

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : Sciences pour l'Environnement Gay Lussac.

Secteur de Recherche : Biologie des organismes ; Biotechnologies
Animales, Végétales et Microbiennes

Présentée par :

Damien AFOUFA-BASTIEN

**Etude de l'expression de gènes codant pour des transporteurs de sucres et
de l'activité de transport au cours d'une interaction Vigne (*Vitis*
vinifera)/champignons pathogènes**

Directeurs de Thèse :
Pierre COUTOS-THEVENOT
Eric GOMES

Soutenue le 30 novembre 2010
devant la Commission d'Examen

JURY

Marie-France CORIO-COSTET	Directeur de recherche INRA, Bordeaux	Rapporteur
Bernard DUMAS	Directeur de recherche CNRS, Toulouse	Rapporteur
Françoise SIMON-PLAS	Directeur de recherche INRA, Dijon	Examineur
Philippe SIMONEAU	Professeur de l'Université d'Angers	Examineur
Rémi LEMOINE	Directeur de recherche CNRS, Poitiers	Examineur
Eric GOMES	Professeur de l'Université de Bordeaux	Examineur
Pierre COUTOS-THEVENOT	Professeur de l'Université de Poitiers	Examineur

Résumé

Chez les plantes supérieures, il est clairement établi que le chargement/déchargement du phloème ainsi que la distribution des sucres au sein des cellules sources et puits sont assurés par des protéines membranaires appelées transporteurs. Les gènes codant pour ces protéines de transport appartiennent à des familles multigéniques. En plus de leur implication dans le développement, plusieurs études imputent aux transporteurs de sucres un rôle dans la réponse des plantes à différentes contraintes de type biotique. Les données actuelles supportent l'idée d'une compétition pour les ressources carbonées, particulièrement les hexoses, entre les deux protagonistes d'un pathosystème. Les données concernant une telle compétition au sein d'un pathosystème nécrotrophe sont encore faiblement étayées.

Dans cette étude, la disponibilité du génome de la vigne (*Vitis vinifera*), récemment séquencé, a offert l'opportunité d'identifier de nombreux transporteurs de sucres ainsi que plusieurs invertases chez cette espèce. Utilisant les séquences protéiques des 53 AtMSTs (transporteurs de monosaccharides), 9 AtSUCs (transporteurs de saccharose) et 6 *AtcwINV* (invertases) d'*Arabidopsis thaliana*, 65 séquences de transporteurs de monosaccharides, 4 séquences de transporteurs de saccharose ainsi que 6 séquences d'invertases ont pu être identifiées. L'analyse phylogénétique des séquences de transporteurs de sucres a révélé une forte conservation de ces gènes entre les deux espèces. Afin de pouvoir étudier simultanément l'expression de plusieurs de ces gènes au sein de la plante, des membranes macroarrays thématiques ont été développées et ont permis mettre en évidence 3 gènes de transporteurs de sucres fortement exprimés dans les organes végétatifs (*VvHT3*, *VvHT11*, *VvPMT5*), 5 gènes régulés au cours du développement de la baie (*VvSUC11*, *VvSUC12*, *VvHT2*, *VvTMT1*, *VvTMT2*), et plusieurs autres gènes plus spécifiquement exprimés dans le pépin (*VvHT3*, *VvHT5*) ou dans la racine (*VvHT2*).

Sur la base de ces données, l'expression des gènes de transporteurs de sucres et d'invertases a été analysée chez la vigne en réponse à une contrainte biotique. Sur plante, l'infection par *Botrytis cinerea* a induit une surexpression du transporteur d'hexoses *VvHT5* et de l'invertase pariétale *VvcwINV1*. L'induction des gènes de défense *VvPR3* et *VvBIG8.1* ainsi que la production de resvératrol ont également été mises en évidence dans les feuilles infectées. Pour compléter les résultats obtenus sur plantes, une suspension cellulaire de vigne cv Chardonnay a été initiée, celle-ci constituant un outil d'étude simplifié. L'infection des cellules de vigne par des conidies de *B. cinerea* a induit une surexpression de 3 gènes de transporteurs d'hexoses, *VvHT1*, -5, -13, ainsi que de l'invertases pariétales *VvcwINV1*. L'induction de ces 4 gènes a également été observée en réponse à trois éliciteurs fongiques : une endopolygalacturonase, un dialysat de culture du champignon et l'ergostérol. Parallèlement à l'induction transcriptionnelle des gènes de transporteurs de sucres, une augmentation de l'influx de glucose a été mesurée dans les cellules traitées par du dialysat. Cette modification du métabolisme carboné s'est aussi accompagnée de l'induction de plusieurs gènes de PR-protéines ainsi que des marqueurs de défense *VvPGIP* et *VvPAL*.

Ces données indiquent que les transporteurs d'hexoses et les invertases de vigne sont impliqués dans la mise en place des mécanismes de défense lors d'une infection par le champignon nécrotrophe *B. cinerea* ou lors d'une élicitation par des éliciteurs fongiques. Cette étude a ouvert de nouvelles perspectives en identifiant des candidats intéressants pour une approche de génomique fonctionnelle. La surexpression de certains gènes de transporteurs de sucres et/ou d'invertases dans des plantules de vigne pourrait en effet démontrer leur rôle dans les phénomènes de tolérance.

Mots-clés : *Vitis vinifera*, *B. cinerea*, transporteurs, sucres, invertases, défense, éliciteurs

Abstract

In higher plants, it is well established that the phloem loading/unloading as well as the distribution of sugars within source and sink cells is occurring by membrane proteins called transporters or carriers. The genes coding for these transport proteins belong to multigenic families. Besides their implication in development, several studies have described a role of sugar transporters in plant response to various biotic stresses. The current data support the idea of a competition for the carbon resources, particularly hexoses, between both protagonists within a pathosystem. The knowledge concerning such a competition within a necrotrophic plant/pathogen interaction is still scarce.

The availability of the recently sequenced genome of *Vitis vinifera* (Pinot Noir) offered the opportunity to identify numerous sugar transporter as well as several invertase sequences in this species. Using the amino acid sequences of the 53 AtMSTs (monosaccharide transporters), 9 AtSUCs (sucrose transporters) and 6 AtcwINVs (invertases) from *Arabidopsis thaliana*, sequences encoding for 65 monosaccharide transporters, 4 sucrose transporters and 6 invertases were identified. Phylogenetic analysis of the sugar transporter protein sequences from *Vitis* and *Arabidopsis* revealed a strong conservation between the two species. In order to simultaneously profile the expression of these transporter genes in different organs, macroarrays were developed and demonstrated that 3 sugar transporter genes are expressed in almost all vegetative organs (*VvHT3*, *VvHT11*, *VvPMT5*), 5 are regulated during berry development (*VvSUC27*, *VvSUC12*, *VvHT2*, *VvTMT1*, *VvTMT2*) and several others are more specifically expressed in seeds (*VvHT3*, *VvHT5*) or in roots (*VvHT2*).

On the basis of these data, the expression of sugar transporter and invertase genes was analyzed in the grapevine during the plant response to a biotic stress. In plant leaves, the infection by *Botrytis cinerea* led to an up-regulation of the hexose transporter gene *VvHT5* and the cell wall invertase gene *VvcwINV1*. Induction of the defense genes *VvPR3* and *VvBIG8.1* as well as production of the phytoalexin resveratrol were also detected in the infected leaves.

To strengthen the results obtained with plants, a cell suspension culture of grapevine cv Chardonnay was established as a simplified tool of study. Infection of the grapevine cells by *B. cinerea* conidia led to the induction of 3 hexose transporter genes *VvHT1*, *5*, *13* as well as cell wall invertase gene *VvcwINV1*. The induction of these 4 genes was also observed in response to three fungal elicitors: an endopolygalacturonase, a *B. cinerea* culture filtrate and ergosterol. Parallel to the transcriptional induction of the hexose transporter genes, an increase in the glucose transport activity was noted in *B. cinerea* filtrate treated cells. This modification of the carbon metabolism occurred in parallel with the induction of several PR-protein genes as well as defense markers *VvPGIP* and *VvPAL*.

Taken together these data indicate that grapevine hexose transporters and cell wall invertases are involved in the implementation of the defense mechanisms during an infection by the necrotrophic fungus *B. cinerea* or an elicitation by fungal elicitors. This study opened new perspectives by identifying interesting candidate genes for a functional genomics approach. Indeed, the overexpression of some sugar transporter and/or invertase genes in grapevine plants could demonstrate their role in tolerance mechanisms.

Key-words: *Vitis vinifera*, *Botrytis cinerea*, transporters, carriers, sugars, invertases, defense, elicitors

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Rémi Lemoine pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire « Transport des Assimilats » devenu « PhyMoTS ». Je le remercie pour sa gentillesse quotidienne, ses conseils avisés en matière de transporteurs de sucres et d'absorption, et surtout pour avoir répondu à mes si nombreuses questions.

Je présente mes remerciements les plus respectueux à mes deux encadrants de thèse Pierre Coutos-Thévenot et Eric Gomès pour m'avoir chaleureusement accueilli au sein de l'équipe « biotique » et pour m'avoir guidé dans mes travaux avec attention. Notre collaboration m'a permis d'enrichir mes connaissances scientifiques et restera un très bon souvenir. Spéciale dédicace à Pierre pour son self-control durant l'assemblage du pdf final.

J'adresse mes remerciements à Marie-France Corio-Costet et Bernard Dumas pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Je remercie également Françoise Simon-Plas et Philippe Simoneau pour leur participation à mes comités de suivi de thèse ainsi que pour avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance.

Je remercie également Marc Fermaud et Marie-France Corio-Costet pour m'avoir gracieusement fourni les souches de *B. cinerea* et *E. necator* utilisées au cours de ce travail. De même, merci à Michel Ponchet et Benoît Poinsot pour leur don de cryptogéine et d'endopolygalacturonase.

Ce travail ne serait pas ce qu'il est sans l'aide précieuse et inestimable de Cécile Gaillard. Cécile, bien qu'il soit difficile de tout résumer en quelques lignes, je tiens à t'exprimer toute ma gratitude pour tout ce que tu as fait pour moi durant ces quatre années. Merci pour t'être investie dans mon projet, pour les centaines de Northern effectuées, les séances de repiquage sous la hotte, la suspension de Chardonnay (on la tient !!), les soirées de discussion dans le bureau et ton soutien au quotidien.

Je remercie très vivement Maryse Laloi, pour sa gentillesse, ses conseils judicieux et pour m'avoir guidé dans les méandres des séquences de transporteurs de sucres et d'invertases. Merci également pour ton travail de relecture au cours de la rédaction de ce mémoire ; ton aide m'a été précieuse et je suis très fier du Chapitre III.

Un grand merci à la plus sympa des Béarnaises Nathalie Pourtau. Ce n'est pas sans un petit pincement au cœur que j'écris ces quelques mots. Merci pour ton soutien quotidien, tes conseils avisés, les moments passés durant les repas du midi, tes anecdotes de post-doc (à quand Camden town ?) et pour notre petite cigarette du soir qui me manquera.

Un petit clin d'œil à Laurence Maurousset (ma Lolo) pour sa gentillesse, pour m'avoir éclairé sur certains points de botanique et pour son excentricité qui a égayé mes repas du midi.



Nathalie, Laurence, je tenais également à vous remercier pour avoir pris en charge certaines de mes surveillances d'examens et pour m'avoir allégé de quelques tas de copies à corriger au cours de ma dernière année de thèse (et d'ATER !). Merci également à Marjorie Juchaux-Cachau pour sa grande pédagogie et ses précieux conseils lors de la préparation de mes TP.

Mes remerciements s'adressent également à Sylvain La Camera pour ses précieux conseils, son dynamisme et surtout son coup de main précieux lors de la mise en page de ce manuscrit.

Un grand merci à Mr Manceau pour m'avoir permis de prélever librement des baies de Chardonnay sur le domaine du S.R.P.V de Biard (86).

Merci à Lucie Sauvaitre (Miip-Miip) pour son aide dans les pesées de mes nombreux tubes d'absorption et le repiquage de mes champignons, Benoît Porcheron pour le passage de mes échantillons en HPLC, Emmanuel Beauchêne pour les gels de protéines et son coup de main dans le repiquage des vignes, Julien Jeauffre et Titi Rousseau pour les expéditions « vignoble » (vive l'azote liquide !) et leur aide dans les extractions d'ARNs, Florence Thibault pour les nombreuses fixations de feuilles de vigne, Emile Béré et Sonia Georgeault pour les observations au MEB, et Daniel Guyonnet pour les nombreux séquençages effectués au cours ce travail de thèse. Je remercie également Magali Lallemand, Jenny Colas, Mélodie Goin et Bruno Faure pour toute l'aide qu'ils ont su m'apporter. J'ai également une pensée affectueuse pour Marie-Thérèse Bidoyen qui nous manque à tous.

Je remercie tous mes collègues de l'unité qui ont su me soutenir et me conseiller : Rossitza Atanassova, Mireille Faucher, Fabienne Dédaldéchamp, Andrée Bourbouloux (ne cherche pas Dédé, il n'y a pas d'occitan dans ce manuscrit !), Jean-Philippe Biolley, Pierrette Fleurat-Lessard (merci pour les photos de *Botrytis* réalisées au MET), Gabriel Roblin et l'équipe des levuristes, Thierry Ferreira, Thierry Bergès et Matthieu Régnacq.

Merci à tous les doctorants du laboratoire pour leur sympathie, leur soutien et les nombreux coups de gueule aussi : Amélie Saumonneau, Céline Vignault, Céline Camps, Thomas Desfougères, Ludovic Pineau, Yves Séré. Un clin d'œil particulier à Christophe Valtaud et Estelle Luini (mes petites tomates) avec qui j'ai passé de très bons moments ; merci à tous les deux pour vos conseils, la découverte de la campagne poitevine, les parties de pêche sur la Charente ainsi que les week-ends très instructifs sur la distillation et le Cognac. Merci aussi à Virginie Portemer (mon *alter ego* pour ce qui est de râler) et Audrey Abot (malgré nos prises de bec, on est tous dans le même bateau. Et puis vive ABBA !). Spéciale dédicace à Anna Medici (Annibabà) pour avoir supporté mon sale caractère et pour m'avoir éclairé sur certains points informatiques. Je suis content d'avoir pu partager le vaste sujet des transporteurs de sucres de la vigne avec toi, nos longs moments de réflexion et d'échange vont me manquer. Enfin, je souhaite bon courage à Cyril Abadie (proche de la fin) ainsi qu'à Dany Mainson et Pauline Lemonnier (qui sont un peu plus loin de la fin).



Je n'oublie pas les stagiaires qui ont également agrémenté le quotidien du labo : Pauline Nouvellon (qui a aussi un squiz dans sa voiture), Emilie Sohier (pour son travail d'analyse sur les séquences de transporteurs et les promoteurs), Amélie Rabot, Emilie Gailledrat, Stevens Ayrault (merci à toi pour ta motivation et ton investissement dans ce travail de thèse), Steven Colas et Thomas Guérinier. Merci à tous pour votre bonne humeur et votre dynamisme.

Merci à la clique du PBS : PO, Arnaud, Jo, Coco ainsi que Julie, Sandrine et Doudou avec qui j'ai passé de bons moments.

Je remercie Geneviève Harika et Sylvie Clercy-Morel pour leur bonne humeur quotidienne, leur soutien et surtout pour leur efficacité redoutable dans la gestion des bons de commande et des papiers administratifs. Vous avoir est un véritable luxe.

Je remercie sincèrement Laurent Fillion et Laurence Héchard pour leur gentillesse et pour m'avoir fait découvrir les ateliers de l'école de l'ADN que j'ai pris plaisir à animer. Merci également à François Baty-Sorel pour ses conseils avisés en termes d'organisation et de valorisation (il reste encore du boulot !).

Une mention particulière pour Titi et Spit pour ces quatre années d'amitié et de soutien. Merci pour toutes les soirées passées à Buxerolles et St Georges les Bx qui m'ont permis de tenir le coup. Titi, je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée lors de la rédaction de ce mémoire, merci pour les figures, la vérification des références (jusqu'au bout de la nuit) et tout le reste (notamment pour m'avoir nourri). Merci aux personnes que j'ai pu croiser chez vous, Priki, Bob, Eve et Emerick, pour leur sympathie et leur soutien.

Un énorme merci à mes proches et amis Troyens qui me manquent et qui m'ont soutenu depuis tout ce temps : Lauriane, Flavie, Coco, Ghis, Bertrand, Anne-Perrine, Elé et Luce (je peux enfin te dire officiellement que les particules cacaiques n'existent pas). J'adresse un remerciement particulier à Aline et Sandrine pour leur soutien et pour m'avoir donné la plus belle raison de continuer.

Enfin, je n'y serais jamais arrivé sans le soutien de ma famille. Je remercie très affectueusement ma maman, mon frère, ainsi que tous les membres de ma famille pour leur soutien moral (et financier) tout au long de mes études malgré un certain flou concernant mes activités de recherche.

Je dédie l'ensemble de ce travail à Nina. Je t'aime.



« Il est plus facile de commencer que de finir »

Plaute

Abréviations

AA	Acides aminés
ABA	Abscissic acid
ACT	Actine
ADN	Acide désoxyribonucléique (c : complémentaire, g : génomique)
AGP	Arabinogalactane
AIA	Acide indole acétique
AMP	Antimicrobial protein/peptide
AOS	Active oxygen species
ARN	Acide ribonucléique
AS	Activité spécifique
ATP	Adénosine tri-phosphate
BAP	6-benzylaminopurine
BBCH	Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt et Chemische Industrie
BET	Bromure d'éthidium
Blast	Basic local alignment search tool
BSA	Bovine serum albumin
BTH	S-methyl benzo[1,2,3]thiazole-7-carbothioate
BTOA	Benzothiazole-2-oxyacetic acid
BY2	Bright Yellow 2
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CC	motif Coiled-Coil
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CFDA	(6,5)-Carboxyfluorescein diacétate
CHS	Chalcone synthase
CSB	Cabernet Sauvignon baies
CTAB	Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
CW-INV	Cell wall invertase
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	Désoxyribonucléotide
DST	Disaccharide transporter
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétate
EF1 α	Elongation factor 1 alpha
EF1 γ	Elongation factor 1 gamma
EndoPG	Endopolygalacturonase
EST	Expressed sequence tag
ET	Ethylène
ETI	Effector-triggered immunity

FAO	Food and agriculture organization
FEH	Fructane exohydrolase
GAPDH	Glycéraldéhyde -3-phosphate déshydrogénase
GAR-HPC	Goat anti-Rabbit IgG – horseradish peroxidase conjugate
GFP	Green fluorescent protein
GIN	Grapevine invertase
GlcT	Plastidic Glucose Transporter
GUS	β -glucuronidase
HALC	High affinity-low capacity
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HEX	Hexose transporter
HPLC	High performance liquid chromatography
HR	Hypersensitive response
IBMIG	Institut de biologie moléculaire et d'ingénierie génétique
INRA	Institut national de recherche agronomique
IPP	Isopentenyl diphosphate
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
ISR	Induced systemic resistance
JA	Jasmonic acid
K_m	Constante de Mickaelis
LAHC	Low affinity-high capacity
LAR	Local acquired resistance
LB	Luria Bertani
LRR	Leucine-rich repeats
LTP	Lipid transfer protein
LVMH	Louis Vuitton, Moët, Hennessy
MAMP	Microbe-associated molecular pattern
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCS	Multiple cloning site
MDB	Maladies du bois
MES	N-morpholino-2-ethanesulfonic acid
MFS	Major facilitator superfamily
MOPS	N-morpholino-3-propane sulfonic acid
MS	Murashige et Skoog
MST	Monosaccharide transporter
N/A-INV	Neutral/Alkaline invertase
NB	Nucleotide binding
NCBI	National center for biotechnology information
NOA	β -naphtoxyacétic acid
OEPP	Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes
OGA	Oligogalacturonide
OIV	Organisation internationale de la vigne et du vin
Oligo (dT)	Oligo-désoxythymine

PAL	Phénylalanine ammonialyase
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PCD	Programmed cell death
PCR	Polymerase chain reaction
PCV	Packed cell volume
PGIP	Polygalacturonase inhibitor protein
PLACE	Plant cis-acting elements
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PMT	Polyols monosaccharide transporter
PPPL	Pageruler prestained protein ladder
PPPS	Precision plus protein standard
PR	Pathogenesis related
PRR	Pattern recognition receptors
PTI	PAMP-triggered immunity
PVPP	Polyvinyl polypyrrolidone
RNasin	Ribonuclease inhibitor
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse transcription
S.R.P.V	Service régional de la protection des végétaux
SA	Salicylic acid
SAR	Systemic acquired resistance
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOB	Super optimal broth
SOC	Super optimal broth (with glucose)
SPS	Sucrose phosphate synthase
SSC	Standard sodium citrate
ST	Sugar transporter
STP	Sugar transport protein
Stsy	Stylbène synthase
SUF	Sucrose facilitator
Susy	Sucrose synthase
SUT/SUC	Sucrose transporters/carrier
TFA	Trifluoroacetic acid
TIGR	The insitute for genomic research
TIR	Toll/interleukin-1-receptor
TM	Température d'hybridation
TMT	Tonoplast monosaccharide transporter
TMV	Tobacco mosaic virus
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-amino méthane
UDP	Uridine diphosphate
UGFT	UDP-glucose-flavonoïde-3- <i>O</i> -glucosyl transférase

UMR	Unité mixte de recherche
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolets
VGT	Vacuolar glucose transporter
V-INV	Vacuolar invertase
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
2,4D	2,4-dichlorophénoxyacétique acid

Unités et facteurs de multiplication

°C	Degré Celsius
μ	Micro (10^{-6})
Ω	Ohm
A	Absorbance
Bq	Becquerel
Da	Dalton
g	Gramme
h	Heure
hpi	Heures post-inoculation
jpi	Jours post-inoculation
k	Kilo
L	Litre
m	milli (10^{-3})
M	Molaire (mole/Litre)
min	Minute
Pa	Pascal
pb	Paire de bases
pH	potentiel Hydrogène
pI	point Isoélectrique
p/v	Poids/volume
rpm	Rotations par minute
sec	Seconde
SAF	Semaines après floraison
U	Unité enzymatique
V	Volt
v/v	Volume/volume

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS

1. Aux origines de la vigne et du vin	i
1.1. Un peu d'histoire	i
1.2. La domestication de la vigne	ii
1.2.1. De <i>sylvestris</i> à <i>sativa</i>	ii
1.2.2. Naissance de la viticulture	iv
1.2.3. <i>Vitis vinifera</i> à la conquête du monde.....	v
1.3. Des racines américaines : sauvetage du vignoble mondial	viii
2. La France dans la viticulture mondiale	x

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Présentation, développement et physiologie de la vigne	1
1.1. Taxonomie et biodiversité de la vigne	1
1.2. Cycle de développement de la vigne	3
1.2.1. Cycle végétatif de la vigne	3
1.2.2. Cycle reproducteur de la vigne	4
1.3. Structure et développement physiologique de la baie de raisin	5
1.3.1. Structure de la baie de raisin	5
1.3.2. Développement physiologique de la baie de raisin.....	5
2. Le transport chez les plantes supérieures	10
2.1. Importance de l'eau dans le développement des fruits	11
2.2. Cas particulier de la baie de raisin : réduction du flux xylémien	11
2.2.1. Intégrité du xylème au cours de la maturation	11
2.2.2. Compartimentation et viabilité cellulaire au cours de la maturation.....	12
2.3. Transport phloémien des photoassimilats	13
2.3.1. Synthèse et formes de glucides transportés.....	13
2.3.2. Structure du complexe conducteur	13
2.3.3. Chargement du complexe conducteur	14
2.3.4. Déchargement du complexe conducteur	15
2.3.5. Force de puits et déchargement du phloème de la baie de raisin	16
3. Les transporteurs de sucres chez les végétaux supérieurs : classification et rôle dans le développement	18
3.1. La "Major Facilitator Superfamily"	18

3.2. Les transporteurs de disaccharides	20
3.2.1. Les transporteurs de saccharose chez la vigne	22
3.3. Les transporteurs de monosaccharides	24
3.3.1. Sous-famille des STPs (Sugar Transport Proteins)	26
3.3.2. Sous-famille des AtVGTs (Vacuolar Glucose Transporters)	27
3.3.3. Sous-famille des AtTMTs (Tonoplast Monosaccharide Transporters)	28
3.3.4. Sous-famille des AtpGlcT (Plastidic Glucose Transporters)	29
3.3.5. Sous-famille des AtPLTs (Polyol Transporters) ou AtPMTs (Polyols Monosaccharide Transporters)	30
3.3.6. Les transporteurs de monosaccharides chez la vigne	31
4. Les Invertases : des enzymes clés dans la répartition des sucres et le développement.....	34
4.1. Les invertases acides (CW-INV et V-INV)	34
4.2. Les invertases neutres/alcalines (N/A-INV).....	37
4.3. Les invertases chez la vigne.....	39
5. La pourriture grise et l'oïdium : deux maladies cryptogamiques importantes de la vigne.....	41
5.1. La pourriture grise / <i>Botrytis cinerea</i>	41
5.2. L'oïdium / <i>Erysiphe necator</i>	43
6. Mécanismes de défenses des plantes	45
6.1. La résistance non-hôte	45
6.2. La résistance race/cultivar spécifique	47
6.3. Voies de signalisation impliquées dans la mise en place des défenses	48
6.4. Mécanismes conduisant à la résistance des plantes.....	50
6.4.1. Renforcement de la paroi végétale.....	50
6.4.2. La Réponse Hypersensible.....	51
6.4.3. Accumulation des composés de défense.....	52
7. Problématique scientifique et objectifs généraux.....	56

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel Biologique	59
1.1. Matériel végétal	59
1.1.1. Culture de vitroplants de Chardonnay.....	59
1.1.2. Culture de vigne en système aéroponique.....	59

1.1.3.	Culture de vigne en serre	59
1.1.4.	Obtention d'embryons somatiques de Chardonnay.....	60
1.1.5.	Prélèvements de baies de raisin.....	60
1.1.6.	Culture de cellules.....	61
1.2.	Matériel fongique	62
1.2.1.	<i>Botrytis cinerea</i>	62
1.2.2.	<i>Alternaria brassicae</i>	62
1.2.3.	<i>Erysiphe necator</i>	63
1.3.	Matériel éliciteur	64
1.3.1.	Un éliciteur fongique général : l'ergostérol	64
1.3.2.	Une élicitine : la cryptogéine.....	64
1.3.3.	Une glycoprotéine élicitrice : l'endopolygalacturonase.....	64
1.3.4.	Un mélange protéique : le dialysat de culture de <i>B. cinerea</i>	64
1.4.	Souches bactériennes : <i>Escherichia coli</i> XL1-blue et DH5α	66
1.5.	Vecteurs de clonage.....	66
1.5.1.	Le plasmide pGEM [®] -T Easy	66
2.	Méthode d'infection/élicitation et procédure de prélèvement	67
2.1.	Infection des plantes cultivées en serre et en aéroponie par <i>B. cinerea</i>	67
2.2.	Infection des vitroplants de Chardonnay	67
2.2.1.	Infection par <i>B. cinerea</i>	67
2.2.2.	Vérification des postulats de Koch	68
2.2.3.	Infection par <i>E. necator</i>	69
2.3.	Infection et élicitation des cellules de vigne en suspension	69
3.	Evolution des paramètres cultureux	69
3.1.	Mesure de la croissance des cellules de Chardonnay.....	69
3.2.	Dosage des sucres par HPLC.....	70
3.3.	Mesure de l'osmolarité du milieu de culture	70
4.	Méthodes de biologie moléculaire	71
4.1.	Extraction, synthèse et purification d'acides nucléiques	71
4.1.1.	Extraction d'ADN génomique à partir de mycélium	71
4.1.2.	Extraction d'ADN génomique à partir de feuilles de vigne	71
4.1.3.	Extraction d'ARNs totaux à partir de plantes et de cellules de vigne	72
4.1.4.	Traitement à la DNase et purification des ARNs totaux.....	73
4.1.5.	Synthèse d'ADN complémentaire à partir d'ARNs totaux	73
4.1.6.	Dosage des acides nucléiques au spectrophotomètre.....	74

4.1.7.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	74
4.2.	La PCR : technique d'identification et d'amplification de fragments d'intérêt	75
4.2.1.	Définition des amorces.....	75
4.2.2.	Identification de <i>B. cinerea</i>	75
4.2.3.	Amplification de fragments d'ADN d'intérêt.....	76
4.3.	Technique de clonage	77
4.3.1.	Purification des fragments d'intérêt.....	77
4.3.2.	Ligature des fragments d'intérêt dans le pGEM®-T Easy	77
4.3.3.	Transformation de bactéries	77
4.3.4.	Minipréparation d'ADN plasmidique	79
4.3.5.	Vérification de l'intégration de l'insert.....	79
4.3.6.	Séquençage des clones d'intérêt.....	80
5.	Etude de l'expression de gènes d'intérêt	81
5.1.	Analyse par Northern blot	81
5.1.1.	Séparation des ARNs totaux en conditions dénaturantes	81
5.1.2.	Transfert des ARNs sur membrane de nylon.....	81
5.1.3.	Synthèse de fragments « sondes » radioactifs	81
5.1.4.	Hybridation, lavages et exposition des membranes	82
5.2.	Analyse par macroarrays	83
5.2.1.	Production de fragments spécifiques des gènes d'intérêt.....	83
5.2.2.	Dépôt des fragments spécifiques sur membrane de nylon	83
6.	Méthodes de biochimie	85
6.1.	Analyse de protéines	85
6.1.1.	Préparation de fractions microsomales	85
6.1.2.	Dosage de protéines au spectrophotomètre	85
6.1.3.	Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE.....	85
6.1.4.	Coloration des protéines au nitrate d'argent après migration sur gel SDS- PAGE 12%	86
6.1.5.	Transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose	86
6.1.6.	Immuno-détection de la protéine VvHT1	87
6.2.	Mesures d'absorption de sucres radiomarqués par les cellules de Chardonnay	87
6.2.1.	Mesure d'absorption de glucose sur une cinétique courte.....	87

6.2.2. Mesure d'absorption de glucose et de saccharose 4 heures après l'inoculation	88
6.3. Extraction du resvératrol produit dans les feuilles de vigne	89
6.4. Dosage du resvératrol par chromatographie inverse.....	89
7. Techniques de microscopie	89
7.1. Observation au microscope classique	89
7.2. Observation à la loupe binoculaire.....	90
7.3. Observation en microscopie électronique à balayage.....	90
8. Analyses <i>in silico</i>	90

CHAPITRE I

1. Impact d'une infection par <i>Botrytis cinerea</i> sur l'expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres.....	93
1.1. Identification du mycélium de <i>B. cinerea</i> par PCR	93
1.2. Infection de feuilles de vignes cultivées en serre	93
1.3. Infection de vignes en système aéroponique	94
1.3.1. Recherche de gènes différentiellement exprimés entre plantes infectées et plantes saines	95
1.4. Infection de plantules de vigne en système <i>in vitro</i>	97
1.4.1. Test d'identification de <i>B. cinerea</i> par PCR	97
1.4.2. Infection et suivi des symptômes sur vitroplants de vigne.....	98
1.4.3. Observation des différents stades développementaux de <i>B. cinerea</i> au cours de l'infection	98
1.4.4. Ré-isolément du champignon et validation de l'expérimentation.....	99
1.4.5. L'infection <i>in vitro</i> par <i>B. cinerea</i> induit-elle une réponse de la plante avant la mort des tissus ?.....	100
1.5. Réponses sur baies naturellement infectées au vignoble	102
2. Analyse des réponses de la vigne dans le cas d'une interaction biotrophe.	103
2.1. Développement de l'oïdium sur feuilles de vigne	103
2.2. Production de resvératrol par les feuilles oïdiées	104
2.3. Mise en place de défenses et induction de gènes du métabolisme carboné en réponse à <i>E. necator</i>	104
3. Discussion	105

3.1. Développement de la pourriture grise sur feuilles de vignes cultivées en serre	105
3.1.1. Symptômes foliaires et germination du champignon.....	105
3.1.2. Développement de symptômes anormaux sur feuilles.....	107
3.2. Développement de la maladie en système aéroponique	107
3.2.1. Croissance du champignon et apparition des symptômes.....	107
3.2.2. L'infection par <i>Botrytis</i> induit-elle des réponses dans les feuilles ?.....	109
3.3. Effet de la pourriture grise sur l'expression des gènes de la vigne cultivée en système <i>in vitro</i>	111
3.3.1. Remplacement de la souche 916T par la souche 112T de <i>B. cinerea</i>	111
3.3.2. Développement des symptômes de la pourriture grise en système <i>in vitro</i>	112
3.3.3. Les symptômes sont corrélés au développement de <i>Botrytis</i>	114
3.3.4. Induction de réactions de défense face à « l'intrus »	114
3.3.5. "HR or not HR ?"	115
3.3.6. Induction d'une réponse systémique par <i>Botrytis</i>	116
3.3.7. L'infection par <i>Botrytis</i> induit des gènes codant pour un transporteur de sucres ainsi qu'une invertase pariétale.....	118
3.4. Les réponses de la vigne face à <i>E. necator</i> sont communes à celles observées avec <i>B. cinerea</i>	119
3.4.1. Développement de l'oïdium en système <i>in vitro</i>	119
3.4.2. Activation des réactions de défense en réponse à <i>E. necator</i>	120
3.4.3. Les gènes <i>VvHT5</i> et <i>VvcwINV</i> sont induits en réponse à l'oïdium	121
3.5. Vers une évolution du système biologique	121
 CHAPITRE II	
1. Mise en place de la suspension cellulaire	123
1.1. Choix de l'explant	123
1.2. Initiation de cals sur milieux solides.....	124
1.3. Ensemencement direct d'explants en culture liquide.....	127
1.4. Protocole d'initiation de la suspension cellulaire de Chardonnay.....	129
2. Caractérisation de la suspension cellulaire de Chardonnay	129
2.1. Etude de la croissance	129
2.2. Evolution de la concentration en sucres du milieu durant le cycle de croissance cellulaire	131
2.3. Evolution de l'osmolarité du milieu de culture	132
2.4. Evolution du pH du milieu de culture	132

2.5. Observation microscopique des cellules de Chardonnay	133
3. Discussion	133
3.1. Induction de la callogenèse	134
3.1.1. Callogenèse à partir des feuilles	134
3.1.2. Callogenèse à partir des baies de raisin	136
3.1.3. Callogenèse à partir d'embryons somatiques, de tiges et de pétioles	136
3.1.4. Influence du milieu de culture : le milieu MS.....	138
3.1.5. Influence du milieu de culture : les milieux MS NH ₄ /2 et MS/2.....	140
3.2. Initiation de la suspension cellulaire de Chardonnay	142
3.2.1. Initiation à partir de cals obtenus sur milieux solides	142
3.2.2. Initiation de la callogenèse à partir d'explants ensemencés en milieu liquide..	143
3.3. Croissance des cellules de Chardonnay et évolution du milieu au cours de la culture	144
4. Conclusion : Chardonnay, un cépage récalcitrant ?	148

CHAPITRE III

1. Les transporteurs de sucres chez la vigne : une famille multigénique...152

ARTICLE

2. Les invertases chez la vigne : Identification et profil d'expression153

2.1. Identification de séquences codantes pour des invertases pariétales153

2.2. Expression des gènes VvcwINVs et VvGINs dans différents organes de la vigne au cours du développement.154

2.2.1. Expression dans les organes végétatifs..... 154

2.2.2. Expression dans les baies en maturation et les pépins..... 155

3. Discussion

3.1. Recherche exhaustive de séquences codant pour des invertases157

3.2. Expression des gènes codant pour des invertases dans les organes végétatifs de la vigne.....157

3.2.1. Analyse dans les jeunes feuilles et les feuilles de vigne..... 157

3.2.2. Analyse dans les pétioles et les tiges de vigne..... 159

3.2.3. Analyse dans les racines et les vrilles 160

3.3. Etude du profil d'expression des gènes codant pour des invertases au cours du développement des baies de raisin161

3.3.1.	Analyse dans les baies épépinées	161
3.3.2.	Analyse dans les pépins	163
4.	Conclusion.....	164
 CHAPITRE IV		
1.	Mise en place d'une contrainte biotique sur des cellules de vigne en suspension	165
1.1.	Obtention d'un dialysat de culture de <i>Botrytis cinerea</i>	165
1.2.	Mise en évidence de réactions de défense dans les cellules de vigne élicitées	166
1.2.1.	Analyse d'expression de gènes de défense par macroarray	166
1.2.2.	Confirmation de l'induction de gènes de défense par Northern blot.....	167
2.	Recherche de gènes codant pour des transporteurs de sucres et des invertases différemment exprimés en réponse à une élicitation	168
2.1.	Crible global par macroarrays.....	168
2.2.	Confirmation de l'induction transcriptionnelle des gènes candidats par Northern blot.....	169
3.	Effet d'un traitement éliciteur sur l'activité de transport de sucres.....	170
3.1.	Effet à court terme sur le transport d'hexoses	170
3.2.	Comparaison de l'efficacité d'inhibition du transport de glucose par la cryptogéine sur cellules de vigne et de tabac	172
3.3.	L'induction des gènes de transporteurs de sucres lors d'un traitement éliciteur a-t-elle un impact sur l'activité de transport ?.....	173
3.3.1.	Effet sur le transport de glucose.....	173
3.3.2.	Accumulation de la protéine VvHT1 dans les cellules de Chardonnay traitées par du dialysat de culture de <i>Botrytis</i>	174
3.3.3.	Effet du dialysat de culture de <i>Botrytis</i> sur le transport de saccharose.....	174
4.	Discussion	175
4.1.	Des éliciteurs fongiques ainsi que des conidies de <i>B. cinerea</i> induisent l'expression de gènes de défense dans les suspensions cellulaires de vigne.....	175
4.2.	Induction des gènes codant pour des transporteurs de sucres et des invertases en réponse à une élicitation	178
4.3.	Effet d'un traitement éliciteur sur le transport des sucres	180
4.3.1.	Inhibition précoce du transport de glucose par les éliciteurs fongiques	180

4.3.2. Quels sont le ou les transporteur(s) cible(s)?.....	182
4.3.3. L'induction des gènes codant pour des transporteurs d'hexoses entraîne une augmentation de l'activité de transport.....	183
4.4. Invertases, qu'en est il réellement?	184
5. Quel est le rôle physiologique de l'induction de <i>VvHT5</i> et <i>VvcwINV</i>?	185
5.1. Les Champignons : des compétiteurs pour les sucres.....	185
5.2. Mobilisation des sucres au cours des défenses : rôle des transporteurs et des invertases pariétales.....	187
Conclusion générale et perspectives.....	191
Références bibliographiques	195
Annexes.....	227

Avant Propos

La vigne et le vin : Une histoire de tradition et de terroir



Figure 01 : Feuille de vigne fossile. Cette feuille de vigne fossilisée, de 6,6 cm de long (pétiole compris) a été trouvée dans le Montana (Beaverhead County, Etats-Unis). Celle-ci date de 38 à 23 millions d'années (éocène) et ne présente aucune différence avec certaines espèces de *Vitis* actuelles (d'après Yahya, 2006).

1. Aux origines de la vigne et du vin

1.1. Un peu d'histoire

« C'est à la vigne que commence le vin. Sans elle, il n'existerait pas » (Malnic, 2004). Parce que la vigne et le vin sont culture et civilisation, la première partie de ce mémoire retrace une part de sa fabuleuse histoire à travers les siècles.

Il est évidemment impossible de connaître l'origine exacte de la famille des Vitacées, ni l'ordre d'apparition sur Terre des différents genres (Galet, 2000) mais si l'histoire du vin précéda l'écriture dans la vie des Hommes, celle de la vigne plonge ses racines jusque dans l'ère secondaire. Historiquement, certains restes fossilisés de *Cissus* (genre actuellement le plus nombreux) attestent que les premiers représentants de la famille des Vitacées (*Cissites*, *Ampelophyllum*) pourraient remonter à l'ère secondaire, à la fin du crétacé, soit environ 140 million d'années avant notre ère, dans les forêts qui couvraient alors notre planète au Nebraska, en Chine, au Portugal, en Bohême, en Croatie et en Italie. Cependant, ces premières empreintes ne sont pas très sûres (Galet, 2000) et les échantillons foliaires fossilisés sont contestés. Ils pourraient en effet provenir d'autres plantes comme les platanes, tilleuls ou érables comme l'a suggéré Kirchheiner en 1939. Seule la datation de fragments de feuilles de *Cissus*, d'*Ampelopsis* et de *Vitis*, découverts en Amérique ou en Europe, est incontestable : début de l'ère tertiaire, éocène inférieur (Fig.01).

Les plus vieilles espèces de *Vitis* connues ont été trouvées en Asie (Chine, Japon) et en Amérique (Alaska, Etats-Unis), ainsi qu'en Champagne dans les travertins (roches calcaires) de Sézanne, remontant au début de l'éocène. Celles-ci sont nommées *Vitis sezannensis* Sap. et datent d'environ 65 millions d'années (Galet, 2006). Les espèces ancestrales les plus nombreuses appartiennent quant à elles au miocène (25 millions d'années avant J.-C.) car le climat très doux de cette période géologique a favorisé la diffusion de la vigne, même dans les régions où elle n'existe plus aujourd'hui : Islande (*V. islandica* Heer), Groenland (*V. olriki* Heer et *V. artica* Heer), Alaska (*V. alaskana* Heer, *V. crenata* Heer), Angleterre (*V. Hookeri* Heer et *V. britannica* Heer) (Galet, 2000). En France, on a pu trouver *V. sequanensis* Sap. dans les tufs de Vesoul, en Haute-Saône. Plus au sud, on peut citer *V. praevinifera* Sap. trouvée au mont Charrey, en Ardèche, qui préfigure les vignes européennes actuelles. D'autres espèces ont été découvertes en Allemagne comme *V. teutonica* Braun, *V. Braunii*



Figure 02 : Vigne sauvage à la cime des arbres. Les vignes sauvages peuvent encore occasionnellement être observées sur la canopée des arbres des Pyrénées (flèche) (d'après This *et al.*, 2006)

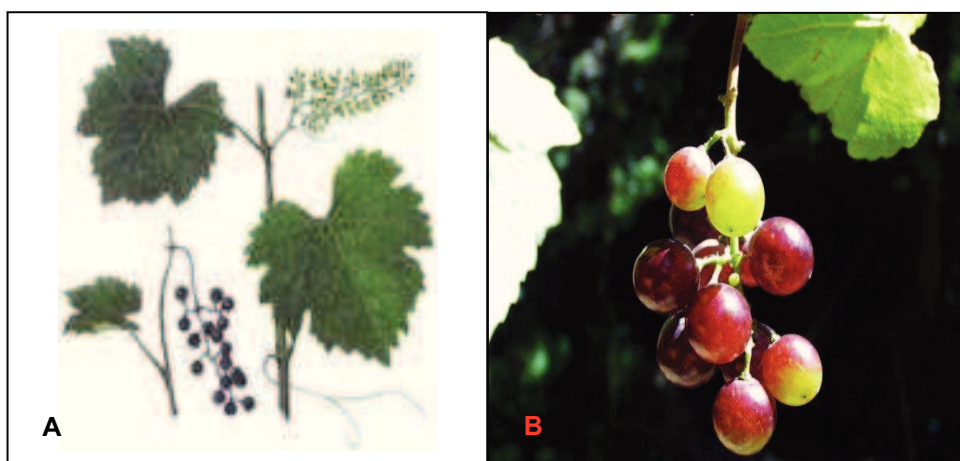


Figure 03 : *Vitis vinifera sp silvestris*. La vigne sauvage n'a pas un aspect très différent de la vigne cultivée (A). Cette espèce pousse en lisière des bois rampant sur le sol ou s'agrippant à d'autres plantes, parfois jusqu'aux cimes des arbres. Les plantes femelles peuvent présenter des raisins, les grappes étant généralement petites (B).

Ludw, V. Ludwigii Braun. Il s'agissait encore de vignes sauvages ne donnant pas de raisins pouvant être mangés ni vinifiés, mais ces *Vitis* engendrèrent les variétés de vignes à vin, les *Vitis vinifera*, qui allaient donner au cours des millénaires, les nombreux cépages aujourd'hui utilisés par les vignerons.

1.2. La domestication de la vigne

1.2.1. De *sylvestris* à *sativa*

La vigne sauvage ou encore « lambrusque » (*ampelos argia, labrusca, Vitis sylvestris* ou *silvestris*) désigne toute vigne croissant apparemment à l'état sauvage. Il existe trois sortes de lambrusques : les lambrusques post-culturelles qui ne font que prolonger une vigne préalablement établie mais dont la culture a été abandonnée par la suite, les lambrusques subspontanées nées dans un sol inculte à partir de pépins provenant de cultures, et les lambrusques spontanées qui représentent un élément naturel de notre flore (Levadoux, 1956). Par son allure générale, le *sylvestris* ne se distingue pas sensiblement du type cultivé *sativa*. Son aspect est celui de toute vigne croissant à l'état sauvage rampant sur le sol, tapissant les rochers, s'élevant sur les arbustes des maquis et des garrigues méditerranéennes, ou encore s'élançant vigoureusement jusqu'aux cimes des arbres les plus élevés (Fig. 02). Leurs grappes sont généralement petites ou moyennes (Fig. 03), à baies lâches, foncées et acerbes, et grâce à leur dispersion relative, elles échappent aux atteintes des parasites.

Bien qu'indéterminée, la domestication progressive de la vigne sauvage en vigne cultivée s'est faite lentement par des voies qui laissent encore planer bien des incertitudes. Les raisins produits par les lambrusques sont des fruits médiocres et la vigne sauvage se prête mal à une mise en culture immédiate. C'est en effet une plante dioïque, dont les plants femelles demandent le voisinage immédiat de plants mâles pour fructifier ; c'est d'autre part une plante dont l'hétérozygotie est telle qu'elle doit être propagée végétativement. Concurrencée par de nombreuses autres essences sous les climats méditerranéens (figuier, palmier-dattier, grenadier) et par de nombreuses plantes à baies des régions tempérées, la vigne n'avait que peu de chance de rentrer en culture. Des expérimentations répétées n'ont pu s'exercer efficacement qu'en utilisant un riche matériel botanique naturel (Albert *et al.*, 1988). La Transcaucasie, berceau supposé de *V. vinifera*, était d'ailleurs une région regroupant plusieurs dizaines de variétés sauvages de *V. vinifera* ainsi qu'une gamme de climats qui n'ont pu qu'élargir les potentialités comme terre d'expériences. Lorsque les Hommes eurent découvert

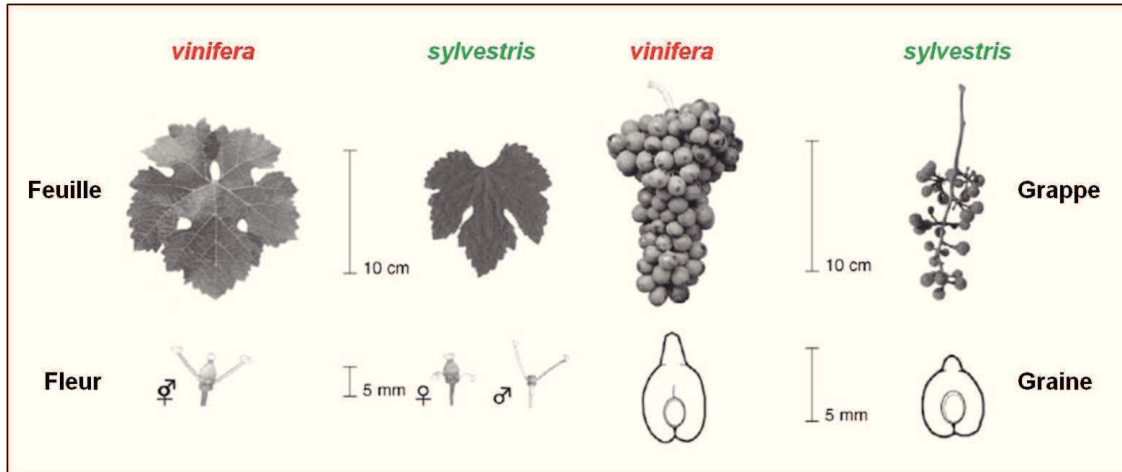


Figure 04 : Différences morphologiques entre les vignes cultivées et sauvages. Plusieurs différences peuvent être observées entre les espèces cultivées et sauvages de vigne notamment au niveau des feuilles, des fleurs, des grappes à maturité et des graines (d'après This *et al.*, 2006).

qu'on pouvait obtenir, à partir de grappes écrasées de lambrusques, une boisson alcoolique de bonne conservation et de goût agréable, la mise en culture de la vigne s'imposa et captiva les peuples antiques des grandes civilisations d'Asie occidentale (Levadoux, 1956 ; Vidal, 2001). Ainsi, durant sa domestication, la biologie de la vigne allait subir plusieurs changements afin d'obtenir un meilleur contenu en sucre pour une meilleure fermentation, de meilleurs rendements et une production plus régulière (Fig. 04 ; This *et al.*, 2006).

De nombreuses incertitudes subsistent encore sur la localisation et la période de domestication de la vigne. Plusieurs événements secondaires et indépendants de domestication apparaissent évidents. A l'heure actuelle, l'augmentation des ressources génétiques disponibles chez la vigne permettent d'analyser la diversité génétique de cette plante et de mieux comprendre son évolution et son développement historique par des approches de phylogéographie. L'analyse de la quantité et de la distribution de la variation génétique au sein des populations cultivées (*sativa*) et sauvages (*sylvestris*) peuvent alors aider à comprendre le ou les processus de domestication de la vigne, et de déterminer ou remettre en cause les centres d'origine de certains cépages actuels.

Par exemple, une analyse conduite à l'aide de *loci* microsatellites sur des vignes sauvages et cultivées, a montré que deux cépages italiens (Bovale Murru et Bovale Muristellu) présents en Sardaigne, étaient génétiquement très proches des variétés sauvages locales contrairement à d'autres cépages cultivés de Toscane et Calabre (Grassi *et al.*, 2003). Considérant la position géographique de l'île et les faibles échanges culturels avec le continent au cours de son histoire, il apparaît évident que la Sardaigne puisse constituer un foyer secondaire de domestication de la vigne à partir des espèces sauvages autochtones. Plus récemment, cette notion de sélection et de domestication multi-locale des *sylvestris* a été renforcée par une étude du génome chloroplastique de plusieurs vignes cultivées et sauvages d'Eurasie (513 *sativa* et 688 *sylvestris* de 130 localités) (Arroyo-Garcia *et al.*, 2006). En analysant la diversité et la répartition des chlorotypes au sein des populations de *sylvestris* et *sativa*, les auteurs ont ainsi mis en évidence l'existence d'une contribution génétique des populations de *sylvestris* de l'Est et de l'Ouest dans la formation génétique des cépages européens actuellement cultivés. Ceci implique une domestication de la vigne indépendante à l'Est et à l'Ouest de l'Europe : une origine liée aux populations de *sylvestris* du Proche et Moyen Orient, et une origine liée aux populations de *sylvestris* de l'Ouest de la méditerranée

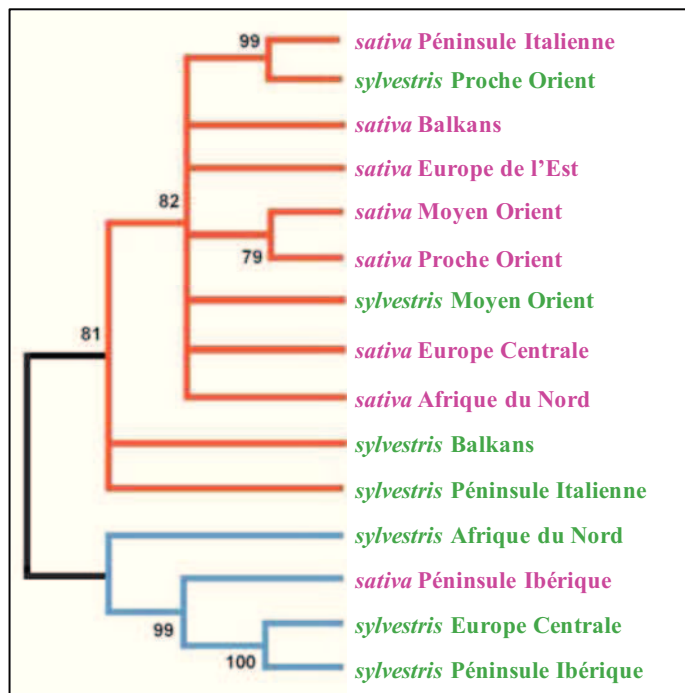


Figure 05 : Relations génétiques entre les populations de *sylvestris* et *sativa* de la vigne échantillonnées en Eurasie. L'arbre a été construit en utilisant la méthode Neighbour-Joining après calcul des distances Dmyu pour toutes les combinaisons de populations deux à deux. Les bootstraps supérieurs à 70 sont indiqués. Les principaux clusters sont colorés en rouge et bleu. Les groupes populationnels de *sylvestris* sont indiqués en vert, ceux de *sativa* en magenta (d'après Arroyo-Garcia *et al.*, 2006).

(Péninsule Ibérique, Europe Centrale et Afrique du Nord), cette dernière aboutissant probablement aux vignes cultivées de l'Ouest européen (Fig.05).

1.2.2. Naissance de la viticulture

Alors que les paléobotanistes situent l'apparition de la vigne à la fin de la période crétacée (ère secondaire) ou au début de l'éocène (ère tertiaire), la transformation graduelle des vignes sauvages en vignes cultivées appartient à l'histoire plus récente de l'humanité (Vidal, 2001).

Lors de son apparition sur Terre (entre 2,5 et 3 millions d'années avant J.-C.), l'Homme trouve la vigne sauvage et découvre probablement rapidement la comestibilité des baies de lambrusques qu'il commence à collecter dès le Paléolithique inférieur (entre 500 000 et 120 000 ans avant notre ère). La présence de pépins près de Nice (station de *Terra Amata*) atteste de cette consommation de raisins 400 000 ans avant J.-C. Ces premiers raisins ramassés par les Hommes proviennent de souches qui se sont développées spontanément et qui sont probablement issues de semis naturels réalisés au hasard.

Au Mésolithique (10000-9000 ans avant J.-C.) et surtout au Néolithique, âge de la pierre polie (6000 – 3000 ans avant J.-C.), l'Homme abandonne le nomadisme et devient agriculteur. Les premiers essais culturels n'intéressaient qu'un petit nombre de plantes alimentaires (orge et blé), des plantes textiles (lin, chanvre) et quelques légumes. Les plantes fruitières en étaient exclues. Cependant, les Hommes du néolithique consommaient des fruits comme la baie de raisin, comme permettent de l'affirmer de nombreux vestiges et des tas de pépins retrouvés au voisinage de leur « habitat » (Levadoux, 1956). C'est probablement à cette époque, entre 6000 et 8000 avant notre ère, qu'il découvre accidentellement le vin, des raisins entassés dans une jarre se mettant à fermenter spontanément (Galet, 2000). Bien qu'il ne reste plus rien de Jéricho, la plus vieille ville du monde (Cisjordanie), des vestiges de raisin et même de pressoirs datant de neuf mille ans avant notre ère y ont été trouvés (Pigeat, 2000). Ceci atteste que les premiers Hommes utilisaient les baies des vignes sauvages et connaissaient l'art de presser les grappes. En Mésopotamie, les Sumériens cultivaient la vigne et distinguaient même les vins de plaine des vins de coteaux établissant peut-être ainsi le premier lien entre vin et paysage.

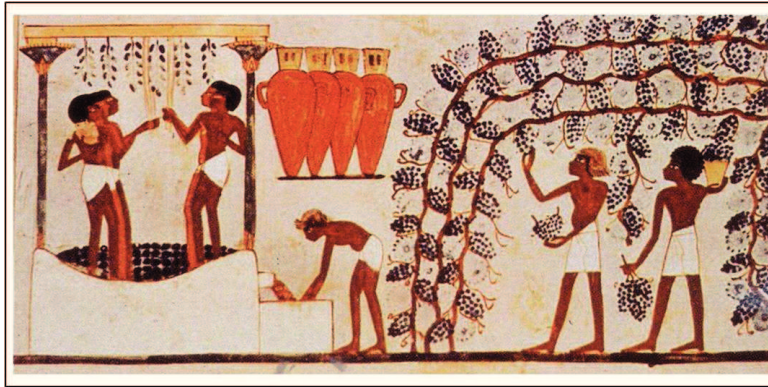


Figure 06 : Vendanges sous la XVIII^{ème} dynastie (1590-1390 avant J.-C.) en Egypte. En Egypte, la culture de la vigne est très ancienne. Les vins étaient réservés à Pharaon ainsi qu'aux rites funéraires. Les grappes étaient cueillies à la main ou à l'aide de couteaux puis foulées au pied. Les vins étaient conservés dans des jarres enduites de poix.

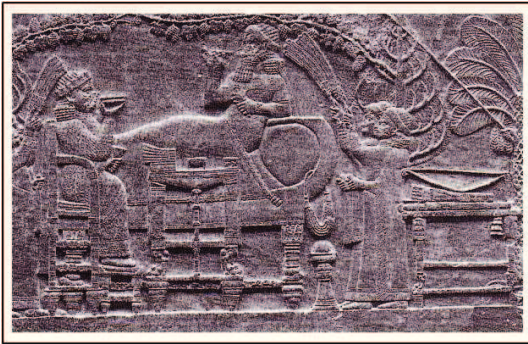


Figure 07 : Banquet sous la treille à Babylone. Les babyloniens étaient réputés pour être de solides buveurs. La boisson nationale était la bière mais certains textes, comme le code d'Hammourabi que l'on peut voir au Louvre, mentionnent des boutiques à vins où les habitants de Babylone allaient se désaltérer.

Figure 08 : Culture de la vigne dans la Grèce antique. Une femme grecque arrose une vigne en compagnie d'un jeune faune. (D'après le *Recueil des dessins d'ornements d'architecture de la manufacture de Joseph Breugnat*, vers 1813).



Figure 09 : La vente de vin en Gaule. Le propriétaire gaulois est autorisé à vendre chez lui les surplus de vins récoltés sur ses terres, mais sans « faire taverne » : le vin est à emporter, l'acheteur ne franchit pas le seuil de la demeure. Les chalands peuvent se fournir en vin au jour le jour. (II-III^e siècle, musée archéologique de Dijon).

Il y a 5000 ans, nombreux sont ceux qui ont compris comment faire le vin et le plaisir qu'on pouvait en tirer. En Egypte, cinq types de vins étaient offerts au pharaon et servaient en outre à l'usage funéraire. Les reliefs et les peintures qui ornent les tombeaux et certains temples décrivent avec précision les travaux de la vigne (Fig. 06), la fabrication et la conservation du vin dès l'Ancien Empire Egyptien (2700-2200 av. J.-C.) et jusqu'à la fin du I^{er} millénaire avant l'ère chrétienne (Malnic, 2004). La vigne est aussi en bonne place dans les jardins de Babylone (Fig. 07) : elle commence à être reconnue comme un élément du paysage (Pigeat, 2000).

1.2.3. *Vitis vinifera* à la conquête du monde

Le développement du commerce maritime dans la Méditerranée antique va permettre à la viticulture de dépasser le cadre du Proche-Orient pour s'étendre à l'ensemble de l'Europe (Albert *et al.*, 1988). Les grecs donnent à la viticulture et au commerce du vin une ampleur antérieurement inégalée, jusqu'à leur soumission et à la domestication romaine au II^e siècle avant J.-C. (Vidal, 2001). En Grèce, la culture de la vigne est synonyme de civilisation ; ceux qui savent exploiter la terre et cultiver ses fruits ont la bénédiction des dieux. Le vin était un élément important de la civilisation hellénique (Fig. 08) et les premiers cépages cultivés ne différaient probablement que très peu des formes sauvages les plus évoluées. La sélection des mutations et des semis naturels (ou artificiels) permit de dégager peu à peu des formes plus productives et mieux adaptées aux conditions culturales. Cultivés dans des régions d'agriculture intensive ou irriguée, ces cépages qui forment la *proles orientalis* devaient évoluer rapidement par accumulation de caractères récessifs vers des formes à grappes plus volumineuses. La vigne était très répandue en Grèce, dans les îles de la mer Egée et dans les colonies de la grande Grèce, Italie du Sud et Sicile (Malnic, 2004).

La culture de la vigne fit son apparition en Gaule il y a 2500 ans (Fig. 09) grâce aux marchands grecs installés à Massilia (Marseille) et dans la vallée du Rhône. La Gaule ne connaissait alors que la bière fabriquée avec l'orge (la cervoise) et l'hydromel fait avec le miel (Lachiver, 1988). Vers 600 avant notre ère, la Massilia phocéenne passe rapidement de cité consommatrice à cité productrice de vin comme toutes les grandes villes du Sud de l'Espagne avec l'implantation du premier vignoble français. C'est du reste un raisin grec, la Syrah (Fig. 10), qui allait s'affirmer comme cépage noble de certains crus des côtes du Rhône, tels que l'Hermitage et la côte Rôtie qui sont sans doute parmi les plus anciens de nos grands vins. Les connaissances techniques viticoles se diffusent dans tout le bassin méditerranéen



Figure 10 : La Syrah, un cépage grec. La Syrah est un des rares cépages rouges féminins. Ses grappes sont très serrées, les baies petites, ovoïdes, d'un noir bleuté et à peau épaisse.



Figure 11 : Création du vignoble de la Narbonnaise. A l'époque Gallo-Romaine (125 ans av. J.-C.), les romains créent en Gaule narbonnaise une grande province viticole traversée par la voie Domitienne. Cet important vignoble alimentait toute la Gaule de ses vins ainsi que Rome elle-même.

grâce au commerce pratiqué par les Phéniciens. Les savoir-faire se mélangent avec l'arrivée d'esclaves venus d'Asie Mineure. La méthode grecque se mêle aux expériences palestiniennes ou syriennes. Mais ce fut surtout les légions de César qui allaient introduire l'implantation de la vigne dans l'ensemble de la Gaule. Au gré de leurs multiples conquêtes, les romains sont alors les protagonistes de l'expansion viticole, suscitant l'essor ou l'implantation progressive de la vigne et du vin dans leur immense empire (Vidal, 2001). Le Sud de l'Espagne devient le grenier de Rome. La vigne gagne ensuite toute l'Italie, puis la Narbonnaise où se crée un important vignoble (Fig. 11). La navigation fait de Lyon le plus grand port viticole de l'Antiquité (Pigeat, 2000). Au I^{er} siècle av. J.-C., la vigne couvrait toute la péninsule italienne et les romains étaient passés maîtres dans l'art de cultiver la vigne et de faire du vin (Malnic, 2004). L'accroissement de la production dans les régions viennoise et bordelaise permit cependant aux commerçants gaulois de supplanter leurs rivaux romains dans leurs échanges ; les citoyens romains se mirent à consommer du vin gaulois.

Les vins gaulois menaçant très sérieusement ceux de Rome, et surtout, l'extension des vignobles réduisant d'autant les emblavures, l'empereur Domitien publie en 92 un édit qui interdit la plantation de vigne dans l'enceinte des villes italiennes, proscrit la création de nouveaux vignobles en Italie et ordonne l'arrachage de la moitié de ceux des provinces extérieures (Pigeat, 2000), en réalité, presque la totalité du vignoble gaulois. Cet interdit ne fut levé que deux cents ans plus tard, en 270, par l'empereur Probus, soucieux de renforcer la cohésion impériale. Grâce à ce décret, la vigne allait reprendre son développement dans tout l'Empire romain (Malnic, 2004).

En 476, avec la chute de l'Empire Romain d'Occident, le christianisme, identifié à la civilisation de la vigne et du vin, reprend à son compte la propagation de la vigne. (Pigeat, 2000). Officiellement instaurée par Constantin en 313, propagée par la prédication de saint Martin au cours de la seconde moitié du IV^e siècle, la religion chrétienne a besoin de vin pour célébrer le mystère de la Communion (Lachiver, 1988). Dès le VI^e siècle, une nouvelle géographie viticole se dessine sous l'impulsion de l'Eglise. Les moines et les évêques plantent des vignes ; le vin devient la boisson des Chrétiens par excellence. Le premier miracle du Christ est la transformation de l'eau en vin, et son dernier repas, un hommage convivial au vin. Des vignobles de qualité s'implantent autour des cités auxquels s'ajoutent ceux qu'exploite chaque abbaye. Chaque cité a son évêque qui, à la suite de la défaillance de l'autorité impériale, devient le premier personnage de la cité. Saint Rémi aurait d'ailleurs lui-

même planté une vigne en pays rémois. La vigne est également plantée dans des régions où l'on a peine à l'imaginer aujourd'hui comme la Bretagne, la Flandre, l'Angleterre, l'Irlande, la Prusse et au Sud du Danemark (Albert *et al.*, 1988). L'ancienne France monarchique fixa définitivement l'entretien des vignobles comme culture traditionnelle (Jacquemont, 1993). Vers 640, se produit un évènement considérable pour l'avenir des paysages viticoles dans le monde : la religion musulmane interdit la consommation de vin. La vigne disparaît donc progressivement de Palestine, de Syrie, d'Egypte, de Libye, d'une partie de la Caucase, de l'Asie et de la vallée de l'Indus. La destruction de la vigne accompagne les conquêtes des califes de Damas et de Bagdad en Afrique du Nord, en Sicile, en Corse et en Sardaigne. La méditerranée perd son caractère de centre du monde viticole.

Du IX^e au XV^e siècle, les rois de France et d'Angleterre, les empereurs d'Allemagne, les comtes de Flandre, les ducs de Bourgogne et toutes les cours d'Europe vont développer la vigne (Malnic, 2004) suite à un essor économique qui provoque une renaissance de la viticulture (Albert *et al.*, 1988). Paris, devenue capitale des Capétiens, implante ses vignobles suivie par le Jura, la Bourgogne, la Champagne où les mauvaises friches sont mises en valeur. Les Cisterciens deviennent rapidement les maîtres de la viticulture en France. En 1112, l'ordre cistercien est fondé par Bernard de Clairvaux et assure une très large diffusion de la culture de la vigne et de ses techniques (Pigeat, 2000). Naissent alors de prestigieux vignobles comme Chablis, Beaune ou encore Chambolle.

Avec l'arrivée de Christophe Colomb aux Antilles en 1492, la civilisation du vin suit la conquête du Nouveau Monde. D'abord introduits au cours de diverses missions sous forme de graines en raison d'une facilité de transport (This *et al.*, 2006), Hernan Cortes apporte ensuite des plants de vigne au Mexique vers 1521 et crée le premier « vignoble » d'Amérique. D'autres font leur apparition au Chili, au Pérou, en Argentine, fournissent la demande locale et exportent leurs vins vers l'Europe.

Pendant le XVIII^e siècle, la noblesse de robe bordelaise se passionne pour la viticulture et est prise d'une véritable « fureur de planter ». Bordeaux se tourne vers une production de haute qualité et dans les années 1770, la ville devient un grand port colonial : le vin est en tête des exportations et part dans le monde entier. La Champagne, jusqu'alors productrice de vins ordinaires, découvre d'une part la vinification en blanc du Pinot Noir et d'autre part des méthodes rationnelles pour fabriquer des vins pétillants dont la renommée gagne rapidement

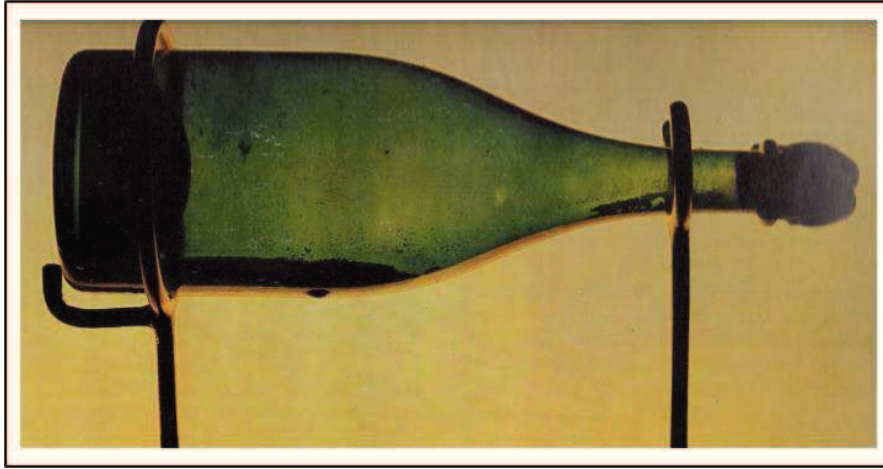


Figure 12 : La première bouteille de Champagne chez Moët et Chandon (XIX^e siècle). L'acte de naissance du commerce moderne du vin en bouteille a été marqué par la décision du gouvernement royal du 25 mai 1728. Avant cette date, la commercialisation du vin en bouteille était pratiquement interdite en raison du non respect de la contenance. La forme de la bouteille en verre noir a lentement évolué au cours du XVIII^e siècle, prenant de la hauteur et devenant cylindrique. Ce n'est qu'au début du XIX^e siècle que l'on commence à mentionner des bouteilles de « Bordeaux » ou de « Champagne ». Les formes spéciales sont donc tardives. (d'après Albert, 1988).

toutes les cours d'Europe. Avec l'évolution des techniques de la fusion du verre et du soufflage, il devient possible de fabriquer des bouteilles épaisses, plus solides et moins chères. D'abord en forme de cruche rustique, elles commencent à ressembler aux formes champenoises et bourguignonnes au cours du XVII^e siècle (Fig. 12). A la fin du XVIII^e siècle, le vin se vend désormais en bouteille.

Le XIX^e siècle est l'époque du grand développement international de la viticulture qui profite du mouvement économique (naissance du capitalisme) et de l'invention de techniques de navigation. Le négoce du vin connaît une nouvelle expansion (Malnic, 2004). En Hongrie, le vignoble s'étend considérablement jusqu'à devenir plus vaste que celui d'Italie ou d'Espagne. Le vignoble gagne l'Australie. En Chine, les jésuites établissent la vigne dans de nombreuses provinces au climat favorable, le Japon emboîte le pas avec l'introduction de cépages américains et européens, base du petit vignoble actuel. Aux Etats-Unis, les vignobles prospèrent surtout en Ohio mais de nouvelles exploitations se développent en Californie où les cépages les plus réputés d'Europe sont introduits par des colons de diverses nationalités.

Après la première guerre mondiale, la production freinée pour un temps, reprend de plus belle. L'implantation coloniale française permet aux paysages viticoles de se développer en URSS, au Maroc, en Algérie et en Tunisie. En 1939, alors que la seconde guerre mondiale sinistre les vignobles français, allemands, italiens et espagnols, la vigne s'étend considérablement en Nouvelle-Zélande (Pigeat, 2000). Après celle-ci, la viticulture mondiale entre dans une ère nouvelle notamment avec la mécanisation. On produit en masse et on se spécialise dans la culture des cépages les plus productifs (Malnic, 2004).

Dès les années soixante-dix, le monde viticole atteint une ère de grande prospérité due à une succession d'années exceptionnelles accompagnées d'une augmentation constante de la consommation de vins de bonne qualité. Rien ne permet alors de contester l'extraordinaire conquête réalisée par la viticulture en fonction des besoins croissants des consommateurs (Vidal, 2001).

1.3. Des racines américaines : sauvetage du vignoble mondial

Jusque vers le milieu du XIX^e siècle, seuls les insectes comme la pyrale, la cochenille ou l'altise ainsi que leurs larves préoccupent les viticulteurs qui les connaissent depuis longtemps. Ces animaux parasites, en attaquant les feuilles, les inflorescences et les

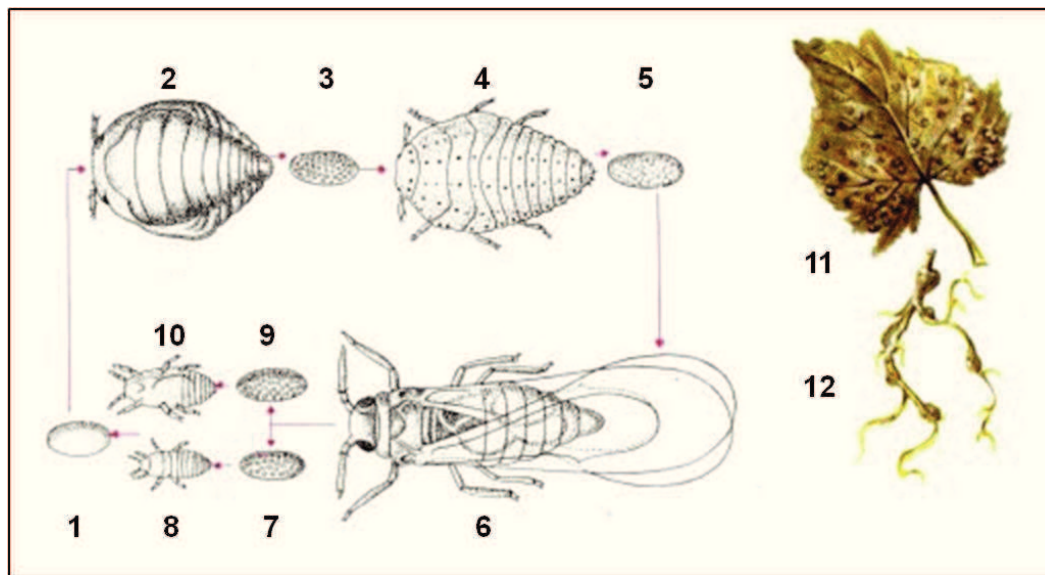


Figure 13 : Cycle reproductif du phylloxéra. Le cycle est complet sur les vignes américaines. L'œuf d'hiver est pondu dans les fentes de l'écorce de la vigne (1) ; après éclosion, la femelle gallicole parthénogénétique se fixe aux feuilles pour en sucer la sève (2), provoquant la formation de galls ; son œuf (3) donne naissance à une femelle radicicole parthénogénétique (4) qui pond à son tour (5) pour engendrer une femelle sexupare ailée (6) qui donnera soit des œufs mâles (7), soit des œufs femelles (9) donnant respectivement des individus mâles (8) et femelles (10) ; ces dernières, une fois fécondées, donneront des œufs d'hiver marquant le début d'un nouveau cycle. Face inférieure d'une feuille de vigne présentant des galls (11). Racines portant des nodosités provoquées par les piqûres des individus radicicoles (12).

grappes, perturbent les récoltes sans pour autant menacer la vie de la vigne. Cependant, le monde de la vigne va être frappé par de nouveaux fléaux : les maladies cryptogamiques et l'invasion phylloxérique.

Venues d'outre-Atlantique, des maladies cryptogamiques frappent durement les vignobles français et européens : l'oïdium en 1848, le mildiou en 1878. Mais c'est surtout le phylloxéra qui, introduit en France en 1864 à Pujaut, petite commune du Gard, va dévaster tous les vignobles d'Europe et même au-delà. La France a le triste privilège d'être le premier pays viticole européen envahi mais aucun pays producteur ne sera épargné. Il s'agit d'un puceron jaune vif nommé *Dactylosphaera vitifoliae* (ou *Phylloxera vastatrix*), d'un à deux millimètres de long et muni d'un rostre avec lequel il pique les feuilles et les racines de la vigne. Les feuilles des espèces américaines réagissent en formant des galles. Les radicelles de la vigne européenne se déforment suite à la formation d'excroissances et les racines plus grosses se nécrosent, ces deux phénomènes bloquant la circulation des sèves et provoquant la mort des ceps par asphyxie. Le cycle de développement du phylloxéra, très complexe, est réalisé complètement sur les vignes américaines où il comprend fondamentalement une forme ailée et trois formes dépourvues d'ailes : les sexués (mâles et femelles), les gallicoles (sur les feuilles) et les radicales (dans le sol) (Fig. 13). C'est cette dernière forme qui est dangereuse pour la vigne européenne.

Importé des Etats-Unis avec des vignes américaines, ce puceron demeura inaperçu pendant environ cinq années avant de provoquer de graves pertes au sein des vignobles (mort des ceps). Face à ce mal, une commission d'étude fut créée en 1870 afin d'en identifier la cause. La découverte du puceron, par Jules-Emile Planchon, n'empêcha malheureusement pas l'extension de ce qui devint la « crise phylloxérique ». En 1900, celle-ci avait atteint l'ensemble du vignoble français. Malgré l'emploi de moyens chimiques par le biais d'insecticides à base de solutions sulfurées, ceux-ci ne sont que des palliatifs qui permettent de prolonger la durée de la vigne sans pour autant la sauver (Vidal, 2001). Des régions et des appellations entières sont alors rayées de la carte, de nombreux cépages ancestraux disparaissent. Pour inciter aux replantations, une loi de 1887 exempte d'impôts fonciers pour quatre ans tout terrain planté ou replanté de vignes, mais le vignoble français ne se reconstitue vraiment qu'à partir de 1893, à base de plants américains et d'hybride franco-américains (Pigeat, 2000). En effet, certaines vignes américaines semblant réfractaires au phylloxéra, on se rendit vite compte que le greffage de *V. vinifera* sur ces espèces de *Vitis* américaines était

le seul moyen de sauver la vigne européenne. Certaines espèces comme *labrusca*, *riparia* ou *rupestris* allaient connaître une longue carrière. Pour les terrains calcaires, n'était disponible que *V. berlandieri* malheureusement rebelle au bouturage. Des croisements entre cette dernière espèces et des *vinifera*, *riparia* et *rupestris* permirent de venir à bout de ce problème (Albert *et al.*, 1988). C'est ainsi que Millardet obtient le 41B (*chasselat* x *berlandieri*) qui servi à replanter la plupart des vignes en terrain calcaire (Lachiver, 1988). Au bout du compte, le greffage fit renaître peu à peu l'espoir dans les vignobles. Ce travail colossal dura vingt ans et le monde du vin mit le premier tiers du XX^e siècle pour s'en remettre.

Le phylloxéra, outre ces conséquences économiques immédiates, entraîna la disparition de nombreux vignobles mais permis néanmoins l'instauration généralisée de nouvelles pratiques viticoles comme le greffage associées à une amélioration des connaissances sur les cépages, les porte-greffes et les sols.

2. La France dans la viticulture mondiale

La vigne est une des espèces fruitières les plus cultivées dans le monde. En 2008, la culture de raisins se plaçait en première position des cultures fruitières mondiales (fruits frais) en termes de surface cultivée et au quatrième rang en termes de production (Annexe 01 ; données de la FAO : Food and Agriculture Organization, 2008). Le vignoble mondial, réparti sur les cinq continents, s'étend sur 7.660.000 hectares dont la majeure partie est située en Europe (57,9%). L'Asie concentre 21,3% des surfaces cultivées ainsi que l'Amérique (13%), l'Afrique (5,2%) et l'Océanie (2,7%) (Communiqué de presse de l'OIV : Organisation Internationale de la Vigne et du vin, 2010). La production mondiale de raisins est estimée à 675,3 millions de quintaux avec une production mondiale de vin de 268,7 millions d'hectolitres (OIV, 2010). Dans les deux cas, l'Europe reste le premier producteur avec respectivement 44% et 67,8% de ces productions. La création de la Communauté Economique Européenne (en 1957) a permis le rapprochement dès 1970, de quatre pays producteurs de vins, la France, l'Italie, l'Allemagne et le Luxembourg, auxquels se sont ajoutés la Grèce en 1981 ; l'Espagne et le Portugal en 1986, et enfin l'Autriche en 1995. Si bien qu'à ce jour le secteur viti-vinicole de l'Union Européenne est le plus important du monde (Vidal, 2001). Cependant, les pays du Nouveau Monde commencent sérieusement « à montrer le bout de leurs sarments » avec une production de vin en hausse régulière et qui constitue une

Tableau 01 : Superficie du vignoble mondial. Liste des dix premiers vignobles mondiaux (OIV, 2010).

Pays	Superficie	
	hectares	%
Espagne	1 113 000	14,5
France	840 000	11,0
Italie	818 000	10,7
Turquie	505 000	6,6
Chine	470 000	6,1
Etats-Unis	398 000	5,2
Iran	330 000	4,3
Portugal	243 000	3,2
Argentine	228 000	3,0
Roumanie	206 000	2,7

Tableau 02 : Production mondiale de vin. Liste des dix premiers producteurs mondiaux de vin (OIV, 2010).

Pays	Production	
	hectolitres	%
Italie	47 699 000	17,7
France	45 558 000	17,0
Espagne	35 166 000	13,1
Etats-Unis	20 600 000	7,7
Argentine	12 135 000	4,5
Chine	12 000 000	4,5
Australie	11 598 000	4,3
Chili	9 869 000	3,7
Afrique du Sud	9 788 000	3,6
Allemagne	9 180 000	3,4

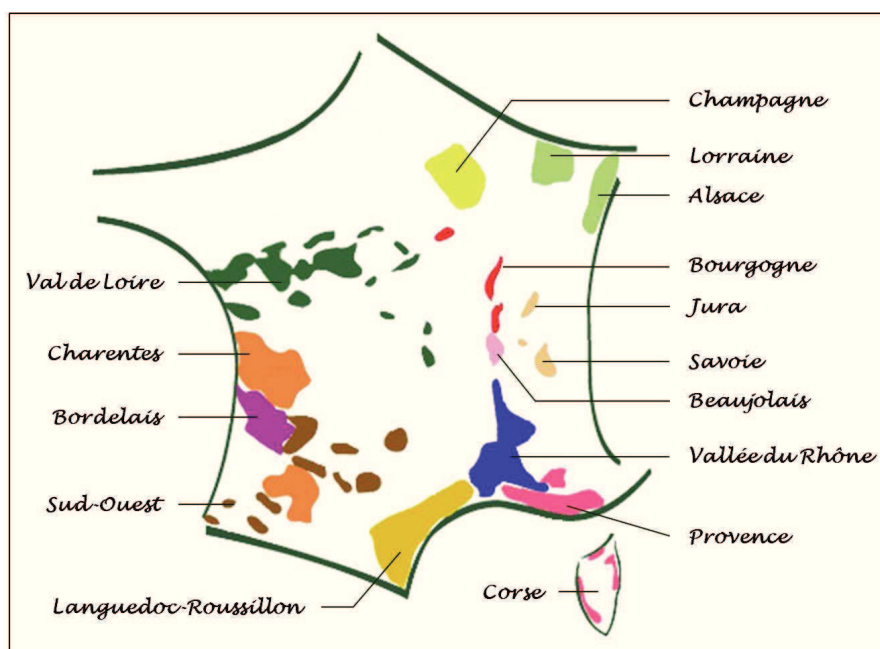


Figure 14 : Les principaux vignobles de France. La France compte une quinzaine de grandes régions viticoles.

Tableau 03 : Exportations mondiales de vin. Liste des dix premiers exportateurs mondiaux de vin (OIV, 2010).

Pays	Exportations	
	hectolitres	%
Italie	18 600 000	21,5
Espagne	14 430 000	16,7
France	12 513 000	14,5
Australie	7 716 000	8,9
Chili	6 935 000	8,0
Etats-Unis	3 983 000	4,6
Afrique du Sud	3 958 000	4,6
Allemagne	3 650 000	4,2
Argentine	2 827 000	3,3
Portugal	2 309 000	2,7

concurrence accrue. Les exportations de vins d'Amérique du Sud, d'Afrique de Sud et d'Australie progressent en effet plus rapidement que celles d'Europe (Synthèse Agreste, 2010) obligeant les viticulteurs européens à s'adapter à une nouvelle demande mondiale. Parallèlement, la décroissance de la consommation mondiale de vin poursuit sa baisse entamée en 2008 (-3,6%) (OIV, 2010) ; la consommation devient plus qualitative que quantitative (Malnic, 2004).

Actuellement, avec ces 840.000 hectares, la superficie du vignoble français est en deuxième position (à égalité avec l'Italie) derrière l'Espagne (Tableau 01 ; OIV, 2010). Il représente environ 1,5% du territoire métropolitain. La viticulture représente 14% des productions agricoles (Malnic, 2004). Le vin est perçu comme un secteur d'activité important dans l'économie nationale. En valeur, il se positionne, avec 9,5 milliards d'euros, comme le deuxième secteur de production agricole, juste derrière le lait (Couderc, 2007). Ce secteur emploie près de 240.000 personnes dans les exploitations, ce chiffre étant sous estimé si l'on considère les emplois engendrés par la dynamique de celui-ci (négoce, coopératives, lieux de distribution, restauration). Dans un monde qui produit plus de vins qu'il n'en consomme (environ 20% de plus), la France fait partie, avec l'Italie et l'Espagne, du trio de tête des pays producteurs, loin devant les autres. Avec 47,5 millions d'hectolitres produits en 2009 (Tableau 02 ; OIV, 2010), elle se « chamaille » la première place de production de vin avec l'Italie, son principal concurrent, placé en première position depuis 2007.

Plusieurs grandes régions viticoles, réparties sur dix régions administratives, peuvent être distinguées en France : l'Alsace, la Lorraine, la Champagne, le Val de Loire, la Bourgogne, le Beaujolais, le Jura, la Savoie, la vallée du Rhône, la Provence et la Corse, le Languedoc-Roussillon, le Sud-Ouest, le Bordelais et les Charentes (Fig. 14). Le vignoble français génère environ 5,3 milliards d'euros exportés soit le troisième excédent commercial après l'aéronautique et l'automobile (Malnic, 2004). L'Italie confortant sa place de leader et l'Espagne gagnant la deuxième place, la France se positionne en troisième position des exportateurs avec 12,5 millions d'hectolitres (Tableau 03 ; OIV, 2010) ; le Champagne constituant le premier vin exporté dans le monde en valeur (Malnic, 2004). En termes de valorisation des exportations, les vins français conservent cependant leur première place devant les vins italiens et surtout les vins espagnols (Synthèse Agreste, 2010).

Néanmoins, face à la concurrence des vins du Nouveau Monde, les viticulteurs français peinent aujourd'hui à trouver des débouchés à leur production. « *La demande mondiale est une demande des vins de cépage* », « *nous n'avons pas aujourd'hui des capacités à vendre des vins de cépage en France* » (M. Le Maire, ministre de l'Agriculture, pour Le Monde, 2009). Les terroirs français ont moins la cote, les vignerons vont devoir revoir leurs étiquettes pour séduire de nouveaux consommateurs (Letessier, Le Figaro, 2009). Alors que l'Italie a mis en place une politique commerciale offensive qui lui permet de progresser sur les marchés internationaux, la France ne cesse de se faire distancer. Pour remonter la pente, des fonds devraient être créés par le ministère de l'Agriculture afin de promouvoir les vins français ; cette mesure devant s'accompagner d'une réorganisation de la profession pour mieux défendre ses intérêts (article dans le Point, 2009).

INTRODUCTION

Etude Bibliographique

Tableau 04 : Division des Vitacées. La famille des Vitacées compte actuellement 19 genres d'importance inégale (d'après Galet, 2000).

Genres	Nombre d'espèces
<i>Vitis</i>	108 (dont 28 fossiles, 15 douteuses)
<i>Cissus</i>	367 (dont 8 fossiles)
<i>Ampelopsis</i>	31 (dont 4 fossiles)
<i>Pterisanthes</i>	21
<i>Tetrastigma</i>	132 (dont 4 fossiles)
<i>Ampelocissus</i>	92
<i>Clematicissus</i>	1
<i>Landukia</i>	1
<i>Parthenocissus</i>	19
<i>Rhoicissus</i>	11
<i>Cayratia</i>	65 (dont 1 fossile)
<i>Acareosperma</i>	1
<i>Pterocissus</i>	1
<i>Cyphostemma</i>	258
<i>Puria</i>	1
<i>Nothocissus</i>	1
<i>Yua</i>	3
<i>Cissites</i>	genre fossile
<i>Paleovitis</i>	genre fossile

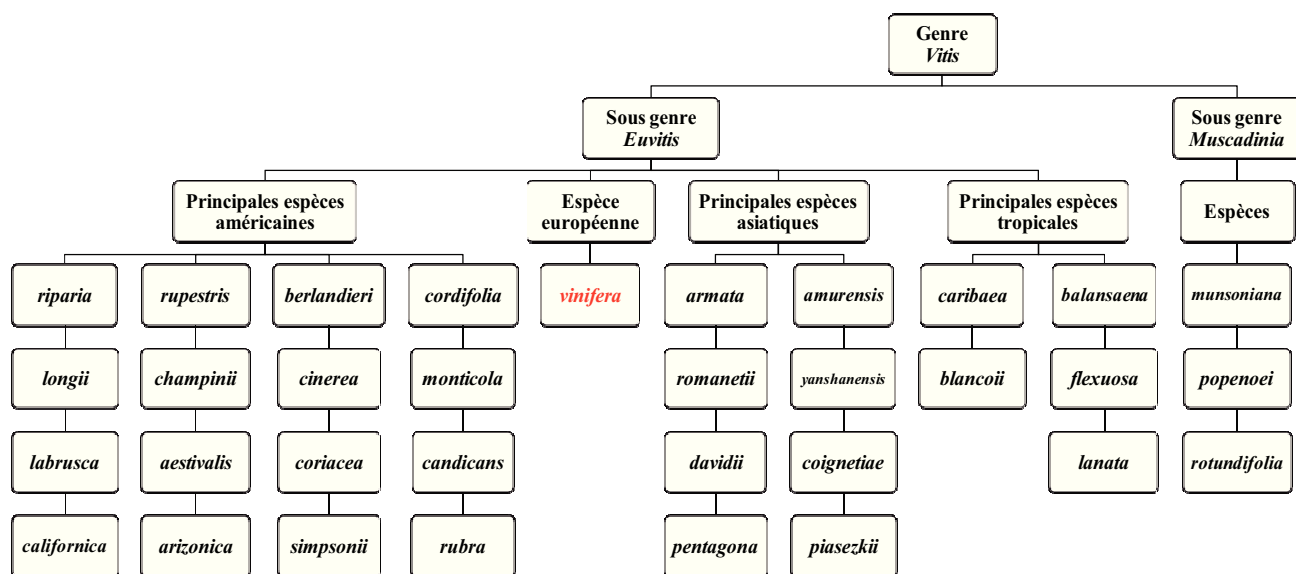


Figure 15 : Classification du genre *Vitis*. Le genre *Vitis* se divise en deux sous-genres : *Muscadinia* qui comprend trois espèces originaires des Etats-Unis ; et *Euvitis* qui compte une soixantaine d'espèces inter-fertiles réparties dans quatre groupes en fonction de leur origine géographique (d'après Mullins *et al.*, 1992).

1. Présentation, développement et physiologie de la vigne

1.1. Taxonomie et biodiversité de la vigne

Les vignes spontanées ou cultivées sont des Spermaphytes (ou Phanérogames, plantes à fleurs), Angiospermes (ovules cachés dans un ovaire), appartenant à la classe des Dicotylédones, à la sous-classe des Rosidées, au phylum des Térébinthales-Rubiales, à l'ordre des Rhamnales et à la famille des Vitacées (autrefois Ampélidées ou Ampélidacées) qui compte plus d'un millier d'espèces (Galet, 2000 ; Huglin et Schneider, 1998). Les Vitacées comptent actuellement dix-neuf genres d'importance inégale dont le genre *Vitis* et deux genres fossiles (Tableau 04). *Vitis* constitue le genre d'importance agronomique majeure. Il consiste en environ 60 espèces inter-fertiles présentes presque exclusivement dans l'hémisphère Nord (This *et al.*, 2006). Il a été divisé par Planchon en deux sous-genres, *Euvtis* (ou *Vitis*) et *Muscadinia*, en tenant compte des différences anatomiques, morphologiques et cytologiques des espèces (Fig.15) (Galet, 2000 ; Huglin et Schneider, 1998 ; Mullins *et al.*, 1992).

Le sous-genre *Muscadinia* ne comprend que trois espèces vivant dans le Sud-Est des Etats-Unis ou au Mexique. Ce sont des espèces diploïdes, leur nombre chromosomique est $2n = 40$ ce qui a rendu difficile les croisements avec d'autres *Vitis* ($2n = 38$). Seule l'espèce *M. rotundifolia* est cultivée dans les états du Sud américain au travers de plusieurs variétés pour la consommation de raisins frais, la préparation de gelées ou marmelades, l'obtention de vin et même pour la préparation des raisins secs. Celle-ci s'avère résistante à un grand nombre de parasites tels que le phylloxéra, le mildiou, l'anthracnose et la pourriture grise.

Le sous-genre *Euvtis* contient les « vraies vignes » ainsi que la quasi-totalité des vignes cultivées. Leur nombre chromosomique est $2n = 38$ avec la possibilité d'avoir des cépages triploïdes à $2n = 57$ ou tétraploïdes à $2n = 76$, toutes deux des mutations (Galet, 2000). A l'intérieur du sous-genre *Euvtis*, trois ou quatre groupes peuvent être distingués selon les auteurs : américain, asiatique, tropicale et euro-asiatique (ou européen) (Galet, 2000 ; Huglin et Schneider, 1998 ; Mullins *et al.*, 1992).

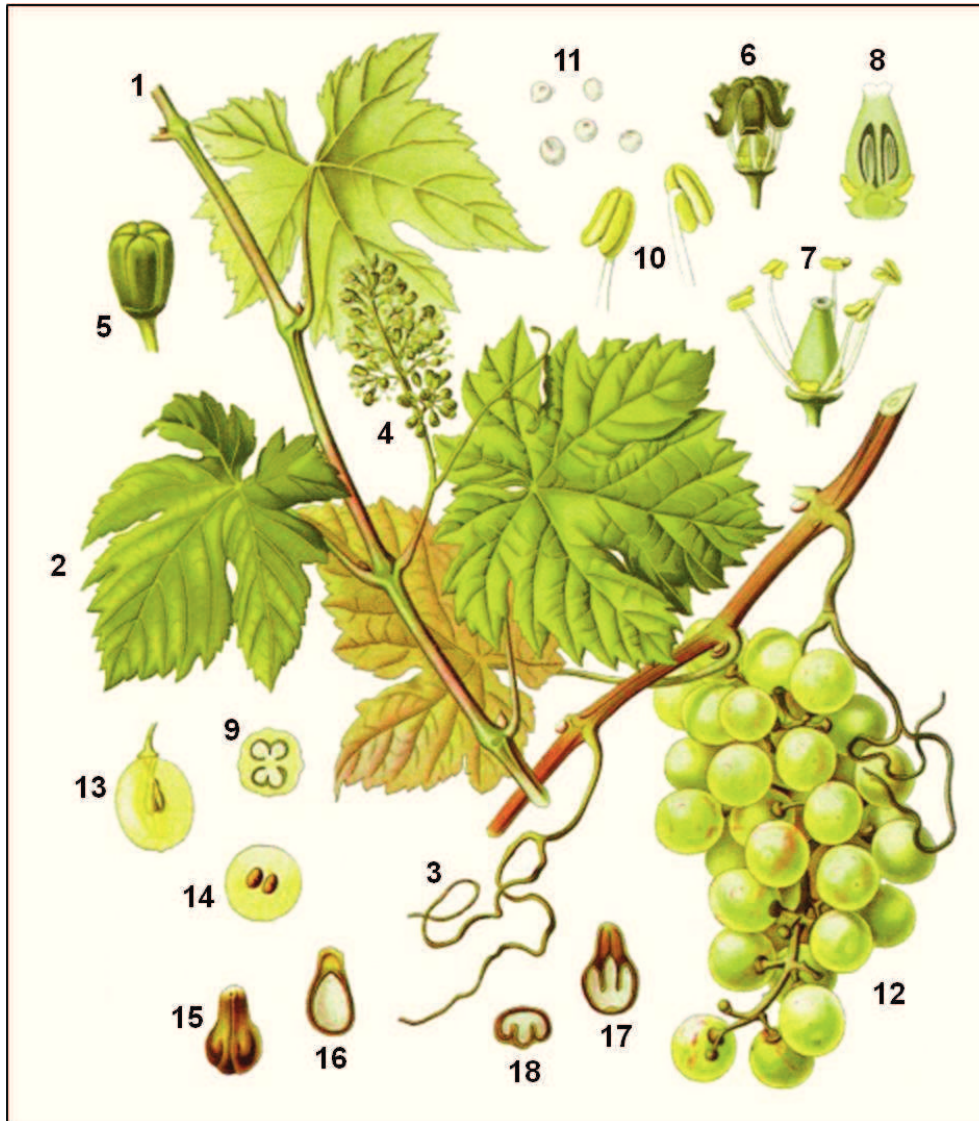


Figure 16 : Caractéristiques de *Vitis vinifera sativa*. Sarment (1) ; Feuille à cinq nervures principales (2) ; Vrille (3) ; Inflorescence (4) ; Bouton floral (= jeune fleur fermée) (5) ; Fleur déhiscente (ouverture de la corolle) (6) ; Fleur hermaphrodite ouverte avec cinq étamines (7) ; Coupe longitudinale de l’ovaire (8) ; Coupe transversale de l’ovaire (9) ; Etamines à filet grêle (10) ; Grains de pollen (11) ; Grappe de raisin (12) ; Coupe longitudinale d’une baie (13) ; Coupe transversale d’une baie (14) ; Graine (pépin en face ventrale) (15) ; Coupe longitudinale d’une graine (16 et 17) ; Coupe transversale d’une graine (18).

➤ Le groupe américain comprend une vingtaine d'espèces. Elles sont résistantes à de nombreuses maladies, peu productives et sont aujourd'hui utilisées comme porte-greffes dans 85% du vignoble mondial.

➤ Le groupe asiatique comprend une dizaine d'espèces peu étudiées dont la plus commune est *V. amurensis*. Ces espèces asiatiques ne résistent pas aux maladies américaines. Comme géniteur d'hybrides producteurs directs, seul *V. amurensis* a été exploitée par les russes pour sa résistance au froid hivernal (*vinifera* x *amurensis* et *labrusca* x *amurensis*) (Galet, 2000).

➤ Le groupe tropical comprend des vignes moins communes et plus rares qui ne seront pas détaillées.

➤ Le groupe euro-asiatique (ou européen) ne comporte qu'une seule espèce : *Vitis vinifera* Linné. Celle-ci comprend un archétype, *Vitis vinifera sylvestris* (sauvage) et *Vitis vinifera sativa* (cultivée) (Fig. 16). *Vitis vinifera sativa* est la seule espèce largement exploitée dans l'industrie vinicole globale (This *et al.*, 2006) et comprend plusieurs milliers de variétés classées par Negrul en trois branches suivant des critères écologiques, géographiques et morphologique : la *prole pontica*, la *prole occidentalis* et la *prole orientalis* (Huglin et Schneider, 1998). Cette vigne cultivée a progressivement été domestiquée par l'Homme par sélection de plantes hermaphrodites et présente aujourd'hui un polymorphisme remarquable en relation avec son caractère fortement hétérozygote. Au sens botanique, les variétés sont des cultivars et représentent des clones provenant d'un pépin, ensuite multipliés par voie végétative et dont tous les descendants sont identiques. Les vignerons emploient plutôt le terme plus général de cépages qui peut être un clone unique ou au contraire provenir de plusieurs clones apparemment très proches entre eux au point d'être confondus sous un même nom (Galet, 2000). Aujourd'hui les cépages cultivés sont multipliés par voie végétative car le semis ne permet pas de les reproduire fidèlement. Cinq mille cépages sont répertoriés, la plupart n'existant que dans des collections. En France, bien que 249 cépages soient autorisés par la réglementation (Malnic, 2004) seule une quarantaine est utilisée. Douze d'entre eux couvrent 70% des surfaces encépées : Chardonnay, Sauvignon, Ugni Blanc, Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot, Grenache, Carignan, Cabernet Franc, Gamay, Cinsault et Pinot Noir. La vigne est cultivée dans toutes les zones de la région européenne et méditerranéenne

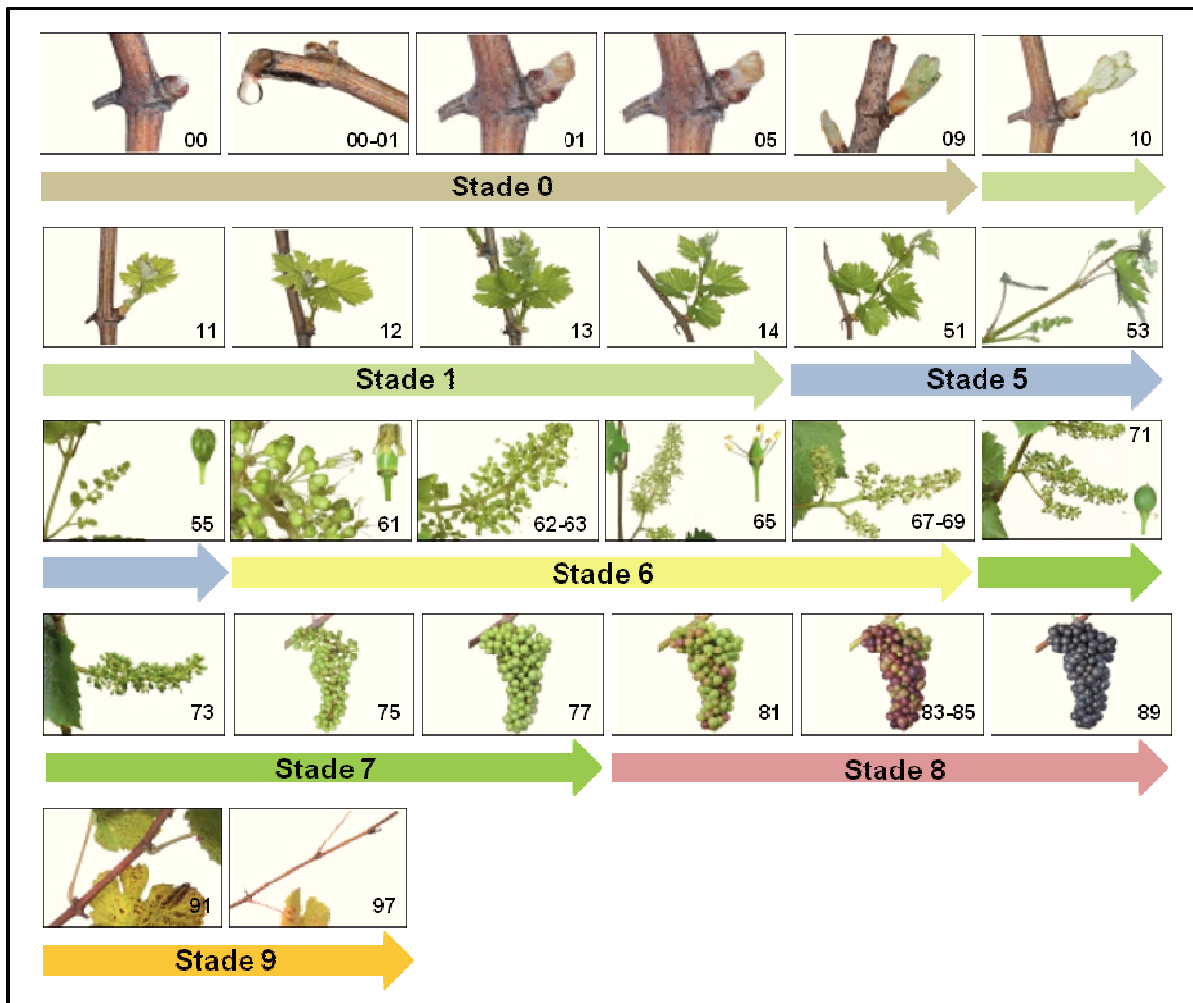


Figure 17 : Stades phénologiques repères de la vigne. L'échelle BBCH est divisée en 7 stades principaux, eux-mêmes subdivisés en stades secondaires (codes BBCH). **Stade 0** : Débourrement, **Stade 1** : Développement des feuilles, **Stade 5** : Apparition des inflorescences, **Stade 6** : Floraison, **Stade 7** : Développement des fruits, **Stades 8** : Maturation des baies, **Stade 9** : Sénescence et début de dormance. Codes BBCH : **00** : Bourgeon d'hiver, **00-01** : La vigne pleure, **01** : Gonflement du bourgeon, **05** : Bourgeon dans le coton, **09** : Pointe verte, **10** : Sortie des feuilles, **11** : Première feuille étalée et écartée de la pousse, **12** : Deux feuilles étalées, **13** : Trois feuilles étalées, **14** : Quatre feuilles étalées, **51** : Grappes visibles, **53** : Grappes séparées, **55** : Boutons floraux séparés, **61** : Début floraison, **62-63** : Floraison, **65** : Pleine fleur, **67-69** : Fin de floraison, **71** : Nouaison, **73** : Développement des baies (grosueur de plombs), **75** : Baies stade petit pois, **77** : Fermeture de grappe, **81** : Véraison (les baies commencent à traluire), **83-85** : Poursuite de la véraison, **89** : Récolte (maturité des baies), **91** : Maturité des bois (Aoûtément), **97** : Chute des feuilles. (d'après Bloesch et Viret, 2008).

qui bénéficie d'un été suffisamment chaud pour la maturation du raisin (Bulletin OEPP : Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes, 2002).

1.2. Cycle de développement de la vigne

La vigne est une plante pérenne ; chaque année, au cours de son développement, elle effectue deux cycles : **un cycle végétatif** et un **cycle reproducteur**, tous deux en compétition pour les ressources issues de la mobilisation de réserves ou de la photosynthèse (Lebon *et al.*, 2008). Ces deux cycles comprennent un certain nombre de stades phénologiques correspondant à la croissance des différents organes de la vigne. Depuis les années 1990, un code décimal international (de 00 à 100) connu sous le nom d'échelle BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt et Chemische Industrie) s'est imposé pour décrire les principaux stades repères de la vigne (Fig. 17). Les stades phénologiques décrits par Baggolini (1952), très répandus dans la pratique, ont été maintenus en correspondance avec l'échelle BBCH (Bloesch et Viret, 2008). *Vitis vinifera* étant cultivée dans les deux hémisphères de la Terre, elle possède donc des rythmes de végétation différents, décalés de six mois. Nous nous attarderons sur le cycle de l'hémisphère Nord (Fig. 18).

1.2.1. Cycle végétatif de la vigne

Au début du printemps (mars-avril), le débourrement des bourgeons constitue la première manifestation visuelle de la croissance (Galet, 2000). Suite à la sortie de dormance, déclenchée par l'apparition de conditions favorables (12-20°C), les bourgeons débourrent (au bout de 21 à 26 jours), les rameaux s'allongent, les jeunes feuilles préformées dans les bourgeons s'étalent et croissent jusqu'au stade adulte, et de nouvelles feuilles se forment. Cette croissance, dépendante des conditions thermiques et du régime hydrique (Huglin et Scheider, 1998) se prolonge et s'arrête définitivement dans la seconde quinzaine de juillet ou début août sous l'action de la sécheresse du sol ainsi que de la concurrence trophique exercée par les grappes sur les rameaux fertiles. Afin d'assurer un nouveau cycle végétatif l'année suivante, la vigne doit alors procéder à une phase de dépôt de lignine et de substances de réserve, principalement sous forme d'amidon, à l'intérieur des tissus des racines, du cep, des bras et des sarments : c'est l'aoûtement qui débute en août et qui se poursuit jusqu'en novembre. Simultanément avec l'aoûtement des organes végétatifs, les baies drainent de façon concurrentielle les sucres ainsi que les substances de réserve (aleurone, amidon, huile) orientées vers les cellules de la pulpe et l'albumen des graines. La fin du cycle végétatif est

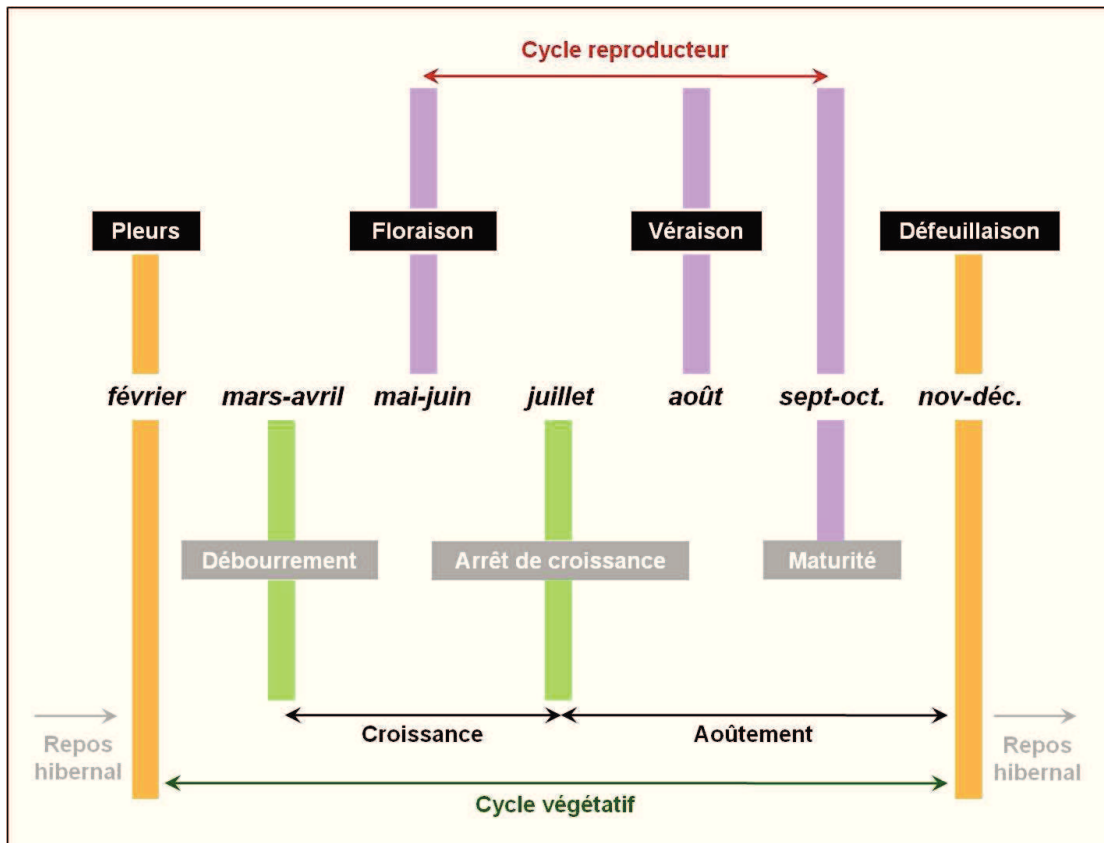


Figure 18 : Cycle végétatif et reproducteur de la vigne dans l'hémisphère Nord. Dans les régions tempérées, la vigne possède un rythme de croissance discontinu avec l'alternance de périodes de végétation et des périodes de repos (d'après Galet, 2006).

marquée par la défeuillaison (novembre-décembre) après quoi la vigne ne présente plus d'activité végétative apparente, c'est la dormance.

1.2.2. Cycle reproducteur de la vigne

La formation des organes reproducteurs des plantes ligneuses telles que la vigne s'étale sur deux saisons successives (Lebon *et al.*, 2008), la première permettant l'initiation des primordia inflorescentiels, alors que la seconde est caractérisée par l'émergence des inflorescences, des fleurs et le développement des baies. Quelques jours après le débourrement, la croissance débute et les inflorescences sortent des bourgeons. Lorsque les premières feuilles sont étalées, elles deviennent bien visibles et se développent jusqu'à leur épanouissement complet autour de mai-juin (Galet, 2000). Au terme d'une à deux semaines, les boutons floraux, qui se présentent d'abord en masses compactes, se séparent et l'ensemble de l'inflorescence acquiert sa forme définitive (Huglin et Schneider, 1988). Cette phase a une grande importance sur le volume et la qualité de la récolte car elle fixe le potentiel quantitatif et la précocité de celle-ci (Blouin et Guimberteau, 2000).

Les fleurs hermaphrodites (caractéristiques de *V. vinifera sativa*) sont donc pollinisées directement par le pollen de leurs étamines (autogamie) mais elles peuvent également subir une fécondation croisée par l'apport de pollen étranger par des insectes ou par le vent (allogamie) (Galet, 2000). L'autogamie est cependant considérée comme la règle générale chez les cépages hermaphrodites (Huglin et Schneider, 1988).

Après la fécondation, la fleur et les étamines se flétrissent et disparaissent tout comme le stigmate et le style. Seul l'ovaire persiste pour donner la baie tandis qu'à l'intérieur les ovules vont évoluer en graines. Le développement des ovaires, à l'échelle de la grappe, s'appelle la nouaison. Au mois d'août, alors que les parties végétatives subissent l'aoûtement, les grains grossissent et accumulent un certain nombre de substances comme des acides organiques ; ils commencent alors à prendre une forme de baie. La véraison marque alors la fin de la période herbacée et le début de la maturation. Durant cette dernière phase (45 jours environ), de nombreux changements physiologiques (accumulation d'hexoses, de composés phénoliques, d'arômes et de précurseurs d'arômes) s'opèrent jusqu'à la pleine maturité des baies. Fin septembre ou début octobre, les baies sont généralement vendangées. Après cette période, les raisins entrent dans une phase de surmaturation caractérisée à la fois par un flétrissement des baies et par une augmentation de la concentration en sucres. Certains cépages dits nobles comme le Riesling, le Pinot Gris ou le Gewurztraminer supportent bien la

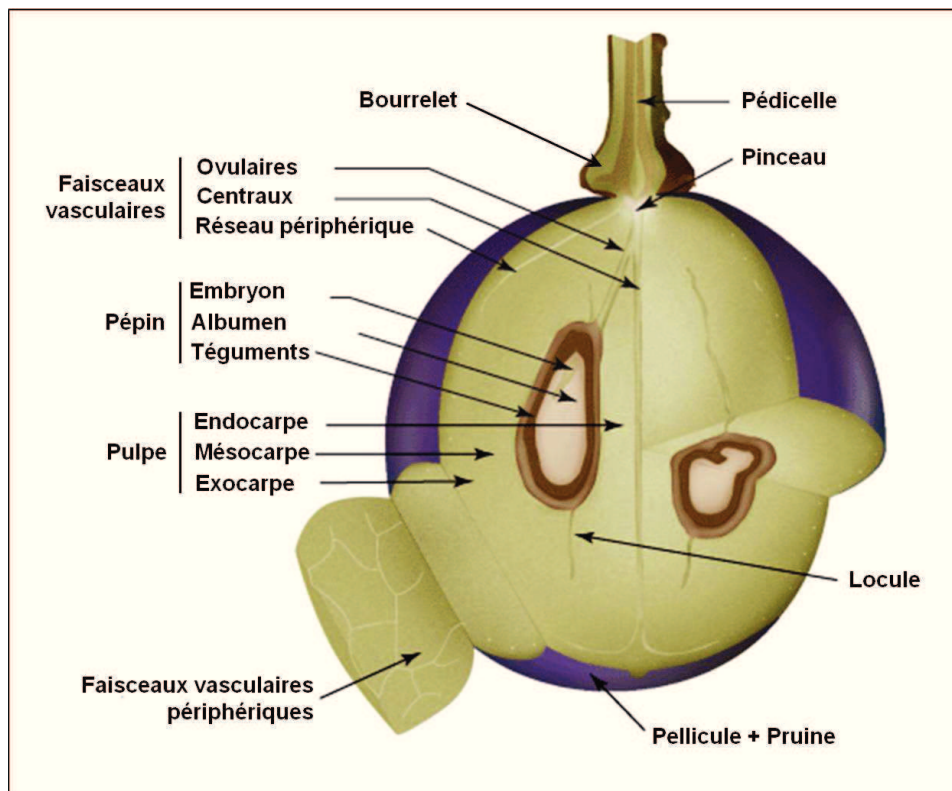


Figure 19 : Structure d'une baie de raisin. Les baies de raisin sont insérées sur une dilatation du pédicelle appelée bourrelet. Elles contiennent des faisceaux vasculaires ainsi que différents types de tissus.

surmaturation et sont à l'origine de vendanges tardives donnant des vins liquoreux très aromatiques.

1.3. Structure et développement physiologique de la baie de raisin

1.3.1. Structure de la baie de raisin

Les baies de raisins proviennent du développement des tissus de l'ovaire après la fécondation. Les cellules des parois carpellaires de l'ovaire se multiplient et donnent sa forme à la baie qui peut être variable. La baie (Fig. 19) est constituée de trois principaux types de tissus : la pellicule, la pulpe et les pépins (Kennedy, 2002). La pellicule est constituée de plusieurs assises cellulaires : la cuticule, l'épiderme et l'hypoderme où sont localisées les substances colorantes (anthocyanes) et aromatiques. A maturité, la majorité du poids de la baie correspond à la pulpe (de 65 à 91%), composée de huit à dix assises de cellules qui peuvent atteindre un volume très important. Les cellules de la pulpe renferment le moût et contiennent de l'eau, des sucres, des matières azotées et des acides organiques qui ne sont pas uniformément répartis. Enfin, la baie de raisin compte également la présence de pépins qui proviennent du développement des ovules fécondés. Théoriquement, le nombre de pépins est de quatre par baie même si la moyenne se situe bien souvent vers deux (Huglin et Schneider, 1998). Certains cépages comme Sultanine et Corinthe sont même apyrènes, c'est-à-dire dépourvus de pépins.

La nutrition des cellules de la pulpe et des pépins est assurée par des faisceaux libéro-ligneux. Le pédicelle se prolonge dans la baie par le pinceau qui l'irrigue au cours de son développement grâce à un réseau de faisceaux vasculaires périphériques, de faisceaux centraux et de faisceaux ovulaires (qui se rendent aux graines).

1.3.2. Développement physiologique de la baie de raisin

Le profil de croissance des baies de raisin est caractérisé par une courbe en double sigmoïde qui peut être divisée en trois phases nettement caractéristiques (Fig. 20) (Blouin et Guimberteau, 2000, Davies et al, 1999, Davies et Robinson, 2000, Fillion *et al.*, 1999, Galet, 2000, Hayes *et al.*, 2007, Tattersall *et al.*, 1997). Au cours des deux premières phases dont la durée totale est d'environ 60 jours, c'est-à-dire jusqu'à la véraison, la croissance des baies est de type herbacée. Elle se déroule à l'image des autres organes de la plante. La dernière phase de croissance, la maturation, débute à la véraison et va se poursuivre jusqu'à la maturité des

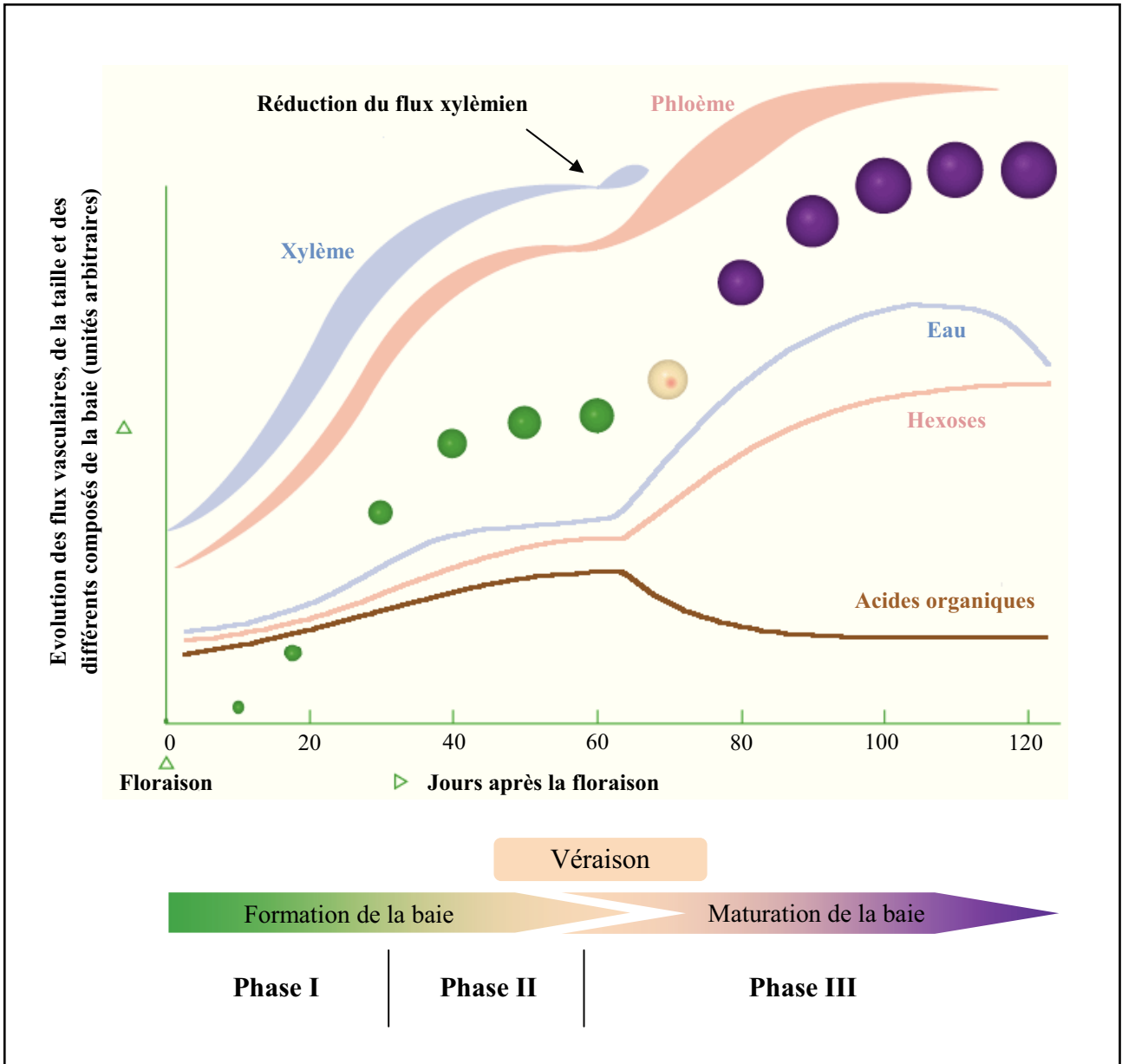


Figure 20 : Schéma représentant l'accumulation relative de l'eau, des hexoses et des acides organiques dans la baie de raisin au cours de son développement. La taille et la couleur relative de la baie sont représentées tous les 10 jours à partir de la floraison. Les flux xylémien et phloémien sont respectivement représentés par les aires bleue et rose. L'évolution des teneurs en eau, hexoses et acides organiques au sein de la baie sont représentées par les courbes bleue, rose et marron respectivement. (adapté de Kennedy, 2000)

baies (de 40 à 60 jours). Les baies vont alors accumuler une grande quantité d'eau, de sucres, d'acides aminés et de composés phénoliques alors que les concentrations en acides organiques diminuent.

1.3.2.1. Première phase du développement : Croissance rapide et division cellulaire

Cette première phase dure environ 40 jours après l'épanouissement complet des fleurs (anthèse). De la nouaison jusqu'à une vingtaine de jours plus tard, la croissance du péricarpe et des pépins est relativement lente. A partir du 20^{ème} jour, le développement s'accélère, les baies et les pépins croissent rapidement et font l'objet d'intenses divisions cellulaires (Huglin et Schneider, 1998). Le poids et le volume des baies augmentent parallèlement à l'accumulation d'une grande quantité d'acides organiques (Fig. 20) dont les principaux sont les acides tartrique et malique. Les pépins s'approchent de leur taille définitive, leur nombre conditionnera le poids final du fruit.

En tant que fruit, le raisin nécessite la présence d'hormones pour son développement. Lors des premières phases de son développement, la jeune baie contient des hormones permettant la multiplication et le grandissement cellulaire, des auxines, des gibbérellines et des cytokinines importées dans la baie ou synthétisées par les pépins ou par les ovules non fécondés (Bloin et Guimberteau, 2000). La concentration en auxine est maximale après la nouaison puis diminue de façon régulière jusqu'à la véraison où elle atteint son minimum (Fig.21). Les teneurs en gibbérellines et cytokinines évoluent de façon concomitante lors du développement de la baie. Elles sont relativement faibles à la nouaison et augmentent très rapidement au cours de la première phase de croissance à la fin de laquelle elles atteignent leur maximum.

Au cours de la phase herbacée, les baies vertes, chlorophylliennes, sont à la fois des organes consommateurs et producteurs. Elles sont consommatrices car elles entrent en concurrence avec les parties végétatives pour les sucres issus de la photosynthèse. Ceux-ci, importés sous forme de saccharose, migrent vers les baies vertes où ils sont hydrolysés en hexoses (glucose et fructose) (Galet, 2000). Les feuilles et racines fournissent de l'acide malique ainsi qu'un peu d'acide tartrique produit par les jeunes feuilles. Ces composés sont cependant distribués selon un certain ordre de priorité (Champagnol, 1984). Ils sont préférentiellement utilisés afin de satisfaire aux besoins de la consommation sur place, au

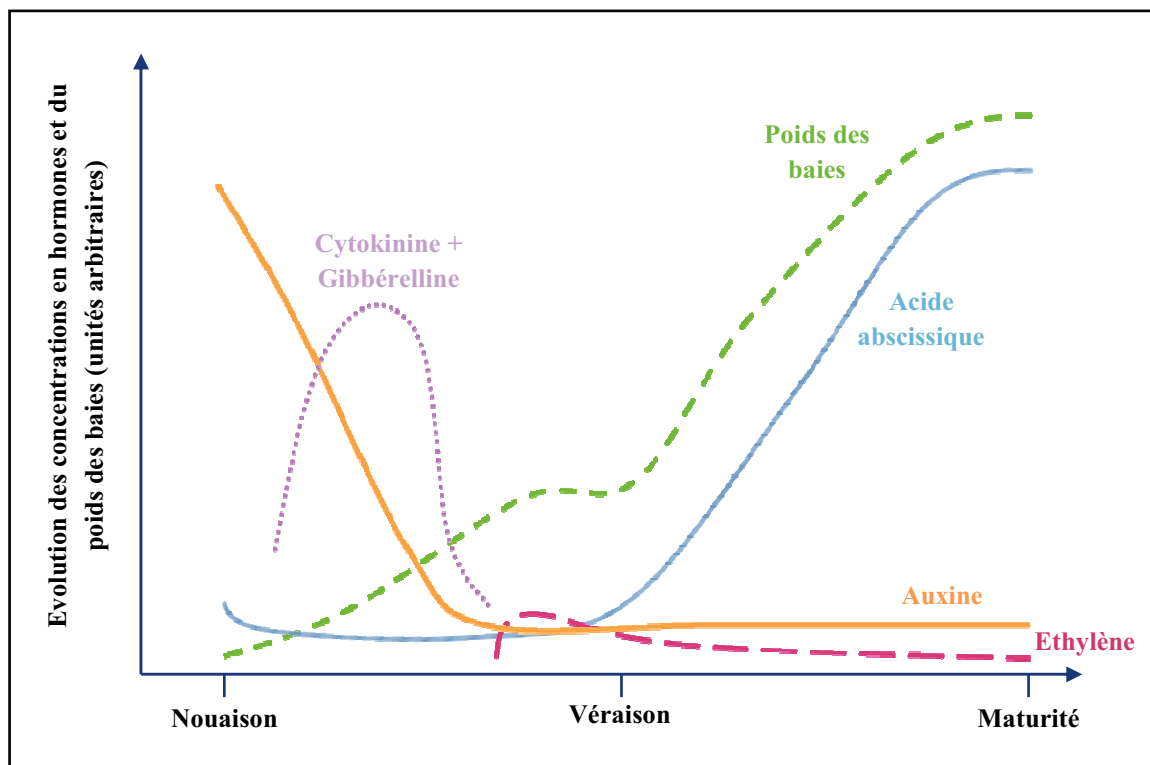


Figure 21 : Evolution des teneurs en hormones de croissance au cours du développement des baies. (d'après Champagnol, 1984)

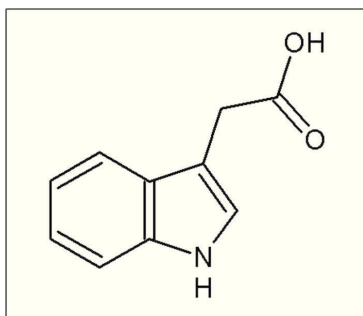


Figure 22 : Structure de l'acide indole-3-acétique.

cours de l'édification éventuelle de certains organes, et au cours de la respiration des feuilles (cycle de Krebs) pour produire de l'énergie stockée sous forme d'ATP qui sera ensuite employé dans les processus de croissance et de biosynthèse. La proportion non consommée est alors en partie polymérisée en amidon, et l'autre partie exportée d'abord vers l'extrémité des rameaux et enfin vers les jeunes baies. Le métabolisme de la baie verte est alimenté par le fructose qui est donc moins abondant que le glucose. Le rapport glucose/fructose est alors de 4 à 5 (Champagnol, 1984).

1.3.2.2. Deuxième phase du développement : Période de latence

La seconde phase du développement, qui dure entre 10 et 20 jours, correspond en réalité à une phase de latence caractérisée par une croissance très lente voire insignifiante des baies. Ce ralentissement est corrélé à une diminution importante de la concentration en certaines hormones de croissance comme l'auxine, les cytokinines et les gibberellines (Bouin et Guimberteau, 2000 ; Champagnol, 1984). Ces faibles concentrations en hormones atteintes à la fin de cette deuxième phase de croissance (véraison) n'évoluent plus jusqu'à la maturité (Fig. 21) des raisins et permettrait en réalité l'entrée en phase de maturation.

Chez la vigne, l'application d'une auxine synthétique, le BTOA (benzothiazole-2-oxyacetic acid), retarde l'entrée en maturation qui se traduit par un retard dans le grossissement de la baie, dans l'accumulation des sucres et dans l'évolution de la couleur. L'accumulation de l'acide abscissique (ABA), caractéristique de l'entrée en maturation du raisin, est également retardée de deux semaines par le BTOA. Au niveau génétique, cette hormone de synthèse retarde de 4 semaines l'expression des gènes de la chalcone synthase (*CHS*) et de l'UDP-glucose-flavonoïde-3-*O*-glucosyl transférase (*UFGT*) toutes deux impliquées dans la voie de biosynthèse des anthocyanines (Davies *et al.*, 1997). La principale auxine retrouvée chez les plantes est l'acide indole acétique (AIA ; Fig. 22) qui coexiste avec d'autres auxines dont le rôle physiologique reste obscure (Gaspar *et al.*, 1996 ; Kende et Zeevaart, 1997 ; Normanly *et al.*, 1995). L'entrée en maturation de la baie de raisin est donc certainement liée à la diminution de la concentration en AIA observée chez la vigne juste avant la véraison (Göktürk Baydar et Harmankaya, 2005 ; Inaba *et al.*, 1976).

Comme observé pour l'auxine, les concentrations en gibbérellines et cytokinines diminuent fortement jusqu'à la véraison à partir de laquelle elles ne sont plus présentes durant toute la maturation. La diminution de la teneur en gibbérellines interviendrait, comme

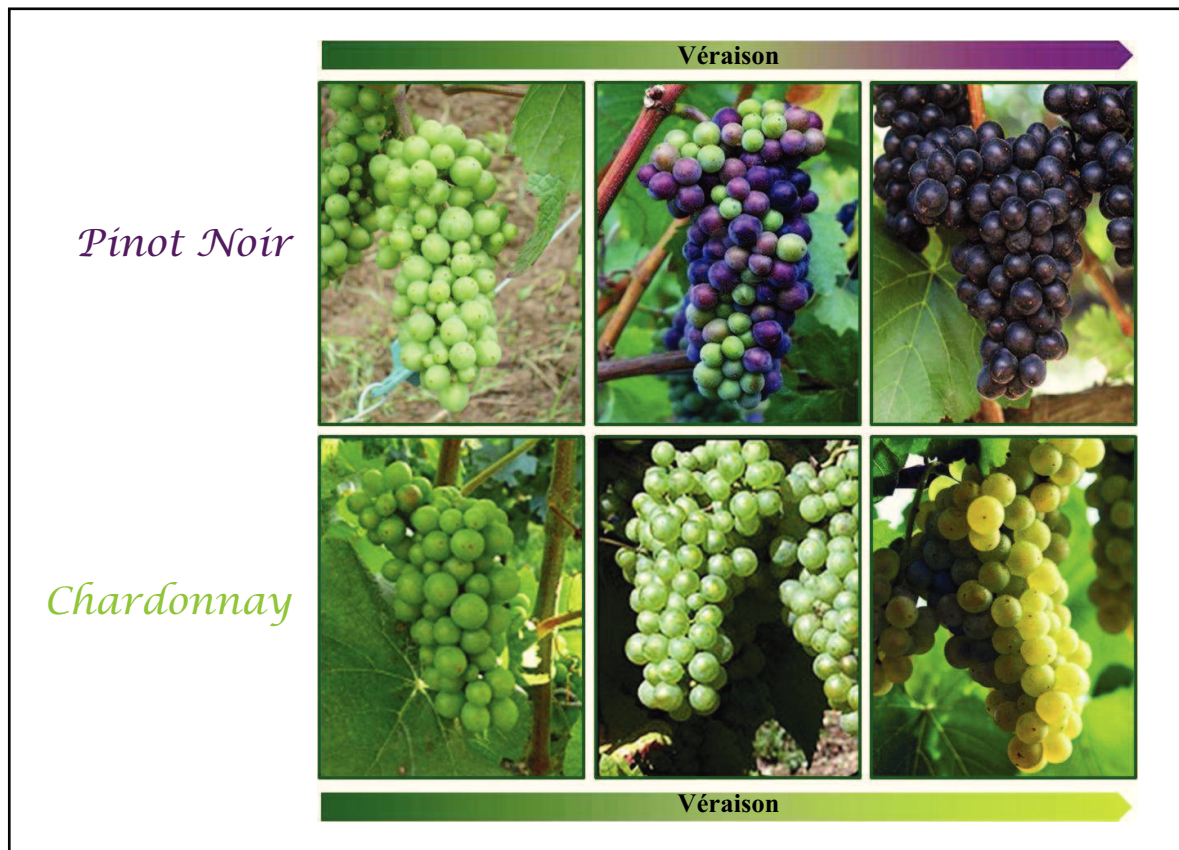


Figure 23 : Evolution de la couleur des baies au cours de la véraison. Chez les cépages rouges comme Pinot Noir, l'évolution de la couleur s'observe facilement au moment de la véraison : les baies passent du vert au noir. Chez les cépages blancs comme Chardonnay, la véraison est visuellement moins évidente : les baies s'éclaircissent et deviennent translucides.

l'auxine, dans l'entrée en maturation des fruits puisqu'elles ont été décrites comme capables d'inhiber la synthèse des anthocyanes chez la pomme (Awad et De Jager, 2002), inhiber la dégradation de la chlorophylle chez le citron (Trebitsh *et al.*, 1993) ainsi que la synthèse de caroténoïdes chez le kaki, fruit du plaqueminier (Gross *et al.*, 1984). Concernant les cytokinines, les données sont beaucoup moins étayées que pour les gibbérellines. Elles provoqueraient, comme les gibbérellines, un retard dans la maturation des fruits (Inaba *et al.*, 1976). La deuxième phase de croissance se caractérise donc par une forte diminution de concentration des substances de type auxine, gibbérelline et cytokinine qui coïncide en partie avec l'arrêt de croissance des pépins.

A la fin de cette phase, les baies sont dures, vertes et de la taille d'un petit poids ; l'acidité est maximum. Les baies ne contiennent pas plus de 150 mM d'hexoses avec un rapport glucose/fructose d'environ 2 (Fillion *et al.*, 1999). Elles commencent à perdre leur chlorophylle marquant ainsi le début de la véraison.

1.3.2.3. Troisième phase du développement : Grandissement cellulaire et changements physiologiques

La véraison marque la fin de la période herbacée et le début de la maturation. Des changements simultanés et brutaux dans l'aspect, la structure et la composition des baies vont avoir lieu, induits par des transformations physiologiques internes.

- Changement de couleur de la pellicule

Visuellement, la véraison correspond au changement de couleur de la baie, dû à une disparition rapide de la chlorophylle. La disparition des chloroplastes laisse donc place à la « couleur » au niveau de la pellicule. Les baies se colorent plus ou moins en rouge chez les cépages colorés (dû à la présence d'anthocyanes dans l'hypoderme) et deviennent translucides chez les cépages blancs (Fig. 23). Ces substances, qui sont des composés secondaires du catabolisme des sucres, regroupent entre autres, des anthocyanes (cyanidine, delphinidine, malvidine, paeonidine, petunidine), des flavones (kaempférol, quercitine, myricétine), des acides-phénoliques (acides caféique, cinnamique, coumarique, férulique) et des tannins (catéchines, leucoanthocyanidines) (Fig. 24). Ce phénomène est rapide puisqu'un grain de raisin peut changer de couleur en une journée ; l'ensemble des grappes d'un vignoble en une quinzaine de jours.

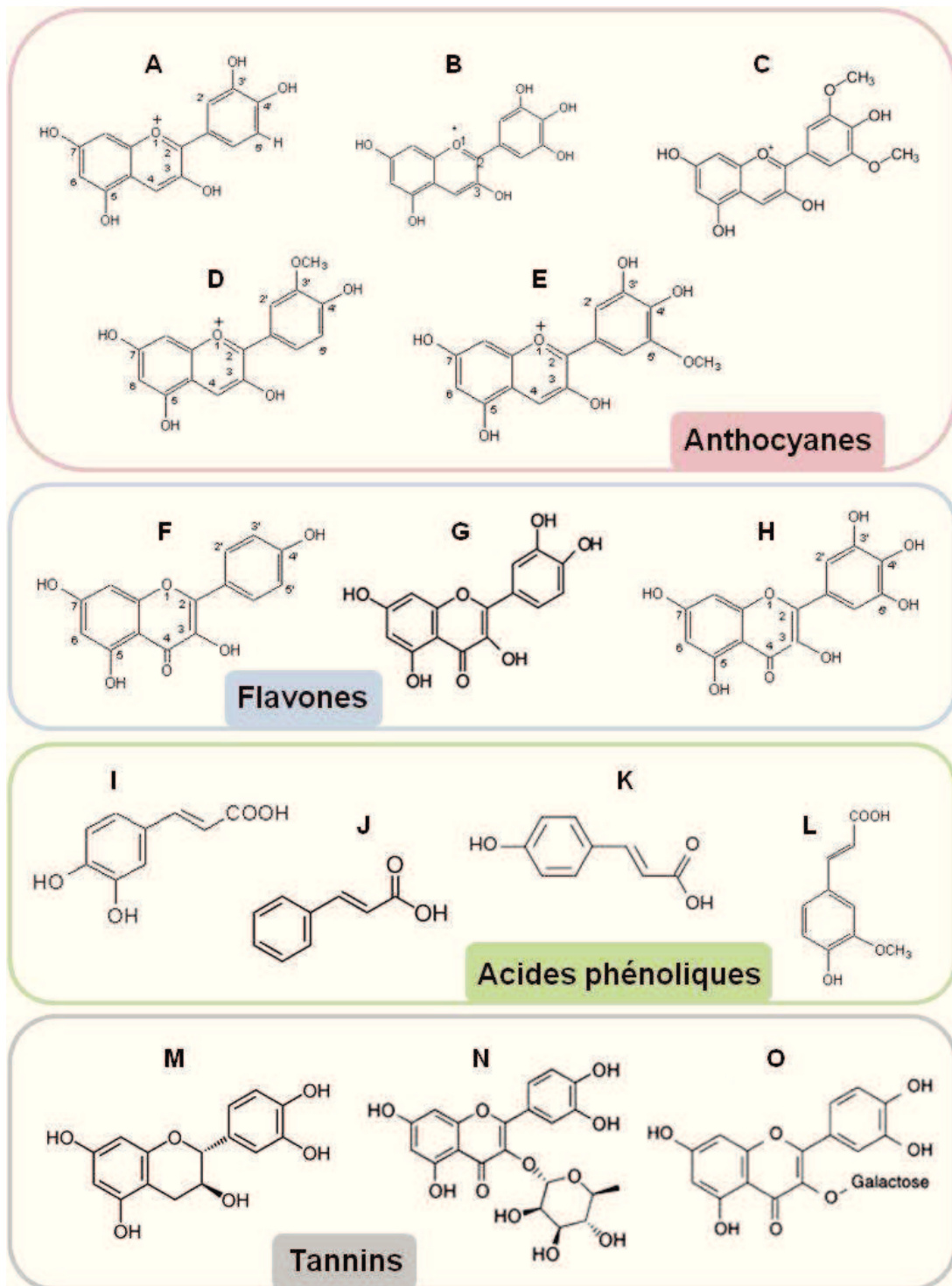


Figure 24 : Exemples de structure de quelques composés phénoliques présents dans la baie de raisin. Des anthocyanes : cyanidine (A), delphinidine (B), malvidine (C), paéonidine (D), pétunidine (E) ; des flavones : kaempférol (F), quercitine (G), myricétine (H) ; des acides phénoliques : acide caféique (I), acide cinnamique (J), acide coumarique (K), acide férulique (L) ; et des tannins comme les catéchine (M) et les leucoanthocyanidines : quercitrine (N), hyperoside (O).

- Changement dans le volume et la consistance des baies

Parallèlement au changement de couleur, les baies grossissent de nouveau. Cette augmentation rapide du volume n'est plus la conséquence d'une multiplication cellulaire mais d'un grandissement des cellules sous l'afflux de sucres et d'eau (Bouin et Guimberteau, 2000). Au cours de cette période, les baies de raisin atteignent leur taille et leur forme quasi-définitives même si celles-ci peuvent encore augmenter en volume à la suite d'une forte absorption d'eau au cours de la maturation. Au niveau de leur consistance, les baies deviennent souples et molles en raison du gonflement des cellules de la pulpe et d'une dégradation partielle des chaînes pectiques pariétales.

- Changement dans le rapport acides/sucres de la pulpe

L'accumulation des sucres à la véraison peut apparaître comme la modification la plus significative au cours du développement de la baie de raisin. Malgré l'augmentation du volume du grain, la teneur en sucres croît ce qui implique que ceux-ci affluent vers la baie plus vite que l'eau qui assure l'augmentation de volume (Champagnol, 1984). En fin de véraison, la quantité de sucres initialement contenue dans la baie en début de véraison peut avoir triplé. Importé des organes sources par le phloème sous forme de saccharose, celui-ci est clivé en hexoses ensuite accumulés dans la vacuole des cellules du mésocarpe. Vingt jours après la véraison, la concentration en hexoses dans la baie peut ainsi atteindre 1 M avec un rapport glucose/fructose de 1 (Fillion *et al.*, 1999). Le déchargement des sucres dans la baie ne s'arrête que vers la fin de la maturation.

Alors que l'acidité des baies est maximum juste avant la véraison, cette période est également caractérisée par la modification du rapport acides/sucres. L'acidité totale des grains de raisin diminue. Plus de 90% de l'acidité des raisins est attribuable aux acides tartrique et malique auxquels il convient d'ajouter secondairement l'acide citrique (Fig. 25). L'acide tartrique, peu répandu dans le règne végétal, est l'acide le plus fort du raisin dans lequel on le trouve en quantité abondante. Son métabolisme est lent et il est accumulé sans subir de profondes transformations. Ne considérant que ses teneurs initiale et finale, la concentration en acide tartrique dans la baie est généralement considérée constante au cours de la maturation. L'acide malique, très répandu dans le règne végétal, est le principal acide organique de nombreux fruits. Durant la maturation du grain de raisin, c'est-à-dire à partir de la véraison, sa dégradation est plus intense que sa synthèse et que les migrations vers la grappe ce qui induit une diminution plus ou moins rapide de sa concentration.

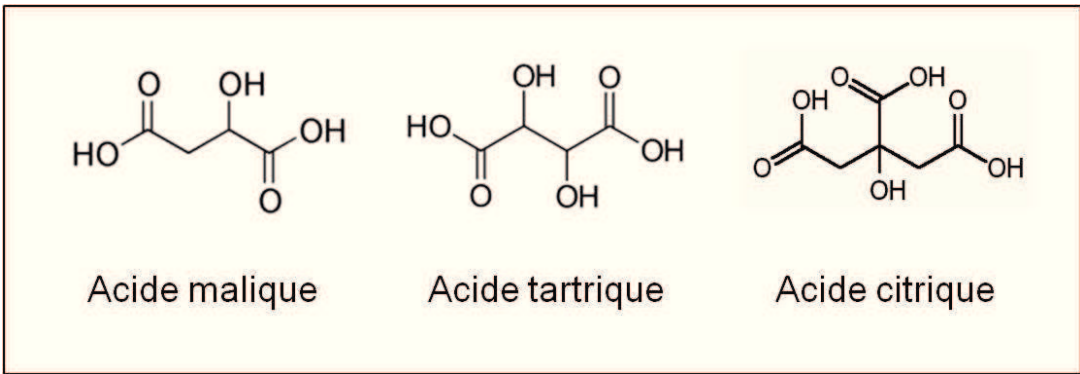


Figure 25 : Structure des acides principalement responsables de l'acidité des raisins.

- Changement dans le potentiel aromatique des baies

La baie accumule également des composés aromatiques appartenant à diverses familles chimiques et souvent présents en faible quantité dans la pellicule des raisins. Sous l'action de levures ou bactéries, des composés non volatils et non odorants (sucres, acides aminés...) peuvent donner naissance à des alcools, esters, aldéhydes qui peuvent réagir entre eux et ainsi participer à l'*arôme fermentaire*. Des composés volatils libres et odorants comme les terpénols et alcools terpéniques (linalol, géraniol, nérol, ho-triéanol, citronellol et α -terpinéol) participent à l'*arôme libre* du raisin. D'autres substances peu volatiles et inodores peuvent également libérer des molécules odorantes spécifiques d'un cépage sous l'action des enzymes du raisin et des levures, constituant l'*arôme lié* qui sera révélé lors de la fermentation par les levures.

2. Le transport chez les plantes supérieures

Les plantes supérieures ont développé des organes aux fonctions très différentes : les organes végétatifs aériens vont capter la lumière et le CO₂ atmosphérique pour réaliser la photosynthèse tandis que les organes souterrains (racines) vont acquérir l'eau et les éléments minéraux présents dans le sol. Cette spécialisation des organes nécessite donc des échanges importants *via* les sèves transportées au sein des tissus conducteurs. Les organes non photosynthétiques ainsi que les jeunes organes en développement ou les fruits vont être dépendants de ces échanges. La sève brute xylémienne va transporter l'eau et les minéraux aux organes aériens tandis que la sève élaborée phloémienne va transporter les sucres et les acides aminés aux autres organes de la plante permettant leur croissance et leur développement. L'eau transportée *via* le xylème peut ainsi s'accumuler dans les jeunes tissus en développement (bourgeons, jeunes feuilles, fruits), favorisant leur extension, ou réhydrater des organes en déficit hydrique. Le xylème et le phloème étant interconnectés sur leur entière longueur, l'eau ainsi qu'une certaine quantité de solutés peuvent également être réabsorbés par le phloème qui possède un plus faible potentiel osmotique (Keller *et al.*, 2006). Ce transport d'eau est capital pour le développement des fruits, y compris les baies de raisin.

2.1. Importance de l'eau dans le développement des fruits

L'augmentation de la taille des organes d'une plante est essentiellement due à l'accroissement de leur teneur en eau. Chez les fruits comme la baie de raisin et la tomate, l'extension de la baie est clairement affectée par les relations hydriques qui existent au sein de la plante (Ho, 1996). Jusqu'à un certain stade de développement, l'accumulation d'eau provoque une extension cellulaire qui empêche l'augmentation de la pression de turgescence et qui maintient la force d'appel ; le volume de la baie augmente. Dans le cas du raisin, le volume final du fruit résulte ainsi des échanges d'eau entre le cep et le fruit, et entre le fruit et l'atmosphère. Durant la seconde phase de son développement, la taille des baies de raisin double exclusivement sous l'action de l'expansion cellulaire résultant d'une accumulation d'eau et de sucres (Coombe, 1992).

2.2. Cas particulier de la baie de raisin : réduction du flux xylémien

2.2.1. Intégrité du xylème au cours de la maturation

L'eau nécessaire au grossissement et à la transpiration de la plupart des organes entre généralement au sein de ces organes *via* le xylème (Bondada *et al.*, 2005). Chez les fruits charnus, les flux d'eau s'effectuent à la fois *via* le xylème et le phloème, la contribution de chaque tissu dépendant du stade de développement du fruit ainsi que de l'espèce considérée (Bondada *et al.*, 2005 ; Dai *et al.*, 2010 ; Keller *et al.*, 2006). Chez certains jeunes fruits, l'eau importée est majoritairement d'origine phloémienne ; chez d'autres comme la tomate, la pomme, le kiwi et la baie de raisin, une transition est observée au cours du développement, les flux d'eau passant de majoritairement xylémiens à majoritairement phloémiens (Chatelet *et al.*, 2008). Pour la baie de raisin, qui contient entre 75 et 85% d'eau (Dai *et al.*, 2010), ce changement s'opère autour de la véraison. Avant la véraison, le flux d'eau de la plante vers la baie est assuré par le xylème, le phloème ne contribuant que pour environ 12% de l'influx total (Greenspan *et al.*, 1994). A la véraison, à partir de laquelle la baie peut doubler de volume, le phloème devient la principale source d'eau importée dans les baies contribuant alors pour 80% de l'import (Dai *et al.*, 2010 ; Greenspan *et al.*, 1994 ; Keller *et al.*, 2006, Ollat *et al.*, 2002). La sève élaborée, riche en sucres, conduit donc à la modification de la composition du fruit lors de la maturation. La rupture du flux xylémien dans la baie résulterait d'une accumulation de solutés (saccharose et hexoses) dans l'apoplaste et aurait d'importantes conséquences physiologiques pour la baie de raisin.

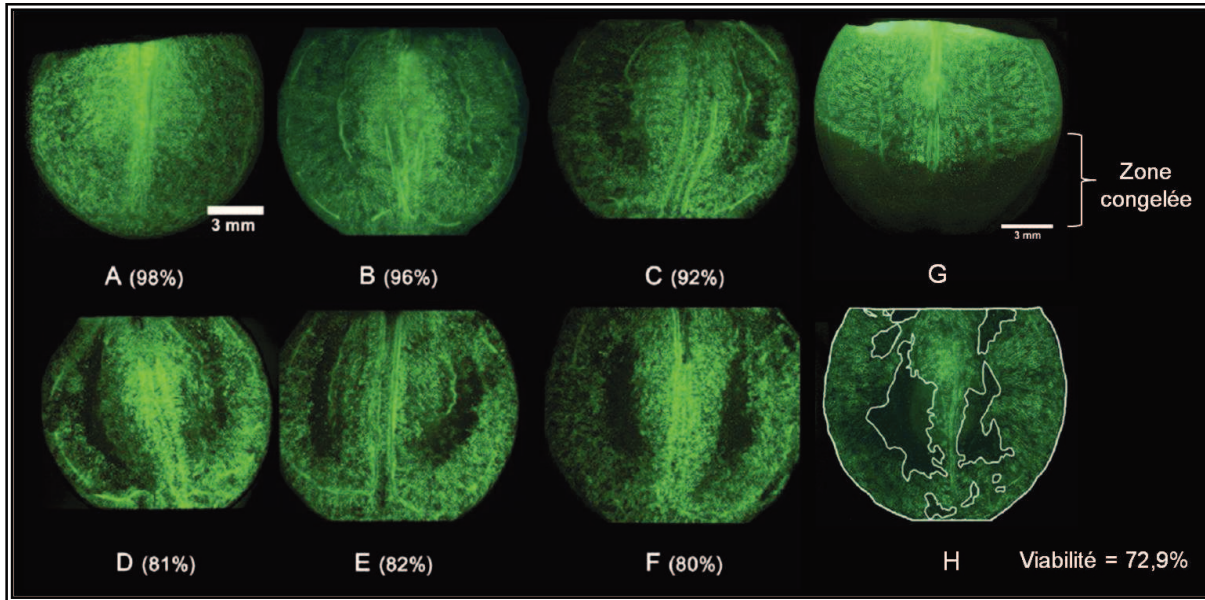


Figure 26 : Maintien de l'intégrité cellulaire au cours du développement de la baie de raisin. Coupes longitudinales de baies de raisin (cv. Nebbiolo) incubées avec de la Fluorescéine diacétate (FDA, marqueur vital). Les baies ont été prélevées à différents jours après l'anthèse (JAA). **A** : 42 JAA ; **B** : 82 JAA ; **C** : 97 JAA ; **D** : 110 JAA ; **E** : 120 JAA ; **F** : 131 JAA. Les chiffres entre parenthèses indiquent l'aire fluorescente comme un pourcentage de l'aire totale de la baie (**H**). **G** : confirmation de la FDA comme un marqueur de viabilité. (d'après Krasnow *et al.*, 2008)

2.2.2. Compartimentation et viabilité cellulaire au cours de la maturation

Pour la vigne, il a été suggéré que la présence de solutés dans l'apoplaste ainsi que la diminution dans la fermeté de la baie étaient due à une diminution de turgescence provoquée par une perte de la compartimentation apoplaste/symplaste des cellules du mésocarpe (Delrot *et al.*, 2001 ; Lang et During, 1991). Cependant de récents travaux indiquent que l'intégrité membranaire ainsi que la viabilité cellulaire sont maintenues dans la baie au cours de son développement (Fig. 26) (Krasnow *et al.*, 2008). Les auteurs montrent en effet que la perte dans la compartimentation ainsi que dans l'intégrité membranaire est substantielle, réduite à une petite zone du tissu loculaire, et très tardive dans le développement du fruit (bien après la véraison). Ces observations sont relativement cohérentes s'il on considère, durant la maturation, l'expression de gènes codant pour des protéines associées à la membrane plasmique telles que des transporteurs de sucres (Davies *et al.*, 1999 ; Fillion *et al.*, 1999). Au niveau de la paroi, le contenu protéique semble également augmenter de 50% pendant la maturation, surtout en protéines riches en hydroxyprolines, suggérant le maintien du métabolisme au sein des cellules de la baie (Nunan *et al.*, 1998). Il apparaît alors évident que c'est la compartimentation des solutés entre le symplaste et l'apoplaste, et plus particulièrement leur accumulation dans l'apoplaste, qui régulerait le potentiel hydrique total ainsi que la turgescence des cellules.

La turgescence a probablement une importante contribution dans le ramollissement et dans la maturation des fruits (Wada *et al.*, 2008). Il a récemment été montré que la turgescence des cellules de la baie de raisin diminuait de 0,4 MPa avant la véraison à moins de 0,1 MPa après la véraison (Matthews et Shackel, 2005) ; et il est hautement probable que les solutés apoplastiques jouent un rôle régulateur important. Il est d'ailleurs démontré que le potentiel de solutés dans l'apoplaste est dynamique et que la concentration apoplastique en solutés pouvait presque augmenter d'1 M lors de la formation des baies (Wada *et al.*, 2008). Au cours des phases I, II et III du développement, cette forte accumulation provoque une diminution du potentiel hydrique total dans l'apoplaste passant respectivement de -0,50 à -0,57 puis -3,42 MPa. Cette diminution du potentiel hydrique conduirait à un efflux d'eau à partir du phloème, faisant ainsi diminuer la pression phloémienne et permettant de maintenir le flux de sève élaborée (Patrick, 1997).

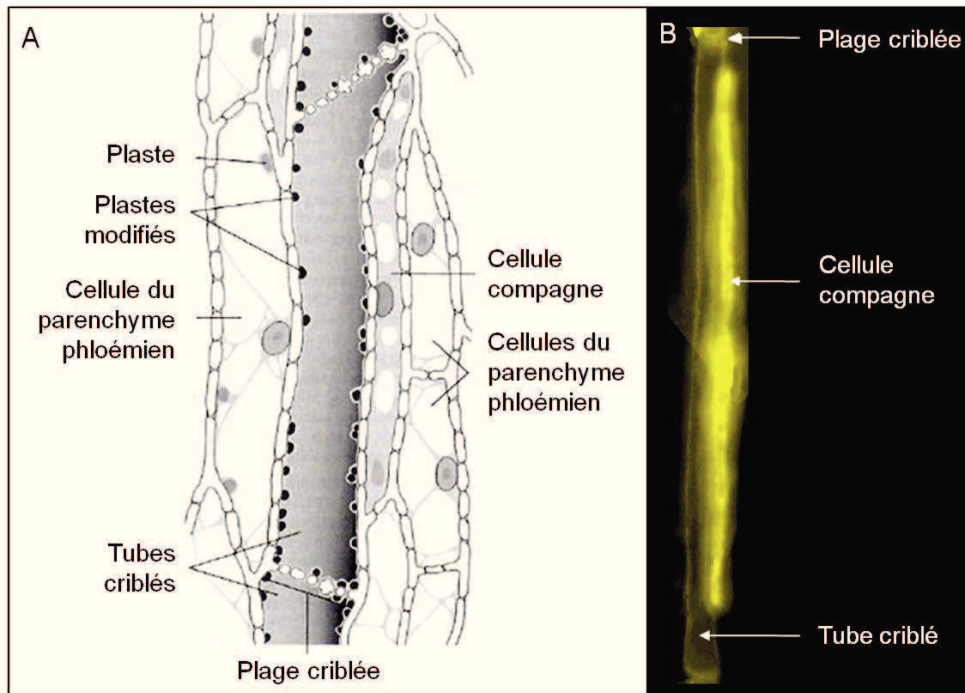


Figure 27 : Structure du complexe phloémien. Le tissu phloémien est composé de tubes criblés et de cellules compagnes associées entourés par des cellules de parenchyme. (A) Tissu phloémien d'une tige de tabac. (B) Coupe longitudinale d'un tube criblé de hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* (inclusion dans du méthacrylate). (d'après Hopkins, 2003 ; Thompson et Wolniak, 2008)

2.3. Transport phloémien des photoassimilats

2.3.1. Synthèse et formes de glucides transportés

Chez les végétaux supérieurs une partie de l'eau absorbée ainsi que le CO₂ atmosphérique sont utilisés pour la photosynthèse sous l'effet de l'énergie lumineuse captée par les pigments. Durant la photosynthèse, qui se déroule majoritairement dans les cellules du mésophylle des feuilles matures (sources), les trioses phosphate représentent les produits nets du cycle de Calvin. Ils peuvent être utilisés dans plusieurs voies métaboliques au sein du chloroplaste, comme la formation d'amidon ou la synthèse de lipides, ou exportés vers le cytosol des cellules du mésophylle où ils sont convertis en saccharose ou en acides aminés (Frommer et Sonnewald, 1995). Chez la plupart des végétaux supérieurs, le saccharose constitue la forme de glucide majoritairement transportée (Frommer et Sonnewald, 1995 ; Lemoine, 2000) en raison de sa forme métabolique relativement inerte, c'est-à-dire non réductrice et relativement insensible au métabolisme comparé au glucose. La saccharose synthase (Susy) ainsi que la saccharose-phosphate synthase (SPS) jouent un rôle clé dans sa synthèse ainsi que dans son exportation à partir des feuilles sources. Une fois produit, ce disaccharide est temporairement transporté dans la vacuole, ce qui détermine le « pool » de saccharose disponible pour l'export (Lemoine, 2000). La sève élaborée, légèrement alcaline (pH 7,5 à 8,5), est donc bien plus concentrée que la sève brute et les glucides représentent la majorité des solutés présents parfois jusqu'à 300 grammes par litre selon l'espèce.

2.3.2. Structure du complexe conducteur

Le transport longue-distance des assimilats entre les organes « sources » et « puits » *via* le phloème implique nécessairement une étape de chargement ainsi qu'une étape de déchargement du complexe conducteur. Les « composants » clés du phloème sont les tubes criblés, dans lesquels s'opère le transport longue-distance, et les cellules compagnes qui leur sont très « intimement » liées parmi une foule de cellules parenchymateuses (Fig. 27) (Hopkins, 2003 ; Truernit, 2001). Au cours de leur formation, les tubes criblés subissent une série de modifications (autophagie sélective) aboutissant à la perte du noyau, du tonoplaste, des ribosomes, de l'appareil de Golgi ainsi que des microtubules et microfilaments. A maturité, ces cellules n'ont conservé que le plasmalemme, le réticulum endoplasmique (modifié) et des mitochondries. Bien que la vacuole n'existe plus, le cytoplasme adopte une position pariétale, accolé au plasmalemme. Ainsi, les tubes criblés forment une file allongée de cellules séparées par des cribles dans leur paroi transversale. Les zones où les pores des

cribles sont relativement grands forment des plages criblées et permettent un continuum protoplasmique dense entre cellules. Les cellules compagnes contiennent du cytoplasme et l'ensemble des différents organites cellulaires. Elles maintiennent de nombreuses connexions (plasmodesmes) avec les tubes criblés, les deux ayant une dépendance étroite. Une cellule compagne demeure vivante tant que le tube criblé est fonctionnel ; lorsque le tube criblé meurt, la cellule compagne qui lui est associée meurt également.

2.3.3. Chargement du complexe conducteur

Le transport de la sève élaborée et des photoassimilats peut être décomposé en trois étapes : (i) le transport latéral à travers différents tissus au niveau de la feuille « source », (ii) le transport longitudinal dans le phloème (encore appelé « translocation »), et (iii) le transport latéral au niveau de l'organe receveur dit « puits ». Le cheminement du saccharose de son lieu de synthèse (cytoplasme des cellules du mésophylle) vers le complexe conducteur n'est pas long (trois ou quatre cellules) et il est généralement admis que le disaccharide migre jusqu'aux cellules du parenchyme phloémien par la voie symplastique, le long de son gradient de concentration, en utilisant les plasmodesmes (Fig. 28). Cette notion est renforcée par la forte densité de plasmodesmes inter-connectant les cellules du tissu (Lalonde *et al.*, 2003). Une fois au niveau du parenchyme phloémien, le saccharose doit être chargé dans le complexe conducteur (tube criblé-cellule compagne). Dans la feuille source, les nervures mineures sont considérées comme le site majeur de chargement du phloème (Lalonde *et al.*, 2003) et deux mécanismes sont alors possibles et souvent discutés (Kühn *et al.*, 1999 ; Truernit, 2001) : une voie symplastique et une voie apoplastique.

Chez de nombreuses espèces comme le tabac, la pomme de terre ou la fève, le complexe conducteur est isolé des cellules voisines (pas de connections symplastiques) (Kühn *et al.*, 1999 ; Truernit, 2001) ce qui implique nécessairement le passage par la voie apoplastique dans le processus de chargement. Le rôle de l'apoplaste dans le transport courte-distance précédant la translocation a commencé à se définir dans les années 1970 suite à des études menées principalement sur la betterave (Geiger *et al.*, 1974). Cependant, le mécanisme qui permet l'efflux des glucides vers l'apoplaste à partir des cellules du mésophylle, avant le chargement dans le phloème, est encore peu connu. Cet efflux serait vraisemblablement catalysé par une protéine (Fondy et Geiger, 1977), mais on ignore encore s'il requiert de l'énergie, bien que la plupart des études suggèrent qu'il s'agisse d'une diffusion facilitée (Fig. 28).

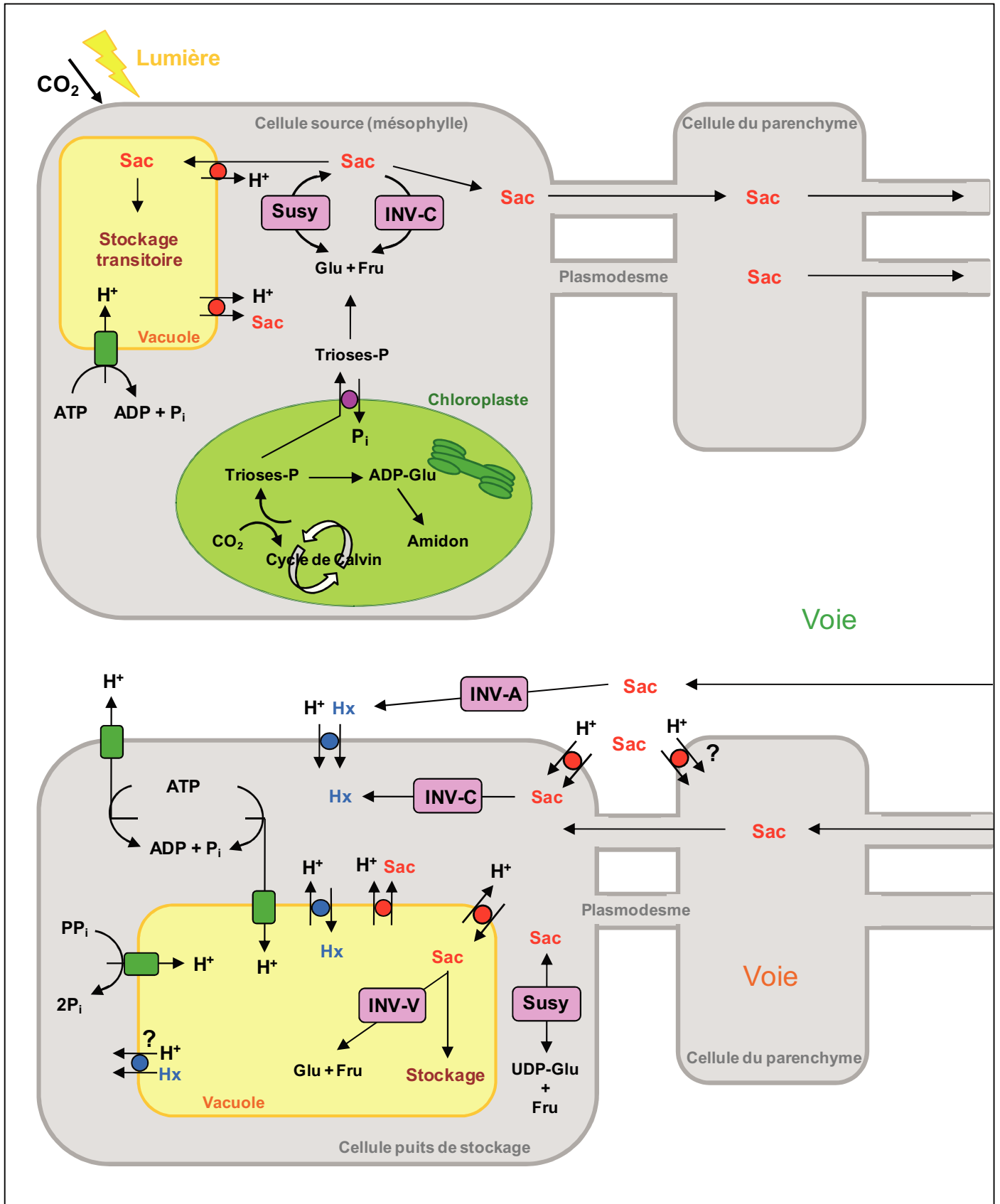
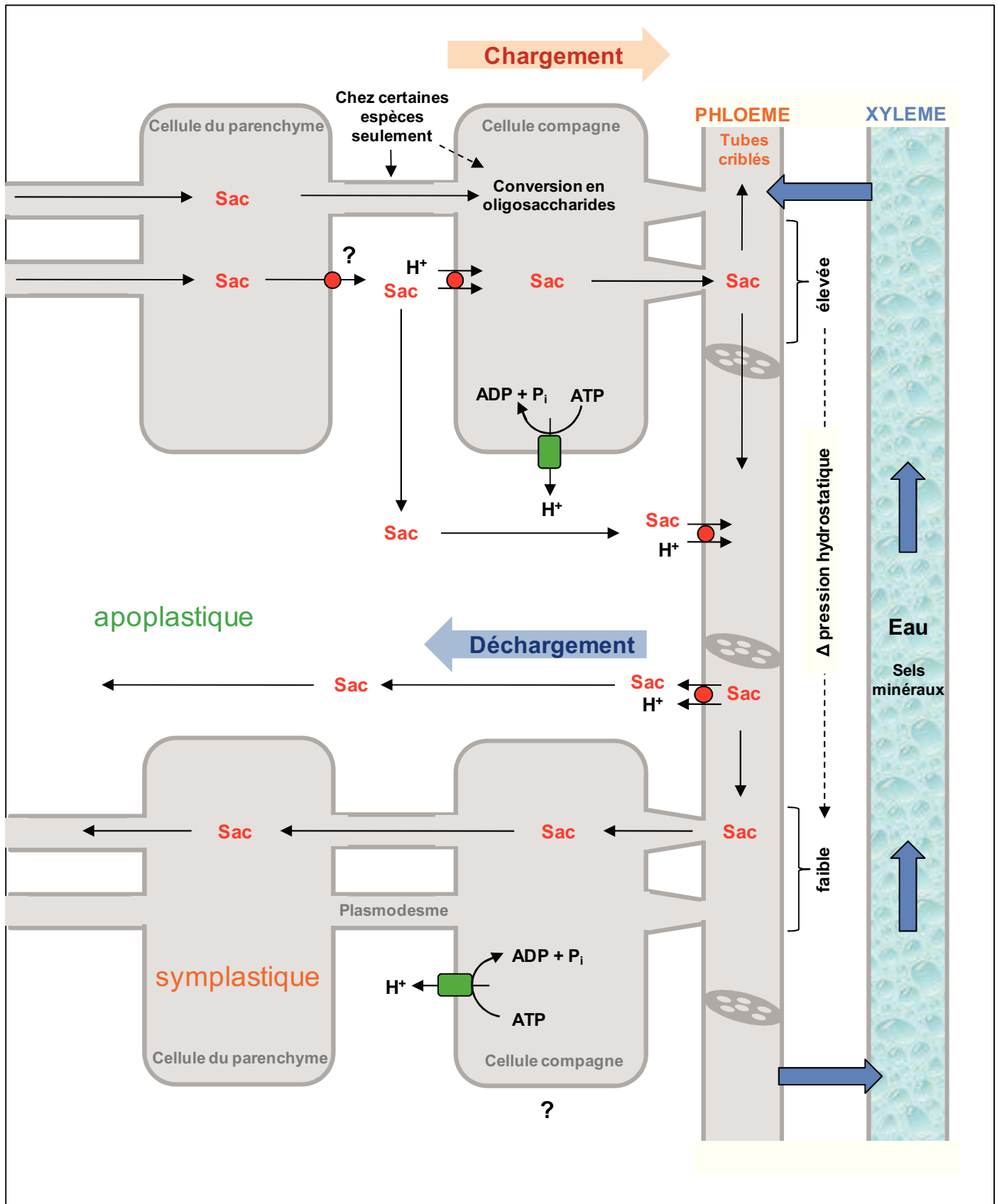


Figure 28 : Chargement, transport et déchargement des photoassimilats dans le complexe conducteur. La synthèse de saccharose (Sac) a lieu dans les cellules du mésophylle. Celui-ci migre au travers de plasmodesmes jusqu'au complexe conducteur (cellule compagne-tube criblé) où il est chargé de façon active. Le saccharose est ensuite transporté grâce à un flux de masse passif vers les cellules puits. Deux voies sont alors possibles : symplastique et apoplastique. Ces deux voies impliquent des transporteurs membranaires (cercles), des pompes



à protons (rectangles verts) et des invertases vacuolaires (INV-V), cytoplasmiques (INV-C) et apoplastiques (INV-A). Ces invertases génèrent des hexoses (Hx). Les points d'interrogation indiquent les éléments hypothétiques de la voie de transport. (d'après Delrot, 2000 ; Koch, 2004 ; Kühn et Grof, 2010 ; Lemoine, 2000 ; Patrick, 1997 ; Sauer, 2007 et Williams *et al.*, 2000).

Dans le phloème, les concentrations en saccharose sont 8 à 40 fois supérieures à celles observées dans les cellules du mésophylle (Sovonick *et al.*, 1974) et ce gradient de concentration implique l'existence d'un transport actif *via* des protéines membranaires. Ce mécanisme est décrit comme un cotransport H^+ /saccharose (symport), avec une stoechiométrie de 1 (Frommer et Sonnewald, 1995 ; Lemoine, 2000), utilisant la force proton-motrice pour importer les glucides dans la cellule compagne contre leur gradient de concentration. Cette force est assurée par une pompe à protons ATP-dépendante située sur la membrane plasmique et exportant les protons hors du cytoplasme (Delrot, 2000 ; Lalonde *et al.*, 2003). Celle-ci crée un gradient de pH ainsi qu'un gradient électrique transmembranaire (-150/-180 mV) qui se combinent pour créer la force proton-motrice. Les cellules compagnes contiennent de nombreuses mitochondries indiquant qu'elles sont probablement impliquées dans la fourniture d'énergie (ATP) nécessaire au chargement du phloème (Frommer et Sonnewald, 1995). Ainsi, la sélectivité des transporteurs permet de réaliser un chargement sélectif du saccharose vis-à-vis des hexoses (Fig. 28). Ce système de co-transport énergie-dépendant conduit à une accumulation des sucres à une concentration qui peut dépasser 1 M dans le complexe conducteur (Carpaneto *et al.*, 2005). Une fois dans le tube criblé, le saccharose est transporté à longue distance des organes sources vers les organes puits selon la théorie du flux de masse développée par Münch (1930) (cité par Patrick, 1997).

2.3.4. Déchargement du complexe conducteur

La voie symplastique apparaît comme la principale voie de déchargement du phloème (Patrick, 1997). Au travers de cette voie, le saccharose transite *via* les plasmodesmes selon un gradient de concentration et est bien souvent hydrolysé dans le cytoplasme des cellules receveuses (sauf betterave et canne à sucre) (Fig. 28). Le maintien de ce gradient est alors assuré par le métabolisme et/ou la compartimentation subcellulaire (vacuole) des glucides qui fixent la force relative des différents puits en compétition dans la plante (Delrot, 2000). De ce fait, l'activité de certaines enzymes telles que les invertases, la saccharose synthase et les enzymes impliquées dans la synthèse d'amidon interviennent de façon déterminante dans la force de puits (Dai *et al.*, 2010 ; Kühn, 1999). Les transporteurs tonoplastiques, fonctionnant en antiport H^+ /saccharose, jouent également un rôle clé dans l'import de saccharose dans la vacuole (Kühn, 2010).

Le saccharose peut également être déchargé à partir du phloème *via* la voie apoplastique. Il doit alors franchir le plasmalemme du complexe conducteur ainsi que celui des cellules puits impliquant la présence de transporteurs spécifiques (Fig. 28). Tout comme pour le chargement du phloème, ce transport est un cotransport H⁺/sucre énergie-dépendant. Après le déchargement, le saccharose peut également être hydrolysé en hexoses (glucose et fructose) dans l'apoplaste grâce à l'activité d'invertases pariétales. L'influx des hexoses dans la cellule puits s'effectue alors grâce à des transporteurs d'hexoses situés sur le plasmalemme. D'après Patrick (1997), le déchargement du phloème comprend invariablement une composante apoplastique résultant d'un gradient de concentration transmembranaire élevé. Cette composante serait dépendante de la conductance entre le symplaste et l'apoplaste. Cependant, et de façon générale, le déchargement apoplastique n'interviendrait que dans quelques situations particulières comme l'accumulation d'une grande quantité de solutés osmotiquement actifs pendant la maturation des fruits, et dans la graine en développement où il n'existe pas de communication symplastique entre l'embryon et le tissu maternel (Frommer et Sonnewald, 1995).

Néanmoins, plusieurs études démontrent que les voies de déchargement du phloème ne sont pas exclusives et qu'elles peuvent évoluer en réponse au développement et à la fonction de l'organe puits (Roberts *et al.*, 1997 ; Ruan et Patrick, 1995 ; Viola *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2006).

2.3.5. Force de puits et déchargement du phloème de la baie de raisin

La force de puits peut être définie comme l'habilité compétitive d'un organe à importer des photoassimilats (Herbers et Sonnewald, 1998). L'activité « puits » se décompose en trois grands aspects importants : (i) le déchargement des assimilats à partir du phloème, le transport post-phloème et l'import dans la cellule puits, (ii) leur utilisation (principalement dans la respiration), et (iii) le stockage des glucides importés. De ce fait, la force de puits peut être influencée par divers processus métaboliques. Ce n'est donc pas une propriété du puits lui-même, mais la résultante de multiples déterminants moléculaires. De plus, les organes puits ne sont qu'une partie de la plante entière, ce qui conduit à une compétition entre les différents puits pour les ressources carbonées. Le flux libérien (phloème) peut donc suivre des directions très variables, les différents organes exportateurs ou consommateurs se comportant comme des vases communicants mis en relation par les tubes criblés (Champagnol, 1984).

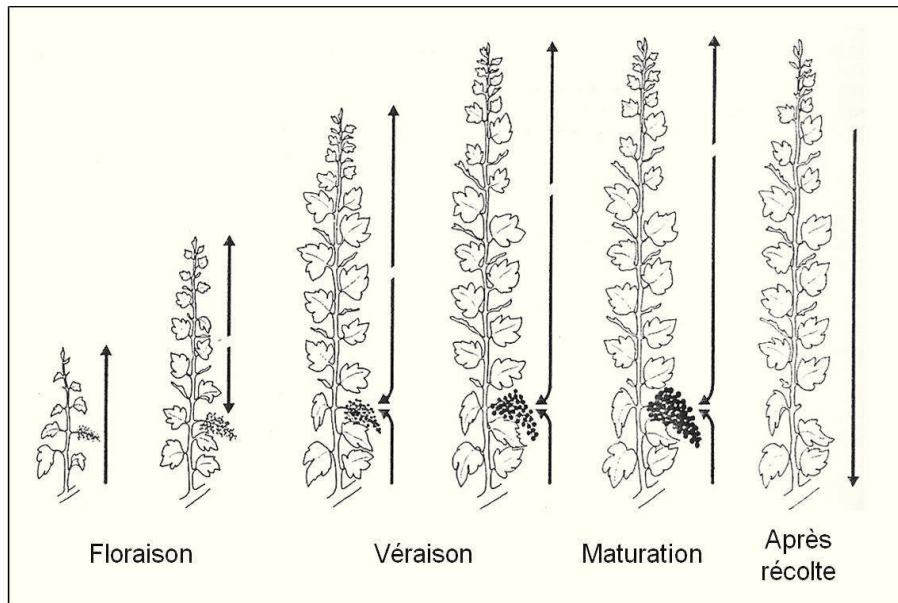


Figure 29 : Evolution du flux libérien, immédiatement après la photosynthèse, au cours du développement. Lors du développement des baies, les grappes deviennent le centre d'appel prioritaire des photoassimilats. (d'après Champagnol, 1984)

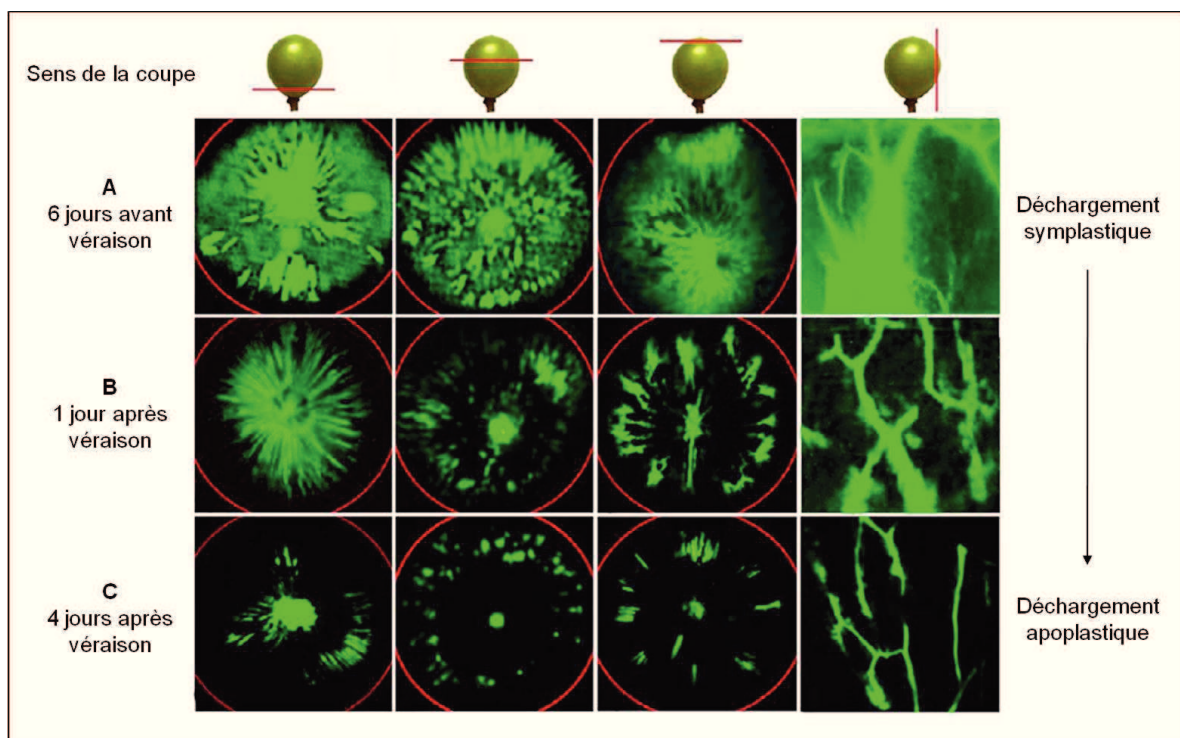


Figure 30 : Transition du mode de déchargement du phloème au cours du développement de la baie de raisin. Des baies de raisin ont été traitées avec de la CFDA puis coupées transversalement ou longitudinalement afin d'observer la progression du traceur dans les tissus. Six jours avant la véraison, le marquage au sein des tissus de la baie est diffus traduisant d'un déchargement symplastique (A). Autour de la véraison, le marquage est moins diffus comparé à la période pré-véraison (B). Après la véraison le marquage est restreint aux vaisseaux périphériques et centraux, traduisant d'un déchargement apoplastique (C). (d'après Zhang *et al.*, 2006)

Au moment de la véraison et durant les six semaines suivantes, les grappes deviennent le centre d'appel prioritaire par rapport aux racines et au cep (Fig. 29) (Candolfi-Vasconcelos *et al.*, 1994). Les baies constituent donc des puits puissants drainant toutes les sources de carbone possibles incluant certaines réserves du bois. En moins de six semaines, la baie multiplie son poids sec par 4 alors que les autres organes ne subissent qu'une faible variation de leur masse.

Au cours de son développement, la baie de raisin est alimentée par des vaisseaux vasculaires centraux et périphériques. Durant les deux premières phases du développement, le complexe conducteur périphérique est connecté aux cellules du parenchyme voisin à travers de nombreux plasmodesmes (Zhang *et al.*, 2006). L'utilisation d'un « traceur » fluorescent tel que la CFDA (6(5)carboxyfluoresceine diacétate) a alors démontré que la baie de raisin utilisait préférentiellement la voie symplastique lors du déchargement du phloème au cours des phases I et II de son développement (Fig. 30). La distribution de la fluorescence a également révélé un déchargement post-phloème symplastique au sein des cellules de stockage du parenchyme. Au cours de la phase III cependant, le blocage du traceur symplastique a alors mis en évidence la prédominance d'un déchargement apoplastique (mettant en jeu des transporteurs membranaires) au sein de la baie. Cette transition entre les deux voies de déchargement, également observée chez la tomate (Nguyen-Quoc et Foyer, 2001 ; Ruan et Patrick, 1995), s'observe à la véraison et apparaît hautement corrélée à une modification dans la structure des plasmodesmes ainsi qu'à l'expression et à l'activité des invertases solubles et pariétales (Zhang *et al.*, 2006). L'évolution vers un déchargement apoplastique du saccharose serait en effet provoquée par une diminution de la conductivité des plasmodesmes partiellement due à un dépôt de callose. De façon logique, le changement dans la voie de transit du saccharose s'accompagne d'un changement dans la localisation de l'activité invertasique. En effet, lors des phases de pré-véraison, l'hydrolyse du saccharose importé par le symplaste est majoritairement catalysée par des invertases acides vacuolaires alors que le saccharose importé par la voie apoplastique après la véraison est clivé par des invertases pariétales (Fig. 31). Dans les deux cas, l'hydrolyse continue du saccharose par les invertases permet de maintenir le gradient de concentration et ainsi de favoriser son déchargement. L'activité de la saccharose synthase (Susy) augmente à la véraison, mais reste 200 à 300 fois inférieure à celle des invertases (Davies et Robinson., 1996 ; Zhang *et al.*, 2006). Elle pourrait intervenir dans l'hydrolyse du saccharose chargé par la voie symplastique ou intervenir au cours de « cycles futiles » dont le rôle dans le métabolisme du saccharose et dans la force de puits a été décrit et discuté chez la tomate au cours du développement du fruit (Nguyen-Quoc et Foyer, 2001).

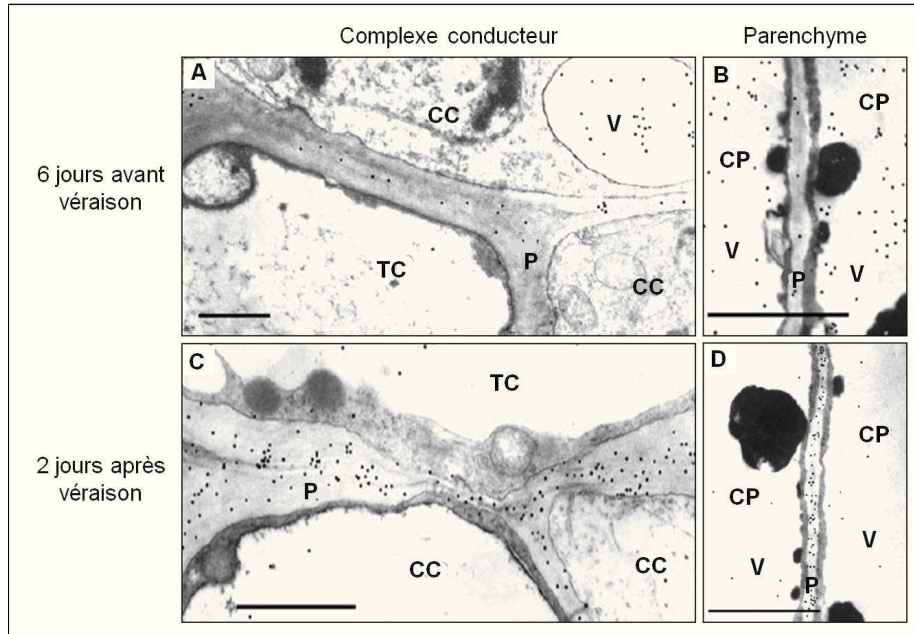


Figure 31 : Marquage immuno-cytochimique des invertases dans les tissus de baies de raisin en développement. Avant la véraison, les invertases acides, marquées à l'aide de particules d'or, sont localisées dans la paroi entre le tube criblé et la cellule compagne mais surtout dans la vacuole de la cellule compagne (A). Ces invertases acides sont également très nombreuses dans la vacuole des cellules du parenchyme avec une densité plus faible dans la paroi (B). Après la véraison, les invertases sont plus nombreuses dans la paroi séparant le tube criblé et la cellule compagne que dans la vacuole de celle-ci (C). Au niveau des cellules du parenchyme, seules quelques invertases sont trouvées dans la vacuole des cellules, la majorité étant localisées dans la paroi (D). CC : cellule compagne ; TC : tube criblé ; P : paroi ; V : vacuole ; CP : cellule du parenchyme. (d'après Zhang *et al.*, 2006)

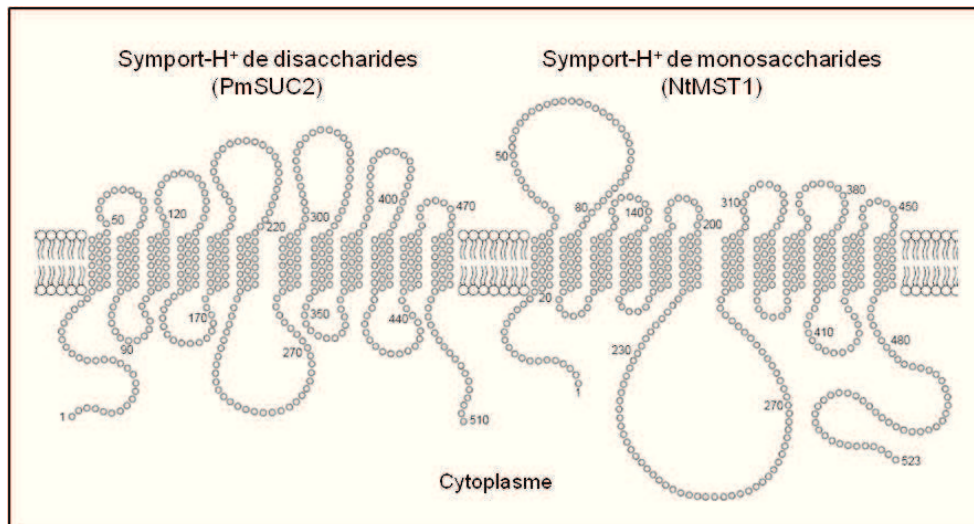


Figure 32 : Représentation hypothétique de la topologie d'un transporteur de disaccharides et d'un transporteur de monosaccharides. Les deux transporteurs de saccharides représentés (PmSUC2 de *Plantago major* et NtMST1 de *Nicotiana tabacum*) sont des symports- H^+ composés de 12 segments transmembranaires en hélices α . (d'après Williams *et al.*, 2000)

3. Les transporteurs de sucres chez les végétaux supérieurs : classification et rôle dans le développement

3.1. La "Major Facilitator Superfamily"

Il est aujourd'hui clairement établi que les plantes possèdent plusieurs types de transporteurs afin de coordonner le transport de sucres dans divers tissus, à différents stades de développement et dans des conditions environnementales variables (Kühn et Grof, 2010, Lemoine, 2000 ; Williams *et al.*, 2000). Chez les végétaux supérieurs, ces transporteurs de sucres sont classés en deux familles distinctes : les « DSTs » (Disaccharide transporters) qui se réfèrent aux transporteurs de disaccharides, et les « MSTs » (Monosaccharide transporters) qui se réfèrent aux transporteurs de monosaccharides (Büttner, 2007 ; Williams *et al.*, 2000). La nomenclature peut cependant varier dans la littérature et devenir confuse s'il on considère les abréviations SUT, SUC, SCR ou encore SUF utilisées pour les transporteurs de disaccharides et STP, HEX et ST utilisées pour les transporteurs de monosaccharides. Néanmoins, malgré cette nomenclature parfois différente, tous ces transporteurs appartiennent à la grande famille « MFS » (Major Facilitator Superfamily) (Marger et Saier, 1993) qui comprend elle-même 29 sous-familles identifiées sur la base de données phylogénétiques (Saier *et al.*, 1999). Ces sous-familles, regroupent diverses protéines identifiées chez les organismes vivants tels que les plantes, les animaux, les champignons et les bactéries, ce qui fait de la MFS une des plus grande classe de transporteurs trouvée dans la nature (Hirai *et al.*, 2003).

La MFS a originellement été définie comme une superfamille de transporteurs (ou perméases) caractérisés par deux unités structurales de six segments transmembranaires, connectées par une boucle cytoplasmique centrale (Nelissen *et al.*, 1997). Les protéines de cette famille ont généralement une longueur de 500 à 600 acides aminés, une masse moléculaire d'environ 55 kDa, et forment une structure de 12 segments transmembranaires constitués d'hélice α , avec des terminaisons N et C cytoplasmiques (Büttner et Sauer, 2000 ; Hirai *et al.*, 2003 ; Sauer, 2007). Bien que leurs séquences en acides aminés soient peu homologues, les DSTs et MSTs partagent donc des similarités structurales (Fig. 32) (Williams *et al.*, 2000). Cette structure dériverait de la duplication d'un gène codant pour une protéine à six segments transmembranaires (Büttner et Sauer, 2000 ; Delrot *et al.*, 2001). Actuellement, les structures tridimensionnelles des protéines de transporteurs de sucres chez les plantes ne

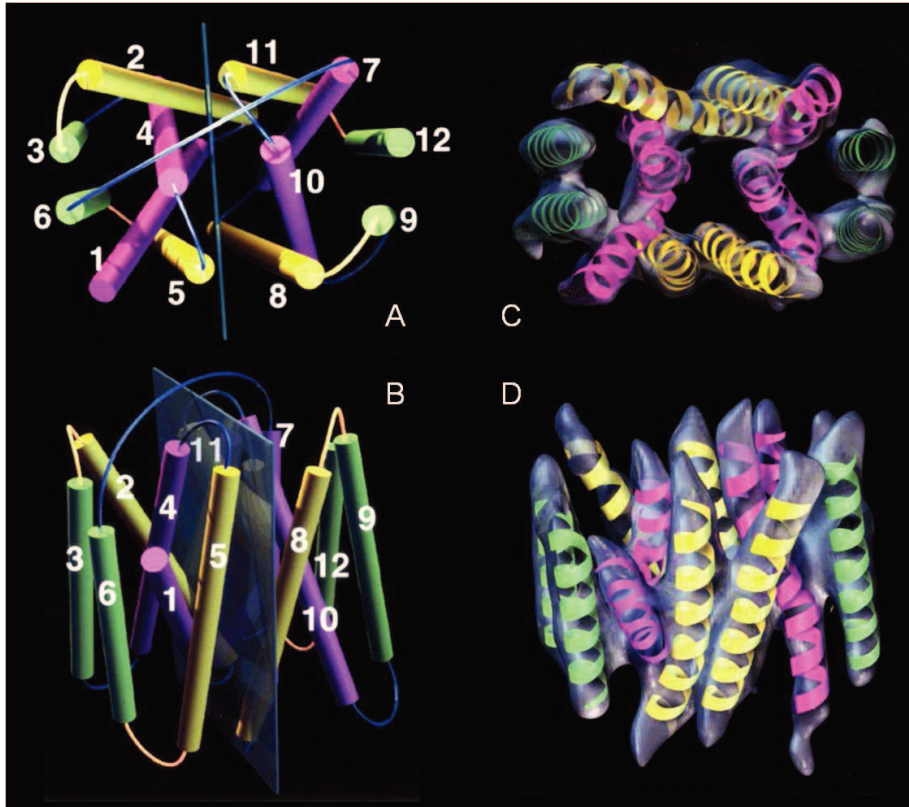


Figure 33 : Structure tridimensionnelle du transporteur bactérien OxIT. Arrangement probable des hélices de la protéine OxIT, membre de la MFS. Les hélices sont représentées par des cylindres et les connexions entre hélices par des boucles. La limite entre les deux parties de la protéine est indiquée par un plan transparent. (A) vue à partir du cytoplasme, (B) vue de face. La protéine OxIT est également représentée par une carte de densité tridimensionnelle. (C) vue à partir du cytoplasme, (D) vue de face. (d'après Hirai *et al.*, 2003)

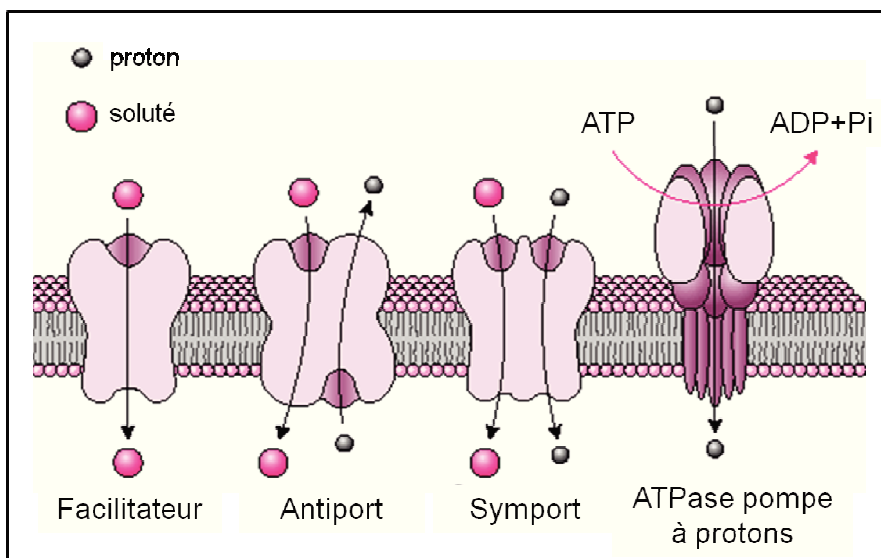


Figure 34 : Mécanismes de diffusion facilitée par des transporteurs. La diffusion facilitée permet des transports plus rapides que la diffusion passive ; elle peut ou non être couplée à un transport de proton.

sont pas encore accessibles mais de nombreuses approches ont conduit à l'identification, au niveau de la séquence en acides aminés, de régions fonctionnelles importantes permettant de proposer des modèles prédictifs de ces structures (Büttner et Sauer, 2000). Les données sont bien souvent obtenues pour des transporteurs « non végétaux » et transposées au modèle végétal lorsque de forts degrés de similarité de séquence sont observés. Une analyse structurale du transporteur d'oxalate bactérien OxIT a d'ailleurs permis d'affiner les données sur la structure tridimensionnelle des membres de la MSF. Les auteurs ont ainsi montré que les 12 hélices α de la protéine pouvaient se diviser en 3 classes (Fig. 33) (Hirai *et al.*, 2003). Un lot de 4 hélices (vert), presque perpendiculaires au plan de la bicouche lipidique, est observé en périphérie de la molécule. Ce lot d'hélices, de part sa position, ne semble pas participer à la formation de la cavité centrale par laquelle transite le substrat. Un second lot de 4 hélices (jaune) est incliné de 10° à 20° le long de la circonférence de la molécule. Une face de ces hélices contribue à la formation du canal central sur la longueur. Enfin, un troisième lot de 4 hélices (violet) constitue également une part de la cavité centrale mais s'incline de façon à la « traverser » du centre vers l'extérieur (Fig. 33). L'angle de 20° à 30° formé par ces dernières implique qu'elles entrent exclusivement en contact soit avec la moitié cytoplasmique, soit avec la moitié périplasmique du canal transmembranaire. L'architecture finale est telle que chaque moitié de la molécule comprend un lot de 6 hélices, les deux lots étant fortement symétriques. Ainsi, la limite des deux moitiés forme une interface presque creuse qui constitue le canal de transport. La forte symétrie structurale de la molécule pourrait constituer une explication possible au transport bidirectionnel de substrat par les protéines de la MFS.

La plupart des transporteurs sont codés par des familles multigéniques, au sein desquelles les membres différeraient sensiblement dans leur spécificité de substrat, et de façon plus importante dans leur localisation et la régulation de leur expression (Delrot *et al.*, 2001). Ces transporteurs peuvent fonctionner différemment selon le système, leur localisation et/ou les conditions physiologiques de la plante, et sont capables de transporter des métabolites de nature diverse (Pao *et al.*, 1998). Actuellement, excepté les trois facilitateurs PsSUF1, PsSUF4 (*Phaseolus vulgaris*) et PvSUF1 (*Pisum sativum*) qui permettent le transport bidirectionnel, pH- et énergie-indépendant du saccharose, tous les autres transporteurs de sucres caractérisés chez les plantes sont des co-transporteurs membranaires sucre/proton avec une stoechiométrie de un pour un (Büttner et Sauer, 2000 ; Frommer et Sonnewald, 1995 ; Lemoine, 2000). Ces transporteurs de sucres peuvent être de trois types (Fig. 34) : (i) les

transporteurs plasmalemmiques d'influx de type symport/H⁺ qui permettent l'entrée des sucres dans les cellules ou dans certains compartiments cellulaires ; (ii) les transporteurs tonoplastiques qui peuvent être des facilitateurs (diffusion facilitée) mais qui sont également supposés fonctionner en tant qu'antiport/H⁺ en raison du pH vacuolaire plus bas que le pH cytoplasmique ; et (iii) les transporteurs plasmalemmiques d'efflux, de nature encore mystérieuse, responsable du déchargement au niveau des organes puits ou de la sortie du saccharose des cellules du mésophylle au voisinage du phloème (Briskin *et al.*, 1985 ; Doll *et al.*, 1979 ; Keller, 1992 ; Laloi *et al.*, 1993 ; Lemoine, 2000 ; Martinoia *et al.*, 2000).

3.2. Les transporteurs de disaccharides

Les transporteurs de saccharose sont d'importance majeure chez les plantes puisque ce sucre est la forme habituellement transportée à longue distance. De ce fait, ces transporteurs apparaissent comme étant spécifiques des plantes (Williams *et al.*, 2000). Le premier transporteur de saccharose a été identifié et caractérisé en 1992 chez l'épinard (*Spinacia oleracea*) par complémentation fonctionnelle d'une levure mutée (Riesmeier *et al.*, 1992). Dans leur étude, les auteurs ont développé une levure mutée dans la voie de sécrétion des invertases (*Saccharomyces cerevisia* SUSY7) et incapable de croître en présence de saccharose comme seule source de carbone car démunie de système de transport pour ce sucre. Celle-ci pouvait cependant métaboliser le saccharose interne grâce à la présence d'une saccharose synthase (Susy). La complémentation de cette levure à l'aide d'une banque d'ADNc de feuilles d'épinard a permis d'identifier le premier ADNc codant pour un transporteur de saccharose : *SoSUT1* (*Spinacia oleracea* Sucrose Uptake Transporter 1). Ce transporteur a été caractérisé comme symport saccharose/H⁺ avec une stoechiométrie de un pour un, un K_m estimé à 1,5 mM et une masse moléculaire de 55 kDa. Depuis le clonage de *SoSUT1*, la méthode de complémentation utilisant les levures (*S. cerevisia*, *S. pombe*) est devenue une des méthodes les plus fréquemment utilisées pour la caractérisation fonctionnelle des transporteurs chez de nombreuses plantes (Büttner et Sauer, 2000, Lemoine, 2000) telles que *S. tuberosum* (StSUT1 ; Riesmeier *et al.*, 1993), *A. thaliana* (AtSUC1 et 2 ; Sauer et Stolz, 1994), *P. major* (PmSUC1 ; Gahrtz *et al.*, 1996), *O. sativa* (OsSUT1 ; Hirose *et al.*, 1997), *V. faba* (VfSUT1 ; Weber *et al.*, 1997) ou encore *D. carota* (DcSUT1 et 2 ; Shakya et Sturm, 1998). Bien que la levure représente un système d'expression hétérologue pratique, plusieurs transporteurs de sucres (AtSUC1, StSUT1, AtSTP1) ont également été caractérisés dans des ovocytes de Xénope (*Xenopus laevis*) qui constituent un second système pour l'étude

des propriétés cinétiques et électrogéniques des transporteurs (Aoshima *et al.*, 1993 ; Boorer *et al.*, 1992, 1994 ; Miller et Zhou, 2000 ; Zhou *et al.*, 1997).

Les SUTs/SUCs caractérisés sont des transporteurs d'influx du plasmalemme qui ont généralement une activité de transport optimum pour un pH externe acide (4,5-5,5) même si certains transporteurs tels que PmSUC1 et AtSUC1 se montrent moins sensibles que les autres protéines lors d'une augmentation de pH. L'activité de ces deux transporteurs reste constante pour un pH compris entre 4,5 et 6,5 (Lemoine, 2000). Les DSTs ont une affinité pour le saccharose qui peut être variable bien que la majorité des transporteurs caractérisés aient un K_m compris entre 0,3 et 2 mM. Certains tels que AtSUC9 ou AgSUT1 montrent une affinité pour le sucre supérieure ($K_m \sim 0,07$ et $0,139$ mM respectivement) (Sivitz *et al.*, 2007 ; Noiraud *et al.*, 2000) ou une affinité moindre tels que HvSUT1 et 2 (*Hordeum vulgare*) (K_m respectif de 7,5 et 5 mM) (Weschke *et al.*, 2000). Ils présentent une forte spécificité pour leur substrat, l'activité de transport pouvant cependant être inhibée en présence de maltose (Williams *et al.*, 2000). Pour certains, l'activité de transport est également stimulée par le glucose ce qui peut être indirectement attribué à une augmentation de l'activité de la pompe à protons.

A l'heure actuelle, rares sont les transporteurs qui ont pu être associés spécifiquement à des tissus sources ou puits. Certains gènes semblent cependant exprimés uniquement dans les organes puits tels que *DcSUT2* dans la tige en croissance, la pointe racinaire, la fleur et la graine en développement (Shakya et Sturm, 1998) ou *NtSUT3* spécifiquement exprimé dans le grain de pollen en fin de développement (Lemoine *et al.*, 1999). La plupart des données indiquent que les transporteurs de saccharose sont exprimés dans le phloème, tout au long du complexe conducteur et que ceux-ci pourraient intervenir à la fois dans le chargement et déchargement du disaccharide. Parallèlement à leur rôle dans le chargement et déchargement, plusieurs transporteurs sont aussi suspectés intervenir dans la récupération du saccharose (fuites) le long du complexe conducteur au cours de la translocation. D'autres encore tels que StSUT1 et DcSUT2 ne sont pas exclusivement confiné dans le phloème mais peuvent également être présents de façon minoritaire dans d'autres cellules de parenchyme de stockage (Kühn *et al.*, 1996 ; Lemoine *et al.*, 1996 ; Shakya et Sturm, 1998).

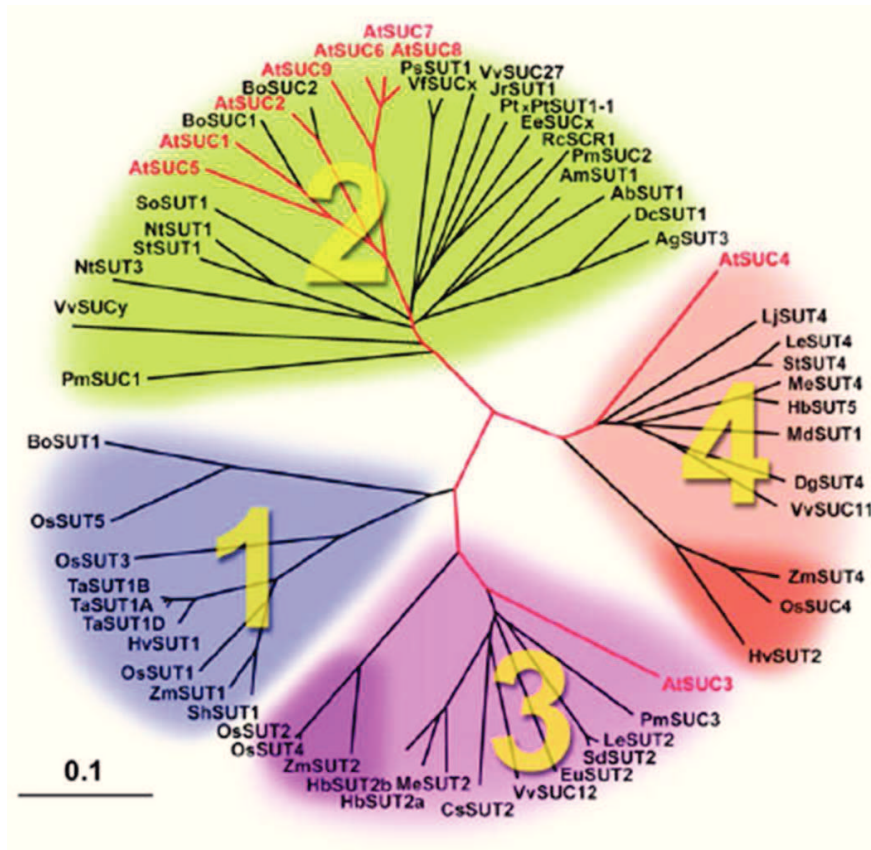


Figure 35 : Arbre phylogénétique de séquences de transporteurs de saccharose chez les plantes. L'arbre regroupe 62 séquences de transporteurs de saccharose putatifs ou caractérisés disponibles dans les bases de données publiques. (d'après Sauer, 2007)

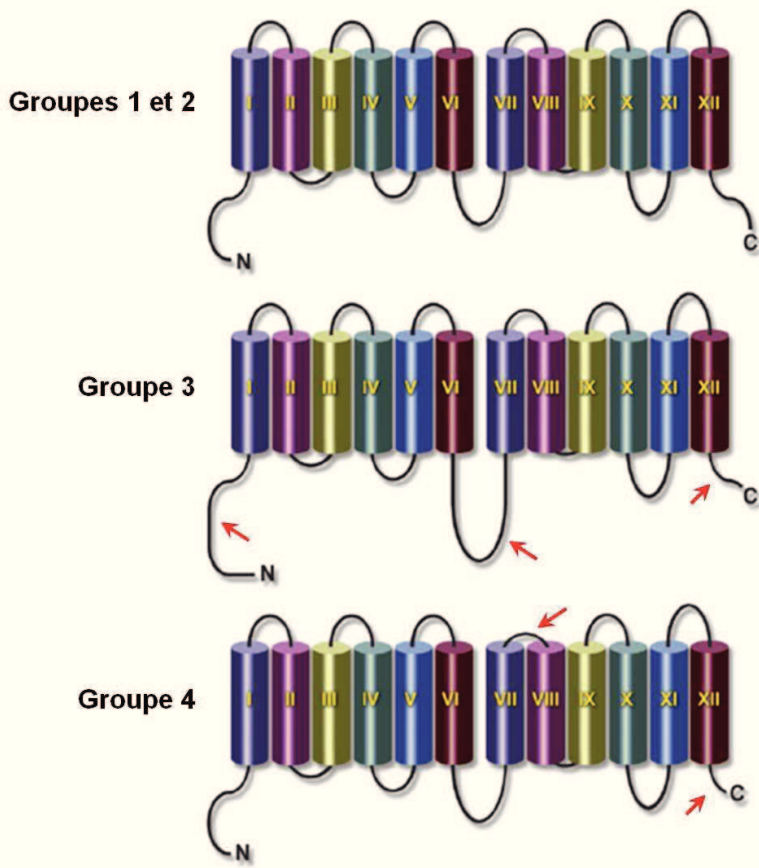


Figure 36 : Structure des transporteurs de saccharose. En fonction de leur séquence protéique, les transporteurs de saccharose ont été classés en différents groupes. Chaque groupe possède donc des caractéristiques structurales différentes. Dans cette représentation, les parties N- et C- terminales sont orientées du côté cytoplasmique. Les transporteurs du groupe 3 ont une partie N-terminale plus longue et une partie C-terminale plus courte que les transporteurs des groupes 1 et 2. Leur boucle cytoplasmique centrale est également plus importante. Les transporteurs du groupe 4 ont la séquence peptidique la plus courte. La partie C-terminale ainsi que la boucle entre les hélices transmembranaires VII et VIII sont réduites. (d'après Sauer, 2007).

Chez toutes les plantes analysées telles que le riz (*O. sativa*), la maïs (*Z. mays*), l'arabette (*A. thaliana*), le plantain (*P. major*), la vigne (*V. vinifera*) ou encore la tomate (*L. esculentum*), de petites familles multigéniques de transporteurs de saccharose ont été identifiées (Davies *et al.*, 1999 ; Hackel *et al.*, 2006 ; Sauer *et al.*, 2004 ; Sauer, 2007 ; Yu *et al.*, 2002). En 2004, 2007 puis 2010, un arbre phylogénétique a été généré à partir des séquences pleine longueur de transporteurs de saccharose disponibles dans différentes bases de données (Lalonde *et al.*, 2004 ; Sauer, 2007 ; Kühn et Grof, 2010). Le second arbre (2007), qui regroupe 62 séquences, révèle l'existence de 4 groupes distincts (Fig. 35): le groupe 1 comporte des séquences de monocotylédones uniquement ; le groupe 2, des séquences de dicotylédones uniquement alors que les groupes 3 et 4 sont mixtes (Sauer, 2007). En 2010, Kühn et Grof proposeront la distinction d'un cinquième groupe, celui-ci étant exclusivement constitué de transporteurs de monocotylédones non caractérisés fonctionnellement. L'analyse des différentes séquences a permis d'identifier des régions variables entre les transporteurs des quatre premiers groupes et d'attribuer ces différences à des sites spécifiques dans les protéines. Ainsi les différences les plus évidentes ont été détectées dans les régions N et C terminales (localisées dans le cytoplasme) ainsi que dans les boucles centrales connectant les hélices VI et VII ou VII et VIII (face apoplastique ou lumen de la vacuole) (Fig. 36).

3.2.1. Les transporteurs de saccharose chez la vigne

Trois séquences d'ADNc homologues à des transporteurs de saccharose ont été identifiées et clonées à partir de baies de raisin (*V. vinifera*): *VvSUC11* (AF021808), *VvSUC12* (AF021809) et *VvSUC27* (AF021810) (Davies *et al.*, 1999). Une quatrième séquence nommée *VvSUT2* (AF439321) peut également être trouvée dans la base de données GenBank même si aucune étude fonctionnelle n'a, à ce jour, été conduite sur ce gène. Les séquences protéiques de *VvSUC11*, 12 et 27 ont une homologie d'environ 50% et un alignement entre les trois séquences a pu montrer que *VvSUC12* révélait une boucle centrale cytoplasmique plus longue que les deux autres protéines (95 acides aminés pour *VvSUC12* contre 40 et 35 pour *VvSUC11* et *VvSUC27* respectivement) (Davies *et al.*, 1999). L'analyse phylogénétique des transporteurs de saccharose de plantes effectuée par Sauer (2007) montre d'ailleurs un regroupement différent des transporteurs de vigne au sein de la famille des DSTs (Fig. 35). *VvSUC11* se positionne dans le groupe 4 (SUT4) des transporteurs faible affinité-haute capacité (LAHC), *VvSUC27* et *VvSUT2* dans le groupe 2 (SUT1/SUC2) des transporteurs haute affinité-faible capacité (HALC), et *VvSUC12* dans le groupe 3 (SUT2/SUC3) dans lequel beaucoup de transporteurs présentent une large boucle centrale

cytoplasmique. *VvSUC11* et *VvSUC12* sont très peu exprimés dans les racines et vrilles (Davies *et al.*, 1999). Ils sont en revanche fortement exprimés dans les pépins, un peu moins dans la fleur et les feuilles, *VvSUC12* étant presque exclusivement exprimé dans la jeune feuille. Au cours du développement de la baie, ces deux gènes ont un profil d'expression relativement semblable, avec une expression modérée jusqu'à la véraison à partir de laquelle le niveau de transcrits augmente. Le profil d'expression de *VvSUC27* apparaît très différent de celui de ses deux homologues avec une très forte expression dans les racines, les vrilles, les pépins et les fleurs et une expression moindre dans les feuilles. Dans la baie, le profil d'expression de *VvSUC27* est inversé par rapport à celui de *VvSUC11* et *VvSUC12*. Son expression est significative avant la véraison à partir de laquelle elle diminue. Dès 12 semaines après la floraison, les transcrits de *VvSUC27* ne sont plus détectables.

Les trois transporteurs de saccharose ont été caractérisés par complémentation fonctionnelle d'une levure mutante (*S. cerevisiae* Σ 22574s, SEY2102 ou SUSY7) déficiente en invertases. Les trois protéines catalysent un transport actif de saccharose, avec un optimum à pH acide (entre 4 et 5) impliquant certainement un mécanisme de co-transport de type symport/H⁺. *VvSUC11* et *VvSUC12* ont révélé une forte affinité pour le saccharose avec des K_m respectifs de 0,88 et 1,36 mM alors que *VvSUC27* serait un transporteur de faible affinité (K_m ~9 mM) (Ageorges *et al.*, 2000 ; Manning *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2008). L'affinité pour le saccharose de *VvSUC11*, *VvSUC12* et *VvSUC27* est relativement surprenante s'il on considère les groupes de transporteurs auxquels ils appartiennent. En effet, *VvSUC11* révèle une forte affinité pour le saccharose alors qu'il se positionne dans le groupe 4 de transporteurs de faible affinité, *VvSUC12* présente également une forte affinité pour le disaccharide alors qu'il possède une grande boucle cytoplasmique caractéristique des senseurs du groupe 3, et *VvSUC27* révèle une faible affinité pour le saccharose alors qu'il est regroupé au sein du groupe 2 des transporteurs de haute affinité des dicotylédones (Sauer, 2007). Ces observations indiquent d'une part que la fonctionnalité d'un transporteur ne peut être réellement prédite par une simple comparaison de séquence, et d'autre part que les SUCs de la vigne pourraient représenter des exceptions au sein des différents groupes de transporteurs.

Bien qu'exprimés dans certains tissus végétatifs comme les feuilles ou les vrilles, les transporteurs de saccharose de la vigne semblent très fortement exprimés dans différents tissus d'organes puits tels que les racines (*VvSUC27*), les pépins et les baies (*VvSUC11*, *12* et *27*) (Davies *et al.*, 1999 ; Manning *et al.*, 2001). Le mode de déchargement phloémien de la

baie de raisin évolue au cours du développement passant d'un déchargement symplastique à un déchargement apoplastique (Zhang *et al.*, 2006). Ce dernier mode nécessite un mécanisme efficace de transport au travers des membranes cellulaires. L'accumulation des sucres, qui caractérise la maturation de la baie de raisin, implique donc des transporteurs de saccharose localisés sur la membrane plasmique. Les données actuelles suggèrent que la baie exprime au moins trois gènes de transporteurs de saccharose au cours de son développement, ceux-ci possédant différentes affinités et capacités à transporter le disaccharide. Ce dernier point impliquerait que chacune de ces protéines fonctionnent afin de satisfaire un besoin spécifique en relation avec le développement de la baie.

3.3. Les transporteurs de monosaccharides

Au niveau des sites de destination (organes puits), le saccharose peut soit entrer directement dans la cellule *via* la voie symplastique (plasmodesmes), soit *via* la voie apoplastique grâce à un transport actif. Alternativement, le saccharose peut être hydrolysé dans l'apoplaste par des invertases extracellulaires pour être absorbé sous forme d'hexoses (glucose et fructose, Lalonde *et al.*, 2004 ; Büttner and Sauer, 2000 ; Büttner, 2007). Tout comme le saccharose, le transport des hexoses à travers les membranes est assuré par des protéines qui catalysent le transport soit par diffusion facilitée (mais sélective), soit au travers d'un transport actif secondaire et permettant leur accumulation.

Dans le règne végétal au sens large (*Plantae*), les premières caractéristiques du transport des hexoses ont été étudiées et caractérisées dans les années 1970 chez l'algue verte *Chlorella kessleri* (chlorophyte autrefois appelée *C. vulgaris*) (Komor et Tanner, 1974). Cette algue unicellulaire peut croître aussi bien en conditions autotrophiques qu'en conditions hétérotrophiques, ce dernier cas impliquant le glucose comme seule source de carbone. La transition entre les deux modes trophiques implique une augmentation importante du transport d'hexoses qui a alors été caractérisé comme un système dépendant du pH, avec un optimum à pH acide (4,5-6,5). L'ADNc *CkHUP1* (*Chlorella kessleri* Hexose Uptake Protein 1) codant pour une protéine de transport fut cloné par criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir de cellules induites par du glucose (Sauer et Tanner, 1989). La fonction de CkHUP1 a ensuite été caractérisée dans la levure (*Schizosaccharomyces pombe*) en tant que symport glucose/H⁺ à forte affinité ($K_m = 15 \mu\text{M}$) ; constituant ainsi le premier transporteur de sucre de la membrane plasmique identifié et caractérisé du règne végétal (Sauer *et al.*, 1990a). A l'aide de sondes dérivées de l'ADNc CkHUP1, il a alors été possible d'identifier, de cloner et de

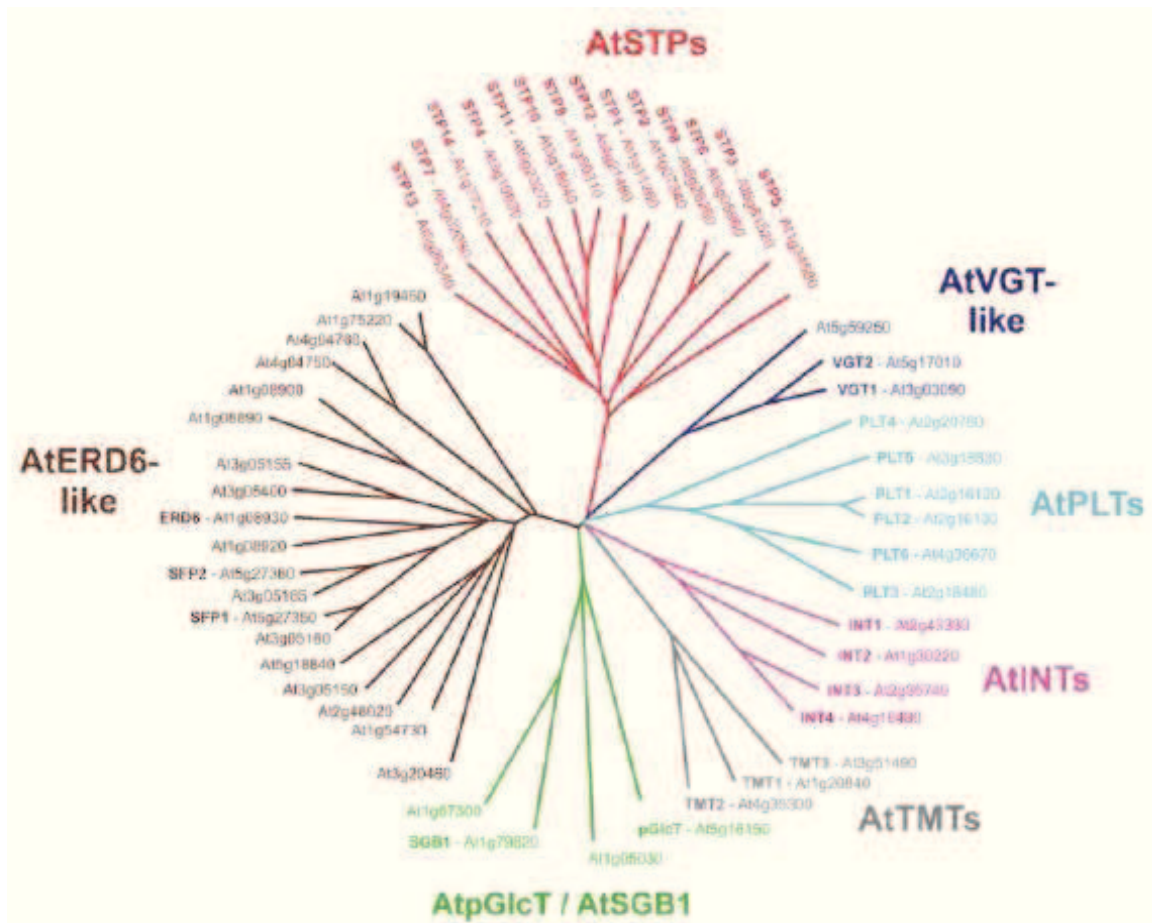


Figure 37 : Arbre phylogénétique des transporteurs de monosaccharides chez *Arabidopsis*. L'arbre regroupe 53 séquences formant 7 clades distincts. (d'après Büttner, 2007)

caractériser le premier transporteur de glucose chez les plantes supérieures : AtSTP1 (*Arabidopsis thaliana* Sugar Transport Protein 1, Sauer *et al.*, 1990b). En 1993, suivant une même approche, une sonde dérivée de *AtSTP1* a alors permis d'identifier et de caractériser NtMST1 chez le tabac (*Nicotiana tabacum* Monosaccharide Transporter 1, Sauer et Stadler, 1993). Depuis le clonage de AtSTP1 et NtMST1, de nombreux transporteurs de sucres de plantes ont été identifiés tels que AtSTP2 (*A. thaliana*), MtST1 (*M. truncatula*) ou encore CST1-7 (*C. rubrum*) (Harrison, 1996 ; Roitsch et Tanner, 1994 ; Truernit *et al.*, 1999).

A l'heure actuelle, de nombreux transporteurs de monosaccharides (MSTs) ont été identifiés et, pour la plupart, caractérisés chez de nombreuses plantes telles que *A. thaliana* (Büttner, 2007, 2010), la tomate (Dibley *et al.*, 2005), le riz (Toyofuku *et al.*, 2000), la fève (Weber *et al.*, 1997) ou encore la vigne (Fillion *et al.*, 1999, Vignault *et al.*, 2005 ; Hayes *et al.*, 2007). Tous les transporteurs caractérisés jusqu'à maintenant sont de type symport/H⁺ énergie-dépendant acceptant les monosaccharides formant un cycle pyranose (Büttner et Sauer, 2000). Les MSTs ont une spécificité pour leurs substrats plus large que les transporteurs de saccharose (Delrot *et al.*, 2001 ; Williams *et al.*, 2000) pouvant inclure les hexoses tels que le glucose, le fructose, le galactose et le mannose ; le xylose (pentose) ou encore 3-*O*-méthylglucose, non métabolisable (Büttner, 2010). Les K_m rapportés pour les transporteurs caractérisés se situent généralement entre 10 et 100 μM considérant leur substrat préférentiel (Büttner et Sauer, 2000). Alors que les gènes de DSTs apparaissent spécifiques des plantes, de nombreux gènes de MSTs trouvent des orthologues chez les bactéries (EcAraE, EcXylE, EcGalP), les levures (ScHxts, ScGal2) et les mammifères (GLUTs) (Büttner et Sauer, 2000 ; Williams *et al.*, 2000).

En comparant les séquences de transporteurs des 4 génomes eucaryotes séquencés *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *A. thaliana* et *O. sativa*, les MSTs peuvent se distinguer en fonction de leur phylogénie, de leur spectre de substrats, leur mécanisme de transport et par leur spécificité cellulaire formant ainsi des clades spécifiques (Lalonde *et al.*, 2004). Ainsi 13 clades ont pu être identifiés dans la superfamille des MSTs. Chez les plantes, la famille la mieux caractérisée est celle des *AtSTPs* chez *Arabidopsis thaliana* dans laquelle 53 gènes homologues ont pu être identifiés puis classés en 7 sous-familles d'origine commune (Fig. 37) (Büttner, 2007). Bien que certains « MST-like » aient une relativement faible homologie avec des transporteurs caractérisés, toutes les protéines possèdent les deux signatures protéiques typiques des transporteurs de sucres (G-R-[KR]) entre les domaines transmembranaires II/III et

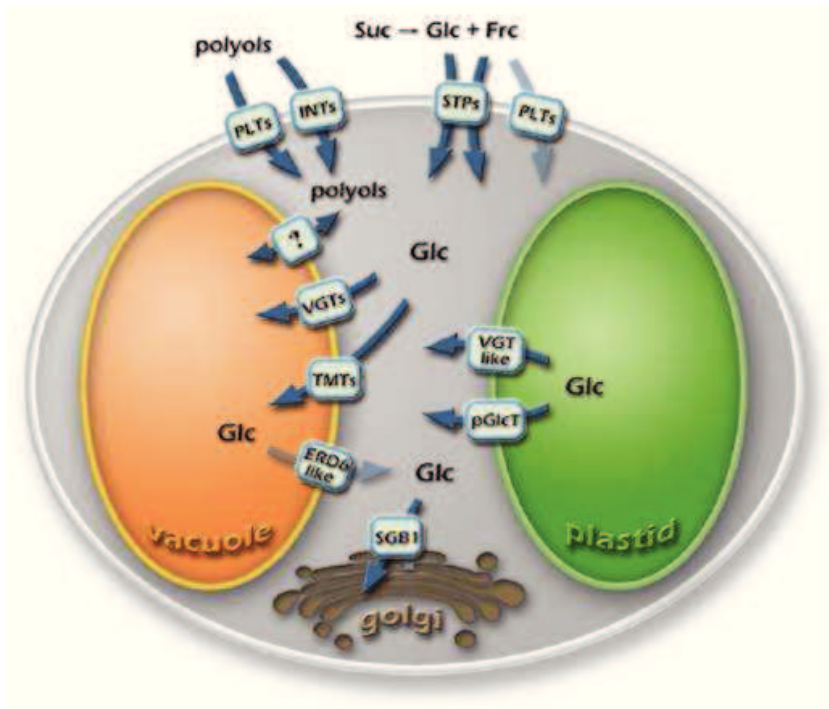


Figure 38 : Illustration schématique de la distribution subcellulaire des monosaccharides et de la localisation des transporteurs MSTs. Le sens de transport du glucose, fructose et des polyols dans la cellule est indiqué par les flèches. (STPs : Sugar Transport Proteins ; VGTs : Vacuolar Glucose Transporters ; TMTs : Tonoplast Monosaccharide Transporters, pGlcT : Plastidic Glucose Transporter ; SGB1 : Suppressor of G protein Beta1 ; PLTs : Polyol Transporters ; INTs: Inositol Transporters, ERD6-like : Early-responsive to dehydration). (d'après Büttner, 2007)

VIII/IX). Par mesure de clarté, la classification des MSTs sera abordée selon celle établie chez *Arabidopsis* par Büttner (2007) ; ceci n'excluant pas différentes comparaisons avec les MSTs d'autres espèces.

3.3.1. Sous-famille des STPs (Sugar Transport Proteins)

La famille des AtSPTs est, jusqu'à présent, la mieux caractérisée des MSTs d'*A. thaliana* et comprend 14 gènes homologues dont 9 (AtSTP1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 13 et 14) ont été caractérisés comme symport/H⁺ de la membrane plasmique et de haute affinité pour leur substrat (sauf AtSTP3) (Büttner, 2007 ; 2010). Ces transporteurs catalyseraient le transport des monosaccharides de l'apoplaste vers la cellule (Fig. 38). De façon intéressante, AtSTP14 ne transporte pas le glucose ni le fructose mais est spécifique du galactose ; seuls AtSTP6 et AtSTP13 transportent significativement le fructose, et aucune activité de transport n'a encore pu être démontrée pour AtSTP5 et AtSTP7. Dans la littérature, les 14 gènes d'*Arabidopsis* trouvent 13 orthologues chez le riz (*O. sativa*), tous se regroupant dans un même et unique clade (Lalonde *et al.*, 2004). Les profils d'expression des STPs de différentes plantes suggèrent que ces gènes de transporteurs seraient majoritairement exprimés au niveau des tissus puits (Delrot *et al.*, 2001), bien que certains tels que *AtSTP1*, *3*, *4*, *13* et *14* soient également exprimés dans la feuille ou la tige (Büttner, 2010 ; Stadler *et al.*, 2003 ; Truernit *et al.*, 1996). AtSTP3 serait d'ailleurs spécifique des feuilles quelque soit le stade de développement (Büttner *et al.*, 2000). Les hexoses n'étant pas chargés dans le complexe conducteur, le rôle de ces transporteurs dans les organes tels que la feuille source ou la tige serait la récupération des monosaccharides à partir de l'apoplaste, l'origine desquels reste floue (recyclage de monosaccharides lors de la mort cellulaire ?).

Bien que le sol ne contienne normalement pas de sucres en quantités significatives, les racines constituent un autre organe puits capable d'absorber les hexoses extérieurs. Chez *Arabidopsis*, les gènes de transporteurs de saccharose sont relativement peu exprimés dans les racines parallèlement à une forte expression d'une invertase pariétale (*AtcwINV1*), ce qui suggère que le saccharose n'a probablement pas un rôle central dans l'import de carbone dans la cellule puits *via* la voie apoplastique (Büttner *et al.*, 2010). Ainsi, l'importance des hexoses expliquerait l'expression significative d'*AtSTP1*, *4*, *7* et *13* dans différentes parties de la racine (Büttner, 2010 ; Sherson *et al.*, 2000 ; Truernit *et al.*, 1996). L'importance d'AtSTP1 pour l'absorption des hexoses dans la racine a été démontrée à l'aide de mutants affectés dans leur capacité à absorber le glucose (Sherson *et al.*, 2000). AtSTP1 apparaît comme le

transporteur de monosaccharides majoritaire de la racine. Beaucoup d'autres gènes de MSTs tels que *NtMST1* (*N. tabacum*), *LeHT1* et *LeHT3* (*L. esculentum*), *OsMST2-4* (*O. sativa*) ou encore *Mtst1* (*M. truncatula*) ont une expression significative voire très élevée dans la racine (Gear *et al.*, 2000 ; Harrison, 1996 ; Sauer et Stadler, 1993 ; Toyofuku *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2007). Il a alors été suggéré que les transporteurs de monosaccharides pouvaient être impliqués dans l'import de glucose requis pour la synthèse de la paroi (cellulose) et dans le maintien de la pression osmotique lors de l'élongation cellulaire.

Les sucres sont nécessaires au développement de l'embryon ainsi qu'au dépôt des composés de réserve requis pour la germination (Williams *et al.*, 2000). Chez *V. faba*, durant les premières phases du développement de la graine, *VfSTP1* ainsi que l'invertase pariétale *VfCWINVI* sont exprimés dans les cotylédons de l'embryon (Weber *et al.*, 1997). L'expression des deux gènes est confinée dans les régions épidermiques fournissant les hexoses, substrats métaboliques, nécessaires aux divisions cellulaires et à la morphogénèse. Au cours des phases plus tardives du développement de l'embryon (constitution des réserves), l'expression de *VfSTP1* diminue au profit de *VfSUT1*. Chez *Arabidopsis*, *AtSTP1*, 5, 7, 8, 12 et 14 révèlent une expression significative dans la graine en développement, ceux-ci étant majoritairement exprimés dans les téguments (Büttner, 2010 ; Sherson *et al.*, 2000). *AtSTP12* et 14 sont les deux transporteurs les plus abondants dans les téguments et l'endosperme du stade pré-globulaire au stade « torpille ». L'expression d'*AtSTP8* est confinée dans la chalaze de l'albumen (point de bifurcation du faisceau cribro-vasculaire en provenance du placenta) durant les phases précoces du développement, celle d'*AtSTP7* exclusivement dans le suspenseur. La fonction d'*AtSTP5* et d'*AtSTP7* reste indéterminée, les deux protéines n'étant pas caractérisées (ne transportent aucun sucre habituellement testé).

3.3.2. Sous-famille des AtVGTs (Vacuolar Glucose Transporters)

La famille des AtVGTs, très proche des AtSTPS, est composée de trois gènes similaires à une perméase bactérienne de xylose (LbXylT) et nommés *AtVGT1* (At3g03090), *AtVGT2* (At5g17010) et *AtVGT3?* (At5g59250). Sur ces trois transporteurs, *AtVGT1* et *AtVGT2* ont récemment été localisés sur le tonoplaste de levures (EBY.VW4000) et de protoplastes d'*Arabidopsis* à l'aide de fusions GFP (Aluri *et al.*, 2007). Bien que ne complétant pas la levure mutante EBY.VW4000 déficiente dans le transport des hexoses (Reifenberger *et al.*, 1997), la fonction d'*AtVGT1* a pu être déterminée à l'aide de vacuoles isolées de levures (SAY114) comme système hétérologue. Ainsi, *AtVGT1* a pu être caractérisé comme

transporteur de glucose énergie-dépendant ($K_m = 3,7$ mM), transportant également mais dans une moindre mesure le fructose, mais pas le xylose. Le gène est fortement exprimé dans le pollen, un peu moins dans les feuilles et les tiges, et n'est pas détectable dans les racines. L'étude de mutants *Atvgt1* a pu révéler un rôle important, bien que non exclusif, de ce transporteur de glucose dans la germination de la graine et dans la floraison (Aluri *et al.*, 2007). Aucune fonction n'est encore démontrée pour AtVGT2 et AtVGT3.

3.3.3. Sous-famille des AtTMTs (Tonoplast Monosaccharide Transporters)

Tout comme les AtVGTs, la famille des AtTMTs est constituée de trois protéines homologues, AtTMT1-3 (At1g20840, At4g35300, At3g51490), qui présentent une large boucle centrale entre les domaines transmembranaires VI et VII, caractéristique des senseurs potentiels de sucres décrits chez les DSTs du groupe SUT2/SUC3 (Büttner, 2007 ; Neuhaus, 2007). A l'heure actuelle, le rôle de cette boucle centrale est encore flou et la fonction de ces protéines en tant que senseurs de sucres n'a pas été démontrée. Deux études de protéomique ont révélé la présence d'AtTMT1 et AtTMT2 sur le tonoplaste (Carter *et al.*, 2004 ; Endler *et al.*, 2006). Plus récemment, une étude de localisation à l'aide de fusion GFP a confirmé la localisation tonoplastique d'AtTMT1 mais aussi d'AtTMT3 dans des protoplastes de tabac et d'*Arabidopsis* (Wormit *et al.*, 2006). *AtTMT1* est exprimé dans les feuilles (juvéniles et adultes) ainsi que dans la fleur, alors qu'*AtTMT2* est majoritairement détecté dans les racines et la tige. Le niveau d'expression d'*AtTMT3* semble trop faible pour être détecté par des approches de protéomiques ou Northern blot. Wormit *et al.* (2006) ont révélé que l'expression d'*AtTMT1* et *AtTMT2* est induite lors de traitements thermiques (températures basses et élevées) ainsi que par un stress salin. De façon logique, les vacuoles issues de plantes traitées par le froid semblent accumuler plus de glucose que celles de plantes cultivées à température normale. Cette augmentation de l'activité de transport est inhibée par le NH_4^+ (annule le gradient de protons), le fructose et la phlorizine suggérant que ces transporteurs fonctionnent en antiports sucre/proton. Parallèlement, les vacuoles préparées à partir de lignées mutantes (simples ou triples) se sont révélées moins efficaces que les lignées sauvages dans l'import de glucose indiquant qu'AtTMT1 et AtTMT2 jouent un rôle important dans le transport vacuolaire de monosaccharides notamment lors de stress environnementaux. Au niveau fonctionnel, la fonction d'AtTMT1 a récemment été démontrée sur des vacuoles purifiées, suggérant fortement une activité d'antiport glucose/ H^+ (Wingenter *et al.*, 2010).

3.3.4. Sous-famille des AtpGlcT (Plastidic Glucose Transporters)

Au cours de la photosynthèse, une partie du carbone fixé est orientée vers la synthèse d'amidon transitoire qui constitue une réserve de carbone au sein du chloroplaste (Weber *et al.*, 2000). Cet amidon est mobilisé au cours de la nuit et résulte dans la formation de glucose. Cette voie nécessite alors un transporteur afin de permettre l'export du glucose hors du chloroplaste. Un tel transporteur putatif de glucose (pGlcT) a initialement été identifié chez l'épinard (*S. oleracea*) et localisé sur la membrane interne du chloroplaste (Weber *et al.*, 2000). Dans les années 2000, une nouvelle base de données de protéines membranaires d'*Arabidopsis* a été établie (ARAMEMNON ; Schwacke *et al.*, 2003) offrant diverses informations prédictives (topologie transmembranaire, signaux d'adressage) et une classification sur la bases de données fonctionnelles et phylogénétiques. Chez *Arabidopsis*, la famille des pGlcTs comprend 3 homologues (At1g67300, At1g05030 et At5g16150). L'analyse du mutant d'*Arabidopsis* TC265 réduit dans sa capacité à dégrader l'amidon transitoire malgré la présence des enzymes de dégradation dans le chloroplaste, a permis de suggérer un rôle pour ces transporteurs putatifs. L'accumulation de glucose dans les chloroplastes du mutant ainsi que l'absence d'une protéine d'environ 40 kDa dans l'enveloppe chloroplastique a conduit à suggérer que ce mutant était altéré dans sa capacité à exporter les produits de l'activité amylolytique. Les auteurs ont alors conclu que chez *Arabidopsis*, la dégradation de l'amidon conduisait à la production de glucose, celui-ci étant normalement exporté vers le cytoplasme *via* un transporteur (Neuhaus et Wagner, 2000 ; Trethewey et Rees, 1994). Chez le tabac, les transcrits de pGlcT sont majoritairement localisés dans les tissus sources ; cependant, une analyse détaillée d'ESTs (Expressed Sequence Tags) de pGlcT a montré que ce transporteur était également exprimé dans plusieurs tissus hétérotrophes chez le citron, la tomate ou encore l'abricot (Fischer et Weber, 2002). Ces observations suggèrent que pGlcT pourrait avoir un rôle autre que l'export de glucose. Il pourrait aussi être impliqué dans l'import de carbone dans les tissus puits. Quoiqu'il en soit, le transport de glucose plastidique serait un processus actif couplé à un transport de protons (Servaites et Geiger, 2002).

En dépit de la forte homologie entre les membres de la famille des pGlcTs (42-69%), tous ne seraient pas trouvés dans les plastes (Büttner, 2007). Récemment, un de ces membres, SGB1 (Suppressor of G protein beta 1 ; At1g79820) à été identifié comme transporteur putatif d'hexoses localisé au niveau de l'appareil de Golgi (Wang *et al.*, 2006).

3.3.5. Sous-famille des AtPLTs (Polyol Transporters) ou AtPMTs (Polyols Monosaccharide Transporters)

Les polyols, encore appelés sucres-alcools, sont des formes réduites d'aldoses et de cétooses pouvant avoir une structure linéaire ou cyclique (Noiraud *et al.*, 2001a). Le terme de « polyols » se réfère aux composés d'au moins trois carbones portant chacun un groupement hydroxyle (OH). Ces dérivés de sucres sont, comme le saccharose, non réducteurs et considérés comme une forme de transport moins accessible au métabolisme cellulaire que le glucose. Chez de nombreuses plantes, ils s'accumulent également en réponse à des contraintes environnementales telles que le froid, un déficit hydrique ou un stress salin (Noiraud *et al.*, 2001b ; Stoop *et al.*, 1996 ; Conde *et al.*, 2007). Le mannitol (dérivé du mannose) est le polyol le plus largement distribué dans la nature et rapporté chez plus d'une centaine de plantes vasculaires (Stoop *et al.*, 1996). D'autres sont également communément rencontrés comme le sorbitol et le galactinol respectivement dérivés du glucose et du galactose. Actuellement, aucune plante n'est connue pour synthétiser exclusivement des polyols. Chez le céleri ou l'olive par exemple, la synthèse de mannitol s'opère simultanément avec celle du saccharose ou du raffinose respectivement. En 2001, le premier transporteur de polyols AgMAT1 a été isolé et caractérisé chez le céleri (*A. graveolens*) en tant que symport mannitol/H⁺ (Noiraud *et al.*, 2001b). Depuis, de nombreux transporteurs de polyols ont été identifiés et caractérisés chez de nombreuses espèces telles que la cerise (*P. cerasus* ; PcSOT1 et PsSOT2), le plantain (*P. major* ; PmPLT1 et PmPLT2), la pomme (*M. domestica* ; MsSOT3-5), l'olive (*O. europaea*, OeMAT1), l'arabette (*A. thaliana* ; AtPMT1, 2 et 5) et de nouveau le céleri (*A. graveolens* ; AgMAT2) (Conde *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2003 ; Juchaux-Cachau *et al.*, 2007 ; Klepek *et al.*, 2005, 2010 ; Ramsperger-Gleixner *et al.*, 2004 ; Reinders *et al.*, 2005 ; Watari *et al.*, 2004). Les transporteurs de polyols caractérisés fonctionnent comme des symports polyols/H⁺ énergie-dépendants et sont généralement de faible spécificité. Excepté pour PcSOT1-2 et PmPLT2, considérés comme relativement spécifique du sorbitol, les autres transporteurs catalysent le transport d'un grand nombre de composés tels que les hexoses (glucose et fructose), pentoses (ribose, tétrose) et autres polyols de diverses longueurs de chaîne (xylitol, erythritol, glycérol).

Le génome d'*Arabidopsis* contient six gènes homologues qui forment une sous-famille distincte au sein des MSTs (Büttner, 2007 ; Kepleck *et al.*, 2010). Initialement nommés *AtPLTs*, les gènes de cette famille ont récemment été renommés *AtPMTs* ; l'abréviation « PLT » étant déjà utilisée pour les gènes PLETHORA1 et 2 d'*Arabidopsis* (Aida *et al.*,

2004 ; Kepleck *et al.*, 2010). Actuellement, 3 membres de cette famille, AtPMT1, AtPMT2 et AtPMT5, ont été caractérisés en système hétérologue (levure et oocyte de Xénope) comme transporteurs actifs de type symport/H⁺, tous trois localisés sur la membrane plasmique d'*Arabidopsis* (Klepeck *et al.*, 2005, 2010 ; Reinders *et al.*, 2005). Les trois protéines ont une faible spécificité de substrat, pouvant transporter des polyols (sorbitol, xylitol, glycérol), mais aussi différents monosaccharides (hexoses et pentoses) tels que fructose et le ribose. Ce transport efficace des hexoses et pentoses par les transporteurs de polyols est une observation des plus intéressantes. En effet, l'activité de transport du ribose apparaît plus élevée *via* AtPMT5 comparé à n'importe quel autre transporteur de monosaccharides (STPs) caractérisé chez *Arabidopsis* (Klepeck *et al.*, 2005). AtPMT1 et AtPMT2, très exprimés dans les cellules en croissance telles que le grain de pollen et le tube germinatif, pourraient quant-à-eux transporter le fructose issu de l'hydrolyse du saccharose dans l'apoplaste (Kepleck *et al.*, 2010). Les seuls STPs capables de transporter le fructose (AtSTP6 et AtSTP13) ne sont pas ou peu (AtSTP6) exprimés dans le grain de pollen ce qui pourrait supporter le rôle d'AtPMT1 et AtPMT2 comme transporteurs de fructose dans ces cellules puits.

Bien que les transporteurs de polyols caractérisés aient été localisés sur la membrane plasmique (Juchaux-Cachau *et al.*, 2007 ; Klepeck *et al.*, 2005, 2010 ; Reinders *et al.*, 2005), des polyols sont également trouvés dans la vacuole. Le sorbitol, chez le plantain et le pêcher (*P. major*, *P. persica*), ainsi que le mannitol chez le céleri (*A. graveolens*), sont majoritairement présents dans la vacuole (48-73%), suivi du stroma (19-27%) et du cytosol (8-25%) (Nadwodnik et Lohaus, 2008). Chez le plantain maritime (*P. maritima*), le sorbitol est presque exclusivement trouvé dans la vacuole (88%). Différents modes de transport ont pu être identifiés au travers du tonoplaste. Chez le céleri (*A. graveolens*), le mannitol traverse le tonoplaste des cellules du parenchyme des pétioles par diffusion facilitée pour être transitoirement stocké (Greutert *et al.*, 1998). Chez la pomme par contre, le sorbitol est activement transporté au sein de la vacuole des cellules du fruit (Yamaki, 1987). Malgré ces observations, aucun transporteur de polyols n'a encore été localisé sur le tonoplaste (Büttner, 2007).

3.3.6. Les transporteurs de monosaccharides chez la vigne

A l'heure actuelle, 7 séquences de transporteurs de monosaccharides ont pu être isolées chez la vigne : *VvHT1* (*Vitis vinifera* Hexose Transporter 1 ; AJ001061), *VvHT2* (AY663846), *VvHT3* (encore appelé *VvHT7* ; AY538259/AY854146), *VvHT4* (AY538260), *VvHT5*

(AY538261), *VvHT6* (AY861386) et *VvpGIT* (*Vitis vinifera* plastid Glucose Transporter ; AY608701) (Conde *et al.*, 2006 ; Fillion *et al.*, 1999 ; Glissant, 2005 ; Hayes *et al.*, 2007 ; Vignault *et al.*, 2005). Sur l'ensemble de ces transporteurs, seuls *VvHT1*, *VvHT4* et *VvHT5* ont été caractérisés dans la levure (EBY.VW4000) comme symports actifs glucose/H⁺, optimum à pH acide (4,5-5), et de haute affinité avec des K_m respectifs de 70, 137 et 89 μM (Vignault *et al.*, 2005 ; Hayes *et al.*, 2007). L'activité vectorielle de transport de *VvHT2*, *VvHT3*, *VvHT6* ainsi que *VvpGIT* n'a actuellement pas pu être démontrée dans la levure avec les sucres habituellement testés (Glissant, 2005 ; Hayes *et al.*, 2007 ; Vignault, 2007). En plus du glucose, *VvHT1* transporte également le galactose et, dans une faible mesure, le fructose. Le mannose n'est pas transporté par la protéine mais constitue cependant un important compétiteur pour le site actif du transporteur. *VvHT4* est spécifique du glucose alors que *VvHT5* peut également transporter le fructose.

En utilisant la technique d'hybridation *in situ*, les transcrits de *VvHT1* ont été détectés dans la feuille et la baie de raisin majoritairement au niveau des vaisseaux conducteurs. Dans la jeune baie, la protéine est localisée sur la membrane plasmique des cellules de la pulpe et majoritairement au niveau du phloème. Au niveau du complexe conducteur, une localisation plus précise révèle une forte densité du transporteur dans la membrane plasmique des cellules à l'interface tube criblé/cellule compagne (Vignault *et al.*, 2005). Deux autres transporteurs, *VvHT3* et *VvHT4*, ont également été localisés sur la membrane plasmique de cellules épidermique d'oignon grâce à des fusion GFP (Hayes *et al.*, 2007).

Considérant les transporteurs *VvHT1* à 5, l'analyse du profil d'expression des *VvHTs* par RT-PCR quantitative révèle d'une part que *VvHT1* et *VvHT3* sont les plus exprimés dans la feuille, et d'autre part que leur expression augmente au cours du développement (Hayes *et al.*, 2007). *VvHT5*, bien que moins exprimé, présente le même profil d'expression dans les feuilles que *VvHT1* et *VvHT3* alors que *VvHT2* et *VvHT4* ne sont pas détectés. Bien que non exprimé dans la feuille, des résultats obtenus par RT-PCR semi-quantitative ont montré que *VvHT2* est très fortement exprimé dans la racine et l'inflorescence, et dans une moindre mesure dans les tiges (Vignault, 2007). *VvHT6* a un profil d'expression similaire à *VvHT2* dans les organes végétatifs, bien qu'exprimé à des niveaux plus élevés et que les transcrits soient aussi détectables dans les feuilles. Ces différentes observations suggèrent que les trois transporteurs *VvHT1*, *VvHT3* et *VvHT5* jouent un rôle dans les feuilles sources où ils pourraient permettre la récupération des monosaccharides perdus à partir du phloème

(« fuites »). Bien que le saccharose soit le sucre majoritairement transporté, la sève phloémienne contient cependant de petites quantités de monosaccharides qui résultent de l'activité de la saccharose synthase et de la glycolyse dans le complexe conducteur (Geigenberger *et al.*, 1993). VvHT2, VvHT6 et potentiellement VvHT4 seraient plutôt impliqués dans l'import des monosaccharides au niveau des organes puits.

Dans la baie, Hayes *et al.* (2007) ont montré que *VvHT1*, *VvHT2* et *VvHT3* sont beaucoup plus exprimés que *VvHT4* et *VvHT5*, peu détectés. L'expression de ces trois gènes est plus élevée avant la véraison et diminue sensiblement après la véraison. Bien que très faiblement exprimé, le niveau d'expression de *VvHT5* augmente légèrement (x 3) lors des derniers stades de développement de la baie (Hayes *et al.*, 2007). En utilisant les techniques de microarrays et de RT-PCR semi-quantitative, Glissant (2005) puis Vignault (2007) ont démontré que l'expression de *VvHT6* est très importante au moment de la véraison pour ensuite diminuer au cours de la maturation. Sur l'ensemble des transporteurs actuellement connus, *VvHT6* présenterait le plus haut niveau d'expression dans la baie à la véraison (Glissant, 2005). Globalement, l'expression des différents *VvHTs* connus (majoritairement avant ou au moment de la véraison) n'est pas strictement corrélée avec la période de forte accumulation d'hexoses dans la baie après la véraison. *VvHT2*, *VvHT3* et *VvHT6*, tout de même significativement exprimés après véraison, pourraient potentiellement faciliter le transport et l'accumulation des sucres au sein des cellules de la pulpe bien que cela n'est pas été formellement démontrée. Au contraire, l'expression de *VvHT1*, qui diminue fortement après la véraison, semble démontrer que ce transporteur ne participe pas à l'accumulation des sucres dans la baie. Il serait plutôt impliqué au cours des stades précoces du développement dans la fourniture de carbone pour la division et la croissance cellulaire, période où le niveau d'hexoses dans l'apoplaste est encore faible (voie de déchargement symplastique). Cette hypothèse est soutenue par une étude de Conde *et al.* (2006) dans laquelle les auteurs démontrent une induction de l'expression de *VvHT1* par de faibles concentrations de glucose et une répression en présence de fortes concentrations. De ce fait, la protéine VvHT1 n'est détectée qu'au stade « vert » du développement de la baie, lorsque la concentration en hexoses de la pulpe est encore faible. Ce double aspect dans la régulation de *VvHT1* par le glucose est certainement attribuable à la présence, dans le promoteur du gène, d'éléments *cis*-régulateurs impliqués dans la régulation par les sucres. En effet, certains éléments positifs tels « SURE1 » et « Suc box 3 » permettraient l'induction de *VvHT1* alors que d'autres tels que

« AMYBOX1 » et « AMYBOX2 » conduiraient à sa répression (Fillion *et al.*, 1999 ; Atanassova *et al.*, 2003).

Quoi qu'il en soit, l'organisation des transporteurs de monosaccharides en familles multigéniques chez d'autres espèces comme *Arabidopsis* (53 membres) ou le riz (22 membres) (Büttner, 2007 ; Lalonde *et al.*, 2004), suggère l'existence potentielle d'un grand nombre de protéines chez la vigne pouvant catalyser le transport des monosaccharides et leur accumulation dans la baie de raisin.

4. Les Invertases : des enzymes clés dans la répartition des sucres et le développement

Les invertases (β -fructosidases ou encore β -fructofuranosidases) sont des hydrolases qui catalysent l'hydrolyse irréversible du saccharose en hexoses (glucose et fructose) et jouent un rôle crucial dans de nombreux aspects de la croissance et du développement des plantes (Roitsch et Gonzalez, 2004). Trois types d'invertases peuvent être distingués en fonction de leur solubilité, leur localisation subcellulaire, leur pH optimum d'activité ainsi que leur point isoélectrique : les invertases pariétales (CW-INV), les invertases vacuolaires (V-INV) et les invertases neutres/alcalines (N/A-INV). A l'heure actuelle, les bases de données contiennent plus de 300 séquences d'invertases codant pour plus de 200 isoenzymes identifiées chez environ 50 espèces (Roitsch et Gonzalez, 2004). Comme les transporteurs de sucres, les invertases sont codées par des familles multigéniques. La plupart des espèces contiennent au moins deux isoformes d'invertases vacuolaires et plusieurs isoformes d'invertases pariétales et neutres. Le génome d'*Arabidopsis* contient 6 gènes d'invertases pariétales, 2 gènes d'invertases vacuolaires et 9 gènes d'invertases neutres (Ji *et al.*, 2005). Celui du riz (*O. sativa*) comprend respectivement 9, 2 et 8 séquences (Cho *et al.*, 2005 ; Ji *et al.*, 2005). Chez le maïs (*Z. mays*), 4 séquences d'invertases pariétales et 2 séquences d'invertases vacuolaires ont pu être identifiées (Kim *et al.*, 2000). Le peuplier quant à lui possède 16 séquences d'invertases neutres (Nonis *et al.*, 2008).

4.1. Les invertases acides (CW-INV et V-INV)

Les invertases pariétales et vacuolaires ont des propriétés enzymatiques et biochimiques similaires et partagent un important degré d'homologie. Elles ont une masse moléculaire comprise entre 55 et 70 kDa et attaquent le saccharose à partir du résidu fructose (Sturm,

1999). Ces deux types de glycoprotéines peuvent fonctionner en β -fructofuranosidases c'est-à-dire accepter le stachyose et le raffinose comme substrat bien que l'hydrolyse de ces composés soit réduite comparé au saccharose.

Les invertases pariétales sont des protéines apoplastiques caractérisées par un faible pH d'activité optimum (3,5 à 5). Leur point isoélectrique (pI) est généralement élevé (alcalin ou neutre), bien que certaines présentent un pI acide ; elles peuvent donc être libres ou liées à la paroi cellulaire par des liaisons ioniques (Kim *et al.*, 2000 ; Roitsch et Gonzalez, 2004). Au niveau des tissus puits, ce type d'enzymes est très important puisqu'elles vont cliver le saccharose déchargé du phloème par la voie apoplastique. L'hydrolyse du saccharose va alors permettre le contrôle de la force de puits au niveau des organes importateurs. Les hexoses générés vont ensuite être transportés au travers des différentes membranes cellulaires *via* des transporteurs (Roitsch *et al.*, 2003). Chez beaucoup d'espèces, les invertases pariétales sont d'ailleurs co-exprimées avec des transporteurs d'hexoses. Chez *V. faba* par exemple, durant les premières phases du développement de la graine, *VfSTP1* et *VfCWINV1* sont co-exprimés dans les cotylédons de l'embryon afin de maintenir une force de puits et de fournir les hexoses nécessaires aux divisions cellulaires (Weber *et al.*, 1997). De la même façon, *HvSTP2* et *HvCWINV2* sont tous deux exprimés dans les tissus du caryopse chez l'orge (*H. vulgare*) (Weschke *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis*, *AtcwINV1* et *AtSTP1* sont également conjointement exprimés dans la feuille (Sherson *et al.*, 2003). Alors que les valeurs de K_m reportées pour les transporteurs de sucres sont généralement de l'ordre du μM , celles des invertases extracellulaires sont de l'ordre du mM ce qui limite le déchargement phloémien.

Les invertases vacuolaires, considérées comme des invertases acides solubles, fonctionnent à un pH compris entre 5 et 5,5, et sont localisées dans la vacuole. Elles régulent le stockage du saccharose dans la vacuole ainsi que sa remobilisation vers les processus métaboliques (Roitsch et Gonzalez, 2004). Ces invertases ont une grande importance dans l'accumulation des sucres dans les organes de stockage tels que les fruits et les tubercules. Actuellement, de nombreuses études ont pu mettre en évidence le rôle crucial des invertases dans l'allocation des sucres et le développement.

Chez la carotte (*D. carota*), l'utilisation de plantes transgéniques a permis de montrer l'importance des invertases acides dans le déchargement phloémien et la force de puits (Tang *et al.*, 1999). Les auteurs ont ainsi montré que la répression, par une approche antisens, d'une

invertase pariétale ou vacuolaire au niveau de la racine entraînait d'une part une réduction de son développement et d'autre part la production excessive de feuilles avec une accumulation importante de saccharose et d'amidon. Au niveau du puits (racine), l'activité des deux types d'invertases ne permettant plus le maintien du gradient de saccharose nécessaire pour la translocation longue-distance, le surplus de carbone assimilé au niveau foliaire serait alors utilisé dans l'élaboration de feuilles.

Chez la pomme de terre (*S. tuberosum*), la surexpression d'une invertase pariétale de levure entraîne une diminution du nombre de tubercules parallèlement à une augmentation de leur taille (Sonnewald *et al.*, 1997). Dans les lignées transgéniques, les tubercules accumulent cependant moins de saccharose au profit du glucose, les concentrations en fructose et amidon n'étant pas modifiées par rapport aux lignées sauvages (Hajirezaei *et al.*, 2000). Au niveau des feuilles, les effets phénotypiques les plus prononcés ont été observés avec les plantes surexprimant l'invertase vacuolaire de levure (Büssis *et al.*, 1997). Dans celles-ci, une forte accumulation d'hexoses vacuolaires est observée dans les feuilles ce qui provoque une augmentation de la pression osmotique. Cette modification dans la balance osmotique provoquerait également une accumulation prononcée de saccharose et d'acides aminés dans le cytosol.

Dans les lignées transgéniques de tabac (*N. tabacum*), la surexpression des invertases apoplastique ou vacuolaire de levure provoque plusieurs changements phénotypiques sévères (Sonnewald *et al.*, 1991 ; Vonschaewen *et al.*, 1990). Les plantes transgéniques présentent en effet une réduction significative de la taille (attribuée à une réduction de la longueur des entrenœuds), une altération dans le développement du système racinaire ainsi qu'une décoloration ou nécrose de certaines parties des feuilles matures. Les feuilles sources présentent également un niveau élevé de sucres solubles et d'amidon, une augmentation de la respiration ainsi qu'une diminution de l'activité photosynthétique résultant d'une dégradation des chlorophylles (Heineke *et al.*, 1994 ; Sonnewald *et al.*, 1991 ; Vonschaewen *et al.*, 1990).

Ces observations ont conduit les auteurs à suggérer que les plantes surexprimant l'invertase pariétale ou vacuolaire étaient altérées dans leur capacité à exporter le saccharose. Le phénotype foliaire observé pourrait alors être dû à deux phénomènes qui ne s'excluent pas l'un de l'autre : (i) les hexoses générés s'accumuleraient dans l'apoplaste et provoqueraient une diminution du potentiel osmotique, celui-ci conduisant à la plasmolyse puis la mort des cellules du mésophylle voisines, et/ou (ii) les hexoses seraient importés dans les cellules du mésophylle où ils seraient phosphorylés afin de retourner dans un cycle « futile » de synthèse

de saccharose (Nguyen-Quoc et Foyer, 2001 ; Vonschaewen *et al.*, 1990). Ce dernier point entrainerait une photo-inhibition allant jusqu'à une dégradation des chlorophylles. Chez *Arabidopsis*, l'accumulation d'anthocyanes observée dans les feuilles des plantes transgéniques, aurait alors pour rôle de capturer l'excès de lumière inutilisable pour la photosynthèse (Vonschaewen *et al.*, 1990).

Certains organes puits tels que la graine ou le grain de pollen sont symplastiquement isolés des vaisseaux conducteurs et impliquent nécessairement la voie apoplastique à l'interface des tissus maternels et du puits (Schneidereit *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2007). De ce fait, les invertases pariétales jouent un rôle important dans l'alimentation carbonée de ces puits. Dans la graine, l'importance de ce type d'invertase dans le maintien du gradient de photoassimilats a été démontrée chez le double mutant de maïs *miniature-1 (mn)* déficient dans la production de grains (Miller et Chourey, 1992). Chez le maïs (*Z. mays*), la majorité du saccharose est normalement hydrolysée dans la région du pédicelle avant son entrée dans l'endosperme. Or, il a été montré que le mutant *mn* était déficient dans son activité invertasique au niveau du grain. Cette déficience induit une dégénération des cellules au niveau de la chalaze provoquant une interruption entre le pédicelle et l'endosperme. Ainsi, le grain n'est plus alimenté. Récemment, il a également été suggéré chez l'orge (*H. vulgare*), que l'action des invertases pariétales combinée à celle des hexokinases, glucokinases, phosphoglucomutases et UDP-glucose pyrophosphorylases pouvait générer de l'UDP-glucose nécessaire aux processus de division cellulaire et d'élongation lors du développement précoce de la graine (Sreenivasulu *et al.*, 2004). Dans le grain de pollen de tabac (*N. tabacum*), l'activité de l'invertase pariétale Nin88 est essentielle à la régulation du développement. Sa répression entraîne un arrêt du développement et une stérilité mâle (Goetz *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces résultats démontre donc que les relations source/puits ainsi que de nombreux aspects du développement peuvent complètement être modifiés par l'activité des invertases acides.

4.2. Les invertases neutres/alcalines (N/A-INV)

Le troisième et dernier type d'invertases, neutres, alcalines ou encore cytoplasmiques, est localisé dans le cytoplasme en raison de son pH optimum d'activité compris entre 6,8 et 8. Contrairement aux invertases acides, les invertases neutres ne sont pas glycosylées et ne fonctionnent pas ou très peu en tant que β -fructofuranosidases (hydrolysent préférentiellement le saccharose). Elles partagent peu d'homologies avec les deux autres types d'enzymes et leur

fonction physiologique est peu étayée dans la littérature en raison de leur activité faible et transitoire (Roitsch et Gonzalez, 2004 ; Winter et Huber, 2000). Le saccharose cytoplasmique est généralement transporté au sein de la vacuole afin d'y être hydrolysé (Koch, 2004). Une erreur serait alors de considérer que les invertases neutres n'ont pas ou peu d'effet dans la répartition des sucres et le développement.

Chez la pomme de terre (*S. tuberosum*), la surexpression d'une invertase neutre de levure conduit à une réduction dans la taille des tubercules parallèlement à une augmentation de leur nombre (Sonnewald *et al.*, 1997). Les tubercules matures de ces lignées révèlent une forte réduction de leur concentration en saccharose comparés aux tubercules des lignées sauvages (Hajirezei *et al.*, 2000). Les concentrations en fructose et en amidon ne sont pas modifiées par l'activité invertasique alors que celle du glucose est augmentée. Parallèlement, l'analyse de ces lignées a révélé une accumulation d'hexoses phosphate ainsi que d'intermédiaires de la glycolyse au cours du développement des tubercules. Ces hexoses phosphate résultent d'une forte augmentation de l'activité fructokinase alors que l'activité glucokinase est peu induite. Au niveau des feuilles matures, l'activité de l'invertase neutre induit l'apparition de nécroses ainsi qu'une accumulation de glucose et surtout de fructose (Büssis *et al.*, 1997). De plus, parallèlement à une diminution de la photosynthèse, une augmentation de la concentration en 3-phosphoglycérate et hexoses phosphate (glucose et fructose) est également observée. La présence de ces composés indique que les enzymes de synthèse du saccharose sont inactivées, certainement afin d'éviter un cycle « futile » de synthèse et de dégradation du disaccharide. Ces différentes données indiquent que chez la pomme de terre, l'activité des invertases neutres peut conduire à d'importants changements dans le métabolisme primaire. La régulation de la glycolyse serait liée à l'hydrolyse cytoplasmique du saccharose.

D'importantes modifications phénotypiques sont également observées dans les lignées transgéniques de tabac (*N. tabacum*) surexprimant une invertase neutre de levure. Comme observé chez la pomme de terre, ces lignées accumulent du glucose, du fructose mais aussi de l'amidon dans les feuilles (Sonnewald *et al.*, 1991). La teneur en fructose, majoritairement stocké dans la vacuole, est plus élevée que le glucose ce qui résulterait d'une faible activité des fructokinases (Heineke *et al.*, 1994). De plus, parallèlement à une diminution de la photosynthèse, une réduction de la croissance végétative (feuilles et racines) peut être observée, ceci résultant d'une diminution dans l'export de saccharose à partir des feuilles sources. Les feuilles présentent également un phénotype enroulé qui serait dû à l'expansion

ou la division des cellules de la face adaxiale. Ce phénomène impliquerait des influx d'eau provoqués par la forte accumulation des hexoses dans cette zone.

Chez *Arabidopsis*, l'invertase neutre CINV1 interviendrait dans la croissance racinaire (Lou et al, 2007). Les plantes mutantes *cinvl* révèlent en effet une activité invertasique cytosolique réduite et une réduction du système racinaire. Ce phénotype étant similaire aux mutants *pip5k9-d* surexprimant une phosphatidylinositol monophosphate 5-kinase (PIP5K), les auteurs ont pu démontrer une interaction de PIP5K9 avec CINV1 régulant négativement l'élongation des cellules de la racine.

4.3. Les invertases chez la vigne

En 1990, une première étude a pu mettre en évidence l'activité d'invertases acides solubles ou liées à la paroi chez la vigne (Ruffner *et al.*, 1990). Les auteurs ont ainsi démontré biochimiquement que l'activité de ces deux types d'enzymes catalysait l'hydrolyse du saccharose au cours des phases précoces du développement de la feuille, et que cette activité sucrolytique était majoritairement due aux invertases acides solubles. De plus, la baisse de l'activité invertasique au cours du développement, parallèlement à l'augmentation de la concentration en saccharose, a permis de corréler le profil d'activité des enzymes à la transition des feuilles d'un état puits importateur vers un état source exportateur de saccharose. Les premiers ADNc codant pour des invertases putatives chez la vigne ont été identifiés au milieu des années 1990. A l'heure actuelle, 1 séquence d'invertase pariétale (*VvewINV* : *Vitis vinifera* cell wall Invertase), 2 séquences d'invertases vacuolaires (*VvGIN* : *Vitis vinifera* grape Invertase) et 9 séquences d'invertases neutres (*VvNI* : *Vitis vinifera* Neutral Invertase) ont été identifiées chez la vigne (Davies et Robinson, 1996 ; Hayes *et al.*, 2007 ; Nonis *et al.*, 2008).

L'analyse de l'expression des deux gènes *VvGIN1* et *VvGIN2* dans différents organes de la vigne montre que ces deux invertases sont différemment exprimées (Davies et Robinson, 1996). *VvGIN1* est majoritairement exprimé dans la baie (pellicule et pulpe) mais son expression est également significativement détectée dans les feuilles puits et les fleurs. Son niveau d'expression est faible dans les vrilles et indétectable dans les racines, les pépins et les feuilles matures. La plus forte expression de *VvGIN2* est détectée dans les fleurs et comparable à celle de *VvGIN1*. Dans tous les autres organes analysés, cette deuxième invertase vacuolaire est beaucoup moins exprimée que la première. Les transcrits *VvGIN2* sont détectés dans la baie avec une accumulation légèrement supérieure dans les cellules de la

pulpe comparée à la pellicule. L'expression de *VvGIN2* est faible dans les racines et les vrilles ; encore plus faible dans les jeunes feuilles et indétectable dans les feuilles adultes. Au cours du développement de la baie de raisin, *VvGIN1* est très fortement exprimé au cours des 10 semaines suivant la floraison puis devient indétectable dès la 12^{ème} semaine. L'expression de *VvGIN2* est beaucoup plus faible et restreinte aux 4 premières semaines après la floraison. L'activité des deux invertases acides augmente cependant jusqu'à la véraison (8 semaines après la floraison) et se maintient sensiblement durant la maturation. Cette dernière observation suggère que les invertases vacuolaires de la baie sont des protéines stables avec un faible « turnover ». Il est également intéressant de noter que l'augmentation du niveau de transcrits des deux invertases ainsi que de l'activité invertasique associée précèdent l'accumulation des sucres dans la pulpe. La baie de raisin préparerait toutes la « machinerie » nécessaire à l'accumulation des sucres avant la véraison (Davies et Robinson, 1996).

Une seule séquence d'invertase pariétale de vigne est aujourd'hui présente dans la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Nommée *VvcwINV1*, son profil d'expression a été étudié dans les feuilles de vigne ainsi qu'au cours du développement de la baie (Hayes *et al.*, 2007). Dans les feuilles, *VvcwINV1* est exprimée dans les jeunes feuilles et son expression augmente fortement dans les feuilles adultes. Dans ces dernières, sa co-expression avec différents transporteurs d'hexoses tels que *VvHT1* et *VvHT3* supporte l'idée que ces protéines ont toutes un rôle important dans les feuilles sources. Chez *Arabidopsis*, les deux invertases pariétales *AtcwINV1* et *AtcwINV3* sont également exprimées dans les feuilles sources (Hayes *et al.*, 2007 ; Sherson *et al.*, 2003). A l'inverse, la faible expression de *VvcwINV1* dans les jeunes feuilles, parallèlement à la forte expression de *VvGIN1*, supporte l'hypothèse d'un déchargement symplastique du saccharose lors du développement précoce des feuilles (Davies et Robinson, 1996 ; Hayes *et al.*, 2007). Dans la baie en développement, le profil d'expression de *VvcwINV1* est sensiblement similaire à celui de *VvGIN1*. Son expression augmente fortement jusqu'à la véraison (8 semaines après la floraison) puis diminue brutalement à partir de la 10^{ème} semaine à partir de laquelle son niveau d'expression reste bas. De ce fait, comme observé pour les *VvGINs*, l'expression de *VvcwINV1* précède l'accumulation des sucres dans la baie. Néanmoins, un marquage immunochimique a permis de détecter, après la véraison, la présence de nombreuses invertases dans l'apoplaste de la baie ainsi qu'une activité associée (Zhang *et al.*, 2006). Ces enzymes seraient donc très stables.

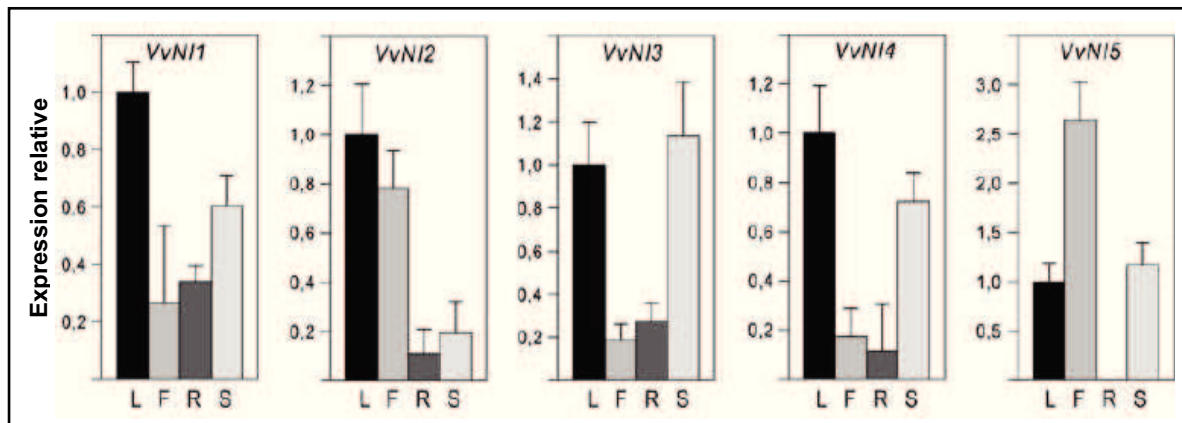


Figure 39 : Expression relative de cinq gènes d'invertases neutres chez la vigne. L'expression des cinq gènes d'invertases neutres *VvNI1* à *5* a été analysée dans différents organes de la vigne tels que les feuilles (L), les inflorescences (F), les racines (R) et les graines (S). (d'après Nonis *et al.*, 2008)

Neuf séquences d'invertases neutres ont été identifiées dans le génome de la vigne (Pinot Noir) par comparaison avec différentes séquences connues chez *Arabidopsis*, le peuplier et le riz (Nonis *et al.*, 2008). Sur les 9 séquences identifiées, une analyse à l'aide du logiciel BLAST dans les banques d'ESTs (Expressed Sequence Tags) issues des cépages Chardonnay, Cabernet Sauvignon et Pinot Noir a permis de sélectionner 5 séquences (*VvNI1* à *VvNI5*) significativement exprimées dans divers organes. Leurs profils d'expression ont ensuite été étudiés dans les organes du cépage Merlot. La plupart des *VvNIs* sont exprimées dans les feuilles, les fleurs, les racines et les pépins avec cependant des profils d'expression différents (Fig. 39) (Nonis *et al.*, 2008). Dans la baie de raisin en cours de développement, l'expression des différents *VvNIs* est généralement faible avec des profils d'expression sensiblement similaires dans la pulpe et la pellicule. Les transcrits de *VvNI1* et *VvNI2* sont plus abondants lors des phases précoces du développement puis diminuent jusqu'à la véraison où ils atteignent leur expression minimum. A l'inverse, *VvNI3*, *VvNI4* et *VvNI5*, peu exprimés en début de développement, révèlent tous les trois un pic d'expression au moment de la véraison. Seule l'expression de *VvNI3* et *VvNI4* ré-augmente ensuite au cours de la maturation. Certaines invertases neutres pourraient donc jouer un rôle dans le mécanisme d'accumulation des hexoses dans les cellules de la pulpe. Néanmoins, cette hypothèse doit être considérée avec prudence puisque ces différentes invertases neutres pourraient être adressées dans un autre compartiment cellulaire que le cytoplasme tel que la mitochondrie ou les plastes et/ou révéler une fonction non catalytique (Murayama et Handa, 2007).

5. La pourriture grise et l'oïdium : deux maladies cryptogamiques importantes de la vigne

De nombreux parasites peuvent s'attaquer à la vigne et provoquer de graves dégâts. Certaines maladies font peser une menace constante sur les vignobles et font l'objet de très nombreux traitements phytosanitaires (Dubos, 2002). Les champignons phytopathogènes représentent la majorité des agents pathogènes de la vigne, la pourriture grise et l'oïdium faisant parti des plus dommageables économiquement.

5.1. La pourriture grise / *Botrytis cinerea*

La pourriture grise est une maladie présente dans tous les vignobles du monde. Très ancienne, les symptômes de la maladie étaient déjà signalés dans l'antiquité par Pline l'ancien

(Dubos, 2002). C'est actuellement une maladie redoutée des viticulteurs. Le champignon incriminé est *Botryotinia fuckeliana* (forme parfaite) qui appartient à la division des Ascomycètes, à la classe des Leotiomycètes, à l'ordre des Helotiales et à la famille des Sclérotiniacées. Celui-ci est décrit comme une apothécie pédicellée brunâtre qui prend naissance sur un sclérote et produit des ascospores. Cette forme du champignon reste exceptionnellement observable et probablement fugace dans la nature même si des analyses de la structure des populations du champignon suggèrent que la reproduction sexuée est efficace dans certaines régions comme la Champagne (Giraud *et al.*, 1998). La forme imparfaite se nomme *Botrytis cinerea* et se caractérise par un mycélium brun, régulièrement cloisonné formant un ruban. Cette forme appartient à la division des Deutéromycètes, à la classe des Hyphomycètes, à l'ordre des Moniliales et à la famille des Moniliacées (Bouchet *et al.*, 1999). La discrétion de la forme sexuée implique que *Botrytis cinerea* est un des rares agents fongiques désignés couramment par le nom de sa forme imparfaite.

Botrytis est un champignon ubiquiste, polyphage qui peut coloniser plus de 200 hôtes (van Kan *et al.*, 2006 ; Williamson *et al.*, 2007). Ce genre présente un statut particulier parmi les champignons parasites car sa biologie se situe à la frontière du saprophytisme et du parasitisme ; il peut ainsi se développer d'abord sur des tissus morts avant de devenir parasite. (Dubos, 2002). Il est de plus nécrotrophe, induisant la mort des cellules de l'hôte *via* diverses molécules toxiques et enzymes lytiques (complexe enzymatique). Lorsque les conditions sont favorables, sa dissémination est assurée par des conidies produites en grand nombre par des conidiophores. Produites dès le printemps, ces conidies assurent plusieurs cycles secondaires de contaminations durant l'été. Leur libération est favorisée par la pluie et elles sont principalement disséminées par le vent (sporée aérienne) et les insectes.

Chez la vigne, tous les organes aériens peuvent être attaqués par *B. cinerea*. Dans les vignobles où le printemps est souvent pluvieux (Champagne, Jurançon), les jeunes rameaux peuvent présenter des tâches brunes et se recouvrent parfois d'un feutrage gris pouvant conduire à un flétrissement (mauvais aoûtement) puis dessèchement des apex. Dès leur apparition au printemps, les feuilles peuvent être attaquées et révéler des tâches de couleur rougeâtres sur la face adaxiale et sur la périphérie du limbe. Ces tâches peuvent avoir un aspect de brûlures et, par temps humide, présenter un feutrage gris sur leur contour. Les inflorescences, toujours réceptives, peuvent être contaminées avant la floraison et totalement détruites. De plus, les pièces florales et les jeunes baies avortées peuvent être colonisées par le

champignon et rester emprisonnées au cœur de la grappe. Ces parties contaminées peuvent alors servir de relais saprophytiques pour des attaques ultérieures sur d'autres parties de la grappe. Les nécroses au niveau des pédoncules (pourriture pédonculaire) peuvent conduire à un flétrissement partiel ou total des grappes. Les baies deviennent marron puis se recouvrent de conidiophores ; elles se rident et se ratatinent.

De part sa biologie, *Botrytis* est un champignon très difficile à contrôler. Les dégâts dus à la pourriture grise se manifestent par des pertes de rendements mais également par l'altération des qualités organoleptiques des raisins et donc des vins du fait de la dégradation des matières colorantes et de la destruction de la pellicule contenant les composés aromatiques (Pérez Marin, 2007). Capable du pire comme du meilleur, *Botrytis cinerea* peut cependant, dans certaines conditions climatiques (humides et ensoleillées) et sous l'action de certaines souches, être responsable de la pourriture noble à l'origine de prestigieux vins blancs liquoreux.

5.2. L'oïdium / *Erysiphe necator*

L'oïdium, originaire d'Amérique du Nord, est la première maladie d'origine américaine introduite en Europe (Dubos, 2002). Signalé par Tucker en 1845 dans le Sud-Est de l'Angleterre, l'agent causal de la maladie prit le nom d'*Oïdium tuckeri* en 1847. Aujourd'hui appelé *Erysiphe necator*, de nombreuses synonymies existent dont *Uncinula necator* Schweinitz Burrill encore utilisée (Corio-Costet, 2007). Cette forme parfaite appartient à la division des Ascomycètes, à la classe des Leotiomycètes, à l'ordre des Erysiphales et à la famille des Erysiphacées. A la surface des organes infectés, sa reproduction sexuée se caractérise par la production de cléistothèces, organes sphériques clos renfermant des asques disposés en bouquet. Chaque asque contient 4 à 8 spores unicellulaires, hyalines et ovoïdes. La forme imparfaite, *Oïdium tuckeri*, est caractérisée par un mycélium hyalin, cloisonné, rampant et ramifié qui forme un feutrage dense. La reproduction asexuée s'effectue au travers de la différenciation de conidiophores, chacun portant une courte chaîne de 3 à 5 oïdies (ou conidies). Son apparence est décrite comme une fine poussière blanchâtre ce qui lui a valu le nom anglais de « powdery mildew ». L'oïdium de la vigne est actuellement présent dans tous les vignobles du monde et représente une maladie importante sur cette culture car pouvant entraîner la perte de la totalité des récoltes (Corio-Costet, 2007).

Erysiphe necator est un ectoparasite biotrophe obligatoire. Ces caractéristiques trophiques impliquent d'une part le maintien en vie des tissus colonisés (contrairement au nécrotrophe *B. cinerea*), et d'autre part l'impossibilité de cultiver le champignon *in vitro* sur milieux synthétiques (O'Connell et Panstruga, 2006). Dans le vignoble, le champignon peut se conserver selon plusieurs modes : dans les bourgeons dormants et dans les cléistothèces. En effet, pendant la période végétative, le mycélium peu contaminer les bourgeons latents et rester en survie jusqu'à l'année suivante. Lors de la reprise de croissance végétative, le mycélium reprend son activité physiologique et se développe sur les bourgeons avec une grande vigueur ; il contamine les jeunes pousses en cours de croissance. Le développement du rameau peut alors être perturbé conduisant au faciès « drapeau » (aspect rabougri, feuille crispées). D'autre part, au printemps, les cléistothèces libèrent et disséminent leurs ascospores sous l'action de la pluie et du vent. Quelque soit le mode de conservation hivernale du champignon, les infections primaires induites par ces sources d'inoculum vont alors permettre la différenciation de conidiophores et la production d'oïdies, sources de contaminations secondaires. Les mycéliums en développement émettent des appressoria qui perforent la cuticule des cellules épidermiques et forment des suçoirs assurant leur nutrition.

L'oïdium peut s'attaquer à tous les organes verts de la vigne (Pérez Marin, 2007). C'est une maladie qualifiée de polycyclique dont le développement épidémique est assuré par la succession de cycles de contamination / infection (Dubos, 2002). Sur les feuilles, les symptômes peuvent se manifester indifféremment sur la face adaxiale et abaxiale du limbe, notamment chez les cépages très sensibles. On peut généralement y observer des tâches grisâtres aux contours plus ou moins définis qui peuvent restées localisées ou s'étendre sur toute la surface. En cas d'attaque massive, les feuilles se crispent et gondolent tout en se recouvrant d'une poussière blanchâtre. Elles peuvent également se dessécher et entrer en sénescence. Les pousses et les sarments sont très sensibles jusqu'à l'aoûtement. Des tâches diffuses de couleur sombre se développent et foncent lorsque la pousse durcit. Lors d'attaques sévères, l'aoûtement reste superficiel et le rameau se dessèche. L'infection des inflorescences peut conduire à une forte coulure (chute des futures baies) surtout si l'attaque a lieu autour de la floraison. Les dégâts les plus importants se concentrent généralement sur les grappes. Sur les baies, les cellules finissent par se nécroser ce qui entraîne un arrêt de croissance de la pellicule. Celle-ci finit habituellement par se fendre sous l'action de la croissance des cellules de la pulpe. Ces dégâts directs ont des conséquences sur la qualité et la quantité des récoltes tout en favorisant des dégâts indirects tels que la pénétration d'autres champignons comme *B.*

cinerea. En plus d'un retard et d'une hétérogénéité dans la maturation qui provoque une augmentation de l'acidité, l'oïdium peut aussi entraîner des goûts désagréables dans le vin (Corio-Costet, 2007).

6. Mécanismes de défenses des plantes

Au cours de leur existence, les plantes sont constamment soumises à l'attaque d'agents pathogènes tels que des bactéries, des champignons ou des virus. Si certains de ces microorganismes peuvent être bénéfiques, comme dans le cas des relations symbiotiques entre plantes et bactéries fixatrices d'azote ou dans le cas des mycorhizes, d'autres peuvent au contraire se révéler pathogènes pour les végétaux. Néanmoins, la maladie apparaît comme une exception, les plantes ayant mis au point, au cours de leur évolution, un panel de mécanismes élaborés leur permettant de se défendre efficacement contre les agents pathogènes.

Dans les rares cas où l'interaction plante/agent pathogène est compatible, la plante est dite sensible. L'agent pathogène se développe et colonise les tissus de son hôte probablement en raison de sa non reconnaissance par la plante ou d'un système de défense déficient. Cependant dans la majorité des cas, la maladie ne se développe pas et la plante est dite résistante. Deux types de résistance peuvent alors être distingués : la résistance non-hôte et la résistance spécifique race/cultivar (Odjakova et Hadjiivanova, 2001).

Les mécanismes et les voies de signalisation mis en jeu lors des interactions plante/pathogènes sont complexes et multiples ; et les paragraphes qui suivent ne sauraient être exhaustifs en la matière.

6.1. La résistance non-hôte

La résistance non-hôte est la forme de résistance la plus communément impliquée chez les plantes contre la majorité des microorganismes potentiellement phytopathogènes (Heath, 2001 ; Mysore et Ryu, 2004). Elle résulte d'une incompatibilité fondamentale entre tous les cultivars d'une espèce de plante et tous les pathovars d'une espèce donnée de microorganismes ; et dépend de la capacité de l'agent pathogène à franchir les barrières physiques de la plante et/ou de contourner les réponses actives induites par la plante suite à la reconnaissance de son agresseur. Elle peut être physicochimique, trophique ou spatio-temporelle. En effet, les végétaux disposent tout d'abord de barrières physiques et chimiques préformées telles que la cuticule foliaire, les parois pectocellulosiques, le cytosquelette

cellulaire ainsi que des composés secondaires et antimicrobiens (saponines, phytoanticipines). Très souvent, ces barrières sont suffisantes pour conférer à la plante une résistance efficace.

La résistance non-hôte peut aussi impliquer la mise en place de défenses inductibles dues à la reconnaissance non spécifique d'éliciteurs généraux qui peuvent être de nature chimique différente (glycoprotéines, lipides, polysaccharides, Montesano *et al.*, 2003). Les plantes possèdent en effet un panel de récepteurs, les PRRs (Pattern Recognition Receptors), capables de percevoir des signatures moléculaires propres à des classes entières de microorganismes et pouvant déclencher les réponses de défenses. Ces éliciteurs sont aujourd'hui désignés sous le terme de PAMPs ou de MAMPs (Pathogen ou Microbe-Associated Molecular Pattern), les MAMPs étant, contrairement aux PAMPs, également retrouvés chez les espèces non pathogènes (Boller et Felix, 2009 ; He *et al.*, 2007 ; Mackey et McFall, 2006 ; Nürnberger *et al.*, 2004). Des fragments de chitine, principal composant pariétal des champignons, représentent des MAMPs classiques chez les plantes (Felix *et al.*, 1993). L'ergostérol, principal stérol des ascomycètes et basidiomycètes, agit également comme un MAMP et est capable d'induire des réponses de défense chez le tabac et la vigne (Kasparovsky *et al.*, 2004 ; Laquitaine *et al.*, 2006 ; Lochman *et al.*, 2006). Les élicitines (cryptogéine, oligandrine) sécrétées par les Oomycètes *Phytophthora* et *Phytium* sont également efficaces dans l'initiation des défenses (Bonnet *et al.*, 1996 ; Keller *et al.*, 1996 ; 1999 ; Mohamed *et al.*, 2007). Certaines enzymes comme des xylanases et endopolygalacturonases peuvent aussi agir en tant qu'éliciteurs indépendamment de leur activité enzymatique (Boudart *et al.*, 2003 ; Poinssot *et al.*, 2003).

Les éliciteurs conduisant à la mise en place de réactions de défenses non spécifiques peuvent également être de nature endogène. Bien que certains agents pathogènes puissent générer une force mécanique suffisante pour pénétrer dans la paroi végétale, la plupart sécrètent des enzymes afin de la dégrader (Vorwerk *et al.*, 2004). Ainsi, les champignons par exemple vont sécréter des cellulases, des polygalacturonases, xylanases et des protéinases qui vont s'attaquer aux polymères pariétaux. Les fragments générés peuvent alors agir en tant que signaux de danger et induire des réponses de défenses. Originellement appelés éliciteurs endogènes (Darvill et Albersheim, 1984), ils sont aujourd'hui décrits comme des DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns, Boller et Felix, 2009). Un exemple classique de DAMPs sont les oligogalacturonides (OGAs) issus de la dégradation de la pectine sous l'action des polygalacturonases (Hückelhoven, 2007). Ces fragments induisent des réactions de défenses chez de nombreuses plantes (Aziz *et al.*, 2004 ; Boudart *et al.*, 2003 ; Doares *et*

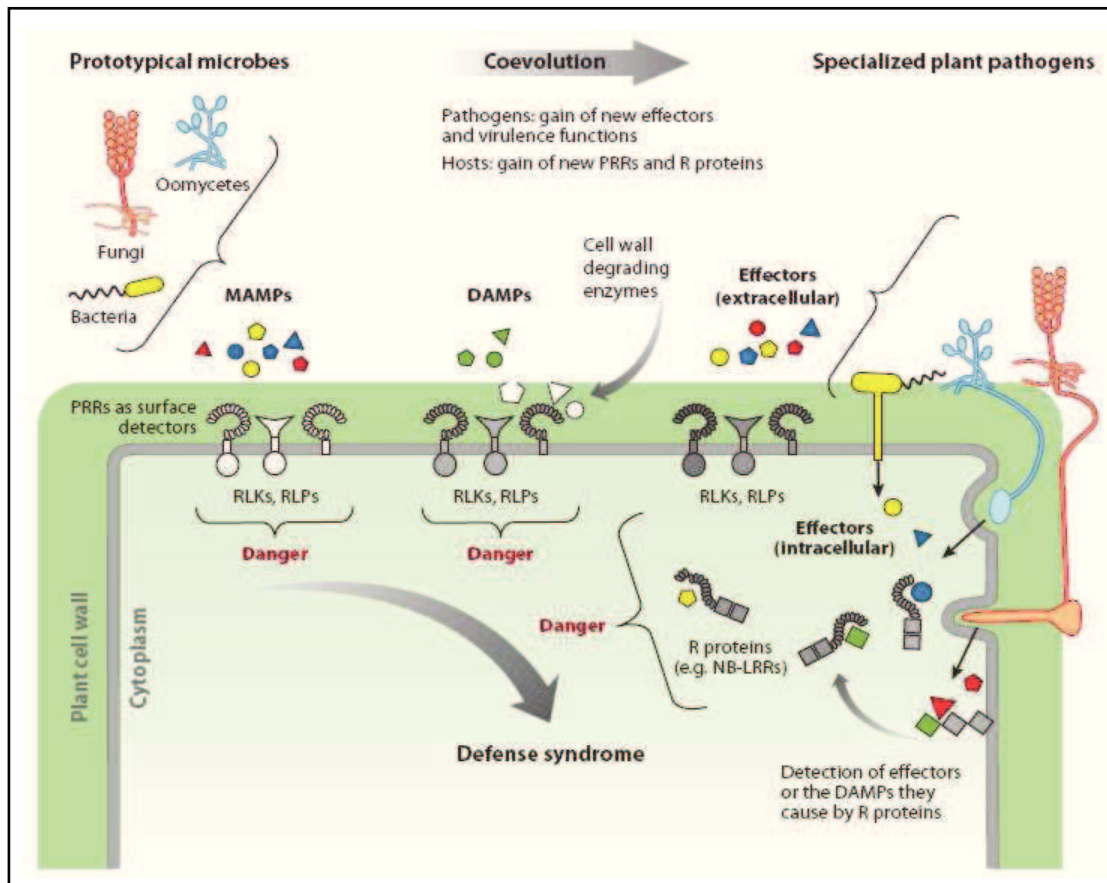


Figure 40 : Perception des MAMPs, des DAMPs et des effecteurs par la cellule végétale. Les MAMPs (Microbe-associated molecular patterns (MAMPs), les DAPMs (Damage-associated molecular patterns) ainsi que les effecteurs sont perçus comme des signaux de danger par la cellule végétale. Lorsqu'ils sont reconnus par des récepteurs PRRs et R, des réactions de défense sont mises en place (d'après Boller et Felix, 2009).

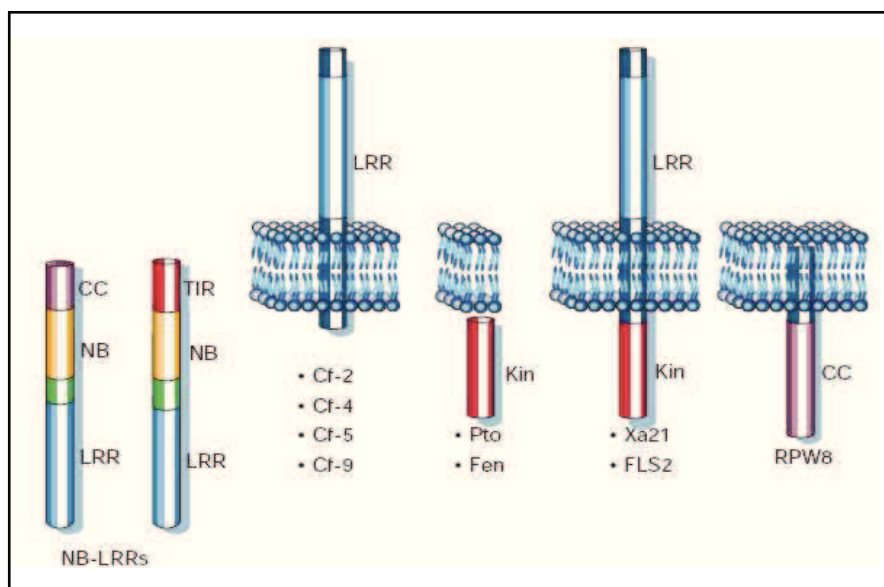


Figure 41 : Représentation de la localisation et de la structure des cinq classes principales de récepteurs impliqués dans l'ETI. (d'après Dangl et Jones, 2001)

al., 1995 ; D'Ovidio *et al.*, 2004 ; Klarzynski *et al.*, 2000). Aussi, la perception des OGAs en tant que DAMPs semble être un mécanisme conservé au sein du règne végétal et donc relativement ancien sur le plan évolutif. Des fragments de cellulose (cellodextrines) et des monomères de cutine stimulent aussi des réactions de défenses (Aziz *et al.*, 2007 ; Darvill *et al.*, 1992 ; Fauth *et al.*, 1998). La perception des MAMPs/PAMPs et des DAMPs par les récepteurs PRRs de la cellule végétale initie donc des signaux d'alerte et une réponse active de défense conduisant à la résistance basale des plantes (Fig. 40) ou PTI (PAMPs-Triggered Immunity). De plus, il pourrait également exister un système de « sensing » de l'intégrité de la paroi faisant potentiellement intervenir une grande diversité de récepteurs et de senseurs tels que des canaux ioniques, des protéines riches en leucine (extensines) ainsi que des arabinogalactanes (AGPs) (Humphrey *et al.*, 2007 ; Nakagawa *et al.*, 2007).

6.2. La résistance race/cultivar spécifique

Contrairement à la résistance non-hôte, la résistance race/cultivar est génétiquement fondée sur le concept de reconnaissance « gène-pour-gène » développé par Flor (Flor, 1971). A l'origine, ce concept stipulait qu'« à chaque gène conditionnant une réaction chez l'hôte, correspond un gène chez le parasite qui conditionne sa pathogénicité ». Certaines études ultérieures ayant démontré que la résistance chez la plante et l'avirulence chez l'agent pathogène sont généralement des caractères dominants, l'hypothèse a évolué vers le postulat que : « pour chaque gène conférant une résistance chez l'hôte, correspond un gène d'avirulence chez l'agent pathogène ». L'interaction gène-pour-gène fait donc intervenir deux gènes dominants appelés gènes de résistance (*R*) chez la plante et gène d'avirulence (*Avr*) chez le parasite et dont les produits vont interagir selon le modèle récepteur/ligant.

Les produits des gènes d'avirulence, sécrétés afin de contourner les défenses végétales, sont aujourd'hui considérés comme une classe particulière d'effecteurs ce qui a conduit à la notion d'ETI (Effector-Triggered Immunity) pour désigner la résistance impliquant les produits des gènes *R* (Boller et Felix, 2009). La plupart des récepteurs impliqués dans l'ETI appartiennent à une grande famille de protéines qui partagent des motifs structuraux communs tels que des domaines LRR (Leucine-Rich Repeats) et NBS (Nucleotide Binding Site) ainsi qu'un domaine variable qui peut présenter certaines similarités avec le domaine TIR de la drosophile (Toll/Interleukin-1-Receptor) ou le motif CC des mammifères (Fig. 41) (Coiled-Coil) (Dangl et Jones, 2001 ; Bonas et Lahaye, 2002). Par analogie, il a été proposé que certaines protéines NBS-LRR puissent constituer des hétérodimères avec d'autres protéines grâce aux domaines TIR et CC. Parmi les protéines *R* identifiées à l'heure actuelle, il est

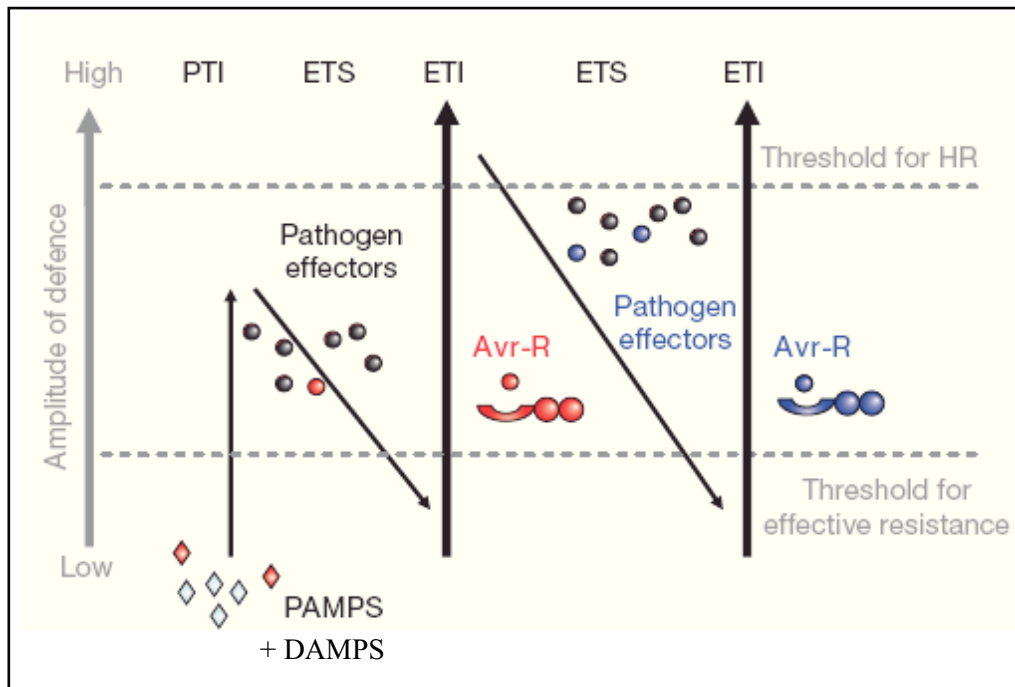


Figure 42 : Modèle en « zigzag » illustrant les mécanismes de défense impliqués dans les interactions plantes-microorganismes. (adapté de Jones et Dangl, 2006)

possible de distinguer, entre autres, des protéines membranaires à domaine LRR extracellulaire (famille des Cf-X chez la tomate), des protéines Ser/Thr kinases intracellulaires (PTO de la tomate) faisant intervenir des phénomènes de sécrétion de type III, des récepteurs transmembranaires possédant un domaine LRR extracellulaire et un domaine protéine kinase intracellulaire (Xa21 chez le riz) ou encore de petites protéines potentiellement membranaires avec un domaine CC putatif (RPW8 chez *Arabidopsis*).

En 2006, Jones et Dangl ont proposé un modèle « zigzag » en quatre phases afin de représenter le système de défense des plantes. Cette représentation regroupe les deux mécanismes de résistance basale induite par les PAMPs/MAMPs et de résistance race/cultivar induite par des effecteurs. Cependant les données de Boller et Felix (2009) suggèrent que les DAMPs puissent être intégrés au modèle (Fig. 42). Au cours de la phase I, les MAMPs/PAMPs et DAMPs sont reconnus par les récepteurs PRRs résultant dans la PTI (PAMP-triggered immunity) qui peut stopper la colonisation de l'agent pathogène. Au cours de la phase II, les agents pathogènes ayant contourné les mécanismes de la PTI sécrètent des effecteurs qui constituent des facteurs de virulence et qui peuvent interférer avec celle-ci. C'est l'ETS (Effector-triggered susceptibility). Dans la phase III, un effecteur donné peut spécifiquement être reconnu par une protéine NB-LRR et induire l'ETI (Effector-triggered immunity). Cette ETI est une réponse de type PTI amplifiée et plus rapide qui résulte généralement par une résistance de la plante *via* une réponse hypersensible autour du point d'attaque. Au cours de la phase IV, la sélection naturelle conduit les agresseurs à contourner l'ETI soit par la mutation ou la diversification des gènes *Avr*, soit par l'acquisition de nouveaux effecteurs qui suppriment l'ETI. Cette sélection résulte dans de nouvelles spécificités des gènes R qui peuvent de nouveau conduire à l'ETI.

6.3. Voies de signalisation impliquées dans la mise en place des défenses

La perception des éliciteurs, qu'ils soient généraux ou spécifiques, va déclencher une cascade de signalisation impliquant de nombreux messagers secondaires conservés chez la plupart des eucaryotes. Chez les plantes, peu de différences ont été observées entre les mécanismes de signalisation impliqués dans la PTI ou l'ETI (Nürnberg et Scheel, 2001). La transduction du signal conduisant à la mise en place des défenses entraîne des modifications des activités membranaires. En effet, parmi les réponses physiologiques les plus précoces ; on observe généralement des changements plus ou moins transitoires dans la perméabilité de la membrane plasmique aux ions (Fig. 43). Ces changements incluent des influx de Ca^{2+} et de

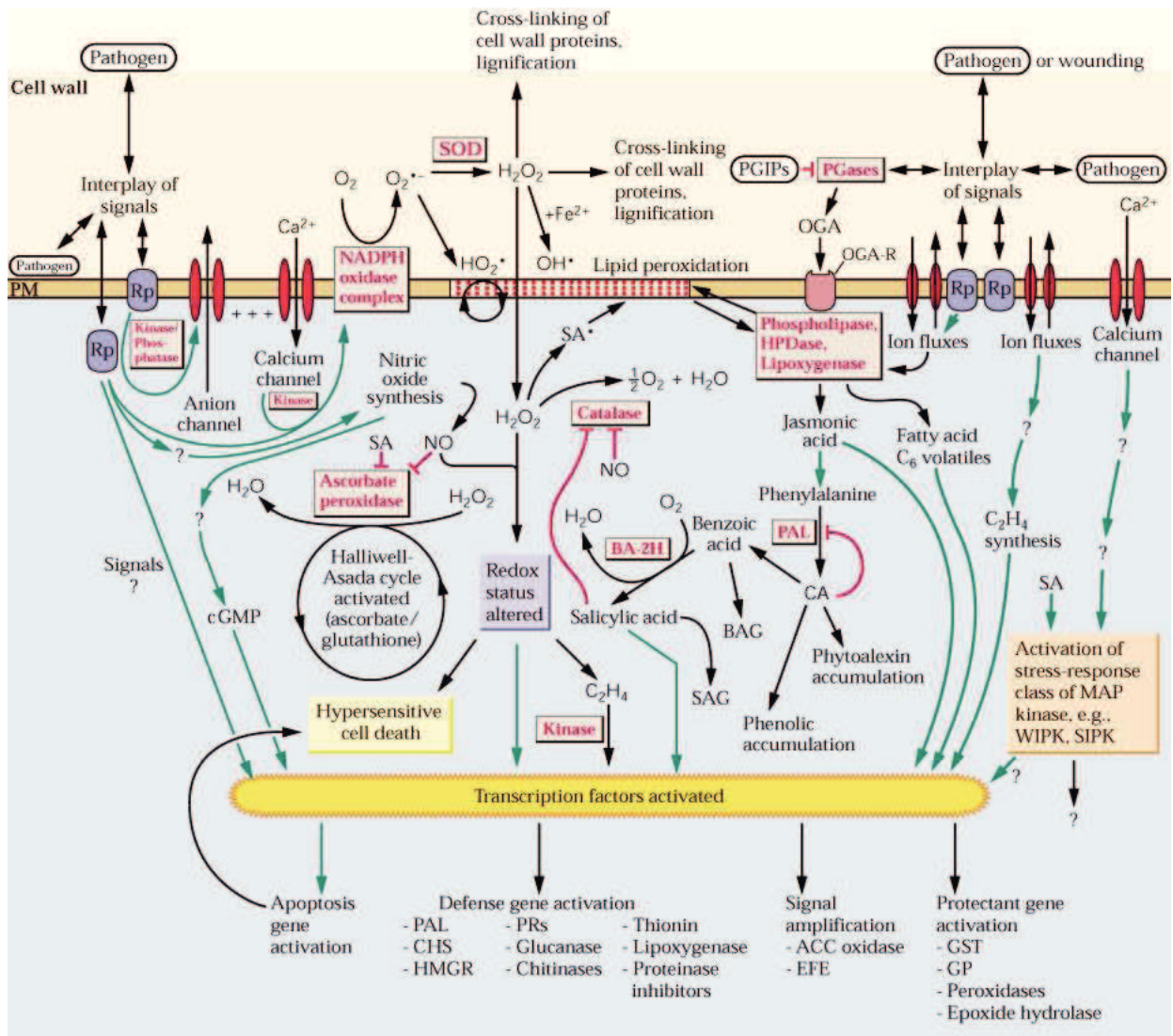


Figure 43 : Cascade de signalisation, de transduction du signal et de réponse aux microorganismes pathogènes à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Les récepteurs de plantes (Rp) interceptent des signaux qui incluent les produits directs ou indirects des gènes *Avr*, le contact physique et les composés généraux de chaque organisme tels que la chitine, des enzymes et des fragments pariétaux. Les récepteurs des plantes peuvent ou non être les produits des gènes R. Les événements de signalisation immédiatement déclenchés impliquent des kinases, des phosphatases, des protéines G et des flux d'ions. Plusieurs réponses distinctes et rapidement activées incluent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'oxyde nitrique, et l'induction transcriptionnelle de gènes de défense. Une amplification de ces réponses précoces s'opère au travers de la production de molécules signal additionnelles telles que d'autres ROS, des produits de peroxydation des lipides, de l'acide benzoïque (BA), de l'acide salicylique (SA), de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène. Ceux-ci induisent à leur tour d'autres gènes liés aux défenses. L'altération concomitante du statut redox cellulaire active des mécanismes de protection cellulaire (cycle Halliwell-Asada et les enzymes : superoxyde dismutase (SOD) et catalases) et induit des gènes codant pour différents protectants cellulaires. Certains stress vont également pouvoir induire la mort cellulaire. Les interconnexions entre les différentes voies induites vont alors coordonner les réponses de la plante. Les flèches vertes indiquent des interactions positives ; les interactions négatives étant représentées par les encarts rouges. ACC : acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique ; BAG : acide benzoïque glucoside ; BA-2H : acide 2-benzoïque hydroxylase ; CA : acide cinnamique ; cGMP : guanosine 5'-monophosphate cyclique ; CHS : chalcone synthase ; EFE : enzymes formant de l'éthylène ; GP : glutathion peroxydase ; GST : glutathion S-transférase ; HMGR : 3'-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-COA réductase ; HO₂[•] : radical hydroperoxyl ; HPDase : hydroxyperoxyde deshydratase ; MAP : « mitogen-activating protein » ; NO : oxyde nitrique ; OH[•] : radical hydroxyl ; OGA et OGA-R : oligogalacturonides et leurs récepteurs ; PAL : phenylalanine ammonia-lyase ; PGases : polygalacturonases ; PM : membrane plasmique ; SA[•] : radical acide salicylique ; SAG : acide salicylique glucoside ; SIPK : kinases induite par le SA ; WIPK : kinases induites par la blessure. (d'après Buchanan *et al.*, 2000)

H^+ et des efflux concomitants de K^+ , Na^+ et de Cl^- *via* des canaux ioniques (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998 ; Mehdy, 1994 ; Scheel, 1998, Zimmermann *et al.*, 1997) . Bien que l'efflux de K^+ et Na^+ soit nécessaire à la mise en place des réactions de défenses (Amano *et al.*, 1997 ; Blatt *et al.*, 1999), le calcium semble jouer un rôle plus prépondérant en tant que messenger secondaire dans l'ouverture des autres canaux ionique et/ou dans l'activation de protéines kinases calcium-dépendantes (Calmoduline, CDPK) (Lecourieux *et al.*, 2002 ; Ludwig *et al.*, 2005). D'autre part, cet ion permet l'induction de la production de formes actives d'oxygène (bouffée oxydative) (Grant *et al.*, 2000 ; Hückelhoven, 2007 ; Palavan-Unsal et Arisan, 2009 ; Pugin *et al.*, 1997). La génération de la bouffée oxydative (ou burst oxydatif) fait intervenir le monoxyde d'azote (NO) ainsi que trois formes actives de l'oxygène (ROS) : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), son précurseur l'anion superoxide (O_2^-) ainsi que le radical hydroxyle (OH^\cdot) (Delledonne *et al.*, 1998 ; 2001 ; Lamb et Dixon, 1997 ; Levine *et al.*, 1994 ; Simon-Plas *et al.*, 2002). Les ROS peuvent agir d'une part en tant qu'agents antimicrobiens et d'autre part en tant que signaux secondaires inducteurs des défenses (Apel et Hirt., 2004 ; Boller et Felix, 2009). Il a été montré que la forme H_2O_2 était un inducteur de la NO synthase aboutissant à la production de NO mais aussi de la voie des phénylpropanoïdes et notamment de la benzoate hydroxylase aboutissant à l'accumulation de SA à partir de l'acide benzoïque. Ces deux hormones sont des inhibiteurs puissants du cycle Halliwell-Asada et des catalases cytoplasmiques impliqués dans la détoxification des ROS aboutissant à un burst oxydatif autocatalitique. Ces formes actives de l'oxygène interviennent également dans le processus de mort cellulaire (HR) chez les plantes (Beers et McDowell, 2001 ; Rusterucci *et al.*, 1996 ; Tenhaken *et al.*, 1995). La transduction des signaux conduisant aux voies de défenses implique irrémédiablement des mécanismes de phosphorylation de protéines par des protéines kinases (Yang *et al.*, 1997). Plusieurs types de kinases peuvent intervenir dans la signalisation dont les CDPKs (Calcium-Dependent Protein Kinases) et les MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) (Romeis *et al.*, 2001). Les CDPKs constituent une famille de protéines sensibles à la concentration intracellulaire de calcium. Ainsi leur activité augmente en réponse à l'influx calcique engendré suite à la reconnaissance d'un agent pathogène (Cheng *et al.*, 2002 ; Klimecka et Muszynska, 2007 ; Romeis *et al.*, 2000, 2001). Les MAPKs forment un second groupe de transducteurs de signaux liés à l'ETI (Effector-triggered Immunity) agissant en aval du signal calcique. Elles interviennent dans une cascade de 3 kinases fonctionnellement liées, MAPKKK→MAPKK→MAPK, et très conservées chez les eucaryotes (Asai *et al.*, 2002 ; Lebrun-Garcia *et al.*, 1998 ; Tena *et al.*, 2001 ; Zhang et Klessig, 2001). Enfin, les événements de signalisation précoce sont généralement amplifiés

via la production de signaux secondaires tels que l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène qui vont avoir un rôle important dans l'induction d'un état de résistance générale de la plante face à un large spectre d'agents pathogènes (Durrant et Dong, 2004 ; Odjakova et Hadjiivanova, 2001 ; Yang *et al.*, 1997). Indépendamment, ces signaux vont permettre une résistance contre des gammes distinctes d'agents pathogènes (Thomma *et al.*, 1998, 2001). Cependant, la régulation des défenses via ces trois hormones est complexe car elle met en jeu des systèmes séparés mais qui interagissent entre eux. En effet, SA, JA et éthylène participent à un réseau de signalisation complexe au sein duquel chaque voie de signalisation influence une autre voie positivement ou négativement (Kunkel et Brooks, 2002).

6.4. Mécanismes conduisant à la résistance des plantes

6.4.1. Renforcement de la paroi végétale

Au cours d'une confrontation plante/agent pathogène, les éliciteurs primaires ainsi que les signaux endogènes secondaires vont activer un panel divers de gènes de défenses conduisant à la synthèse de molécules protectrices, les AMPs (Antimicrobial Proteins/Peptides) (Chung *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 1997). La reconnaissance de l'agresseur et la rapidité de mise en place des réactions de défenses vont être cruciales pour le devenir de l'interaction (Dong *et al.*, 1991). Le renforcement des barrières physiques de la paroi végétale constitue un mécanisme primaire important lors de la défense. Ce mécanisme induit l'accumulation de glycoprotéines riches en proline ou hydroxyproline (Benhamou *et al.*, 1991 ; Deepak *et al.*, 2007 ; Neumann *et al.*, 1999 ; Sheng *et al.*, 1991) et des dépôts de callose et de polymères aromatiques comme la lignine par activation de la PAL, les hydroxylases et les OMT (O-Méthyl transférases) permettant la synthèse des monolignols (Brown *et al.*, 1998 ; Hückelhoven, 2007 ; Kumudini and Shetty, 2002). Ceci aboutit à la formation de papilles au niveau du point d'entrée du parasite. Ces papilles peuvent également comprendre des matières pectiques, de la silice et/ou du calcium. Ces phénomènes de dépôts de composés pariétaux peuvent être cruciaux dans la résistance à la pénétration car ils vont pouvoir opposer une résistance mécanique aux forces invasives des *appressoria* fongiques (Bechinger *et al.*, 1999). De nombreuses enzymes de modification des parois (pectine méthylestérases, peroxydases, polygalacturonases, xyloglucanases endotransglycosidases...) impliquées dans la croissance cellulaire vont également pouvoir intervenir dans le remodelage des parois végétales lors

d'attaques par des agents pathogènes (Brisson *et al.*, 1994 ; Calderon *et al.*, 1992 ; Nunan *et al.*, 2001).

6.4.2. La Réponse Hypersensible

Une des réponses de défenses les plus efficaces se manifeste par le déclenchement d'une réaction hypersensible (HR) caractérisée par une mort cellulaire localisée autour du point d'infection (Heath, 2000 ; Morel et Dangl, 1997 ; Pontier *et al.*, 1998). Celle-ci intervient dans l'ETI (Effector-triggered immunity) et est consécutive à la reconnaissance spécifique d'un effecteur, produit d'un gène *Arv*, par un récepteur, produit d'un gène *R*. Elle possède également des caractéristiques communes avec la mort cellulaire programmée (PCD : Programmed Cell Death) chez les animaux (Greenberg and Yao, 2004) et serait sous le contrôle d'un programme génétique (Lorrain *et al.*, 2003). Associée à la voie de l'acide salicylique, la HR est efficace contre les agents pathogènes biotrophes et fonctionnerait comme une barrière empêchant l'accès aux nutriments ainsi qu'à l'eau (Heath, 2000 ; Glazebrook, 2005 ; Mayer *et al.*, 2001). Par contre, ce mécanisme de défense n'est pas viable contre les agents pathogènes nécrotrophes qui se développent sur des tissus morts. L'induction de la mort cellulaire par la plante favoriserait dans ce cas la colonisation des tissus par le microorganisme (Govrin et Levine, 2000). Ainsi, les voies de signalisation associées à la mort cellulaire de type HR se distinguent de celles associées à la mort provoquée par les agents pathogènes nécrotrophes. Ces dernières impliqueraient plutôt les voies de l'acide jasmonique et de l'éthylène (Glazebrook, 2005).

La réponse hypersensible est associée à une induction des voies métaboliques secondaires qui, au travers de la synthèse de composés antimicrobiens tels que les phytoalexines et les PR-protéines, vont conduire à une résistance au niveau des cellules qui entourent la nécrose. Cette résistance est appelée la « Résistance locale acquise » (LAR) (Dorey *et al.*, 1997) et va déclencher une résistance non spécifique dans la plante entière appelée « Résistance Systémique Acquise » (SAR). La résistance conférée par la SAR protège la plante à long terme contre un large spectre d'agents pathogènes tels que des bactéries, champignons, oomycètes et virus (Dempsey *et al.*, 1994 ; Durrant et Dong, 2004 ; Ryals *et al.*, 1996). L'acide salicylique participe largement à la mise en place de la SAR mais son rôle en tant que « messenger » n'a pas encore été clairement démontré. Il semblerait que d'autres signaux primaires tels que les oxylipines (JA) puissent intervenir comme messagers mobiles de signalisation de la SAR *via* des protéines de transport, les LTPs (Lipid Transfer Proteins) (Buhot *et al.*, 2004 ; Girault *et al.*, 2008). Dans tous les cas, ces types de résistances (LAR et

Tableau 05 : Les différentes classes et fonctions des familles de PR-protéines identifiées chez les plantes.
(d'après Sels *et al.*, 2008)

Famille	Type	Taille (kDa)	Propriétés	Cible microbienne
PR-1	Tabac PR-1a	15	Antifongique	Inconnue
PR-2	Tabac PR-2	30	β -1,3-glucanase	β -1,3-glucanes
PR-3	Tabac P, Q	25-30	Chitinase (classe I, II, IV, V, VI)	Chitine
PR-4	Tabac 'R'	15-20	Chitinase (classe I, II)	Chitine
PR-5	Tabac S	25	Thaumatine-like	Membrane
PR-6	Tomate inhibiteur 1	8	Inhibiteur de protéase	-
PR-7	Tomate P69	75	Endoprotéinase	-
PR-8	Concombre chitinase	28	Chitinase (classe III)	Chitine
PR-9	Tabac 'lignine peroxydase'	35	Péroxydase	-
PR-10	Persil 'PR1'	17	Ribonucléase-like	-
PR-11	Tabac chitinase 'classe V'	40	Chitinase (classe I)	Chitine
PR-12	Radis Rs-AFP3	5	Défensine	Membrane
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	5	Thionine	Membrane
PR-14	Orge LTP4	9	Protéine de transfert de lipides	Membrane
PR-15	Orge OxOa (germine)	20	Oxalate oxidase	-
PR-16	Orge OxOLP	20	Oxalate oxidase-like	-
PR-17	Tabac PRp27	27	Inconnue	-

- : pas d'activité antimicrobienne reportée *in vitro*

SAR) impliquent la synthèse de PR-protéines ainsi que de métabolites secondaires, les phytoalexines.

6.4.3. Accumulation des composés de défense

6.4.3.1. *La famille des PR-protéines*

Les PR-protéines (Pathogenesis-Related proteins) sont définies comme des protéines de la plante hôte induites dans des situations pathologiques ou en réponse à des molécules élicitrices (Van Loon et Van Strien, 1999). Elles s'accumulent localement dans les tissus infectés mais aussi de manière systémique en association avec la SAR. Au cours de la HR, l'expression des PR-protéines représente le changement quantitatif le plus important dans la composition des tissus infectés en protéines solubles (Fritig *et al.*, 1998). Les premières PR-protéines ont été découvertes dans les années 1970 dans des feuilles de tabac infectées par le virus de la mosaïque (TMV) (Van Loon et Van Kammen, 1970) et prirent leur nom dans les années 1980 (Antoniw *et al.*, 1980). Depuis, elles ont été mises en évidence chez de nombreuses espèces végétales en réponse à des contraintes biotiques et abiotiques (Stintzi *et al.*, 1993). Les PR-protéines ont initialement été classées en 14 familles principalement sur la base de leur masse moléculaire, leur point isoélectrique et de leur fonction (Stintzi *et al.*, 1993 ; Van Loon et Van Strien, 1999) mais de nouvelles familles ont pu être identifiées depuis, amenant la classification actuelle à 17 familles dont la majorité a une fonction connue (Tableau 05) (Sels *et al.*, 2008). Certaines protéines de ces familles ont une masse moléculaire inférieure à 10 kDa ce qui a conduit au terme de PR-peptides.

Les **PR-1** sont les premières PR-protéines identifiées et sont très abondantes. Bien que leur mode d'action ne soit pas encore connu, celles-ci sont généralement considérées comme antifongiques agissant potentiellement au niveau de la membrane plasmique des microorganismes. Chez le tabac (*N. tabacum*) et la tomate (*L. esculentum*), certaines PR1 sont en effet capables d'inhiber la croissance de *Phytophthora infestans* (Niderman *et al.*, 1995). De plus, la surexpression d'une PR1a chez le tabac entraîne une tolérance plus importante aux deux oomycètes *Peronospora tabacina* et *Phytophthora parasitica* (Alexander *et al.*, 1993). Les PR-protéines les mieux caractérisées sont les β -1,3-glucanases (**PR-2**) et les endochitinases acides ou basiques (**PR-3**, **PR-4**, **PR-8** et **PR-11**) qui possèdent des activités enzymatiques capables de dégrader les polysaccharides présents dans la paroi des champignons et bactéries (Brunner *et al.*, 1998 ; Fritig *et al.*, 1998 ; Kauffman *et al.*, 1987 ;

Legrand *et al.*, 1987 ; Stintzi *et al.*, 1993). Les **PR-5** sont des osmotines possédant certaines homologies avec les thaumatines humaines (« thaumatine-like »). Elles possèdent des propriétés antifongiques et agiraient au niveau de la membrane plasmique des champignons en la fragilisant et en dissipant le gradient de protons (Abad *et al.*, 1996 ; Koiwa *et al.*, 1997). La surexpression d'une osmotine dans le tabac (*N. tabacum*) et la pomme de terre (*S. tuberosum*) provoque un retard dans le développement de symptômes foliaires après inoculation de *Phytophthora infestans* (Liu *et al.*, 1994). Chez l'oranger (*C. sinensis*) la surexpression d'une PR-5 confère une tolérance à *Phytophthora citrophthora* (Fagoaga *et al.*, 2001). Les **PR-6** sont des inhibiteurs de protéases (PIs) qui interviennent dans la défense contre les insectes, les herbivores et les nématodes (ces organismes utilisent majoritairement une combinaison de protéases comme enzymes protéolytiques digestives). Elles sont généralement classées en fonction du type de protéases qu'elles inhibent (ex : Serine proteases inhibitors ; Cysteine protease inhibitors ; Koiwa *et al.*, 1997 ; Ryan, 1990). La surexpression d'un PI dans le tabac (*N. tabacum*) entraîne une inhibition de croissance des larves de *Manduca sexta* (sphinx du tabac ; Johnson *et al.*, 1989). Chez le riz (*O. sativa*), la surexpression d'un PI au niveau du système racinaire conduit à une réduction de croissance et de fécondité du nématode *Globodera pallida* (Urwin *et al.*, 1995). De plus, ces inhibiteurs de protéases auraient également des effets sur les champignons et les bactéries puisque la surexpression d'un PI chez le tabac (*N. alata*) entraînerait une protection des plantes vis-à-vis de *Botrytis cinerea* et *Pseudomonas solanacearum* (Charity *et al.*, 2005 ; Sels *et al.*, 2008). Les **PR-7** ont été identifiées uniquement chez la tomate (*L. esculentum*) en réponse au CEV (Citrus Exocortis Viroid) et à *Phytophthora infestans*. Elles interviendraient en tant qu'endoprotéases (Tornerio *et al.*, 1996). Les **PR-9** sont des peroxydases qui seraient associées au stress oxydant et impliquées dans le renforcement des parois végétales (Fritig *et al.*, 1998 ; Hiraga *et al.*, 2001). L'activité des peroxydases est induite au cours de la HR chez le tabac (*N. tabacum*) et associée à la SAR et à l'ISR chez le concombre (*C. sativus*) (Rasmussen *et al.*, 1995 ; Stintzi *et al.*, 1993). De plus, l'induction de gènes codant pour des peroxydases est associée à la résistance au cours de l'interaction entre le riz et *Xanthomonas campestris* (Chittoor *et al.*, 1997). Les **PR-10** regroupent des protéines structurellement proches de ribonucléases ce qui suggérerait leur implication dans les réponses de défenses contre les virus. Cette fonction reste cependant à démontrer (Moiseyev *et al.*, 1997). Les **PR-12**, **PR-13** et **PR-14** ont une faible masse moléculaire et représentent des PR-peptides isolés chez plusieurs espèces. Ils sont riches en cystéine et fortement induits en réponse à l'infection par des agents pathogènes (Broekaert *et al.*, 1995 ; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998). Tous ces

peptides semblent avoir pour cible la membrane plasmique des microorganismes (Sels *et al.*, 2008 ; Thevissen *et al.*, 2003). L'activité la mieux caractérisée des **PR-12** (défensines) est leur habilité à inhiber la croissance d'un certain nombre de champignons filamenteux *in vitro*. Tout comme les PR-12, la principale caractéristique des **PR-13** (thionines) est leur activité antifongique et antibactérienne *in vitro*. Les **PR-14** (LTP : Lipid Transfer Protein) ont obtenu leur nom en raison de leur habilité à transférer des phospholipides entre les membranes *in vivo*. Ces protéines ont une activité antimicrobienne qui pourrait résulter d'une interaction avec les membranes biologiques, conduisant probablement à une perméabilisation. Cependant, seules quelques isoformes possèdent une activité antifongique clairement démontrée. En plus de la contrainte biotique, les gènes codant pour des LTPs peuvent être exprimés dans le développement et induits suite à des contraintes abiotiques telles que le froid, la sécheresse et le stress salin. De nombreuses fonctions ont alors été suggérées pour les LTPs incluant un rôle dans la synthèse de cutine, dans la β -oxydation, dans les réponses de défenses ainsi que dans la signalisation *via* l'acide jasmonique comme protéine fixatrice du JA. L'application exogène d'un complexe LTP4-JA sur des plantes de tabac ou de vigne induit d'ailleurs une tolérance élevée à *Phytophthora parasitica* et *Botrytis cinerea* respectivement (Buhot *et al.*, 2004 ; Girault *et al.*, 2008). Les oxalate-oxydases ainsi que les oxalate-oxydase-like qui représentent respectivement les familles de **PR-15** et **PR-16** sont induites chez le blé et l'orge suite à une infection par le champignon *Erysiphe graminis* (Dumas *et al.*, 1995 ; Zhou *et al.*, 1998). Elles pourraient également être impliquées dans le renforcement des parois végétales. Une PR-16 (CaGLP1) est également induite chez le piment (*C. annuum*) lors de la HR provoquée par le virus de la mosaïque du tabac (TMV). CaGLP1 pourrait être impliquée dans la résistance à de nombreux agents pathogènes également au travers du renforcement de la paroi cellulaire (Park *et al.*, 2004). Les **PR-17** constituent la dernière classe de PR-protéines identifiées et ne sont représentées que par 4 protéines, NtPRp27 du tabac (*N. tabacum*) , CWI-5 du blé (*T. eastivum*) et HvPR17a et b de l'orge (*H. vulgare*). NtPRp27 est induite chez le tabac suite à l'infection par le virus de la mosaïque (TMV), une contrainte hydrique ou encore une blessure (Okushima *et al.*, 2000). Sa nature et sa fonction restent cependant inconnues. CWI-5 est induite chez le blé suite à un traitement par du BTH (acide benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioique-S-méthyl-ester) inducteur de la SAR. Bien que sa fonction soit inconnue, l'accumulation de la protéine induirait une résistance à *Blumeria graminis* (Gorlach *et al.*, 1996). Chez l'orge, HvPR17a et HvPR17b s'accumulent également suite à l'infection par *B. graminis*. Il est suggéré que ces protéines

puissent avoir une fonction de protéases mais celle-ci n'a pas pu être démontrée *in vitro* (Christensen *et al.*, 2002).

6.4.3.2. Les phytoalexines

Les phytoalexines constituent une autre composante importante de l'arsenal de défenses mis en place par les plantes. Ce sont des molécules de faible poids moléculaire, de structures variées et possédant une activité antimicrobienne. Elles sont fortement induites lors d'une interaction plante/agent pathogène ou en réponse à des éliciteurs et peuvent rapidement s'accumuler dans les tissus entourant les zones de nécrose afin d'empêcher la progression de l'infection (Dorey *et al.*, 1997 ; Kuc, 1995 ; Rustérucchi *et al.*, 1996). Chez *V. vinifera*, les phytoalexines peuvent s'accumuler dans les tissus en très grandes quantités, excédant parfois la concentration nécessaire à l'inhibition de la croissance fongique (Jeandet *et al.*, 2002). Ces métabolites secondaires dérivent de la voie des phénylpropanoïdes. Ils peuvent être issus de la voie de l'acétyl-COA et de l'Isopentenyl diphosphate (IPP) (sesquiterpènes), de la voie des acides shikimiques (coumarines), ou des deux voies combinées (stilbènes, isoflavonoïdes) (Hammerschmidt, 1999). L'étape d'engagement dans la voie de synthèse des stilbènes est catalysée par la PAL (Phénylalanine ammonia lyase), point d'entrée dans la voie des composés phénoliques, puis aiguillée par la stilbènes synthase, enzyme très proche en termes de séquence et de structure de la chalcone synthase. Ainsi, de nombreux stress induisent l'expression de ces deux enzymes et la production de phytoalexines. De plus, de nombreuses études ont pu montrer que la surexpression de la stilbène synthase de vigne (*VST1*) chez de nombreuses plantes induisait une production de resvératrol (la principale phytoalexine de la vigne) ainsi qu'une résistance accrue aux agents pathogènes fongiques et oomycètes (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001 ; Hain *et al.*, 1993 ; Hipskind et Paiva, 2000 ; Jeandet *et al.*, 2002 ; Leckband et Lörz, 1998 ; Thomzik *et al.*, 1997 ; Zhu *et al.*, 2004). Dans certains cas comme le kiwi (*A. deliciosa*), la surexpression de *VST1* entraîne une accumulation de picéide au lieu du resvératrol, ce qui n'induit pas de résistance aux agents pathogènes tels que *B. cinerea* (Kobayashi *et al.*, 2000) indiquant que cette forme glycosylée du resvératrol n'aurait pas d'activité biologique.

OBJECTIFS et STRATEGIES

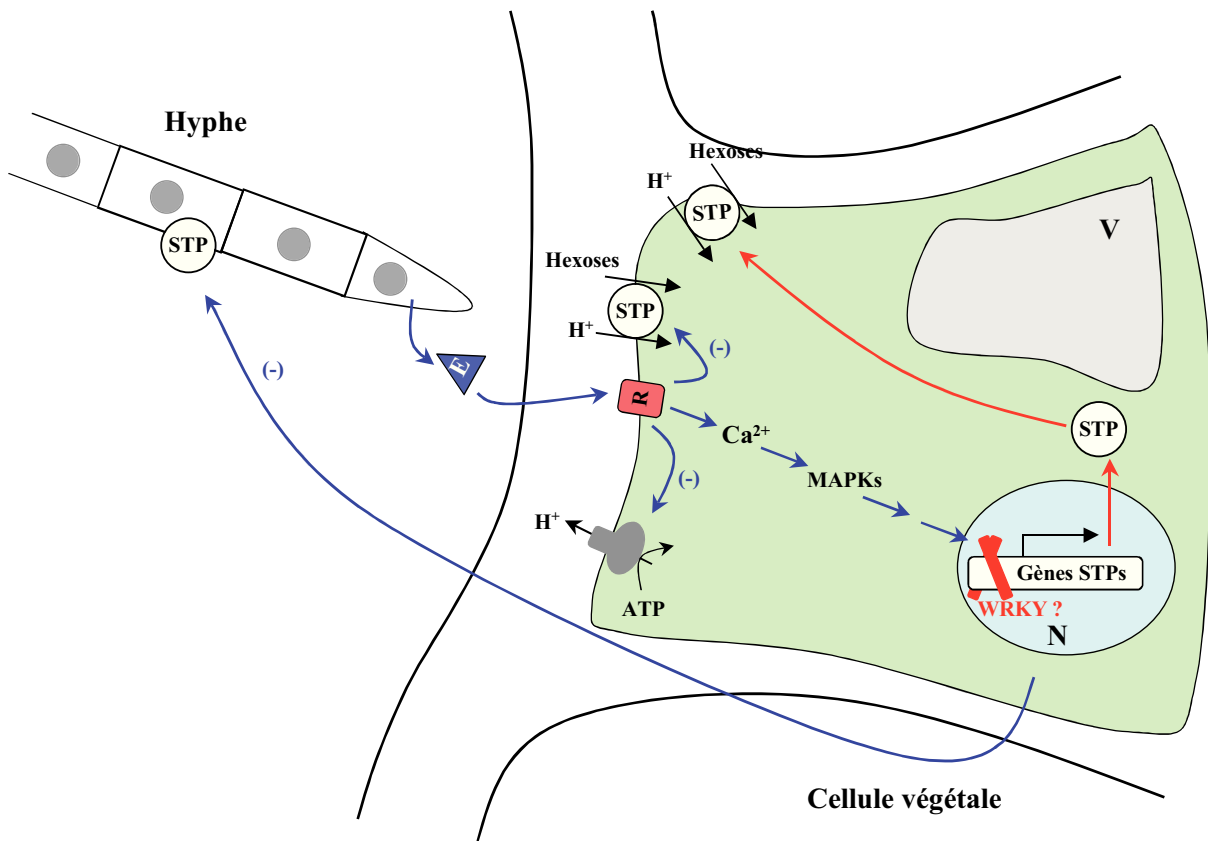


Figure 44 : Modèle théorique de réponse des transports d'assimilats aux stress biotiques.

7. Problématique scientifique et objectifs généraux.

A l'initiation de ce travail, si les grandes voies de défense de la vigne contre les pathogènes étaient déjà bien documentées, peu de données étaient disponibles sur la génomique *sensu stricto* de la vigne. En revanche, au niveau transcriptomique, des résultats commençaient à émerger et surtout plusieurs programmes de séquençage systématique d'ESTs (Expressed Sequence Tags) étaient déjà initiés chez le Chardonnay, la Syrah et le Pinot Noir au travers d'un regroupement de laboratoires (Montpellier, Bordeaux, Poitiers, Reims et le génoscope). Ces ESTs ont permis de développer les premières générations de puces microarrays sur le génome partiel et d'établir les premiers profils d'expression de gènes. De nouvelles séquences ont pu être identifiées dans ces banques d'ESTs et utilisées pour déterminer la fonction biologique de nouveaux gènes candidats. Ce n'est qu'à la fin de ce travail qu'une collaboration Franco-Italienne a permis de publier le premier génome entier d'un cépage de vigne sur un clone de Pinot Noir (PN40024), d'en établir les premières cartes physiques et de générer des puces à ADN "génome entier". Cette grande étape dans la compréhension de la physiologie de la vigne nous a donc permis d'étendre notre étude de quelques gènes candidats que nous connaissions au départ à une étude quasi exhaustive (sur la fin du travail) de l'ensemble des gènes de transporteurs de sucre d'intérêt.

En 2006, les PR-protéines, les phytoalexines et les gènes de résistance étaient largement étudiés dans le contexte d'étude des défenses vis-à-vis de *Botrytis*, du mildiou, de l'oïdium et des MDB (maladies du bois). Cependant, aucune hypothèse n'était avancée sur une possible implication de la relation trophique pouvant entraîner une compétition pour les sucres et aboutir à des phénomènes de tolérance de la vigne face à ses principaux champignons pathogènes. C'est pourquoi le laboratoire a formulé la première hypothèse et établi le premier modèle théorique sur l'altération des relations sources/puits de la plante lors d'une interaction plante/pathogène. Dans ce contexte, les acteurs essentiels seraient donc les transporteurs de sucres (au sens large) qui interviendraient d'une part dans l'adaptation de la plante à un nouveau puits créé par le champignon pathogène et qui auraient d'autre part un rôle dans le ralentissement de la progression de celui-ci (Fig. 44).

Au cours d'une interaction plante/champignon phytopathogène, un ensemble de réactions physiologiques et biochimiques se mettent en place. Une réaction de type incompatible peut apparaître si la plante reconnaît son agresseur. En tout état de cause, si un éliciteur est perçu par un récepteur de la cellule végétale, la plante réagit par une cascade de transduction de signaux telle que décrite dans l'introduction bibliographique. Celle-ci aboutit

à l'expression de PR-protéines, la production de phytoalexines et d'une bouffée oxydative, cette dernière produisant des formes réactives de l'oxygène impliquées dans plusieurs mécanismes de mise en place de barrières à la progression du pathogène. Parallèlement, le devenir de l'interaction reposerait sur une compétition qui s'établit entre l'hôte et le microorganisme pour les ressources et les nutriments, notamment les sucres, afin d'assurer la croissance de l'un et de l'autre. Il est notable que chez les fruits charnus par exemple, une attaque de champignon aboutira d'autant plus facilement que la maturation est avancée et que la disponibilité en sucre pour le champignon est importante (Flaishman et Kolattukudy, 1994 ; Giovannoni, 2001).

Ainsi, il est relativement logique de penser que dès les étapes primaires de l'infection, un champignon va tenter de mobiliser le plus possible les ressources carbonées de la plante à son profit. Celui-ci va donc créer un nouveau "puits" qui va attirer les assimilats afin de les absorber au niveau cellulaire. Ce puits supplémentaire va perturber les relations sources/puits de la plante, ainsi que les mécanismes de déchargement du phloème et d'absorption cellulaire. Nous avons fait l'hypothèse que, dans les premières minutes de l'interaction, le champignon empêche le chargement des sucres dans la cellule végétale pour les mobiliser et les retenir dans l'apoplaste. Ce mécanisme suppose une action directe du champignon sur l'activité des transporteurs de sucres du plasmalemmes (saccharose, hexoses). Cette hypothèse a été testée au sein de notre laboratoire en collaboration avec l'INRA de Dijon chez le Tabac pour lequel le système éliciteur cryptogéine est bien décrit (Bourque *et al.*, 2002). Dans cette étude, il est parfaitement démontré que quelques minutes après le traitement de cellules en suspension par 50 nM de cryptogéine, le transport de glucose est totalement stoppé par la présence de l'éliciteur. Ce blocage ne semble pas passer par l'ATPase pompe à protons et traduit donc certainement une action directe d'inhibition de l'activité des transporteurs en place dans la membrane plasmique.

D'autre part, il a également été démontré que 24 h après élicitation de suspensions cellulaires de pin (*P. pinaster*), le transport de glucose est au contraire augmenté par rapport à des cellules non traitées (Azevedo *et al.*, 2006). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'une plante élicitée ayant détecté un agent pathogène va réagir en augmentant son activité d'influx de glucose pour réabsorber les sucres, et tenter d'affamer le champignon. La mobilisation d'une activité invertasique pour cliver le saccharose en glucose et fructose pourrait également intervenir dans ce contexte. L'hypothèse pour expliquer cette réaction plus tardive de la plante serait que la cellule végétale répond en augmentant la transcription des gènes de transporteurs. Cette stratégie permettrait d'augmenter la densité des transporteurs de sucres sur le

plasmalemme et/ou de mettre en place des protéines de transport insensibles à l'inhibition par le champignon. Cette hypothèse est fortement étayée dans la littérature. Truernit *et al.* (1996) démontrent que dès 4 h après l'élicitation par des éliciteurs fongique et bactérien, des cellules d'*Arabidopsis thaliana* réagissent en augmentant d'environ 15 fois l'activité de transcription du gène *AtSTP4* codant un transporteur de monosaccharides (hexoses).

Ce travail de thèse s'est donc articulé autour de la question suivante : lors d'un stress biotique, comment évolue l'expression d'un certain nombre de gènes de transporteurs de sucres et comment s'établit cette régulation au niveau transcriptomique ? Cette étude a été effectuée sur le modèle de la vigne, plante d'intérêt agronomique pour laquelle le laboratoire avait déjà cloné et caractérisé plusieurs gènes de transporteurs d'hexoses (*VvHT1*, 2, 6) ; tout en s'appuyant sur les données génomiques et transcriptomiques issues d'*Arabidopsis thaliana*. De plus, nous nous sommes attachés à relier les données d'expression des gènes de transporteurs à leur fonction biologique, c'est-à-dire quantifier les répercussions d'une contrainte biotique au niveau de l'activité de transport des cellules à la fois pour les hexoses mais aussi pour le saccharose.

La stratégie expérimentale que nous avons adoptée a été la suivante :

- Dans un premier temps, une approche *in silico* basée sur les données du modèle *Arabidopsis* et le séquençage du génome de Pinot Noir (<http://www.genoscope.cns.fr>) nous a permis d'identifier et de répertorier des séquences de transporteurs de sucres putatives chez la vigne.

- Dans un second temps, à l'aide des données bioinformatiques obtenues, notre stratégie expérimentale s'est articulée autour de trois axes principaux :

- Mise en évidence, à court terme, d'une inhibition du transport de sucres par différents éliciteurs fongiques.
- Identification des gènes de transporteurs de sucres induits ou réprimés au niveau transcriptionnel au cours de l'interaction par la technique du macroarray thématique, associée à une validation par Northern blot.
- Développement d'un modèle cellulaire afin de mesurer l'activité de transport de sucres *in vitro* en fonction des conditions physiologiques.

Le premier volet de mon travail a consisté en la mise en place d'un mode de culture de plantes permettant d'étudier l'expression des gènes de transporteurs de sucres au cours d'une interaction vigne/champignons pathogènes. Au cours de la seconde partie de cette étude, nous avons fait évoluer notre système d'infection vers un modèle de suspension cellulaire permettant d'étudier l'expression des gènes de transporteurs ainsi que l'activité de transport de sucres associée, en réponse à une élicitation.

Matériel et Méthodes



Figure 45 : Culture *in vitro* de plants de vigne. Les vitroplants de Chardonnay sont cultivés sur milieu gélosé en bocaux stériles (A) placés en chambre de culture (B). (Trait : 2 cm)

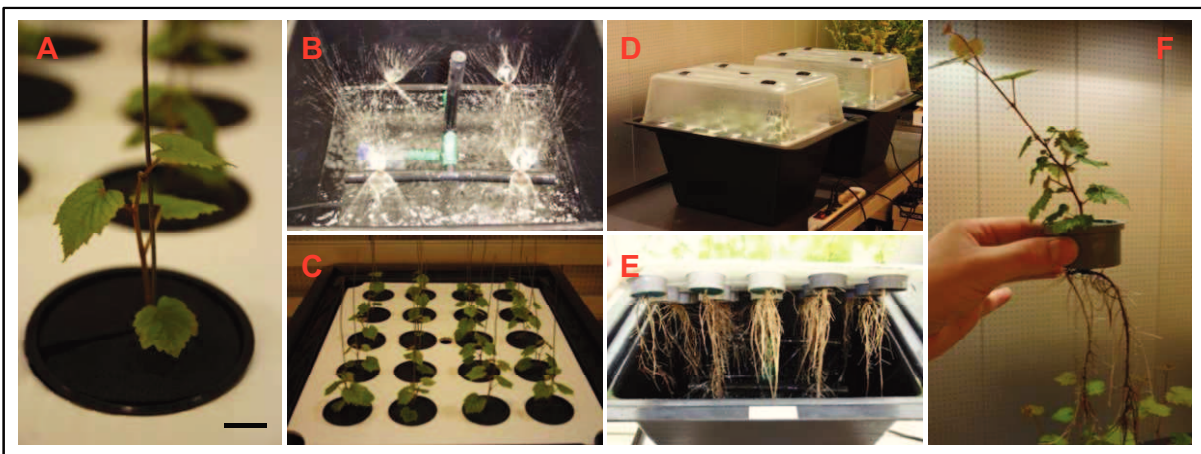


Figure 46 : Culture de plants de vigne en système aéroponique. Les vitroplants de Chardonnay sont transférés du système *in vitro* en système aéroponique au stade 3-4 feuilles (A). La solution nutritive est délivrée par aspersion (B) dans un bac contenant 20 plantes (C). Les plantules sont recouvertes d'un couvercle plastique (D) permettant une forte humidité relative. Après une vingtaine de jours de culture, les vignes atteignent une vingtaine de cm de hauteur avec un système racinaire abondant, facilement récoltable (E et F). (Trait : 1 cm)

Matériel et Méthodes

1. Matériel Biologique

1.1. Matériel végétal

1.1.1. Culture de vitroplants de Chardonnay

Les vitroplants de vigne sont cultivés en bocaux stériles sur le milieu gélosé McCown Woody Plant (Lloyd and McCown, 1980) autoclavé 20 min à 120°C et dont la composition est décrite annexe 1. Les cultures sont placées sous un éclairage d'environ 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et soumises à une photopériode de 16 h de jour à $23 \pm 1^\circ\text{C}$ / 8h de nuit à $18 \pm 1^\circ\text{C}$ (Fig. 45). Après 4 à 5 semaines de croissance et l'obtention de 5 à 6 entre-nœuds, les vitroplants sont multipliés par micro-bouturage sur du milieu frais afin de toujours disposer de plantes *in vitro*.

1.1.2. Culture de vigne en système aéroponique

Les vignes sont multipliées par micro-bouturage *in vitro* sur le milieu McCown Woody Plant puis acclimatées en système aéroponique lorsqu'elles atteignent le stade 3-4 feuilles et une racine de 3 à 5 cm de long. Les plantules sont maintenues au niveau du collet par des mousses synthétiques, au dessus d'un bac opaque de 15 L contenant une solution nutritive (Fig. 46). Cette solution nutritive, dont la composition est décrite annexe 2, est adaptée de Gibeaut (Gibeaut *et al.*, 1997) dans laquelle le $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$ et le Fe-diéthylènetriamine pentaacétate ont été remplacés par du Na_2EDTA et du FeSO_4 (Dalton *et al.*, 1983). Celle-ci est délivrée par aspersion grâce à une pompe (Maxi-Jet 1000 L.h^{-1}) qui crée un brouillard suffisant au bon développement des racines et des plantules. Le dispositif est placé dans un phytotron sous un éclairage d'environ 285 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et soumis à une photopériode de 16 h de jour à 23°C , 70% d'humidité / 8 h de nuit à 18°C , 65% d'humidité. Les plantes sont ainsi cultivées pendant 21 jours sous un couvercle plastique avant de procéder à la récolte des organes ou aux infections avec *Botrytis cinerea*.

1.1.3. Culture de vigne en serre

Après une croissance *in vitro* d'environ 6 semaines sur le milieu McCown Woody Plant, les vignes cv Chardonnay sont délicatement transférées en pots de 12 cm dans un mélange terre/vermiculite (2:1) préalablement autoclavé (20 min à 120°C). Recouvertes d'une cloche en plastique transparent afin de favoriser un taux d'humidité élevé, les plantules de

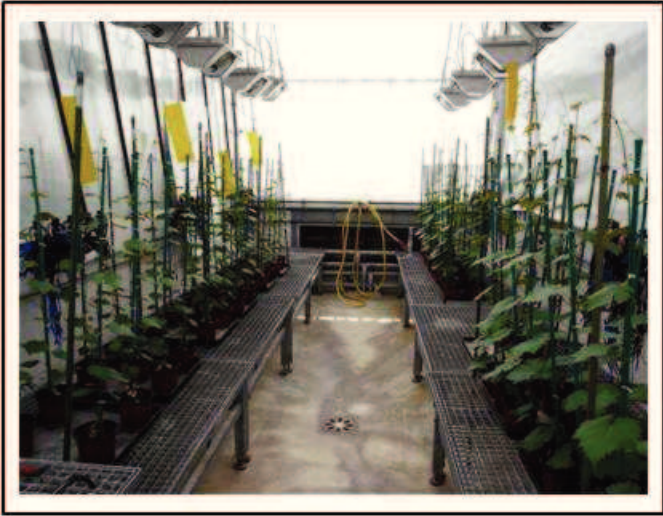


Figure 47 : Culture de vigne en serre. Des vitroplants de Chardonnay âgés de 6 semaines environ sont transférés en pots de 12 cm contenant un mélange de terre et de vermiculite (2:1). Les plantes sont alors transférées en serre en condition semi-contrôlées.

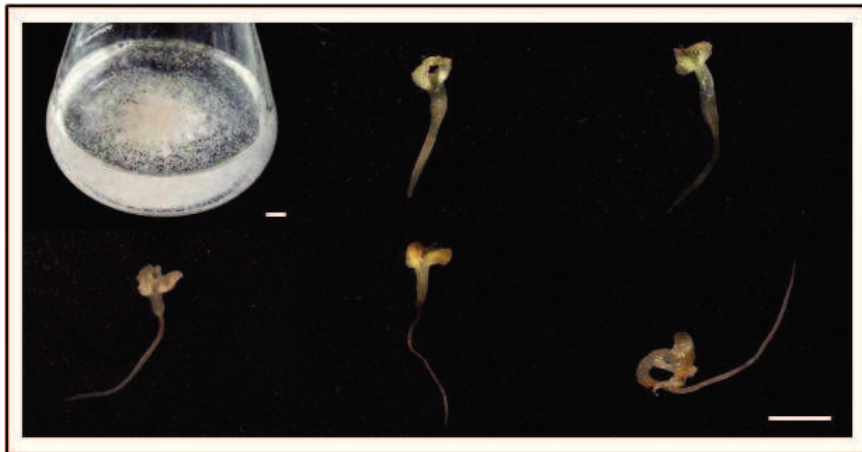


Figure 48 : Obtention d'embryons somatiques à partir d'une suspension cellulaire embryogène de Chardonnay. L'embryogenèse somatique est déclenchée par le transfert des cellules du milieu liquide « GM⁺ » contenant 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'acide β -naphtoxyacétique (NOA) dans le milieu « GM0 » qui en est dépourvu. (Traits : 0,5 cm)

vigne sont ainsi transférées en serre en condition semi- contrôlées (~18 h de jour à $23 \pm 1^\circ\text{C}$ / 6 h de nuit à $18 \pm 2^\circ\text{C}$). Les pots sont soumis à un éclairage naturel ou relayé par des lampes à vapeur de sodium (Philips SON-T, 423 W), et sont maintenus humides par un arrosage régulier à l'eau du robinet. Au terme d'une semaine de culture en serre, les cloches plastiques sont retirées et lorsque que les vignes atteignent 30 à 40 cm de hauteur, des tuteurs sont placés afin de maintenir une croissance verticale des plants (Fig. 47).

1.1.4. Obtention d'embryons somatiques de Chardonnay

Les embryons somatiques sont initiés à partir des cellules embryogènes de Chardonnay (*Vitis vinifera*, clone 76). Cette suspension à été initiée par Coutos-Thevenot *et al.* (1992) selon les techniques décrites par Mauro *et al.*, (1992). Les cellules sont cultivées dans le milieu Murashige et Skoog modifié « GM+ », stérilisé par autoclavage (20 min à 120°C) et dont la composition est décrite annexe 3. Elles sont placées sous agitation permanente (115 rpm) à 22°C , à l'obscurité et repiquées tous les 14 jours par addition de 0,2 mL de cellules sédimentées (PCV – Packed Cell Volume) dans 25 mL de milieu frais. Le déclenchement de l'embryogenèse somatique est effectué par transfert d'environ 0,1 mL de cellules sédimentées dans 50 ml de milieu « GM0 » dépourvu d'auxine (Coutos-Thevenot *et al.*, 1992). Les cellules sont alors placées à 26°C sous agitation orbitale (115 rpm) et le milieu de culture renouvelé tous les deux jours afin d'éliminer les substances sécrétées par les embryons somatiques et pouvant inhiber l'embryogenèse. Parallèlement au renouvellement du milieu, une quantité arbitraire d'embryons somatiques est éliminée afin de maintenir une faible densité de culture. Au terme de 5 à 6 semaines, les embryons somatiques sont utilisés afin d'initier de la callogenèse sur milieu gélosé (Fig. 48).

1.1.5. Prélèvements de baies de raisin

Les baies de raisin (*V. vinifera* L. cv Chardonnay) ont été récoltées en 2007 sur le domaine du S.R.P.V (Service Régional de la Protection des Végétaux) de Biard (86). Plusieurs stades de développement ont été prélevés de la nouaison (25.06.07) jusqu'aux vendanges (20.09.07) afin d'étudier le profil d'expression des gènes de transporteurs de sucres au cours de la maturation. Des baies naturellement botrytisées ont également été récoltées 5 jours avant les vendanges (1 grappe) pour analyser l'effet de l'infection par *Botrytis* sur l'expression des différents gènes dans la baie. Les grappes ont été prélevées entières par section du pédoncule à l'aide d'un sécateur, emballées dans du papier



Figure 49 : Prélèvement de baies de Chardonnay au vignoble. Les baies de raisin ont été récoltées sur le domaine du Service Régional de la Protection des Végétaux (Biard) (A) à partir du stade « nouaison » (B) jusqu'au stade « récolte » (C).

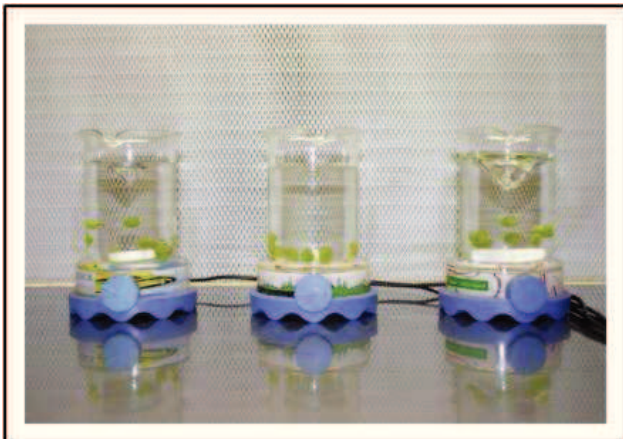


Figure 50 : Désinfection des baies de raisin. Avant d'utiliser les tissus de baies de Chardonnay comme explants pour initier de la calogenèse sur milieu gélosé, celles-ci ont été désinfectées sous hotte à flux laminaire horizontal dans des bains d'éthanol et d'hypochlorite de sodium.

d'aluminium puis directement congelées dans de l'azote liquide (Fig. 49). Les prélèvements ont été maintenus dans l'azote liquide du vignoble jusqu'au laboratoire avant d'être transférés et conservés à -80°C. Lors des broyages dans l'azote liquide les baies ont été épépinées avant l'extraction des ARNs.

Parallèlement, afin d'initier de la callogenèse à partir de tissus de baies, certaines grappes en maturation ont été prélevées, emballées et maintenues sur de la glace jusqu'au laboratoire. Avant la mise en culture *in vitro* des tissus, les baies ont subi un protocole de désinfection consistant en un bain d'éthanol 70% (v/v) pendant 1 minute, un bain de 20 minutes dans de l'hypochlorite de sodium à 0,75 g.L⁻¹ additionné de Tween 20 à 0,05% (v/v), puis deux bains successifs de 5 minutes dans de l'eau ultra-pure stérile, sous hotte à flux laminaire horizontal (Fig. 50).

1.1.6. Culture de cellules

1.1.6.1. *Cellules de vigne cv Chardonnay (CHY)*

La suspension cellulaire de vigne cv Chardonnay a été initiée au cours de ce travail à partir de cals issus de pétioles et de tiges de vitroplants. Les cellules sont maintenues dans un milieu Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968) stérilisé par autoclavage (20 min à 120°C) et dont la composition est décrite annexe 4. Les suspensions cellulaires sont placées sous agitation permanente (115 rpm), à 22°C et à l'obscurité. Chaque semaine, 10 mL de suspension sont transférés dans 20 mL de milieu frais. Les conditions d'obtention de cette suspension sont décrites dans le deuxième chapitre des résultats.

1.1.6.2. *Cellules de vigne cv Cabernet Sauvignon (CSB)*

La suspension cellulaire « CSB » a été initiée à partir de cals issus de baies de raisin du cépage Cabernet Sauvignon (don du Pr Mérillon ; Faculté de Pharmacie, Bordeaux 2). Les cellules sont cultivées dans un milieu Murashige et Skoog modifié (Decendit and Mérillon, 1996) stérilisé par autoclavage (20 min à 120°C) et dont la composition est décrite annexe 5. Les cultures sont maintenues à 22°C, à l'obscurité et sous agitation orbitale (110 rpm). Celles-ci sont repiquées tous les 7 jours par addition de 10 mL de suspension dans 40 mL de milieu frais.

1.1.6.3. Cellules de tabac (BY2)

La culture cellulaire de tabac (*Nicotiana tabacum* L. var. Bright Yellow-2 (BY2)), gracieusement donnée par I. Ichri (INRA Villenave d'Ornon), a été initiée par le laboratoire de Recherche Scientifique du Tabac (Japan Tobacco Corporation) à partir de cals issus de jeunes plants de tabac (Kato *et al.*, 1972). Ces cellules sont cultivées dans un milieu Murashige et Skoog modifié (Nagata and Kumagai, 1999), stérilisé par autoclavage (20 min à 120°C) et dont la composition est décrite annexe 6. Elles possèdent une vitesse de croissance rapide ainsi qu'une forte capacité de synchronisation (Nagata *et al.*, 1992; Nagata and Kumagai, 1999). Les cultures sont placées sous agitation orbitale (170 rpm), à 22°C et à l'obscurité. Au terme de 7 jours de culture, 1,5 mL de suspension sont transférés dans 80 mL de milieu frais.

1.2. Matériel fongique

1.2.1. *Botrytis cinerea*

Les souches de *B. cinerea* utilisées au laboratoire ont gracieusement été fournies par B. Dubos (souche 916T) et M. Fermaud (souches 162V, 112T et 344T) de l'INRA de Villenave d'Ornon. Ces souches sont cultivées en boîtes de Pétri (9 cm) sur du milieu « Malt-Extract-Agar » (Oxoid, Ref. CM0059) à raison de 50 g.L⁻¹ (soit 30 g.L⁻¹ d'extrait de malt ; 5 g.L⁻¹ de peptones fongiques et 15 g.L⁻¹ d'agar). Les boîtes sont placées à 22°C à l'obscurité et le champignon repiqué tous les mois par dépôt d'une carotte de 0,5 cm de diamètre sur du milieu frais. La sporulation est induite sur le même milieu en plaçant les boîtes nouvellement ensemencées à la lumière (80 μmol.m⁻².s⁻¹) et à 22°C pendant environ 7 jours.

1.2.2. *Alternaria brassicae*

A. brassicae a été utilisée comme témoin négatif lors des tests d'identification formelle de *B. cinerea* par PCR. La souche utilisée a été envoyée par V. Grimault, responsable du laboratoire de pathologie au sein de la SNES d'Angers (Station Nationale d'Essais des Semences). La souche (ref. 01120102) est cultivée en boîte de Pétri (9 cm) sur du milieu « Potato Dextrose Agar » (PDA, Difco™) à raison de 39 g.L⁻¹. Les boîtes de culture sont placées à 23°C à l'obscurité et le champignon repiqué tous les mois par dépôt d'une carotte de 0,5 cm de diamètre sur du milieu frais.

1.2.3. Erysiphe necator

En tant qu'ectoparasite strict, *E. necator* ne peut être cultivé sur milieu synthétique comme *B. cinerea*. Le champignon est alors constamment multiplié sur feuilles de vigne détachées et placées en survie. N'étant pas convenablement équipé au laboratoire, la préparation de l'inoculum d'*E. necator* a été effectuée au sein de l'équipe de M-F Corio-Costet (UMR 1065 Santé Végétale, INRA de Villenave d'Ornon). Les étapes de préparation du matériel végétal et de multiplication du champignon sont décrites par Corio-Costet (2007) et brièvement récapitulées ci-après.

Des plants de vigne cv Cabernet Sauvignon sont cultivés en serre et protégés d'attaques naturelles d'*E. necator* par des vapeurs de soufre. Lorsque les plantes atteignent 8 à 10 feuilles, les feuilles du 2^{ème} et 3^{ème} rang à partir de l'apex sont prélevées et nettoyées sous un flux d'eau constant. Les deux faces des feuilles sont légèrement frottées afin d'éliminer les cires épicuticulaires puis plongées dans un bain d'eau permutée additionnée de quelques gouttes d'alcool à 70% pour éliminer les principaux thrips retrouvés en serre. Après un séchage entre deux feuilles de papier absorbant, le matériel foliaire est décontaminé 10 minutes dans un bain d'hypochlorite de calcium (50 g.L⁻¹) puis rincé dans un bain d'eau stérile. Les feuilles sont ensuite séchées entre deux feuilles de papier velin (57 g.m⁻²) stérile (Prat Dumas & Cie, France). Des disques foliaires de 18 mm de diamètre sont alors stérilement découpés à l'emporte pièce et placés en boîtes de Pétri (10 cm) la face inférieure en contact avec un milieu gélosé contenant 16 g.L⁻¹ d'agar et 30 mg.L⁻¹ de benzimidazole (8 disques par boîte).

Les souches d'*E. necator* (S1, 145 et ESL33) sont multipliées sur disques foliaires maintenus en survie. Les inoculations sont effectuées sous hotte à flux laminaire selon la méthode décrite par Cartolaro and Steva (1990). Les boîtes de Pétri sont placées dans des tours d'inoculation en Plexiglas de 60 cm de hauteur et les oïdies sont détachées des feuilles ou disques sporulents placés au dessus des tours à l'aide d'un souffle d'air généré par une pompe d'aquarium (RENA 301[®]) reliée à une pipette Pasteur stérile. Les boîtes inoculées sont placées dans une chambre de culture à 21 ± 2°C et soumise à une photopériode de 18 h sous un éclairage de 25 µE.m⁻².s⁻¹. Cinq à huit jours post-inoculation, les premières tâches mycéliennes apparaissent. Les souches du champignon sont ainsi entretenues tous les 12 à 14 jours en fonction de leur intensité de sporulation.

1.3. Matériel éliciteur

1.3.1. Un éliciteur fongique général : l'ergostérol

L'ergostérol est un composant des membranes des cellules fongiques ; en tant que tel, ce stérol cristallin est généralement considéré comme un éliciteur général. Peu soluble dans l'eau, une solution à 10 mM d'ergostérol (Fluka, Ref 45480) est préparée dans l'éthanol 96% puis chauffée à 65°C jusqu'à complète dissolution des cristaux. Une solution d'ergostérol est préparée avant chaque essai d'élicitation et utilisée à une concentration finale de 2 μ M correspondant à 0,02% final d'éthanol dans le milieu.

1.3.2. Une élicitine : la cryptogéine

La cryptogéine est une petite holoprotéine d'environ 10 kDa qui appartient à la famille des élicitines (Mohamed *et al.*, 2007; Mikes *et al.*, 1997). Elle est sécrétée par l'oomycète *Phytophthora cryptogea*. Cette élicitine purifiée a été fournie sous forme lyophilisée par M. Ponchet (UMR Interactions Biotiques et Santé Végétale, INRA 1301 – CNRS 6243, Nice Sophia Antipolis) et remise en solution à raison de 10 μ M dans un tampon mannitol (0,175 M mannitol ; 10 mM MES ; 0,5 mM CaCl₂ ; 0,5 mM K₂SO₄, pH 5,5). Les aliquots de chaque solution ont été conservés à -20°C.

1.3.3. Une glycoprotéine élicitrice : l'endopolygalacturonase

L'endopolygalacturonase purifiée (endoPG) de *Botrytis* (T4BcPG1) a gracieusement été fournie par B. Poinssot (UMR 1088 Biologie cellulaire et Ecologie des Interactions Plantes/Micro-Organismes, INRA/Université de Bourgogne) en 2003. Cet éliciteur protéique d'environ 40 kDa a été obtenu à partir de la souche T4 de *Botrytis* suivant le protocole décrit par Poinssot *et al.* (2003) et utilisé au sein du laboratoire pour l'étude de l'expression d'un gène codant pour une LTP (Lipid Transfert Protein) chez la vigne. Conservée dans de l'eau à -80°C, cette glycoprotéine a également été utilisée au cours de ce travail de thèse pour éliciter les cellules de Chardonnay à raison de 0,1 μ g.mL⁻¹ final.

1.3.4. Un mélange protéique : le dialysat de culture de *B. cinerea*

La quantité d'endoPG étant insuffisante pour étudier l'expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres et l'activité de transport associée, un dialysat de culture de *Botrytis* a été produit et utilisé en tant qu'éliciteur.

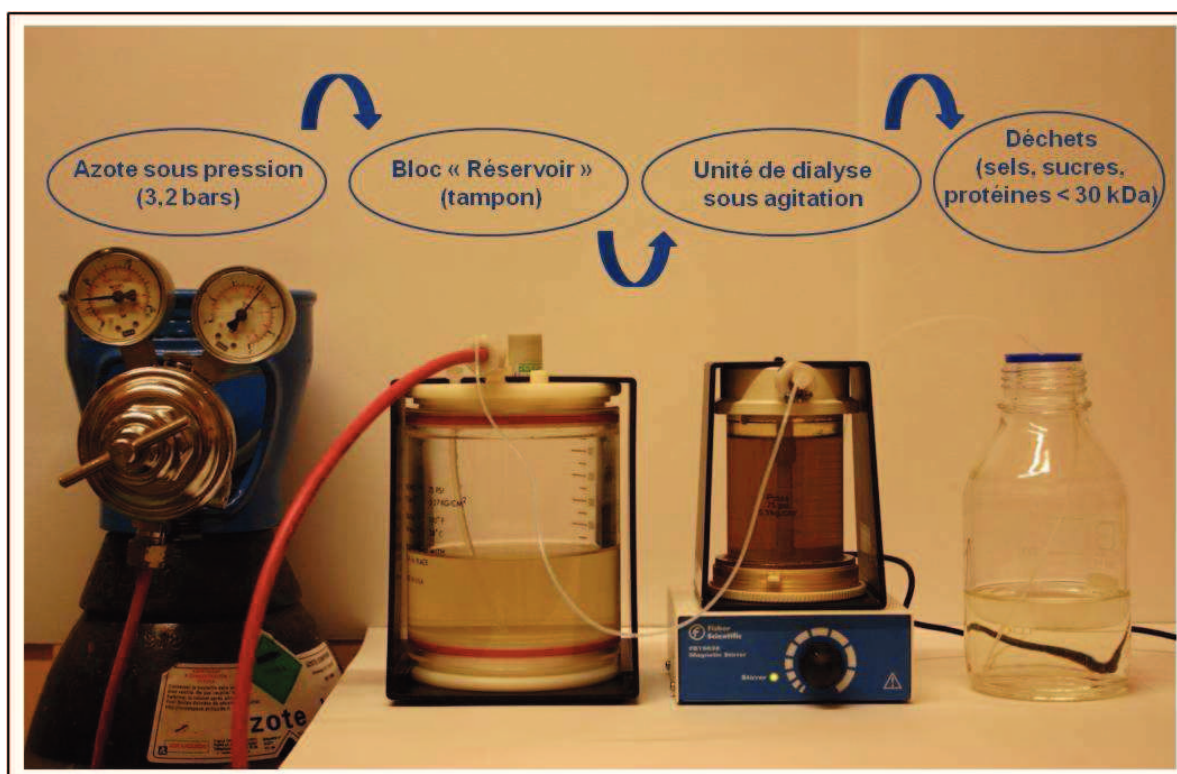


Figure 51 : Système de concentration et de dialyse du milieu de culture de *B. cinerea*. Le milieu de culture, placé dans l'unité de dialyse, est progressivement remplacé par du tampon entraîné par de l'azote sous pression. La membrane de l'unité de dialyse permet de retenir les protéines de taille supérieure à 30 kDa ; les protéines de plus petite taille, les sels, les sucres passent au travers de la membrane et sont éliminés. La dialyse est effectuée en chambre froide à 4°C.

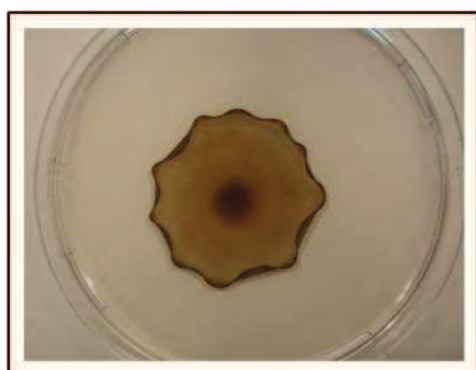


Figure 52 : Couche polysaccharidique éliminée du système de dialyse. Tous les deux jours, une couche de polysaccharides est délicatement enlevée à la surface de la membrane de dialyse.

Les conidies de *B. cinerea* (112T) sont stérilement récoltées dans de l'eau ultra-pure stérile sur un mycélium sporulent de 7 jours environ (cf §1.2.1). Quatre fioles d'Erlenmeyers contenant chacun 500 mL de milieu « Nitsch et Nitsch » modifié (Nitsch and Nitsch, 1969 ; Annexe 7) et autoclavé (20 min à 120°C) sontensemencées avec la suspension conidienne à raison de 2500 conidies.mL⁻¹. Les cultures sont ensuite placées pendant 4 semaines sous agitation orbitale (130 rpm) et soumises à une photopériode de 16 h de jour à 23 ± 1°C / 8h de nuit à 18 ± 1°C. Au terme d'un mois de culture, le milieu est stérilement filtré sous hotte à flux laminaire horizontal au travers d'une passoire métallique autoclavée (maille : 1 mm²) afin d'éliminer la majeure partie du mycélium fongique. Le milieu récolté est alors centrifugé 2 x 15 minutes à 10500 g, 4°C et les culots de mycélium obtenus éliminés après chaque centrifugation. Le filtrat de culture est alors filtré sous vide au travers d'un filtre de papier Fisherbrand (90 mm, Fisher Bioblock[®]) puis congelé une nuit à -20°C afin de précipiter les polysaccharides. Après décongélation, le filtrat est ultra-centrifugé 30 minutes à 34180 g (UltraPro, rotor Sorvall A621, rayon maximum) à 4°C puis de nouveau filtré sous vide au travers d'un filtre de papier Fisherbrand (90 mm, Fisher Bioblock[®]). Au terme de cette dernière filtration, 1,5 L de filtrat sont récupérés. Ce volume est alors concentré puis dialysé grâce à un système de dialyse sous pression d'azote installé en chambre froide à 4°C (Fig. 51). Placé dans un réservoir, le filtrat est entraîné par une pression d'azote de 3,2 bars (46 psi) au travers d'une membrane d'ultrafiltration (Diaflo[®], YM30, AMICON, INC., Beverly, USA) située dans l'unité de dialyse. Cette membrane permet alors l'élimination des éléments du milieu comme les sucres et des protéines de masse moléculaire inférieure à 30 kDa. Un agitateur magnétique est intégré au système afin de ne pas colmater la membrane au cours de la filtration. Le filtrat est ainsi concentré durant 5 jours jusqu'à l'obtention d'un volume d'environ 100 mL. Tous les 2 jours, en raison d'une diminution significative du débit de filtration, le système est démonté et la membrane délicatement nettoyée dans un bain d'eau ultra-pure. La formation d'une couche brunâtre et visqueuse, probablement attribuée au dépôt de polysaccharides, est en effet observée au cours de la filtration provoquant un colmatage du dispositif (Fig. 52). Celle-ci est alors éliminée. Au terme des 5 jours de concentration, la dialyse est alors commencée par ajout de 1,5 L de tampon mannitol (0,175 M mannitol ; 10 mM MES ; 0,5 mM CaCl₂ ; 0,5 mM K₂SO₄) dans le réservoir. La dialyse du filtrat est ainsi conduite durant 5 jours jusqu'à l'obtention d'un volume final de 20 ml de dialysat. Le dialysat de culture est ensuite centrifugé 10 minutes à 10500 g, 4°C puis le surnageant stocké à -80°C.

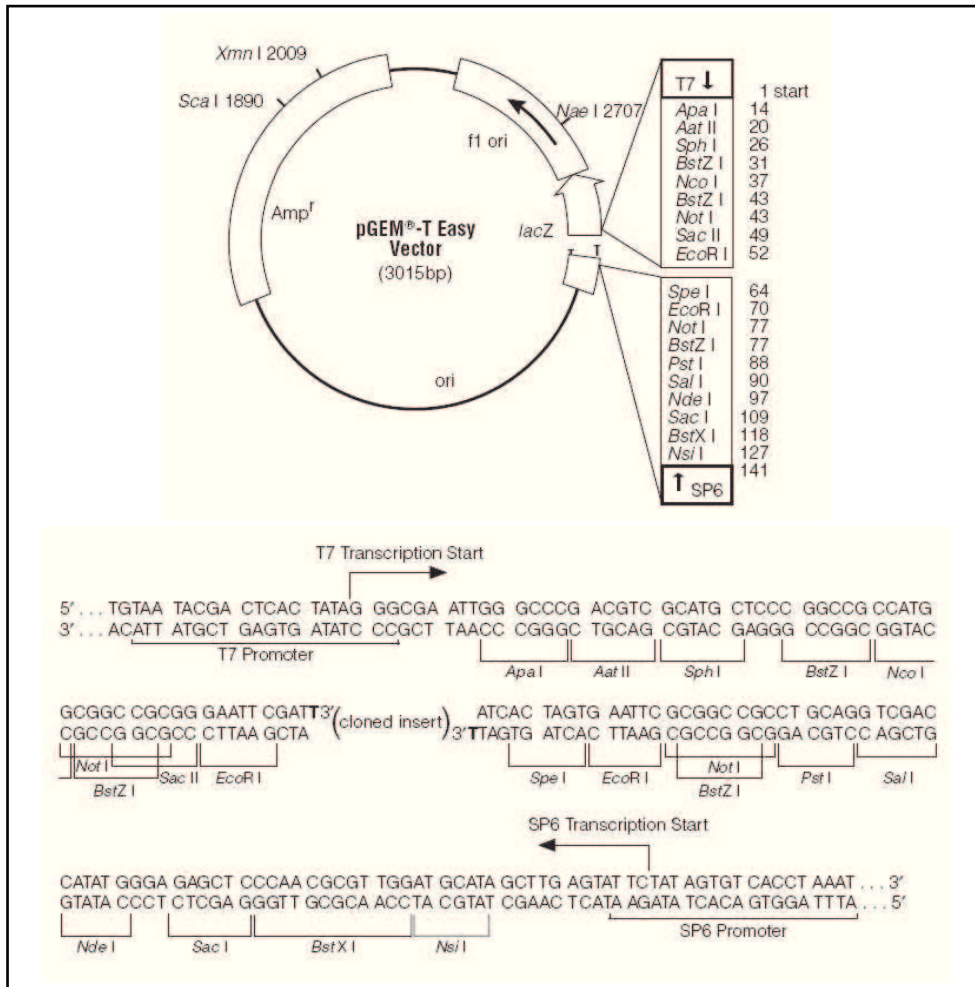


Figure 53 : Carte du vecteur pGEM[®]-T Easy et séquences flanquantes au site d'insertion.

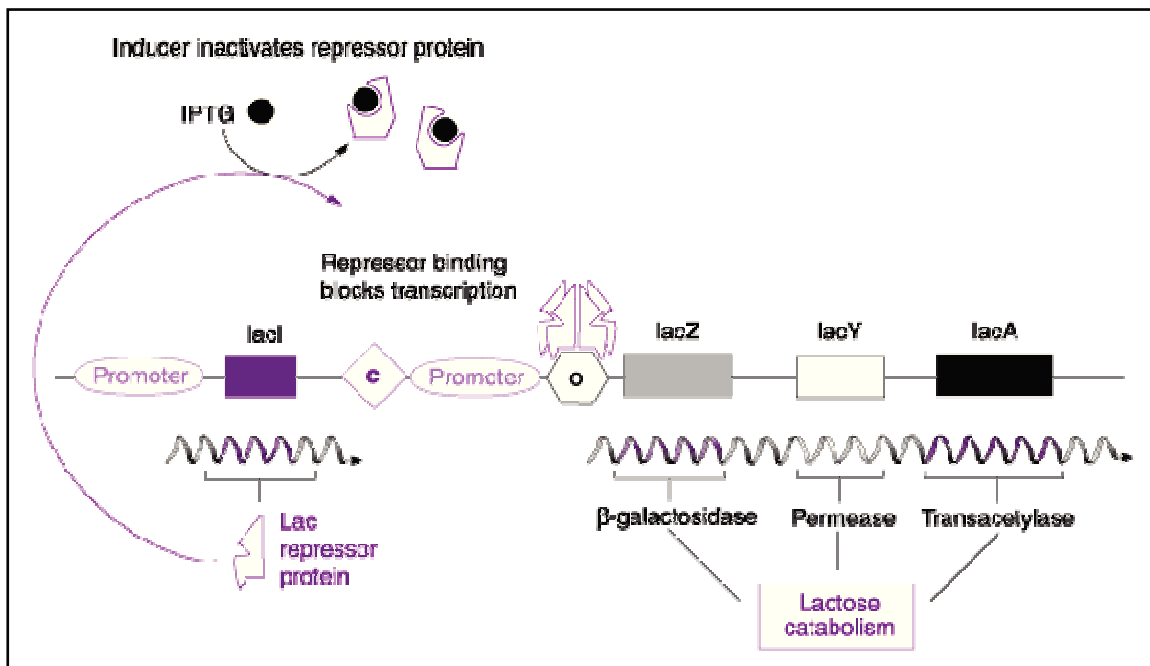


Figure 54 : Principe de fonctionnement de l'opéron lactose en présence d'IPTG. L'IPTG se lie au répresseur constitutif qui ne peut alors plus se lier à l'opérateur (O). LacZ peut ensuite être transcrit.

1.4. Souches bactériennes : *Escherichia coli* XL1-blue et DH5 α

Les souches d'*E. coli* XL1-blue (Clontech) et DH5 α (Gibco-BRL) sont de type *rec A1* et ne peuvent donc pas subir de recombinaison de leur génomes. Ayant une bonne stabilité génique, ces deux souches sont utilisées pour la manipulation des plasmides introduits par choc thermique ou électroporation.

1.5. Vecteurs de clonage

1.5.1. Le plasmide pGEM[®]-T Easy

Le plasmide pGEM[®]-T Easy (Promega, USA) est un vecteur pratique pour le clonage de produits PCR (réaction de polymérisation en chaîne). Ce plasmide de 3015 pb est fourni sous forme linéaire, coupé au milieu de son site multiple de clonage (MCS), et possède une thymine aux extrémités 3' qui empêchent d'une part sa recircularisation, et facilite d'autre part la ligature des produits de PCR. Certaines polymérases thermostables ajoutent en effet une déoxyadénosine à l'extrémité 3' des fragments amplifiés venant compléter les extrémités sortantes du plasmide. Le vecteur (Fig. 53) porte également deux marqueurs de sélection qui sont le gène *Amp^r* de résistance à l'ampicilline et un segment du gène *lacZ*, comprenant le MCS et codant pour la partie N-terminale de la β -galactosidase. Cette enzyme peut en effet être séparée en 2 peptides, *lacZ α* et *lacZ ω* , chacun ne pouvant être actif par lui-même. Ainsi, le gène *lacZ α* est porté par le plasmide alors que *lacZ ω* est porté en *trans* par le chromosome bactérien de certaines souches. Tous deux sous le contrôle de l'opéron lactose, la transcription est activé en présence d'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside ; analogue non métabolisable du galactose) qui se lie au répresseur constitutif et libère l'opérateur (Fig. 54). Au sein d'un transformant, les deux parties de l'enzyme peuvent s'associer *in vitro* pour former une protéine active par α -complémentation (Ullmann *et al.*, 1967). Le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside), substrat de l'enzyme, peut alors être transformé en un produit coloré en bleu (Horwitz *et al.*, 1964). Lorsqu'un fragment d'ADN est inséré dans le vecteur au niveau du MCS, la transcription de *lacZ α* est interrompue et les bactéries n'ont plus d'activité β -galactosidase ; elles apparaissent blanches. Le vecteur possède également les promoteurs T7 et SP6 de part et d'autre de la cassette de clonage, qui peuvent être utilisés pour la fixation des amorces correspondantes (T7 et SP6) lors des réactions de PCR.

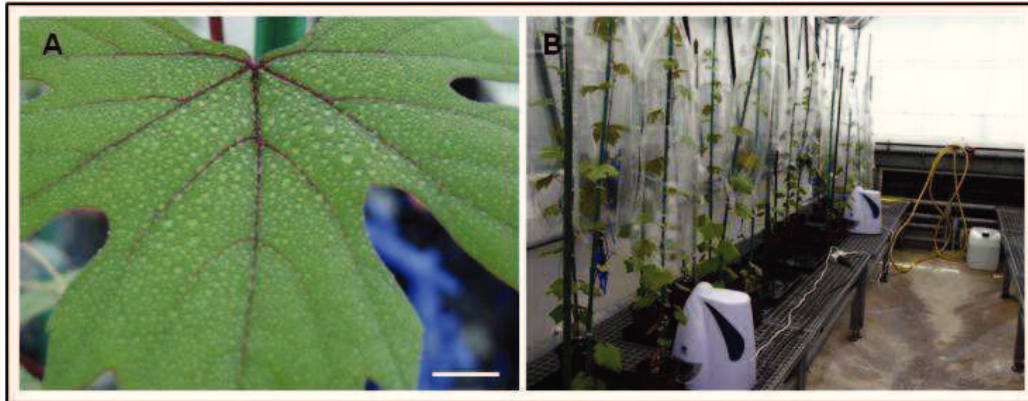


Figure 55 : Infection de feuilles de vignes cultivées en serre. Les feuilles sont infectées par pulvérisation d'une suspension conidienne à $1000 \text{ conidies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (A). Les plantes sont ensuite couvertes de sacs plastiques perforés afin de favoriser un climat humide et des humidificateurs sont placés devant chaque lot de plantes (B). (Trait : 1 cm)

2. Méthode d'infection/élicitation et procédure de prélèvement

2.1. Infection des plantes cultivées en serre et en aéroponie par *B. cinerea*

L'infection des vignes cv Chardonnay par *B. cinerea* est effectuée à l'aide d'une suspension conidienne de la souche 916T. Les conidies sont récoltées stérilement par lavage de la surface mycélienne âgée de 7 jours à l'aide de 2 x 20 mL de milieu malt-glucose (respectivement 5 g.L⁻¹ et 0,1 M). Après une centrifugation de 10 min à 3500 g et à 4°C, 38 mL de surnageant sont éliminés. La concentration de la suspension conidienne est alors déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez puis ramenée à 1000 conidies.μL⁻¹.

Les feuilles des plantes cultivées en serre sont inoculées par pulvérisation de la suspension conidienne, les feuilles témoins étant pulvérisées avec du milieu malt-glucose. Les plantes sont ensuite ensachées à l'aide de sacs en plastiques transparents perforés afin de favoriser un microclimat humide autour des feuilles. Des humidificateurs/ioniseurs (Alpatec, HU 60.1 ET, débit de vapeur : 9 L/j) sont placés devant chaque lot de plantes afin de maintenir une humidité relative la plus importante possible (Fig. 55). Parallèlement, 4 à 5 bassinages ponctuels du sol sont effectués tous les jours. Les feuilles d'une plante (témoin et infectée) sont prélevées toutes les 24 heures sur une cinétique allant de 0 à 15 jours post-inoculation. Celles-ci sont alors immédiatement congelées dans de l'azote liquide puis conservées à -80°C.

Après 21 jours de culture en système aéroponique, les feuilles de vigne sont inoculées avec la suspension conidienne par badigeonnage de la surface foliaire à l'aide d'un pinceau stérile. Après inoculation, les bacs d'aéroponie sont recouverts d'une cloche plastique transparente ce qui favorise le maintien d'une forte humidité propice au développement du champignon. Les feuilles de chaque condition sont prélevées à 0, 5, 10, 15, 24, 48 et 96 hpi, chaque point de la cinétique étant un mélange de feuilles de 3 plantes (sauf t0 pour lequel 2 plantes sont utilisées). Les feuilles sont immédiatement congelées dans de l'azote liquide avant d'être conservées à -80°C.

2.2. Infection des vitroplants de Chardonnay

2.2.1. Infection par *B. cinerea*

Contrairement aux vignes cultivées en serre et en aéroponie, les vitroplants sont inoculés avec la souche 112T de *Botrytis*. Les conidies sont récoltées stérilement par lavage de la surface mycélienne âgée de 7 jours à l'aide de 2 x 20 mL d'eau ultra-pure stérile. Après

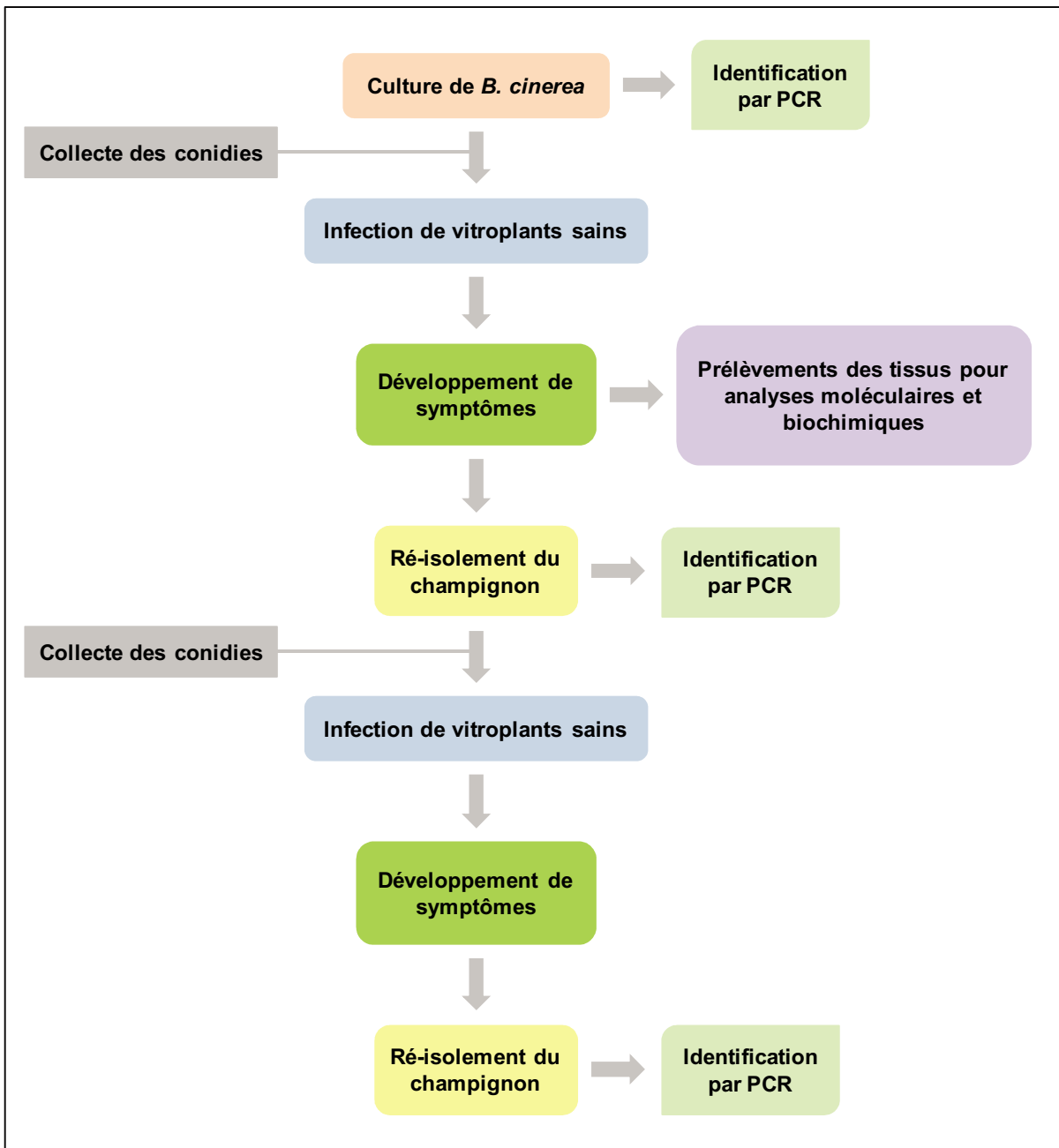


Figure 56 : Schéma du principe de vérification des postulats de Koch.

une centrifugation de 10 minutes à 3500 g et à 4°C, 38 mL de surnageant sont éliminés. La concentration de la suspension conidienne est alors déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez puis ramenée à 1000 conidies. μL^{-1} . Les conidies fraîchement récoltées sont ensuite laissées une nuit en pré-germination dans l'eau à 22°C et à l'obscurité.

Les vitroplants sont stérilement inoculés en bocal sous hotte à flux laminaire horizontal. La suspension conidienne est badigeonnée sur la surface foliaire à l'aide d'un pinceau stérile, les témoins étant traités avec de l'eau ultra-pure autoclavée (20 min à 120°C). Après fermeture des bocaux et ajout d'un film plastique autour des couvercles, ceux-ci sont placés sous un éclairage d'environ 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et soumis à une photopériode de 16 h de jour à 23 \pm 1°C / 8h de nuit à 18 \pm 1°C. Les feuilles ainsi que les tiges sont ensuite prélevées à 0, 2, 4, 8, 24, 48 et 96 hpi, chaque point de la cinétique étant un mélange de feuilles ou de tiges de 5 plantes (1 bocal). Le matériel prélevé est immédiatement congelé dans de l'azote liquide avant d'être conservé à -80°C.

2.2.2. Vérification des postulats de Koch

La vérification des postulats de Koch est effectuée afin de confirmer le rôle étiologique de *Botrytis* dans l'apparition des symptômes sur feuilles (Fig. 56). Ces postulats sont au nombre de 4 : (i) le micro-organisme doit être présent en abondance dans tous les organismes souffrant de la maladie, (ii) le micro-organisme doit pouvoir être isolé de l'organisme malade et cultivé *in vitro*, (iii) le micro-organisme cultivé doit entraîner l'apparition de la maladie lorsque introduit dans un organisme sain et (iv) le micro-organisme doit être à nouveau isolé du nouvel organisme hôte rendu malade puis identifié comme étant identique à l'agent infectieux original.

Après 96 heures d'infection, une feuille infectée et une feuille témoin sont stérilement prélevées à partir de vitroplants puis déposées en boîte de Pétri (9 cm) sur du milieu « Malt-Extract-Agar » (Oxoid, Ref. CM0059). Les boîtes sont placées sous un éclairage d'environ 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et soumis à une photopériode de 16 h de jour à 23 \pm 1°C / 8h de nuit à 18 \pm 1°C. Lorsque les ré-isolements sont positifs (feuilles initialement infectées uniquement), une croissance mycélienne caractéristique de *Botrytis* se propage à partir des tissus foliaires placés en culture. Après sporulation du mycélium, les conidies sont stérilement récoltées et ré-inoculées sur feuilles de vitroplants par badigeonnage à partir d'une suspension conidienne à 1000 conidies. μL^{-1} . Après développement d'une nouvelle série de symptômes sur feuilles, le champignon est de nouveau ré-isolé sur milieu « Malt-Extract-Agar ». Parallèlement aux ré-

Tableau 06 : Traitements appliqués aux cellules de Chardonnay en suspension.

Traitements	Volume de culture	Concentration	Témoins
Dialysat de culture de <i>B. cinerea</i>	30 mL	1,22 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Tampon mannitol
Endopolygalacturonase purifiée	15 mL	0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	H ₂ O ultra-pure stérile
Ergostérol	30 mL	2 μM	Ethanol 0,02%
<i>B. cinerea</i> (112T)	30 mL	90000 conidies.mL ⁻¹	H ₂ O ultra-pure stérile

isolement du champignon sur milieu gélosé, des tests d'identification formelle sont effectués par PCR.

2.2.3. Infection par *E. necator*

Les vitroplants de Chardonnay sont inoculés en bocaux, sous hotte à flux laminaire horizontal, à l'aide de disques foliaires oïdiés et sporulants. L'inoculation est délicatement effectuée par « tapotement » des disques sur la surface des feuilles des vitroplants. Pour des raisons de quantité d'inoculum et d'intensité de sporulation, les vignes sont inoculées par un mélange de trois souches d'oïdium : la souche S1 (âgée de 9 jours), la souche 145 (âgée de 9 jours) et la souche ESL33 (âgée de 20 jours). Considérant l'ensemble des disques foliaires utilisés, ces trois souches représentent respectivement 8%, 50% et 42% de l'inoculum total appliqué sur chaque plante. Après fermeture des bocaux et ajout d'un film plastique autour des couvercles, ceux-ci sont placés sous un éclairage d'environ $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et soumis à une photopériode de 16 h de jour à $23 \pm 1^\circ\text{C}$ / 8h de nuit à $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Les feuilles sont ensuite prélevées à 0, 1, 2, 3, 4, 7, 10 et 15 jours post-inoculation et immédiatement congelées dans de l'azote liquide avant d'être conservées à -80°C . Chaque point de la cinétique représente un mélange de feuilles de 5 plantes (1 bocal).

2.3. Infection et élicitation des cellules de vigne en suspension

Les cellules de vigne cv Chardonnay sont utilisées au 6^{ème} jour de culture dans le milieu Gamborg B5 et infectées/élicitées en fioles d'Erlenmeyers dans 15 ou 30 mL de culture. Les traitements sont effectués sous hotte à flux laminaire horizontal et récapitulés dans le tableau 06. Pour chaque traitement, les cellules sont récoltées à 0, 2, 4, 8 et 24 hpi, chaque point de la cinétique correspondant à une fiole d'Erlenmeyer de culture. Les cellules sont prélevées par filtration sous vide sur filtre en microfibre de verre GF/C (Whatman®, 42,5 mm) ; puis immédiatement congelées dans de l'azote liquide avant d'être conservées à -80°C .

3. Evolution des paramètres cultureux

3.1. Mesure de la croissance des cellules de Chardonnay

La croissance des cellules de Chardonnay est déterminée par une mesure quotidienne de la masse fraîche de cellules. Au terme de 7 jours de culture dans le milieu Gamborg B5 (Annexe 05), 14 fioles d'Erlenmeyers contenant 20 mL de milieu sont ensemencés avec

10 mL de suspension cellulaire. Les cultures « filles » sont alors placées sous agitation orbitale (115 rpm), à 22°C et à l'obscurité. Durant 13 jours, les cellules d'une fiole d'Erlenmeyer (30 mL) sont prélevées à heure fixe par filtration sous vide sur filtre en microfibre de verre GF/C (Whatman®, 42,5 mm); puis immédiatement pesées sur une balance (Sartorius *Basic* BA110S). La masse fraîche de cellule est exprimée en g.mL⁻¹. Parallèlement aux prélèvements des cellules, le milieu de culture filtré est également récolté afin de procéder à un dosage de sucres par HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance).

3.2. Dosage des sucres par HPLC

Au cours de la cinétique de croissance des cellules de Chardonnay (de J0 à J13), le milieu de culture est récolté après filtration sous vide des cellules. Les échantillons de milieux sont conservés à -20°C jusqu'à leur analyse par HPLC. Après décongélation, les milieux sont centrifugés 30 minutes à 16600 g, 4°C avant d'être filtrés sur une membrane de cellulose régénérée hydrophile de 0,22 µm (Fisher, 5174C). Vingt µL de chaque échantillon sont ensuite injectés dans une colonne (Aminex HPX-87C, 300 x 7,8 mm, 125-0095, Bio-Rad) et les sucres détectés à l'aide d'un réfractomètre différentiel IOTA2 (Refractive Index Detector 475, Kontron Instruments). Leur identification est effectuée grâce à des échantillons standards constitués, entre autres, de saccharose, glucose et de fructose. Pour chaque point de la cinétique, des triplicatas sont effectués et la concentration en sucres est exprimée en mM.

3.3. Mesure de l'osmolarité du milieu de culture

L'osmolarité est mesurée dans le milieu de culture des cellules de Chardonnay récolté au cours de leur croissance (de J0 à J13). Pour cela, 10 µl de milieu sont déposés sur un disque de papier (Wescor®, SS-033) puis introduit dans la chambre de mesure d'un osmomètre à tension de vapeur (VAPRO™ 5520, Wescor®). Pour chaque point de la cinétique, des triplicatas sont effectués et l'osmolarité est exprimée en mmol.kg⁻¹.

3.4. Mesure du pH au cours de la croissance cellulaire

Le pH du milieu de culture des cellules de Chardonnay est mesuré sur un volume de 20 mL après filtration sous vide des cellules. Celui-ci est déterminé par un pH-mètre UviLight PC2 (Secomam®) après un étalonnage à l'aide de solutions tampons commerciales de pH 4 ; 7 et 10 (BioBlock Scientific).

4. Méthodes de biologie moléculaire

4.1. Extraction, synthèse et purification d'acides nucléiques

4.1.1. Extraction d'ADN génomique à partir de mycélium

L'identification de *Botrytis cinerea* par PCR nécessite l'extraction d'ADN génomique. La méthode utilisée est celle de Moller *et al.* (1992) modifiée par Martinez *et al.* (2008). L'ADNg fongique est extrait à partir des mycéliums de *B. cinerea* et *A. brassicae* (témoin négatif), issus de boîte de culture mère ou à partir de ré-isolements effectués à partir de feuilles infectées. Le mycélium est récolté par « raclage » modéré à la surface du milieu de culture en prenant soin de ne pas prélever de gélose. Entre 30 et 50 mg de mycélium sont introduits en tubes Eppendorf® de 2 mL et placés à -80°C pendant 30 minutes minimum avant d'être lyophilisés une nuit à -30°C à l'aide d'un lyophilisateur LABCONCO (Ref. 794803, Kansas City, USA). Après la lyophilisation, le mycélium est alors broyé en fine poudre à l'aide d'un petit mortier puis transféré en tubes Eppendorf® de 2 mL. Un mL de tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl pH 8 ; 10 mM EDTA pH 8, 2% SDS (v/v)) est alors ajouté à la poudre puis incubé à 55°C pendant 10 minutes en prenant soin d'agiter vigoureusement les tubes au terme des 5 premières minutes d'incubation. Les polysaccharides sont ensuite éliminés par un ajout de 65 µL de CTAB 10% et 140 µL de NaCl 5 M. Les tubes sont incubés 10 minutes à 65°C avant l'ajout de 700 µL de phénol/chloroforme/alcool isoamilique (25 : 24 : 1 ; v/v/v). Après une émulsion de quelques secondes, une centrifugation de 10 minutes à 10000 g (4°C) est effectuée et le surnageant est récupéré en tubes propres et stériles. Ce dernier est alors émulsionné quelques secondes dans un volume de chloroforme/alcool isoamilique (24 : 1 ; v/v) puis centrifugé de nouveau 10 minutes à 10000 g, 4°C. Après collecte du surnageant, les acides nucléiques sont précipités entre 30 minutes et 1 heure à -20°C en présence d'1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3 M et de 2 volumes d'éthanol 96%. L'ADNg est ensuite sédimenté par une centrifugation de 30 minutes à 18200 g, 4°C ; puis les sels éliminés par un lavage du culot dans 500 µL d'éthanol 70%. Le culot est ensuite séché 15 minutes à 37°C avant d'être repris dans 50 à 100 µL d'eau ultra-pure stérile. Les tubes d'ADNg sont ensuite conservés à -20°C.

4.1.2. Extraction d'ADN génomique à partir de feuilles de vigne

L'ADN génomique est extrait à partir de feuilles de vitroplants de vigne cv Chardonnay prélevées puis broyées dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier. Environ 0,5 g de poudre de feuille sont placés en tube Eppendorf® de 2 mL et additionnés de 500 µL

de tampon d'extraction (1,4 M NaCl ; 55 mM CTAB ; 20 mM EDTA pH 8 ; 0,1 M Tris-HCl pH 8 ; 0,1 M PVP 40T et 5 mM DTT ajouté extemporainement). Les tubes sont mélangés par inversion puis placés 10 minutes à 65°C avant l'ajout d'un volume de chloroforme/alcool isoamilique (24 : 1 ; v/v). Après une émulsion de quelques secondes, les tubes sont centrifugés 5 minutes à 18200 g et à température ambiante. Le surnageant est ensuite récupéré, transféré en tubes stériles de 12 mL (Sarstedt) puis additionné d'un volume de tampon de précipitation (27 mM CTAB ; 10 mM EDTA pH 8 ; 50 mM Tris-HCl pH 8). Après un mélange par inversion et l'ajout de 2,5 volumes d'éthanol 96%, les acides nucléiques sont précipités 1 heure à -20°C. Au terme d'une heure de précipitation, les tubes sont centrifugés 10 minutes à 9500 g, 4°C et le surnageant éliminé. Le culot est alors repris dans 500 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8 ; 1 mM EDTA pH 8, 1 M NaCl), additionné d'un µL d'une solution de RNase à 1 mg.mL⁻¹ (0,08 unités ; Euromedex) et incubé 1 heure à 37°C. Les tubes sont ensuite placés 10 minutes à 65°C et leur contenu transféré en tubes Eppendorf® de 2 mL. Après ajout de 2,5 volumes d'éthanol 96%, les tubes sont centrifugés 20 minutes à 18200 g, 4°C. Le culot obtenu est alors lavé dans 500 µL d'éthanol 70% avant d'être séché 15 minutes à 37°C et repris dans de l'eau ultra-pure stérile.

4.1.3. Extraction d'ARNs totaux à partir de plantes et de cellules de vigne

Les ARNs totaux sont extraits à partir de matériel congelé à -80°C et broyé en fine poudre dans de l'azote liquide. La méthode utilisée dérive de celle de Chang *et al.* (1993) modifiée par Valtaud *et al.* (2009) et est employée sur différents types de tissus tels que les différents organes de vignes prélevés *in vitro*, en aéroponie, au vignoble ; les baies ainsi que les cellules de Chardonnay.

Cinq mL de tampon d'extraction préalablement chauffé à 65°C (55 mM CTAB ; 100 mM Tris-HCl pH 8 ; 25 mM EDTA pH 8 ; 2 M NaCl ; 3,44 mM spermidine ; 2% PVPP (p/v) ; 2% β-mercaptoéthanol (v/v)) sont ajoutés à 1 g de matériel végétal broyé. L'ensemble est incubé 5 à 10 minutes à 65°C en prenant soin d'agiter les tubes quelques secondes au terme des cinq premières minutes d'incubation. Les protéines sont alors éliminées par deux extractions successives au chloroforme/alcool isoamilique (24 : 1 ; v/v). Après addition d'un volume de chloroforme/alcool isoamilique et un mélange par inversion, les tubes sont centrifugés 15 minutes à 4900 g, 4°C. La phase aqueuse est délicatement prélevée et l'extraction au chloroforme/alcool isoamilique répétée une seconde fois. Les ARNs totaux sont spécifiquement précipités une nuit à 4°C en présence d'1/4 de volume de LiCl 10 M. Après une centrifugation de 30 minutes à 10000 g, 4°C, et élimination du surnageant, le culot

d'ARN est lavé dans 1 mL de LiCl 2 M, puis repris dans 500 µL de SDS 0,5% (v/v). Un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamilique (24 : 24 : 1 ; v/v/v) est alors ajouté dans l'extrait afin d'éliminer les protéines et les polysaccharides restants. Cette étape est souvent nécessaire lorsque les tissus proviennent de plantes ligneuses comme la vigne qui sont très riches en polysaccharides. Après un mélange par inversion, les tubes sont centrifugés 10 minutes à 18200 g, 4°C, et le surnageant est collecté. Une extraction au chloroforme/alcool isoamilique (24 : 1) est alors réalisée afin d'éliminer les traces de phénol dans la phase aqueuse. Après une centrifugation de 10 minutes à 18200 g, 4°C, et collecte du surnageant, les acides nucléiques (ARNs) sont précipités 2 heures à -20°C en présence d'1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,3) et 2,5 volumes d'éthanol 96%. Les ARNs sont ensuite sédimentés par centrifugation 20 minutes à 18200 g, 4°C, puis le culot est lavé dans 500 µL d'éthanol 70%. Après un séchage 15 minutes à 37°C, les ARNs sont repris dans l'eau ultra-pure stérile.

4.1.4. Traitement à la DNase et purification des ARNs totaux

Les ARNs totaux extraits à l'aide de la méthode de Chang *et al.* (1993) modifiée sont très souvent contaminés par d'infimes quantités d'ADN génomique non détectable par électrophorèse mais par amplification par PCR. Afin d'éliminer cet ADNg contaminant, les ARNs totaux sont traités à la DNase I suivant les instructions du protocole « RNA Cleanup » (p56, 4^{ème} édition) du kit « RNeasy[®] Plant Mini Kit » (Qiagen). La digestion par la DNase I est effectuée sur colonne au cours de la purification suivant les instructions du protocole « Optional On-Column DNase Digestion with the RNase-Free DNase Set » (Qiagen, « Appendix D », p 69, 4^{ème} édition). Un total de 100 µg d'ARNs sont ainsi traités par 27,3 unités de DNase I pendant 15 minutes à température ambiante. En fin de purification, les ARNs sont repris dans 40 µL d'eau ultra-pure stérile et conservés à -80°C.

4.1.5. Synthèse d'ADN complémentaire à partir d'ARNs totaux

Les ADNc sont synthétisés par transcription inverse à partir de 2 µg d'ARNs totaux traités à la DNase I. Des oligodT (2 µM) sont ajoutés aux ARNs dans un volume final de 15 µL puis le mélange est dénaturé 10 minutes à 75°C avant d'être conservé sur glace. Sont alors ajoutés au mélange 0,8 mM de dNTPs, 4 mM de DTT, 40 unités de « RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor » (Promega), 200 unités d'enzyme « M-MLV reverse transcriptase » (Promega) ainsi que du tampon « RT Reaction Buffer » une fois concentré (10 mM Tris-HCl

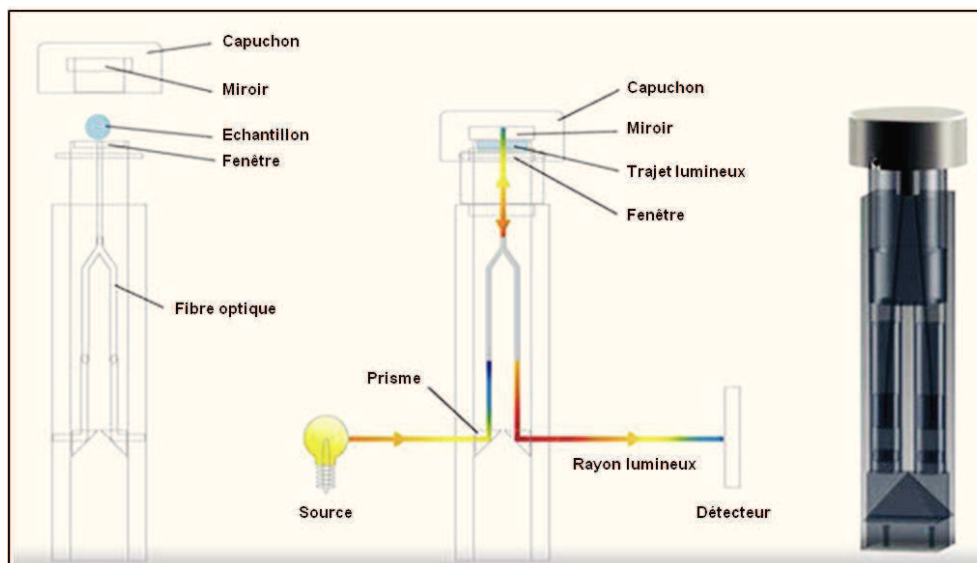


Figure 57 : Principe d'utilisation de la TrayCell pour le dosage des acides nucléiques par spectrophotométrie. La TrayCell (Hëllma®) permet un dosage sur de faibles volumes d'échantillons grâce à un système de renvoi basé sur la fibre optique.

Tableau 07 : Concentrations en agarose utilisées pour la séparation des acides nucléiques par électrophorèse en conditions non dénaturantes.

Dépôts	Concentration en agarose (p/v)
ADNg	0,8%
ADNc	1,2%
ARNs totaux	1,2%
Fragments 1000-2000 pb	0,9%
Fragments 200-1000 pb	1,2%
Fragments 90-200 pb	1,5%
Fragments < 90 pb	2,0%

pH 8,3 ; 15 mM KCl ; 0,6 mM MgCl₂ ; 2 mM DTT). La réaction est effectuée à 42°C pendant 1 heure avant d'être stoppée par une incubation de 10 minutes à 95°C. Les échantillons sont ensuite dilués 4 fois par ajout de 75 µL d'eau ultra-pure stérile puis utilisés (2,5 µL) comme matrice lors de l'amplification de fragments d'intérêt par PCR.

4.1.6. Dosage des acides nucléiques au spectrophotomètre

La concentration des acides nucléiques est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UviLight PC2 (Secomam) au travers de la mesure de l'absorbance (A) des échantillons. Les mesures sont effectuées à trois longueurs d'ondes : 260 nm (absorbance des acides nucléiques), 280 nm (absorbance des protéines) et 320 nm (absorbance utilisée comme ligne de base). Les dosages sont effectués à l'aide d'une cuve « TrayCell » (Hëllma[®], 105.800UVS) sur 5 µL d'échantillon dilué au 10^{ème} dans de l'eau ultra-pure stérile. Ce système de renvoi basé sur la fibre optique (Fig. 57) forme une chambre de mesure avec un parcours optique défini de 1 mm correspondant à une dilution virtuelle au 1/10^{ème}. Le capuchon et son miroir permettent ainsi le dosage sur de faible volume d'échantillon. La concentration est alors calculée de la façon suivante en tenant compte de la dilution virtuelle (x10) et de la dilution de l'échantillon (x10) :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}) = [(A_{260\text{nm}} - A_{320\text{nm}}) * 10 * 10 * R] / 1000$$

où R dépend de la nature des acides nucléiques dosés (ADN double brin : R = 50 ; ADN simple brin : R = 33 ; ARN : R = 40). Ce facteur correspond à la concentration d'acides nucléiques, en µg.mL⁻¹, pour laquelle une unité d'absorbance est égale à 1.

La pureté des échantillons est évaluée par le calcul du rapport A_{260nm}/A_{280nm}. Celle-ci est optimale pour un rapport compris entre 1,7 et 1,9 pour une solution d'ADN, et 1,9 et 2,1 pour une solution d'ARN.

4.1.7. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse en conditions non dénaturantes sur gel d'agarose est utilisée pour vérifier l'intégrité des acides nucléiques extraits ou amplifiés par PCR ainsi que l'homogénéité des dosages. Le gel est composé d'agarose (Eurobio) dissout dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-Acétate ; 1 mM EDTA pH 8) et dont la concentration est choisie en fonction de la taille des fragments à analyser (Tableau 07). Du bromure d'éthidium (BET) est ajouté dans le gel en fusion à raison de 0,5 µg.mL⁻¹ afin de visualiser les acides nucléiques sous lumière UV. Avant le chargement des puits, les échantillons sont additionnés d'1/10^{ème}

de volume de tampon de charge (50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; saccharose 50% (p/v) ; bleu de bromophénol 0,25% (p/v)) excepté pour les fragments amplifiés par PCR dans le tampon « Green GoTaq® Flexi Buffer » (contient déjà un tampon de charge). L'électrophorèse est réalisée dans un tampon TAE 0,5X (TAE 1X 50% (v/v) ; H₂O ultra-pure 50% (v/v)) sous une tension de 100V. Au terme de la migration, les bandes d'intérêt sont visualisées sous lumière UV (310 nm) et la taille des fragments est évaluée par comparaison avec un marqueur de taille (Smart Ladder, Eurogentec[®]).

4.2. La PCR : technique d'identification et d'amplification de fragments d'intérêt

4.2.1. Définition des amorces

La PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) permet l'amplification spécifique d'une séquence d'ADN à l'aide d'un couple d'amorces défini. La matrice peut être de l'ADN génomique, complémentaire ou plasmidique, apportée sous forme purifiée ou sous forme de pré-culture bactérienne. Les amorces sont définies à l'aide des logiciels Oligo 4.0 et Lasergene (Primer Select, DNASTAR, USA) chacune comprenant une vingtaine de nucléotides. Elles ne doivent pas former de dimer entre elles ni posséder de sites d'hybridation aspécifique sur la séquence matrice. La température d'hybridation (TM) des deux amorces d'un couple doit être la plus proche possible et peut être calculée de la façon suivante :

$$Tm (^{\circ}C) = [2 * (A+T) + 4 * (G+C)]$$

où A est le nombre d'adénines, T le nombre de thymines, G le nombre de guanines et C le nombre de cytosines.

Lorsque les deux TM d'un couple d'amorces ne sont pas identiques, la réaction de PCR est réalisée avec la TM la plus faible des deux amorces.

Les réactions de PCR sont effectuées dans un thermocycleur programmable TC-512 (TECHNE) ou *PCR Express* (Hybaid).

4.2.2. Identification de *B. cinerea*

L'identification de *B. cinerea* est réalisée par PCR afin de caractériser formellement le mycélium obtenu à partir des boîtes de culture mères ou à partir de ré-isolements issus de feuilles infectées en système *in vitro*. Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume réactionnel de 50 µL comprenant 50 ng d'ADNg fongique ; 0,4 µM de chaque amorce (Eurogentec[®]) ; 2 mM de MgCl₂ ; 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide (dNTPs) ; 1X de

Tableau 08 : Amorces utilisées pour l'identification de *B. cinerea* par PCR.

Nom	Séquence 5' → 3'	Amplicon (pb)	Références
C729 ⁺	AGC TCG AGA GAG ATC TCT GA	750	Rigotti <i>et al.</i> , 2002
C729 ⁻	CTG CAA TGT TCT GCG TGG AA		
FLIP2	CGG TGG TGT AAA GTG GTG CG	277	Martinez <i>et al.</i> , 2008
FABR	GTG CCA CCT AAG TTG AGT ACC CC		

Tableau 09 : Conditions de PCR utilisées pour l'identification de *B. cinerea*.

Amorces	Dénaturation initiale	Amplification			Elongation finale	
		Cycles	Dénaturation	Hybridation		
C729 ⁺ /C729 ⁻	2 min à 94°C	35	30 sec à 94°C	30 sec à 37°C	1 min à 72°C	10 min à 72°C
FLIP2/FABR	-	37	30 sec à 95°C	1 min à 69°C	1 min à 72°C	-

Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'amplification d'ADNc pleine longueur. Les numéros d'accension commençant par GSVIVP correspondent à la base de données Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr>) ; les autres à la base de données GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>).

Noms	Accessions	Fragments clonés	Amorces 5' → 3'	Amplicon (pb)	Références
<i>VvHT1</i>	CAA04511 GSVIVP00004559001	ATG → STOP	F : ATG CCG GCT GTC GGA GGC TT R : TCA TAC ATT CTT AAC AGG GT	1560	Fillion <i>et al.</i> , 1999 Vignault <i>et al.</i> , 2005
<i>VvHT5</i>	ABO37861 GSVIVP00019956001	ATG → STOP	F : ATG CCT GCT GGA GGA TTC G R : TTA TAA TTG GGA AGA AGG ATC G	1611	Hayes <i>et al.</i> , 2007
<i>VvTMT1</i> (= <i>VvHT6</i>)	AAX47312 GSVIVP00002919001	ATG → STOP	F : ATG AAC GGA GCT GTG CTA GTG GC R : TCA GTC ATT CTT TGC TGC AGT AAC C	2223	Vignault <i>et al.</i> , 2005
<i>VvSUC11</i> (= <i>VvSUT1</i>)	AAF08329 GSVIVP00015035001	ATG → STOP	F : ATG GCG GTC CCT GGG GG R : TCA TGT GTG GAC CCT GGA T	1506	Davies <i>et al.</i> , 1999 Ageorges <i>et al.</i> , 2000
<i>VvewINV1</i>	AAT09980 GSVIVP00034185001	ATG → STOP	F : ATG GCC ACC TCT TCT CAT R : TCA ATT GAT TTT AGC TTT CT	1728	Hayes <i>et al.</i> , 2007

tampon « 5X Green GoTaq® Flexi Buffer » et 3,75 unités de « GoTaq® Flexi DNA Polymerase » (Promega). Les amorces utilisées pour l'identification de *B. cinerea* sont celles décrites par Rigotti *et al.* (2002), C729⁺ et C729⁻ (Tableau 08), permettant l'amplification d'un produit de 750 pb. Le programme d'amplification à l'aide de ces deux amorces est décrit tableau 09. Un second test par PCR est réalisé à l'aide des amorces FLIP2 et FABR décrites par Martinez *et al.* (2008) afin d'amplifier un fragment du transposon *Flipper* (277 pb) caractéristique des souches « *transposa* » de *B. cinerea*. Le programme d'amplification utilisé à l'aide des deux amorces est décrit tableau 09.

4.2.3. Amplification de fragments d'ADN d'intérêt

Les ADN, gènes pleine longueur (ADNc) ou fragments de gènes utilisés au cours de ce travail comme sondes spécifiques, ont été amplifiés par PCR sur de l'ADNg ou de l'ADNc obtenu à partir de feuilles de vitroplants de vigne (cv Chardonnay).

La réaction PCR est réalisée dans un volume réactionnel final de 50 µL contenant environ 100 ng d'ADN matriciel ; 0,4 µM de chaque amorce (Eurogentec[®]) ; 2 mM de MgCl₂ ; 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide (dNTPs) ; 1X de tampon « 5X Green GoTaq® Flexi Buffer » et 3,75 unités de « GoTaq® Flexi DNA Polymerase » (Promega). Le programme d'amplification comporte les étapes suivantes : (i) une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, (ii) 30 cycles comprenant une dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 30 secondes à TM optimum et une étape d'élongation de X min à 72°C (1 minute.kb⁻¹), (iii) un cycle final d'élongation à 72°C pendant 7 minutes. Les amorces utilisées ont été définies sur des séquences issues des banques Genoscope et GenBank (<http://www.genoscope.cns.fr> ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ou directement issues de publications. Celles-ci sont listées dans les tableaux 10 à 14. Afin d'amplifier et cloner des sondes spécifiques des gènes d'intérêt (transporteurs de sucres, invertases, certains gènes de défenses), les amorces sont généralement définies dans la région 3'UTR (Untranslated Regions) des séquences, parties les plus divergentes. Pour l'amplification des sondes ADN correspondant aux PR-protéines, les amorces ont cependant été définies dans la séquence codante afin qu'une sonde puisse reconnaître (potentiellement) plusieurs isoformes d'une même famille (Eric Gomès, communication personnelle).

Tableau 11 : Amorces utilisées pour l'amplification des fragments de gènes codant pour des transporteurs de sucres utilisés en Northern blot et macroarray. Les numéros d'accèsion commençant par GSVIVP correspondent à la base de données Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr>) ; les autres à la base de données GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>).

Noms	Accessions	Fragments clonés	Amorces 5' → 3'	Amplicon (pb)	Références
<i>VvHT1</i>	CAA04511	UTR3'	F : TCA ACG ATG GTT CTT ACA GC	262	Fillion <i>et al.</i> , 1999
	GSVIVP00004559001		R : AAC CGA TAG TAT TGT ATT CG		Vignault <i>et al.</i> , 2005
<i>VvHT2</i>	AAT77693	UTR3'	F : GCG GTG TTG GTA CTG GTA C	371	Fillion <i>et al.</i> , 1999
	GSVIVP00015239001		R : GGA CTT GAG AAG GAA TTT AGC		Vignault <i>et al.</i> , 2005
<i>VvHT3</i> (= <i>VvHT7</i>)	ABO37859	UTR3'	F : CAC TTG GGT GGA CAG TTC C	400	Vignault <i>et al.</i> , 2005
	GSVIVP00005628001		R : GGA TTA TTT GAA GTT CAC CGA		Hayes <i>et al.</i> , 2007
<i>VvHT4</i>	ABO37860	UTR3'	F : ATT CGT GTA TTA TTT GCT GC	333	Hayes <i>et al.</i> , 2007
	GSVIVP00030854001		R : CGG GCA ATT TAC GAT CAT		
<i>VvHT5</i>	ABO37861	UTR3'	F : GGT GTG GAA GAA GCA TTG G	323	Hayes <i>et al.</i> , 2007
	GSVIVP00019956001		R : GGC ACA AGA ACA CAT ATA C		
<i>VvHT11</i>	GSVIVP00038182001	UTR3'	F : GGA AAG GCA ACC CAA AGT G R : CTA TTT ATT GTA ATT TGA ATG C	187	
<i>VvHT12</i>	GSVIVP00019953001	UTR3'	F : AGA TGA GCT AGT GGC ACA AC R : AGA TAT CAT GGT GGA TGG	224	
<i>VvHT13</i>	GSVIVP00016689001	UTR3'	F : GGA CTA CTC TAT TGA AAT CC R : GGA AAT TCT TTG TTT ATA CTG C	139	
<i>VvTMT1</i> (= <i>VvHT6</i>)	AAX47312	UTR3'	F : TGA CTG AAT GCG GGG GAA GC	109	Vignault <i>et al.</i> , 2005
	GSVIVP00002919001		R : CGA CCA TCA AAA TAT CCA C		
<i>VvTMT2</i>	GSVIVP00036283001	UTR3'	F : TTT CGA TTC AGA TGC TCC R : CAT CAG AGA GCC CCT GAA AG	240	
<i>VvTMT3</i>	GSVIVP00019321001	UTR3'	F : CAT CCT GGA ACT GCC GGG R : CAT CAA AGA ATG CTG AGC	230	
<i>VvpGIT</i>	AAU07980	UTR3'	F : CCG TCT GTC TTC TTG CTG TC	262	Vignault <i>et al.</i> , 2005
	GSVIVP00038247001		R : CCA AAC ATA TAC CCG CAA AAG		
<i>VvSUC11</i> (= <i>VvSUT1</i>)	AAF08329	UTR3'	F : CCA TGG GAT CAA CTT TTT G	191	Davies <i>et al.</i> , 1999
	GSVIVP00015035001		R : CAT TTT ACC ACC CAT ATT GAT		Ageorges <i>et al.</i> , 2000
<i>VvSUC12</i>	AAF08330	UTR3'	F : GGA TGC TTT ATT TGG TGG A R : AGC ACA AGG CAT CAA AGC	396	Davies <i>et al.</i> , 1999
<i>VvSUC27</i>	AAF08331	UTR3'	F : TGT AGT GGG TGC GTT TGC R : GAT GAC CGT GGG CTC TAC A	369	Davies <i>et al.</i> , 1999
<i>VvSUT2</i>	AAL32020	UTR3'	F : CTG AAT CGA AGA GTT GGA G R : CTT GTC TCA GCA CTT GGC	326	Picaud <i>et al.</i> , 2001
<i>VvPMT1</i>	GSVIVP00010278001	UTR3'	F : AGC GTG CTT ATG CTG AAC CAC R : AGG GCT AGA GAC AAA CTA TAA	332	
<i>VvPMT2</i>	GSVIVP00016743001	UTR3'	F : AAC CCT TAC TTA CCG ATA G R : GGG ATC GAC GGA CAC CTG ATA	308	
<i>VvPMT3</i>	GSVIVP00024964001	UTR3'	F : CGT TTT ATA CTG GTT TAT TG R : AGT GAA GCC GCA TAT GCT	310	
<i>VvPMT4</i>	GSVIVP00025836001	UTR3'	F : AAG TTT CAT TTT ATG AGC TAA R : GCC AGT GAC TGG AAC AGC CAG	243	
<i>VvPMT5</i>	GSVIVP00036419001	UTR3'	F : AGA AGA AGT CAT GTA CTA AC R : TTC ATT CCA TAT TCA GCC CC	222	

Tableau 12 : Amorces utilisées pour l'amplification des fragments de gènes codant pour des invertases utilisés en Northern blot et macroarray. Les numéros d'accèsion commençant par GSVIVP correspondent à la base de données Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr>) ; les autres à la base de données GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>).

Noms	Accessions	Fragments clonés	Amorces 5' → 3'	Amplicon (pb)	Références
<i>VvcwINV1</i>	AAT09980 GSVIVP00034185001	UTR3'	F : CCT ACA TTG GCT ATT GAC R : CTA GGT AAC AAA AGA AAC TG	254	Hayes <i>et al.</i> , 2007
<i>VvcwINV2</i>	GSVIVP00021585001	UTR3'	F : CCA GAT CCA AAA TAA AAA AG R : CAT CGT ATG GTG AGA AAT TC	212	
<i>VvcwINV3</i>	GSVIVP00032195001	UTR3'	F : GCA TTT AAC AGT GGA AAT R : AAG ACT ATT TTA CCC CTA	253	
<i>VvcwINV4</i>	GSVIVP00032196001	UTR3'	F : GAA AGC TGA GAT TGT TCC TAC R : GCA TCA AAA TCT TCA TAA ATT GC	241	
<i>VvGIN1</i>	AAB47171 GSVIVP00029907001	UTR3'	F : CCT CTT CAA CAA TGC CAC TG R : CAC AGG ACT CGG GGG ATT TC	190	Davies & Robinson, 1996
<i>VvGIN2</i>	AAB47172 GSVIVP00004764001	UTR3'	F : CCC CTA CTC ATC CCA TCA R : TGA AGA AAT AGA GCA AAG C	295	Davies & Robinson, 1996

Tableau 13 : Amorces utilisées pour l'amplification des fragments de gènes codant pour des protéines de défenses utilisés en Northern blot et macroarray. Les numéros d'accèsion commençant par GSVIVP correspondent à la base de données Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr>) ; les autres à la base de données GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>).

Noms	Accessions	Fragments clonés	Amorces 5' → 3'	Amplicon (pb)	Références
<i>VvPR1</i>	GSVIVP00038582001	partie de séquence codante	F : GTT GGC GTT GGG TCT ATG R : CAT AGT TGC CCG GTG GAT C	340	
<i>VvPR3</i>	GSVIVP00036222001	partie de séquence codante	F : CTT CCC GGT TTT GGT GTT AT R : AGC AGA AAG CAT ACA GCA AC	216	
<i>VvPR5</i>	GSVIVP00014680001	partie de séquence codante	F : CAC TGA ACT GCA TCG GTG G R : AAC CAC CGA ACC TGA ATC AG	233	
<i>VvPR6</i>	GSVIVP00023307001	partie de séquence codante	F : TAT ACT ATC TAA CCC TGG AAG R : GTC CAT TAC CTT GTT TAA CAC	168	
<i>VvPR7</i>	GSVIVP00001055001	partie de séquence codante	F : CTG CCG ATC TTC ACA ACC TT R : TCA GCG TTC GGT TCA CAA TC	213	
<i>VvPR9</i>	GSVIVP00037458001	partie de séquence codante	F : ACA CCA AAA GCC CTA CAA CT R : CGG CCT ATA TGA CTC AGT TG	258	
<i>VvPR10</i>	GSVIVP00033078001	partie de séquence codante	F : CAC TGT GGT TGA CGG AGA T R : CTA TTG AAG CCT ACG TCC TG	208	
<i>VvBIG8.1</i>	AF487826	UTR3'	F : GTT TAT GTG GCT GGT TTG R : CGC TAT AAT TTC ATT ATT AG	319	Bézier <i>et al.</i> , 2002
<i>VvPGIP</i>	AF305093	UTR3'	F : GTT GGA CCT TTC GCA TAA C R : TCC GTT TCA TTT ATT TTA GG	287	Bézier <i>et al.</i> , 2002
<i>VvPAL</i>	GSVIVP00013930001	UTR3'	F : CAC CCT TGC ACA TAC TCT R : TCA TTT TAT TAG AGG AGC G	297	

Tableau 14 : Amorces utilisées pour l'amplification des fragments de gènes de référence utilisés en Northern blot et macroarray. Les numéros d'accèsion correspondent à la base de données GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>).

Noms	Accessions	Fragments clonés	Amorces 5' → 3'	Amplicon (pb)	Références
<i>VvEF1α</i>	BQ799343	partie de séquence codante	F : GAA CTG GGT GCT TGA TAG GC R : AAC CAA AAT ATC CGG AGT AAA AGA	150	Terrier <i>et al.</i> , 2005
<i>VvEF1γ</i>	AAD54312	partie de séquence codante	F : AGC TTT TAC CGC GGG CAA GAG ATA CC R : TTT GGA TAG GTA ACG TAT CAC TTA AA	316	Pratelli <i>et al.</i> , 2002
<i>VvACT1</i>	AAK54158	partie de séquence codante	F : AGC TGG AAA CTG CAA AGA GCA G R : ACA ACG GAA TCT CTC AGC TCC A	95	Bonomelli <i>et al.</i> , 2004
<i>VvGAPDH</i>	CB973647	partie de séquence codante	F : CGA CCA TTG TTA CTG CTG T R : GAA ATC CAG GGG CAA AAC	377	Reid <i>et al.</i> , 2006

4.3. Technique de clonage

4.3.1. Purification des fragments d'intérêt

Après l'amplification par PCR et migration sur gel d'agarose, la bande correspondant au fragment d'intérêt est découpée puis purifiée à l'aide du kit « Wizard[®]SV Gel Clean-Up System » (Promega). L'éluion finale est effectuée par centrifugation (3 minutes, 18200 g) avec 30 µL d'eau ultra-pure stérile. L'éluât est ensuite redéposé sur la colonne puis centrifugé de nouveau afin de récupérer un maximum d'ADN.

4.3.2. Ligature des fragments d'intérêt dans le pGEM[®]-T Easy

La réaction de ligature est effectuée dans le pGEM[®]-T Easy (Promega) dans un volume réactionnel de 20 µL comprenant 50 ng de vecteur, 1X de tampon « 2X Rapid Ligation Buffer » (50 mM Tris-HCl pH 7,6 ; 10 mM MgCl₂ ; 1 mM ATP ; 1 mM DTT, 5% PEG 8000), 3 unités de T4 DNA ligase (Promega) ainsi qu'une quantité d'ADN purifié (insert). Cette quantité en insert est ajoutée afin d'obtenir un rapport molaire insert/vecteur de 3 : 1 ; elle peut être calculée de la façon suivante :

$$\text{Insert}_{(\text{ng})} = [(\text{Insert}_{(\text{pb})} * \text{vecteur}_{(\text{ng})}) / \text{vecteur}_{(\text{pb})}] * R_{(\text{insert} : \text{vecteur})}$$

où le vecteur = 50 ng, 3015 pb et R = 3

Le mélange est ensuite incubé une nuit à 16°C.

4.3.3. Transformation de bactéries

4.3.3.1. *Préparation de bactéries thermocompétentes*

Avant la transformation des bactéries par choc thermique, celles-ci sont rendues thermocompétentes. La souche d'*E. coli* (XL1-blue ou DH5α) est striée sur du milieu Liuria-Bertani (LB) sans antibiotique (10 g.L⁻¹ tryptone ; 5 g.L⁻¹ d'extraits de levures ; 85,5 mM NaCl ; 15 g.L⁻¹ agar bactériologique de type E ; pH 7) puis incubée une nuit à 28°C. Une colonie est ensuite stérilement ensemencée dans 10 mL de milieu SOB (20 g.L⁻¹ tryptone ; 5 g.L⁻¹ d'extraits de levures ; 10 mM NaCl ; 2,5 mM KCl ; 5 mM MgCl₂ ; 5 mM MgSO₄) et la pré-culture incubée une nuit à 28°C sous agitation orbitale (200 rpm). Huit mL de pré-culture sont alors ensemencés dans 200 mL de milieu SOB puis placés à 28°C sous agitation jusqu'à ce que l'absorbance (A_{600nm}) de la culture bactérienne atteigne une valeur située entre 0,6 et 0,8. Les bactéries sont alors sédimentées par centrifugation 15 minutes à 900 g, 4°C (Hermle) dans 4 tubes stériles de 50 mL. Après élimination du surnageant, chaque culot bactérien est re-suspendu dans 17,5 mL de tampon TB froid (10 mM PIPES ; 15 mM CaCl₂ ; 250 mM KCl ;

55 mM MnCl₂ ; pH 6,7). Après rassemblement des cultures deux à deux, celles-ci sont placées 10 minutes à 4°C puis de nouveau centrifugées 10 minutes à 900 g, 4°C. Les deux culots obtenus sont alors repris dans 8 mL de tampon TB froid puis rassemblés dans un même tube. 1,2 mL de DMSO sont alors délicatement ajoutés à la culture tout en agitant légèrement. Les bactéries sont alors placées 10 minutes à 4°C avant d'être aliquotées en fractions de 100 µL puis congelées dans de l'azote liquide. Les aliquots sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

4.3.3.2. Transformation de bactéries par choc thermique

Les bactéries thermocompétentes (100 µL) sont décongelées sur glace avant l'ajout de 2 µL de réaction de ligation et 3 µL de DMSO. Celles-ci sont laissées 10 minutes sur glace avant de subir un choc thermique d'une minute à 42°C. Après une nouvelle incubation de 5 minutes sur glace, 1 mL de milieu SOC (20 g.L⁻¹ tryptone ; 5 g.L⁻¹ d'extraits de levures ; 10 mM NaCl ; 2,5 mM KCl ; 10 mM MgCl₂ ; 10 mM MgSO₄ ; 20 mM glucose) est stérilement ajouté aux suspensions bactériennes avant d'incuber les cultures 1 heure à 37°C sous agitation (200 rpm). Environ 30 minutes avant l'étalement des bactéries, 2 mg d'IPTG (50 µL à 40 mg.mL⁻¹) et 1 mg de X-gal (50 µL à 20 mg.mL⁻¹) sont étalés sur du milieu LB solide (10 g.L⁻¹ tryptone ; 5 g.L⁻¹ d'extraits de levures ; 85,5 mM NaCl ; 15 g.L⁻¹ agar bactériologique de type E ; pH 7) additionné de 1 mg.L⁻¹ d'ampicilline. 100 µL de culture bactérienne sont alors étalés sur le milieu LB + ampicilline + IPTG + X-gal avant une incubation d'une nuit à 37°C. Les colonies de bactéries qui ont intégré le plasmide et son insert apparaissent alors blanches (Matériels et Méthodes, § 1.5.1.).

4.3.3.3. Transformation de bactéries par électroporation

La transformation des bactéries par électroporation est souvent requise pour les grosses constructions (vecteur + insert). Les bactéries sont rendues électrocompétentes par un traitement au froid (Sambrook *et al.*, 1989). Après décongélation, 40 µL de bactéries électrocompétentes sont incubés 1 minute dans la glace en présence de 4 µL de réaction de ligation. Après transfert du mélange dans une cuve d'électroporation, une brève impulsion électrique (4,5 msec ; 2,5 kV ; 25 µF ; 200 Ω) est appliquée à l'aide d'un électroporateur Gene Pulser (BioRad). Cette dernière provoque une désorganisation momentanée de l'enveloppe bactérienne et la formation réversible de pores par lesquels entrent les plasmides. Après l'impulsion électrique, les bactéries sont immédiatement additionnées d'1 mL de milieu

SOC (20 g.L⁻¹ tryptone ; 5 g.L⁻¹ d'extraits de levures ; 10 mM NaCl ; 2,5 mM KCl ; 10 mM MgCl₂ ; 10 mM MgSO₄ ; 20 mM glucose), transférées en tube Eppendorf® puis placées en culture pendant 1 heure à 37°C sous agitation (200 rpm). La culture bactérienne est ensuite étalée (100 µL) sur du milieu LB (10 g.L⁻¹ tryptone ; 5 g.L⁻¹ d'extraits de levures ; 85,5 mM NaCl ; 15 g.L⁻¹ agar bactériologique de type E ; pH 7) additionné de 1 mg.L⁻¹ d'ampicilline, de 2 mg d'IPTG (50 µL à 40 mg.mL⁻¹) et de 1 mg de X-gal (50 µL à 20 mg.mL⁻¹). Les cultures sont incubées une nuit à 37°C.

4.3.4. Minipréparation d'ADN plasmidique

Les minipréparations sont effectuées à partir de cultures bactériennes. Pour cela, les colonies blanches d'*E. coli* sélectionnées grâce au crible blanc/bleu (Matériel et Méthodes, § 1.5.1.) sont placées en culture dans 3 mL de milieu LB additionné d'ampicilline (1 mg.L⁻¹) pendant une nuit à 37°C, sous agitation (200 rpm). Les bactéries de la culture sont ensuite sédimentées par une centrifugation de 5 minutes à 10000 g, 4°C, puis le surnageant est éliminé. L'extraction de l'ADN plasmidique est alors effectuée à partir du culot obtenu à l'aide du kit « High Pure Plasmid Isolation Kit » (Roche). L'élution finale est réalisée avec 50 µL d'eau ultra-pure stérile par centrifugation (1 minute à 18200 g, 4°C). La présence et la qualité des inserts clonés sont alors vérifiées par PCR.

4.3.5. Vérification de l'intégration de l'insert

Afin de vérifier que la séquence d'intérêt est bien présente au niveau du site multiple de clonage (MCS), une amplification par PCR est réalisée sur 0,1 µL de minipréparation plasmidique. Cette réaction de PCR est effectuée dans un volume réactionnel de 20 µL comprenant 0,4 µM de chaque amorce (Eurogentec®) ; 2 mM de MgCl₂ ; 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide (dNTPs) ; 1X de tampon « 5X Green GoTaq® Flexi Buffer » et 1,5 unités de « GoTaq® Flexi DNA Polymerase » (Promega). Les amorces utilisées sont les deux amorces T7 et SP6 situées de part et d'autre du MCS, respectivement à 79 et 99 pb. Le programme d'amplification comporte les étapes suivantes : (i) une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, (ii) 30 cycles comprenant une dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 30 secondes à 52°C et une étape d'élongation de X min à 72°C (1 minute.kb⁻¹), (iii) un cycle final d'élongation à 72°C pendant 7 minutes. Le produit d'amplification est déposé sur gel d'agarose et soumis à une électrophorèse (Matériel et

Méthode, § 4.1.7.). La construction (plasmide + insert) est séquencée si le produit amplifié est à la taille attendue (taille de l'insert + 178 pb).

4.3.6. Séquençage des clones d'intérêt

Afin de comparer les séquences clonées à celle attendues, un séquençage systématique des fragments amplifiés est effectué. Le séquençage est réalisé à l'IBMIG (Institut de Biologie Moléculaire et d'Ingénierie Génétique ; Université de Poitiers) à l'aide d'un séquenceur ABI Prism Applied Biosystem 3130 Avant Analyser. Pour se faire, deux étapes sont nécessaires : une réaction d'amplification des fragments par PCR et une purification des produits amplifiés.

4.3.6.1. *Amplification des fragments à séquencer*

L'amplification est réalisée à l'aide du kit « Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit » (Applied Biosystems) dans un volume réactionnel de 5 µL comprenant environ 100 ng d'ADN plasmidique ; 2 µM d'amorce et 2 µL de tampon v3.1. Le mélange est placé dans un thermocycleur (Hybaid *PCR Express*) et soumis au programme suivant : 1 minute de dénaturation initiale à 95°C suivie de 30 cycles comprenant 30 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 50°C et 4 minutes d'élongation à 60°C. Chaque clone est amplifié par deux réactions PCR indépendantes : une utilisant l'amorce T7 et l'autre utilisant l'amorce SP6, toutes deux situées sur le plasmide (pGEM[®]-T Easy) de part et d'autre du site multiple de clonage (MCS).

4.3.6.2. *Précipitation et purification des fragments à séquencer*

Le volume de la réaction est complété à 40 µL avec de l'eau ultra-pure stérile puis additionné de 1,5 volume d'isopropanol. Le mélange est incubé 10 minutes à température ambiante afin de précipiter les acides nucléiques puis centrifugé 20 minutes à 18200 g. Après élimination du surnageant, le culot obtenu est lavé par 250 µL d'éthanol 70% puis centrifugé de nouveau dans les mêmes conditions. Le culot est ensuite séché 20 à 30 minutes à 37°C puis repris dans 20 µL de formamide désionnifiée. Les échantillons sont alors placés 3 minutes à 100°C avant d'être congelés à -20°C ou directement injectés dans le séquenceur.

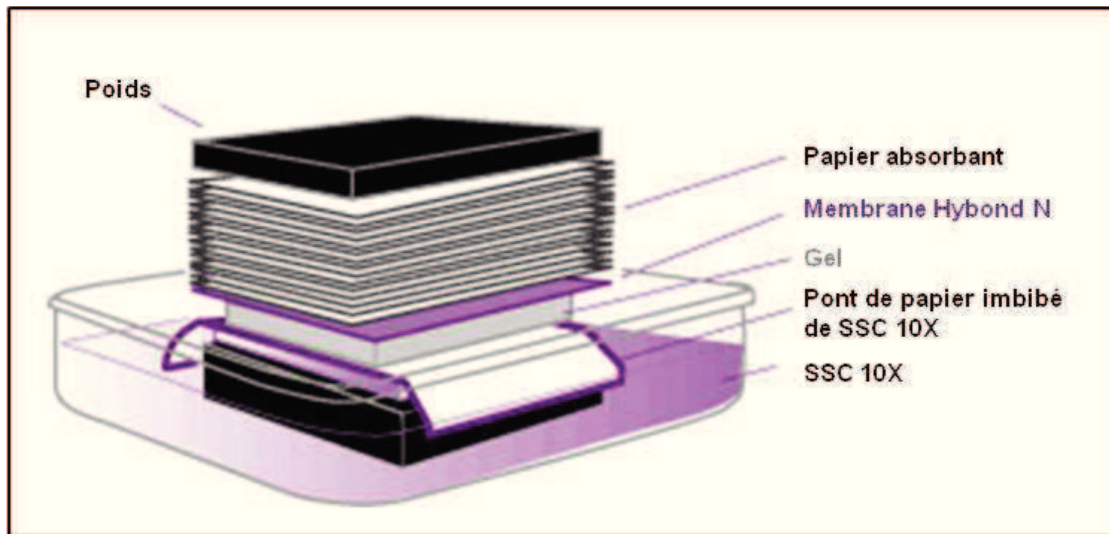


Figure 58 : Système de transfert par capillarité des ARNs sur la membrane de nylon. Les ARNs sont entraînés du gel vers la membrane par un flux passif de tampon (SSC 10X).

5. Etude de l'expression de gènes d'intérêt

5.1. Analyse par Northern blot

5.1.1. Séparation des ARNs totaux en conditions dénaturantes

Vingt µg d'ARN totaux sont complétés à 20 µL avec de l'eau ultra-pure stérile puis additionnés de 25 µL de tampon de solubilisation (23,5 M formamide ; 2,3 M formaldéhyde ; 29,4 mM MOPS ; 7,35 mM Acétate de sodium ; 1,47 mM Na₂-EDTA ; 8,82% (v/v) tampon de charge (50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; saccharose 50% (p/v) ; bleu de bromophénol 0,25% (p/v)). Les tubes sont placés à 65°C pendant 10 minutes afin d'éliminer les structures secondaires, puis conservés sur glace pendant 10 minutes. La formamide présente dans le tampon permet de maintenir la linéarité des ARNs. Les ARNs dénaturés sont ensuite séparés sur gel en conditions dénaturantes (1,2% (p/v) agarose ; MEN 1X (20 mM MOPS ; 5 mM Acétate de sodium ; 1 mM Na₂-EDTA ; pH 7) ; 2,4 M formaldéhyde) dans du tampon MEN 1X. L'électrophorèse est réalisée à 110 V pendant environ 5 heures.

5.1.2. Transfert des ARNs sur membrane de nylon

Après un bain de 15 minutes dans de l'eau ultra-pure suivi d'un second bain de 15 minutes dans du tampon SSC 10X (1,5 M NaCl ; 0,15 M Citrate trisodique ; pH 7), les ARNs sont transférés par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond™- N, GE Healthcare) avec du tampon SSC 10X, pendant une nuit. La migration du tampon est assurée par un « pont » de papier Whatman® situé sous le gel, et par la superposition de papiers Whatman® et de papiers absorbants (ouate blanche, Argos) placés au dessus de la membrane (Fig. 58). Le flux passif de tampon permet l'entraînement des ARNs, ceux-ci étant retenus sur la membrane par des liaisons électrostatiques. Après transfert, les ARNs sont fixés de façon covalente par chauffage 2 heures à 80°C puis colorés par un bain de 10 minutes dans de l'acide acétique 5% (v/v) suivi d'un bain de 5 minutes dans une solution de bleu de méthylène (0,5 M Acétate de sodium ; 0,04% (p/v) bleu de méthylène, pH 5,2). Cette coloration (ARN ribosomiques) permet de vérifier l'homogénéité des dépôts ainsi que leur intégrité. Après plusieurs lavages de la membrane à l'eau ultra-pure, celle-ci est séchée à température ambiante et hermétiquement conservée à 4°C.

5.1.3. Synthèse de fragments « sondes » radioactifs

Les fragments d'intérêt clonés sont amplifiés par PCR, séparés sur gel d'agarose par électrophorèse puis purifiés à l'aide du kit « Wizard®SV Gel Clean-Up System » (Promega).

Après dosage, les fragments « sondes » sont radiomarqués avec du [α - 32 P]-dCTP à l'aide du kit « Prime-a-Gene[®] Labeling System » (Promega). Trente ng d'ADN sont dénaturés 3 minutes à 100°C puis immédiatement placés dans la glace. Le mélange réactionnel est alors ajouté, comprenant 1X de tampon « Labeling Buffer » ; 20 μ M de chaque dNTP (sauf dCTP) ; 0,33 μ M de [α - 32 P]-dCTP (1,85 MBq) et 5 unités de « DNA polymerase I Large Klenow Fragment ». La réaction est effectuée dans un volume de 50 μ L, à 25°C pendant un minimum de 2 heures. Les sondes sont alors purifiées sur colonne GE 50 Illustra[™] ProbeQuant[™] (GE Healthcare) afin d'éliminer des dNTPs non incorporés. Le pourcentage d'incorporation de la radioactivité est estimé à l'aide d'un compteur Geiger de la façon suivante :

$$\% \text{ d'incorporation} = \frac{\text{Coups émis par la sonde purifiée}_{(\text{cps})}}{\text{Coups émis par la sonde purifiée}_{(\text{cps})} + \text{la colonne}_{(\text{cps})}} * 100$$

où cps = coups par seconde.

Les sondes radioactives sont dénaturées 5 minutes à 100°C avant d'être incorporées au tampon d'hybridation.

5.1.4. Hybridation, lavages et exposition des membranes

Afin de saturer les sites aspécifiques des membranes, ces dernières sont pré-hybridées en tube dans 20 mL de tampon Church (0,25 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ pH 7,2 ; 1 mM Na₂EDTA ; 7% SDS (p/v) et 1% BSA (p/v)) pendant 2 heures à 65°C sous rotation lente. Au terme de la pré-hybridation, les membranes sont hybridées dans 20 mL de tampon Church additionnée des 50 μ L de sonde radiomarquée dénaturée. L'hybridation des membranes est effectuée pendant une nuit à 65°C sous agitation lente.

Après une nuit d'hybridation, les membranes sont lavées à 65°C (i) 15 minutes dans du SSC 2X, 0,1% SDS, (ii) 15 minutes dans du SSC 1X, 0,1% SDS et (iii) 15 minutes dans du SSC 0,5X, 0,1% SDS. Après ce dernier lavage, les membranes sont déposées sur un papier Whatman[®] imbibé de SSC 2X puis emballées hermétiquement dans un sac plastique thermo-soudé.

Les membranes sont ensuite placées dans une cassette et exposées pendant 16 heures sur un écran « Storage Phosphor Screen » (Molecular Dynamics). La révélation des signaux est effectuée à l'aide d'un scanner Typhoon TRIO Imager puis l'intensité de ces derniers est quantifiée à l'aide du logiciel ImageQuant 5.2 (GE Healthcare). La méthode utilisée pour la

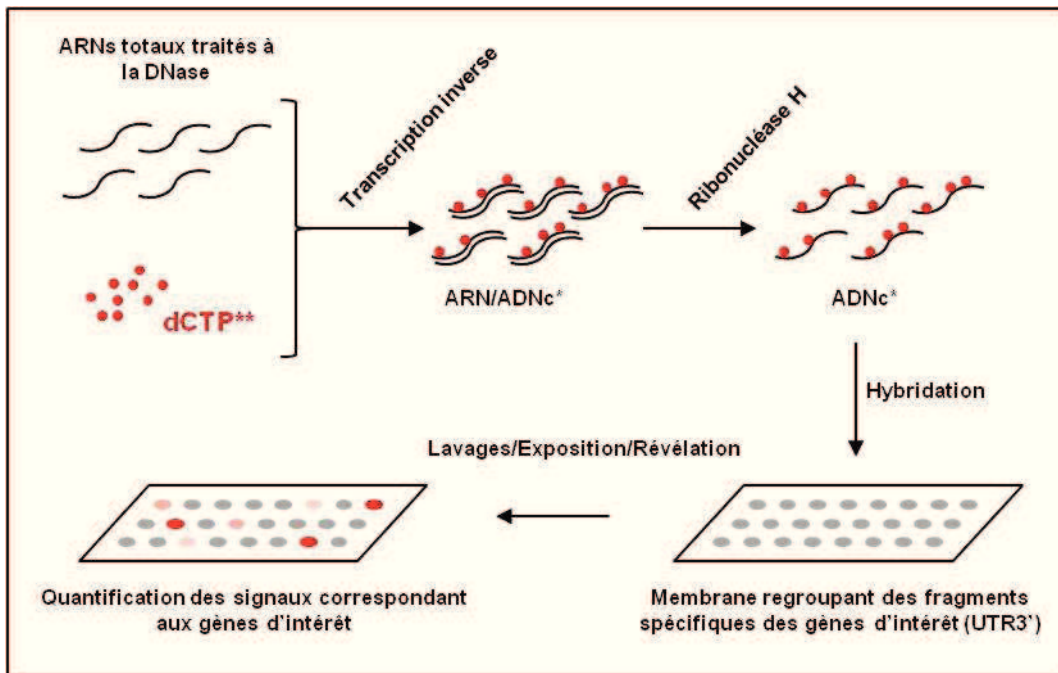


Figure 59 : Principe d'hybridation d'une membrane macroarrays. La technique de macroarrays permet de cribler l'expression de plusieurs gènes en une hybridation.

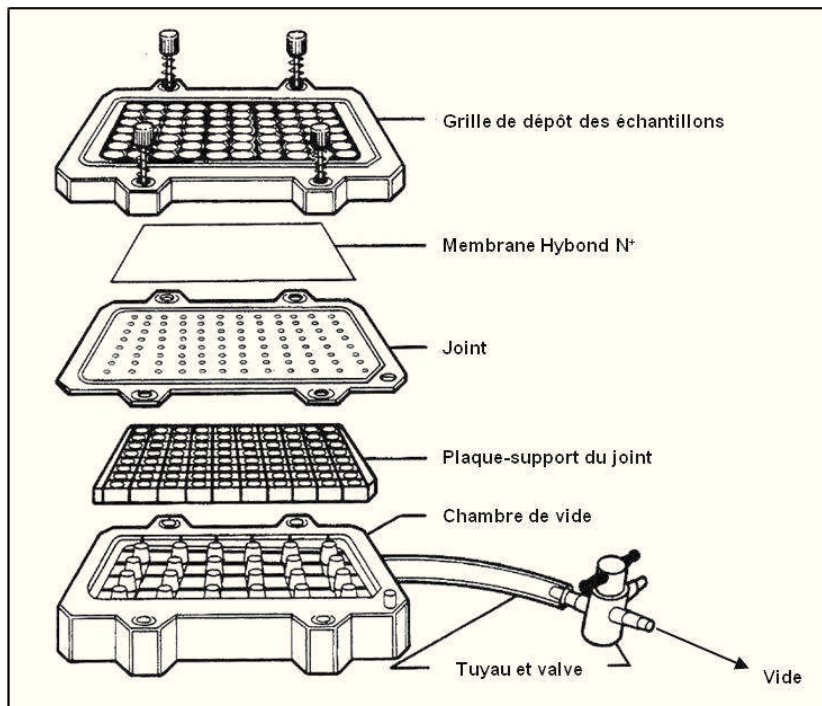


Figure 60 : Système de dépôt sur membrane de nylon. Les séquences spécifiques de chaque gène sont déposées sur la membrane de nylon grâce au vide créé dans la chambre de vide, sous la membrane.

soustraction du bruit de fond est la méthode « local average » permettant la détermination puis l'élimination du bruit de fond local autour de chaque signal.

5.2. Analyse par macroarrays

Contrairement au Northern blot qui ne permet l'étude que d'un voire deux gènes différents au cours d'une hybridation, la technique par macroarrays permet, pour une condition donnée, d'analyser l'expression d'un nombre plus important de gènes en effectuant qu'une hybridation. Dans ce cas, les sondes radioactives ne sont plus des fragments de gène dirigés contre les ARN messagers mais des ADNc radioactifs dirigés contre un panel de dépôts, spottés sur une membrane, et correspondant en grande majorité aux régions UTR3' de chaque gène (Fig. 59).

5.2.1. Production de fragments spécifiques des gènes d'intérêt

Les fragments correspondant à chaque gène de l'étude et clonés dans pGEM[®]-T Easy sont amplifiés par PCR (Matériels et Méthodes, § 4.2.3.) à l'aide de l'amorce T7 ainsi que d'une des deux amorces spécifiques de l'insert (dépend du sens d'insertion). Deux réactions de 50 µL sont effectuées pour chaque fragment de gène, l'étape d'hybridation des amorces étant fixée à 50°C pendant les 30 cycles d'amplification. Après une séparation par électrophorèse sur gel d'agarose (1% (p/v)) et une purification à l'aide du kit « Wizard[®]SV Gel Clean-Up System » (Promega), les ADNc sont dosés au spectrophotomètre ($A_{260\text{nm}}$).

5.2.2. Dépôt des fragments spécifiques sur membrane de nylon

Après le dosage, chaque ADN est alors spotté sur une membrane de nylon (Hybond-N⁺, GE Healthcare) préalablement trempée 10 minutes dans du SSC 6X (0,9 M NaCl ; 90 mM Citrate trisodique ; pH 7) à l'aide d'un dotter 96 puits (Bio-Dot[®] Microfiltration Apparatus, BIO-RAD) relié à une pompe à vide (Fig. 60). Les quantités d'ADN déposées sont de 50 ng pour les fragments correspondant aux gènes d'intérêt et de 100 ng pour ceux correspondant aux gènes de référence (*EF1α*, *EF1γ*, *ACT* et *GAPDH*). Des dépôts d'eau ultra-pure ou de 50 ng d'ADN de sperme de saumon sont également effectués afin de pouvoir quantifier et éliminer le bruit de fond dû à l'hybridation aspécifique des sondes ADNc sur les dépôts d'ADN. Chaque fragment ADN est déposé en triplicata sur la membrane divisée en trois « blocs » (Tableau 15). La membrane est ensuite placée 2 minutes dans une solution de dénaturation (1,5 M NaCl ; 0,5 M NaOH) afin de dénaturer les ADNc spottés sur la membrane.

Tableau 15 : Plan de dépôts des membranes macroarrays. A. Gènes codant pour des transporteurs de sucres et invertases. B. Gènes codant pour des protéines de défenses.

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<i>VvHT1</i>	<i>VvHT13</i>	<i>VvPMT1</i>	<i>VvCWINV4</i>	<i>VvHT12</i>	<i>VvSUT2</i>	<i>VvCWINV3</i>	<i>H2O</i>	<i>VvHT1</i>	<i>VvHT13</i>	<i>VvPMT1</i>	<i>VvCWINV4</i>
B	<i>VvHT2</i>	<i>VvTMT1</i>	<i>VvPMT2</i>	<i>VvGIN1</i>	<i>VvHT11</i>	<i>VvSUC27</i>	<i>VvCWINV2</i>	<i>VvGAPDH</i>	<i>VvHT2</i>	<i>VvTMT1</i>	<i>VvPMT2</i>	<i>VvGIN1</i>
C	<i>VvHT3</i>	<i>VvTMT2</i>	<i>VvPMT3</i>	<i>VvGIN2</i>	<i>VvpGIT</i>	<i>VvSUC12</i>	<i>VvCWINV1</i>	<i>VvACT</i>	<i>VvHT3</i>	<i>VvTMT2</i>	<i>VvPMT3</i>	<i>VvGIN2</i>
D	<i>VvHT4</i>	<i>VvTMT2</i>	<i>VvPMT4</i>	<i>VvEF1α</i>	<i>VvHT5</i>	<i>VvSUC11</i>	<i>VvPMT5</i>	<i>VvEF1γ</i>	<i>VvHT4</i>	<i>VvTMT3</i>	<i>VvPMT4</i>	<i>VvEF1α</i>
E	<i>VvHT5</i>	<i>VvSUC11</i>	<i>VvPMT5</i>	<i>VvEF1γ</i>	<i>VvHT4</i>	<i>VvTMT3</i>	<i>VvPMT4</i>	<i>VvEF1α</i>	<i>VvHT5</i>	<i>VvSUC11</i>	<i>VvPMT5</i>	<i>VvEF1γ</i>
F	<i>VvpGIT</i>	<i>VvSUC12</i>	<i>VvCWINV1</i>	<i>VvACT</i>	<i>VvHT3</i>	<i>VvTMT2</i>	<i>VvPMT3</i>	<i>VvGIN2</i>	<i>VvpGIT</i>	<i>VvSUC12</i>	<i>VvCWINV1</i>	<i>VvACT</i>
G	<i>VvHT11</i>	<i>VvSUC27</i>	<i>VvCWINV2</i>	<i>VvGAPDH</i>	<i>VvHT2</i>	<i>VvTMT1</i>	<i>VvPMT2</i>	<i>VvGIN1</i>	<i>VvHT11</i>	<i>VvSUC27</i>	<i>VvCWINV2</i>	<i>VvGAPDH</i>
H	<i>VvHT12</i>	<i>VvSUT2</i>	<i>VvCWINV3</i>	<i>H2O</i>	<i>VvHT1</i>	<i>VvHT13</i>	<i>VvPMT1</i>	<i>VvCWINV4</i>	<i>VvHT12</i>	<i>VvSUT2</i>	<i>VvCWINV3</i>	<i>H2O</i>
	Bloc 1				Bloc 2 (inversé)				Bloc 3			

B

	1	2	3	4	5	6
A	<i>VvPR1</i>	<i>VvPGIP</i>	<i>VvPAL</i>		<i>VvPR1</i>	<i>VvPGIP</i>
B	<i>VvPR3</i>	<i>VvBIG8.1</i>	<i>VvPR10</i>	<i>H2O</i>	<i>VvPR3</i>	<i>VvBIG8.1</i>
C	<i>VvPR5</i>	<i>VvEF1α</i>	<i>VvPR9</i>	<i>VvGAPDH</i>	<i>VvPR5</i>	<i>VvEF1α</i>
D	<i>VvPR6</i>	<i>VvEF1γ</i>	<i>VvPR7</i>	<i>VvACT</i>	<i>VvPR6</i>	<i>VvEF1γ</i>
E	<i>VvPR7</i>	<i>VvACT</i>	<i>VvPR6</i>	<i>VvEF1γ</i>	<i>VvPR7</i>	<i>VvACT</i>
F	<i>VvPR9</i>	<i>VvGAPDH</i>	<i>VvPR5</i>	<i>VvEF1α</i>	<i>VvPR9</i>	<i>VvGAPDH</i>
G	<i>VvPR10</i>	<i>H2O</i>	<i>VvPR3</i>	<i>VvBIG8.1</i>	<i>VvPR10</i>	<i>H2O</i>
H	<i>VvPAL</i>		<i>VvPR1</i>	<i>VvPGIP</i>	<i>VvPAL</i>	
	Bloc 1		Bloc 2 (inversé)		Bloc 3	

Celle-ci est alors neutralisée pendant 5 minutes dans une solution de neutralisation (1,5 M NaCl ; 0,5 M Tris pH 8) avant un bain de 30 secondes dans du SSC 2X (0,3 M NaCl ; 0,03 M Citrate trisodique ; pH 7). La fixation de façon covalente des ADNc sur la membrane est réalisée par exposition aux UV pendant 1 minute à $0,120 \text{ J.cm}^{-2}$ à l'aide d'un cross-linker (Bio-Link, BLXE, E254). La membrane est ensuite conservée à 4°C dans un sac hermétiquement fermé jusqu'à son utilisation.

Des ADNc radioactifs sont synthétisés à partir d'ARNs totaux extraits de plantes ou de cellules et traités à la DNase (Matériels et Méthodes, § 4.1.3. et 4.1.4.). Les ARNs sont rétro-transcrits à 37°C pendant un minimum de 2 heures dans un volume réactionnel de $50 \mu\text{L}$ comprenant $30 \mu\text{g}$ d'ARNs ; $2 \mu\text{M}$ d'oligo d(T)₁₆ ; $0,5 \text{ mM}$ de dATP, dTTP, dGTP (chacun) ; $2,26 \mu\text{M}$ de dCTP ; 1X de tampon « RT Buffet » ; 800 unités de rétrotranscriptase M-MLV (Promega) et $0,33 \mu\text{M}$ de [α -³³P]-dCTP. Après la rétro-transcription, la réaction est placée 15 minutes à 70°C puis immédiatement transférée dans la glace. La matrice ARN est alors dégradée par ajout de 10 unités de Ribonucléase H (Promega) et une incubation de 30 minutes à 37°C . Les ADNc radiomarqués sont alors purifiés sur colonne GE 50 IllustratTM ProbeQuantTM (GE Healthcare) puis le taux d'incorporation du ³³P estimé à l'aide d'un compteur Geiger (Matériels et Méthodes, § 5.1.3.). Les ADNc sondes sont alors dénaturés 5 minutes à 100°C puis incorporés au tampon Church ($0,25 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,2 ; $1 \text{ mM Na}_2\text{EDTA}$; 7% SDS (p/v) et 1% BSA (p/v)) pour l'hybridation des membranes macroarrays.

Les conditions de pré-hybridation, d'hybridation et de lavages des membranes macroarrays sont identiques à celles décrites pour l'analyse par Northern blot (Matériels et Méthodes, § 5.1.4.).

Après le dernier bain de lavage, la membrane est déposée sur un papier Whatman[®] imbibé de SSC 2X puis hermétiquement emballée dans un sac plastique thermo-soudé. Celle-ci est ensuite placée dans une cassette et exposée pendant 48 heures sur un écran « Storage Phosphor Screen » (Molecular Dynamics). La révélation des signaux est effectuée à l'aide d'un scanner Typhoon TRIO Imager puis l'intensité de ces derniers est quantifiée à l'aide du logiciel ImageQuant TL 7.0 (GE Healthcare). La méthode utilisée pour la soustraction du bruit de fond est la méthode « edge average » permettant la détermination puis l'élimination du bruit de fond local autour de chaque signal.

6. Méthodes de biochimie

6.1. Analyse de protéines

6.1.1. Préparation de fractions microsomales

Les fractions microsomales sont préparées à partir de cellules de Chardonnay traitées par du dialysat de culture de *Botrytis* au 6^{ème} jour de culture. Les cellules sont récoltées par filtration sous vide puis 4 g de matière fraîche sont broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier puis transférés en tube de 50 mL. Dix mL de tampon de broyage froid (0,5 M sorbitol ; 50 mM HEPES ; 5 mM EDTA ; 0,6% PVPP (p/v) ; 2 mM DTT ; 1 mM PMSF ; pH 7,5) sont ajoutés à la poudre de cellules puis vortexés quelques secondes avant une centrifugation de 15 minutes à 10000 g, 4°C. Le surnageant est collecté puis centrifugé de nouveau 5 minutes à 10000 g, 4°C, afin d'éliminer les derniers débris cellulaires. Le surnageant est collecté de nouveau, placé dans en tubes de polycarbonate, puis ultra-centrifugé 35 minutes à 100000 g, 4°C (UltraPro, rotor Sorvall A621, rayon maximum). Le surnageant est alors éliminé et le culot repris dans 100 µL de tampon de resuspension (8 mM KH₂PO₄ ; 42 mM K₂HPO₄ ; 300 mM sorbitol ; 0,5 mM DTT ; 1 mM EDTA ; pH 7,5). Le culot de microsomes est dissout dans le tampon de resuspension à l'aide d'un pinceau fin stérile.

6.1.2. Dosage de protéines au spectrophotomètre

Le dosage de protéines est effectué selon la méthode classique de Bearden (Bearden Jr, 1978). Un volume d'échantillon à doser est additionné de 100 µL de Triton X100 à 0,1% (v/v) puis incubé 10 minutes à température ambiante. Le volume est ensuite ajusté à 1 mL avec de l'eau ultra-pure stérile puis additionné d'1 mL de réactif de Bearden. Après une homogénéisation et une nouvelle incubation de 10 minutes à température ambiante, l'absorbance du mélange protéique est lue au spectrophotomètre à 595 nm. Afin de convertir cette absorbance en concentration de protéines, une gamme étalon est effectuée avec de l'albumine sérique bovine (BSA).

6.1.3. Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE

Une électrophorèse sur gel SDS-PAGE, dérivée de la méthode décrite par Laemmli (1970), est effectuée afin de visualiser le profil protéique du dialysat de culture de *B. cinerea* ainsi que pour la détection, par Western blot, de la protéine VvHT1 dans des fractions microsomales obtenues à partir de cellules. L'électrophorèse nécessite la préparation d'un gel

composé de deux parties : (i) le gel de concentration (4,8% (p/v) acrylamide/bis-acrylamide ; 125 mM Tris pH 6,8 ; 0,1% (p/v) SDS ; 0,02% (v/v) TEMED ; 0,048% (p/v) persulfate d'ammonium) et (ii) le gel de résolution (12% (p/v) acrylamide/bis-acrylamide ; 375 mM Tris pH 8,8 ; 0,1% (p/v) SDS ; 0,05% (v/v) TEMED ; 0,037% (p/v) persulfate d'ammonium). Les deux parties du gel sont coulées dans un système Mini-protean III (Bio-Rad). Les échantillons sont dilués dans du tampon de Laemmli (2% (p/v) SDS ; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 10% (v/v) glycérol ; 1 M β -mercaptoéthanol) puis placés à 100°C pendant 5 à 10 minutes avant d'être chargés dans le gel. Deux marqueurs de taille ont été placés en parallèle des échantillons, le PPS (Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad) et le PPPL (PageRuler Prestained Protein Ladder, Euromedex), afin d'évaluer la taille des protéines analysées après coloration du gel. La migration est réalisée dans un tampon Tris/Glycine (0,1% (p/v) SDS ; 25 mM Tris ; 192 mM glycine) à ampérage constant, 30 minutes à 15 mA puis 2 heures à 25 mA.

6.1.4. Coloration des protéines au nitrate d'argent après migration sur gel SDS-PAGE 12%

La méthode utilisée est adaptée de celle décrite par Yan *et al.* (2000). Après migration, le gel est incubé deux fois 15 minutes dans un tampon fixateur (10% (v/v) acide acétique ; 40% (v/v) méthanol) puis laissé une nuit dans l'eau ultra-pure à 4°C. Il est ensuite baigné 30 minutes dans un tampon sensibilisateur (30% (v/v) méthanol ; 0,2% (p/v) thiosulfate de sodium ; 6,8% (p/v) acétate de sodium) sous agitation légère. Le gel est ensuite lavé trois fois 5 minutes dans de l'eau ultra-pure avant d'être placé dans une solution d'argent (0,25% (p/v) AgNO_3), préparée à l'abri de la lumière, pendant 20 minutes sous agitation. Après deux nouveaux lavages d'une minute dans de l'eau ultra-pure, le gel est incubé dans une solution de développement (2,5% (p/v) carbonate de sodium ; 0,04% (v/v) formaldéhyde) jusqu'à l'apparition des bandes. Au cours du développement, la solution est renouvelée une à deux fois dès que celle-ci commence à jaunir. Lorsque les bandes de protéines sont bien visibles, le gel est alors placé 10 minutes dans une solution d'arrêt (1,45% (p/v) $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) avant trois lavages finaux de 5 minutes dans de l'eau ultra-pure.

6.1.5. Transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose

Les protéines séparées sur gel d'acrylamide sont transférées par électro-transfert sur une membrane de nitrocellulose (HybondTM-ECLTM, Amersham). Ce transfert est réalisé pendant 2 heures à 60 V dans du tampon de transfert (0,3% (p/v) Tris ; 1,44% (p/v) glycine ;

20% (v/v) méthanol) à l'aide du système Mini-protean III (Bio-Rad). Afin de vérifier l'efficacité de transfert, la membrane est colorée pendant 10 minutes dans une solution de rouge Ponceau (0,2% (p/v) rouge Ponceau (Sigma, ref. P3504) dans de l'acide trichloroacétique à 3%) puis rincée à l'eau ultra-pure.

6.1.6. Immuno-détection de la protéine VvHT1

Les sites aspécifiques de la membrane de nitrocellulose sont saturés par une incubation de trois fois 15 minutes dans un tampon PBS-Régilait-Tween (145 mM NaCl ; 2 mM NaH₂PO₄ ; 8 mM Na₂HPO₄ ; pH 7,2 ; 3% (p/v) lait en poudre écrémé « Régilait » et 0,1% (v/v) Tween-20) à température ambiante. La membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-VvHT1 dilué au 1/3000^{ème} dans un second tampon PBS-Régilait-Tween (145 mM NaCl ; 2 mM NaH₂PO₄ ; 8 mM Na₂HPO₄ ; pH 7,2 ; 1% (p/v) lait en poudre écrémé « Régilait » et 0,1% (v/v) Tween-20). L'incubation est effectuée sous agitation lente. Après deux lavages de 10 minutes dans ce dernier tampon, la membrane est incubée pendant 90 minutes à température ambiante avec l'anticorps secondaire GAR-HPC (Goat Anti-Rabbit IgG – Horseradish Peroxidase Conjugate ; Bio-Rad), dilué au 1/10000^{ème} dans le tampon PBS-Régilait-Tween. La membrane est ensuite lavée trois fois 10 minutes dans le tampon PBS-Régilait-Tween puis 3 fois 10 minutes dans du tampon PBS (145 mM NaCl ; 2 mM NaH₂PO₄ ; 8 mM Na₂HPO₄ ; pH 7,2) avant d'être révélée.

La détection des signaux est réalisée à l'aide du kit « ECLTM Plus Western blotting Detection Reagents » (Amersham) grâce à une réaction enzymatique. L'anticorps secondaire (GAR) est couplé à la peroxydase de raifort (Horseradish) qui dégrade le diacylhydrazide cyclique contenu dans le kit « ECLTM Plus » en émettant un signal lumineux. Ce signal est détecté par une exposition de 30 secondes d'un film autoradiographique (HyperfilmTM ECL, Amersham) sur la membrane.

6.2. Mesures d'absorption de sucres radiomarqués par les cellules de Chardonnay

6.2.1. Mesure d'absorption de glucose sur une cinétique courte

Les cellules de Chardonnay, cultivées en conditions standards dans le milieu Gamborg B5 (Annexe 4), sont collectées au 6^{ème} jour de culture puis lavées trois fois par filtration dans 180 mL de tampon mannitol (0,175 M mannitol ; 10 mM MES ; 0,5 mM CaCl₂ ; 0,5 mM K₂SO₄, pH 5,5). Les cellules sont ensuite re-suspendues dans ce même tampon à raison de 0,2 g MF.mL⁻¹, réparties en fractions de 40 mL en fioles d'Erlenmeyer puis placées en

équilibration pendant 2 heures sous agitation orbitale (145 rpm), à température ambiante et à l'abri de la lumière. La cinétique d'absorption est débutée à t_0 par l'ajout d'un mélange de 8 μmol de glucose et $2,96 \cdot 10^{-4}$ μmol de D-[5- $^3\text{H}(\text{N})$]-glucose (0,148 MBq) apporté à une concentration finale de 0,2 mM de glucose (glucose- ^3H négligé) ; 3,7 $\text{kBq} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou encore 18,5 $\text{MBq} \cdot \text{mmol}^{-1}$ de glucose. Pour chaque temps de la cinétique (0, 15, 30, 45 et 60 minutes), trois fois 2 mL de cellules sont prélevés, filtrés sur filtres en microfibrilles de verre (25 mm, Fisher Bioblock) et lavés trois fois dans 5 mL de tampon mannitol. Les cellules sont ensuite placées sans les filtres en tube de polyéthylène (PerkinElmer) puis séchées une nuit à 80°C. Après une pesée, elles sont alors digérées une nuit à 55°C par 800 μL de milieu de digestion (13% (v/v) acide perchlorique ; 12% (v/v) peroxyde d'hydrogène ; 0,04% (p/v) Triton X100). Dix mL de liquide à scintillation (EcoLiteTM, MP Biomedicals LLC) sont alors ajoutés aux tubes, vigoureusement agités puis placés dans un compteur à scintillation (Packard Instruments) afin de mesurer la radioactivité absorbée. Les résultats sont obtenus en désintégrations par minute (dpm) et doivent être convertis en quantité de glucose absorbée.

La quantité de glucose absorbée est exprimée en $\text{nmole} \cdot \text{g}^{-1}$ de matière sèche grâce au calcul intermédiaire de l'activité spécifique (AS) du mélange radioactif ajouté aux cellules. Celle-ci est déterminée par le comptage de 2 μL de mélange radioactif en présence de liquide à scintillation et permet la conversion $\text{dpm} \rightarrow \text{moles de glucose}$. Deux μL de mélange radioactif contiennent 800 nmoles de glucose, on obtient ainsi la relation :

$$\text{AS}_{(\text{nmole glc} / \text{dpm})} = 800 / \text{dpm mesurées}$$

6.2.2. Mesure d'absorption de glucose et de saccharose 4 heures après l'inoculation

La procédure de lavage et de re-suspension des cellules de Chardonnay est identique à celle utilisée pour les mesures d'absorption sur des temps courts, à l'exception du tampon mannitol, remplacé par du milieu Gamborg sans sucres à pH 5,5. Après équilibration des cellules, l'absorption est débutée à t_0 par l'ajout de glucose ou de saccharose. Le mélange de glucose est détaillé dans le paragraphe précédent. Le mélange de saccharose est composé de 9,22 μmoles de saccharose et de $3,13 \cdot 10^{-4}$ μmoles de [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-saccharose (5,77 kBq) apporté à une concentration finale de 0,230 mM ; 0,144 $\text{kBq} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou encore 625,8 $\text{kBq} \cdot \text{mmoles}^{-1}$ de saccharose. Les cellules sont prélevées 4 heures après l'ajout du sucre dans le milieu et la procédure suivie est identique à celle décrite précédemment.

Tableau 16 : Séquence d'injection des tampons pour l'analyse par HPLC. La colonne est préalablement équilibrée en tampon A puis l'échantillon est élué par un gradient linéaire d'acétonitrile croissant suite à l'injection progressive d'un tampon B.

Etapes	Temps (min)	Flux (mL.min⁻¹)	Tampon A (%)	Tampon B (%)
1	0,5	0,8	100,0	0,0
2	5,0	0,8	100,0	0,0
3	10,0	0,8	65,0	35,0
4	10,0	0,8	50,0	50,0
5	10,0	0,8	0,0	100,0
6	5,0	0,8	0,0	100,0
7	5,0	0,8	100,0	0,0
8	15,0	0,8	100,0	0,0

L'activité spécifique (AS) du mélange radioactif est déterminée par le comptage de 2 μ L en présence de liquide à scintillation et permet la conversion dpm \rightarrow moles de saccharose. Deux μ L de mélange radioactif contiennent 922 nmoles de saccharose, on obtient ainsi la relation :

$$AS \text{ (nmoles saccharose / dpm)} = 922 / \text{dpm mesurées}$$

6.3. Extraction du resvératrol produit dans les feuilles de vigne

Des feuilles de vitroplants de Chardonnay, infectées ou non par *B. cinerea*, sont prélevées à différents temps de la cinétique d'infection, pesées et congelées dans de l'azote liquide. Elles sont ensuite broyées dans un mortier et le resvératrol extrait 2 fois par 250 μ L de méthanol pour 100 mg de matière fraîche. Le broyat, placé en tube Eppendorf[®], est alors centrifugé 10 minutes à 18000 g à 4°C afin de sédimenter les débris cellulaires. Afin d'éliminer les chlorophylles, le surnageant méthanolique est collecté puis passé sur une colonne C18 (Sep-Pack[®] C18 cartridge, Waters, USA) préalablement équilibrée avec 2 mL de méthanol à 90% (v/v). L'extrait est ensuite analysé par HPLC.

6.4. Dosage du resvératrol par chromatographie inverse

Cent quatre-vingt μ L d'extrait sont injectés dans une colonne en phase inverse (C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm, Dionex) préalablement équilibrée en tampon A (1% (v/v) acétonitrile ; 0,1% (v/v) TFA ; 98,9% (v/v) H₂O ultra-pure) à un débit de 0,8 mL.min⁻¹. L'analyse est réalisée sur une chaîne HPLC (Perkin-Elmer, série 200) constituée d'un injecteur automatique équipé d'une boucle de 200 μ L, d'une pompe quaternaire à mélangeur basse pression, et d'un détecteur UV visible mono longueur d'onde. L'échantillon est ensuite élué (0,8 mL.min⁻¹) par un gradient linéaire d'acétonitrile croissant suite à l'injection progressive (tableau 16) d'un tampon B (90% (v/v) acétonitrile ; 0,1% (v/v) TFA ; 9,9% (v/v) H₂O ultra-pure). La détection est réalisée par un suivi de l'absorbance à 305 nm. La quantité de resvératrol est déterminée par l'intégration de l'aire des pics par rapport à une gamme étalon de resvératrol de concentration connue.

7. Techniques de microscopie

7.1. Observation au microscope classique

Les échantillons (ex : conidies de *Botrytis*) sont observés à l'aide d'un microscope Motic[®] BA400 équipé d'une caméra 2I SYSTEM (UI-2240-C, Paris). L'acquisition des

images est réalisée à l'aide des logiciels Wolfie[®] V.1 et Pégase Pro[®] V.4, ce dernier permettant l'insertion d'une échelle de taille après calibration du système optique.

7.2. Observation à la loupe binoculaire

Les échantillons de feuilles infectées ainsi que certaines fructifications fongiques sont observés au moyen d'une loupe binoculaire Leica (MZ16FA, Leica Microsystems Ltd.) équipée d'une caméra Leica DFC300FX.

7.3. Observation en microscopie électronique à balayage

Les échantillons (fragments de feuilles de vigne infectées ou non, fragments de gélose supportant du mycélium en croissance) sont fixés 4 minutes sous vide léger puis 1 heure dans une solution de fixation préparée dans du tampon phosphate de Sørensen (3% (p/v) glutaraldéhyde (Sigma, G5882), 28 mM NaH₂PO₄ ; 72 mM Na₂HPO₄ ; pH 7,2). Ils sont ensuite lavés 6 fois 15 minutes dans du tampon phosphate de Sørensen (7,5% (p/v) saccharose ; 56 mM NaH₂PO₄ ; 144 mM Na₂HPO₄ ; pH 7,2) avant d'être déshydratés dans des bains d'acétone de degré croissant (5 minutes dans acétone 30% (v/v) ; 5 minutes dans acétone 50% (v/v) ; 2 fois 5 minutes dans acétone 70% (v/v) ; 2 fois 10 minutes dans acétone 90% (v/v) puis 2 fois 15 minutes dans acétone 100%). Les échantillons sont ensuite soumis à une dessiccation au point critique en utilisant le CO₂ (température critique : 31°C, pression critique : 73,8 mbar) comme liquide de transfert afin de chasser l'acétone (BALZERS, CPD 030). Ils sont alors fixés par une laque argentique sur des porte-objets avant d'être métallisés à l'or (dépôt de 25 nm ; 20 secondes à 50 mA sous vide (5.10⁻² mbars) ; BAL-TEC, SCD 005 ou BAL-TEC, MED 020). Les observations des échantillons sont réalisées à l'aide d'un microscope à balayage à 3 kV (Jeol 6301F) ou 15 kV (Jeol 840A).

8. *Analyses in silico*

La recherche et la collecte de séquences (nucléotidiques et protéiques) est effectuée *via* internet à l'aide des serveurs *tair* (The Arabidopsis Information Ressource ; <http://www.arabidopsis.org/>), NCBI (National Center for Biotechnology Information ; base de donnée GenBank ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Genoscope (Grape Genome Browser 8X ; Blast Server ; <http://www.genoscope.cns.fr/>) ainsi que le serveur du Broad Institute (Botrytis Cinerea Database ; <http://www.broadinstitute.org/>).

Les alignements de séquences sont réalisés à l'aide du logiciel Lasergene (Megalyn, DNASTAR, USA) et du server MultAlin (Corpet, 1988 ; <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). Les pourcentages d'homologie entre les séquences protéiques sont calculés par le logiciel Lasergene (Megalyn) après l'alignement multiple de celles-ci.

Les arbres phylogénétiques ont été construits selon plusieurs méthodes :

- A l'aide du logiciel MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) au travers d'un alignement multiple des séquences protéiques (ClustalW). Les arbres phylogénétiques non enracinés (Neighbor Joining) sont générés après 500 'bootstraps'.
- A l'aide du server Phylogeny.fr (Robust Phylogenetic Analysis For The Non-Specialist ; <http://www.phylogeny.fr/> ; (Dereeper *et al.*, 2008)). Les alignements (ClustalV) sont effectués par le programme MUSCLE (Edgar, 2004) et les arbres générés par le programme PHYML (Anisimova and Gascuel, 2006; Guindon and Gascuel, 2003), par la méthode « maximum likelihood », après 100 'bootstraps' et suivant le 'JTT amino acid substitution model'. Les arbres sont ensuite visualisés avec le programme TreeDyn (Chevenet *et al.*, 2006).

La recherche de séquences d'adressage et/ou d'une putative localisation subcellulaire des protéines étudiées est réalisée à l'aide du server TargetP v1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>).

La détermination du nombre de domaines transmembranaires et des profils d'hydrophatie des protéines est effectuée grâce aux servers TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) et TopPred (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=toppred>).

La recherche du point isoélectrique des protéines est réalisée à l'aide de l'outil 'Compute pI/Mw' du server ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/>).

L'analyse des promoteurs de gènes et la mise en évidence d'éléments *cis*-régulateurs potentiels sont effectuées à l'aide du programme PLACE (PLAnt Cis acting regulatory DNA Elements database ; (Higo *et al.*, 1999) ; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>).

Chapitre I

Description et mise au point du pathosystème et identification de gènes codant pour des transporteurs de sucres impliqués dans la réponse de la vigne à *B. cinerea* et *E. necator*.

Chapitre I

Description et mise au point du pathosystème « plantes » et identification de gènes codant pour des transporteurs de sucres impliqués dans la réponse de la vigne à *B. cinerea* et *E. necator*.

Afin de mieux comprendre la fonction biologique des transporteurs de sucres dans un contexte de contrainte biotique, la première partie de ce travail a consisté en une étude de leur régulation au sein de l'interaction vigne/champignons pathogènes. Au début de cette étude, de nombreux travaux avaient été menés sur l'identification, la localisation et/ou la caractérisation, chez la vigne, des transporteurs d'hexoses *VvHT1*, *VvHT2*, *VvHT3*, *VvHT4*, *VvHT5*, *VvHT6*, *VvpGIT* (Fillion *et al.*, 1999 ; Cakir *et al.*, 2003, Glissant, 2005 ; Hayes *et al.*, 2007 ; Vignault *et al.*, 2005) et de saccharose *VvSUC11*, *VvSUC12*, *VvSUC27* et *VvSUT2* (Davies et Robinson, 1999 ; AF439321). Utilisant les données disponibles dans la base de données Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), l'ADNc de ces 11 gènes de transporteurs de sucres a pu être isolé et cloné afin de servir de sonde dans notre analyse d'expression. Parallèlement au clonage des ADNc de transporteurs de sucres, et afin de pouvoir corrélérer l'éventuelle régulation des ces gènes avec la mise en place des défenses chez la plante, des sondes correspondant à des PR-protéines (PR1, 3, 5, 6, 7, 9 et 10) ainsi qu'au marqueur de HR *VvBIG8.1* (*Botrytis*-Induced Grapevine) (Bézier *et al.*, 2002) ont également été isolées et clonées.

Dans un premier temps, pour des raisons techniques et pratiques, nous avons choisi d'utiliser *Botrytis cinerea*, agent nécrotrophe facilement cultivable sur milieu synthétique, en partant du postulat que les phases précoces de l'infection sont comparables à une interaction de type biotrophe (Glazebrook, 2005). Dans un second temps, afin de vérifier notre hypothèse, l'infection des feuilles de vigne a été abordée avec l'agent biotrophe stricte *Erysiphe necator*.

Outre le fait d'être un cépage économiquement important dans le monde et en France, notamment dans l'Est (Champagne), notre choix s'est porté sur le Chardonnay car des banques de données EST (Expressed Sequence Tag) ainsi que certaines séquences génomiques étaient alors disponibles sur ce cépage. Une collaboration entre 2002 et 2005 avec les laboratoires INRA UMR 619 de Bordeaux et l'UMR SPO Agro-Montpellier a en effet permis le séquençage de 15 000 EST de vigne dont 5000 EST chez le cépage Chardonnay. Ces travaux, ainsi que l'identification de plus d'un millier d'unigènes ont permis

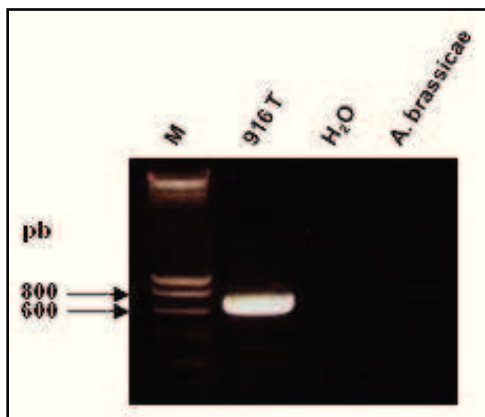


Figure 61 : Identification de *B. cinerea* par PCR. La PCR a été effectuée à partir d'ADNg fongique extrait à partir de la souche 916T à l'aide du protocole de Möller *et al.* (1992), en utilisant les amorces C729+/- décrites par Rigotti *et al.* (2002). Le produit d'amplification a été déposé sur gel agarose 1% en parallèle des deux témoins négatifs (H₂O ; *Alternaria brassicae*). M : marqueur de taille (Smart Ladder, Eurogentec).

l'étude, par une approche transcriptomique, de la signalisation glucidique et du développement de la baie de Chardonnay (Glissant, 2005).

1. Impact d'une infection par *Botrytis cinerea* sur l'expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres

1.1. Identification du mycélium de *B. cinerea* par PCR

La souche 916T étant présente au laboratoire depuis de nombreuses années, et afin de pouvoir attribuer les symptômes sur plantes au champignon uniquement, un test d'amplification par PCR a été réalisé pour vérifier l'appartenance du champignon cultivé ou ré-isolé à l'espèce *B. cinerea*. Les amorces C729+/- (Rigotti *et al.*, 2002) ont été choisies pour ce test et permettent l'amplification d'un produit de 750 pb spécifique de l'espèce *Botrytis cinerea* et absent chez les autres espèces du genre. Une des premières étapes de ce travail a donc consisté en la vérification de la souche cultivée avant de procéder aux infections sur plantes. Cette vérification a été effectuée sur le champignon cultivé *in vitro* après extraction de l'ADNg à partir du mycélium et selon le protocole de Möller *et al.* (1992). En parallèle, l'amplification a également été réalisée sur de l'ADNg d'*Alternaria brassicicola*, constituant un témoin négatif en plus de l'eau.

Après la PCR, l'analyse en gel d'électrophorèse d'agarose révèle la présence d'une bande de taille attendue (750 pb) pour l'échantillon « 916T » alors qu'aucune amplification n'est observée pour les témoins H₂O et *A. brassicae* (Fig. 61). Ce test valide donc formellement l'appartenance de la souche 916T à l'espèce *B. cinerea*. Celle-ci a alors été utilisée pour l'infection des plantes de vigne.

1.2. Infection de feuilles de vignes cultivées en serre

Afin de se rapprocher des conditions du vignoble, les premiers essais d'infection ont été conduits sur plantes cultivées en serre. Les feuilles des deux tiers supérieurs de chaque plante ont été infectées par pulvérisation d'une suspension conidienne de *Botrytis* (916T) puis recouvertes d'un sac plastique transparent et percé afin de créer un microclimat humide autour de chaque plante et ainsi favoriser le développement du champignon. Les plantes témoins ont été traitées de façon similaire avec du milieu malt-glucose (10 et 19,8 g.L⁻¹ respectivement), utilisé pour la collecte des conidies de *Botrytis*. Cependant, au cours du temps, aucun symptôme caractéristique n'a pu être observé suite à l'infection. Au terme de 7 jours post-

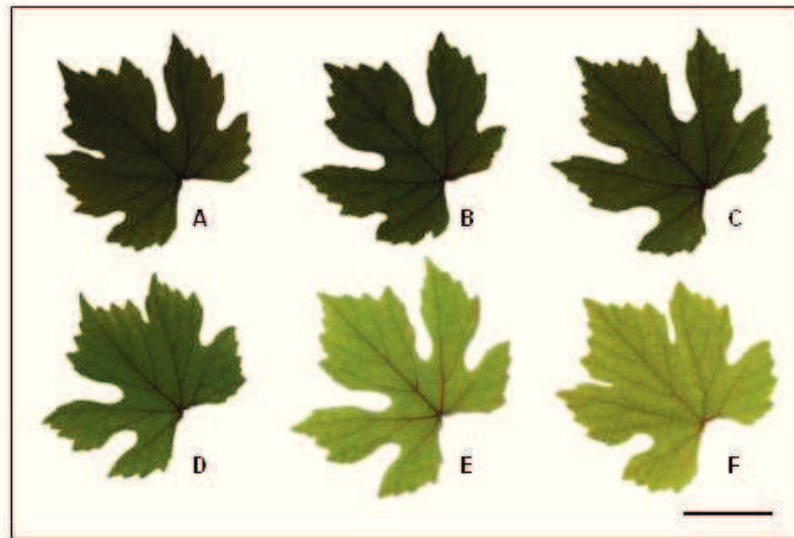


Figure 62 : Observation de feuilles de vignes cultivées en serre et infectées par *B. cinerea*. A chaque point de la cinétique d'infection, une feuille de vigne a été prélevée afin de suivre l'évolution des symptômes. **A.** 0 jpi ; **B.** 1 jpi ; **C.** 3 jpi ; **D.** 5 jpi ; **E.** 10 jpi ; **F.** 15 jpi. (Trait : 5 cm)

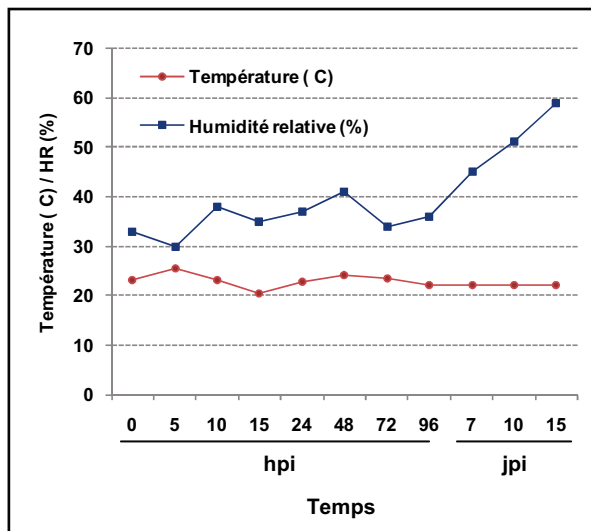


Figure 63 : Suivi de la température et de l'humidité relative au cours de la cinétique d'infection. La température (°C) ainsi que l'humidité relative (%) ont été relevées au cours du temps à l'aide de capteurs situés à l'intérieur de la chapelle de la serre. hpi : heures post-inoculation ; jpi : jours post-inoculation.

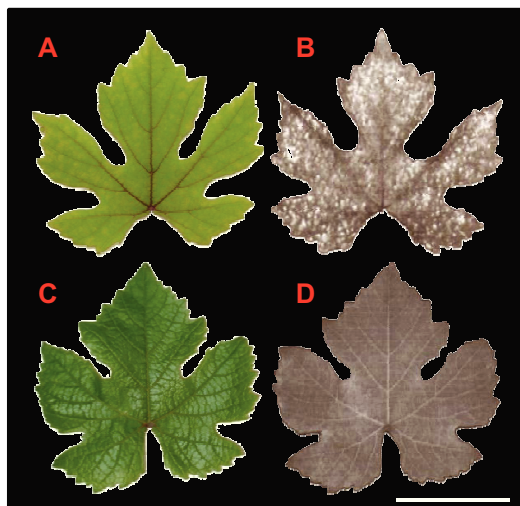


Figure 64 : Observation de feuilles de vigne témoins au 10^{ème} jour après pulvérisation. Feuille de vigne ensachée observée en lumière naturelle (**A**) et sous UV (**B**). Feuille de vigne non ensachée observée en lumière naturelle (**C**) et sous UV (**D**). (Trait : 5 cm)

inoculation (jpi), les feuilles de vigne n'ont pas développé de taches nécrotiques ni de zones de macération habituellement observées avec la pourriture grise (Fig. 62).

La germination des conidies et le développement du champignon étant dépendant du couple température/humidité relative, un suivi des deux paramètres a été effectué dans la chapelle de la serre. La figure 63 montre un maintien de la température entre 21 et 25,5°C au cours des 15 jours d'infection et des fluctuations du pourcentage d'humidité entre 30 et 59%, ces valeurs restant faibles. Ces données indiquent que, bien que la température puisse être considérée comme propice à la germination des conidies de *Botrytis*, l'hygrométrie semble pouvoir constituer un facteur limitant de la croissance du champignon.

De plus, à partir du 5^{ème} jour, outre l'absence de symptômes foliaires dus à l'infection, les plants de vignes (traités et témoins) ont révélé des « panachures » jaunâtres pouvant visuellement être assimilées à des phénomènes de chloroses. L'observation sous UV de feuilles témoins prélevées au 10^{ème} jour a montré une fluorescence anormale suggérant la présence de composés phénoliques et donc l'induction de la voie des phénylpropanoïdes (Fig. 64). L'observation de feuilles de vigne non ensachées, exemptes de symptôme et ne révélant pas de fluorescence, suppose la perception d'une contrainte exogène à l'infection, probablement de nature abiotique, et due au dispositif d'ensachage des plantes.

Au 15^{ème} jour de l'essai d'infection, face à l'absence de symptômes caractéristiques de *B. cinerea*, la surface d'une feuille infectée a été observée en microscopie électronique à balayage afin de rendre compte du développement du champignon. Comme suspecté, alors que de nombreuses conidies sont observées sur la surface de la feuille infectée, aucun tube germinatif n'a pu être mis en évidence 15 jours après inoculation (Fig. 65). Bien que les paramètres d'infection en serre aient été optimisés au maximum, il semble que l'hygrométrie, trop faible, ait compromis la germination des conidies de *Botrytis* et la colonisation de sa plante hôte. Un autre système de culture de plantes, l'aéroponie, a donc été utilisé par la suite.

1.3. Infection de vignes en système aéroponique

Un système de culture de vigne en aéroponie a été développé. Celui-ci constitue un dispositif intermédiaire entre la culture en serre et la culture *in vitro*. Ce système, flexible et efficace, permet la culture de jeunes plantules de vigne sur un bac dans lequel une solution nutritive est délivrée par aspersion. L'avantage de ce dispositif réside dans la mise en culture des plantes dans un phytotron, sous une cloche, permettant d'obtenir un pourcentage d'humidité élevé tout en régulant la température. Ainsi la germination et le développement du champignon sont certainement favorisés.

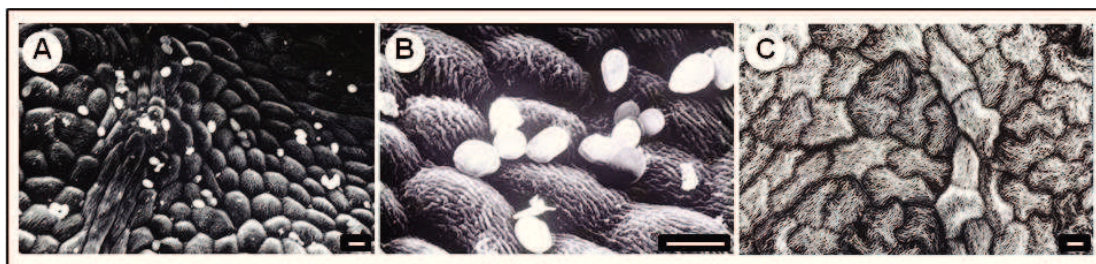


Figure 65 : Observation en microscopie électronique à balayage de la surface foliaire d'une feuille infectée. Quinze jours post inoculation avec des conidies de *B. cinerea*, des fragments de feuilles de vigne ont été prélevés, fixés dans du PFA/glutaraldéhyde, passés au point critique puis métallisés à l'or (25 nm). Les échantillons ont ensuite été observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Jeol 840 A).
A et B : feuille infectée ; **C :** feuille témoin (Trait : 10 µm)

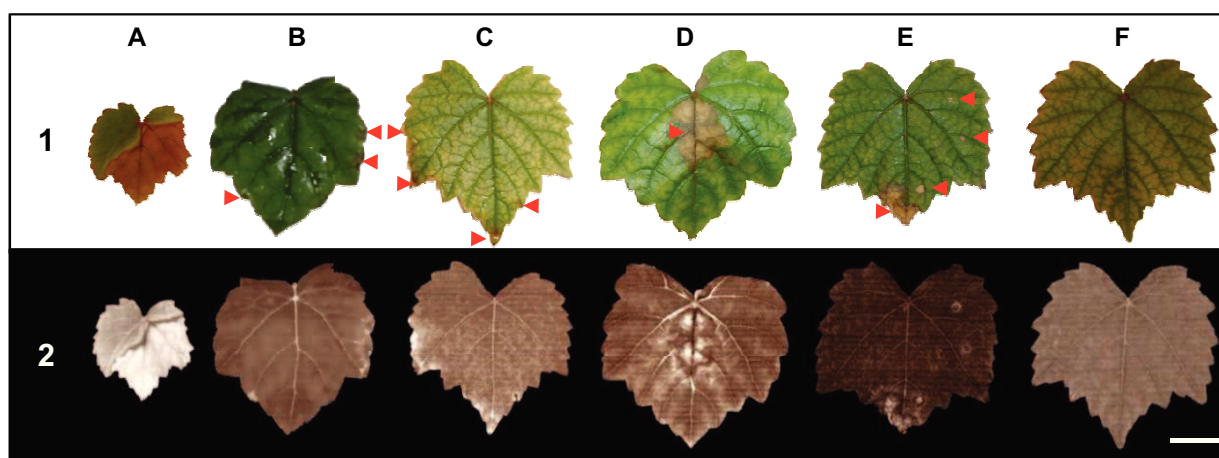


Figure 66 : Evolution des symptômes sur feuilles de vignes cultivées en aéroponie et infectées par *B. cinerea*. La partie supérieure de l'image (1) présente l'observation des symptômes en lumière naturelle et la partie inférieure (2) l'observation correspondante en lumière UV. Les flèches rouges indiquent la présence de colonies fongiques. Cinétique de prélèvement : 24 hpi sur jeune feuille de l'apex (A) et sur feuille mature (B) ; 48 hpi (C) ; 96 hpi (D) et 7 jpi (E). Témoins malt-glucose à 7 jours (F). (Trait : 1,5 cm)

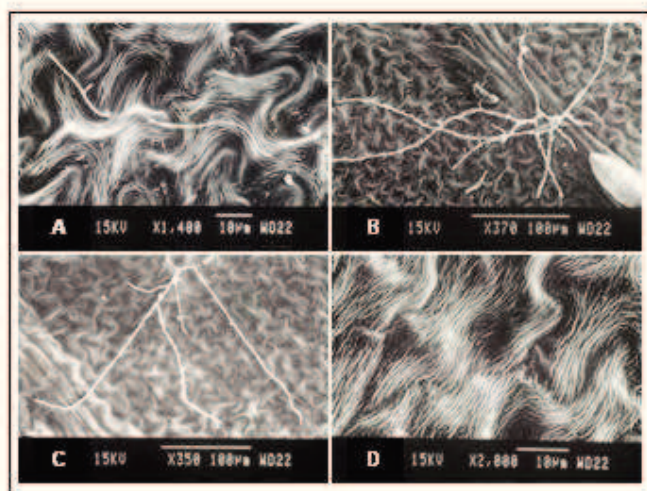


Figure 67 : Observation en microscopie électronique à balayage du mycélium à la surface de feuilles infectées par *B. cinerea*. Des fragments de feuilles de vigne ont été prélevés, fixés dans du PFA/glutaraldéhyde, passés au point critique puis métallisés à l'or (25 nm). Les échantillons ont ensuite été observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Jeol 840 A). **A.** feuille infectée à 24 hpi ; **B. et C.** feuilles infectées à 48 hpi ; **D.** feuille témoin à 48 hpi.

Après 20 jours de culture sous cloche, les plants de vigne ont été infectés par badigeonnage au pinceau de la surface foliaire à l'aide d'une suspension conidienne de *Botrytis* (916T) réalisée dans du milieu malt-glucose. Les feuilles de 20 plantes ont été inoculées avec le champignon parallèlement à 20 autres plantes témoins badigeonnées avec une solution de malt-glucose. L'apparition de zones nécrotiques à 24 hpi sur les feuilles des apex suggère que les spores de *Botrytis* ont germé et colonisé les tissus foliaires (Fig. 66-1). Sur feuilles plus âgées, seules quelques points d'infection sont observés à 24 hpi ce qui est probablement dû à la nature plus « robuste » des tissus et à la présence d'une couche cireuse plus importante que sur les feuilles juvéniles. Le développement du champignon a été apprécié en microscopie électronique à balayage ce qui a permis d'observer formellement la présence d'un mycélium sur la surface des feuilles infectées à 24 et 48 hpi (Fig. 67). Au cours de la cinétique d'infection et avec le développement du mycélium, les zones nécrotiques se sont développées et ont évolué en plage de macération aux alentours de 96 hpi/7jpi.

Afin de déterminer si le champignon était perçu par la plante, les feuilles infectées et présentant des symptômes ont été observées sous UV. Les observations (Fig. 66-2) révèlent une fluorescence au niveau des sites d'infection ce qui suppose l'activation de la voie des phénylpropanoïdes et la production de phytoalexines, les noyaux aromatiques de ces molécules ayant la propriété de fluorescer aux UV. L'absence de fluorescence sur les feuilles témoins montre que le phénomène de défense est bien dû à la perception de *Botrytis*. L'infection des plants de vigne en système aéroponique a donc permis la germination et le développement de *Botrytis* ainsi que sa perception par la plante.

1.3.1. Recherche de gènes différentiellement exprimés entre plantes infectées et plantes saines

En considérant l'apparition des symptômes foliaires ainsi que l'activation potentielle de la voie des phytoalexines, il apparaît évident que *Botrytis* a été perçu par la plante. La problématique était alors de savoir si, parallèlement à l'activation des voies de défenses, la vigne pouvait moduler la transcription des gènes codant pour des transporteurs de sucres. N'ayant aucune information sur le profil de réponse des gènes de transporteurs de sucres en système aéroponique, celui-ci a été étudié par Northern blot sur une cinétique de 0 à 96 hpi. Cette technique ne permettant qu'un nombre limité d'hybridations sur une même membrane, nous avons alors choisi d'utiliser comme sondes radioactives les ADNc pleine longueur des transporteurs afin d'être le plus exhaustif possible. En effet, les gènes de transporteurs de sucres appartiennent à une famille multigénique dont les membres peuvent être relativement

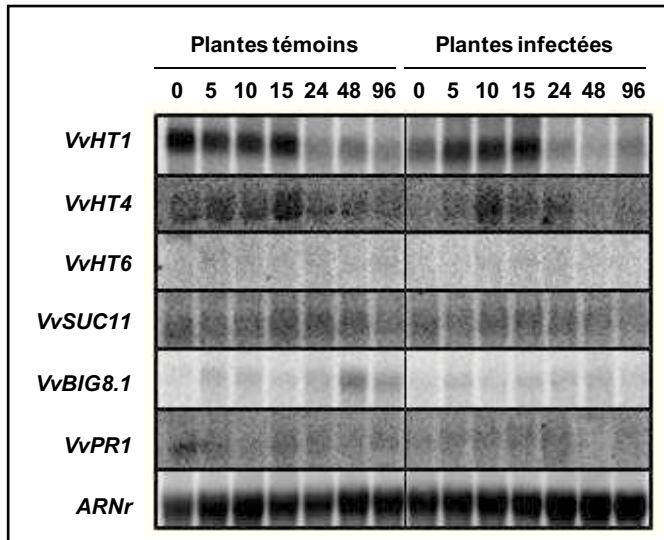


Figure 68 : Analyse du profil d'expression de gènes de transporteurs de sucres et de défenses dans les feuilles de vigne infectées en système aéroponique. Les feuilles de vigne ont été infectées à l'aide de conidies de *B. cinerea*. Les ARNs ont été extraits de 0 à 96 hpi puis l'expression des gènes de transporteurs et de défenses analysée par Northern blot (20µg par puits). Après hybridation avec des sondes-³²P (ADNc pleine longueur pour les transporteurs de sucres ; UTR3' pour les gènes de défenses), les membranes ont été exposées 16 h sur écrans du PhosphoImager.

Figure 69 : Expression de VvHT1 dans les feuilles de vignes cultivées en aéroponie. Les feuilles de vigne ont été infectées à l'aide de conidies de *B. cinerea*. Les ARNs ont été extraits de 0 à 96 hpi puis l'expression de VvHT1 analysée par Northern blot (20µg par puits). Après hybridation avec la sonde ADNc pleine longueur (³²P), la membrane a été exposée 16 h sur un écran PhosphoImager. Les signaux ont été normalisés par rapport aux signaux correspondant aux ARNr.

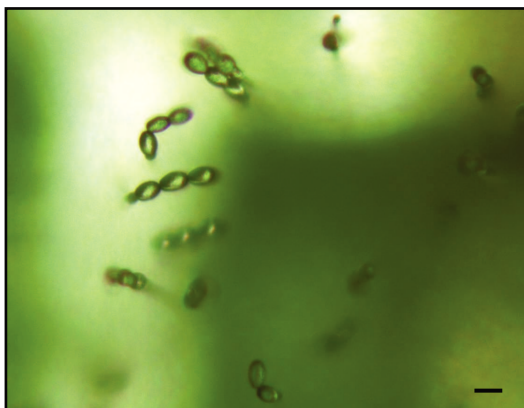
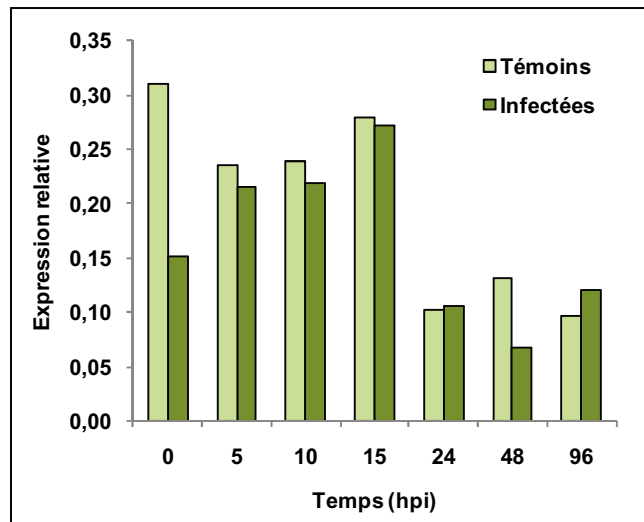


Figure 70 : Observation de l'oïdium sur feuille de vigne. Les vignes cultivées en système aéroponique ont été contaminées par l'agent de l'oïdium : *E. necator*. L'observation des colonies fongiques révèle la présence de conidiophores terminés par des chaînettes de conidies caractéristiques. (Trait : 30 µm)

proches ; ainsi l'utilisation des ADNc pleine longueur devait permettre de diminuer la spécificité des sondes et potentiellement d'augmenter la probabilité de mettre en évidence une différence d'expression d'un ou plusieurs gènes de transporteurs. Ces sondes ont été choisies arbitrairement dans la classe des transporteurs d'hexoses et de saccharose, plasmalemmiques ou tonoplastiques. Au niveau des gènes de défenses, notre analyse s'est focalisée dans un premier temps sur l'expression de *VvBIG8.1* et *VvPRI*.

Les résultats obtenus sont présentés figure 68 où chaque point de la cinétique représente un mélange des feuilles provenant de 3 plantes distinctes. Seul *VvHT1* montre un niveau d'expression significativement détectable dans la feuille, alors que *VvHT4*, *VvHT6* et *VvSUC11* sont faiblement exprimés. Cependant la comparaison des profils entre plantes infectées et plantes témoins ne permet pas de mettre en évidence une modification d'expression des gènes de transporteurs de sucres suite au traitement par les conidies. L'analyse ciblée sur l'expression de *VvHT1* (Fig. 69) confirme ce résultat. Les signaux observés à 5, 10 et 15 hpi dans les deux conditions témoins et traitées sont certainement dus au rythme circadien d'expression du gène.

Au niveau des gènes de défenses, nous pouvons également constater que ni *VvPRI* ni *VvBIG8.1* ne sont induits suite à l'inoculation des feuilles par les conidies (Fig. 68) malgré la possible activation de la voie des phytoalexines.

Ce premier essai d'infection sur plante n'a donc pas permis de mettre en évidence une réponse transcriptionnelle des gènes de transporteurs de sucres. Considérant la faible sévérité des symptômes observés sur une cinétique de 96 h, deux essais d'infection ont donc été conduits sur des cinétiques d'infection plus longues. Cependant, les plantes n'étant pas cultivées en conditions stériles avec le système aéroponique, ces deux essais ont systématiquement abouti à une contamination par un autre champignon blanc et poudreux identifié morphologiquement comme étant *Erysiphe necator*, agent de l'oïdium de la vigne (Fig. 70).

L'infection des vignes avec *B. cinerea* se révélant difficilement maîtrisable en système aéroponique en raison d'un environnement non stérile et propice aux contaminations extérieures, le dispositif expérimental a donc évolué vers une méthode de culture des vignes et d'infection *in vitro*. Bien que la quantité de matériel végétal soit limitée en système *in vitro*, ce dispositif permet néanmoins de maintenir les plantes en conditions axéniques jusqu'à leur infection et de limiter la colonisation des tissus exclusivement au champignon inoculé expérimentalement.

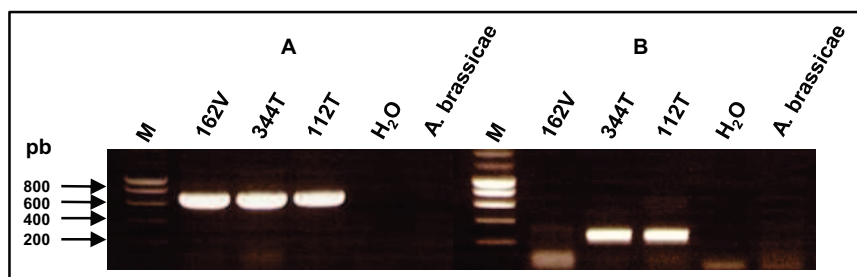


Figure 71 : PCR d'identification des souches de *B. cinerea* et de la sous-population « *transposa* ». La PCR a été effectuée à partir d'ADNg fongique extrait à partir de souches de *Botrytis* à l'aide du protocole de Möller *et al.* (1992). Les amplifications ont été effectuées sur la souche 112T en parallèle des deux autres souches 162V (*vacuma*) et 344T (*transposa*) ainsi que des témoins négatifs H₂O et *A. brassicae*. Les produits d'amplification ont été déposés sur gel agarose 1%. **A.** amorces C729+/- (Rigotti *et al.*, 2002) ; **B.** amorces FLIP2/FABR (Martinez *et al.*, 2008) ; M : marqueur de taille (Smart Ladder, Eurogentec).

1.4. Infection de plantules de vigne en système *in vitro*

Au cours de ce travail, une « dérive » dans la croissance et le niveau de sporulation de la souche 916T de *Botrytis* a pu être observée. En effet, bien que placée dans les mêmes conditions de culture au cours des repiquages successifs, cette souche a révélé au cours du temps une diminution dans sa vitesse de croissance, un changement d'aspect (mycélium plus clair et moins dense) ainsi qu'une absence de sporulation. Ces problèmes ont conduit au remplacement de la souche 916T par la souche 112T, décrite comme appartenant à la sous-population « *transposa* » de *B. cinerea* (Martinez *et al.*, 2003, 2005).

1.4.1. Test d'identification de *B. cinerea* par PCR

Comme mentionné dans le paragraphe 1.1.1. de ce chapitre, un test par PCR a été développé (Rigotti *et al.*, 200) afin de diagnostiquer l'espèce *Botrytis cinerea*. Ce test, qui utilise le couple d'amorces C729+/-, a donc été effectué sur la souche 112T avant l'infection de plantes. Parallèlement, un second test a été conduit pour confirmer l'appartenance de la souche utilisée à la sous-population « *transposa* ». Ce dernier utilise le couple d'amorces FLIP2/FABR décrit par Martinez *et al.* (2008) et permet l'amplification d'un fragment (277 pb) du transposon *Flipper*, exclusivement sur les souches « *transposa* » (le transposon est absent dans les « *vacuma* »). Deux autres souches de *Botrytis* ont également été utilisées comme témoins : 162V (*vacuma*) et 344T (*transposa*). Les amplifications ont été réalisées sur de l'ADNg extrait à partir des mycélia selon la méthode de Möller *et al.* (1992).

Après migration des produits PCR sur gel d'agarose 1%, les résultats obtenus avec les amorces C729+/- révèlent l'amplification d'un produit de 750 pb chez les trois souches de *Botrytis* (Fig. 71). L'absence d'amplification dans les deux témoins négatifs (H₂O et *A. brassicae*) confirme que les champignons entretenus au laboratoire appartiennent bien à l'espèce *B. cinerea*. Parallèlement, l'utilisation des amorces FLIP2/FABR a conduit à l'amplification d'un produit d'environ 300 pb à partir des souches 344T et 112T. Aucune amplification n'est observée avec la souche 162V, ni avec les deux témoins négatifs. Ces résultats démontrent que la souche 112T appartient bien à la sous-population « *transposa* » de l'espèce *Botrytis cinerea*. Ces vérifications étant faites, les conidies de cette dernière ont été utilisées pour infecter des vitroplants de vigne.

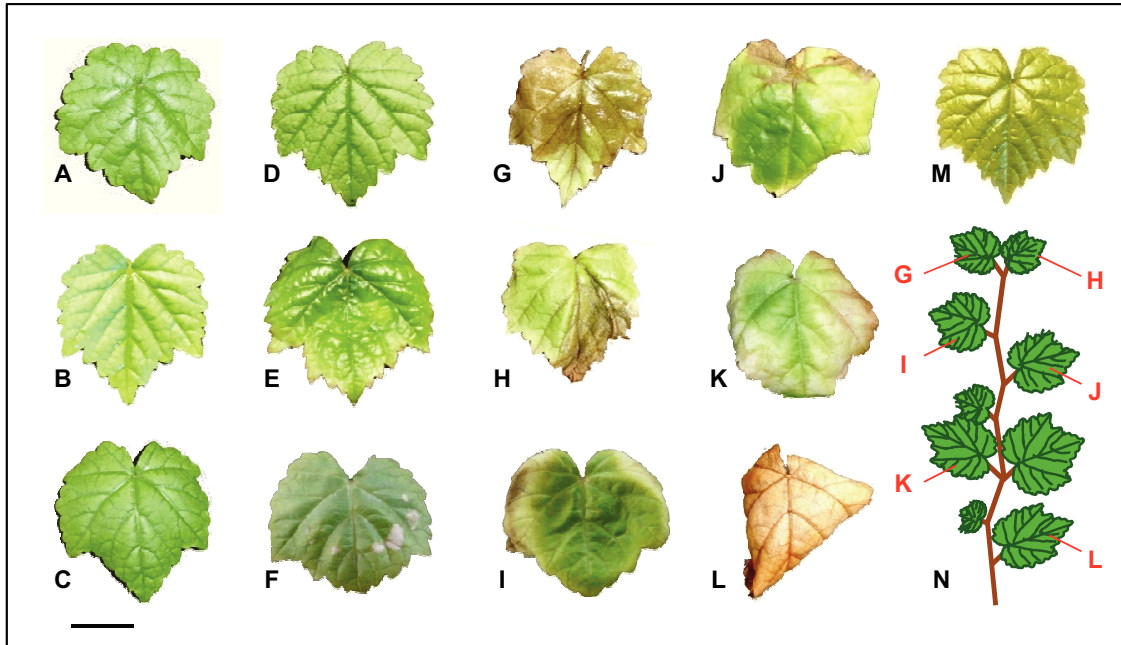


Figure 72 : Evolution des symptômes foliaires sur feuilles de vitroplants infectés par *B. cinerea*. Les feuilles ont été inoculées à l'aide d'une suspension conidienne de *B. cinerea*. L'observation des symptômes et le prélèvement des feuilles ont été effectués à 0 (A), 2 (B), 4 (C), 8 (D), 24 (E), 48 (F) et 96 hpi (G, H, I, J, K, L). La position des feuilles prélevées à 96 hpi est indiquée sur le schéma N. Témoin à 96 hpi (M). (Trait : 1,5 cm)

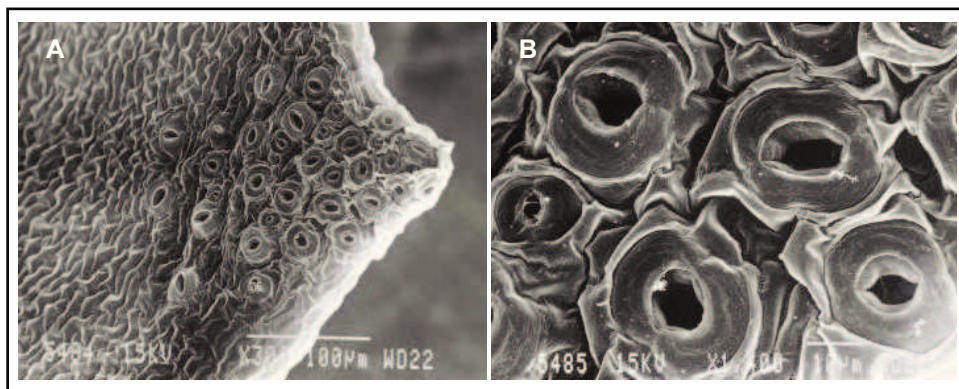


Figure 73 : Observation d'une pointe de feuille de vigne en microscopie électronique à balayage. L'observation de la face adaxiale des feuilles de vigne révèle la présence de groupements de structures ressemblant à des stomates au niveau des pointes. Ces structures (hydathodes ?) peuvent alors constituer des points d'entrée préférentiels pour le champignon. Les fragments de feuilles de vigne ont été fixés dans du PFA/glutaraldéhyde, passés au point critique puis métallisés à l'or (25 nm). Les observations ont ensuite été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Jeol 840 A).

1.4.2. Infection et suivi des symptômes sur vitroplants de vigne

Durant les 8 premières heures d'infection, aucun symptôme n'a pu être observé (Fig. 72 A, B, C, D). Cette période de temps est probablement nécessaire au champignon pour germer et pénétrer les tissus de l'hôte. Après 24 hpi, certaines parties de feuille commencent à changer de couleur en passant d'un vert vif au jaune pâle (Fig. 72 E). Cette dépigmentation, qui n'est pas nettement délimitée, résulte certainement d'une dégradation des chlorophylles ce qui suppose, qu'à ce stade de la cinétique, le champignon a probablement colonisé une partie des tissus. A 48 hpi, plusieurs zones nécrotiques, semblables à celles observées lors des phénomènes d'hypersensibilité (HR), peuvent être observées à la surface de certaines feuilles. L'étendue des symptômes reste cependant limitée à quelques taches sur la surface foliaire encore verte. Il faut attendre 96 hpi pour que les feuilles de vigne commencent à présenter des symptômes plus ou moins sévères en fonction des plantes et de la maturité des feuilles. La première feuille basale, qui provient de l'explant microbouturé, ainsi que les feuilles de l'apex manifestent les symptômes les plus avancés, caractérisés par d'importantes zones de macération ou un dessèchement total de la feuille (Fig. 72 G, H, L). A ce stade de l'infection, l'évolution de la maladie sur les feuilles intermédiaires semble plus progressive en se manifestant d'abord par une dépigmentation des tissus, suivie de leur nécrose. Il est également intéressant de noter que dans la majorité des cas, l'apparition des symptômes débute en périphérie de la feuille avant d'évoluer vers la partie centrale. Ainsi trois zones peuvent être généralement observées: une zone centrale encore verte, une zone intermédiaire dépigmentée (jaune) et une zone périphérique en macération (marron). Afin d'expliquer ce profil d'évolution des symptômes, la face adaxiale d'une feuille de vitroplant a été observée en microscopie électronique à balayage. Les observations révèlent la présence de groupements de structures ressemblant à des stomates exclusivement situés au niveau des pointes foliaires (Fig. 73). Ces structures peuvent alors facilement constituer des points d'entrée pour le champignon ce qui expliquerait l'apparition plus précoce des symptômes à la périphérie de la feuille. L'infection des vignes en système *in vitro* a donc permis le développement de symptômes caractéristique de *B. cinerea*.

1.4.3. Observation des différents stades développementaux de *B. cinerea* au cours de l'infection

Afin de pouvoir corréliser l'apparition des symptômes foliaires à la biologie du champignon, un suivi du développement de *Botrytis* sur la surface des feuilles a été effectué

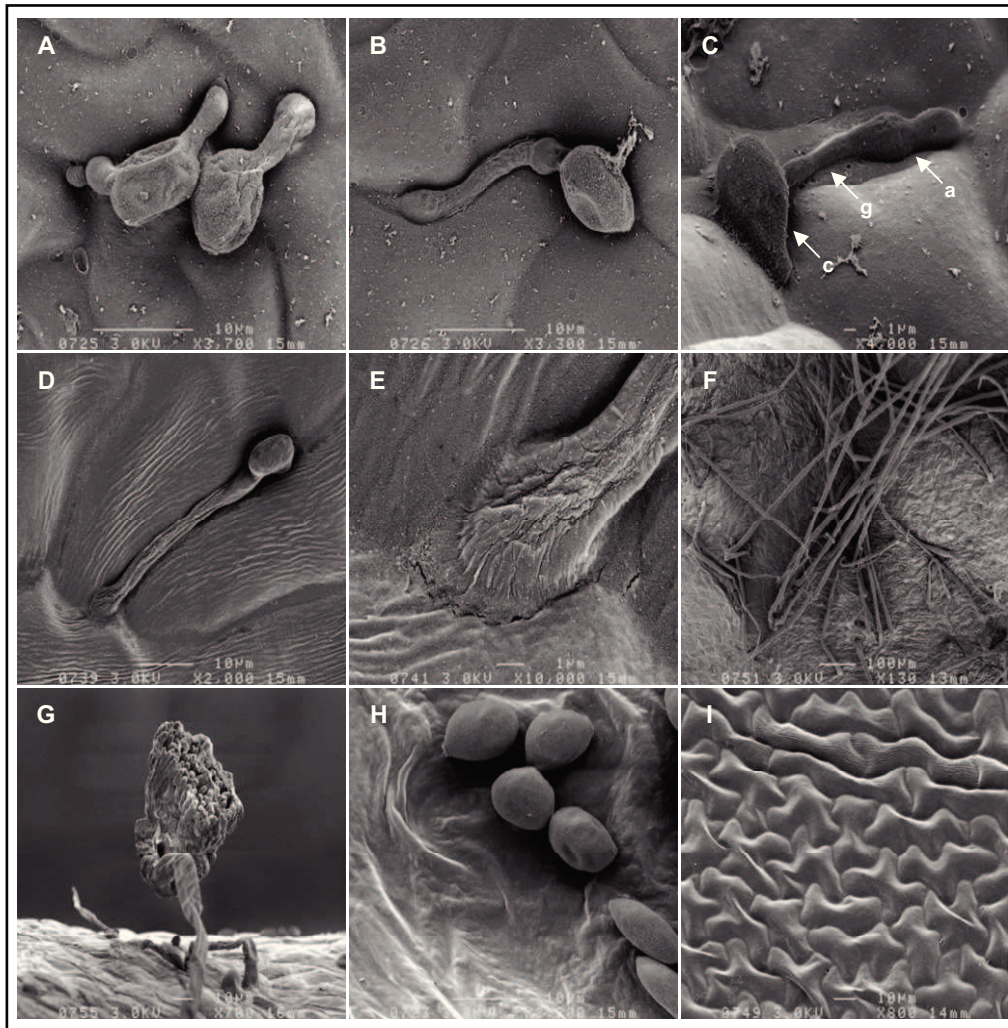


Figure 74 : Observation en microscopie électronique à balayage du développement de *B. cinerea* sur la surface des feuilles de vigne. Les observations ont été effectuées à 24 h (A), 48 h (B, C), 96 h (D, E) et 6 jours post inoculation (F, G, H). La surface d'une feuille témoin est présentée en I. Après inoculation, les conidies (c) émettent un tube germinatif (g) et développent une structure de type appressorium (a) afin de percer l'épaisse cuticule cireuse. Autour des sites de contact, la surface de l'épiderme de la feuille semble modifiée (C, E). Au terme d'environ une semaine d'infection, un mycélium de surface se développe avec l'apparition de fructifications sur les tissus nécrosés : les conidiophores (F, G). Ceux-ci produisent un grand nombre de conidies (H) qui constituent une source d'inoculum secondaire. Les échantillons ont été fixés dans du PFA/glutaraldéhyde, passés au point critique puis métallisés à l'or (25 nm). Les observations ont ensuite été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Jeol 840 A).

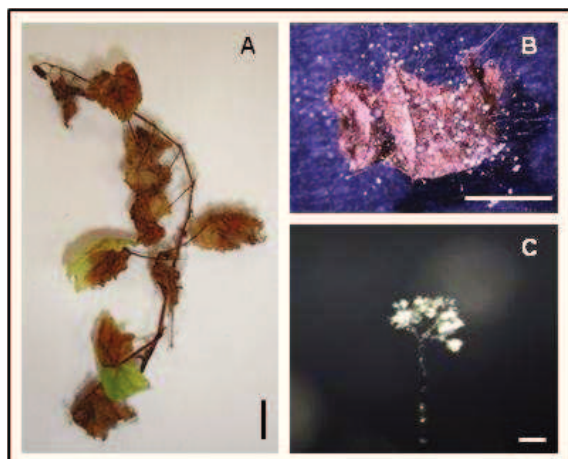


Figure 75 : Fructifications de *B. cinerea* sur vitroplant de vigne 15 jours après infection. Après de 2 semaines d'infection, les vitroplants de vigne sont presque entièrement nécrosés (A). Des plages de macération recouvrent les feuilles et de nombreuses fructifications du champignon peuvent être observées sur l'ensemble des surfaces foliaires colonisées (B). Des conidiophores sont émis (C), porteurs d'un grand nombre de conidies qui peuvent assurer d'autres cycle de contaminations secondaires. (Trait : 1cm (A et B) ; 50 μ m (C)).

en microscopie électronique à balayage. De 0 à 8 hpi, la présence du champignon n'a pas pu être vérifiée ce qui laisse supposer que les conidies ont été décrochées par les différents traitements (fixation + lavages) imposés par la technique. A partir de 24 hpi, leur adhésion à la surface de l'hôte est suffisamment importante pour qu'elles puissent être observées. Ainsi, nous pouvons constater que suite à l'inoculation, les conidies de *Botrytis* germent et développent un tube germinatif de longueur variable (Fig. 74 A, B, C, D). A l'extrémité de celui-ci, le champignon forme un renflement, l'appressorium, lui permettant de percer l'épaisse cuticule de la feuille de vigne. Au niveau des zones de contact entre la plante et son agent pathogène, il semble que la structure de l'épiderme soit modifiée (Fig. 74 C, E) ce qui laisse supposer une forte activité enzymatique au niveau de ces zones. Avec la colonisation des tissus, nous pouvons observer une déstructuration de la surface foliaire (zone de macération) et le développement d'un mycélium de surface ainsi que de nombreuses fructifications, les conidiophores (Fig. 74 F, G). Ces structures reproductrices sont porteuses de conidies qui, une fois disséminées sur la surface foliaire (Fig. 74 H), peuvent germer et constituer une source d'inoculum secondaire. Une infection poussée jusqu'à 15 jpi provoque la mort des vitroplants de vigne et un recouvrement total des tissus en macération par les conidiophores de *Botrytis* (Fig. 75).

Les symptômes observés sur feuilles (Fig. 72) coïncident donc avec les différents stades de développement du champignon sur son hôte (Van Kahn, 2006 ; Williamson *et al.*, 2007).

1.4.4. Ré-isolement du champignon et validation de l'expérimentation

Parallèlement à l'apparition des symptômes et au suivi du développement fongique par microscopie, un ré-isolement du champignon a été effectué à partir de feuilles placées sur milieu gélosé. L'ajout de cette étape de ré-isolement permet de s'assurer que le champignon se trouve bien sur les feuilles utilisées et de procéder à son identification. La figure 76 montre que 4 jours après dépôt d'une feuille infectée, prélevée à 96 hpi, sur milieu gélosé malt-agar, un mycélium se développe et couvre l'intégralité de la boîte de Pétri. Aucune croissance n'est observée à partir de feuilles témoins. Après environ 6 jours de culture, des conidies ont été prélevées dans de l'eau à partir du mycélium sporulant. Ces conidies (Fig. 77 A), d'aspect caractéristique de *Botrytis*, ont ensuite été ré-inoculées sur vitroplants de vigne par badigeonnage. Après 96 hpi, une reproduction des symptômes (dépigmentation, zones de nécrose et macération) a pu être observée sur feuille (Fig. 77 B). Des conidiophores du champignon ont également été mis en évidence après 6 jours d'infection (Fig. 77 C).

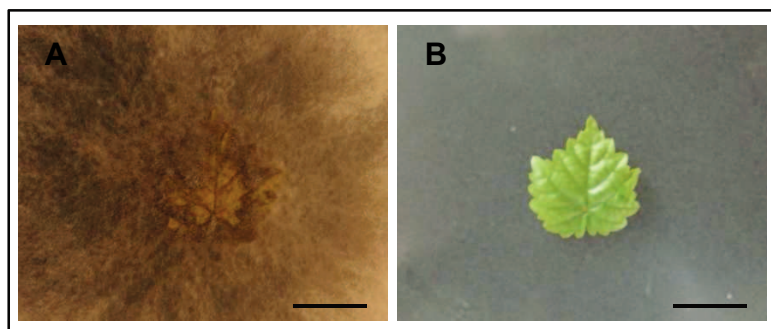


Figure 76 : Ré-isolement de *Botrytis* à partir de feuilles infectées. Après 96 hpi, des feuilles de vigne ont été placées sur milieu gélosé malt-agar. Après 4 jours de culture, un important développement mycélien est observé à partir des feuilles infectées (A) alors qu'aucune croissance ne se manifeste à partir des feuilles témoins (B). (Trait : 1,5 cm)

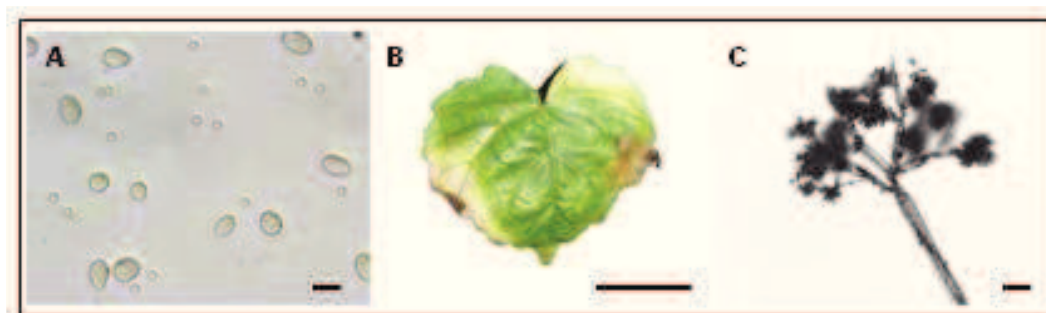


Figure 77 : Obtention de symptômes sur feuille partir du champignon ré-isolé. Suite au ré-isolement de *Botrytis* sur milieu malt-agar, des conidies ont été prélevées pour infecter de nouvelles plantes (A). Après 96 hpi, des symptômes caractéristiques de nécrose et de macération sont observés (B). Au terme de 6 jours d'infection des conidiophores sont différenciés par le champignon (C). (Trait : 10 µm (A) ; 1 cm (B) ; 50µm (C))

Figure 78 : PCR d'identification de *B. cinerea*. Le champignon a été ré-isolé sur milieu malt-agar à partir de feuilles infectées *in vitro*. Le mycélium a été prélevé par raclage à la surface du milieu gélosé puis l'ADNg extrait suivant le protocole de Möller *et al.* (1992). Les amplifications ont été effectuées à l'aide des couples d'amorces C729+/- (Rigotti *et al.*, 2002 ; puits 1) et FLIP2/FABR (Martinez *et al.*, 2008 ; puits 2) en parallèle des deux témoins H₂O (puits 3) et *A. brassicae* (puits 4).

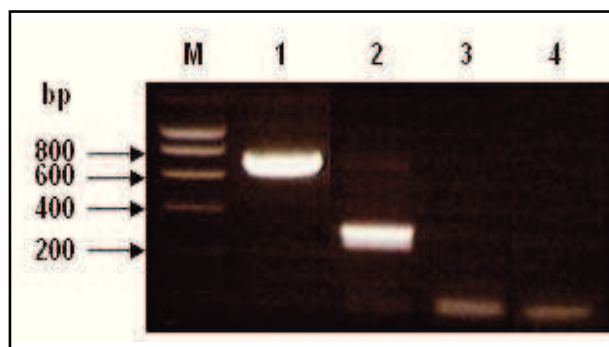
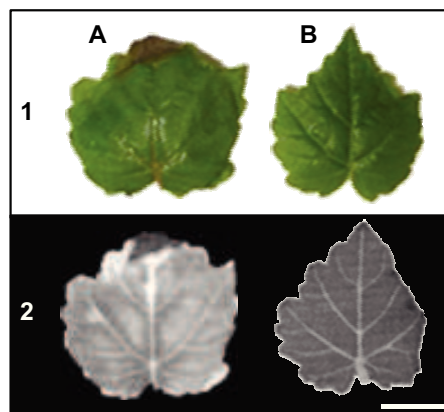


Figure 79 : Induction de la voie des phénylpropanoïdes en réponse à l'infection par *B. cinerea*. Observation de feuilles de vitroplants à 96 hpi. A. feuille infectée. B. feuille témoin. La partie supérieure de l'image (1) présente l'observation des symptômes en lumière naturelle et la partie inférieure (2) l'observation correspondante en lumière UV. (Trait : 1 cm)



Parallèlement au prélèvement des conidies, le mycélium a également été récupéré par raclage modéré à la surface du milieu malt-agar. Après extraction de l'ADNg fongique par la méthode de Möller *et al.* (1992), l'identification formelle de *Botrytis* a été effectuée à l'aide des deux tests PCR précédemment cités dans ce chapitre (Rigotti *et al.*, 2002 ; Martinez *et al.*, 2008). Les résultats révèlent l'amplification d'un produit de 750 pb avec le couple d'amorces C729+/-, et d'un produit d'environ 300 pb avec le couple FLIP2/FABR (Fig. 78), typique d'une souche de type *transposa*.

L'ensemble de ces résultats confirme formellement que le champignon initialement inoculé sur feuille puis ré-isolé appartient bien à *Botrytis cinerea* et plus particulièrement à la sous-population « *transposa* ». Cette démarche permet de valider l'expérimentation d'infection sur plantes.

1.4.5. L'infection *in vitro* par *B. cinerea* induit-elle une réponse de la plante avant la mort des tissus ?

1.4.5.1. *Synthèse de resvératrol dans les feuilles infectées*

Afin de déterminer si la perception de *Botrytis* par la plante pouvait déclencher la synthèse de composés comme les phytoalexines (resvératrol), un test simple a été effectué sous UV. Les noyaux phénoliques de ces molécules, qui appartiennent à la famille des phénylpropanoïdes, ont en effet la propriété de fluorescer aux UV. L'observation à 96 hpi d'une feuille infectée révèle une fluorescence autour des tâches nécrotiques provoquée par le champignon (Fig. 79) ce qui suppose une production de resvératrol autour des points d'infection. Considérant ces premiers résultats, un dosage de la phytoalexine a été réalisé au cours de la cinétique d'infection par HPLC. Les résultats montrent qu'il y a bien une production de resvératrol dans les feuilles de vigne infectées dès 24 hpi (Fig. 80). Initialement de 1,47 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière fraîche à 24 hpi, cette concentration augmente à 48 puis 96 hpi avec des concentrations respectives de 3,02 et 13,51 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Une faible quantité est détectée dans les feuilles témoins (0,8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF en moyenne) mais bien inférieure à celle observée dans les feuilles inoculées avec le champignon. Bien que l'infection des feuilles par *Botrytis* aboutisse à la mort des tissus, sa perception déclenche néanmoins la mise en place de mécanismes de défense chez la vigne, celle-ci passant entre autres par la production de phytoalexines comme le resvératrol. Bien que non étudiée au cours de ce travail, l'induction d'un certain nombre de gènes, comme la stilbène synthase, suite à la reconnaissance du champignon apparaît alors évidente.

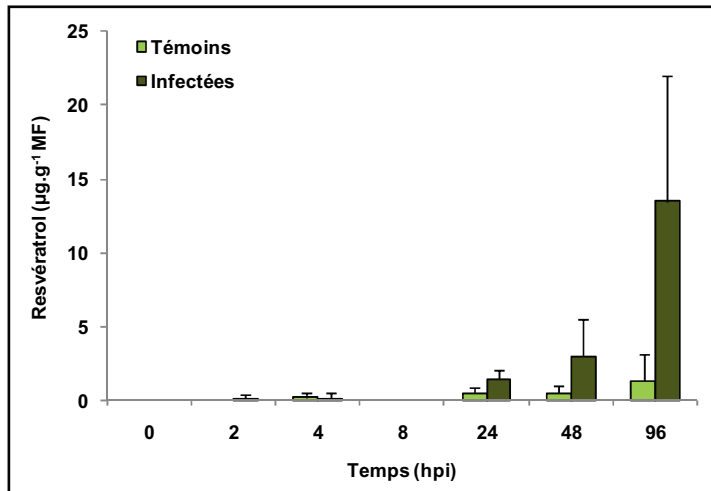


Figure 80 : Production de resvératrol dans les feuilles de vigne. Après infection des feuilles par *B. cinerea*, un dosage de resvératrol a été effectué par HPLC. Pour chaque point de la cinétique, 5 feuilles de vigne ont été utilisées. Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions biologiques indépendantes.

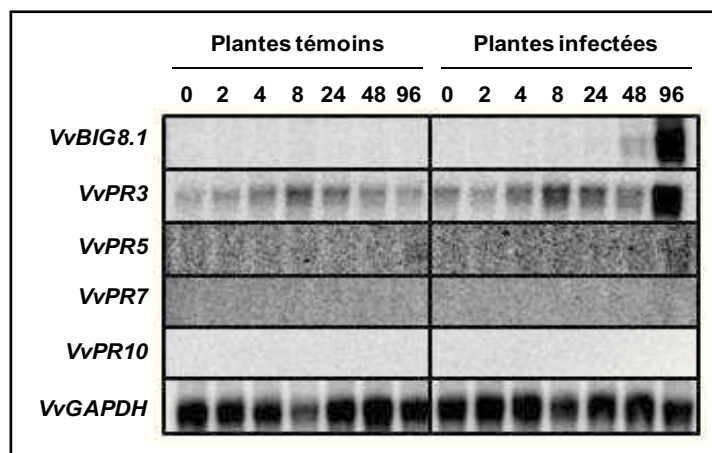


Figure 81 : Analyse du profil d'expression de gènes de défense dans les feuilles de vignes cultivées *in vitro*. Les feuilles de vigne ont été infectées à l'aide de conidies de *B. cinerea*. Les ARNs ont été extraits de 0 à 96 hpi puis l'expression des gènes de défenses analysée par Northern blot (20µg par puits). Après hybridation avec des sondes-³²P, les membranes ont été exposées 16 h sur un écran de PhosphoImager. Les résultats sont représentatifs de 3 répétitions biologiques indépendantes.

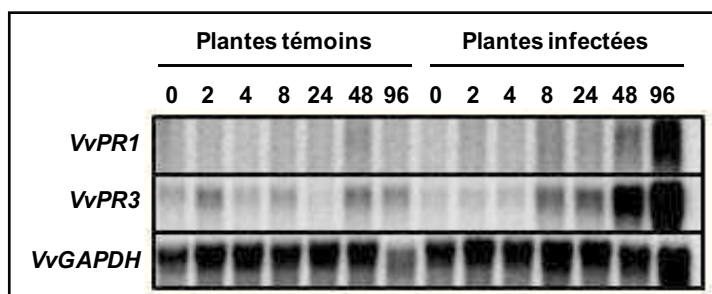


Figure 82 : Analyse du profil d'expression de gènes de défense dans les tiges de vignes infectées en système *in vitro*. Les feuilles de vigne ont été infectées à l'aide de conidies de *B. cinerea*. Les ARNs ont été extraits de 0 à 96 hpi puis l'expression des gènes de défenses analysée par Northern blot (20µg par puits). Après hybridation avec des sondes-³²P, les membranes ont été exposées 16 h sur écrans PhosphoImager. Les résultats sont représentatifs de 3 répétitions biologiques indépendantes.

1.4.5.2. Induction de gènes de défense dans les feuilles de vigne

L'analyse de l'expression des gènes de défense a été effectuée par Northern blot en ciblant sur le gène *VvBIG8.1* et quelques gènes de PR-protéines. Les résultats révèlent une induction transcriptionnelle de *VvBIG8.1* à 48 hpi avec un maximum observé à 96 hpi (Fig. 81). Cette induction de $7,9 \pm 0,8$ et $40,2 \pm 30,5$ fois respectivement semble coïncider étroitement avec l'apparition des zones de nécrose et de macération observées sur feuilles infectées. En ce qui concerne les gènes de PR-protéines analysés, seul *VvPR3* montre une induction en réponse à l'infection avec un rapport d'induction de $2,3 \pm 1,2$ fois à 48 hpi et $7,7 \pm 3,3$ fois à 96 hpi. L'expression des autres gènes *VvPR5*, *VvPR7* et *VvPR10* ne semble pas modifiée. Ces résultats confirment donc, qu'en plus de la production de resvératrol observée dans les feuilles infectées, plusieurs gènes de défense sont induits suite à l'infection.

1.4.5.3. Déclenchement d'une réponse systémique

Afin de mettre en évidence une éventuelle systémie dans la mise en place des défenses, l'expression de 2 PR-protéines a été analysée dans les tiges de vignes inoculées au niveau foliaire. Dans cette analyse réalisée par Northern blot, chaque point de la cinétique représente un mélange de tiges de 4 plantes différentes. Les résultats montrent que les gènes *VvPRI* et *VvPR3* sont induits dans les tiges de vigne suite à l'infection des feuilles par *Botrytis* (Fig. 82). Tous deux induits d'environ 2,5 fois à 48 hpi, les rapports d'induction sont maximum à 96 hpi avec des valeurs respectives de 7 ± 4 (*PRI*) et 15 ± 12 fois (*PR3*). Au niveau temporel, les réponses observées dans les tiges semblent mises en place parallèlement à celles des feuilles. Il semble cependant que le niveau d'induction de *VvPR3* soit plus élevé dans la tige. Ces résultats montrent donc que l'infection foliaire par *B. cinerea* provoque la mise en place d'une réponse systémique de défenses chez la vigne.

1.4.5.4. Etude de l'expression de gènes codant pour des transporteurs de sucres en réponse à l'infection par *B. cinerea*.

Les feuilles de vitroplants infectées ou non par *B. cinerea* (112T) ont été prélevées sur une cinétique allant de 0 à 96 hpi. Pour chaque temps, les feuilles de 4 plantules ont été mélangées afin d'en extraire les ARNs. L'analyse de l'expression des gènes a été effectuée par Northern blot en utilisant les ADNc pleine longueur de certains transporteurs de sucres comme sondes. Au cours de cette expérience, une étude portant sur l'identification, la caractérisation fonctionnelle et le profil d'expression de *VvHT3*, *VvHT4* et *VvHT5* a été

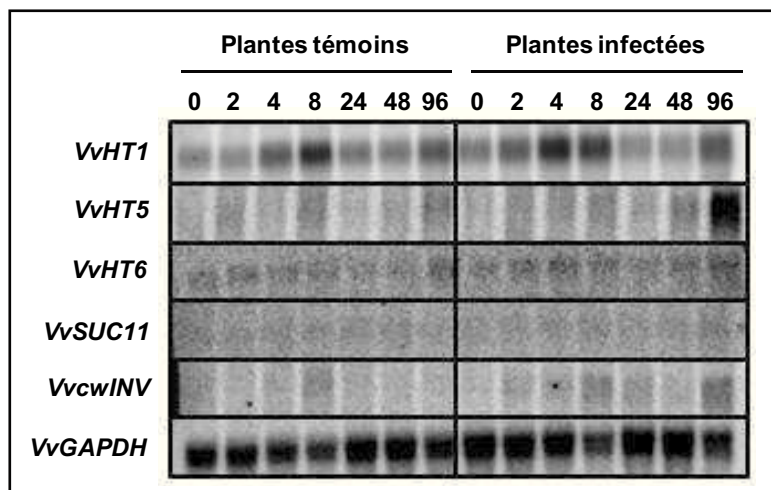


Figure 83 : Analyse du profil d'expression de gènes codant pour des transporteurs de sucres dans les feuilles de vignes cultivées *in vitro*. Les feuilles de vigne ont été infectées à l'aide de conidies de *B. cinerea*. Les ARNs ont été extraits de 0 à 96 hpi puis l'expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres analysée par Northern blot (20µg par puits). Après hybridation avec des sondes-³²P (ADNc pleine longueur), les membranes ont été exposées 16 h sur un écran du PhosphoImager. Les résultats sont représentatifs de 3 répétitions biologiques indépendantes.

Tableau 17 : Rapport d'expression de *VvHT5* et *VvcwINV* à 48 et 96 hpi. Les rapports d'induction transcriptionnelle ont été calculés après calibration des signaux par les signaux correspondant à *VvGAPDH*. Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 répétitions biologiques indépendantes.

	48 hpi	96 hpi
<i>VvHT5</i>	2,87 ± 1,98	19,78 ± 6,55
<i>VvcwINV</i>	1,21 ± 0,70	2,27 ± 0,41

publiée (Hayes *et al.*, 2007). Dans la discussion de cette étude, bien qu'aucune expérience ne soit décrite, les auteurs ont reporté (en « résultats non publiés ») la co-induction de *VvHT5* avec une invertase pariétale (*VvcwINV*) lors de stress biotiques et abiotiques chez la vigne. Ainsi, après avoir isolé et cloné l'ADNc de *VvcwINV*, l'analyse de son expression a également été effectuée en réponse à l'infection par *Botrytis*.

Comme précédemment observé dans les feuilles de vignes cultivées en aéroponie, le niveau d'expression du gène *VvHT1* dans les feuilles des vitroplants est supérieur à celui des autres gènes analysés (Fig. 83). Son expression est significativement détectée dans les feuilles témoins et infectées avec un maximum de transcrits observé à 8 hpi. Néanmoins, aucune induction transcriptionnelle de ce gène n'a été mise en évidence suite à l'infection par *B. cinerea*. L'analyse d'expression des deux autres gènes de transporteurs *VvHT6* et *VvSUC11* montre qu'ils sont peu exprimés dans les feuilles de vigne et qu'ils ne répondent également pas à l'infection par le champignon.

Une réponse transcriptionnelle est cependant mise en évidence avec les sondes *VvHT5* et *VvcwINV*. L'observation des profils d'expression révèle que ces deux gènes sont induits en fin de cinétique notamment autour de 96 hpi (Fig. 83). Le calcul des rapports d'induction (Tableau 17) montre une induction de *VvHT5* à 48 hpi (2,9 fois) et un maximum à 96 hpi (19,8 fois). A un niveau moindre, *VvcwINV* suit le même profil d'expression avec des valeurs d'induction respectives de 1,2 et 2,3. Ces résultats montrent donc que l'infection de feuilles de vigne par *B. cinerea* induit la co-expression d'au moins un gène de transporteurs de sucres et d'une invertase pariétale : *VvHT5* et *VvcwINV*. L'induction de ces deux gènes semble coïncider avec l'apparition des tâches nécrotiques et zones de macération observées sur feuilles. De plus, l'intensité des réponses semble maximum à 96 hpi ce qui coïncide avec l'induction des gènes de défense *VvBIG8.1* et *VvPR3* ainsi qu'avec le pic de production de resvératrol.

1.5. Réponses sur baies naturellement infectées au vignoble

Afin de compléter les résultats obtenus sur vigne en système *in vitro*, des baies de Chardonnay naturellement atteintes de pourriture grise ont été récoltées au vignoble (domaine de la Protection des Végétaux, Biard). Ces baies, saines ou infectées, ont été prélevées 5 jours avant la récolte soit environ un mois après véraison. Après extraction des ARNs, l'expression de plusieurs gènes codant pour des transporteurs d'hexoses, une invertase et deux PR-protéines a été analysée par Northern blot. Les résultats montrent que les signaux correspondant à *VvHT5* et *VvPR3* sont plus intenses dans les baies infectées que dans les baies

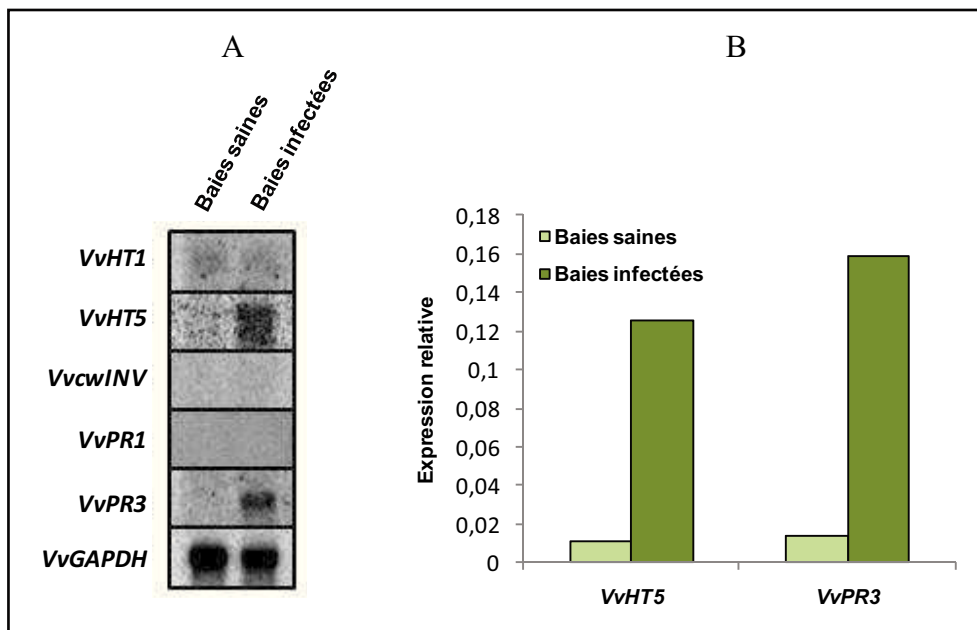


Figure 84 : Expression de gènes de transporteurs d'hexoses, d'invertase et de PR-protéines dans les baies de Chardonnay prélevées au vignoble. Des baies de Chardonnay saines et infectées par la pourriture grise ont été prélevées au vignoble 5 jours avant récolte (1 grappe par condition). Après extraction des ARNs, l'analyse de l'expression de certains gènes de transporteurs de sucres, d'une invertase et de PR-protéines a été conduite par Northern blot. Après hybridation avec des sondes-³²P, les membranes ont été exposées 16 h sur écrans PhosphoImager. **A.** Images des membranes après exposition. **B.** Représentation graphique de l'induction de *VvHT5* et *VvPR3*.

Tableau 18 : Rapport d'expression de *VvHT5* et *VvPR3* dans les baies de Chardonnay infectées. Les signaux correspondant aux gènes ont été normalisés par rapport à l'expression de *VvGAPDH* avant calcul des rapports d'induction.

	Baies infectées
<i>VvHT5</i>	11,28
<i>VvPR3</i>	11,17

saines (Fig. 84 A). En effet, la normalisation de ces signaux par rapport à l'expression de *VvGAPDH* révèle une quantité de transcrits correspondant aux deux gènes bien plus élevée dans les baies symptomatiques (Fig. 84 B), environ 11 fois plus importante que dans les baies saines (Tableau 18). L'expression de *VvHT1*, *VvcwINV* et *VvPR1* n'est pas ou peu détectée dans les deux conditions. Les deux gènes *VvHT5* et *VvPR3* sont donc induits dans les baies de Chardonnay naturellement infectées par *B. cinerea*, bien que celles-ci soient à un stade de maturation avancé.

2. Analyse des réponses de la vigne dans le cas d'une interaction biotrophe

Botrytis cinerea étant un agent pathogène nécrotrophe, son mode trophique implique une lyse cellulaire et une décomposition des tissus colonisés caractérisées par l'apparition de nécroses et de zones de macération. Cependant, supposant que le champignon pouvait se comporter comme un biotrophe durant les phases de l'interaction qui précèdent la mort des tissus, nous avons voulu déterminer si les réponses de la vigne obtenues avec *Botrytis* étaient comparables à celles induites par un agent biotrophe. Ainsi nous avons analysé l'expression de gènes codant pour des transporteurs de sucres et des protéines de défense au cours de l'interaction vigne/*Erysiphe necator*, agent de l'oïdium. *E. necator* étant un ectoparasite obligatoire, l'inoculation des vitroplants de vigne a été réalisée par contact de disques foliaires infectés et sporulents à la surface des feuilles. Les feuilles témoins n'ont subi aucun traitement.

2.1. Développement de l'oïdium sur feuilles de vigne

Les feuilles de vitroplants inoculées avec l'oïdium restent asymptomatiques durant les 3 premiers jours d'infection (Fig. 85). A partir de 4 jpi, de petites taches blanches aux contours mal définis commencent à apparaître sur la face adaxiale des feuilles. A ce stade de la cinétique d'infection, les symptômes restent limités à 2 voire 3 taches par feuille (Fig. 85 E). Après une semaine d'infection, les symptômes sont bien visibles et caractérisés par un feutrage blanc épais qui commence à s'étendre sur les feuilles (Fig. 85 F). Au terme de 10 jpi, le mycélium dense et poudreux a envahi l'ensemble du limbe provoquant un gaufrage et un repliement de celui-ci (Fig. 85 G, H). A 15 jpi, les feuilles les plus gravement touchées sont recouvertes d'un mycélium grisâtre et enroulées sur elles-mêmes (Fig. 85 I). Certaines feuilles sont également de couleur jaunâtre.

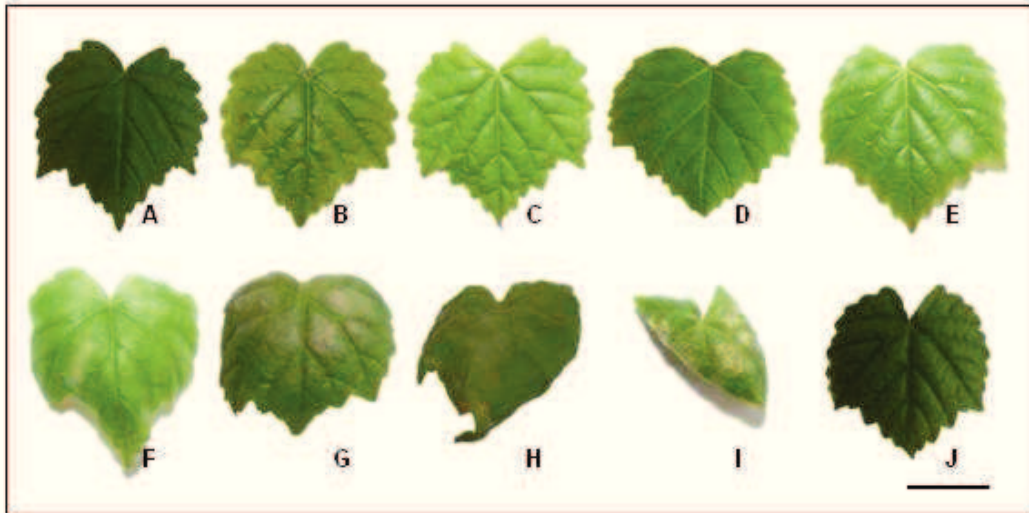


Figure 85 : Evolution des symptômes foliaires sur feuilles de vitroplants infectées par *E. necator*. Les feuilles ont été inoculées par « tapotement » de disques foliaires infectés par *E. necator*. L'observation des symptômes et le prélèvement des feuilles ont été effectués à 0 (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D), 4 (E), 7 (F), 10 (G, H) et 15 jpi (I). Témoin à 15 jpi (J). (Trait : 1,5 cm)

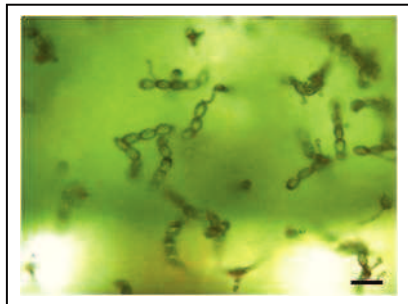


Figure 86 : Production de conidiophores et de conidies par *E. necator*. Après 10 jours d'infection, le champignon forme des conidiophores sur la surface foliaire, chacun porteur de 3 à 6 conidies. (Trait : 50 μ m)

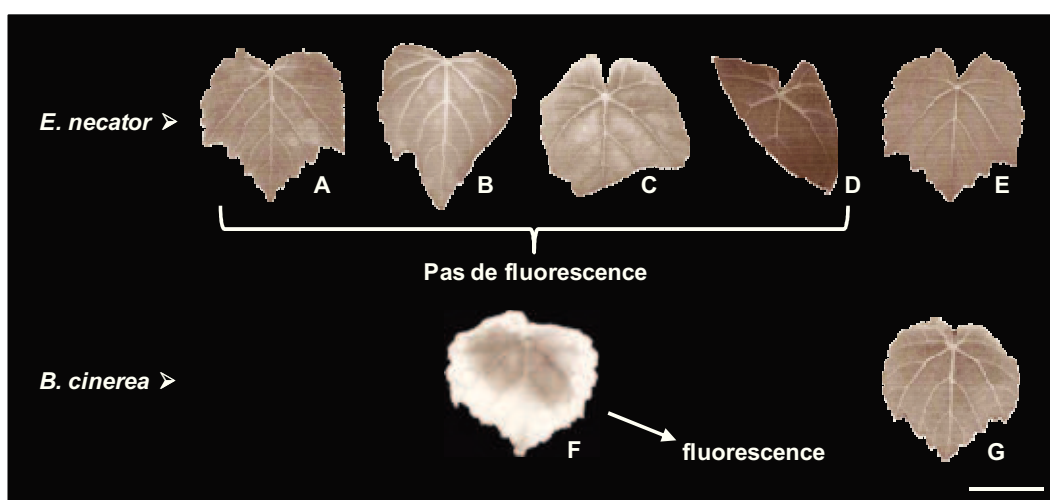


Figure 87 : Observation de feuilles infectées par *E. necator* sous lumière UV. Les feuilles infectées de vitroplants de vigne ont été prélevées puis directement observées sous lumière UV. Les prélèvements des feuilles oïdiées ont été effectués à 4 (A), 7 (B), 10 (C) et 15 jpi (D). Témoin à 15 jpi (E). Une feuille infectée par *B. cinerea* (4 jpi) a été observée en parallèle (F). Témoin à 4 jpi (G). (Trait : 1 cm)

L'observation d'un limbe de feuille à 10 jpi à l'aide d'un microscope optique révèle la production de conidiophores et de conidies expliquant l'aspect poudreux du champignon à ce stade de la cinétique (Fig. 86). Contrairement à *Botrytis cinerea* dont les conidiophores prennent la forme d'arbuscules ramifiés, ceux d'*Erysiphe necator* ne sont pas ramifiés et portent les conidies en chaînettes à leur extrémité. Celles-ci sont ovoïdes, au nombre de 3 à 6 par conidiophore et d'environ 25 µm de long ; elles sont donc en moyenne 2,5 fois plus grosses que les conidies de *Botrytis*.

2.2. Production de resvératrol par les feuilles oïdiées

Afin de déterminer si la perception d'*Erysiphe necator* par la plante pouvait, comme observé avec *Botrytis*, déclencher la synthèse de composés phénoliques comme le resvératrol, des feuilles présentant des symptômes de l'oïdium ont été observées sous UV parallèlement à une feuille infectée par *Botrytis cinerea*. Les observations montrent que, contrairement à *Botrytis* qui induit une fluorescence autour des zones d'infection à 4 jpi, les feuilles oïdiées ne révèlent aucune fluorescence sous UV, même chez les plus attaquées à 15 jpi (Fig. 87). Ces résultats semblent donc montrer que l'infection de la vigne par *E. necator* n'induit pas la voie des phénylpropanoïdes conduisant à la synthèse des phytoalexines. Suite à ce test, un dosage du resvératrol par HPLC n'a pas été jugé utile.

2.3. Mise en place de défenses et induction de gènes du métabolisme carboné en réponse à *E. necator*

Les feuilles de vitroplants infectées ou non par *E. necator* ont été prélevées sur une cinétique allant de 4 à 15 jours d'infection. Pour chaque temps, les feuilles de 5 plantules ont été mélangées afin d'en extraire les ARNs. L'analyse de l'expression des gènes a été effectuée par Northern blot et ciblée sur les gènes induits en réponse à l'infection par *Botrytis* : *VvHT5*, *VvcwINV1*, *VvPR1* et *VvPR3*.

Les résultats obtenus montrent que *VvHT5* et *VvcwINV1* sont induits dans les feuilles suite à l'infection par l'agent de l'oïdium (Fig. 88). Une co-induction des deux gènes est observée à 7 jpi avec une réponse maximum détectée à 15 jpi. Pour ce dernier point de la cinétique, *VvHT5* révèle une expression 4,15 fois supérieure dans les feuilles infectées par rapport aux feuilles témoins, l'induction de *VvcwINV1* étant du même ordre de grandeur (5,36 fois, Tableau 19). De plus, ces deux gènes semblent surexprimés parallèlement à la mise en place de défenses puisque *VvPR1* et *VvPR3* sont également induits suite à l'infection. Le gène

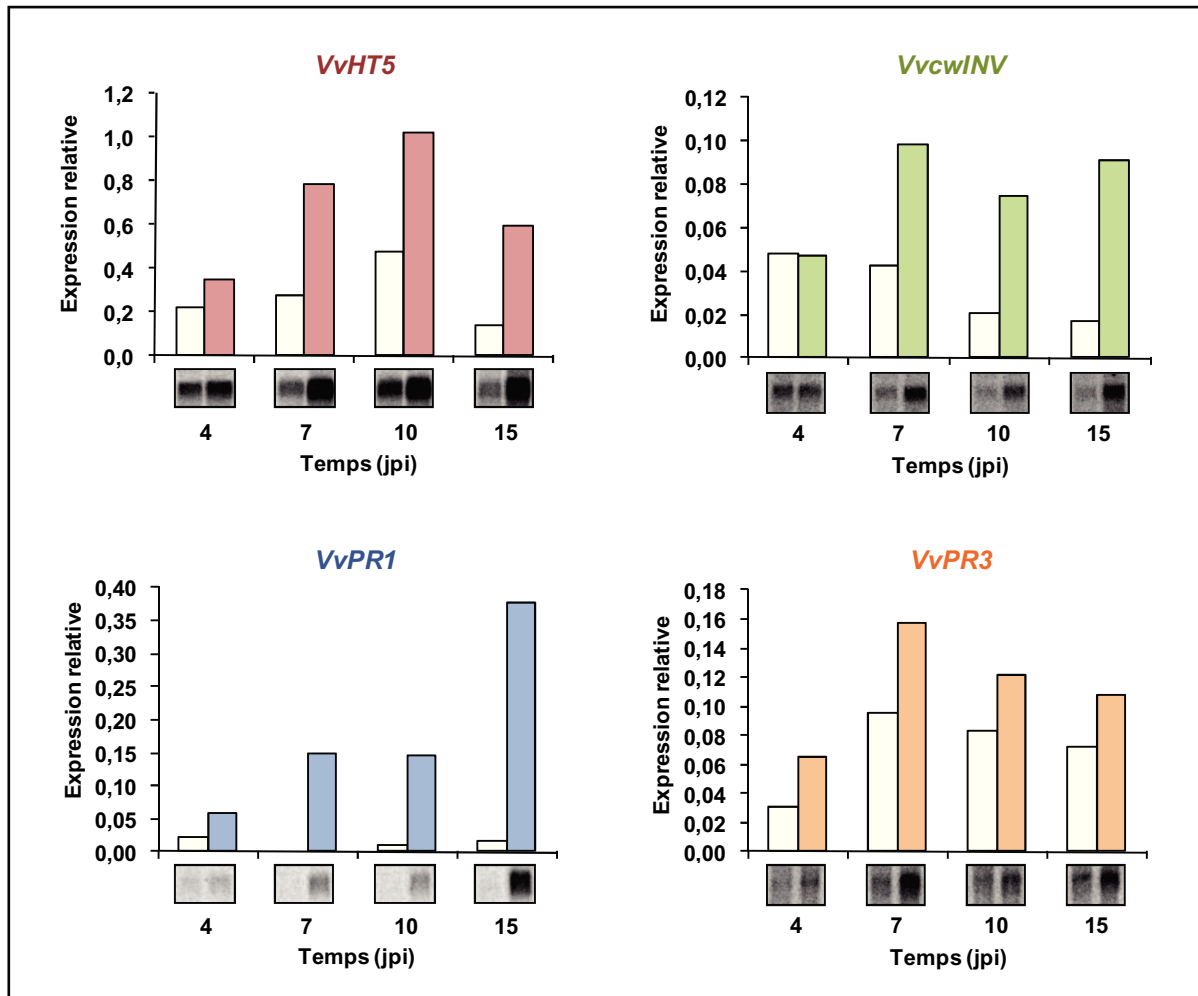


Figure 88 : Analyse du profil d'expression de *VvHT5*, *VvcwINV*, *VvPR1* et *VvPR3* dans les feuilles de vigne infectées par *E. necator*. Les feuilles de vigne ont été infectées à l'aide de disques foliaires oïdiés. Les ARNs ont été extraits de 4 à 15 jpi puis l'expression des 4 gènes analysée par Northern blot (20µg par puits). Après hybridation avec des sondes-³²P, les membranes ont été exposées 16 h sur des écrans du PhosphoImager. Les graphiques représentent les valeurs d'expression de chaque gène normalisées par rapport à l'expression de *VvGAPDH*. Feuilles témoins (blanc), feuilles infectées (couleur).

Tableau 19 : Rapport d'expression de *VvHT5*, *VvcwINV*, *VvPR1* et *VvPR3* dans les feuilles de vigne oïdiées. Les rapports d'expression (infectées/témoins) ont été calculés après calibration des signaux par rapport à l'expression de *VvGAPDH*.

	4 jpi	7 jpi	10 jpi	15 jpi
<i>VvHT5</i>	1,54	2,87	2,13	4,15
<i>VvcwINV</i>	0,98	2,33	3,64	5,36
<i>VvPR1</i>	2,38	13,96	13,77	22,76
<i>VvPR3</i>	2,07	1,64	1,46	1,48

VvPRI est le plus fortement induit des deux gènes de défense avec des valeurs d'induction d'environ 14 fois à 7 et 10 jpi et de 23 fois au terme de 2 semaines d'infection. *VvPR3* semble répondre plus faiblement avec un rapport d'induction d'environ 1,5 fois sur l'ensemble de la cinétique (Tableau 19).

3. Discussion

L'objectif de ce travail étant de mettre en évidence une induction transcriptionnelle de gènes codant pour des transporteurs de sucres au cours d'une interaction vigne/champignon phytopathogène, la première étape de notre étude a été d'infecter des plants de vigne avec un agent fongique. En partant du postulat que lors des phases préliminaires d'une interaction l'agent pathogène se comporte comme un agent biotrophe, notre choix s'est initialement porté sur le champignon nécrotrophe *B. cinerea* pour des raisons de facilité de culture *in vitro* et de production de conidies. La souche 916T étant présente au laboratoire depuis de nombreuses années, il est apparu nécessaire de vérifier son appartenance à l'espèce *B. cinerea* par PCR. Ce test nous a permis de confirmer que la souche 916T cultivée appartenait bien à l'espèce désirée.

3.1. Développement de la pourriture grise sur feuilles de vignes cultivées en serre

3.1.1. Symptômes foliaires et germination du champignon

Afin de se rapprocher au maximum des conditions trouvées du vignoble et de maximiser la quantité de matériel végétal obtenu, des plants de vigne ont été cultivés en serre puis infectés. Outre le fait d'être relativement rapide, ce mode d'inoculation par pulvérisation a été choisi afin de disperser les conidies de façon la plus homogène possible sur la surface foliaire. Après le traitement, les plantes ont ensuite été ensachées à l'aide de sacs plastiques transparents percés afin de maintenir un microclimat humide autour des feuilles. Parallèlement, des humidificateurs ont été placés devant chaque lot de plantes et des bassinages réguliers du sol ont été effectués toutes les 2-3 heures afin d'élever au maximum le taux d'humidité relative. Cependant, malgré ces efforts mis en œuvre pour favoriser le développement du champignon, aucun symptôme caractéristique de *B. cinerea* n'a pu être observé sur les feuilles de vigne au terme de 15 jours post-inoculation (jpi).

La viabilité des conidies a rapidement été mise hors de cause dans ce résultat obtenu en serre. En effet, afin de vérifier le pouvoir germinatif des conidies inoculées sur feuilles, un test de germination avait été effectué sur du milieu gélosé malt-agar en parallèle de

l'infection. Or, dès les premiers jours, la culture placée à 22°C et à l'obscurité a révélé un développement mycélien caractéristique sur le milieu traduisant de la germination des conidies utilisées. Ainsi, bien que les conditions *in vitro* soit significativement différentes du système « plante », il a été conclu que l'absence de symptômes observée en serre n'était pas attribuable au pouvoir germinatif des conidies d'autant plus que la présence d'extraits de malt et de sucre (glucose) dans la suspension conidienne ont généralement un effet stimulateur sur la germination (Cole *et al.*, 1996 ; Doehlemann *et al.*, 2005, 2006a ; Elad, 1988 ; Szejnberg et Blakeman, 1973).

Nous nous sommes donc intéressés aux conditions de température et d'humidité relative qui peuvent exercer une grande influence sur la germination des conidies. Chez *Botrytis cinerea* la germination des conidies peut s'effectuer dans une large gamme de températures allant de 1 à 30°C avec un optimum situé entre 15 et 25°C (Dubos, 2002 ; Martinez *et al.*, 2003). Or, les températures relevées au cours de la cinétique d'infection indiquent une température moyenne (sur 15 jours) de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, la plus basse étant de 21°C et la plus élevée de 25,5°C. Malgré les faibles variations thermiques enregistrées, la température au sein de la serre n'était donc pas limitante au développement de *Botrytis*. Par contre, après avoir analysé les valeurs d'humidité relative, il est apparu que celle-ci puisse être critique pour la germination et le développement du champignon. En effet, l'hygrométrie moyenne enregistrée au cours de notre essai d'infection n'était que de $40 \pm 9\%$ avec un minimum de 30% et un maximum de 59% obtenu le dernier jour de l'essai. Or, dans le cas de *Botrytis*, la présence d'eau libre au site d'infection ainsi que d'une humidité relative supérieure à 90% ont été reportées nécessaires au développement du champignon sur plantes (Dubos, 2002 ; Hausbeck et Moorman, 1996 ; Snow, 1949 ; Williamson *et al.*, 1995). Afin de vérifier l'absence de germination des conidies au terme de 15 jours d'infection, une feuille infectée a été observée au microscope électronique à balayage. Les observations ont ainsi montré que les conidies, bien que nombreuses sur la surface foliaire, n'avaient pas germé probablement en raison d'une hygrométrie trop faible. Il est fort probable que celle-ci soient entrées en latence jusqu'à ce que les conditions deviennent favorables à leur germination. Chez la vigne, ce phénomène est observé lors de la contamination des grappes. Celles-ci sont bien souvent infectées à la floraison même si le champignon reste quiescent et ne devient dommageable qu'au moment de la maturation (McClellan et Hewitt, 1973). Cependant, ne pouvant pas faire augmenter le taux d'humidité relative de la serre sans faire augmenter la température à un niveau critique pour le développement de *Botrytis* (essai d'infection réalisé en juin), les essais d'infection en serre n'ont pas été renouvelés.

3.1.2. Développement de symptômes anormaux sur feuilles

Le développement de symptômes foliaires anormaux sur l'ensemble des plantes de l'essai (témoins et infectées) nous ont conforté dans le choix de ne pas poursuivre les essais d'infection en serre. En effet, 10 jours après l'inoculation des feuilles, celles-ci ont développé des panaches jaunâtres assimilables à un phénomène de chlorose. Observées sous lumière UV, ces feuilles ont également révélé une fluorescence anormale absente dans les feuilles de plantes non ensachées. L'ensachage semble donc avoir indirectement provoqué une réaction physiologique au sein des plantes. Il est en effet possible que celui-ci ait conduit à une augmentation de la concentration d'O₂ rejeté par la photosynthèse dans l'atmosphère des plantes. Cet oxygène, perçu en excès, peut avoir induit la synthèse de formes réactives d'oxygène (O₂^{*}, H₂O₂, OH^{*}), conduisant à l'induction de la voie des phénylpropanoïdes *via* la voie de l'acide jasmonique. La fluorescence observée serait alors due à une accumulation de composés phénoliques, de phytoalexines ou encore d'acides tels que l'acide benzoïque. Ceci reste cependant purement spéculatif puisqu'aucun dosage n'a été effectué au cours de ce travail. L'induction de la voie des phénylpropanoïdes par les UVs est peu probable dans notre cas, la serre étant équipée de rideaux protecteurs lorsque l'intensité lumineuse devient trop élevée.

Face aux difficultés de control des conditions d'infection en serre, il est rapidement apparu nécessaire de développer un système permettant d'une part la culture et le bon développement des plantes et regroupant d'autre part les conditions de température et d'humidité nécessaires à l'installation de la maladie. Le système de culture en aéroponie placé dans un phytotron paraissait alors répondre à ces différentes exigences assurant une quantité suffisante de matériel végétal nécessaire à nos expérimentations. Sans avoir procédé à des mesures directes, il a été supposé qu'au sein du phytotron, dont l'atmosphère est à 70% d'humidité relative, le brouillard créé à l'intérieur des bacs par la dispersion de la solution nutritive, devait permettre un taux d'humidité relative proche de 100%. Ainsi, après une acclimatation des plants de vigne pendant 20 jours en système aéroponique, les feuilles ont été infectées à l'aide d'une suspension conidienne de *B. cinerea* (916T).

3.2. Développement de la maladie en système aéroponique

3.2.1. Croissance du champignon et apparition des symptômes

Le dispositif aéroponique étant très différent de la serre, un autre mode d'inoculation a été utilisé pour l'infection des plantes. En effet, afin de limiter le développement du

champignon aux feuilles de vigne, l'inoculation a été effectuée par badigeonnage de la surface foliaire plutôt que par pulvérisation en prenant soin de ne pas provoquer de dégâts mécaniques qui pourraient être inducteurs de réponses physiologiques. Les premiers symptômes foliaires ont été observés dès 24 hpi majoritairement sur les jeunes feuilles situées au niveau des apex ainsi que sur certaines feuilles plus matures. Ces symptômes se sont traduits par des nécroses ainsi que des plages de macération caractéristiques de *Botrytis* en accord avec son mode trophique, la nécrotrophie. Le champignon tue en effet les cellules de la plante hôte avant leur invasion (Rowe et Kliebenstein, 2010 ; van Kan, 2006). Pour cela, *Botrytis* pénètre directement dans les tissus au travers de la cuticule *via* un complexe enzymatique important (Elad, 2004). De nombreuses enzymes telles que des cutinases, polygalacturonase, β -1,3-glucanases, lipases, cellulases et protéases agissent en synergie pour dégrader les cires cuticulaires et les parois ; certaines seraient indispensables à la virulence du champignon (Brito *et al.*, 2006 ; Kars *et al.*, 2005 ; ten Have *et al.*, 1998). Le fait que les jeunes feuilles de vigne aient une épaisseur cuticulaire et cireuse moins importante que les feuilles matures expliquerait la précocité des symptômes au niveau des apex. Ce phénomène a également été observé avec *E. necator* sur vigne, dont les colonies révèlent un développement plus important sur jeunes feuilles que sur feuilles plus matures, 10 heures après infection (Doster et Schnathorst, 1985). De plus, parallèlement à leur rôle de barrière physique, les cires superficielles, plus abondantes sur feuille mature, auraient quelques propriétés fongistatiques qui pourraient ralentir la germination des conidies et donc le développement des nécroses (Blakemann et Szejnberg, 1973 ; Martin *et al.*, 1957 ; Marois *et al.*, 1986). Au cours de la cinétique d'infection, l'apparition des nécroses a principalement été observée à la périphérie des feuilles ainsi que le long de la nervure médiane. Il est possible que ce phénomène soit dû au relief même des feuilles de vigne. En effet, les feuilles ne sont pas parfaitement planes et sont légèrement bombées de part et d'autre de la nervure centrale. Ainsi, lors de l'inoculation par badigeonnage, il est hautement probable que les conidies se soient concentrées au centre ainsi que sur le pourtour des feuilles. Les propriétés hydrophobes des cires cuticulaires ont d'ailleurs certainement accentué ce phénomène. L'observation en microscopie électronique à balayage de feuilles prélevées à 24 et 48 hpi nous a alors permis de confirmer que les symptômes observés étaient bien attribuables à la germination des conidies et au développement mycélien de *Botrytis*.

3.2.2. L'infection par *Botrytis* induit-elle des réponses dans les feuilles ?

Afin de mettre en évidence la perception de l'agent pathogène par la plante, certaines feuilles ont été observées sous UVs. La fluorescence spécifiquement observée autour des nécroses a alors conduit à suggérer une induction de la voie des phénylpropanoïdes et donc une perception du champignon. A partir de ces différentes données, bien que la sévérité des symptômes soit peu élevée au terme de 96 hpi, nous avons voulu déterminer si l'infection par *Botrytis* modulait l'expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres parallèlement à la mise en place de défenses dans la feuille. Cette analyse, réalisée par Northern blot, n'a cependant pas permis de mettre en évidence un différentiel d'expression parmi les gènes de transporteurs de sucres testés. Les hybridations à l'aide des sondes *VvHT4*, *VvHT6* et *VvSUC11* ont révélées d'une part que ces trois gènes sont très faiblement exprimés dans les feuilles en conditions normales de culture et d'autre part que leur expression n'était pas modifiée dans les 96 h suivant l'infection par *Botrytis*. L'expression de *VvHT4* et *VvHT6* dans les feuilles est cohérente avec les différents travaux de la littérature à savoir que ces deux gènes, qui ne sont pas ou peu détectés, seraient plutôt exprimés au niveau des organes puits (Hayes *et al.*, 2007 ; Vignault, 2007). Concernant *VvSUC11*, Davies *et al.* (1999) ont montré qu'il était moyennement exprimé dans la feuille, faiblement dans la jeune feuille et la feuille mature, et de façon plus importante dans la feuille de croissance intermédiaire. Cependant, ces résultats ont d'une part été obtenus à partir de matériel prélevé au vignoble et d'autre part à partir d'un cépage autre que le Chardonnay, la Syrah. Il est possible que l'expression de *VvSUC11* soit différemment régulée dans les deux conditions de culture, ainsi qu'entre les deux cépages de vigne. Pour *VvHT1*, bien que ce gène ne réponde également pas à l'infection au cours de notre cinétique, son niveau d'expression de base est apparu significativement plus élevé que les autres gènes testés. Cette observation est en accord avec les données de la littérature qui montrent que *VvHT1* et *VvHT3* sont les deux *VvHTs* les plus exprimés dans la feuille (Hayes *et al.*, 2007). De plus, le profil d'expression de *VvHT1* au cours de notre cinétique montre une légère augmentation de la quantité de transcrits de 0 à 15 hpi puis une diminution à partir de 24, 48 et 96 hpi. Deux explications peuvent être envisagées afin d'expliquer cette induction transitoire de *VvHT1* observée à la fois chez les plantes témoins et infectées. La première est que *VvHT1*, inductible par son substrat le glucose (Atanassova *et al.*, 2003 ; Conde *et al.*, 2006) ait été induit par le glucose contenu dans la solution badigeonnée sur les feuilles (malt-glucose). Ce sucre, présent à raison de 100 mM, avait pour but initial de favoriser la germination des conidies de *Botrytis* mais s'est peut être révélé inducteur du transporteur d'hexoses. Une seconde explication pourrait faire intervenir le

rythme circadien sur l'expression des transporteurs de sucres. En effet, une étude de l'expression du transcriptome d'*Arabidopsis* pendant 48 h avec une alternance lumière/obscurité a révélé une induction de plusieurs gènes du métabolisme carboné après 8 heures de lumière, dont les gènes de transporteurs d'hexoses *AtSTP1* et *AtSTP14* (Harmer *et al.*, 2000). Un alignement entre les séquences protéique de *VvHT1* et *AtSTP1* a révélé une homologie d'environ 90% (résultat non présenté) ce qui pourrait suggérer un même mode de régulation par la lumière. L'allumage des lampes du phytotron correspondant, à quelques minutes près, au temps 0 de notre cinétique, le profil d'expression de *VvHT1* entre 0 et 15 h supporterait cette hypothèse, bien que n'excluant pas le rôle du glucose dans l'induction du gène.

Nos différentes données ont donc indiqué que l'expression des gènes de transporteurs de sucres testés n'était pas modifiée dans la feuille de vigne suite à l'infection par *Botrytis* et à l'apparition des symptômes. Ainsi, nous nous sommes ensuite focalisés sur l'expression des deux gènes *VvBIG8.1* et *VvPR1* afin de confirmer la perception du champignon par la plante et la mise en place des réactions de défense. Or, aucun des deux gènes ne s'est montré induit au cours de notre cinétique d'infection. *VvBIG8.1*, homologue chez la vigne de *Hsr203J* du tabac, a pourtant été montré fortement induit sur le cépage Chardonnay dès 24 hpi avec un maximum d'expression à 48 hpi en réponse à *B. cinerea* (Bézier *et al.*, 2002). De façon similaire, *Botrytis* induit également l'expression d'une PR1 chez *Arabidopsis* dès 24 et 48 hpi (Govrin *et al.*, 2006). Nos résultats ont alors suggéré qu'à l'échelle de la feuille entière, le champignon n'était pas suffisamment perçu par la plante afin de déclencher des réponses de défense. Même si certaines réponses locales ont été déclenchées (fluorescence au niveau des points d'infection qui pourrait traduire une induction de la voie des phénylpropanoïdes *via* l'induction de la PAL), il est fort probable que la faible étendue des symptômes ait conduit à une « dilution » des réponses de la plante lors de notre analyse par Northern blot. Un dosage du resvératrol, phytoalexine majeure de la vigne, n'a donc pas été entrepris.

Il est donc évident que la première cinétique d'infection réalisée en aéroponie n'était pas suffisamment longue pour permettre un développement symptomatique suffisant à la mise en place des défenses par la plante. Deux autres essais successifs d'infection ont donc été initiés. Cependant, le système de culture aéroponique n'étant pas stérile et placé dans des conditions favorables aux contaminations, les deux essais d'infection n'ont pas été menés à bien en raison de contaminations exogènes par d'autres champignons tels que l'oïdium (*E. necator*). Bien que le système aéroponique se soit révélé efficace pour la culture des vignes et le développement de la pourriture grise, les difficultés rencontrées dans la maîtrise de

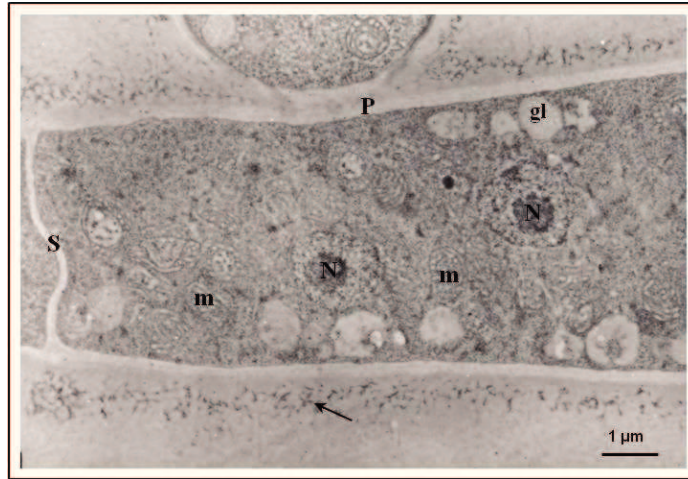


Figure 89 : Caractéristiques ultrastructurales de la souche 916T de *B. cinerea* cultivé *in vitro*. L'observation d'une coupe longitudinale ultra-fine du mycélium révèle des hyphes partitionnés en articles délimités par des septa (S). Chaque article contient un cytoplasme dense ainsi que de nombreuses mitochondries (m), des globules d'apparence lipidique (gl) et plusieurs noyaux volumineux (N). Les hyphes sont entourés d'une paroi épaisse (P) bordée par une matrice extrapariétale (flèche). Les échantillons ont été fixés dans du PFA/glutaraldéhyde puis de l'acide osmique. Après déshydratation, ceux-ci ont été inclus dans de la résine LRWhite. Des coupes ultra-fines ont ensuite été effectuées puis contrastées (acétate d'uranyle, citrate de plomb) avant d'être observées à l'aide d'un microscope électronique (Jeol 1010). Photo par P. Fleurat-Lessard et S. Fontaine.

l'infection nous ont irrémédiablement conduit vers un système de culture et d'infection *in vitro* combinant un fort taux d'humidité relative ainsi qu'une axénie de l'environnement et des tissus infectés. Ce choix a été conforté par plusieurs études montrant un développement significatif de *Botrytis* sur feuilles de vignes cultivées *in vitro*, ainsi qu'une induction de différents gènes de défenses (Bézier *et al.*, 2002 ; Coutos-Thévenot *et al.*, 2001 ; Derckel *et al.*, 1999).

3.3. Effet de la pourriture grise sur l'expression des gènes de la vigne cultivée en système *in vitro*

3.3.1. Remplacement de la souche 916T par la souche 112T de *B. cinerea*

Au cours de ce travail, la souche 916T de *Botrytis* a progressivement révélé un changement d'aspect (mycélium raz) parallèlement à des difficultés de croissance et de sporulation sur milieu gélosé. Les repiquages sur des milieux riches tels que le milieu V8 ou d'autres milieux à base de concentré de légumes n'ont pas abouti à une meilleure sporulation du champignon comparée aux résultats obtenus avec les milieux de base tels que le milieu malt-agar ou PDA (Potato Dextrose Agar). Les conditions de culture n'ayant pas été modifiées, il est alors possible que la souche 916T ait subi, au cours des repiquages successifs, certaines variations génétiques ayant altéré sa « fitness » et sa capacité de sporulation. *Botrytis* est en effet un hétérocaryon (Fig. 89) ce qui lui conférerait la capacité à évoluer rapidement sous certaines contraintes environnementales (Elad, 2004). Cette propriété lui conférerait par exemple une adaptabilité aux fongicides. L'observation de l'ultrastructure de la souche 916T en microscopie électronique à transmission a ainsi révélé jusqu'à 5 noyaux par article mycélien. D'autre part, deux transposons, *Boty* et *Flipper*, ont également été trouvés dans certaines souches de *Botrytis*. *Boty* serait un retrotransposon de classe I (ARN) présent en copies multiples dans différentes parties du génome (Giraud *et al.*, 1999). *Flipper* est un transposon de classe II (ADN) et connu pour être mobile notamment par son insertion dans le gène de la nitrate réductase (Levis *et al.*, 1997). Ces différents éléments (présence de plusieurs noyaux et de transposons) ont donc pu conduire aux modifications phénotypiques observées avec la souche 916T. Ne cherchant pas à approfondir les raisons de ce changement, celle-ci a alors été remplacée par la souche 112T. Bien que nous n'ayons aucune donnée concernant la souche 916T de *Botrytis*, le choix de la 112T n'a pas complètement été anodin. En effet, des travaux conduits sur les populations de *Botrytis* à l'aide de marqueurs moléculaires, ont révélé l'existence, dans le vignoble champenois et bordelais, de deux sous-

espèces que les auteurs ont appelé « *vacuma* » et « *transposa* » (Giraud *et al.*, 1998 ; Martinez *et al.*, 2003). Lors de ces travaux, l'hypothèse a été émise que les *transposa* étaient plus particulièrement inféodées à la vigne (Dubos, 2002). De plus, des tests de pathogénicité menés sur baie de raisin ont montré que les isolats *transposa* de *Botrytis* étaient plus virulent que les isolats *vacuma*. Sur feuilles de vigne cultivées en aéroponie, les symptômes obtenus avec la souche 916T (le « T » ne signifie pas *transposa*) n'ayant pas été très prononcés au terme de 96 hpi, nous avons donc choisi de travailler avec une souche *transposa*, la 112T, afin d'optimiser l'apparition de symptômes sur nos vitroplants de vigne. Après avoir vérifié l'appartenance de la souche 112T à l'espèce *B. cinerea* et à la sous-espèce *transposa* grâce à deux tests PCR respectivement développés par Rigotti *et al* (2002) et Martinez *et al.* (2008), les conidies de cette souche ont été utilisées pour infecter les feuilles de vitroplants de Chardonnay. Afin d'éviter toute induction des gènes de transporteurs de sucres par un apport de glucose (Atanassova *et al.*, 2003 ; Conde *et al.*, 2006) ou autres sucres, les conidies ont été récoltées dans de l'eau stérile puis inoculées par badigeonnage sur la surface foliaire.

3.3.2. Développement des symptômes de la pourriture grise en système *in vitro*

L'infection de feuilles de vigne par l'agent pathogène *B. cinerea* s'est traduite par l'apparition de symptômes dès 24 hpi. Peu sévères au terme de 24 et 48 hpi, ces symptômes ont été plus prononcés à 96 hpi et caractérisés par des zones de macération caractéristiques, pouvant recouvrir l'entière surface des feuilles selon leur position sur la tige. *Botrytis* a donc révélé un mode de vie nécrotrophe typique probablement en raison d'une production de toxines (Van Kan, 2006). Celui-ci secrète en effet des toxines telles que le botcinolide et le botrydial qui ont une phytotoxicité générale (Cutler *et al.*, 1993, Colmenares *et al.*, 2002 ; Williamson *et al.*, 2007). A l'heure actuelle, aucune toxine hôte-spécifique n'a pu être identifiée dans les relations plante/pathogène impliquant *Botrytis* et leur rôle dans la pathogénicité du champignon fait encore l'objet de plusieurs études. Parallèlement, la botrycine et la cinereine, capables d'induire la mort cellulaire sur feuille de vigne, ont également été isolées à partir de filtrats de culture du champignon (Repka, 2006) et pourraient donc participer à la formation des nécroses. Comme observé lors des infections en aéroponie, les jeunes feuilles des apex ont révélé les symptômes les plus prononcés à 96 hpi probablement en raison de leur nature peu lignifiée et d'une couche cireuse moins épaisse que les feuilles plus matures. Les feuilles de la base, repiquées avec le bourgeon lors de la micro-propagation des vignes, ont également subi des attaques sévères (nécrose, dessèchement, enroulement) probablement dues à une sénescence « précoce » comparé aux autres feuilles

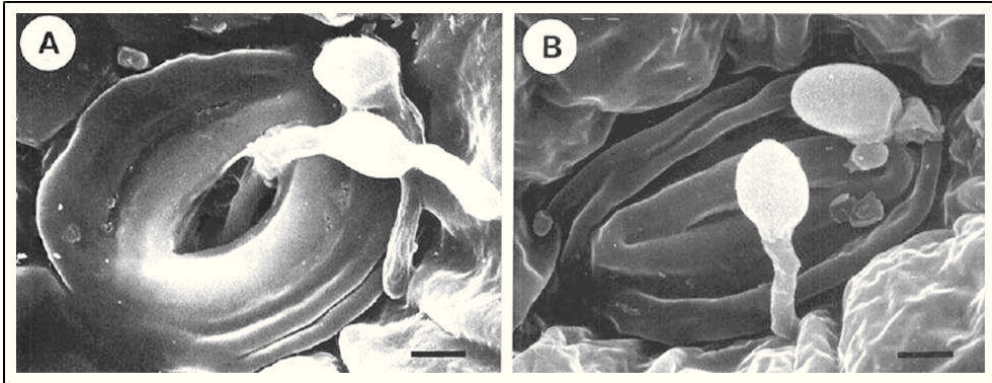


Figure 90 : Pénétration de *Botrytis cinerea* par les stomates. Images en microscopie électronique à balayage de conidies en germination. Le tube germinatif de *B. cinerea* entre par un stomate ouvert (A) et fermé (B) chez la nectarine 36 heures après inoculation. (d'après Fourie *et al.*, 1995 ; Trait 7 µm)

intermédiaires. En effet, il est généralement admis que ces feuilles aident au débourrement des bourgeons repiqués ainsi qu'à la formation des racines en leur fournissant les squelettes carbonés nécessaires à leur croissance initiale. La suppression de cette feuille lors des repiquages ralentit la différenciation des racines et le débourrement du bourgeon. Lors de la croissance des vitroplants (4-5 feuilles), les feuilles de la base entrent très souvent en sénescence ce qui fait qu'elles peuvent constituer un tissu privilégié pour *B. cinerea*. En raison de cet état de base particulier lors des infections, les feuilles de la base des plants n'ont pas été prélevées lors de notre analyse. De plus, il aurait été surprenant de pouvoir extraire des ARNs à partir des ces feuilles en état avancé de décomposition. Les feuilles intermédiaires ont développé des symptômes plus ou moins avancés en fonction de leur position sur la plante, caractérisés dans la majorité des cas par des zones de nécrose et de macération au niveau de la périphérie des feuilles, bordées d'une zone de décoloration des tissus vers l'intérieur du limbe (zone jaune). Cet aspect graduel des nécroses suite à l'infection par *Botrytis* a également été observé chez *Arabidopsis* (Van Baarlen *et al.*, 2004, 2007). La première zone nécrosée serait caractérisée par une mort rapide et par une dessiccation des cellules immédiatement en contact avec les hyphes invasifs. Dans cette zone, *Botrytis* induirait la production de ROS (H_2O_2 , NO^*), molécules importantes dans la signalisation et l'exécution de la mort cellulaire (Gechev et Hille, 2005 ; Levine *et al.*, 1994 ; Laloï *et al.*, 2004), ainsi que de phytoalexines (camalexine). Les propriétés plus ou moins antifongiques des phytoalexines confèreraient à l'hôte un gain de temps afin de mettre en place certaines voies de défense additionnelles. La zone bordant la nécrose (tissus jaunes/verts), pourrait constituer une zone de mort cellulaire plus lente qui servirait à limiter l'expansion de la mort des tissus. Des ROS ont également été trouvés dans cette zone (Van Baarlen *et al.*, 2004, 2007). Les tissus les plus gravement touchés à 96 hpi (tissus marron macérés) ont été observés à la périphérie du limbe. L'observation de la face adaxiale d'une feuille seine en microscopie électronique à balayage a permis de mettre en évidence des groupements de structure ressemblant à des stomates sur chaque pointe foliaire pouvant constituer de nombreux points d'entrée du champignon (Fig. 90) (Fang Hsieh *et al.*, 2001 ; Fourie et Holz, 1995). Ces structures correspondraient à des hydathodes continuellement ouverts (Drennan *et al.*, 2009), ce qui pourrait alors expliquer la précocité des symptômes à la périphérie des feuilles.

3.3.3. Les symptômes sont corrélés au développement de *Botrytis*

Afin de corréler formellement l'apparition des symptômes à la germination des conidies ainsi qu'au développement de *Botrytis*, des feuilles infectées ont été observées en microscopie électronique à balayage. Après la germination des conidies, des appressoria ont pu être observés à l'extrémité des tubes germinatifs. Ces appressoria n'auraient cependant pas une fonction de pénétration par augmentation de la pression physique, ceux-ci étant dépourvus de septum à l'interface appressorium/tube germinatif (van Kan, 2006). De plus, bien que les conidies en germination contiennent de la mélanine, l'appressorium de *Botrytis* ne produit pas de paroi suffisamment mélanisée pour supporter une pression physique telle que celle observée chez *M. grisea* (de Jong *et al.*, 1997 ; Doss *et al.*, 2003). Ainsi la pénétration du champignon est généralement attribuée à la sécrétion d'un complexe enzymatique (cutinases, lipases...) qui digère les composés pariétaux de l'hôte (Choquer *et al.*, 2007 ; Williamson *et al.*, 2007). Au niveau de l'appressorium, une modification dans la structure des tissus de l'hôte a d'ailleurs pu être observée. Sur les tissus les plus nécrosés des feuilles, le champignon a développé des conidiophores, porteurs de conidies qui ont certainement pu constituer une source de contaminations secondaires. Ces observations, parallèlement au ré-isolément et à l'identification formelle de *Botrytis* à partir des tissus nécrosés, ont donc permis d'attribuer l'apparition des symptômes foliaires au développement du champignon. L'observation des conidiophores a également permis de conclure que le système *in vitro* était adéquat pour le déroulement du cycle complet de la pourriture grise.

3.3.4. Induction de réactions de défense face à « l'intrus »

Bien que les phases ultimes de l'infection aboutissent à la mort des tissus colonisés, nous avons voulu déterminer si la perception de *Botrytis* induisait des réactions de défense dans notre système. Un premier test consistant à observer les feuilles infectées sous UV a alors révélé une fluorescence au niveau des nécroses, suggérant une potentielle induction de la voie des phénylpropanoïdes (Langcake et Pryce, 1976). Ceci nous a encouragé à extraire puis doser le résvératrol, principale phytoalexine de la vigne (Laquitaine *et al.*, 2006), par HPLC. Les dosages ont alors montré une production de la phytoalexine dans les feuilles infectées dès 24 hpi, avec un pic de resvératrol à 96 hpi ce qui est d'une part cohérents avec certains travaux montrant une production de resvératrol chez la vigne en réponse à *Botrytis* (Derckel *et al.*, 1999 ; Jeandet *et al.*, 1995) et ce qui suggère d'autre part l'induction des gènes de la PAL et de la stilbène synthase (*VSTI*) (Bézier *et al.*, 2002 ; Coutos-Thévenot *et al.*, 2001 ; Jeandet

et al., 2002). De plus, la présence de resvératrol uniquement dans les feuilles infectées a démontré que cette réponse était bien due à la perception de *Botrytis* par la plante. Chez de nombreuses plantes, les phytoalexines peuvent contribuer à la résistance basale contre *Botrytis*. Chez *Arabidopsis*, les mutants *pad3*, déficients dans la synthèse de camalexine, ont une sensibilité augmentée lors des infections (Van Baarlen *et al.*, 2007 ; Kliebenstein *et al.*, 2005). Cependant, l'installation de la maladie, comme observé chez la vigne par exemple, montre que la croissance du champignon est peu ou pas altérée par la synthèse de stilbènes *in vivo*. Des études ont en effet montré que la large gamme d'hôte de *Botrytis* reposait sur ses capacités à détoxifier les composés antifongiques. Plusieurs travaux ont démontré la capacité du champignon à dégrader le resvératrol et les ptérostilbènes *via* l'activité de laccases (Adrian *et al.*, 1997 ; Marbach *et al.*, 1984 ; Sbaghi *et al.*, 1996). Cette propriété serait un facteur important dans la pathogénicité de *Botrytis*. Chez *Arabidopsis*, la différence d'agressivité observée entre plusieurs isolats de *Botrytis* a d'ailleurs été partiellement attribuée à leur capacité à détoxifier la camalexine (Kliebenstein *et al.*, 2005). Parallèlement, le champignon posséderait aussi des transporteurs ABC sur la membrane plasmique impliqués dans la résistance aux ROS tels que H₂O₂ (Pane *et al.*, 2008).

Le mécanisme de défense le plus fréquemment observé chez la vigne étant l'accumulation de resvératrol associée à une synthèse de protéines de défense (Jeandet *et al.*, 2002), nous avons ensuite analysé l'expression de plusieurs gènes de PR-protéines ainsi que du gène *BIG8.1* dans les feuilles de vigne au cours de la cinétique d'infection. Cette analyse, menée par Northern blot, a révélé une induction significative des gènes *VvPR3* et *VvBIG8.1* principalement à 96 hpi. Ces résultats, qui corroborent les données de la littérature (Bézier *et al.*, 2002a, 2002b ; Robert *et al.*, 2002), ont également confirmé la mise en place des réponses de défense en réponse à la perception de *Botrytis*. Au niveau des feuilles infectées, l'apparition des zones nécrotiques coïncide donc étroitement avec la production de resvératrol et l'induction des deux gènes. D'autre part, *PR5*, induit chez *Arabidopsis* en réponse à *Botrytis* (Govrin *et al.*, 2006) ainsi que *PR7* et *PR10* ne semblent pas répondre à l'infection dans notre système. Bien que n'ayant aucune information sur l'induction des PR7 chez la vigne, il semble que les PR10 soient plutôt induites en réponse à certains biotrophes tels que *P. viticola* et *E. necator* (Kortekamp, 2006 ; Welter L. cité par Camps *et al.*, 2010).

3.3.5. "HR or not HR ?"

L'induction du gène *VvBIG8.1*, considéré comme un marqueur de HR (Bézier *et al.*, 2002a), tendrait à supposer que les réactions de défense mises en place par la vigne sont de

type HR caractérisé par une mort cellulaire au niveau des sites d'infection. De récentes études ont révélé que l'hôte pourrait également jouer un rôle plus actif et plus subtil que ce qui était initialement pensé dans les interactions plantes/nécrotrophes (Williamson *et al.*, 2007). En effet, son habilité à induire la mort cellulaire pourrait constituer un mécanisme crucial dans la colonisation des tissus par les nécrotrophes tels que *B. cinerea*. L'infection d'*Arabidopsis* induit une mort cellulaire concomitante avec une condensation nucléaire et l'induction du gène *Hsr203J* marqueur de la HR (Govrin et Levine, 2000 ; Pontier *et al.*, 1994). Parallèlement, la croissance du champignon est supprimée ou réduite chez les mutants *dnd1* et *exe1* déficients dans la mise en place de la HR, et favorisée par l'inoculation simultanée d'une bactérie avirulente inductrice de HR. De façon similaire, les mutants *acd* qui révèlent une mort cellulaire accélérée sont plus sensibles à *Botrytis* (Repka *et al.*, 2004). Dickman *et al.* (2001) ont également montré que des plantes exprimant de façon hétérologue des gènes animaux anti-apoptotiques étaient plus résistantes à *B. cinerea*. Ces différentes études tendraient donc à montrer que la mort cellulaire observée chez les plantes au cours de leur interaction avec *Botrytis* résulte d'une action concomitante des deux protagonistes. Cependant, le schéma de mise en place des défenses face à *Botrytis* est encore très flou. Chez la vigne par exemple, l'induction de gènes marqueur de la HR tels que *VvBIG8.1* supposerait une mise place des défenses sous la dépendance génétique de type gène-pour-gène. Or, bien que de nombreuses séquences de type NB-LRR aient été mise en évidence chez la vigne (Di Gaspero et Cipriani), une telle relation n'a encore pas été démontrée. Une des grandes lignes directrices des travaux actuels et futures concernant les relations plantes/nécrotrophes résiderait dans l'identification des étapes qui pourraient distinguer la HR *sensu stricto* de la mort cellulaire infligée par les nécrotrophes (Van Kan, 2006).

3.3.6. Induction d'une réponse systémique par *Botrytis*

Bien qu'il existe peu de preuves directes de l'existence d'une résistance de type HR chez la vigne, nous avons néanmoins voulu déterminer si la perception de *Botrytis* ainsi que la mort cellulaire au niveau des feuilles déclenchaient une réponse systémique associée au sein de la plante. Toutes les feuilles ayant été infectées dans nos essais, l'éventuelle mise en place de la SAR a été analysée dans les tiges. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur l'expression de *VvPR3*, induit au niveau foliaire, ainsi que celle de *VvPR1*, considéré comme le principal marqueur de la SAR chez les plantes (Ryals *et al.*, 1996). Les résultats obtenus par Northern blot, ont révélé une forte induction des deux gènes de PR-protéines dans la tige suite à l'infection foliaire par *Botrytis*. Bien qu'il aurait été intéressant d'observer une réponse

systemique au niveau de feuilles non infectées, l'induction des gènes de PR-protéines dans la tige nous a fourni une première indication de la mise en place d'une réponse systemique au sein de notre pathosystème. Ces résultats resteraient à confirmer sur feuilles puisqu'il a été montré que *Botrytis* n'induisait pas la SAR chez *Arabidopsis* (Govrin et Levine, 2002 ; Govrin *et al.*, 2006). Les auteurs ont en effet montré une induction de *PR1*, *PR5* et *PR12* (*PDF1.2*) 2 jours après l'infection dans les feuilles infectées, cette induction étant absente dans les feuilles non inoculées.

La SAR est généralement associée à la HR induite par des agents biotrophes ainsi qu'aux voies de signalisation impliquant l'acide salicylique (SA). Or, il a longtemps été admis que les réponses induites par les nécrotrophes dépendent de l'acide jasmonique (JA) et/ou de l'éthylène (ET) (Glazebrook, 2005). Aujourd'hui, de nombreuses études montrent l'extrême complexité des mécanismes d'activation des défenses chez les plantes. Il existe en effet de nombreuses interconnexions entre les voies de signalisation dépendantes du SA et du JA/ET, chacune pouvant contribuer à la mise en place des défenses contre *Botrytis*. Chez *Arabidopsis* par exemple, les mutants dans la voie de l'ET (*ein2*, *ein3*), dans la voie du JA (*jar1*) ainsi que dans la transduction du signal SA (*npr1*) sont tous plus sensibles à l'infection (Thomma *et al.*, 1998 ; Van Baarlen *et al.*, 2007). La sensibilité accrue de certains mutants dans la perception ou la voie de signalisation du JA serait due à une production moindre de camalexine comparés aux plantes sauvages (Rowe *et al.*, 2010). De plus en plus de données supportent le rôle de l'acide jasmonique en tant que signal alternatif dans l'induction des défenses telles que la SAR. Dans les feuilles de vigne, le méthyl-jasmonate (MeJA) induit des symptômes de HR, la synthèse de composés phénoliques et l'induction de différents gènes de PR-protéines telles que des PR1, 2 et 3 (Repka *et al.*, 2004). Il a également été démontré chez la vigne que la concentration de JA augmentait dans les feuilles en réponse à une infection par *Botrytis cinerea* (Pena-Cortes *et al.*, 2004). D'autre part, Girault *et al.* (2008) ont observé que *VvLTP1* et *VvLTP4*, deux PR14, étaient aussi induites chez la vigne lors d'une infection par *Botrytis*. Les auteurs ont, de plus, montré que *VvLTP4* pouvait se complexer au JA et que le complexe LTP4-JA induisait une protection significative de la vigne vis-à-vis du champignon. Dans cette étude, il a été suggéré que ce complexe pouvait constituer un bon candidat comme signal mobile de la SAR. L'ensemble de ces données serait donc en faveur d'une induction de la SAR par les champignons nécrotrophes, bien que les voies de signalisation qu'elle implique restent à déterminer.

3.3.7. L'infection par *Botrytis* induit des gènes codant pour un transporteur de sucres ainsi qu'une invertase pariétale

A ce stade de l'étude, considérant l'ensemble de ces premières données obtenues sur vitroplants, la mise en place des réactions de défense locales et systémiques suite à la perception de *Botrytis* était évidente. L'objectif *in fine* de ce travail étant de mettre en évidence une modification transcriptionnelle de gènes codant pour des transporteurs de sucres dans un contexte général de défense, l'expression de plusieurs gènes de transporteurs d'hexoses, d'un gène de transporteur de saccharose ainsi que d'une invertase pariétale a été analysée au cours de notre cinétique d'infection. Les résultats obtenus ont ainsi montré que parallèlement à la surexpression des gènes de défense et à la production de resvératrol, le gène de transporteur d'hexoses *VvHT5* ainsi que celui de l'invertase pariétale *VvcwINV* (à un niveau moindre) étaient également co-induits en réponse à l'infection. Parallèlement, le prélèvement au vignoble de grappes de raisin naturellement infectées par la pourriture grise (souche inconnue) nous a donné l'opportunité d'analyser l'expression des gènes de transporteurs de sucres dans un pathosystème naturel loin des conditions du laboratoire. Les résultats obtenus ont ainsi permis de confirmer l'induction de *VvHT5* ainsi que de *VvPR3* dans les baies de raisin infectées. Les données montrent aussi que *VvHT1*, *VvHT5* et *VvcwINV* sont peu exprimés dans la baie saine en fin de maturation ce qui corrobore les observations de Fillion *et al.* (1999) et de Hayes *et al.* (2007). Il en est de même pour l'expression de *VvPR3* bien que l'induction de gènes codant pour des PR-protéines soit souvent reportée au cours de la maturation de la baie de raisin (Deluc *et al.*, 2007 ; Robinson *et al.*, 1997 ; Salzman *et al.*, 1998). Contrairement au système « plante », l'induction de *VvcwINV* n'a pas été observée dans les baies infectées. Les invertases ont pour but l'hydrolyse du saccharose en fructose et glucose, or la baie en fin de maturation est un véritable réservoir d'hexoses (jusqu'à 1M) (Fillion *et al.*, 1999). Il est alors envisageable que cette forte concentration en hexoses ait exercé un rétrocontrôle négatif sur l'expression de *VvcwINV*. De plus, comme observé chez *Arabidopsis* (Sherson *et al.*, 2003), il est hautement probable que la vigne possède plusieurs gènes codant pour des invertases et qui pourraient être impliqués dans la réponse des baies à *Botrytis*. L'ensemble de nos résultats a donc démontré qu'au moins un transporteur de sucres ainsi qu'une invertase pariétale pouvaient être impliqués dans la réponse de la vigne à une infection par un agent nécrotrophe tel que *B. cinerea*.

3.4. Les réponses de la vigne face à *E. necator* sont communes à celles observées avec *B. cinerea*

3.4.1. Développement de l'oïdium en système *in vitro*

Dans un second temps, afin de déterminer si les réponses obtenues avec *Botrytis* pouvaient être comparables à celles mises en œuvre dans un pathosystème biotrophe, nous avons infecté des vitroplants de Chardonnay avec l'agent biotrophe stricte *E. necator* responsable de l'oïdium. N'ayant aucune information concernant le comportement du champignon et le développement de la maladie en système *in vitro*, une des premières étapes a été de suivre le développement des symptômes avant de procéder aux prélèvements des tissus. Asymptomatiques durant les 4 premiers jours d'infection, les symptômes de l'oïdium ont mis plus de temps à se manifester comparés à l'infection par *Botrytis*, ce qui a conduit la cinétique d'infection jusqu'à 15 jpi. Au cours de celle-ci, malgré la colonisation des feuilles par le champignon, aucune nécrose n'a été observée.

L'invasion de la cellule hôte par les agents biotrophes est un phénomène biologique remarquable car elle exige des modifications importantes de l'intégrité membranaire sans altérer la viabilité cellulaire (O'Connell et Panstruga, 2006). Dans la majorité des cas, la pénétration initiale dépend de la formation d'un appressorium multilobé sur la surface de l'hôte. La pénétration des tissus *via* cette structure utilise généralement une combinaison enzymes lytiques/pression de turgescence (Pryce-Jones *et al.*, 1999). Au niveau du taux d'humidité relative nécessaire à la germination, il semblerait qu'*Erysiphe* soit moins exigeant que *Botrytis*. En effet, une hygrométrie de 40 à 100% permet la germination du champignon et des germinations à 20% ont pu être observées (Dubos, 2002). Lors d'une interaction compatible, l'agent pathogène est relativement bien toléré suggérant une suppression plus ou moins importante des défenses de la plante (Panstruga, 2003). Actuellement, aucune relation gène-pour-gène n'a été décrite pour l'interaction *E. necator*/vigne (Corio-Costet, 2007). Suivant la pénétration, les biotrophes élaborent des structures intracellulaires spécialisées, les haustoria, permettant entre autre l'absorption de nutriments à partir de l'hôte. Ainsi, la différenciation des appressoria ainsi que le développement des haustoria pourraient expliquer le développement plus « tardif » des symptômes de l'oïdium comparé aux infections par *Botrytis* qui ne différencie pas de structures aussi élaborées. Lors de la sporulation, le champignon exerce une forte demande nutritionnelle et les tissus infectés peuvent commencer à se chloroser.

3.4.2. Activation des réactions de défense en réponse à *E. necator*

Observée sous UV, les feuilles les plus symptomatiques n'ont pas révélé de fluorescence pouvant indiquer une potentielle induction de la voie des phénylpropanoïdes et donc la production de phytoalexines. Dans la littérature, aucune donnée ne se réfère à la production de resvératrol en réponse à l'oïdium de la vigne. La surexpression de la stilbène synthase *VST1* est capable d'induire une protection contre *B. cinerea* et *Eutypa lata* (Couto-Thévenot *et al.*, 2001) mais aucun essai n'a été effectué avec *E. necator*. Même si l'efficacité des phytoalexines reste à démontrer sur le parasite (Corio-Costet, 2007 ; Glazebrook, 2005), la forte concentration de resvératrol dans certaines variétés de vigne telles que *V. rupestris* conférerait cependant une tolérance à l'oïdium (Dai, 1994 cité par Couto-Thévenot *et al.*, 2001). Chez Chardonnay, nos observations (pas d'épifluorescence dans les feuilles infectées) tendraient à suggérer que la synthèse de resvératrol n'est pas impliquée dans les voies de défenses en réponses à ce champignon. Bien évidemment, un dosage par HPLC de la phytoalexine et/ou l'étude de l'expression des gènes *PAL* (phénylalanine ammonia lyase) et *VST1* (stilbène synthase) permettraient de confirmer cette hypothèse. *Erysiphe spp* n'induisant pas la synthèse de camalexine chez *Arabidopsis* (Glazebrook, 2005 ; Reuber *et al.*, 1998), nous n'avons pas jugé utile de procéder à ces vérifications. Nous avons néanmoins analysé l'expression des deux gènes de PR-protéines, *VvPR1* et *VvPR3*, afin de vérifier la mise en place de défenses suite à la reconnaissance de l'agent pathogène. Les résultats ont indiqué que les deux gènes étaient induits dans les feuilles infectées dès 4 jpi, confirmant ainsi la mise en place de réactions de défense par la plante. Chez la vigne, plusieurs études ont reporté l'induction des gènes de β -1,3-glucanases (PR2), chitinases (PR3) et de protéines thaumatine-like (PR5) en réponse à l'infection par *E. necator* (Jacobs *et al.*, 1999 ; Monteiro *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis*, *E. orontii* induit l'expression de gènes de PR1, PR2 et PR5 (Reuber *et al.*, 1998). De nombreux gènes de PR-protéines (PR1 à 5) sont également surexprimés chez l'orge suite à l'infection par *B. graminis* (Gregersen *et al.*, 1997). Ces données indiquent que chez la vigne ainsi que chez d'autres espèces, l'infection par l'oïdium induit de nombreuses PR-protéines. Pour beaucoup d'entre elles, la forte activité antifongique mesurée *in vitro* suggère qu'elles puissent jouer un rôle important *in vivo* en augmentant la résistance de la plante à l'infection. Cependant, ce panel de protéines de défense ne semble pas suffisant pour stopper la colonisation des tissus par le champignon. Par divers moyens, les biotrophes ont en effet développé des capacités à contourner les défenses mise en place par l'hôte (catalases peroxydases, polyols neutralisant les ROS...) (Zhang *et al.*, 2004 ; Voegelé *et al.*, 2005).

3.4.3. Les gènes *VvHT5* et *VvcwINV* sont induits en réponse à l'oïdium

Après avoir observé une induction de gènes de défense (*PR1* et *PR3*) dans les feuilles infectées par *E. necator*, nous avons voulu déterminer si l'expression des gènes du métabolisme carboné était également induite lors de l'interaction. Notre analyse s'est uniquement focalisée sur les deux gènes mis en évidence avec *Botrytis* : *VvHT5* et *VvcwINV*. Les résultats ont alors montré que les deux gènes étaient également co-induits au cours de l'interaction biotrophe vigne/*E. necator*, dès 7 jpi. Ces données suggèrent d'une part qu'au moins un transporteur de sucres et une invertase sont impliqués dans la réponse de la vigne à l'oïdium, et d'autre part que cette réponse serait commune aux interactions impliquant *B. cinerea* et *E. necator*.

3.5. Vers une évolution du système biologique

Cette première approche abordée sur plante entière a permis de mettre en évidence deux gènes candidats, *VvHT5* (transporteur d'hexoses) et *VvcwINV* (invertase pariétale) induits en réponse à l'infection par *B. cinerea* et *E. necator*. D'un point de vue physiologique, nous avons pu constater que les réponses de la vigne obtenues au cours des phases préliminaires d'une interaction de type nécrotrophe étaient comparables aux réponses obtenues lors d'une interaction de type biotrophe. Cependant, ces premiers travaux sont peu exhaustifs en raison du faible nombre de gènes analysés. En effet, sur les 11 séquences de transporteurs de sucres disponibles, seulement 4 sondes (*VvHT1*, *VvHT5*, *VvHT6* et *VvSUC11*) ont été utilisées lors de notre étude d'expression. Ainsi, il est envisageable qu'un ou plusieurs autres gènes de transporteurs soient également induits en réponse aux champignons. De même, bien que notre analyse se soit focalisée prioritairement sur l'expression de *VvcwINV*, d'autres gènes codant pour des invertases tels que *VvGIN1* et *VvGIN2* (invertases vacuolaires) pourraient potentiellement être induits. D'autre part, ces résultats préliminaires ne montrent qu'un aspect « corrélatif » de l'interaction pathogène (la perception du champignon induit des gènes) et ne reflètent aucune dimension fonctionnelle (l'induction des gènes de transporteurs induit-elle une synthèse de la protéine et une augmentation du transport?). Bien que la plante soit un outil inévitable pour étudier les relations plantes/microorganismes, ce système reste cependant contraignant notamment pour l'étude de l'activité de transport de sucres au cours d'une interaction biotique ou lors d'un traitement éliciteur. En effet, une telle étude pourrait être réalisée sur disques foliaires mais il est difficile, avec un tel système, de maîtriser la quantité d'éliciteur perçue par le matériel

végétal ainsi que l'homogénéité avec laquelle il est perçu. Les suspensions cellulaires constituent alors des outils pratiques pour l'identification et l'étude d'expression de gènes (Roubelakis-Angelakis, 2001), mais également un système simple permettant facilement d'étudier le transport de sucres tout en contrôlant la concentration d'éliciteurs appliquée lors de traitements. C'est pourquoi, après avoir vérifié sur plante entière que la perception de l'agent pathogène induisait des gènes de transporteurs dans un contexte de défense, nous avons choisi de faire évoluer notre système expérimental vers un modèle plus simple de suspension cellulaire. Ainsi, la mise en place d'une suspension cellulaire de Chardonnay a été initiée.

Chapitre II

Initiation d'une suspension cellulaire non embryogène de vigne cv Chardonnay

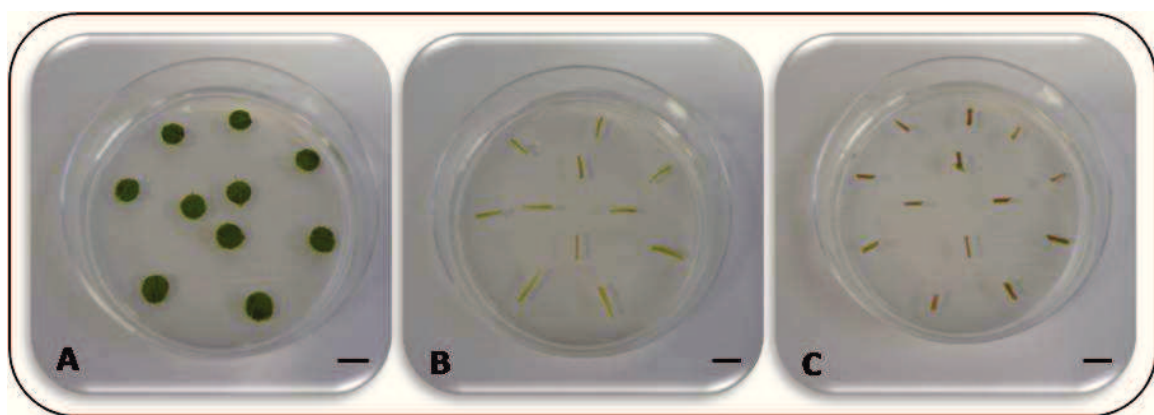


Figure 91 : Organes de vigne utilisés comme explants pour l'initiation de la calogenèse sur milieux gélosés. Des plants de vigne de Chardonnay ont été cultivés *in vitro* sur le milieu solide McCown Woody Plant. Les organes tels que les feuilles (A), les pétioles (B) et les tiges (C) ont ensuite été prélevés puis transférés comme explants sur divers milieux gélosés afin d'initier la production de cals. (Traits : 1 cm)

Chapitre II

Initiation d'une suspension cellulaire non embryogène de vigne cv Chardonnay

La seconde partie de ce travail a consisté en l'obtention d'une suspension cellulaire de vigne (cv Chardonnay), utilisée pour étudier l'expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres et l'activité de transport en réponse à une contrainte biotique *via* l'inoculation directe d'un agent pathogène ou à l'aide de différentes molécules élicitrices.

1. Mise en place de la suspension cellulaire

1.1. Choix de l'explant

Afin d'augmenter les possibilités d'obtention de cette suspension cellulaire, plusieurs types de tissus provenant de différents organes de vigne ont été isolés. Les premiers tissus végétaux utilisés ont été obtenus au travers de la culture *in vitro* de plants de vigne de cépage Chardonnay. Ces vitroplants ont l'avantage d'être cultivés en conditions axéniques évitant ainsi des étapes de désinfection des tissus. Le maintien d'un « pool » constant de plante *in vitro* a également permis l'obtention de tissus en quantité relativement importante et de façon constante pendant la mise en place de la suspension cellulaire. Quatre à six semaines après le microbouturage *in vitro* des plantules sur le milieu de culture « McCown Woody Plant » (Annexe 02), plusieurs organes de plantes ont été prélevés stérilement et directement utilisés comme explants (Fig. 91) :

- **Les feuilles** ont été prélevées à l'emporte-pièce sous forme de disques foliaires, coupées en quatre fragments (quart de feuille) ou grossièrement hachées à l'aide d'un scalpel.
- **Les pétioles** ont été utilisés entiers ou sectionnés longitudinalement.
- **Les tiges** ont été sectionnées de façon à ne garder que les entre-nœuds, utilisés soit entiers, soit sectionnés longitudinalement ou parfois divisés en plusieurs fragments.

Lorsque ceux-ci ont été utilisés entiers, les extrémités des fragments de pétioles et de tiges ont été sectionnées en forme de biseau afin d'augmenter la surface de « blessure » et potentiellement la surface d'initiation de cals cicatriciels.

Parallèlement à l'utilisation d'organes issus de plantes cultivées *in vitro*, **des baies** de Chardonnay fraîchement récoltées sur le domaine de la Protection des Végétaux de Biard (86), ont également été testées comme explants. Après désinfection, les baies ont été

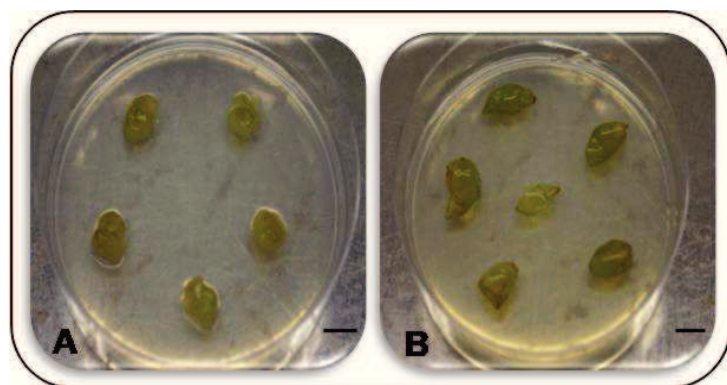


Figure 92 : Tissus de baies utilisés comme explants pour l'initiation de la calogenèse sur milieux gélosés. Après leur désinfection dans une solution d'hypochlorite de sodium et l'élimination des pépins, la pulpe (A) ainsi que la pellicule (B) ont été séparées puis transférées sur milieux solides afin d'initier la production de cals. (Trait : 1 cm)



Figure 93 : Embryon somatique de Chardonnay. Initiés à partir de la suspension cellulaire embryogène de Chardonnay transférée du milieu GM⁺ contenant de l'auxine (NOA) dans un milieu qui en est dépourvu (GM⁰), les embryons de vigne ont été cultivés trois semaines avant d'être utilisés comme explants pour l'initiation de la calogenèse sur milieux gélosés. (Trait : 0,5 cm)

Tableau 20 : Synthèse de l'efficacité des milieux de culture solides utilisés pour la production de cals à partir d'explants de vigne. (0) Pas de calogenèse ; (*) Initiation de petits cals chétifs ; (**) Initiation de cals mais développement insuffisant pour le transfert en culture liquide ; (***) Calogenèse et développement de cals pouvant être transférés en culture liquide ; (nt) non testé.

Base	Milieux de culture solides	Explants utilisés			
		Embryons	Feuilles	Tiges	Pétioles
Murashige et Skoog	MS "CSB" (ANA + BAP)	nt	*	*	*
Murashige et Skoog [NH ₄ ⁺]/2	MS "tabac/41B" (ANA + BAP)	***	*	***	***
	MS "Initiation" (ANA + BAP)	nt	*	***	***
	MS (2,4D + Kinétine)	**	*	**	**
Murashige et Skoog [macroéléments]/2	GM ⁺ (NOA)	0	**	**	**
	MS "Multi-Vignes"	nt	*	**	**
Murashige et Skoog [Cl ⁻ , KI, MnSO ₄] réduites	MS "Chée et Pool <i>Vitis</i> medium"	nt	0	**	**
	MS "Chée et Pool <i>Vitis</i> medium" (ANA + BAP)	nt	0	0	0
Murashige et Skoog FeNaEDTA → FeEDDHA	MS "Van der Salm"	0	0	0	0
	MS "Van der Salm" (ANA + BAP)	0	0	0	0
	MS "Van der Salm" (2,4D + Kinétine)	0	0	0	0

débarassées de leurs pépins et **la pulpe** délicatement séparée de **la pellicule**. Ces deux dernières ont alors été utilisées indépendamment comme explants (Fig. 92).

Enfin, **des embryons somatiques** de Chardonnay ont également été utilisés comme explants pour l'initiation de la callogenèse. Ces embryons ont été générés à partir de la suspension cellulaire embryogène de Chardonnay transférée d'un milieu « GM⁺ » contenant de l'auxine (acide β -naphtoxyacétique : NOA) dans un même milieu qui en est dépourvu (GM0) (Annexe 04). Après environ 3 semaines de culture (Fig. 93), l'épicotyle, les cotylédons ainsi que la radicule ont été sectionnés pour ne conserver que les hypocotyles. Ceux-ci ont été utilisés entiers, sectionnés longitudinalement ou grossièrement hachés.

1.2. Initiation de cals sur milieux solides

La formation de cals a été réalisée dans un premier temps en plaçant des explants végétaux sur différents milieux de culture solides de compositions variées, contenant des phytohormones, en boîte de Pétri et incubés à l'obscurité à une température de 23°C. Les explants ont ensuite été entretenus tous les 10 à 15 jours par repiquage sur du milieu frais afin de stimuler la callogenèse tout en évitant l'épuisement des éléments nutritifs du milieu.

Les explants de vigne ont été placés, dans un premier temps, sur un milieu Murashige et Skoog (MS) « CSB » (Annexe 06) utilisé pour l'entretien des cals de Cabernet Sauvignon et sur un milieu MS modifié (MS NH₄⁺/2 « tabac/41B », Annexe 09). Au laboratoire, ce dernier milieu, dont la concentration en ammonium est réduite de moitié par rapport à une base MS traditionnelle, est majoritairement utilisé pour la production de cals de tabac mais s'est également montré probant pour la vigne (41B). Mais face aux difficultés de callogenèse rencontrées, ces milieux ont ensuite été déclinés parallèlement au test de nouveaux milieux.

Le tableau 20 présente les différents milieux de culture solides utilisés et les résultats obtenus en termes d'induction de la callogenèse à partir d'explants de vigne. Un même milieu pouvant aboutir à des résultats relativement différents en fonction de la nature et de l'état physiologique des explants, ce tableau est une synthèse des effets les plus fréquemment observés au cours des cultures et des repiquages. Le premier constat est qu'un grand nombre de milieux testés ne se sont pas avérés efficaces pour la production de cals ; il s'agit des deux milieux « Chée et Pool » (Annexe 10) et des 3 modifications « Van der Salm » du milieu MS (Annexe 11). Ces milieux n'ont clairement pas induit de callogenèse, provoquant rapidement

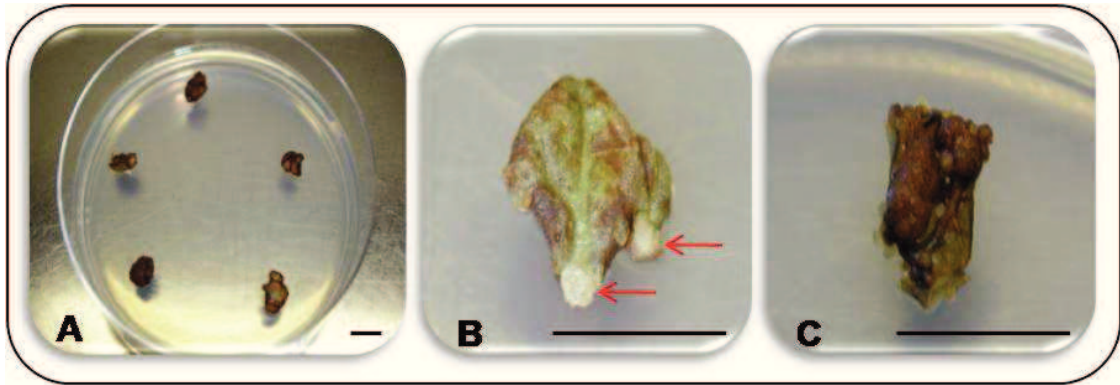


Figure 94 : Nécrose des disques foliaires sur milieux gélosés. Après leur dépôt sur milieux solides, la quasi-totalité des explants foliaires se sont entièrement nécrosés (A). Sur certains disques foliaires, de petits cals blancs (flèches rouges) se sont développés après environ six semaines de culture (B) mais leur développement s'est rapidement stoppé aboutissant à la nécrose totale des explants (C). (Traits : 1 cm)

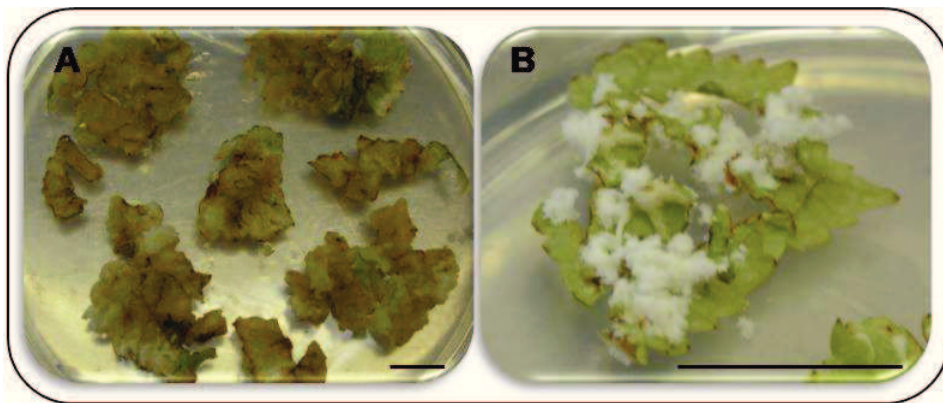


Figure 95 : Evolution des explants de feuilles dilacérées sur milieux gélosés. Incubés sur milieux solides, les feuilles dilacérées de vitroplants se sont rigidifiées puis nécrosées (A). Sur certains fragments, de petits amas « cotonneux » se sont développés au niveau des sites de blessure (B). (Trait : 1 cm)

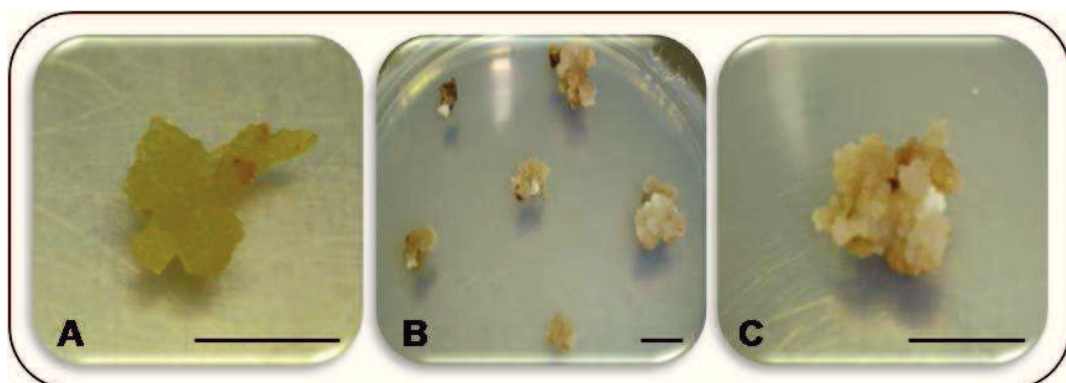


Figure 96 : Production de cals à partir d'embryons somatiques de Chardonnay. Plusieurs dépôts d'embryons « hachés » ont produit de petites masses calleuses de couleur jaunâtre environ cinq semaines après leur mise en culture sur milieux gélosés (A). Au cours des repiquages, ces petites masses ont évoluées en cals (B) qui ont ensuite atteint un aspect satisfaisant et une structure friable (C). (Traits : 1 cm)

un brunissement des explants placés en culture. Les morceaux de tiges et de pétioles ont montré une callogenèse plus marquée particulièrement sur des milieux de base MS dont la concentration en macro-éléments ou ammonium est réduite de moitié par rapport au MS traditionnel tels que « tabac/41B », « Initiation » (Annexe 12), « MS 2,4D/K » (Annexe 13) et « Multivigne » (Annexe 14). Deux de ces modifications MS se sont également montrées probantes pour la callogenèse avec les morceaux d'embryons. Les différents cals obtenus à partir de ces explants et sur ces différents milieux ont montré une croissance notable au cours du temps et une structure plus ou moins friable ce qui a permis de les transférer en culture liquide.

Sur l'ensemble des milieux utilisés (Tableau 20), la production de cals à partir de matériel foliaire de Chardonnay n'a pas été concluante. Les tissus des disques foliaires et des morceaux de feuilles ne se sont pas différenciés en cals susceptibles d'être entretenus sur milieu solide ni, *a fortiori*, transférés en milieu liquide. Outre le fait que la grande majorité des explants se sont rapidement desséchés, l'initiation, sur certains d'entre eux, de petits cals blancs environ 6 semaines après dépôt sur milieu gélosé a été rapidement stoppée par l'apparition de zones nécrotiques de couleur brune à noire probablement attribuables à l'oxydation de composés phénoliques (Fig. 94). Concernant les morceaux de feuilles dilacérées, le durcissement des tissus s'est accompagné d'une nécrose générale ou bien de la formation d'amas « cotonneux » ne pouvant être transférés en culture liquide (Fig. 95). De même, la mise en culture de pulpe et de pellicule de baies n'a pas abouti en raison d'un constant développement de contaminations sur les milieux gélosés. Les baies de Chardonnay ayant été récoltées au vignoble, il n'est pas surprenant que celles-ci soient « porteuses » de nombreux microorganismes tels que des bactéries ou champignons pouvant relativement bien résister au protocole de désinfection utilisé (hypochlorite de sodium).

La production de cals à partir de morceaux d'embryons somatiques s'est montrée plus efficace que la mise en culture de disques foliaires ou de tissus de baies. Quatre à 5 semaines après leur dépôt sur milieu Murashige et Skoog modifié (MS $\text{NH}_4^+/2$ « tabac/41B »), plusieurs amas d'embryons blessés au scalpel ont développé de petites masses calleuses de couleur jaunâtre et montrant une croissance au cours des semaines (Fig. 96 A,B). Après 2 à 3 repiquages tous les 15 jours, ces cals ont atteint un aspect satisfaisant dépourvu de zones nécrotiques et pouvant faire l'objet d'un passage en milieu liquide sous agitation (Fig. 96 C). Il est cependant intéressant de noter que, malgré un aspect correct, ces cals issus d'embryons

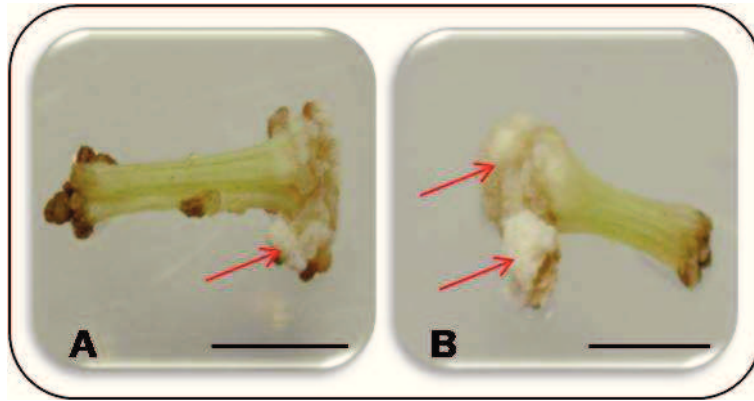


Figure 97 : Production de cals à partir d'explants de pétioles et de tiges. Après quatre à six semaines de culture sur milieux solides, les morceaux de pétioles (A) et de tiges (B) ont produit des cals de couleur blanche à leurs extrémités (flèches rouges). Repiqués tous les quinze jours, ces cals ont pu être séparés des explants primaires et entretenus sur milieux frais. (Trait : 0,5 cm)

Figure 98 : Cal issu d'un explant de tige. Séparés des explants primaires et entretenus toutes les quatre à cinq semaines sur milieu frais, les cals issus de morceaux de tiges et de pétioles ont montré un développement positif. (Trait : 0,5 cm)

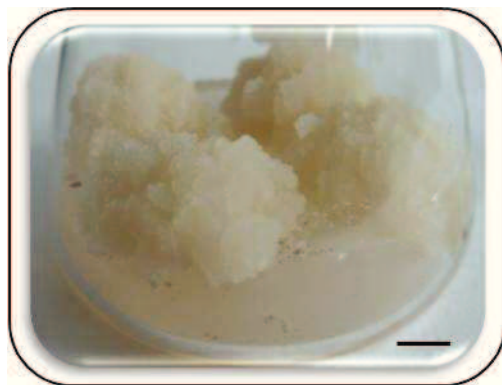
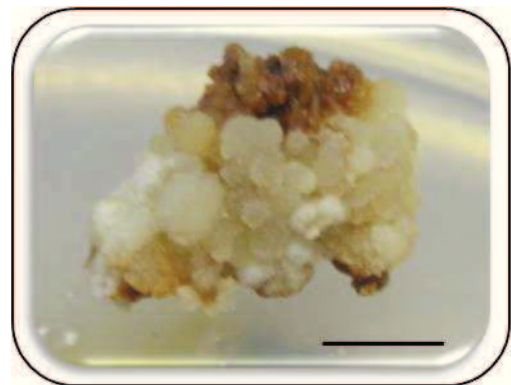
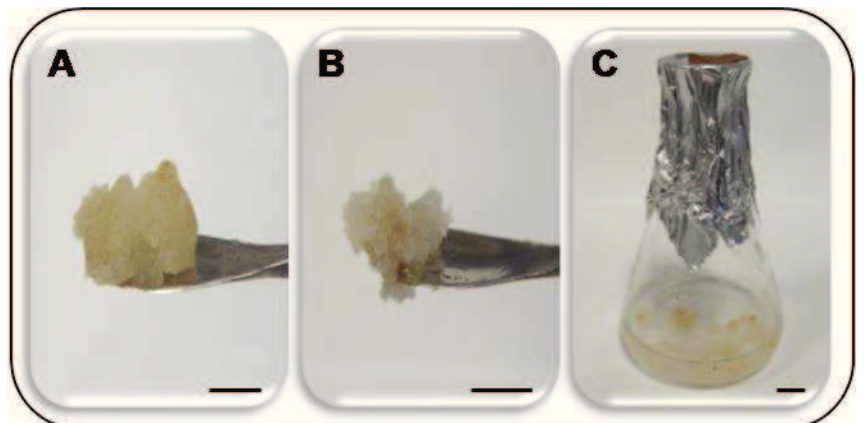


Figure 99 : Cals de vigne du cépage Cabernet Sauvignon. Les cals de Cabernet Sauvignon sont entretenus sur le milieu solide Murashige et Skoog « CSB ». Ils présentent un aspect blanchâtre, une structure très friable et ont une vitesse de croissance importante. Au bout d'un mois de culture (photo), ces cals sont repiqués sur du milieu frais. (Trait : 1 cm)

Figure 100 : Transfert de cals de Chardonnay en cultures liquides. Les cals issus de tiges (A) et d'embryons somatiques (B), suffisamment développés et de texture friable, ont été stérilement transférés dans 15 ml de milieu liquide (C). Les cultures ont ensuite été placées sous agitation orbitale (170 rpm), à l'obscurité et à 23°C. (Trait : 1 cm)



présentaient une texture anormalement molle, l'ensemble cellulaire n'ayant pas de réelle intégrité comparativement aux cals de Cabernet Sauvignon, 41B et de tabac présents au laboratoire.

En dernier lieu, les morceaux de tiges et de pétioles se sont montrés être les explants les plus productifs en terme de callogenèse (Fig. 97). Au terme de 6 à 8 semaines de culture et après élimination des parties nécrosées, des cals primaires ont été séparés des extrémités des explants puis transférés sur milieu solide frais. Au bout de quelques mois, il s'est cependant avéré que le repiquage de ces cals tous les 15 jours favorisait l'apparition de brunissements et d'un aspect vitreux non désiré. L'entretien des cals a donc rapidement évolué vers un repiquage toutes les 4 à 5 semaines en fonction de leur aspect et du milieu utilisé. A partir de ce moment, ceux-ci ont montré une croissance plus prononcée (Fig. 98) même s'ils n'ont jamais atteint la vitesse de croissance ni un aspect aussi satisfaisant que les cals d'autres cépages comme Cabernet Sauvignon (Fig. 99). Deux types de cals différents ont d'ailleurs pu être observés : des cals friables de couleur beige et des cals non friables généralement plus compacts et blancs. L'entretien et la multiplication *in vitro* s'est majoritairement focalisée sur ces cals friables car cette propriété, combinée au taux d'ensemencement (masse de matière fraîche par unité de volume) est sans aucun doute une clé importante dans l'élaboration d'une suspension cellulaire.

Les meilleurs cals friables (de taille comprise entre 1 et 1,5 cm de diamètre) obtenus à partir d'embryons somatiques, de tiges et de pétioles, ont été prélevés puis transférés stérilement en fiole d'Erlenmeyer de 100 ml dans 20 ml de milieu de culture liquide (de composition correspondante au milieu solide mais sans agar) (Fig. 100). Ces cultures ont ensuite été placées à l'obscurité, à 23°C et sous agitation orbitale rapide (170 rpm) afin de favoriser la fragmentation des cals. Cette fragmentation, sous l'effet de l'agitation ainsi que la division cellulaire, aurait théoriquement dû aboutir à une mise en suspension de cellules et à l'épaississement de la culture au cours du temps. Cependant, l'initiation de ces cultures liquides à partir de cals s'est révélée infructueuse. Soit les cals ont immédiatement brunis une fois transférés en milieu liquide, sans phénomène de fragmentation ; soit il y a bien eu mise en suspension de cellules avec un début de croissance (augmentation de la densité cellulaire) mais rapidement suivie par une dégénérescence de la culture (arrêt de croissance et brunissement). Plusieurs essais dans différents milieux comme MS « CSB », MS $\text{NH}_4^+ / 2$

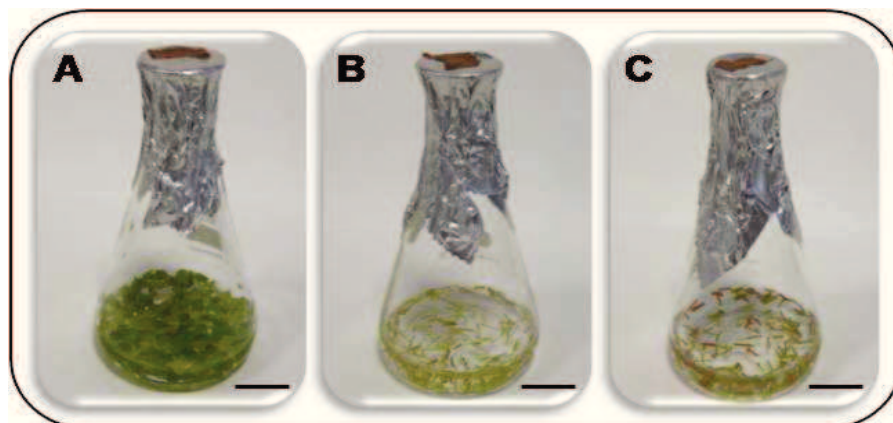


Figure 101 : Ensemencements directs d'explants de vigne en cultures liquides. Parallèlement à l'initiation de la calogénèse sur milieux gélosés, des morceaux de feuilles (**A**), de pétioles (**B**) et de tiges (**C**) ont directement été placés dans 15 ml de milieu liquide. Une fois ensemencées, les cultures ont été placées sous agitation orbitale (170 rpm), à l'obscurité et à 23°C.

Tableau 21 : Synthèse de l'efficacité des milieux de culture liquides utilisés pour la mise en suspension de cellules à partir d'ensemencements directs d'explants de vigne. (0) Pas de mise en suspension de cellules ; (*) Niveau de mise en suspension de cellules très faible ; (**) Niveau de mise en suspension correct mais dérive de la croissance cellulaire ; (***) Niveau de mise en suspension correct et croissance cellulaire significative ; (nt) non testé.

Base	Milieux de culture liquides	Explants utilisés			
		Embryons	Feuilles	Tiges	Pétioles
Murashige et Skoog	MS "CSB" (ANA + BAP)	***	0	0	0
Murashige et Skoog	MS "tabac/41B" (ANA + BAP)	*	*	*	*
[NH ₄ ⁺]/2	MS "Initiation" (ANA + BAP)	nt	0	**	**
	MS (2,4D + Kinétine)	**	*	*	*
Murashige et Skoog	GM ⁺ (NOA)	nt	0	0	0
[macroéléments]/2	MS "Multi-Vignes"	*	*	*	*
	MS "Vitroplants"	nt	0	0	0
Murashige et Skoog	MS "Chée et Pool <i>Vitis</i> medium"	*	0	0	0
[Cl ⁻ , KI, MnSO ₄] réduites	MS "Chée et Pool <i>Vitis</i> medium" (ANA + BAP)	*	nt	0	0
	MS "Chée et Pool <i>Vitis</i> medium" (2,4D + Kinétine)	*	*	nt	nt
Murashige et Skoog	MS "Van der Salm"	0	0	0	0
FeNaEDTA → FeEDDHA	MS "Van der Salm" (ANA + BAP)	0	0	0	0
	MS "Van der Salm" (2,4D + Kinétine)	0	0	0	0
McCown Woody Plant	"McCown Woody Plant"	*	*	*	*

« Initiation » ou « tabac/41B » et sous différentes vitesses de rotation (170, 130 et 115 rpm) ont très rapidement abouti au même résultat.

1.3. Ensemencement direct d'explants en culture liquide

Parallèlement au passage en culture liquide de cals initiés sur milieu gélosé, des explants de vigne ont été placés directement en milieu liquide sous agitation sans passer par une phase de callogenèse sur milieu solide. Ainsi, de petits morceaux de 3 à 5 mm d'embryons somatiques, de feuilles, de tiges et de pétioles prélevés sur vitroplants de Chardonnay ont été utilisés pour des ensemencements liquides directs (Fig. 101). Parfois, les ensemencements ont également été effectués avec des mélanges d'explants, notamment de tiges et de pétioles (~1,5 g de mélange). De nombreux essais ont été effectués à partir des différents types d'explants, dans différents milieux (Tableau 21), tout en faisant varier (i) le type de repiquage (dilution ou renouvellement du milieu), (ii) le mode de repiquage (cellules sédimentées – Packed Cell Volume ou repiquage d'un volume de suspension mère), (iii) le volume et donc la dilution de repiquage. Souvent, ces choix ont été effectués en fonction de l'aspect visuel des suspensions en termes de densité, de granulosité et de couleur.

Une comparaison des milieux a été effectuée concernant les ensemencements directs d'explants en milieux liquides et le tableau 21 regroupe les résultats relatifs à la mise en suspension de cellules. Un des premiers constats effectués est que beaucoup de milieux liquides ont été inefficaces et ont rapidement mené à la perte des explants. C'est notamment le cas des 4 modifications du milieu MS : « Vitroplants » et « Van der Salm » additionnées ou dépourvues de phytohormones, du milieu « GM⁺ », ainsi que du milieu « Chée & Pool », ce dernier étant pourtant commercialisé pour la micropropagation de vigne.

Les milieux MS de concentration en ammonium réduite (excepté le milieu MS « CSB ») ont semblé être les mieux adaptés puisque ce sont les seuls à avoir abouti à la mise en suspension de cellules et, dans certains cas, à la croissance de celles-ci. Rappelons que ces milieux étaient déjà les plus adaptés pour l'initiation de cals sur milieux solides (tableau 20). D'autre part, les ensemencements d'embryons blessés au scalpel ont été globalement plus positifs comparés à ceux effectués à partir de feuilles, de tiges ou de pétioles ; ceci probablement en raison de la nature même des tissus. Ensemencés dans le milieu MS « CSB », les cellules en suspension initiées à partir d'embryons somatiques se sont divisées et ont, au cours du temps et des repiquages, abouti à une suspension épaisse et d'aspect

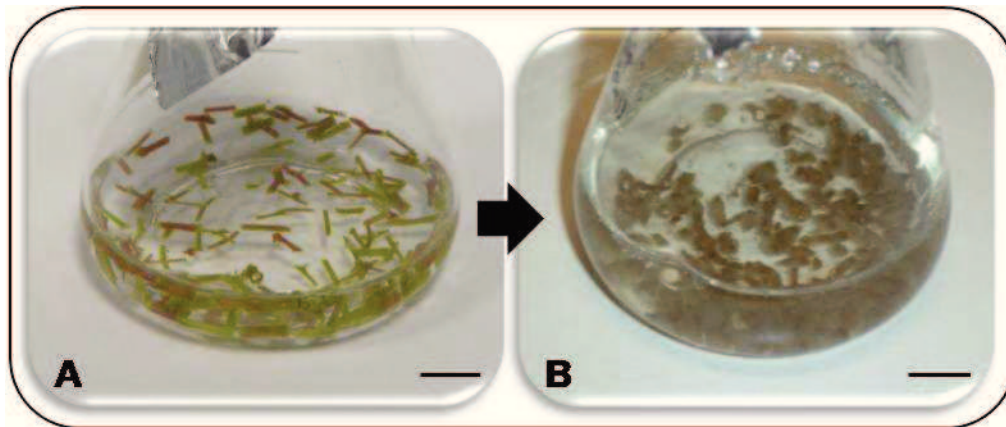


Figure 102 : Evolution des explants de tiges et de pétioles directement ensemencés en culture liquides. Les mélanges d'explants de tiges et de pétioles placés dans le milieu Murashige et Skoog « Initiation » (A) se sont rigidifiés au cours du temps formant des masses calleuses (B). Celles-ci ont été placées sur le même milieu solide jusqu'à la formation de cals friables. (Trait : 1 cm)

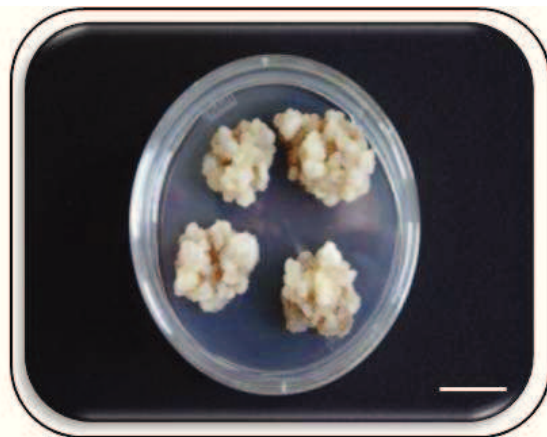


Figure 103 : Cals de Chardonnay obtenus à partir d'explants transférés d'une culture liquide sur milieu solide. Les petites masses calleuses obtenues en culture liquide à partir de morceaux de tiges et de pétioles, puis transférées sur milieu gélosé, ont développé des cals blanchâtres et de texture friable. Ceux-ci ont été de nouveau transférés en culture liquide sous agitation orbitale (115 rpm), à l'obscurité et à 23°C. (Trait : 2 cm)

satisfaisant. Maintenu plus de 6 mois dans ce milieu, cette suspension est ensuite devenue instable avec des phénomènes de brunissements rapides qui ont rapidement conduit à sa perte. D'autres ensemencements, notamment de morceaux de tiges et de pétioles dans le milieu MS $\text{NH}_4^+/2$ « Initiation », ont également permis une mise en suspension de cellules significative mais qui a rapidement subi les effets d'une dérive de croissance.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des cultures liquides de 15 ml ensemencées avec 0,6 à 0,7 g de tissus de feuilles, 0,8 à 1 g de morceaux de tiges, 0,4 à 0,6 g de morceau de pétioles ou avec une quantité indéterminée d'embryons blessés au scalpel. Plusieurs cultures initiées à partir de morceaux d'embryons somatiques se sont montrées encourageantes avec une mise en suspension de cellules individuelles. Pendant plusieurs semaines et après l'élimination progressive des explants initiaux, des suspensions « primaires » se sont maintenues sans réelle croissance ni division cellulaire. Celles-ci ont ensuite évolué pour former des microcals en suspension, prenant ainsi l'aspect non désiré de la suspension cellulaire embryogène de Chardonnay. Les cultures ensemencées avec des morceaux de feuilles ont également montré une mise en suspension de cellules avec une croissance cellulaire significative et un aspect satisfaisant. Cependant, les cellules de ces suspensions se sont très vite agglomérées, formant de petits amas pluricellulaires et hétérogènes les rendant inutilisables. Les cultures réalisées avec un mélange d'explants (tiges et pétioles) se sont avérées plus concluantes au niveau de la mise en suspension de cellules même si de nombreuses suspensions « primaires » ont rapidement décliné.

Malgré ces phénomènes de dérive et de brunissement, la mise en culture liquide de morceaux de tiges et de pétioles s'est tout de même montrée concluante en termes de production de cals. Certains explants ensemencés dans le milieu MS $\text{NH}_4^+/2$ « Initiation » ont en effet progressivement évolué en petites masses caleuses (Fig. 102) qui ont été placées en croissance sur le même milieu solide. Après 3 à 4 semaines, ces petites masses de cellules ont développé des cals de 1 à 1,5 cm de diamètre, sans zone nécrotique et de texture friable (Fig. 103). De nouveau transférés en culture liquide, ceux-ci ont permis la formation d'une suspension dense et en croissance dans le milieu MS « CSB ». Repiquée initialement tous les 10 jours par ajout de 10 ml de culture dans 20 ml de milieu frais, cette suspension s'est maintenue stable environ 6 mois avant de présenter les phénomènes de dérive et de brunissement évoqués précédemment. Un milieu de base Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968 ; annexe 05), qui n'avait pas été testé jusqu'ici, a permis la stabilisation et le maintien de



Figure 104 : Suspension cellulaire non embryogène de Chardonnay. La mise en culture liquide de cals obtenus à partir d'explants de tiges et de pétioles a abouti à la mise en suspension de cellules et à la formation d'une suspension cellulaire dense. Repiquée tous les sept jours dans le milieu Gamborg B5, cette suspension est homogène et stable au cours du temps. (Trait : 2 cm)

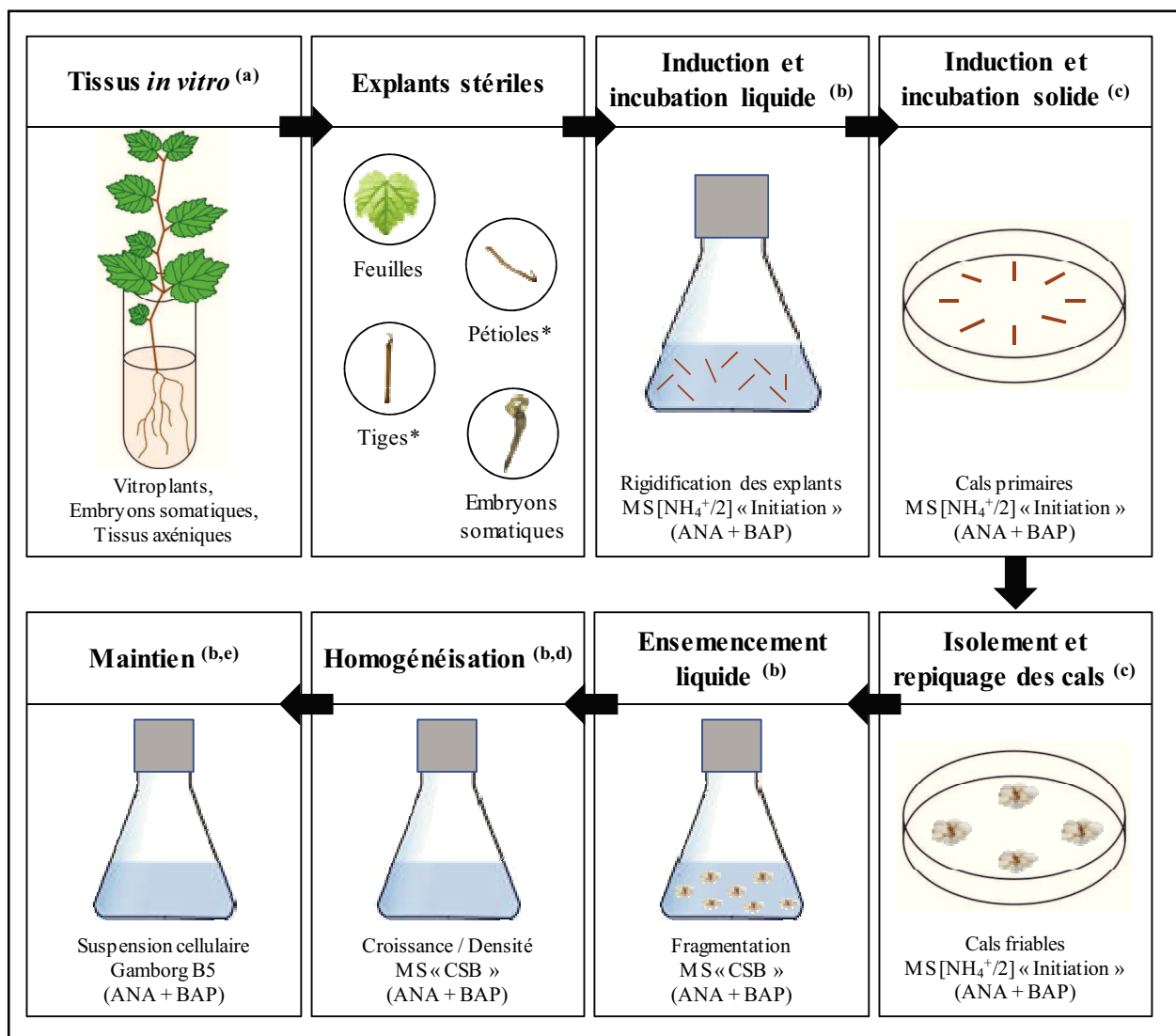


Figure 105 : Schématisation de la procédure utilisée pour l'initiation de la suspension cellulaire non embryogène de Chardonnay. * : explants utilisés en mélange. (a) : 23°C, 16 h de photopériode (vitroplants) ; 26°C, 115 rpm, obscurité (embryons somatiques). (b) : 23°C, 115 rpm, obscurité. (c) : 23°C, obscurité. (d) : dilution au 1/2 dans du milieu frais tous les 10 jours. (e) : dilution au 1/3 dans du milieu frais tous les 7 jours.

la suspension cellulaire non embryogène de Chardonnay actuellement utilisée au laboratoire (Fig. 104).

1.4. Protocole d'initiation de la suspension cellulaire de Chardonnay

Basée sur les essais et les observations effectués durant les 18 premiers mois de ces travaux de thèse, la suspension cellulaire non embryogène de Chardonnay a été obtenue avec la procédure suivante (Fig. 105) :

La première étape consiste en l'obtention de morceaux axéniques de tiges et de pétioles de vigne cv Chardonnay. Des morceaux d'entre-noeuds de 3 à 5 mm sont prélevés stérilement sur plants de vigne cultivés *in vitro* sur milieu gélosé McCown Woody Plant (Annexe 02). Entre 1 et 1,5 g d'explants (mélange de tiges et de pétioles) sont ensuite ensemencés en culture liquide dans 15 ml de milieu Murashige et Skoog $\text{NH}_4^+/2$ « Initiation » (Annexe 12). Ces cultures sont placées à l'obscurité, à 23°C et sous agitation orbitale (115 rpm, amplitude 25 mm). Au bout de 20 jours, 10 ml de milieu sont ajoutés à la culture, ramenant son volume à 25 ml. Après une semaine supplémentaire de culture, lorsque les explants commencent à former de petites masses dures et caleuses, celles-ci sont transférées stérilement sur milieu gélosé MS $\text{NH}_4^+/2$ « Initiation » en boîtes de Pétri, placées à l'obscurité, à 23°C. Les cals sont alors laissés en développement pendant 3 à 4 semaines jusqu'à ce qu'ils atteignent 1 à 1,5 cm de diamètre et une texture friable. Ils sont alors de nouveau transférés en culture liquide dans 15 ml de milieu MS « CSB » (Annexe 06) et placés sous agitation orbitale (115 rpm, amplitude 25 mm), à l'obscurité, à 23°C jusqu'à leur fragmentation et la mise en suspension de cellules. Cette suspension primaire est alors entretenue pendant environ trois mois dans ce dernier milieu et repiquée tous les 10 jours par ajout de 15 ml de suspension dans 15 ml de milieu frais (dilution au 1/2). Au terme de la période d'homogénéisation, la suspension qui s'est épaissie est alors transférée dans le milieu Gamborg B5 (Annexe 05) et repiquée tous les 7 jours par ajout de 10 ml de culture dans 20 ml de milieu frais (dilution au 1/3).

2. **Caractérisation de la suspension cellulaire de Chardonnay**

2.1. Etude de la croissance

Une des premières études menées sur la suspension cellulaire de Chardonnay initiée a été la caractérisation de sa croissance au cours de la culture. La croissance d'une population

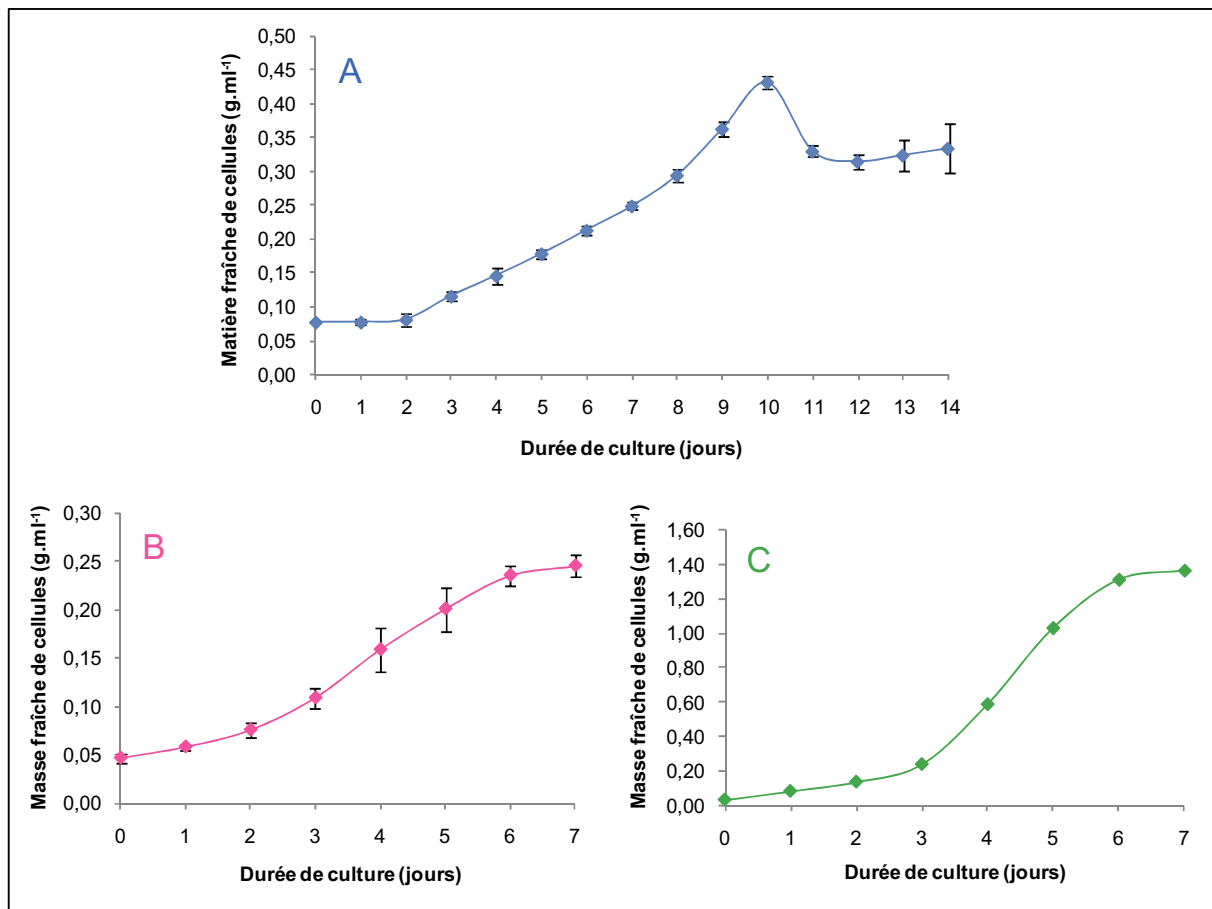


Figure 106 : Etude de la croissance de suspensions cellulaires de vigne et de tabac. Pour chaque suspension cellulaire, les cellules ont été récoltées sur filtres étalonnés, sur un verre fritté relié à une pompe à vide. Les galettes de cellules obtenues ont été pesées sur balance de précision. **(A)** Suspension cellulaire non embryogène de Chardonnay. La courbe de croissance est représentative de trois répétitions indépendantes. **(B)** Suspension cellulaire de Cabernet Sauvignon. La courbe de croissance est représentative de deux répétitions indépendantes. **(C)** Suspension cellulaire de tabac (BY2).

de cellules étant accompagnée d'une augmentation de leur nombre, la méthode utilisée a donc été de suivre l'évolution de la masse de matière fraîche de cellules au cours du temps. Parallèlement, l'étude des courbes de croissance des suspensions cellulaires de Cabernet Sauvignon, présente au laboratoire depuis de nombreuses années, ainsi que de tabac (*Nicotiana tabacum* cv Bright Yellow) a également été menée afin d'effectuer d'éventuelles comparaisons avec celle de la suspension de Chardonnay.

La croissance de la suspension cellulaire de Chardonnay est présentée figure 106 A et révèle une allure différente de celles obtenues avec l'autre cépage (Cabernet Sauvignon, Fig. 106 B) ou l'autre espèce (tabac, Fig. 106 C). Après repiquage, les cellules de Chardonnay subissent une phase de latence d'une durée de deux jours avant d'entrer dans une phase de division cellulaire. Cette latence, durant laquelle il n'y a pas d'augmentation immédiate de la masse de cellules, correspond à une phase d'adaptation à un nouvel environnement qu'est le milieu de culture frais. Chez la suspension cellulaire de Chardonnay, celle-ci semble se caractériser par une absence de division cellulaire pendant les deux premiers jours alors qu'elle est moins prononcée chez les cellules de Cabernet Sauvignon et de tabac qui semblent faiblement se diviser dès le premier jour après le repiquage.

Dès le troisième jour, la masse cellulaire de la suspension de Chardonnay augmente et entre dans une phase de croissance jusqu'au dixième jour de culture. Durant cette phase, la population cellulaire passe de 0,08 à 0,43 g.mL⁻¹ en 8 jours. De plus, nous pouvons constater que la vitesse de croissance est constante de J0 à J8 et qu'elle augmente légèrement jusqu'au 10^{ème} jour de culture. Une régression linéaire imposée entre J2 et J8 chez les cellules de Chardonnay, et entre J2 et J6 chez les cellules de Cabernet Sauvignon a permis de déterminer, par l'intermédiaire du calcul de la pente de chaque droite (respectivement 0,0418 et 0,0411), que les deux suspensions cellulaires de vigne avaient sensiblement la même vitesse de croissance au cours de ces périodes. Cependant, malgré une concentration en cellules équivalente en début de phase de croissance (0,08 g.mL⁻¹), nous pouvons observer que la durée de celle-ci est d'environ 8 jours chez la suspension cellulaire de Chardonnay, alors qu'elle n'est que de 4 jours chez la suspension cellulaire de Cabernet Sauvignon. Il est possible que cette différence soit due à la nature même des cépages ou à la composition des deux milieux de culture « Gamborg B5 » et « CSB » utilisés (Annexes 05 et 06). Comparées aux cellules de tabac dont la croissance semble être de type exponentiel, les cellules de vigne révèlent une croissance typiquement linéaire.

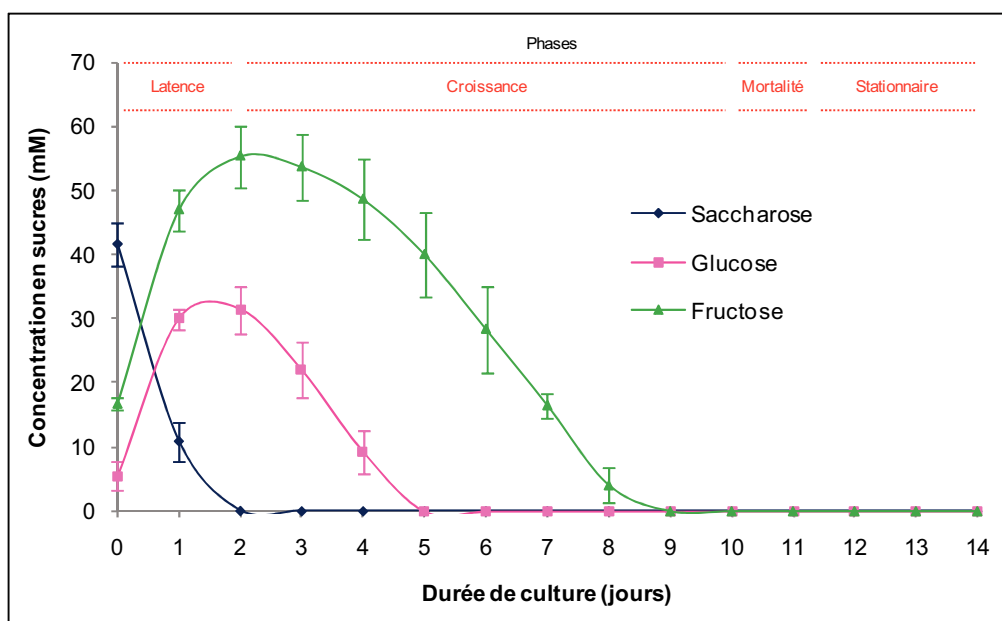


Figure 107 : Evolution de la concentration en sucres du milieu au cours de la culture des cellules de Chardonnay. Les cellules ont étéensemencées dans le milieu Gamborg B5 à raison de 10 ml de culture dans 20 ml de milieu frais. Durant 14 jours, le milieu de culture a été prélevé, filtré sur filtres GF/C Whatman® et les sucres ont été dosés par HPLC. Les courbes représentent l'évolution de la concentration en saccharose, glucose et fructose et sont représentatives de trois répétitions indépendantes. Les différentes phases de croissance cellulaire sont juxtaposées à l'évolution de la concentration en sucres.

Alors qu'au terme de leur phase de croissance les cellules de Cabernet Sauvignon et de tabac entrent en phase stationnaire, phase durant laquelle elles arrêtent de se diviser même si elles restent métaboliquement viables ; les cellules de Chardonnay entrent rapidement dans une phase de mortalité cellulaire. Cette phase de mortalité, durant laquelle il y a une perte d'environ 25% de la masse fraîche de cellules, est probablement due à une carence rapide en nutriments parallèlement à l'accumulation potentielle de « déchets » toxiques conduisant à la diminution du nombre de cellules viables. Cette phase est cependant suivie d'une légère reprise de la croissance entre J11 et J14 (+0,02 g.mL⁻¹). En effet, la mort d'une partie des cellules a probablement libéré certains solutés intracellulaires dans le milieu pouvant être utilisés comme substrats par les cellules encore viables. Malgré une phase de croissance jusqu'au dixième jour de culture et une légère reprise de croissance jusqu'au quatorzième jour, les repiquages de la suspension cellulaire de Chardonnay tous les 10 ou 14 jours ont tous abouti à une dérive ou à des phénomènes de brunissement conduisant à la perte des cultures. C'est pourquoi cette suspension est repiquée tous les 7 jours ce qui permet son maintien.

2.2. Evolution de la concentration en sucres du milieu durant le cycle de croissance cellulaire

Afin de tenter d'expliquer plus finement l'allure de la courbe de croissance des cellules non embryogènes de Chardonnay, un dosage des sucres du milieu a été effectué par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) au cours de leur culture. Ainsi, l'évolution de la concentration en trois sucres : le saccharose, le glucose et le fructose a été suivie pendant 14 jours. Initialement, la culture de cellules de Chardonnay contient majoritairement du saccharose comme source de carbone (Fig. 107) ainsi qu'un reliquat de fructose et de glucose provenant du repiquage lui-même (à J7 le milieu de culture contient encore du fructose) et d'une hydrolyse partielle du saccharose pendant la phase de stérilisation des milieux par autoclavage. L'hydrolyse rapide du saccharose durant les deux premiers jours de culture s'accompagne de l'augmentation de la concentration en hexoses (glucose et fructose) jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de saccharose dans le milieu. Cette observation suggère que la suspension de Chardonnay sécrète, durant la phase de latence, une ou plusieurs invertases dans le milieu capables de cliver le disaccharide. Malgré la plus faible accumulation en glucose par rapport au fructose, qui s'explique par sa quantité initiale à J0, il semble que les deux monosaccharides ne soient pas consommés durant le 1^{er} jour de la phase de latence. Cependant, entre le 1^{er} et 2^{ème} jour de culture, alors que le fructose continue de

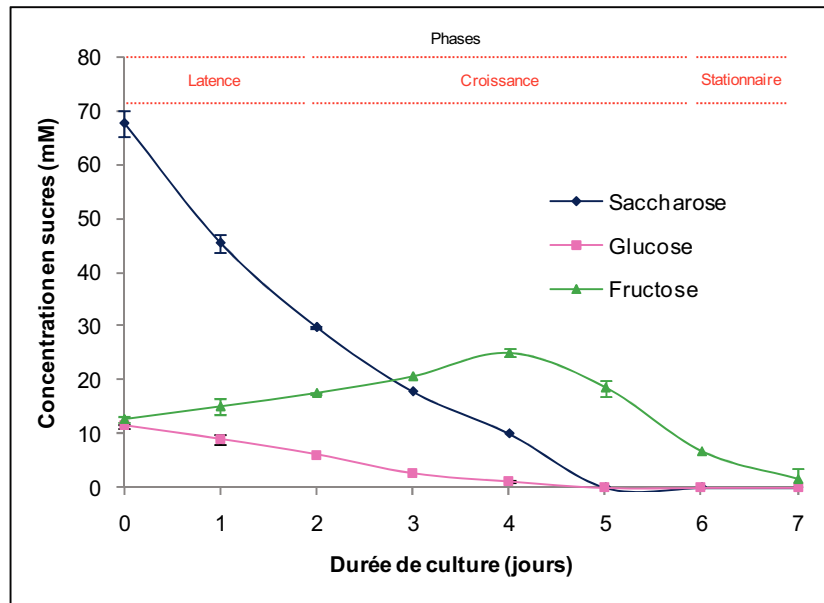


Figure 108 : Evolution de la concentration en sucres du milieu au cours de la culture des cellules de Cabernet Sauvignon. Les cellules ont étéensemencées dans le milieu Murashige et Skoog « CSB » à raison de 10 ml de culture dans 30 ml de milieu frais. Durant 7 jours, le milieu de culture a été prélevé, filtré sur filtres GF/C Whatman® et les sucres ont été dosés par HPLC. Les courbes représentent l'évolution de la concentration en saccharose, glucose et fructose et sont représentatives de deux répétitions indépendantes. Les différentes phases de croissance cellulaire sont juxtaposées à l'évolution de la concentration en sucres.

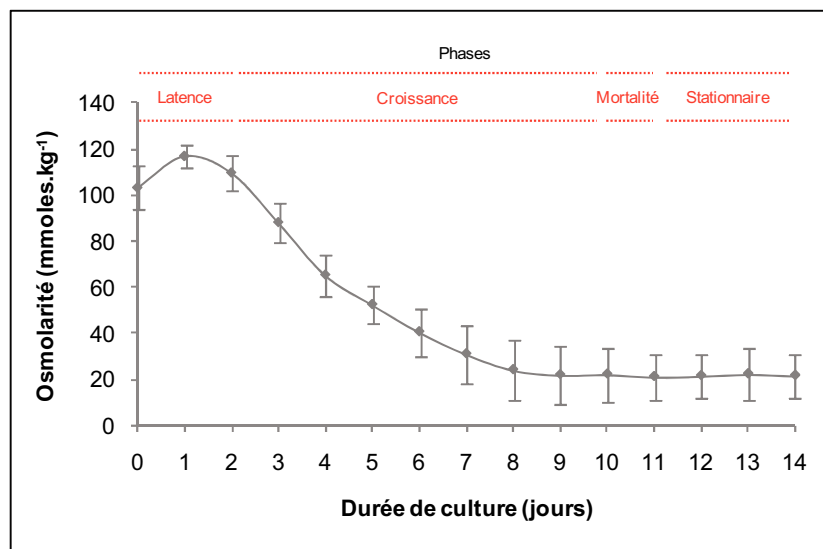


Figure 109 : Evolution de l'osmolarité du milieu au cours de la culture des cellules de Chardonnay. Les cellules ont étéensemencées dans le milieu Gamborg B5 à raison de 10 ml de culture dans 20 ml de milieu frais. Durant 14 jours, le milieu de culture a été prélevé, filtré sur filtres GF/C Whatman® et l'osmolarité dosée à l'aide d'un osmomètre à tension de vapeur Wescor®. Les valeurs sont exprimées en mmoles.kg⁻¹ et la courbe est représentative de trois répétitions indépendantes. Les différentes phases de croissance cellulaire sont juxtaposées à l'évolution de l'osmolarité.

s'accumuler dans le milieu, le glucose commence à être consommé. Dès l'entrée des cellules en phase de croissance (fin du 2^{ème} jour), les deux hexoses sont consommés, le glucose restant préférentiellement absorbé par rapport au fructose. Ce phénomène est également constaté dans les suspensions de Cabernet Sauvignon (Fig. 108) où il n'y a pas d'accumulation de glucose, celui-ci étant consommé dès le repiquage des cellules. D'autre part, les cellules de Cabernet Sauvignon maintiennent leur préférence pour le glucose jusqu'à son épuisement (J4) avant la consommation du fructose ce qui n'est pas le cas des cellules de Chardonnay.

Il est également intéressant de noter que pour les cellules de Chardonnay, la disparition des hexoses du milieu, qui s'observe aux alentours de J9, ne semble pas provoquer d'arrêt de croissance contrairement aux cellules de Cabernet Sauvignon qui entrent en phase stationnaire (J6) avant l'épuisement total des sucres du milieu. En effet, malgré l'absence de sucres dans le milieu, cette suspension cellulaire continue de croître jusqu'au 10^{ème} jour au-delà duquel elle entre dans une phase rapide de mortalité.

2.3. Evolution de l'osmolarité du milieu de culture

Parallèlement à certains facteurs comme la concentration en sucres, de nombreuses conditions environnementales comme l'osmolarité peuvent influencer la division cellulaire. Alors que la conductivité d'un milieu dépend uniquement de la concentration en minéraux (électrolytes), l'osmolarité est la somme des molarités de tous les composés du milieu. Chaque jour, un volume de 10 µl de milieu de culture a été prélevé puis déposé sur disque de papier Wescor[®], et introduit dans un osmomètre à tension de vapeur. Les valeurs d'osmolarité sont exprimées en mmoles.kg⁻¹ et sont représentées dans la figure 109. Nous pouvons constater que suite au repiquage dans du milieu frais (J0), l'osmolarité augmente le 1^{er} jour de 103 à environ 120 mmoles.kg⁻¹. Ensuite, la croissance concomitante des cellules, qui tendent à utiliser le glucose puis le fructose, s'accompagne d'une baisse progressive de l'osmolarité. A partir du 10^{ème} jour de culture, moment où le milieu est exempt de sucres et où les cellules entrent en phase de mortalité, l'osmolarité atteint son minimum autour de 20 mmoles.kg⁻¹.

2.4. Evolution du pH du milieu de culture

Le pH extracellulaire est un autre paramètre important qui subit généralement des variations au cours de la culture. Un pH compris entre 5,0 et 6,0 est généralement optimal pour la croissance cellulaire (Endress, 1994) car correspondant au pH apoplastique dans la

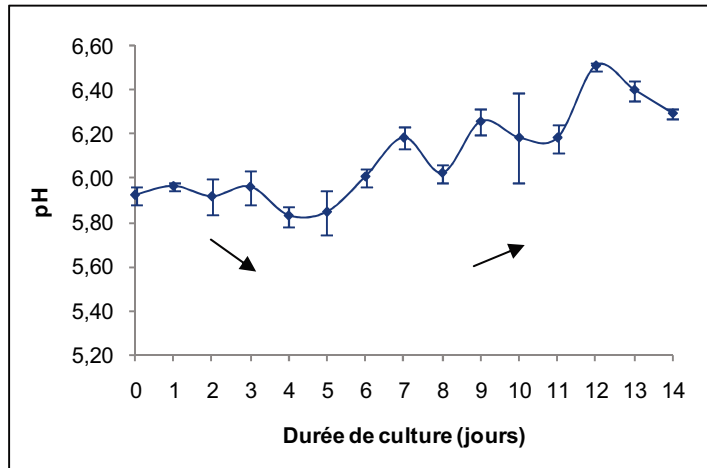


Figure 110 : Evolution du pH du milieu au cours de la culture des cellules de Chardonnay. Les cellules ont étéensemencées dans le milieu Gamborg B5 à raison de 10 ml de culture dans 20 ml de milieu frais. Durant 14 jours, le milieu de culture a été prélevé, filtré sur filtres GF/C Whatman® et le pH dosé à l'aide d'un pHmètre Sartorius®. La courbe est représentative de trois répétitions indépendantes.

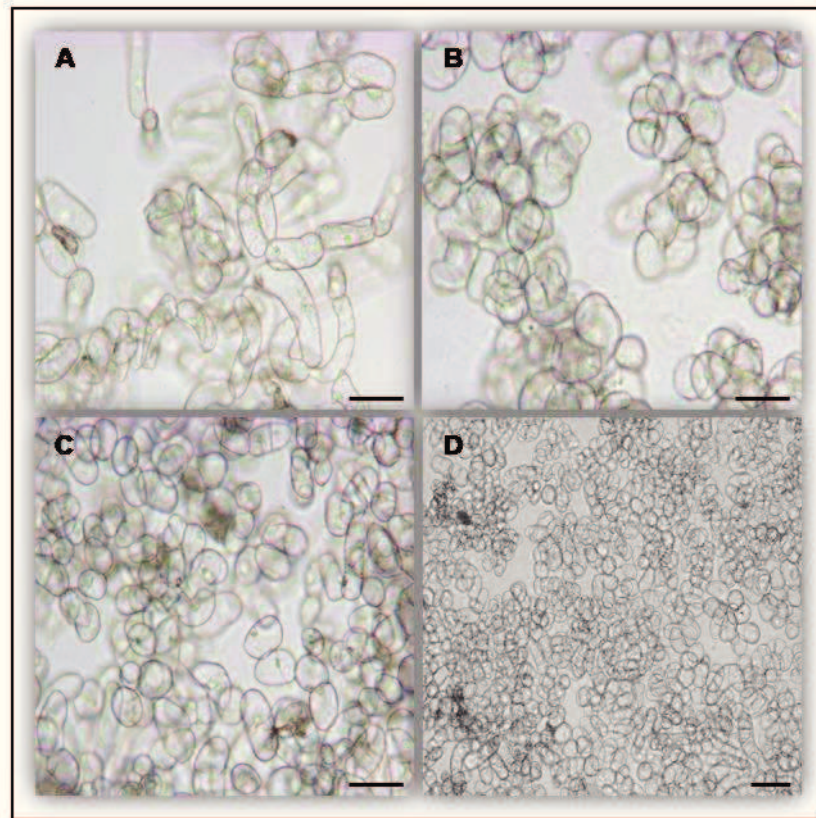


Figure 111 : Observations microscopiques des suspensions cellulaires de vigne et de tabac. Après 7 jours de culture, un volume de suspension cellulaire de tabac (A), de Cabernet Sauvignon (B) et de Chardonnay (C et D) a été prélevé et observé au microscope. L'acquisition des images a été effectuée à l'aide d'un microscope Motic® BA400 et des logiciels Wolfie®V.1 et Pégase Pro®V.4 après calibration du système optique. (Trait : 20 µm)

plante. En condition normale, le pH initial du milieu des cellules de Chardonnay est d'environ $5,9 \pm 0,04$ (Fig. 110). Au terme des quatre premiers jours de culture, une très légère acidification du milieu peut être observée avec une valeur de pH de $5,8 \pm 0,05$ mesurée à J4. A partir du 5^{ème} jour, le pH extracellulaire tend à s'alcaliniser jusqu'à un maximum de $6,5 \pm 0,02$ à J12 et $6,3 \pm 0,03$ en fin de culture.

2.5. Observation microscopique des cellules de Chardonnay

Au 6^{ème} jour de culture, les cellules de Chardonnay ont été observées au microscope parallèlement à des cellules de Cabernet Sauvignon et de tabac (BY2). Alors que les cellules de tabac sont majoritairement de forme allongée et cylindrique (Fig. 111), les cellules de vigne sont des cellules sphériques de 10 μm de diamètre en moyenne. La suspension cellulaire de Cabernet Sauvignon forme des « microcals » avec des cellules en suspension qui s'organisent en petits amas cellulaires. Au contraire, la suspension cellulaire de Chardonnay apparaît plus dense et plus fine, les cellules étant relativement individualisées. Ce caractère homogène de la suspension initiée semble donc répondre aux critères d'homogénéité et de densité requis lors d'études de transport de substrat ou lors de traitement par des éliciteurs.

3. Discussion

Lors de l'initiation de ce travail, plusieurs suspensions cellulaires de vigne étaient disponibles au sein du laboratoire : une suspension non embryogène de Cabernet Sauvignon, ainsi que des suspensions embryogènes de 41B (*V. vinifera* cv Chasselas x *V. berlandieri*) et de Chardonnay. Ces deux dernières peuvent générer des embryons par embryogenèse somatique dès lors que leur milieu de culture est dépourvu d'auxine (Coutos-Thévenot *et al.*, 1992) ; cependant, ces suspensions cellulaires se présentent sous forme de petits amas de cellules (Fig. 112) ce qui rend les études de transport par absorption de substrats radioactifs difficilement envisageables car potentiellement hétérogènes. Comme mentionné dans le chapitre précédent, nous avons choisi de travailler avec le Chardonnay d'une part en raison des banques d'ESTs (Expressed Sequence Tags) disponibles sur ce cépage en 2006, et d'autre part parce que les premières séquences de transporteurs de sucres isolées chez la vigne étaient issues de Chardonnay (Glissant, 2005 ; Vignault *et al.*, 2005). La recherche d'une suspension cellulaire non embryogène de Chardonnay a donc été effectuée auprès de l'unité de recherche « Vignes et Vins » de l'Université de Reims Champagne-Ardennes (Pr C. Clément), de l'UMR « Santé Végétale » de l'INRA de Bordeaux (DR M-F. Corio-Costet), de l'EA

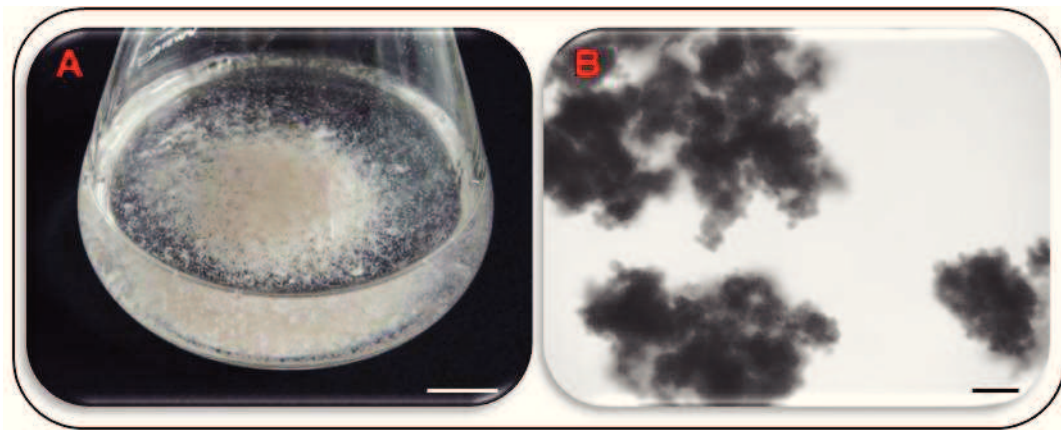


Figure 112 : Suspension cellulaire embryogène de Chardonnay. La culture de cellules embryogènes de Chardonnay se présente sous forme de petits amas blancs en suspension, hétérogènes et sédimentant rapidement après un arrêt de l'agitation (A). Observées au microscope (Motic[®]BA400 ; grossissement x 100) ces cellules de petite taille (< 10 µm) s'organisent en amas morphologiquement hétérogènes de 50 à 500 µm de diamètre (B) ce qui les rend difficilement utilisables pour des études de transport de substrat. (Trait A : 1 cm ; B : 100 µm)

« GESVAB » de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2 (Pr J-M Mérillon), de l'UMR « Science pour l'œnologie » de l'INRA de Montpellier (CR C. Romieux), de l'UMR « Plantes, Microbes, Environnement » de l'Université de Bourgogne (MC B. Poinssot) ainsi qu'auprès de « LVMH Recherche, Moët et Chandon » de Reims (Dr M. Boulay). Cette recherche n'ayant pas abouti, l'initiation d'une suspension cellulaire non embryogène de Chardonnay s'est alors imposée.

La culture *in vitro* de plantes nécessite la mise au point souvent empirique de divers paramètres expérimentaux pouvant être complexes. C'est pourquoi, par soucis de clarté, ces paramètres ont été considérés indépendamment au cours de cette discussion.

3.1. Induction de la callogenèse

En culture *in vitro* de cellules végétales, une des premières étapes fondamentales est l'induction de cals (Eibl et Eibl, 2009) et de nombreuses études ont montré la possibilité d'obtenir des cals à partir de différents tissus de vigne tels que les tiges, les pétioles, les fleurs, les fruits ou encore les vrilles (Braun, 1950 ; Fallot, 1955, Alleweldt and Radler, 1962 ; Arya *et al.*, 1962 ; Staudt *et al.*, 1972). Aussi, plusieurs types de tissus tels que des embryons somatiques, différents organes de vitroplants ainsi que des baies prélevées au vignoble ont été utilisés pour l'initiation de la callogenèse sur milieu solide. Outre le fait d'être cultivés en conditions axéniques et de fournir un matériel homogène, un des avantages des vitroplants par rapport à des tissus provenant du vignoble est que chez les *Vitis* cultivés *in vitro*, il y a conservation de certains caractères morphologiques juvéniles qui concernent l'absence de vrilles ainsi que la phyllotaxie (Augé *et al.*, 1989). Ces caractères juvéniles, qui se maintiennent au cours des repiquages successifs *in vitro* et même quelques temps après le repotage, peuvent probablement représenter un avantage dans la capacité des cellules à se dédifférencier. Cependant, le matériel *in vitro* ne permet la mise en culture que de tissus de petite taille ce qui suppose que l'explant est plus facilement orienté par les substances du milieu contrairement à des explants de grande taille pour lesquels les équilibres endogènes sont déterminants.

3.1.1. Callogenèse à partir des feuilles

Beaucoup de tissus de vigne mis en culture sur milieux solides n'ont pas abouti à la production de cal. Bien que Piagnani *et al.* (2003) aient observé une callogenèse plus

importante à partir d'explants de feuilles de vigne comparativement à la mise en culture d'entre-nœuds ou de racines (Cabernet Sauvignon, *V. riparia*), les disques foliaires provenant de vitroplants se sont avérés être les tissus les moins efficaces en terme d'induction de cals et des phénomènes de brunissement ont été observés chez la quasi-totalité des explants provoquant la mort de ceux-ci. Ce phénomène est un problème majeur chez beaucoup d'espèces et il est souvent difficile de le contrôler. Dû à l'oxydation de substances de nature phénolique qui ont un effet toxique, les cellules mortes peuvent diminuer ou annuler les échanges entre l'explant et le milieu. De plus, ces composés phénoliques peuvent agir en inhibiteurs. Très nombreux chez les végétaux, ce sont des inhibiteurs du métabolisme qui interviennent dans de nombreux processus soit comme antagonistes de substances de croissance soit aussi comme inhibiteurs des réactions métaboliques (Augé *et al.*, 1989). L'ajout de substances anti-oxydantes telles que l'acide ascorbique, le glutathion réduit ou encore de pièges à polyphénols tel que le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ne permet pas toujours de s'affranchir de ce problème (Roussos et Pontikis, 2001 ; Coutos-Thévenot, communication personnelle). Comme beaucoup d'autres espèces ligneuses, les tissus de vigne contiennent une quantité importante de polyphénols, tannins ainsi que des produits de peroxydation des lipides (Baydar, 2006). Ce contenu en composés phénoliques est variable en fonction du type et de la source des explants mis en culture et directement corrélé aux phénomènes de brunissement. Il explique 93% de la variation du pourcentage de brunissement chez l'olive (Roussos et Pontikis, 2001) et chez la vigne une corrélation positive est observée entre le brunissement des explants et leur contenu en composés phénoliques comme l'acide gallique, la catéchine, le catéchol et l'acide chlorogénique (Bayard, 2006). Outre la fleur et la baie, certains organes végétatifs comme la feuille accumulent des composés phénoliques. Chez les cépages Müller Thurgau, Regent et Pinot Gris, des flavonols s'accumulent principalement dans les feuilles où ils constituent la principale classe de flavonoïdes (Puhl *et al.*, 2008). Cette quantité importante de flavonols est cohérente avec l'expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes comme *VvFLS* (flavonol synthase) exprimé dans la feuille (Czemmel *et al.*, 2009). Deluc *et al.* (2006) montrent également l'expression du facteur de transcription *VvMYB5a*, probablement impliqué dans la régulation de la voie des phénylpropanoïdes chez la vigne, très importante dans la feuille et la jeune baie. La présence de ces composés phénoliques au sein des feuilles permet donc vraisemblablement d'expliquer les phénomènes de brunissement et les difficultés de callogenèse rencontrées, en particulier dans le cas d'une plante ligneuse (Margara, 1984).

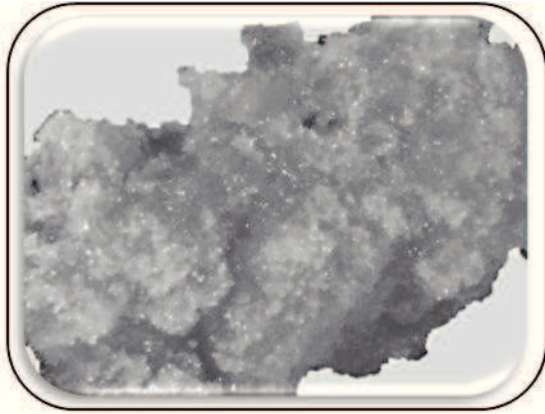


Figure 113 : Cal de *Vitis vinifera* obtenu à partir de baies de raisin. Des cals de nature friable ont pu être obtenus à partir de pellicule de baie de *V. vinifera* cv. Uva Italia (synonyme Muscat d'Alexandrie). Ces cals (établi par S. Cuperus, Université des Sciences Appliquées, Zurich) sont entretenus sur milieu Murashige et Skoog, à 25°C et à l'obscurité. (d'après Eibl et Eibl, 2009).

3.1.2. Callogenèse à partir des baies de raisin

Les feuilles n'ayant pas permis d'obtenir de cals, des tissus frais de jeunes baies de Chardonnay prélevées sur le domaine de la Protection des Végétaux de Poitiers (Biard) ont également été mis en culture sur milieux solides. Eibl et Eibl (2009) mentionnent en effet la possibilité d'obtenir des cals friables à partir de pellicules de baies (*Vitis vinifera* cv. Uva Italia ; Fig. 113). Cependant, ni la pellicule, ni la pulpe n'ont permis d'obtenir de résultats probants en raison de contaminations permanentes et de nature multiple. Les baies étant issues du vignoble, celles-ci sont sans nul doute porteuses d'un grand nombre de « germes » qui peuvent plus ou moins résister aux protocoles de désinfection. La morphologie de la grappe de Chardonnay, petite et compacte, favorise aussi le maintien d'un microclimat favorable au développement d'agents pathogènes et nous pouvons supposer que la pruine, la fine couche cireuse qui recouvre la baie, rend la désinfection difficile en raison de ses propriétés hydrophobes. De plus, il a également été démontré avec *B. cinerea* qu'il existait, au sein de la baie de raisin, un inoculum interne et latent pouvant être trouvé dans l'ensemble de la pulpe après la véraison (Keller *et al.*, 2003). Dans cette étude, des essais d'infections menés en serre ont en effet montré que 100% des inflorescences de Chardonnay infectées conduisait à des baies porteuses d'un inoculum latent. Considérant ces données, les essais utilisant les baies ont donc rapidement été limités.

3.1.3. Callogenèse à partir d'embryons somatiques, de tiges et de pétioles

Finalement, les morceaux d'embryons somatiques, de pétioles et de tiges placés en culture solide sur milieu de base Murashige et Skoog (MS) ont été plus efficaces dans la production de cals que les tissus de feuilles et de baies. Beaucoup d'études soulignent l'influence du type d'explant utilisé dans la callogenèse et ce chez divers espèces comme *Hibiscus sabdariffa* (Sié *et al.*, 2010), *Atriplex Halimus* (Ighilhariz *et al.*, 2008) ou encore *Cannabis sativa* (Slusarkiewicz-jarzina *et al.*, 2005). Bien souvent, tige, pétiole et embryon sont décrits comme efficaces, la feuille pouvant avoir un pouvoir callogène plus tardif et un taux de callogenèse variable selon l'espèce. Dans cette étude, les embryons somatiques sommairement blessés au scalpel ont développé, au cours des semaines, de petites masses cellulaires dépourvues de nécroses ; ceci pouvant certainement s'expliquer par la nature même des tissus placés en culture. En effet, les tissus d'embryons somatiques ne sont pas différenciés ni lignifiés ce qui induit d'une part une certaine friabilité et d'autre part une totipotence cellulaire plus élevée qu'au sein d'un tissu spécialisé. Les cellules subissent moins

de modifications et la fragilité de leurs structures membranaires permet probablement une pénétration rapide des régulateurs de croissance. Certains auteurs estiment que le niveau endogène de régulateurs de croissance relativement important chez les embryons immatures explique la formation rapide de cals parfois surmontés de jeunes pousses (Ayolié *et al.*, 2007).

Parallèlement, des cals de pétioles et de tiges de vigne ont également été obtenus sur milieu Murashige et Skoog même si des phénomènes de brunissement et d'hyperhydrie (= vitrification = aspect vitreux) ont été observés. La tige, au même titre que la feuille de vigne, contient de nombreux composés phénoliques tels que des acides phénoliques (acide caftarique, acide coutarique), des flavonols (quercétine, kaempferol, myricétine, catéchine), des flavanonols (astilbine, engelétine) ainsi que des tannins condensés (cyanidine, delphinidine) pouvant être oxydés (Souquet *et al.*, 2000). D'autre part, la culture *in vitro* d'espèces ligneuses s'accompagne bien souvent d'autres phénomènes anormaux comme la vitrification qui représente un problème sérieux en micropropagation. Dans la littérature, ce phénomène peut être attribué à de nombreux paramètres tels que l'humidité relative, le potentiel hydrique du milieu, la concentration en agar, en cytokinines ou à la présence de plusieurs éléments nutritifs comme NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^- (Brand, 1993 ; Kataeva *et al.*, 1991 ; Pasqualetto *et al.*, 1988 ; Singha *et al.*, 1990). Même si le mode d'action n'est pas encore bien compris, il est possible que la vitrification soit la résultante d'un effet combiné de ces différents paramètres et dépendant de l'espèce considérée. De plus, une caractéristique commune aux différentes études de la vitrification menées sur *Malus domestica*, *Amelanchier arborea*, *Camellia sinensis*, *Gerbera jamesonii* ou encore *Cydonia oblonga* cultivés *in vitro* (Brand, 1993 ; Kataeva *et al.*, 1991 ; Pasqualetto *et al.*, 1988 ; Singha *et al.*, 1990), est que le milieu de base utilisé est le milieu Murashige et Skoog considéré comme un milieu très riche particulièrement en composés azotés (18,8 mM KNO_3 ; 20,6 mM NH_4NO_3). Or, plusieurs études montrent que le degré d'hyperhydrie est étroitement corrélé à la concentration en nitrate et ammonium. Même s'il est difficile de déterminer si celle-ci est liée à la concentration en nitrate ou en ammonium (ou les deux), Daguin et Letouzé (1986) ainsi que Brand (1993) ont observé une corrélation linéaire entre la vitrification et la concentration en ammonium chez *Amelanchier arborea* et *Salix babylonica*. A forte concentration, l'ammonium peut être toxique pour les tissus et les auteurs suggèrent que la vitrification serait le résultat d'un phénomène de détoxication à l'égard de cet ion impliquant la glutamate déshydrogénase. En effet, l'amination de l' α -cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase est considéré comme spécifique des processus de détoxication chez les plantes supérieures, et

dans ce contexte, une forte concentration en ammonium induirait une augmentation de l'activité de cette enzyme qui détournerait le pool d'hydrates de carbone de la voie de biosynthèse des lignines vers la synthèse d'acides aminés, conduisant à la vitrification des tissus. Bien que Brezeanu *et al.* (1980) conseillait un repiquage des cals toutes les 2 semaines afin d'éviter des effets d'hétérogénéité morphologique ; les effets de brunissement et d'hyperhydrie ont nettement été réduits suite à un repiquage toutes les 4 semaines parallèlement à l'élimination des zones nécrotiques. Cette fréquence de repiquage a certainement permis de réduire les instabilités génétiques et la perte de caractéristiques morphologiques souvent observées (Eibl and Eibl, 2009).

3.1.4. Influence du milieu de culture : le milieu MS

Considérant l'ensemble des données présentées, il apparaît évident que la composition en nutriments du milieu de culture est un paramètre critique pour la culture de cellules. Généralement composé d'eau, d'un milieu de base (source de carbone, composés organiques et inorganiques) et de phytohormones, un nombre important de « combinaisons » entre ces différents éléments peut être envisagé lors de l'élaboration d'un milieu de culture optimum pour la croissance cellulaire. Le milieu de base généralement utilisé en culture cellulaire est celui décrit par Murashige et Skoog (1962) qui, révisé par Linsmaier et Skoog (1965) puis Gamborg *et al.* (1968) peut être considéré comme un milieu standard. Dans les années 80 et 90, celui-ci était utilisé par neuf laboratoires sur dix (Vasil and Thorpe, 1994) et pour 80% des cultures cellulaires végétales (Evans *et al.*, 1983). Initialement développé pour la culture de cals de tabac (*Nicotiana tabacum*), ce milieu est riche en micro- et surtout macroéléments avec une concentration relativement importante en sources d'azote. Ces concentrations importantes en ammonium, potassium, nitrate et phosphate sont généralement décrites comme bénéfiques pour l'initiation et la culture de cals (Murashige and Skoog, 1962 ; Vasil and Thorpe, 1994). Au laboratoire, des cals de vigne de Cabernet Sauvignon étant entretenus sur le milieu « CSB » de base MS, ceci a conduit à utiliser préférentiellement ce milieu pour l'initiation de la callogenèse à partir de tissus de Chardonnay. Placés dans les mêmes conditions de culture que les cals de Cabernet Sauvignon (23°C à l'obscurité), aucun explant de Chardonnay n'a cependant abouti à une production significative de cellules suggérant que la composition du milieu « CSB » n'était pas adaptée pour la callogenèse de ce cépage. D'autres milieux ont alors été testés et notamment les milieux « Chée et Pool *Vitis* medium » et « Van der Salm » enrichis ou non en régulateurs de croissance. Le milieu « Chée et Pool *Vitis* medium » est une modification de MS dans laquelle les concentrations en chlore, iode

de potassium et manganèse sont réduites résultant en une amélioration de la multiplication de *Vitis* (hybride « Remaily Seedless ») (Chée et Pool, 1987). La modification « Van der Salm » est utilisée pour la micropropagation d'explants de rose (*Rosa hybrida* L.) et contient une importante source de fer. Dans ce milieu, le FeNaEDTA est remplacé par du FeEDDHA qui donne au milieu une couleur rouge ocre caractéristique. Ce chélateur de fer est plus photostable et représente une meilleure source de fer facilement absorbée par les plantes. Van der Salm *et al.* (1994) ont montré un effet bénéfique de ce chélateur sur *Rosa hybrida* cv Moneyway en limitant les phénomènes de chlorose due à une carence en fer des explants cultivés *in vitro*. Bien que certains cépages de vignes comme Cabernet Sauvignon et Pinot Blanc sont connus pour avoir une aptitude génotypique à résister à la carence en fer impliquant principalement une augmentation de l'activité de la Fe³⁺-chélate réductase, la production d'acides malique et citrique, et potentiellement l'induction de la H⁺-ATPase plasmique, il existe des génotypes sensibles comme *V. riparia* et *V. rupestris*, au sein desquels ces mécanismes ne sont pas régulés (Piagnani *et al.*, 1997 ; 2003). La rose et la vigne étant deux espèces ligneuses et la carence en fer pouvant induire une réduction de croissance et la production de composés phénoliques chez les calcs de vigne (Piagnani *et al.*, 2003), la modification « Van der Salm » a également été testée pour la culture de tissus de Chardonnay. Cependant, bien que décrits comme bénéfiques pour la culture *in vitro* d'espèces ligneuses comme la vigne ou la rose, les deux modifications « Chée et Pool » et « Van der Salm », avec ou sans régulateurs de croissance, n'ont pas permis d'obtenir de calcs quels que soient les tissus placés en culture. En effet, ces deux milieux ont systématiquement et très rapidement induit d'importants phénomènes de brunissement et de nécrose des tissus. Des essais de micropropagation *in vitro* de vigne cv Chardonnay sur ces deux milieux ont également abouti aux mêmes résultats.

De façon générale, il semble donc que les milieux comprenant les micro- et macroéléments de MS ne soit pas adaptés car probablement trop riches pour la culture de Chardonnay. En 1989, Augé *et al.* observaient d'ailleurs que la composition de MS n'était pas toujours la meilleure et qu'elle ne convenait pas pour plusieurs espèces. Il semble en effet que dans certains cas sa teneur en certains ions dépasse l'optimum si bien que ce milieu est souvent utilisé dilué de moitié pour éviter des effets inhibiteurs sur la croissance (Augé *et al.*, 1989 ; Margara, 1984). Les cépages de vigne pouvant avoir des caractéristiques et des exigences très différentes, il n'est donc pas surprenant que le milieu « CSB » soit adapté pour la culture de Cabernet Sauvignon (cépage rouge), le milieu « Chée et Pool » adapté pour

l'hybride de vigne « Remaily Seedless », les deux étant inadaptés pour Chardonnay (cépage blanc). De telles différences ont d'ailleurs été mises en évidence par Péros *et al.* (1998) sur vingt-cinq cépages et hybrides de vigne. Selon l'auteur, la grande variabilité observée entre les cépages indique que l'efficacité des techniques *in vitro* est fortement dépendante du génotype. Cet effet génotype est également observé chez beaucoup d'autres espèces comme *Oryza sativa*, *Ipomoea batatas*, *Triticum durum* ou *Cannabis sativa* (Ayolié *et al.*, 2007 ; Houndonougbo, 1989 ; Slusarkiewicz -Jarzina *et al.*, 2005 ; Visarada *et al.*, 2002).

3.1.5. Influence du milieu de culture : les milieux MS NH₄/2 et MS/2

Privés en grande partie des mécanismes régulateurs de la plante entière, les tissus isolés *in vitro* sont particulièrement sensibles à l'action des ions et les problèmes de culture doivent souvent se poser en termes de pression d'ions et d'équilibres ioniques plutôt que de besoins quantitatifs réels (Margara, 1984). Etant donné que des milieux trop riches en azote (en particulier NH₄⁺) peuvent favoriser la nécrose des tissus cultivés, plusieurs autres modifications du milieu MS ont alors été utilisées. Celles-ci sont caractérisées par une dilution de moitié des macroéléments ou de la concentration en ammonium. Différents régulateurs de croissance tels que l'acide 1-naphtalène acétique (ANA) ou l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4D) combinés avec la kinétine ou la 6-benzylaminopurine (BAP) ont également été utilisés car reconnus efficaces pour l'obtention de cals de vigne (Brezeanu *et al.*, 1980).

Comme suspecté, les milieux de culture les plus efficaces en terme de callogenèse ont été les modifications de MS contenant une concentration en ammonium réduite (dilution de moitié) et ce quelque soit le couple de phytohormones utilisé. Cependant, la combinaison des régulateurs de croissance ANA/BAP a été plus efficace que l'association 2,4D/Kinétine. Bien que les combinaisons hormonales puissent avoir des effets différents selon le type d'explant et l'espèce considérée, l'expression de la compétence morphogénétique *in vitro* est complexe et facilement influencée par la présence d'hormones très actives comme le 2,4D. Ainsi, chez la patate douce (*Ipomoea batatas*), l'influence du caractère variétal se traduit par une différence de comportement des variétés « roses » et « blanches » à l'égard des régulateurs de croissance comme le 2,4D (Houndonougbo, 1989). La présence du 2,4D inhibe l'effet de la kinétine sur la callogenèse des variétés « blanches » alors que l'association des deux hormones augmente la prolifération cellulaire chez les variétés « roses ». Chez *Atriplex*, il a été observé que la combinaison 2,4D/Kinétine pouvait provoquer l'apparition de racines sur des cals issus de

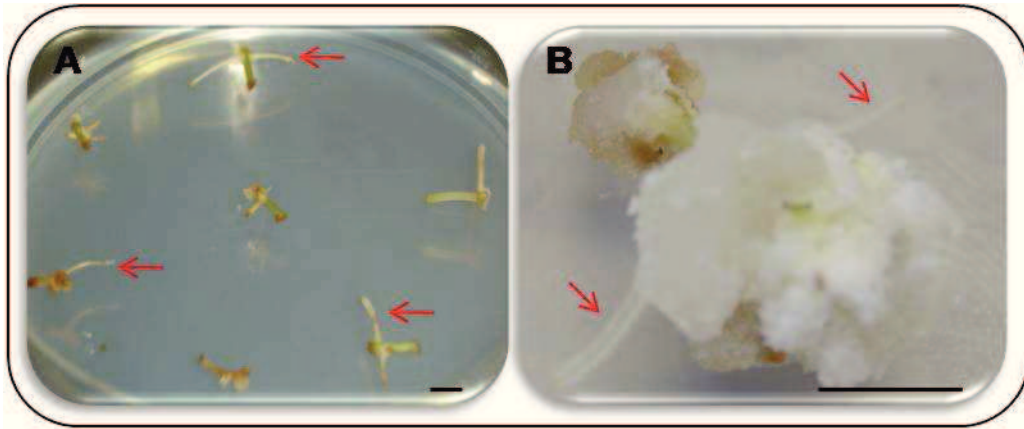


Figure 114 : Développement de racines sur cals et explants de vigne. Entretenus sur le milieu Murashige et Skoog en présence de 2,4D et de kinétine, certains explants de pétioles (A) et certains cals issus de tiges (B) ont différencié de petites racines. (Traits : 0,5 cm)



Figure 115 : Anomalie morphologique observée sur feuilles de vigne cv. Chardonnay cultivée *in vitro*. Multipliés sur milieu McCown Woody Plant, les vitroplants de vigne peuvent présenter certaines modifications morphologiques notamment au niveau des feuilles (feuilles soudées). (Trait : 1 cm)

feuilles (Ighilhariz *et al.*, 2008) et lors de ces travaux, ce phénomène a aussi été rapporté sur certains cals de vigne issus de divers tissus (Fig. 114). La vigne est hautement sensible au 2,4D et bien que cette hormone puisse être nécessaire à l'activation de la division cellulaire, il convient généralement de la remplacer rapidement par une autre auxine (Bessis, 1986).

Les milieux GM⁺ et MS « Multi-Vignes » (dilution des macroéléments MS de moitié) se sont également montrés efficaces pour la callogenèse des tissus même si de meilleurs résultats ont été obtenus en ne réduisant que la concentration en ammonium. Ces observations tendent à dire que la concentration en macroéléments et plus particulièrement en ammonium est décisive pour la culture de tissus de vigne et l'obtention de cals. De plus, ceci ne semble pas concerner uniquement le cépage Chardonnay puisque au laboratoire, certains cals de vigne (41B et 41BT) ainsi que les vitroplants de divers cépages (Ugni Blanc, Merlot) sont couramment entretenus sur ces modifications.

Au terme de plusieurs mois de culture, des cals de Chardonnay ont donc été obtenus à partir de fragments de tige, pétiole et d'embryon préférentiellement placés sur milieux MS (NH₄/2 et Macroéléments/2) additionnés d'ANA et de BAP. Les observations de ces cals effectuées sur les différents milieux utilisés ont cependant mené à suggérer que ce cépage a une rapide tendance au brunissement et une certaine « réticence » à la callogenèse. En 1992, Coutos-Thévenot *et al.* ont d'ailleurs observé que la lignée embryogène CH76 de Chardonnay avait une capacité embryogène faible avec un développement de structures anormales et globuleuses sensibles à la nécrose. En 1999, Jayasankar *et al.* ont cependant obtenu une embryogenèse somatique efficace à partir de deux clones de Chardonnay. Outre de fréquents brunissements, de nombreux cals ont en effet montré des anomalies dans leur morphologie ou leur texture en fonction des milieux utilisés. Il est généralement admis, particulièrement chez les ligneux manipulés *in vitro*, que ce phénomène est dû à des modifications passagères liées au retour partiel à un état juvénile. Ce phénomène a d'ailleurs été suivi en ce qui concerne l'évolution de la forme des feuilles de vigne multipliée *in vitro* (Grenan et Truel, 1983) et au cours de ce travail de thèse, il n'a pas été rare d'observer certaines feuilles soudées entre elles (Fig. 115). Pendant les phases de formation puis de croissance d'un cal, des changements au niveau du nombre et de la structure des chromosomes se produisent et certains régulateurs de croissance comme le 2,4D sont susceptibles d'accroître la fréquence de ces accidents de façon dépendante de l'espèce et du génotype. Quoi qu'il en soit, les meilleurs cals de structure

friable ont été transférés en culture liquide sous agitation afin d'initier une suspension cellulaire.

3.2. Initiation de la suspension cellulaire de Chardonnay

3.2.1. Initiation à partir de cals obtenus sur milieux solides

Les suspensions cellulaires de plantes sont généralement initiées et maintenues en fiole d'Erlenmeyer après ensemencement de fragments de cals en milieu liquide, et la friabilité ainsi que le taux d'ensemencement sont des paramètres clés dans l'établissement d'un tel outil. Au cours de ce travail, les cultures ont été inoculées à partir des meilleurs cals dans les différents milieux abordés au cours de la callogenèse sur milieux solides. Placées à l'obscurité sous agitation orbitale pour favoriser la mise en suspension de cellules, les cultures n'ont cependant pas conduit à une suspension dense et homogène au cours du temps. De nombreux essais ont été effectués et trois observations principales ont pu être faites : (i) soit l'inoculum (cals) s'est rapidement nécrosé sans fragmentation, (ii) soit les cultures ont brutalement dégénéré après quelques semaines de croissance (arrêt de croissance et brunissement), (iii) soit les suspensions initiées ont évolué morphologiquement en amas cellulaires hétérogènes. La nécrose rapide de l'inoculum pourrait s'expliquer par une hétérogénéité des tissus puisqu'au sein d'un cal, tissu néoplastique relativement homogène, peut apparaître secondairement une relative hétérogénéité (Margara, 1984). Lors du passage d'embryons somatiques asynchrones de Chardonnay d'un milieu solide vers un milieu liquide, Jayasankar *et al.* (1999) ont observé un brunissement des cultures et une importante vacuolisation des cellules non embryogènes. Après avoir retiré l'inoculum initial de la culture, les auteurs ont pu constater que les brunissements s'atténaient indiquant que ceux-ci étaient associés à la présence d'embryons somatiques différenciés. Il faut alors considérer que certains cals n'étaient probablement pas propices à un transfert en milieu liquide faute d'homogénéité.

Concernant les cals qui se sont relativement bien fragmentés, il est probable que le transfert en milieu liquide ait complètement modifié le métabolisme cellulaire conduisant à la perte des cultures ou à de profondes modifications morphologiques. De ce fait, la quantité de cal inoculée peut avoir une grande importance. Ben Amar *et al.* (2007) soulignent en effet qu'un inoculum trop important aboutit fréquemment à un brunissement des cellules avec une diminution dramatique de la croissance alors qu'au contraire, un inoculum trop petit n'induit

pas de division cellulaire ni de prolifération. Ce système est en effet très perturbant sur le plan génétique et on observe bien souvent des cellules aneuploïdes (qui ne possèdent pas le bon nombre de chromosomes) dont la proportion peut augmenter avec le nombre de repiquages (Augé *et al.*, 1989). Chez les plantes diploïdes, une faible variation est souvent létale ou très défavorable, perturbant fréquemment la méiose. Deus-Neumann et Zenk (1984) mentionnent le fait que les suspensions cellulaires tendent bien souvent à être instables, ce phénomène pouvant être dû à des délétions, duplications, inversion et translocations de fragments de chromosomes qui peuvent être responsables de modifications au cours de la culture. Comme cité précédemment, certains régulateurs de croissance peuvent également provoquer des modifications puisqu'il a été montré que la culture de cellules d'orge en présence de fortes concentrations en 2,4D aboutissait à un effet mutagène lié à des mitoses polyploïdes associées à des anomalies au niveau du fuseau chromatique (Ziauddin et Kasha, 1990). De tels effets du 2,4D étaient déjà suspectés par Bayliss sur suspension cellulaire de carotte (Augé *et al.*, 1989).

Enfin, dans les suspensions ayant développé des amas de cellules, l'agrégation observée, due à l'adhésion des cellules entre elles, résulte probablement de la sécrétion de polysaccharides extracellulaires pariétaux qui empêchent leur séparation après la division cellulaire (Glicklis *et al.*, 1998). De nombreuses études montrent en effet que les suspensions cellulaires secrètent un grand nombre de polysaccharides extracellulaires, ceux-ci étant principalement composés d'arabinogalactanes, d'acides uroniques et autres polysaccharides (Gotô, 1986 ; Iraki *et al.*, 1989 ; Sims et Bacic, 1995 ; Stevenson *et al.*, 1986).

Ainsi, afin de minimiser au maximum les variations, il est souvent nécessaire de jouer sur la durée de la culture, une durée courte donnant peu de variations alors qu'une durée trop longue donnera des variations trop profondes et inexploitable. Cependant, et pour chacun des milieux testés, la modulation des paramètres tels que les concentrations en hormones, la fréquence et le volume de repiquage ou bien encore la vitesse d'agitation n'ont pas abouti au maintien d'une suspension cellulaire stable et homogène.

3.2.2. Initiation de la callogenèse à partir d'explants ensemencés en milieu liquide

De manière générale, l'ensemencement direct des explants en culture liquide n'a pas conduit à la mise en suspension de cellules pouvant évoluer en suspension exploitable.

Cependant certains milieux liquides, comme le milieu MS « Initiation » ($\text{NH}_4/2$, ANA/BAP), se sont révélés inducteurs de la callogenèse d'explants de tiges et de pétioles provoquant un durcissement et un gonflement de ceux-ci. Sans pouvoir expliquer ce phénomène, cette augmentation du volume de l'explant primaire sous forme de boursouffure a également été observée chez *Atriplex halimus* et *Atriplex canescens* placés sur milieu solide (Ighilhariz *et al.*, 2008) et semble être une caractéristique précédant la callogenèse. Après avoir obtenu des cals friables sur milieux solides à partir des cals initiés en cultures liquides, ceux-ci ont permis d'obtenir une suspension dense mais instable (dérive) dans le milieu MS « CSB ». Des résultats similaires ayant été obtenus à partir des tissus d'embryons somatiques, ces observations ont suggéré que le milieu « CSB » n'était pas adapté au maintien de la suspension cellulaire de Chardonnay. Cependant, à défaut de pouvoir maintenir la suspension dans ce milieu, il semble que celui-ci ait pu constituer un milieu inducteur de la division. Dans le cas des cals, il est d'ailleurs généralement conseillé de différencier les milieux d'induction et d'entretien (Evans *et al.*, 2003). Dans le milieu Gamborg B5, les cellules de Chardonnay se sont montrées plus stables avec un aspect satisfaisant. Ce milieu est un milieu globalement moins riche que Murashige et Skoog, les plus grandes différences étant le rapport $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (12,5 dans Gamborg B5 ; 1,91 dans MS) et la quantité de thiamine (x 100 dans Gamborg B5). Il apparaît alors évident que la concentration en ammonium ait été déterminante pour la viabilité des cellules de vigne et notamment de Chardonnay. Au terme de six mois de culture dans le milieu Gamborg B5, la croissance de la suspension cellulaire de Chardonnay s'est révélée stable avec des divisions régulières laissant envisager de nombreuses applications et l'étude de quelques unes de ces caractéristiques.

3.3. Croissance des cellules de Chardonnay et évolution du milieu au cours de la culture

Une fois repiquées dans du milieu frais, les cellules de Chardonnay subissent une phase de latence d'environ deux jours. Cette phase correspond à une période d'adaptation des cellules à leur nouvel environnement durant laquelle il y a probablement une « dissipation » du potentiel inhibiteur de certaines substances (polyphénols, tannins) sécrétées au cours de la culture précédente. Cependant, bien qu'il n'y ait pas de division, de nouveaux composants cellulaires tels que des co-facteurs essentiels, des ribosomes ou encore de l'ATP commencent à être synthétisés avant que la croissance ne puisse débuter.

A J0, la source de carbone majoritaire est le saccharose et sa concentration décroît rapidement au cours des deux premiers jours de culture au terme desquels il n'y a plus de disaccharide dans le milieu. L'augmentation concomitante de la concentration en hexoses suppose d'une part que le saccharose n'est pas une source immédiate de carbone pour les cellules, et d'autre part l'action d'une ou plusieurs invertases acides (VvCWINV) sécrétées ou non dans le milieu. Bien qu'il n'y ait pas de croissance durant la phase de latence, ces premières données indiquent, en accord avec les observations effectuées sur les suspensions cellulaires d'autres espèces, qu'il y a cependant une forte activité hydrolytique, le saccharose étant clivé en hexoses durant les deux premiers jours de culture. Il semble aussi que le glucose généré soit partiellement consommé au cours de la phase de latence, ce qui n'est pas le cas du fructose.

Au troisième jour de culture, l'entrée en phase de croissance est caractérisée par une consommation significative des hexoses du milieu avec une consommation préférentielle du glucose. En effet, la totalité du glucose est consommée en 5 jours alors qu'il en faut 9 pour épuiser le milieu en fructose. Le comportement des suspensions cellulaires de Chardonnay concernant l'utilisation des sucres semble typique des suspensions cellulaires indifférenciées de dicotylédones puisqu'il s'observe également dans les cultures cellulaires de carotte (*Daucus carota*), de piment de Cayenne (*Capsicum frutescens*), de bouleau (*Betula pendula*) et de *Rudgea jasminoides* (Kretzschmar *et al.*, 2007 ; Madhusudhan *et al.*, 1995 ; Nuutila et Kauppinen, 1992). Dans les suspensions cellulaires de vigne, il est probable que le transporteur d'hexoses VvHT1 (Vignault *et al.*, 2005), qui est très exprimé dans les feuilles de vigne en conditions standard de culture et qui transporte préférentiellement le glucose, puisse participer à l'influx de sucres au cours de la culture. D'un point de vue métabolique, le glucose serait préférentiellement absorbé car il constituerait un meilleur substrat pour la respiration (Sagishima *et al.*, 1989) et dans des cellules de carotte en suspension, il a été observé que celui-ci servait entre autre à la formation d'UDP-glucose qui, une fois combiné au fructose au niveau intracellulaire, conduisait à la synthèse de saccharose, forme de stockage de carbone intermédiaire (Kanabus *et al.*, 1986). Certaines suspensions cellulaires comme le sapin (*Pseudotsuga menziesii*) montrent cependant une légère préférence pour le fructose, celle-ci étant spécifique de cette espèce (Taber *et al.*, 1998). Au cours de la croissance cellulaire, le glucose puis le fructose sont donc progressivement consommés jusqu'à l'épuisement total du milieu en sucre (J9). Au dixième jour de culture, les cellules entrent dans une phase de mortalité qui n'est pas caractéristique puisqu'il n'y a pas d'entrée

en phase stationnaire. Cette phase de mortalité, qui se traduit par une perte de 24% de la masse cellulaire fraîche, n'est pas observée chez les cellules de Cabernet Sauvignon. Il est probable que cette différence soit dépendante du génotype ou que les cellules de Chardonnay soient plus sensibles aux différents paramètres de culture. Il est envisageable qu'un paramètre du milieu devienne limitant au terme des dix jours de culture induisant la mort d'une partie de la population cellulaire de Chardonnay. De ce fait, la disparition de la totalité des sucres du milieu à J9 (plus de fructose) coïncide avec l'entrée en phase de mortalité.

Il est cependant intéressant de noter que la phase de mortalité observée n'a pas induit de brunissement spontané des suspensions et que les cellules entrent ensuite dans une phase stationnaire avec, potentiellement, une très légère reprise de croissance. Une des hypothèses pourrait être qu'il y a mobilisation des réserves en amidon permettant la production de glucose. Lecourieux *et al.* (2010) montrent en effet que les cellules de vigne 41B en suspension contiennent entre 65 et 70 mg d'amidon par gramme de matière sèche à sept jours de culture. Il est alors logique de penser que ces réserves puissent être mobilisées en fin de culture lorsque le milieu s'épuise. Chez des cultures cellulaires de betterave (*Beta vulgaris*) l'amidon, stocké en grande quantité, disparaît dans les 24 heures suivant une carence en sucres (Zamski et Wyse, 1985). D'autre part, il est aussi possible que la phase de mortalité cellulaire observée entre J10 et J11 libère dans le milieu de faibles quantités d'éléments comme des sucres et des ions pouvant être utilisés par les cellules encore viables. Nos données ne permettent cependant pas de dire si la légère augmentation de la masse cellulaire observée entre J12 et J14 est la conséquence d'un phénomène de divisions cellulaires ou d'élongation cellulaire.

Parallèlement à la consommation des hexoses, la croissance concomitante des cellules s'accompagne également d'une baisse de l'osmolarité du milieu. En début de culture, l'hydrolyse rapide du saccharose les deux premiers jours induit une augmentation transitoire de l'osmolarité qui diminue ensuite avec l'utilisation des solutés. Cette évolution de la concentration en osmolites du milieu peut être corrélées à la biomasse des suspensions cellulaires, particulièrement dans les systèmes d'hydrolyse rapide du saccharose (Madhusudhan *et al.*, 1995). A partir du 9^{ème} jour de culture, moment où le milieu est exempt de sucres, l'osmolarité atteint son minimum autour de 20 mmol.kg⁻¹ et les cellules entrent en phase de mortalité. Les cellules sont particulièrement sensibles aux conditions hypo-osmotiques (Felix *et al.*, 2000). Lors des essais de repiquage de la suspension au 10^{ème} ou

14^{ème} jour de culture, celles-ci étaient transférées d'un milieu hypotonique dans un milieu isotonique ; il est alors possible que le choc osmotique ait été trop important induisant une dégénérescence de la culture. A J7, l'osmolarité (30 mmol.kg⁻¹) n'est probablement pas encore critique pour les cellules, permettant le repiquage.

La baisse de l'osmolarité provoque globalement une légère alcalinisation du milieu (+0,4 unités pH) au cours de la culture. Le pH subit une première diminution durant les 4 premiers jours qui est généralement attribuée à l'absorption de l'ammonium qui représente la forme d'azote préférentielle durant la phase initiale de croissance (McDonald et Jackman, 1989). Ensuite, l'absorption des nitrates commence lorsque les enzymes requises pour leur réduction en ammonium sont induites. Combinée au co-transport de protons durant l'absorption des sucres, l'alcalinisation du milieu résulte de l'absorption active des nitrates couplée à un influx de protons et à un efflux passif de OH⁻ produit pendant leur réduction (Morard *et al.*, 1998). En effet, les transporteurs de nitrate de la membrane plasmique sont décrits dans la littérature comme étant des symports 2H⁺/NO₃⁻ (Meharg et Blatt, 1995 ; Crawford et Glass, 1998) et en fin de croissance, l'azote nécessaire est sûrement apportée sous forme d'ammonium, celui-ci dérivant du pool de nitrate stocké dans la cellule. Parallèlement à l'absorption de l'azote, l'âge des cellules augmente la fragilité et la perméabilité membranaire conduisant également à un efflux passif de K⁺ qui participe à l'augmentation du pH (Felix *et al.*, 2000). De nombreuses suspensions cellulaires de plantes (*Arabidopsis*, tabac, pomme de terre, tomate, riz...) réagissent à des conditions hypo-osmotiques par une réponse d'alcalinisation ; ce phénomène étant appelé l'osmo-perception. Bien que la pompe à protons permette sûrement à la cellule de réduire les fluctuations de pH, l'appauvrissement du milieu résulte globalement en une alcalinisation (McDonald and Jackman, 1989).

Parallèlement à l'épuisement du milieu, des composés plus ou moins toxiques peuvent être synthétisés au cours de la culture tels que de l'éthanol et de l'éthylène. Les cellules de plantes sont des organismes aérobie obligatoires mais elles peuvent survivre pour de courtes périodes dans un environnement partiellement ou totalement anaérobie (Perata *et al.*, 1988). Dans ces conditions, des phénomènes de fermentation se produisent conduisant à la production de lactate, malate, succinate et d'éthanol, ce dernier pouvant être toxique à de très faibles concentrations. La production d'éthanol a été détectée dans les milieux de culture de nombreuses espèces comme le riz, le tabac et la carotte (Perata *et al.*, 1988). Partiellement

dépendante de la densité cellulaire, cette production d'éthanol peut inhiber la croissance des cellules notamment en fin de culture. L'éthylène est produit par une large gamme d'organismes et agit comme une hormone gazeuse chez les plantes. Des cultures cellulaires de rose (*Rosa sp.*) produisent de l'éthylène durant la phase de croissance avec une augmentation notable lorsque la phase stationnaire est atteinte. Durant cette dernière phase, les nutriments deviennent limitants et les cellules entrent en sénescence ce qui peut favoriser le dégagement d'éthylène associé à la détérioration des structures fonctionnelles comme la mitochondrie au sein de la cellule.

L'aspect des suspensions cellulaires de plante peuvent présenter un haut degré d'hétérogénéité notamment en terme de morphologie (Eibl et Eibl, 2009) et ces caractères sont généralement associés à l'environnement chimique et hydrodynamique des cellules (Kieran *et al.*, 1997). Cependant, les formes les plus communément rencontrées sont des formes sphériques (carotte, vigne) ou cylindriques (tabac) même si les cellules peuvent évoluer d'un type à l'autre en fonction des conditions de culture. Après plusieurs mois de culture, l'observation des cellules de Chardonnay a révélé des cellules de 10 µm de diamètre, relativement individualisées au sein de suspensions denses et homogènes contrairement aux cellules de Cabernet Sauvignon organisées en amas. Ces caractéristiques ont alors permis d'utiliser la suspension cellulaire dans des expériences d'élicitation et de transport.

4. Conclusion : Chardonnay, un cépage récalcitrant ?

De nombreuses difficultés ont été rencontrées dans l'initiation de la suspension non embryogène de Chardonnay, celles-ci s'étant globalement traduites d'une part par des difficultés de callogenèse, et d'autre part par de rapides phénomènes de brunissement et de dérive. Le manque de données bibliographiques ainsi que l'impossibilité d'obtenir une telle suspension auprès de laboratoires (français) travaillant avec la vigne, suggèrent implicitement la réticence de ce cépage aux manipulations *in vitro*. De plus, malgré les conditions climatiques constantes à l'intérieur des chambres de culture, il a pu être observé que les saisons influençaient largement le comportement callogène des explants et la stabilité des suspensions cellulaires. En effet, les cultures de cals initiées entre octobre 2006 et mars 2007 n'ont pas donné satisfaction alors qu'une nette amélioration de la callogenèse a pu être observée à partir du mois d'avril. Les mêmes observations ont pu être faites durant l'année 2008 concernant le transfert des cals en cultures liquides et la croissance cellulaire. Certains

travaux mentionnent l'influence des saisons sur les cultures *in vitro*. Ainsi, l'efficacité maximum de micropropagation est observée en octobre chez le cactus (*Mammillaria elongata*) ; en mai chez le chêne (*Quercus euboica*) et en mars/avril chez le caroubier (*Ceratonia siliqua*) (Kartsonas et Papafotiou, 2007 ; Papafotiou *et al.*, 2001 ; Romano *et al.*, 2002). De même, l'induction *in vitro* de la gynogenèse est meilleure en juin chez la betterave (*Beta vulgaris*) et l'induction de cals embryogènes plus efficace avant août chez le rosier (*Rosa hybrida*) (Doctrinal *et al.*, 1989 ; Portemer, 2009).

Cependant, modulant au fil des mois certains paramètres cultureux, une mise en suspension de cellules de Chardonnay a été obtenue à partir d'explants de tige et de pétiole. Bien que soumise à de nombreuses variations, une fois initiée, la suspension cellulaire s'est stabilisée dans le milieu Gamborg dans lequel elle est aujourd'hui maintenue.

Chapitre III

Identification et analyse d'expression de gènes codant pour des transporteurs de sucres et des invertases chez la vigne

Chapitre III

Identification et analyse d'expression de gènes codant pour des transporteurs de sucres et des invertases chez la vigne

Chez les plantes, il est clairement établi que le transport des sucres est coordonné par différents types de transporteurs (saccharose, hexoses, polyols) dont les gènes s'expriment différemment dans les organes de la plante, au cours des différentes phases du développement ainsi qu'en réponse à différentes contraintes environnementales (Kuhn and Grof, 2010 ; Lemoine, 2000). Chez toutes les plantes ayant fait l'objet d'études scientifiques telles que le riz (*O. sativa*), la tomate (*L. esculentum*), le maïs (*Z. mays*) ou encore l'arabette (*A. thaliana*), les transporteurs de sucres sont codés par des familles multigéniques plus ou moins importantes, dont les membres se différencient sensiblement par leur spécificité de substrat, leur localisation et la régulation de leur expression (Delrot *et al.*, 2001 ; Hackel *et al.*, 2006 ; Sauer, 2007a ; Yu *et al.*, 2002). A l'heure actuelle, la famille la plus étudiée d'un point de vue transcriptionnel et fonctionnel est celle d'*Arabidopsis thaliana*, qui compte 9 transporteurs de disaccharides et 53 transporteurs de monosaccharides (Sauer, 2007; Büttner, 2007, 2010).

Si la biologie de la vigne n'en fait pas une espèce modèle (plante pérenne, très hétérozygote et possédant un cycle de reproduction long), il est rapidement apparu possible mais aussi nécessaire de développer des outils génomiques pour accélérer l'acquisition des connaissances sur des caractères agronomiques importants (maturation et qualité de la baie de raisin) ainsi que sur la résistance aux maladies et la tolérance aux stress. Terminé au cours de l'année 2007, le séquençage complet du génome de Pinot Noir (PN40024) (Jaillon *et al.*, 2007) est alors devenu accessible *via* le serveur du Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr>). Ainsi, il est devenu possible d'identifier potentiellement, dans le génome de la vigne, des gènes codant pour des transporteurs de sucres autres que les 11 répertoriés au début de ce travail de thèse (7 *VvHTs* et 4 *VvSUC/SUTs*). En utilisant les séquences protéiques des 9 transporteurs de disaccharides et des 53 transporteurs de monosaccharides identifiés chez *Arabidopsis* (Büttner, 2007), une recherche, effectuée par la méthode de Blastp dans le « protéome 8X » de Pinot Noir, a permis l'identification de 54 nouvelles séquences codant pour des transporteurs de sucres putatifs en plus des 11 déjà connues. Une analyse phylogénétique des 65 séquences de transporteurs de sucres a révélé que les transporteurs de disaccharides et de monosaccharides formaient deux groupes distincts. De plus, tout comme observé chez *Arabidopsis*, 7 sous-familles ont pu être identifiées au sein du groupe des

transporteurs de monosaccharides. Sur la base de leur similarité, des paires de protéines orthologues entre *A. thaliana* et *V. vinifera* ont également été mises en évidence. Parallèlement, les régions promotrices (2 kb en amont de l'ATG) des gènes de transporteurs appartenant aux 4 familles les plus étudiées ont été isolées (VvHTs, VvSUC/SUTs, VvPMTs et VvTMTs). A l'aide du serveur PLACE (PLAnt Cis-acting Elements, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>), des éléments *cis*-régulateurs ont été identifiés dans les promoteurs puis comparés entre les sous-familles de transporteurs de sucres. Cette analyse a permis l'identification d'éléments *cis* communs aux 4 familles ainsi que d'éléments uniques présents dans le promoteur d'un seul gène.

Afin d'étudier le profil d'expression des différents gènes identifiés au sein de ces 4 familles de transporteurs de sucres, des sondes spécifiques ont été isolées dans les régions 3'UTR des gènes et une technique d'analyse d'expression par macroarrays a été développée. A l'aide des membranes macroarrays, l'expression des gènes de transporteurs de sucres a pu être analysée dans divers organes végétatifs de la vigne (Chardonnay) cultivée en système aeroponique, dans les baies en cours de développement ainsi que dans les pépins. La fonction biologique des transporteurs de sucre dans les différents organes de la plante a été discutée. A l'heure actuelle, cette analyse constitue la première étude exhaustive des transporteurs de sucres menée chez une plante ligneuse.

Dans un second temps, une démarche similaire a été utilisée afin d'identifier des séquences codant pour des invertases. Les invertases catalysent l'hydrolyse irréversible du saccharose en glucose et fructose. Elles constituent donc des molécules centrales dans le métabolisme carboné et la répartition des sucres notamment parce que les produits de leur activité sont les substrats des transporteurs d'hexoses. En partant de l'hypothèse qu'une interaction de type biotique puisse modifier la transcription des gènes de transporteurs de sucres dans un contexte de compétition pour les squelettes carbonés, il est apparu hautement probable que les gènes codant pour des invertases soient également régulés. Plusieurs données de la littérature corroborent cette hypothèse en montrant une induction des invertases (gènes et activités) lors d'interactions plantes/champignons pathogènes, et plus particulièrement des invertases pariétales (Benhamou *et al.*, 1991; Fotopoulos *et al.*, 2003; Sutton *et al.*, 1999). Nous avons donc choisi de focaliser notre recherche sur l'identification de séquences codant pour des invertases pariétales. Néanmoins, deux séquences d'invertases vacuolaires étant déjà connues chez *V. vinifera* (VvGINs) (Davies et Robinson, 1996), celles-ci ont également été intégrées dans notre recherche. Les séquences protéiques de VvcwINV, VvGINs ainsi que celles des 6 invertases pariétales décrites chez *Arabidopsis* (Sherson *et al.*, 2003), ont ainsi

permis l'identification de trois autres invertases putatives dans le génome de Pinot Noir. Après avoir isolé des sondes 3'UTR pour chacune d'elles chez Chardonnay, leur profil d'expression a été analysé par macroarrays dans différents organes.

1. Les transporteurs de sucres chez la vigne : une famille multigénique

L'identification et l'analyse de l'expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres dans les différents organes de la vigne sont détaillées dans le manuscrit ci-après, publié dans le journal BMC Plant Biology (Afoufa-Bastien *et al.*, 2010). Notons qu'au cours de cette étude, *VvHT6* a été renommé *VvTMT1* par analogie avec ses plus proches orthologues chez *Arabidopsis*.

ARTICLE

**The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview
and macroarray expression profiling**

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling

Damien Afoufa-Bastien^{1†}, Anna Medici^{1†}, Julien Jeauffre^{1,2}, Pierre Coutos-Thévenot¹, Rémi Lemoine¹, Rossitza Atanassova¹, Maryse Laloi^{1*}

Abstract

Background: In higher plants, sugars are not only nutrients but also important signal molecules. They are distributed through the plant *via* sugar transporters, which are involved not only in sugar long-distance transport *via* the loading and the unloading of the conducting complex, but also in sugar allocation into source and sink cells. The availability of the recently released grapevine genome sequence offers the opportunity to identify sucrose and monosaccharide transporter gene families in a woody species and to compare them with those of the herbaceous *Arabidopsis thaliana* using a phylogenetic analysis.

Results: In grapevine, one of the most economically important fruit crop in the world, it appeared that sucrose and monosaccharide transporter genes are present in 4 and 59 loci, respectively and that the monosaccharide transporter family can be divided into 7 subfamilies. Phylogenetic analysis of protein sequences has indicated that orthologs exist between *Vitis* and *Arabidopsis*. A search for *cis*-regulatory elements in the promoter sequences of the most characterized transporter gene families (sucrose, hexoses and polyols transporters), has revealed that some of them might probably be regulated by sugars. To profile several genes simultaneously, we created a macroarray bearing cDNA fragments specific to 20 sugar transporter genes. This macroarray analysis has revealed that two hexose (*VvHT1*, *VvHT3*), one polyol (*VvPMT5*) and one sucrose (*VvSUC27*) transporter genes, are highly expressed in most vegetative organs. The expression of one hexose transporter (*VvHT2*) and two tonoplastic monosaccharide transporter (*VvTMT1*, *VvTMT2*) genes are regulated during berry development. Finally, three putative hexose transporter genes show a preferential organ specificity being highly expressed in seeds (*VvHT3*, *VvHT5*), in roots (*VvHT2*) or in mature leaves (*VvHT5*).

Conclusions: This study provides an exhaustive survey of sugar transporter genes in *Vitis vinifera* and revealed that sugar transporter gene families in this woody plant are strongly comparable to those of herbaceous species. Dedicated macroarrays have provided a *Vitis* sugar transporter genes expression profiling, which will likely contribute to understand their physiological functions in plant and berry development. The present results might also have a significant impact on our knowledge on plant sugar transporters.

* Correspondence: maryse.laloi@univ-poitiers.fr

† Contributed equally

¹UMR-CNRS-UP 6503 - LACCO - Laboratoire de Catalyse en Chimie Organique - Equipe Physiologie Moléculaire du Transport de Sucres - Université de Poitiers - Bâtiment Botanique - 40 Avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

In plants, sugars (sucrose, monosaccharides, polyols) are important molecules that constitute not only metabolites but also nutrients, osmotic and signal molecules. In numerous species, sucrose is the most prevalent sugar produced in photosynthetic organs (source) and transported *via* the phloem over long distances to heterotrophic organs (sink), which depend on a constant supply of carbohydrates [1]. In sink organs, sucrose is either directly imported or cleaved by cell wall-bound invertases into monosaccharides (glucose and fructose), that can be taken up by the sink cells [2]. In some species, sugar alcohols (polyols), such as mannitol, sorbitol and galactinol can also be transported on top of sucrose for long-distance carbon partitioning [3]. In addition to this long-distance transport, sugars can also be allocated in the different organelles of source and sink cells, and more and more biochemical and molecular studies argue for the transport of hexoses into the chloroplast [4] the vacuoles [5], and the Golgi apparatus [6]. Therefore, it is now clearly established that not only the loading and the unloading of the conducting complex, but also the allocation of sugars into source and sink cells is controlled by sugar transporters mediating the transport of sucrose [7-9], reducing monosaccharides [10], or polyols [11-13]. Since the cloning of the first monosaccharide transporter in *Chlorella* [14], the first sucrose transporter in *Spinacia oleracea* [15], and the first polyol transporter in *Apium graveolens* [11], many genes belonging to these families have been isolated from various species. The complete *Arabidopsis* genome has been described to contain 9 sucrose transporter-like sequences [8] and a monosaccharide transporter(-like) gene family, including 53 members grouped into 7 subfamilies [10]. Furthermore, the evolutionary analysis of plant monosaccharide transporters revealed that these seven subfamilies are ancient in land plants [16].

Despite the progress made in identifying genes encoding sugar transporters, little is known about the transcriptional regulation of these genes. *Arabidopsis* microarray data (Genevestigator: <https://www.genevestigator.com>; The BAR: <http://bbc.botany.utoronto.ca>) and some plant transporter gene expression patterns have indicated that developmental and environmental factors could regulate the expression of sugar transporters. Furthermore, evidence is provided that the expression of some sugar transporter genes is regulated by sugars as described for sugar transporter genes in yeast [17], for *VvHT1*, a grapevine hexose transporter [18-20] and for sucrose transporter genes from rice, *OsSUT1* [21] and sugar beet, *BvSUT1* [22-24]. All these data suggest that the expression of sugar transporters might be regulated at the transcriptional level by distinct but usually converging signalling pathways, depending on either developmental and environmental

cues or metabolic and hormonal signals. In spite of the evidence for the role of sugar signalling in the transcriptional control of some transporter genes, the *in silico* analysis of promoter regions of different genes involved in carbon metabolism, sugar storage, mobilization and transport clearly demonstrates the absence of common sugar specific *cis*-elements [25-27]. This analysis is consistent with the fact that in plants, several types of transcription factors (bZIP, WRKY, AP2, MYB, B3, EIN3) are required for sugar signalling and are involved in sugar-regulation of gene expression [27,28]. Considering that the analysis of sugar transporter orthologs in different species might help to better understand their biological function, we analyzed the recently sequenced *Vitis vinifera* genotype PN40024 [29] in order to identify sugar transporter gene families in this species. This work will represent the first exhaustive analysis for sugar transporters in ligneous plant as most of the already known sugar transporters have been characterized from herbaceous species. In woody plants, only 4 sucrose transporters have been already described in *Vitis* [30-32] (GenBank: AF439321), 2 in *Citrus sinensis* (GenBank: AY098891, AY098894), 2 in *Hevea brasiliensis* (GenBank: ABJ51934, ABK60189) and one in *Juglans regia* [33,34]. Seven hexose transporters in *Vitis* [35-37], 2 in *Juglans regia* [34] and few polyol transporters in *Prunus cerasus* [38], in *Malus domestica* [39] and in *Olea europea* [40] were also reported. Furthermore during the last decade, *Vitis vinifera* has become an interesting model to study fruit maturation. It is now clearly established that the onset of ripening (veraison) is characterized by an important accumulation of glucose and fructose in vacuoles of the mesocarp cells [41]. In grapevine, sucrose is the main carbohydrate used for long distance transport and after reaching the phloem of the berry, it is unloaded into the apoplast, possibly cleaved by apoplastic invertases, and sucrose or hexoses can then be transported into the mesocarp. In the cytoplasm of the mesocarp cells, sucrose and hexoses must be transported into the vacuole *via* tonoplasmic transporters. The identification and the characterization of sugar transporter genes in *Vitis vinifera* are therefore important steps in understanding the roles of these proteins in grapevine development as well as in grape ripening process and may further highlight our knowledge on plant sugar transporters.

The present study reports on the identification of sucrose and monosaccharide-like transporter genes in the *Vitis vinifera* genome, on their phylogenetic analysis in comparison with *Arabidopsis* transporters, on their promoter sequences analysis. The construction of specialized cDNA macroarrays used to determine the expression pattern for 20 of these genes in grapevine vegetative organs and during berry ripening is also described.

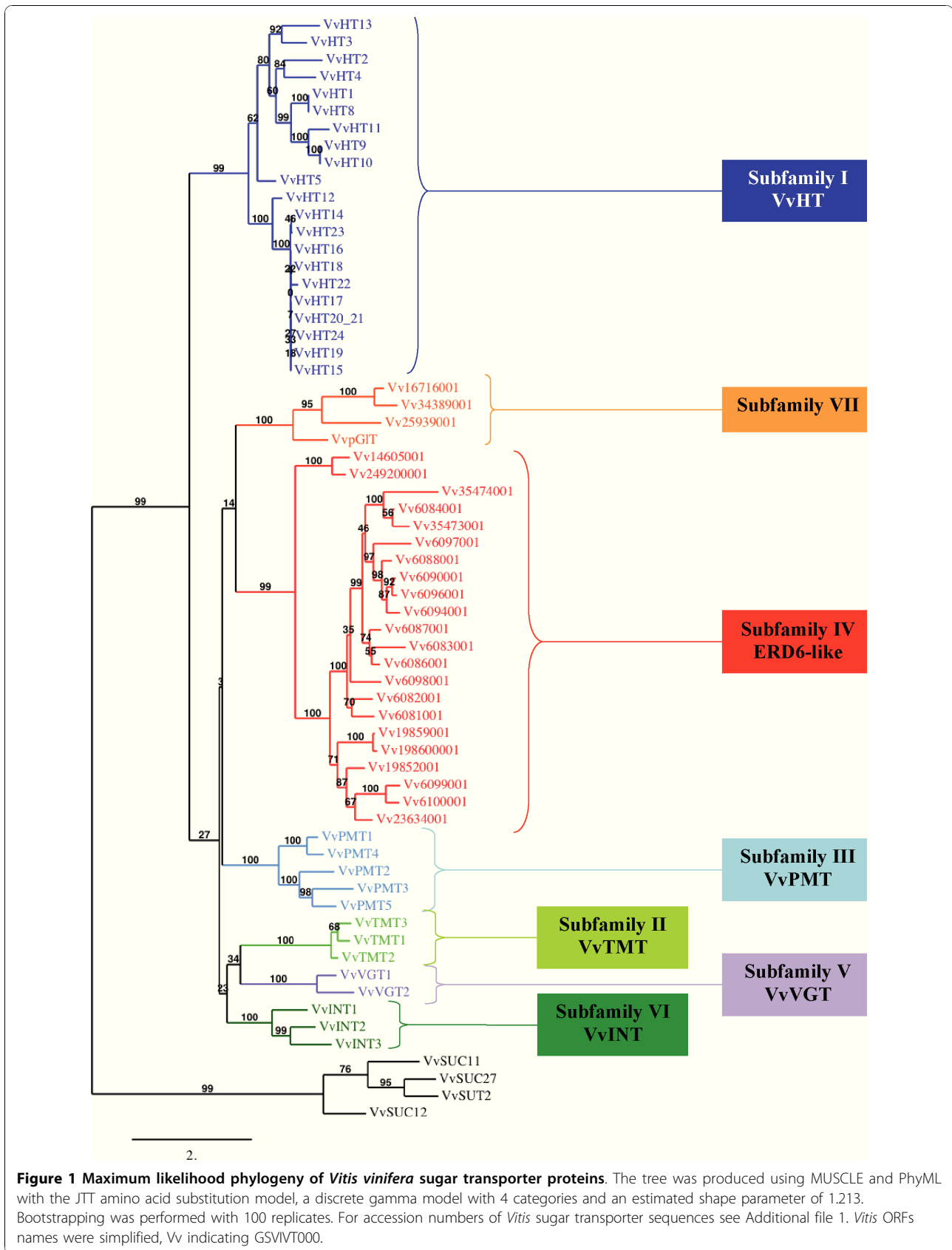


Figure 1 Maximum likelihood phylogeny of *Vitis vinifera* sugar transporter proteins. The tree was produced using MUSCLE and PhyML with the JTT amino acid substitution model, a discrete gamma model with 4 categories and an estimated shape parameter of 1.213. Bootstrapping was performed with 100 replicates. For accession numbers of *Vitis* sugar transporter sequences see Additional file 1. *Vitis* ORFs names were simplified, Vv indicating GSVVT000.

Results

Identification of sugar transporters from *Vitis vinifera*

Blastp searches of the grapevine genome proteome 8× database, using the amino acid sequences of the 9 sucrose transporters and the 53 monosaccharide transporters from *A. thaliana* as query, allowed the identification of 65 ORFs encoding putative sugar transporters in *V. vinifera* (Additional file 1). Among these ORFs, only 4 encode previously described sucrose transporters [30-32] (GenBank: AF439321) and no additional one could be identified. The 61 other ORFs seem to encode putative monosaccharide transporters (MST). Phylogenetic analysis of the 65 *V. vinifera* identified protein sequences using the maximum likelihood (ML) method (Figure 1) reveals that sucrose and monosaccharide transporters form two separate groups. Furthermore in agreement with the phylogeny observed for *A. thaliana* MST [10,16], 7 distinct subfamilies (I-VII) could be clearly identified in the *Vitis* monosaccharide transporter group (Additional file 1 and Figure 1).

Vitis vinifera Sucrose Transporters (VvSUC, VvSUT)

The 4 amino acids sequences encoding the already described sucrose transporters named VvSUC11/VvSUT1, VvSUC12, VvSUC27 and VvSUT2 [30-32] share 40 to 59% similarity between each other and fall into three sucrose transporter subgroups already described (Figure 2) [7-9]. VvSUT2 and VvSUC27 shows 59% similarity and belong to the dicots specific SUT1 subfamily including high affinity sucrose transporters exhibiting apparent K_m value between 0.07 and

2 mM. However, VvSUC27 has been described to be a low-affinity/high-capacity sucrose transporter showing a K_m value for sucrose ranged between 8.0 and 10.5 mM [42]. The structure of *VvSUT2* and *VvSUC27* genes is quite similar, both being around 2380 bp long and containing 4 exons separated by 3 introns (Additional file 1). VvSUC12 shows 66.6% similarity with AtSUC3 and presents an extended domain at the N terminus and an elongated central cytoplasmic loop; two structural characteristics specific to the SUT2/SUC3 subfamily [43]. Furthermore, *VvSUC12* gene is a very long gene (more than 10 kb) containing 14 exons interrupted by 13 introns (Additional file 1); such exon/intron organization is also described for *AtSUC3*. The K_m value for sucrose (1.36 mM) reported for this transporter [32] seems, however, higher than that described for other members of this subfamily, showing either a low affinity (*AtSUC3*: K_m = 11.7 mM) or no sucrose transport function. Finally, although VvSUC11 has a high affinity for sucrose (K_m = 0.88 mM; [32]) it shows 67.9% similarity with *AtSUC4* and falls into the SUT4 subfamily including all low-affinity plant sucrose transporters with K_m value ranging between 5 mM and 6 mM.

Vitis vinifera putative Hexose Transporters (VvHT; subfamily I)

Among the identified ORFs, 22 showed high similarity (40 to 82%) with the AtSTP (Sugar Transport Protein) subfamily members. Among these, 5 correspond to the already well known *V. vinifera* hexose transporters named VvHT (*Vitis vinifera* hexose transporter) such as VvHT1, VvHT2, VvHT3 (also named VvHT7), VvHT4 and VvHT5 [35-37], (Additional file 1). Therefore, the 17 newly identified ORFs were named VvHT8 to VvHT24. VvHT8 amino acid sequence shows 99.4% similarity with VvHT1 and the main differences between the two nucleotide sequences reside in some single nucleotide polymorphism and in the length of a microsatellite sequence in the 3'UTR region. Considering that the chromosomal location of *VvHT1* and *VvHT8* is not determined, it is difficult to conclude if these sequences represent two independent genes, two alleles of the same gene or possibly one single gene. VvHT9 and VvHT10 share 98.5% similarity between each other and around 73% with VvHT11. Interestingly, the three corresponding genes are located in a tandem repeat region, on chromosome 14. In a similar way, *VvHT14* to *VvHT24* form a cluster on chromosome 13 and the 11 corresponding amino acid sequences show very high similarity (more than 90%). VvHT20 and VvHT21, which are located nearby on chromosome 13, contain the two first exons and the last exon of a monosaccharide transporter, respectively. A detailed amino acid sequence analysis revealed that these two partial ORFs are wrongly annotated and might constitute a single monosaccharide transporter, in the third exon

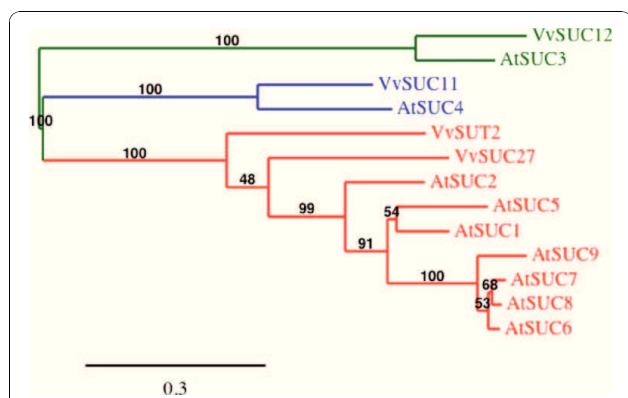


Figure 2 Maximum likelihood phylogeny of *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana* sucrose transporter proteins.

The tree was produced using MUSCLE and PhyML with the JTT amino acid substitution model, a discrete gamma model with 4 categories and an estimated shape parameter of 0.872. Bootstrapping was performed with 100 replicates. Accession numbers for *Arabidopsis thaliana* transporters are: At1g71880 (*AtSUC1*), At1g22710 (*AtSUC2*), At2g02860 (*AtSUC3*), At1g09960 (*AtSUC4*), At1g71890 (*AtSUC5*), At5g43610 (*AtSUC6*), At1g66570 (*AtSUC7*), At2g14670 (*AtSUC8*), At5g06170 (*AtSUC9*); for *Vitis* ones see Additional file 1.

of which a stop codon (TAG) replaces a tryptophan residue (TGG). It is therefore tempting to suggest that this point mutation at the origin of the false annotation, might be due to a sequencing error, but we can not exclude that it could be real. Finally VvHT22, VvHT23 and VvHT24 are partial MST, whose sequences do not seem to be fully sequenced, missing either the N-ter or the C-ter region, or both. Therefore, considering that VvHT8 might be identical to VvHT1 and that VvHT20 and VvHT21 are probably a single protein, we can estimate that the grape genome might contain 20 putative hexose transporters. In this VvHT subfamily, the exon-intron organization seems to be conserved as all completely sequenced genes contain 4 exons separated by 3 introns with the exception of *VvHT4* and *VvHT5*. Phylogenetic analysis (Figure 1) reveals that the VvHT subfamily seems to be divided into two subclades, at the basis of which is located VvHT5 and VvHT12 both present on chromosome 5. VvHT12 is located at the basis of a subclade having a bootstrap value of 100 and containing the 10 closely related transporters from chromosome 13 and 9 (VvHT14 to VvHT24). Furthermore, if we exclude VvHT1 and VvHT8, 3 sister-pairs with a strong bootstrap support ($\geq 84\%$) could be identified, VvHT3/VvHT13 (56.8% similarity); VvHT9/VvHT10 (98.5% similarity) and VvHT2/VvHT4 (52.4% similarity). Finally, phylogenetic analysis of *A. thaliana* and *V. vinifera* sugar transporter proteins allowed us to identify six ortholog pairs between both species (Figure 3) such as VvHT1/AtSTP1 (81.9%), VvHT2/AtSTP5 (65.4%), VvHT3/AtSTP7 (77.2%), VvHT4/AtSTP3 (60.8%), VvHT5/AtSTP13 (82%), VvHT13/AtSTP14 (75.6%). Five of these pairs are supported by bootstrap value of 100%.

***Vitis vinifera* putative Tonoplast Monosaccharide Transporters (VvTMT; subfamily II)**

We have also identified three ORFs, which show the strongest similarity (58.3 to 72%) to the 3 *A. thaliana* Tonoplast Monosaccharide Transporters (AtTMT; [44]). All three *Vitis* ORFs show an extended middle loop between the putative trans-membrane helices six and seven in a similar way as the AtTMT. GSVIVT00002919001 is identical to a *V. vinifera* sugar transporter already mentioned in the literature and called VvHT6 [36]. Considering that it shows a higher similarity with AtTMT (58.8 to 70.9%) than with the VvHT proteins (15 to 26.3%), we renamed it VvTMT1. Similarly, GSVIVT00036283001 and GSVIVT00019321001 were called VvTMT2 and VvTMT3, respectively. The exon-intron organization seems to be conserved in the three genes as they contain all 5 exons separated by 4 introns (Additional file 1). Phylogenetic tree performed with *Vitis* sugar transporter amino acid sequences (Figure 1) reveals that the 3 VvTMT form a clade, which is closely related to putative myo-inositol

transporters (VvINT) and vacuolar glucose transporters (VvVGT) (described below). Furthermore, phylogenetic analysis using *Vitis* and *Arabidopsis* sequences (Figure 4) confirms that TMT sequences from both species form a single clade, with a strong bootstrap support (100%), but within which low bootstrap values ($\leq 45\%$) indicate unresolved nodes and fail to detect sister-pairs between both species.

***Vitis vinifera* putative Polyol/Monosaccharide Transporters (VvPMT; subfamily III)**

Five ORFs show highest similarity (41.4 to 72.1%) with the 6 *A. thaliana* polyol transporters and have been therefore named VvPMT1 to VvPMT5. *V. vinifera* putative polyol transporter amino acids sequences share 40% to 76.8% similarity between themselves and the corresponding genes present all the same structure with 2 exons separated by a single intron. Phylogenetic analysis performed with the *A. thaliana* and *V. vinifera* polyol transporters (Figure 4) reveals that VvPMT1 and VvPMT4 form with AtPMT4 a separated clade. VvPMT2 is at the basis of a second clade, which can be divided into two groups, one including VvPMT3, AtPMT3 and AtPMT6 and the second AtPMT1, AtPMT2, AtPMT5 and VvPMT5. Only AtPMT4 and VvPMT4 could be identified as putative orthologs.

***Vitis vinifera* putative ERD6-like Transporters (subfamily IV)**

Twenty-two ORFs showing strongest similarity with the 19 AtERD6-like proteins were identified (Additional file 1) and share 36.2 to 93.2% similarity with each other. Among them, 6 ORFs correspond to partial sequences in which either the beginning or the end of the protein are not clearly identified. However after a more precise sequence analysis, we were able to realize the full annotation for GSVIVT00006084001 and GSVIVT00006097001. Fourteen ORFs are located on chromosome 14, in a region of tandem gene duplications, three other ORFs are carried by chromosome 5 and two partial ORFs by chromosome 12. The 22 ERD6-like proteins fall into the same subfamily supported by a strong bootstrap value (99%) and 14 loci formed 7 sister pairs (Figure 1). The phylogenetic analysis of the amino acid sequences of ERD6-like transporters from *A. thaliana* and *V. vinifera* (Figure 5) reveals that these transporters can be classified into 4 major groups. A first group includes 7 AtERD6-like located on the 5 chromosomes of *A. thaliana* and 9 VvERD6-like located on 3 chromosomes (5, 7, 14) of *V. vinifera*. A second small group including transporters from both species (At1g19450, At1g75220, Vv14605001 and Vv249200001) was also identified. Inversely, the two last groups include protein sequences from only one species. The *Arabidopsis*

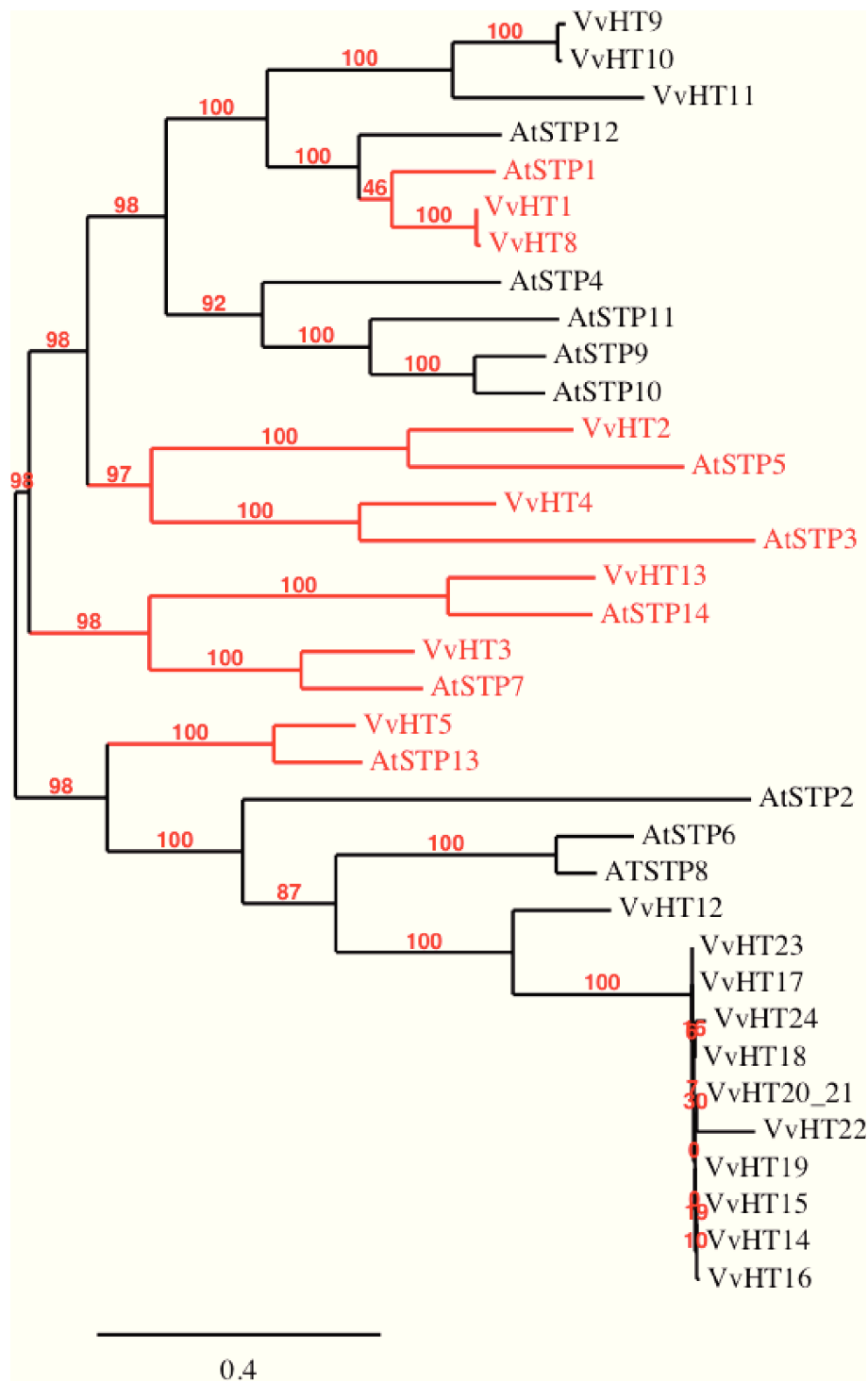


Figure 3 Maximum likelihood phylogeny of *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana* hexose transporter proteins. The tree was produced using MUSCLE and PhyML with the JTT amino acid substitution model, a discrete gamma model with 4 categories and an estimated shape parameter of 1.025. Bootstrapping was performed with 100 replicates. Accession numbers for *Arabidopsis thaliana* transporters are: At1g11260 (AtSPT1), At1g07340 (AtSTP2), At5g61520 (AtSTP3), At3g19930 (AtSTP4), At1g34580 (AtSTP5), At3g05960 (AtSTP6), At4g02050 (AtSTP7), At5g26250 (AtSTP8), At1g50310 (AtSTP9), At3g19940 (AtSTP10), At5g23270 (AtSTP11), At4g21480 (AtSTP12), At5g26340 (AtSTP13), At1g77210 (AtSTP14); for *Vitis* ones see Additional file 1.

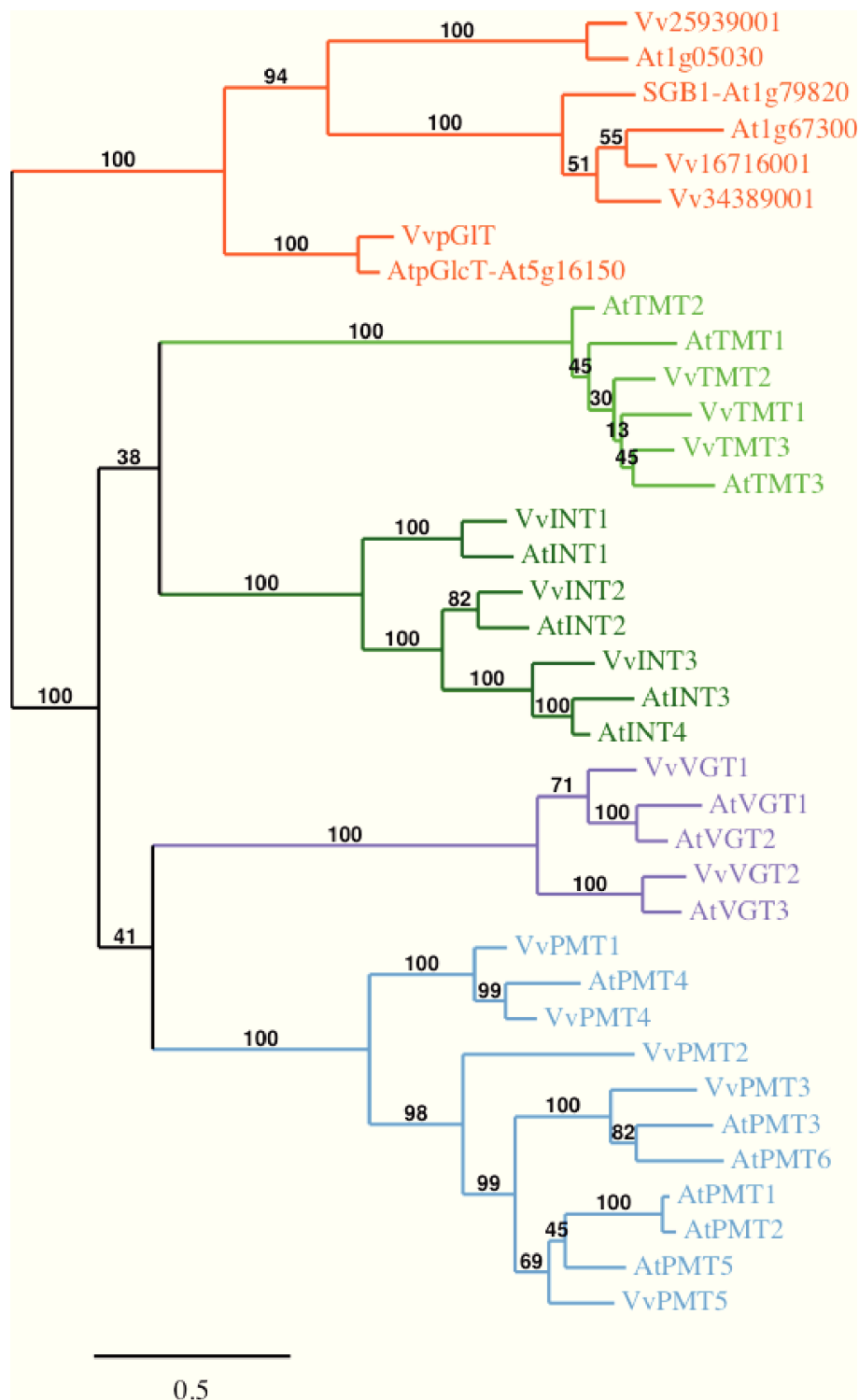


Figure 4 Maximum likelihood phylogeny of *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana* monosaccharide transporter proteins. The tree was produced using MUSCLE and PhyML with the JTT amino acid substitution model, a discrete gamma model with 4 categories and an estimated shape parameter of 1.448. Bootstrapping was performed with 100 replicates. Accession numbers for *Arabidopsis thaliana* transporters are: At1g20840 (AtTMT1), At4g35300 (AtTMT2), At3g51490 (AtTMT3), At2g43330 (AtINT1), At1g30220 (AtINT2), At2g35740 (AtINT3), At4g16480 (AtINT4), At3g03090 (AtVGT1), At5g17010 (AtVGT2), At5g59250 (AtVGT3), At2g16120 (AtPMT1), At2g16130 (AtPMT2), At2g18480 (AtPMT3), At2g20780 (AtPMT4), At3g18830 (AtPMT5), At4g36670 (AtPMT6); for *Vitis* ones see Additional file 1. *Vitis* ORFs names were simplified, Vv indicating GSVIVT000.

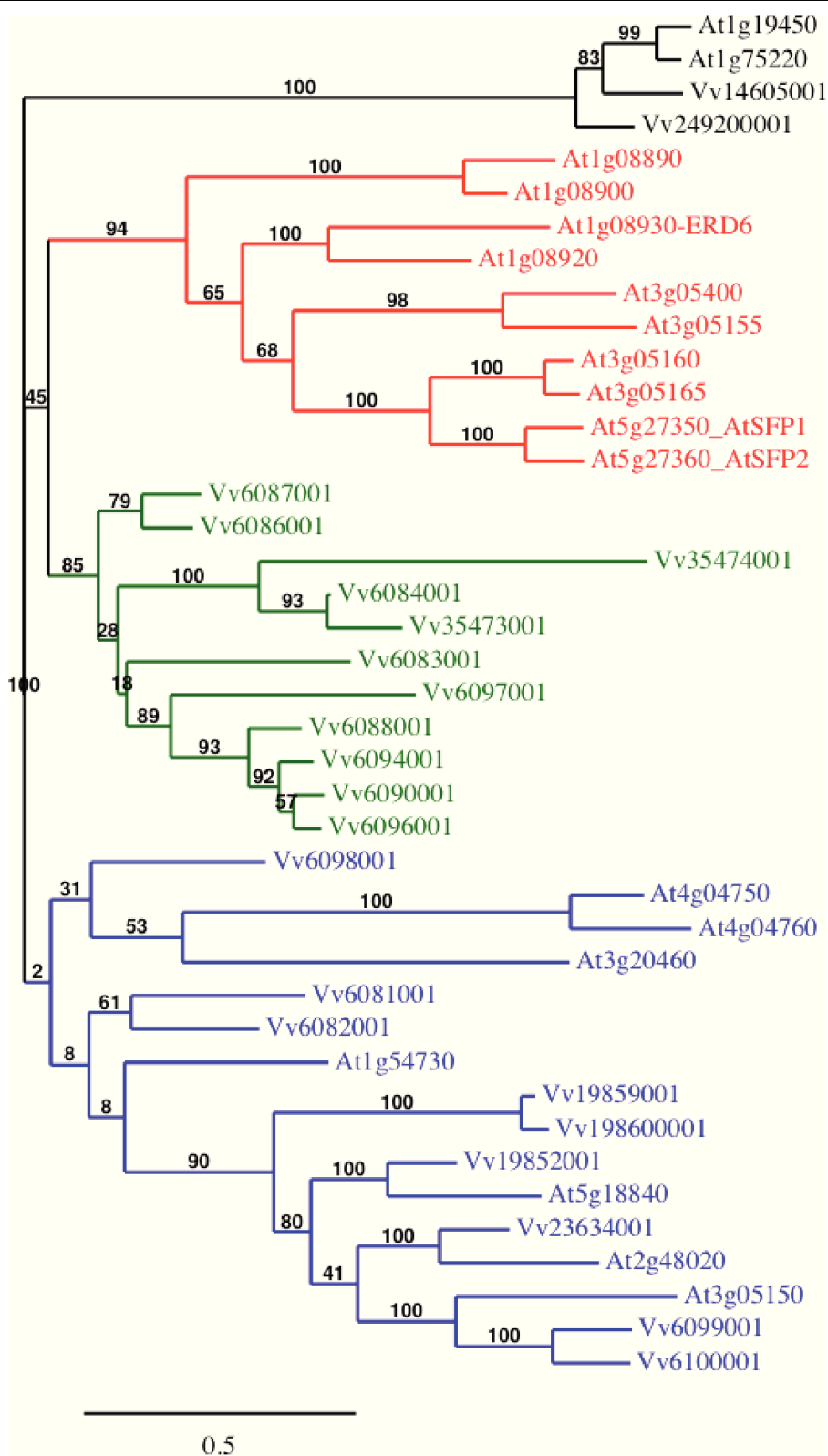


Figure 5 Maximum likelihood phylogeny of *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana* ERD6-like transporter proteins. The tree was produced using MUSCLE and PhyML with the JTT amino acid substitution model, a discrete gamma model with 4 categories and an estimated shape parameter of 1.404. Bootstrapping was performed with 100 replicates. Arabidopsis transporters are indicated with complete ORFs names, for *Vitis* ones ORFs names were simplified, Vv indicating GSVIIVT000.

Table 1 Common putative *cis*-acting elements identified in the *VvSUC/VvSUT*, *VvHT*, *VvTMT* and *VvPMT* promoter sequences

<i>Cis</i> -element name	Sequence	Response	Maximum number of copies/promoter
ARR1AT	NGATT	Cytokinines	36
CIACADIANLELHC	CAANNNNATC	Circadian expression	4**
DOFCOREZM	AAAG	C-metabolism, leaf	40
EBOXBNNAPA	CANNNG	Light, ABA, seeds	36
EECCRCAH1	GANTTNC	CO ₂ -responsive	7
GATABOX	GATA	Light, leaf, shoot	29
GT1CONSENSUS	GRWAAW	Light, leaf, shoot	39
GTGANTG10	GTGA	Pollen	19
IBOXCORE	GATAA	Light, leaf, shoot	13
MYBST1	GGATA	Myb trans activator	4
MYCCONSENSUSAT	CANNNG	ABA, abiotic stress	36
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT	Sugar repression, seeds	9*
POLLEN1LELAT52	AGAAA	Pollen	28
RAV1AAT	CAACA	Root, rosette leaves	9
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	Root	45
SEF4MOTIFGM7S	RITTTTTR	Seed, storage protein	23
WBOXATNPR1	TTGAC	Desease resistance	8*
WBOXHVISO1	TGACT	Sugar, SUSIBA2	9
WBOXNTERF3	TGACY	Wounding, ERF3	16
WRKY71OS	TGAC	GA repressor, ABA	25

Promoter sequence analysis was performed *via* PLACE. *Cis*-element name, sequence motifs and signalling pathway are presented. Up to copies/promoter indicates the highest number of *cis*-acting element found in one promoter. * indicates that the motif is found in all promoters except *VvPMT2*. ** indicates that the motif is found in all promoters except *VvPMT2*, *VvTMT3* and *VvPMT2*.

group contains 10 proteins located on three different chromosomes (1, 3, 5) including ERD6 [45,46], SFP1 and SFP2 [47]. The *Vitis* group includes 11 proteins, 9 of which are encoded by genes located on chromosome 14.

***Vitis vinifera* putative Vacuolar Glucose Transporters (*VvVGT*; subfamily V)**

Two *Vitis* ORFs, named *VvVGT1* and *VvVGT2*, show the highest similarity with the 3 AtVGT (Vacuolar Glucose Transporter)-like transporters. In *Arabidopsis* AtVGT1 and AtVGT2 have been shown to be localized in the tonoplast and glucose transport activity has been

demonstrated for AtVGT1 [48]. On the contrary AtVGT3 is postulated to be localized in chloroplast membrane as this protein presents a N-terminal extension carrying a potential signal for plastid targeting. Phylogenetic tree (Figure 4) indicates clearly that *VvVGT1* is the closest to AtVGT1 and AtVGT2 and that *VvVGT2*, which presents a N-terminal extension, is more closely related to AtVGT3.

***Vitis vinifera* putative Inositol Transporters (*VvINT*; subfamily VI)**

We identified 3 ORFs showing the strongest similarity with the 4 AtINT (Inositol transporter) already described

Table 2 Unique *cis*-acting elements identified only in the promoter sequence of a single sugar transporter gene

<i>Cis</i> -element name	Sequence	Response	Copy number	Gene
ABREZMRAB28	CCACGTGG	Drought, ABA	2	HT5
CRTDREHVCBF2	GTCGAC	Cold, drought	2	HT5
GARE2OSREP1	TAACGTA	GA, germination	1	TMT3
GBOX10NT	GCCACGTGCC	Leaf, root, flower, pollen	1	HT2
GBOXLERNCS	MCACGTGGC	Light, overlap ABA	1	HT5
LREBOXIIPCCHS1	TCCACGTGGC	Cold, drought, ABA	1	HT5
MYBCOREATCYCB1	AACGG	cell cycle, cyclin	1 to 3	<i>VvSUC/VvSUT</i>
NONAMERMOTIFATH3H4	CATCCAACG	meristem,	1	TMT3
ZDNAFORMINGATCAB1	ATACGTGT	Light, leaf, shoot	1	SUC11

Promoter sequence analysis was performed *via* PLACE. *Cis*-element names, sequence motifs, signalling pathways and the number of copies for each element are presented. Gene indicates the corresponding gene in which the *cis*-elements are found.

in *Arabidopsis*. To our knowledge, only two AtINT have been already characterized. AtINT4 is described as a high-affinity, plasma membrane-localized H⁺/symporter specific for myo-inositol [49]. AtINT1 is a tonoplast-localized H⁺/inositol symporter that mediates the efflux of inositol that is generated during the degradation of inositol-containing compounds in the vacuolar lumen [50]. The three *Vitis* ORFs were named VvINT1-3 according to their highest similarity with AtINT (Figure 4).

Other *Vitis vinifera* putative monosaccharide Transporters (VvpGlcT/VvSGB1; subfamily VII)

Finally, 4 ORFs show high similarity with the members of the *Arabidopsis* AtpGlcT/AtSGB1 subfamily, which includes proteins showing homology with a putative glucose transporter (pGlcT) of the chloroplast inner envelope membrane from spinach [4] and with a Golgi-localized hexose transporter homolog (suppressor of G protein beta1:SGB1; [6]). The ORF GSVIVT00038247001 is identical to a *V. vinifera* sugar transporter already mentioned in the literature and called VvpGIT [20,36]. Phylogenetic tree (Figure 4) reveals that inside this subfamily, the proteins separate into 3 groups having strong bootstrap support (100%). VvpGIT and AtpGlcT fall into the same group, which includes also SopGlcT from spinach (not shown). This observation can argue in favor of a chloroplastic localization of VvpGIT even if the precise localization of this transporter is not demonstrated. In a similar way, the fact that Vv16716001 and Vv34389001 form a second group with At1g67300 and SGB1 indicates that these two *Vitis* putative transporters could be localized in Golgi apparatus. Finally Vv25939001 forms a third group with At1g05030.

Search for *cis*-elements putatively involved in the transcriptional regulation of sugar transporter genes

We have identified a 2 kb promoter region for each of the 29 fully sequenced genes from the four mostly studied sugar transporter families: VvSUC/SUT, VvHT, VvTMT and VvPMT (Additional file 2). For only three genes *VvHT14* (1455 bp), *VvTMT3* (1619 bp) and *VvPMT2* (623 bp), the identified sequence is shorter due to the presence of an other ORF located less than 2kb upstream of these transporter genes. A PLACE analysis has been applied to these promoter sequences and the 216 identified *cis*-acting elements have been classified per sugar transporter subfamily, for comparison.

***Cis*-elements common to all promoters**

In a first approach, 20 common *cis*-regulatory elements conserved in the promoter regions of the 29 analyzed sequences have been identified (Table 1). Only the shortest promoter *VvPMT2* (623pb) is missing three of these

elements, namely CIACADIANLELHC, PYRIMIDINE-BOXOSRAMY1A and WBOXATNPR1. Moreover, these common consensus sequences are highly repetitive displaying up to 45 copies into a 2 kb promoter. This might be due to their limited size (4 to 7 bases), and to their high variability (1, 2 and 3 degenerated nucleotides per motif of 5, 6 and 7 bases, respectively). These common *cis*-acting elements are able to confer expression in distinct plant organs, such as leaves, shoots, roots, seeds, and flowers (pollen). They are also responsive to different plant hormones (abscisic acid, gibberellins, ethylene, cytokinins), as well as to several environmental factors (light, CO₂, biotic and abiotic stresses). At least a quarter of these common consensus sequences (EBOXBNNAPA, GATABOX, GT1CONSENSUS, GTGANTG10, IBOXCORE) are required for the transcriptional regulation by light, and this mainly in leaves and shoots. This is in agreement with the roles of the studied transporters in sugar allocation between source- and sink-organs. Finally, the presence of the box CIACADIANLELHC, absent only in the *VvPMT2*, *VvTMT3* and *VvHT12* promoters, strongly suggests the importance of circadian regulation for sugar transporter gene expression.

***Cis*-elements present only in a single promoter**

A second complementary approach was targeted to unique consensus sequences present in the promoter of only one sugar transporter gene, thereby implying some expression specificity. The few unique identified *cis*-elements (Table 2) are characterized by longer sequences (5 to 10 bases), and usually lacking any nucleotide variability. Interestingly, among the 9 gene specific motifs identified, 4 are present only in the *VvHT5* promoter, 2 in *VvTMT3*, one in *VvHT2* and another one in *VvSUC11*. This means that a limited number of gene specific *cis*-acting elements is concentrated in the promoter regions of few sugar transporter genes. For example the hexose transporter gene *VvHT5* is the only one among the 29 genes studied, displaying 4 unique motifs (ABREZMRAB28, CRTDREHVCBF2, GBOXLERNCS, LREBOXIIPCCHS1) in its promoter. Finally, another specific *cis*-element strongly restricted to *VvSUC/VvSUT* genes is the motif MYBCOREATCYCB1 (Table 2), required for transcriptional regulation of cyclin B1 at two different phases of the cell cycle, G1/S and G2/M transitions [51].

***Cis*-elements involved in sugar regulated transcription**

We have studied the transcriptional regulation of sugar transporter genes through the repertory of the main promoter motifs potentially involved in sugar-regulated transcription, and this in combination with other metabolic and hormonal signalling. Additional file 3 summarizes the careful comparison of the following

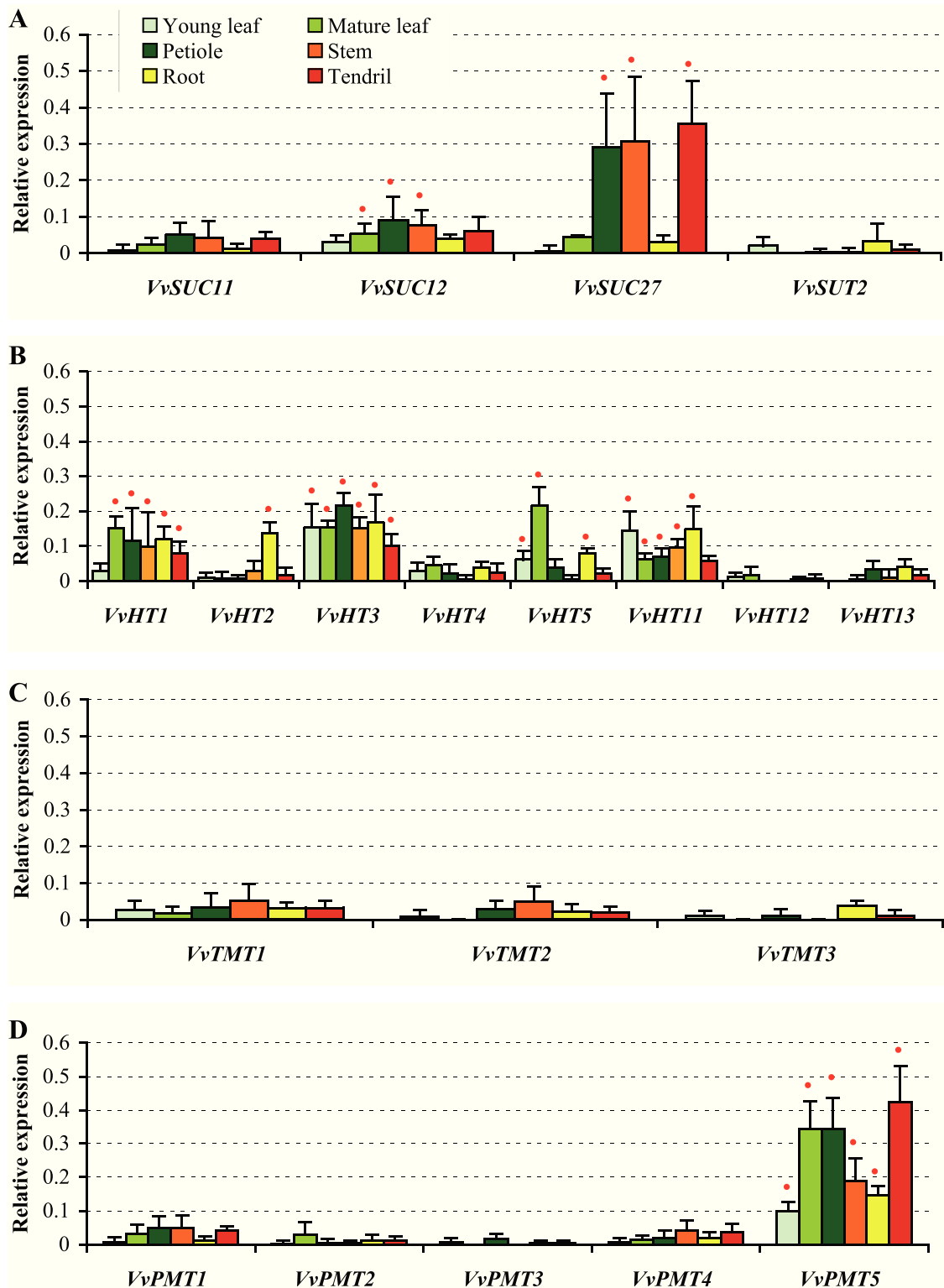
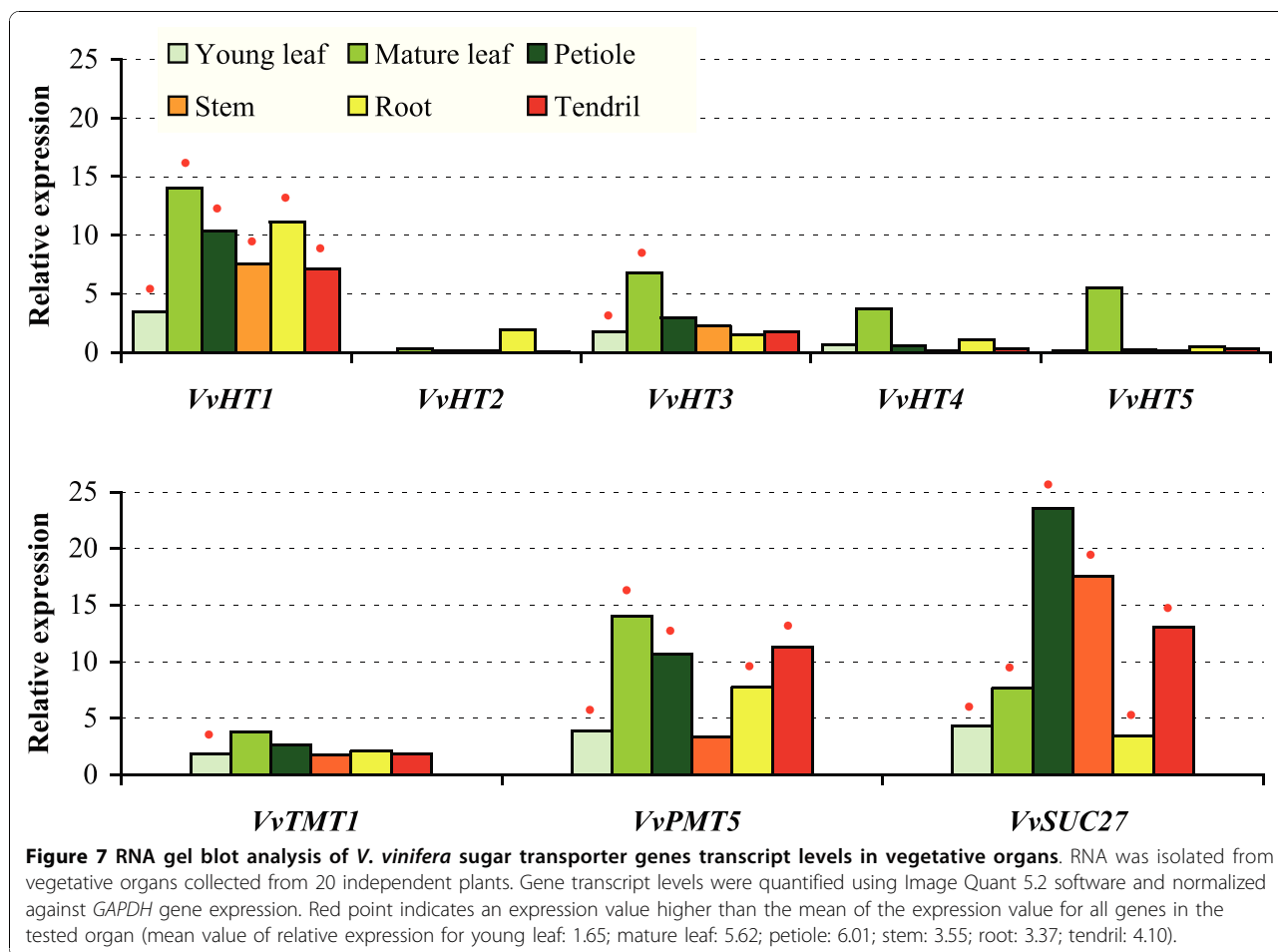


Figure 6 Macroarray analysis of *VvSUC/VvSUT* (A), *VvHT* (B), *VvTMT* (C) and *VvPMT* (D) genes expression in grapevine vegetative organs. RNA was isolated from vegetative organs collected from 20 independent plants. Gene transcript levels were normalized against four reference genes (*GAPDH*, *EF1 α* , *EF1 γ* , *actin*). Each value represents the mean of six replicates obtained with two independent experiments. Red point indicates an expression value higher than the mean of the expression value for all genes in the tested organ (mean value of relative expression for young leaf: 0.03; mature leaf: 0.05; petiole: 0.07; stem: 0.05; root: 0.05; tendril: 0.07).



consensus sequences: *i*) elements for sugar responsiveness as the SURE boxes [52], the bipartite sucrose box 3 [53], the CGACGOSAMY3 [54], the CMSRE [55], the SP8 and WBOXHVISO1 sequences enabling the binding of some WRKY-type proteins at the example of SPF and SUSIBA2 [56-58]; *ii*) sequences common for hormonal and metabolic (sugar) signals perception as the S-box for sugar and ABA [59], the MYBGAHV for gibberellins (GAs) induction and sugar repression [60]; the GARC complex consisting of the AMYBOX1 and 2 [61], and PYRIMIDINE boxes for GAs, ABA and sugar regulation.

There is at least one gene for each subfamily displaying the majority of chosen sugar responsive motifs (*VvHT1* and *VvHT8* - 9 motifs, *VvSUC11* and *VvSUC27* - 8 motifs, *VvHT5*, *VvTMT3* and *VvPMT5* - 7 motifs), thus suggesting a possible transcriptional control dependent on sugars as metabolic signals (Additional file 3). The sucrose box 3, is the most frequently found *cis*-acting element, present at 1 to 4 copies in all studied promoters except *VvHT15*, *VvTMT1* and *VvPMT2*. On the contrary, the CMSRE1IBSPOA element, involved in sucrose positive regulation is only found in promoter

regions of *VvHT2*, *VvHT5* and *VvTMT3*. The sucrose transporter gene family, is the only one displaying the SURE2 motif in the promoter regions of *VvSUC11* and *VvSUC27*. The sugar responsiveness CGACGOSAMY3 box is carried only by *VvHT* genes (*VvHT1*, *VvHT3*, *VvHT5*, *VvHT8*, *VvHT11*), and not by the other subfamilies. Similarly, the S-box (CACCTCCA) usually closely associated to the light-responsive G-box, is carried also only by *VvHT* genes, namely *VvHT1*, *VvHT8* and *VvHT11*. Inversely, the motif MYBGAHV involved in sugar and GA signalling pathways, is displayed by *VvSUC/SUT*, *VvPMT* and *VvTMT* genes, but is lacking in *VvHT* ones. Finally it appears that *VvHT1* and *VvHT8* promoter sequences are the only one to contain a putative GARC complex. A more detailed comparison into the *VvHT* subfamily reveals that *VvHT1* and *VvHT8* promoters are carrying the same *cis*-elements (with the exception of one more copy of the PYRIMIDINEBOXHVPEB1 for *VvHT1*). This indicates that as the coding sequences, the promoter regions for these two putative genes present also a very high similarity (96.7%). This argues in favor of the assumption that

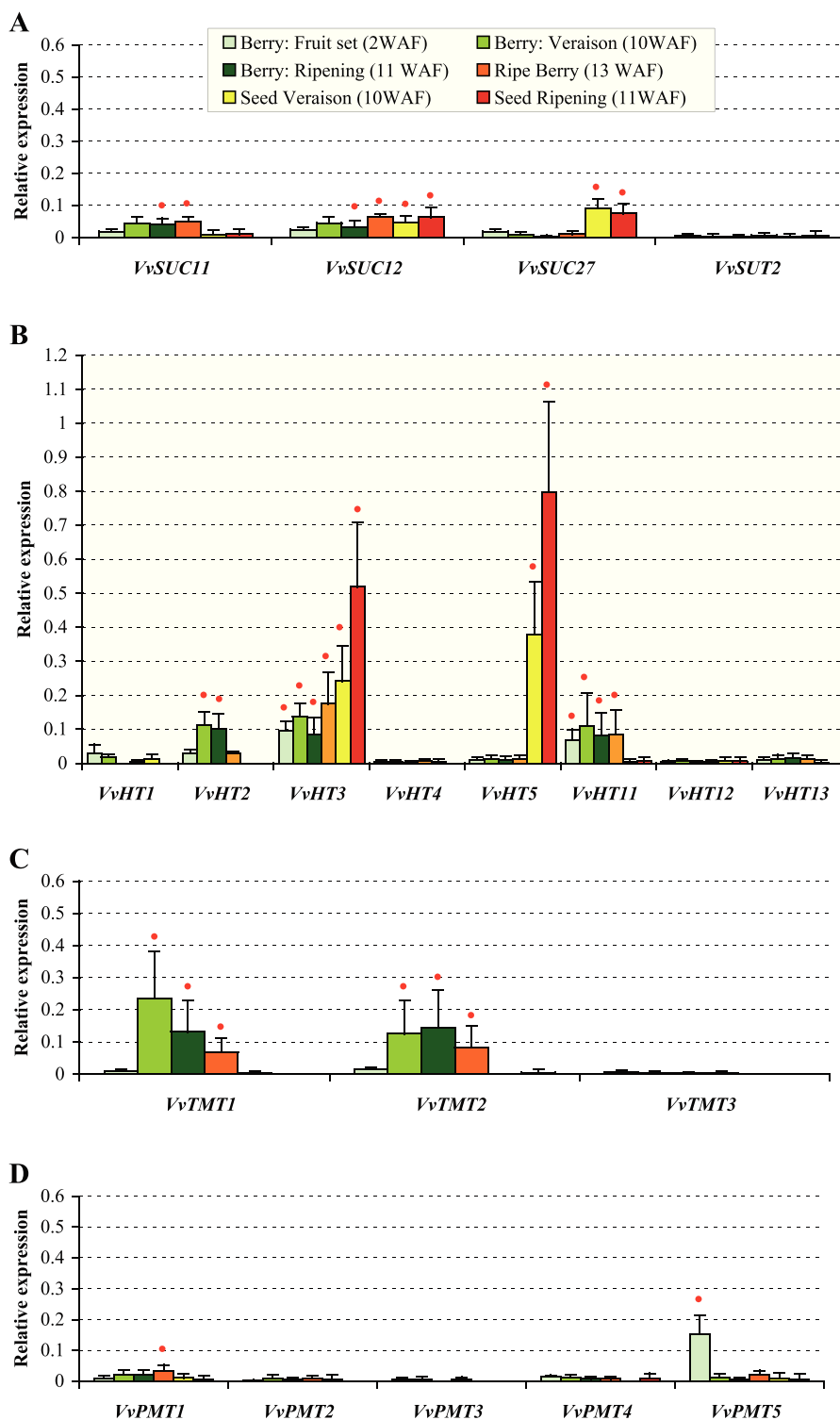


Figure 8 Macroarray analysis of *VvSUC/VvSUT* (A), *VvHT* (B), *VvPMT* (C), *VvTMT* (D) genes expression during grapevine berry and seed development. For each developmental stages, RNA was isolated from all berries collected from 5 independent grapes. Gene transcript levels were normalized against four reference genes (*GAPDH*, *EF1 α* , *EF1 γ* , *actin*). Each value represents the mean of six replicates obtained with two independent experiments. Red point indicates an expression value higher than the mean of the expression value for all genes in the tested organ (mean value of relative expression for berry 2 WAF: 0.056; berry 10 WAF: 0.046; berry 11 WAF: 0.033; berry 13 WAF: 0.029; seed 10 WAF: 0.032; seed 11 WAF: 0.058).

these are either alleles of the same gene or represent the same gene, as already suggested in this study. Such consideration is valuable for another couple of genes mentioned above, *VvHT9* and *VvHT10*, sharing a strong sequence similarity, displaying the same *cis*-acting elements in their promoter region, and carried on the same chromosome. A third gene *VvHT11* is present in tandem repeat with both *VvHT9* and *VvHT10*, by the same chromosome, thus suggesting that they may be products of successive duplications.

***V. vinifera* sugar transporter genes expression in vegetative organs**

In order to study the expression pattern of grapevine sugar transporter genes identified above and belonging to the *VvSUC/VvSUT*, *VvHT*, *VvTMT*, and *VvPMT* sub-families, we have developed sugar transporter macroarray membranes. Specific regions for each sugar transporter (Additional file 4) have been identified in the 3'UTR of the corresponding nucleotide sequences, amplified by PCR using Chardonnay genomic DNA and spotted on nylon membrane. *VvHT8*, *VvHT9*, *VvHT10* and *VvHT14* to *VvHT24*, could not be considered in this expression analysis, as it was not possible to find specific DNA region for these transporters, due to their high sequence similarity either with *VvHT1* or between each other. To determine the gene expression patterns in vegetative organs, macroarrays were hybridized with ³³P-labelled first-strand cDNA synthesized from total RNA isolated from young leaves, mature leaves, petioles, stems, roots and tendrils from 10 weeks-old grapevine plants grown under aeroponic conditions. These culture conditions have been used in order to collect all main vegetative organs at the same development stage and in the same conditions and allowed an easy access to the root system without damage. Among the sucrose transporters only *VvSUC27* is detected at a high level in petioles, stems and tendrils, its transcripts being less abundant in young leaves, mature leaves and roots (Figure 6A). *VvSUC11* and *VvSUC12* are detected in all organs but at a weaker level and *VvSUT2* is the less expressed sucrose transporter being only weakly detected in young leaves and roots. Concerning the *VvHT* family (Figure 6B), 3 genes (*VvHT1*, *VvHT3* and *VvHT11*) are expressed in all the tested organs at a relatively high level (expression value higher than the mean of expression value for all genes) with *VvHT1* and *VvHT11* being less expressed in young leaves and tendrils, respectively. *VvHT2* and *VvHT5* seem to present a more specific expression. *VvHT2* is expressed at a higher level in roots than in the other organs and *VvHT5* is highly expressed in mature leaves and presents a weaker expression in roots and young leaves. The three other hexose transporters (*VvHT4*, *VvHT12*,

VvHT13) are weakly detected, indicating a low expression in the tested organs. The three *VvTMT* are also detected at a very low level in all organs (Figure 6C). Among the polyol/monosaccharide transporters (Figure 6D), only *VvPMT5* could be significantly detected in the six organs. It shows a strong expression in mature leaves, petioles and tendrils, and a weaker expression in stems, roots and young leaves. The other *VvPMT* are weakly expressed in all the tested organs.

In order to validate the results obtained with macroarray hybridizations and to confirm the expression pattern of the sugar transporter genes, we performed a Northern blot analysis for few genes. The results presented in Figure 7 clearly show similar expression patterns for most of the tested genes. *VvHT1* shows the weakest expression in young leaves. *VvHT2* seems to be specifically expressed in roots. *VvHT5* presents a weak expression in all organs, except in mature leaves. *VvTMT1* shows a global weak expression in all organs. *VvPMT5* is highly expressed in mature leaves, petioles and tendrils. Finally, *VvSUC27* shows high amount of transcripts in petioles, stems and tendrils. Few discrepancies were however observed. First, the expression level detected for *VvHT3* is the highest in mature leaves when detected by Northern blot which is not the case using macroarray. Second, *VvHT3* and *VvHT11* show a higher expression in macroarray than in Northern blot analysis. For *VvHT11* signals obtained with Northern blot were too low to be correctly quantified. Furthermore, we could confirm using both methods that *VvHT3* is expressed at a higher level than *VvHT2*, *VvHT4*, *VvHT5*, and *VvHT11* in almost all organs. Taken together, all these results indicate that few transporter genes (*VvHT1*, *VvHT3*, *VvPMT5*, *VvSUC27*) are the most expressed in almost all vegetative organs and that *VvHT2* and *VvHT5* are more specifically expressed in roots and mature leaves, respectively.

Sugar transporter genes expression during grape berry development

In order to study the expression of sugar transporter genes during berry development, we further hybridized the sugar transporters macroarray membranes with ³³P-labelled first-strand cDNA synthesized from total RNA isolated from berries and seeds. Four developmental stages for berries - fruit set (2WAF), veraison (10WAF), ripening (11WAF), ripe berries (13WAF) - and two for seeds (10 and 11 WAF) were used. Among the sucrose transporter genes, *VvSUC11* and *VvSUC12* are both expressed during berry development at a similar level to that detected in vegetative organs (Figure 8A). The weakest expression for these two genes is observed in berries at the stage of fruit set. On the contrary, *VvSUC27*, the most expressed sucrose transporter gene in vegetative

organs is less expressed than *VvSUC11* and *VvSUC12* in berries while *VvSUT2* is weakly or not detected. Three hexose transporters are expressed during berries development (Figure 8B). *VvHT2* is expressed during the 4 tested stages and presents a maximum at the veraison and during ripening. Inversely, *VvHT3* and *VvHT11* are expressed at an equivalent level during the 4 developmental stages. *VvHT1*, *VvHT4*, *VvHT5*, *VvHT12* and *VvHT13* are poorly or not detected at any stage. The expression of two putative tonoplast monosaccharide transporters (*VvTMT1* and *VvTMT2*) which is weak at the fruit set increases significantly at the veraison (figure 8C). Furthermore, the expression level of these two genes is higher in berries at the veraison and during ripening than in vegetative organs. On the contrary, *VvTMT3* does not seem to be expressed in berries at any stage of development. Polyols transporters are not highly expressed in berries, only *VvPMT1* is weakly detected during the 4 stages and *VvPMT5* is expressed mainly at the fruit set stage (Figure 8D). Macroarray hybridization performed with first-strand cDNA synthesized from total RNA isolated from seeds reveals clearly that the expression of *VvHT3* and *VvHT5* is very high in seeds and increases during seed development (Figure 8B). Two other transporter genes *VvSUC12* and *VvSUC27* were also expressed in seeds but at a lower level, and their expression stays stable during the two tested developmental stages (Figure 8A).

Discussion

Phylogenetic analysis of *Vitis vinifera* sugar transporter genes

The search for sugar transporters in the *Vitis vinifera* translated genome has identified 4 sucrose and 59 putative monosaccharide transporters including 20 VvHT (Hexose Transporters), 3 VvTMT (Tonoplast Monosaccharide Transporters), 5 VvPMT (Polyol/Monosaccharide Transporters), 3 VvINT (INositol Transporter), 2 VvVGT (Vacuolar Glucose Transporters), 4 pGIT/SGB1 and 22 ERD6-like transporters. As expected, phylogenetic analysis performed with these sugar transporter proteins revealed that sucrose and monosaccharide transporters form two distinct groups (Figure 1). This analysis allowed us to identify only 4 *Vitis* sucrose transporters, which confirms that, as all other analyzed plants, *Vitis* possesses a small sucrose transporter gene family, in which one gene (*VvSUC12*) belongs to the SUT2 subfamily. Interestingly, in *Vitis* as in *Arabidopsis*, the VvHT and the ERD6-like form the largest multigenic subfamilies. In *Vitis*, this may be due to the presence of 4 repeated regions, encompassing *VvHT* and *ERD6-like* genes. Two duplicated regions located on chromosomes 13 and 14 contain 9 and 3 *VvHT*, respectively. The 2 other regions carried by chromosomes 5 and 14 display respectively 3 and 14 *ERD6-like* genes. Similarly, in

Arabidopsis, the large expansion of AtSTP subfamily has been correlated with 3 segmental duplications and one tandem duplication as well as the expansion of the AtERD6-like subfamily by 2 segmental duplications and 6 tandem duplications [16]. Furthermore, based on significant differences in size observed in the STP and ERD6-like subfamilies, between the non-vascular (moss) and the vascular (gymnosperm and angiosperm) lineages, it has been suggested that the expansion of these two subfamilies could be related to the evolution of vascular plants. This is reflecting the increased importance of the sugar transport and sugar transporters in vascular plants [16]. In agreement with this hypothesis, the AtERD6/VvERD6-like phylogenetic tree (Figure 5) clearly shows that ERD6 transporters from both species fall into four different groups, two of them containing either AtERD6 or VvERD6 transporters only. This indicates that in both species, the expansion of the ERD6-like subfamilies has occurred quite recently, after the separation of these two species.

Sugar-responsive elements in sugar transporter gene promoters suggest their regulation by sugars

The *in silico* search for *cis*-acting elements reveals several common and highly repetitive motifs in sugar transporter gene promoters. These *cis*-acting elements such as DOF (DNA-binding with one finger) proteins, may play a role not only in the regulation of sugar transporter gene expression in terms of activity level, but also plausibly in terms of response specificity *via* a combinatorial control. Such a control has already been suggested for *AtSUC2* [62] the expression of which in the companion cell is regulated by the close cooperation of binding sites for a DOF and a putative HD-Zip transcription factors. Several transporter gene promoters display an important concentration of sugar-responsive elements suggesting their possible transcriptional regulation by sugars. To our knowledge, the transcriptional regulation of *VvHT1* by glucose is the only one to be clearly demonstrated [18-20] and this is confirmed by the fact that *VvHT1* promoter contains the highest number of sugar responsive motifs. This highlights the power of the *in silico* analysis as a first step toward the functional characterization of promoter regions. Finally, the MYB-COREATCYCB1 sequence exclusively found in *SUC/SUT* promoters is not surprising in regard to the sucrose-dependent induction of *Cyclin D3* gene expression [63], thus suggesting a possible concomitant regulation of some sucrose transporter genes in the cell cycle.

Sucrose transporter genes expression in *Vitis vinifera*

The expression patterns detected for the sucrose transporter genes, using macroarrays, are in good agreement with those described in the literature with two main

exceptions: the absence of high expression of *VvSUC11* in seeds and of *VvSUC27* in roots, as reported by [30]. On the contrary, we confirmed that, in berries, *VvSUC11* and *VvSUC12* transcripts are present at all developmental stages and accumulate slightly at the onset of ripening [30,31]. *VvSUC11* is closely related to *AtSUC4*, which has been localized in the tonoplast of *A. thaliana* mesophyll cells [64]. Furthermore, *VvSUC12* falls into the SUT2/SUC3 group which contains very low affinity sucrose transporters for which different putative physiological functions have been proposed including their putative involvement in sucrose import into several sink tissues [43,65,66]. Therefore, it is tempting to suggest that *VvSUC12* is probably involved either in phloem unloading or in sucrose import into berry tissues and that *VvSUC11* might be responsible for sucrose accumulation in berry vacuoles. This hypothesis will have to be verified with the precise localization of these two transporters. We noticed that *VvSUC27* is the most expressed sucrose transporter gene in vegetative organs and that its expression is relatively low in berries. Considering its high expression in petioles, stems and tendrils and the fact that it is closely related to members of the SUT1 subfamily, *VvSUC27* is probably responsible for phloem loading and sugar retrieval during long-distance transport. Finally, the weak expression level observed for the less characterized *Vitis* transporter gene *VvSUT2* makes it difficult to assign a specific role for this transporter.

Hexose transporter genes expression in *Vitis vinifera*

The present phylogenetic analysis indicates that *VvHT1* shows highest similarity with *AtSTP1*. Both are high affinity glucose transporters showing K_m value of 70 μM [36] and 20 μM [67], respectively. During the last decade, different authors have reported various expression patterns for *VvHT1* such as a strong expression in berries and young leaves [35], a preferential expression in sink organs [18], an expression in conducting bundle of leaves, petioles and berries [36] or an expression increasing with leaf development [37]. During berry development, *VvHT1* expression was described to show two peaks (one at the time of anthesis, the other after veraison) [35] or to decline rapidly during ripening [37,68]. This second expression pattern was supported by the detection of *VvHT1* protein only in young green berries [20]. Our results (Figures 6 and 8) clearly confirm that *VvHT1* belongs to the hexose transporters that are poorly expressed in berries, but is one of the mostly expressed *VvHT* in vegetative organs including leaves, petioles, stems, roots and tendrils. Furthermore, its expression increases during leaf development.

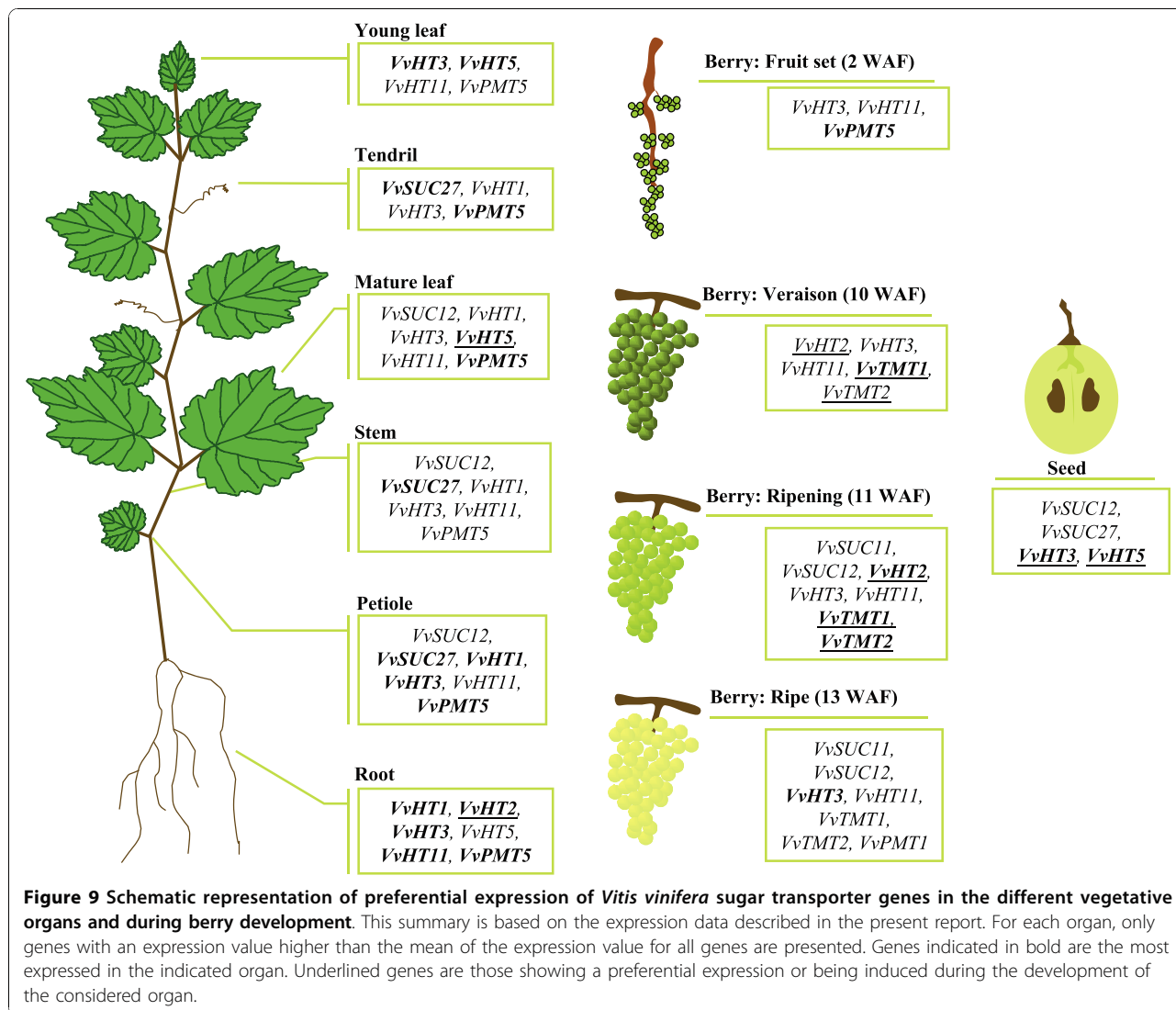
VvHT2 shows the highest similarity with *AtSTP5* which has not been yet characterized. Different reports

describing the expression of *VvHT2* have shown that *VvHT2* is weakly expressed in leaves whatever the stage of development [35] and that the transcript level is high in young berries and declines around veraison [35,37,68]. Our data (Figures 6 and 8) confirm not only *VvHT2* expression in leaves and during berry development, but indicate also its weak expression in almost all vegetative organs except for roots in which it seems to be strongly expressed.

VvHT3 has been described to be one of the mostly expressed *VvHT* in leaves, with increasing expression during leaf development. In young berries, its expression is high, decreases around veraison and increases again around the phase of sugar storage [37]. The expression pattern determined in our experiment (Figures 6 and 7) correlates with that described previously. However, we found that this transporter, which is expressed in all vegetative organs is also highly expressed in seeds (Figure 8), in which its expression seems to increase during development. Interestingly, *VvHT3* shows the highest similarity with *AtSTP7* for which a strong seed expression is also suggested by microarray hybridization data (genevestigator, BAR). Although the localisation and the functionality of these transporters are unknown, they might have a determinant function in sugar storage in seeds and/or in embryo development.

VvHT4 is poorly expressed in all the tested organs and hardly detectable in berries (Figures 6 and 8), in accordance with previous report describing a very weak expression in berry and leaf development [37]. *VvHT4* has been characterized as a glucose transporter showing a high affinity for glucose (K_m : 137 μM), higher than that reported for *AtSTP3* (K_m = 2 mM) the closest related *Arabidopsis* transporter. A physiological role, either to support wounded tissue or in the retrieval of monosaccharides released during cell damage and cell wall degradation, has been proposed for *AtSTP3*, based on its induction after wounding [2]. A more precise characterization of *VvHT4* is therefore required to verify if the expression of this gene is also regulated after wounding or in response to other stresses.

VvHT5 was found to be less expressed than *VvHT1* and *VvHT3* in developing leaves and during berry development [37]. Our experiments confirmed that *VvHT5* transcripts are hardly detected in berries, however they are predominant in seeds, at least for the two tested developmental stages (Figure 8). *VvHT5* shows the highest similarity with *AtSTP13* and both have similar high affinity for glucose (K_m = 89 μM and K_m = 74 μM , respectively) [37,69]. Furthermore, the expression of these two transporters is described to be induced in response to pathogen attack [69,70]. This indicates that these genes could be involved in pathogen starvation and/or in a sugar signalling pathway in plant defense.



The presence of four unique *cis*-acting elements (Table 2) and of a cluster of three ABRE motifs [70] in the promoter region of *VvHT5* gene is in agreement with the regulation of its expression by ABA and biotic stress but also suggests its involvement in abiotic stress responses.

Three putative hexose transporters named *VvHT11*, *VvHT12* and *VvHT13*, that have never been described earlier, have been identified. Our phylogenetic analysis (Figure 3) revealed that *VvHT11* and *VvHT12* are each located at the basis of one of the two duplicated regions involved in the expansion of the *VvHT* subfamily. Furthermore, this analysis allowed us to identify *AtSTP14* and *VvHT13* as orthologs, but no orthologs for *VvHT11* and *VvHT12* could be found. The expression pattern of *VvHT11*, the weak expression of *VvHT12* and *VvHT13* in all vegetative organs and in berries are not

sufficient to suggest putative physiological functions for these three transporters. However recent data indicates that *VvHT13* is induced by necrotrophic fungi and could be involved as *VvHT5* in biotic stress response (Afoufa-Bastien et al., personal communication).

Putative tonoplasmic monosaccharide transporter genes expression in *Vitis vinifera*

Three putative tonoplasmic monosaccharide transporters were identified and named *VvTMT1-3*. Expression data indicate that, even if the expression of *VvTMT1* and *VvTMT2* is present in all the tested vegetative organs, it is highest in developing berries. The expression of *VvTMT1* is described to increase during berry development [71] with a maximum near the start of veraison [68]. Our data not only confirm this expression pattern but suggest also that at least two

transporters, VvTMT1 and VvTMT2, might probably play a significant role during ripening. Although their cellular localisation and their transport activity have not been determined so far, they could be involved in hexose accumulation into vacuoles of berry cells. Furthermore, considering that the expression of *AtTMT1* and *AtTMT2* has been reported to be induced by drought, salt, and cold treatments [44], it would be interesting to verify, if the expression of the *VvTMT* genes is also regulated under stress conditions, particularly in vegetative organs, where they are weakly expressed in normal conditions.

Polyols transporter genes expression in *Vitis vinifera*

Since 2001, many polyol transporters have been identified and characterized in sorbitol or mannitol-translocating plants, where they are described to be responsible for the loading of polyols into the phloem and their transfer to sink organs [11,12,38-40]. More recently, polyol transporters have been identified and characterized in non-polyol-translocating species such as *A. thaliana* [72-74] which contains 6 polyol transporters, the physiological role of which is still unknown. In *Vitis*, the expression of only one EST encoding a putative PMT has been already briefly mentioned in the literature and was shown to be weakly expressed during berry development [68]. Our *in silico* analysis, indicates that the *Vitis* genome contains 5 putative polyol transporter genes. Among them only one named *VvPMT5* was highly expressed in vegetative organs and only at the fruit set. However as grapevine has not been described as a species transporting polyols in the phloem, the role of this transporter is far from being clear.

Conclusions

The present work represents the first exhaustive analysis of sugar transporter genes in a woody plant. The identification of grapevine sugar transporter genes and their comparative analysis with the *Arabidopsis* ones has indicated a strong conservation of these genes between herbaceous and woody plants as well as some expansions of particular functional subfamilies such as hexoses and ERD6-like transporters. In this paper, we developed macroarrays to profile the expression of 20 of these transporters simultaneously in different organs. Our results not only confirmed some expression data already described in the literature but also demonstrated that four sugar transporter genes are expressed in almost all vegetative organs (*VvHT3*, *VvHT11*, *VvPMT5*, *VvSUC27*), few transporters are more specifically expressed in roots (*VvHT2*), mature leaves (*VvHT5*) and/or in seeds (*VvHT3*, *VvHT5*) and three others are regulated during berry development (*VvHT2*, *VvTMT1*, *VvTMT2*) (Figure 9). The present results might help to elucidate the biological function of

sugar transporters in *V. vinifera* development particularly during berry ripening and would also have a significant impact on our knowledge on plant sugar transporters in general. The *in silico* analysis of promoter sequences revealed the presence of *cis*-regulatory elements involved in sugar signalling, and represents a first step towards the understanding of the regulation of sugar transporter gene expression *via* metabolic, hormonal and environmental signals. More and more evidences suggest that sugar transporter genes are regulated under various conditions. Thus, the macroarray analysis described in this paper could constitute a powerful approach to investigate the sugar transporter response to environmental factors in grapevine.

Methods

Identification of sugar transporter genes in *V. vinifera* genome

V. vinifera sugar transporter genes were identified performing a Blastp analysis [75] against the *V. vinifera* proteome 8X database, on Genoscope website <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis> using each *A. thaliana* monosaccharide and sucrose transporter amino acid sequences as query, and an E-value of $1,00^{E-04}$ as threshold. Furthermore, the 2 kb region upstream of the start codon for each gene was considered as the promoter sequence.

Sequence similarities, phylogeny and promoter sequence analysis

Sequence similarities were determined performing Clustal V multiple alignments using Lasergene software (DNASTAR, USA). Phylogenetic analysis of *V. vinifera* and *A. thaliana* sugar transporter protein sequences was performed using maximum likelihood and the <http://www.phylogeny.fr> website [76]. For this, protein sequences alignment was performed using the MUSCLE program [77], and maximum likelihood trees with 100 bootstrap replicates were constructed with the PHYML program [78,79] and the JTT amino acid substitution model. Phylogenetic tree was visualized using Treedyn program [80]. Search for *cis*-regulatory elements in promoter sequences was performed using the PLANT Cis acting regulatory DNA Elements database (PLACE: <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html>)

Plant material and growth conditions

Vitis vinifera cv. Chardonnay plants were cultivated *in vitro*, for 7 weeks (46 days), on McCown Woody Plant Medium (Duchefa, The Netherlands), pH 5.8, supplemented with 20 g.l^{-1} sucrose, with 16 h photoperiod at 24°C. Plants were then transferred to an aeroponic culture system and grown with Gibeaut solution [81] under controlled conditions (16 h photoperiod, 23°C; 70% RH

day/18°C; 65% RH night). After 24 days, young and mature leaves, stems, roots, petioles and tendrils were sampled, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. *V. vinifera* cv. Chardonnay berries were harvested in the 2007 growing season (between 25th June and 10th September) from grapevines grown in SRPV Poitou-Charentes fields (Biard, Poitiers, France). Berries were sampled at 2, 10, 11 and 13 weeks after flowering (WAF) corresponding to fruit set, veraison, and two maturation developmental stages, the last one being 10 days before harvest. After freezing in liquid nitrogen, seedless berries and seeds were stored at -80°C.

RNA isolation

Total RNA was isolated from grapevine tissues as previously described by Valtaud and coworkers (2009) [82]. For macroarray analysis, RNA was treated with RNase-free DNaseI (QIAGEN, Germany) in order to eliminate contaminant DNA and purified using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany), according to the RNA clean up protocol.

Cloning of specific cDNA fragments and macroarray membrane spotting

Specific DNA regions for each sugar transporter and reference genes (*actin*, *EF1 α* , *EF1 γ* and *GAPDH*) have been identified in the 3'UTR of the nucleotide sequence and amplified by PCR using Chardonnay genomic DNA and specific primers (Additional file 4). PCR products were purified with Wizard[®]SV Gel and Clean-Up System (Promega, USA) according to manufacturer's protocol, cloned into the pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, USA) and sequenced using the ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA).

Specific cDNA fragments have been amplified from the obtained plasmids by PCR using one specific primer and T7 primer. For each reaction, 1 μ l of plasmid DNA solution was used as template in a 50 μ l PCR reaction, containing 1 \times Green GoTaq[®] Flexi Buffer, 2 mM MgCl₂, 0.4 μ M of each primer, 0.2 mM of each deoxynucleotide and 1.25 U of GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega, USA). Amplification reactions included an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 52°C, 1 min at 72°C and a final extension of 5 min at 72°C. All PCR products were purified using the Wizard[®]SV Gel and Clean-Up System (Promega, USA) according to manufacturer's protocol.

Each cDNA fragment was dotted in triplicate on a 6 \times SSC-soaked nylon Hybond[™]-N⁺ membrane (GE Healthcare, UK), using a 96-well Bio-Dot[®] Microfiltration Apparatus (BIO-RAD, Canada). The amount of cDNA

per spot was 50 ng for sugar transporter and 100 ng of each reference gene. Three dots of 50 ng of salmon sperm DNA were used as internal negative control. Membranes were then incubated in a denaturing solution (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH), in a neutralizing solution (1.5 M NaCl, 0.5 M TRIS-HCl pH 8), and finally washed in 2 \times SSC solution. DNA was cross-linked to the membrane by exposure to UV light (120 mJ/cm²) using a crosslinker (Bio-Link-BLX-E254).

Macroarray membrane hybridization

For the synthesis of ³³P-labeled cDNA, 30 μ g of DNase treated total RNA were retro-transcribed using 2 μ M oligo d(T)₁₆, 0.5 mM dATP, dTTP, dGTP, 2.26 μ M dCTP, 0.33 μ M [α -³³P]-dCTP (10mCi ml⁻¹) and 800 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, USA). Labeled products were then treated with 10 U of Ribonuclease H (Promega, USA) and purified on illustra[™] Probe Quant[™] Micro Columns (GE Healthcare, UK). Prehybridization and hybridization were carried out at 65°C using Church solution (1% BSA, 1 mM EDTA, 0.25 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ and 7% SDS). After 16-20 h of hybridization, membranes were washed twice in 2 \times SSC; 0.1% SDS for 15 min, twice in 1 \times SSC; 0.1% SDS for 15 min at 65°C and exposed in a Storage Phosphor Cassette for 48 h and images were acquired using a Typhoon TRIO Imager (GE Healthcare, UK). Spot finding, quantification and background subtraction were done with ImageQuant TL 7.0 program (GE Healthcare, UK). Spots were considered as present only if higher than the mean of salmon sperm negative control and then normalized using the mean of 4 reference genes (*actin*, *EF1 α* , *EF1 γ* and *GAPDH*).

Northern blotting

Total RNA (20 μ g) isolated from different organs of grapevine plants were separated by electrophoresis in denaturing formaldehyde 1.2% agarose gel and then transferred to Hybond[™]-N Nylon membrane (GE Healthcare, UK). DNA probes designed on 3'UTR regions of genes of interest were produced by PCR reaction and labeled with [α -³²P]-dCTP using Prime-a-Gene[®] Labelling System (Promega, USA) according to manufacturer's protocol. Prehybridization and hybridization were performed as described for macroarray. Membranes were washed in 2 \times SSC, 0.1% SDS for 15 min, in 1 \times SSC, 0.1% SDS for 15 min and in 0.5 \times SSC, 0.1% SDS for 5 min at 65°C. Membranes were exposed for 48 h in a Storage Phosphor Cassette and scanned as performed for macroarray analysis. Quantification and background correction were done using Image Quant 5.2 software. Reported signals were then normalized to *GAPDH* expression value.

Additional material

Additional file 1: Sucrose and Monosaccharide transporter genes identified in *Vitis vinifera* genome. *Vitis* proteome 8x ID, attributed name, chromosomal position, gene length, number of introns and exons, ORF length, protein length, estimated protein molecular weight and pI, GenBank ID and reference are indicated when available. Genes written in italics are partial.

Additional file 2: Sucrose and Monosaccharide transporter genes promoter sequences identified in *Vitis vinifera* genome. *Vitis* proteome 8x ID, attributed name, chromosomal position and promoter length are indicated.

Additional file 3: *Cis*-acting elements potentially involved in sugar-regulated transcription identified in the *VvSUC/VvSUT*, *VvHT*, *VvTMT* and *VvPMT* promoter sequences. Promoter sequence analysis was performed via PLACE. *Cis*-element names, sequence motifs, signalling pathways and the number of copies for each element are presented for each promoter. x(xx): number of motif types (total number of identified motifs). i) Elements for sugar responsiveness. ii) Elements for sugar and hormonal signals perception.

Additional file 4: Oligonucleotide primers used to amplify specific 3'UTR of sugar transporter and reference genes. Gene name, oligonucleotide sequences and length of the amplified cDNA fragments are indicated.

Acknowledgements

The authors thank Mathieu Célérier and Emilie Sohier for their contribution in retrieving gene and promoter sequences. We are grateful to Freddy MANCEAU from SRPV (service regional de la protection des végétaux) Poitou-Charentes in BIARD (FRANCE) for Chardonnay berries gift.

Author details

¹UMR-CNRS-UP 6503 - LACCO - Laboratoire de Catalyse en Chimie Organique - Equipe Physiologie Moléculaire du Transport de Sucres - Université de Poitiers - Bâtiment Botanique - 40 Avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France. ²UMR Génétique et Horticulture (GenHort) - INRA/INH-UA - BP 60057 - 49071 Beaucouzé cedex, France.

Authors' contributions

DAB and AM were equally involved in plant culture, RNA isolation, cDNA cloning, macroarrays and Northern blot hybridizations, data analysis and participated in genome search and manuscript writing. JJ participated in genome search, cDNA cloning and macroarrays perfecting. PCT helped in macroarrays perfecting and was involved in revising the manuscript critically for intellectual content. RL was involved in revising the manuscript critically for intellectual content and gave final approval of the version to be published. RA performed *cis*-elements identification and wrote the corresponding part of the manuscript. ML conceived the study, carried out the genome search, the gene and promoter sequences analysis, the phylogenetic analysis, participated in building macroarrays and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 16 June 2010 Accepted: 12 November 2010

Published: 12 November 2010

References

- Lemoine R: Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim Biophys Acta* 2000, **1465**(1-2):246-262.
- Buttner M, Sauer N: Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim Biophys Acta* 2000, **1465**(1-2):263-274.
- Zimmermann MH, Ziegler : List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In *Encyclopedia of Plant Physiology*. Edited by: Zimmermann MH, Milburn JA. Berlin: Springer Verlag; 1975:480-503.
- Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Groner F, Hebbeker U, Flugge Ul: Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* 2000, **12**(5):787-802.
- Martinoia E, Massonneau A, Frangne N: Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant Cell Physiol* 2000, **41**(11):1175-1186.
- Wang HX, Weerasinghe RR, Perdue TD, Cakmakci NG, Taylor JP, Marzluff WF, Jones AM: A Golgi-localized hexose transporter is involved in heterotrimeric G protein-mediated early development in Arabidopsis. *Mol Biol Cell* 2006, **17**(10):4257-4269.
- Kuhn C: A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biol* 2003, **5**:215-232.
- Sauer N: Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett* 2007, **581**(12):2309-2317.
- Kuhn C, Grof CP: Sucrose transporters of higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 2010, **13**:1-11.
- Buttner M: The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Lett* 2007, **581**(12):2318-2324.
- Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R: Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *Plant Cell* 2001, **13**(3):695-705.
- Ramsperger-Gleixner M, Geiger D, Hedrich R, Sauer N: Differential expression of sucrose transporter and polyol transporter genes during maturation of common plantain companion cells. *Plant Physiol* 2004, **134**(1):147-160.
- Juchaux-Cachau M, Landouar-Arsivaud L, Pichaut JP, Campion C, Porcheron B, Jeauffre J, Noiraud-Romy N, Simoneau P, Maurousset L, Lemoine R: Characterization of AgMaT2, a plasma membrane mannitol transporter from celery, expressed in phloem cells, including phloem parenchyma cells. *Plant Physiol* 2007, **145**(1):62-74.
- Sauer N, Tanner W: The hexose carrier from *Chlorella*. cDNA cloning of a eucaryotic H⁺-cotransporter. *FEBS Lett* 1989, **259**(1):43-46.
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB: Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *Embo J* 1992, **11**(13):4705-4713.
- Johnson DA, Hill JP, Thomas MA: The monosaccharide transporter gene family in land plants is ancient and shows differential subfamily expression and expansion across lineages. *BMC Evol Biol* 2006, **6**:64.
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM: Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* 2002, **2**(2):183-201.
- Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thevenot P, Delrot S: Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiol* 2003, **131**(1):326-334.
- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R: A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 2003, **15**(9):2165-2180.
- Conde C, Agasse A, Glissant D, Tavares R, Geros H, Delrot S: Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. *Plant Physiol* 2006, **141**(4):1563-1577.
- Matsukura C, Saitoh T, Hirose T, Ohsugi R, Perata P, Yamaguchi J: Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. *Plant Physiol* 2000, **124**(1):85-93.
- Chiou TJ, Bush DR: Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**(8):4784-4788.
- Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR: Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**(16):10876-10880.
- Ransom-Hodgkins WD, Vaughn MW, Bush DR: Protein phosphorylation plays a key role in sucrose-mediated transcriptional regulation of a phloem-specific proton-sucrose symporter. *Planta* 2003, **217**(3):483-489.
- Sheen J, Zhou L, Jang JC: Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 1999, **2**(5):410-418.
- Delrot S, Atanassova R, Maurousset L: Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochim Biophys Acta* 2000, **1465**(1-2):281-306.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J: Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 2006, **57**:675-709.
- Ramon M, Rolland F, Sheen J: Sugar Sensing and Signaling. *The Arabidopsis Book* Rockville: American Society of Plant Biologists; 2008.
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, et al: The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 2007, **449**(7161):463-467.

30. Davies C, Wolf T, Robinson SP: **Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues.** *Plant Sci* 1999, **147**:93-100.
31. Ageorges A, Issaly N, Picaud S, Delrot S, Romieu C: **Identification and functional expression in yeast of a grape berry sucrose carrier.** *Plant Physiol Biochem* 2000, **38**(3):177-185.
32. Manning K, Davies C, Bowen HC, White PJ: **Functional characterization of two ripening-related sucrose transporters from grape berries.** *Ann Bot London* 2001, **87**:125-129.
33. Decourteix M, Alves G, Brunel N, Ameglio T, Guillio A, Lemoine R, Petel G, Sakr S: **JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.).** *Plant Cell Environ* 2006, **29**(1):36-47.
34. Decourteix M, Alves G, Bonhomme M, Peuch M, Ben Baaziz K, Brunel N, Guilliot A, Rageau R, Ameglio T, Petel G, et al: **Sucrose (JrSUT1) and hexose (JrHT1 and JrHT2) transporters in walnut xylem parenchyma cells: their potential role in early events of growth resumption.** *Tree Physiol* 2008, **28**(2):215-224.
35. Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thevenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S: **Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry.** *Plant Physiol* 1999, **120**(4):1083-1094.
36. Vignault C, Vachaud M, Cakir B, Glissant D, Dedaldechamp F, Buttner M, Atanassova R, Fleurat-Lessard P, Lemoine R, Delrot S: **VvHT1 encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem.** *J Exp Bot* 2005, **56**(415):1409-1418.
37. Hayes MA, Davies C, Dry IB: **Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues.** *J Exp Bot* 2007, **58**(8):1985-1997.
38. Gao Z, Mauroussel L, Lemoine R, Yoo SD, van Nocker S, Loescher W: **Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues.** *Plant Physiol* 2003, **131**(4):1566-1575.
39. Watari J, Kobae Y, Yamaki S, Yamada K, Toyofuku K, Tabuchi T, Shiratake K: **Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves.** *Plant Cell Physiol* 2004, **45**(8):1032-1041.
40. Conde C, Silva P, Agasse A, Lemoine R, Delrot S, Tavares R, Geros H: **Utilization and transport of mannitol in *Olea europaea* and implications for salt stress tolerance.** *Plant Cell Physiol* 2007, **48**(1):42-53.
41. Davies C, Robinson SP: **Sugar accumulation in grape berries. Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues.** *Plant Physiol* 1996, **111**(1):275-283.
42. Zhang YL, Meng Q, Zhu HL, Guo Y, Gao HY, Luo YB, Jiang L: **Functional characterization of a LAHC sucrose transporter isolated from grape berries in yeast.** *Plant Growth Regul* 2008, **54**:71-79.
43. Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N: **Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissues.** *Plant Physiol* 2004, **134**(2):684-693.
44. Wormit A, Trentmann O, Feifer I, Lohr C, Tjaden J, Meyer S, Schmidt U, Martinoia E, Neuhaus HE: **Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport.** *Plant Cell* 2006, **18**(12):3476-3490.
45. Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: **Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of three ERDs as HSP cognate genes.** *Plant Mol Biol* 1994, **25**(5):791-798.
46. Kiyosue T, Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: **ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of *Arabidopsis*, encodes a putative sugar transporter.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1370**(2):187-191.
47. Quirino BF, Reiter WD, Amasino RD: **One of two tandem *Arabidopsis* genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated.** *Plant Mol Biol* 2001, **46**(4):447-457.
48. Aluri S, Buttner M: **Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**(7):2537-2542.
49. Schneider S, Schneidereit A, Konrad KR, Hajirezaei MR, Gramann M, Hedrich R, Sauer N: ***Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER4 mediates high-affinity H⁺ symport of myoinositol across the plasma membrane.** *Plant Physiol* 2006, **141**(2):565-577.
50. Schneider S, Beyhl D, Hedrich R, Sauer N: **Functional and physiological characterization of *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER1, a novel tonoplast-localized transporter for myo-inositol.** *Plant Cell* 2008, **20**(4):1073-1087.
51. Trehin C, Ahn IO, Perennes C, Couteau F, Lalanne E, Bergounioux C: **Cloning of upstream sequences responsible for cell cycle regulation of the *Nicotiana glauca* CycB1;1 gene.** *Plant Mol Biol* 1997, **35**(5):667-672.
52. Grierson C, Du JS, de Torres Zabala M, Beggs K, Smith C, Holdsworth M, Bevan M: **Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene.** *Plant J* 1994, **5**(6):815-826.
53. Hattori T, Nakagawa S, Nakamura K: **High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown in vitro on sucrose medium.** *Plant Mol Biol* 1990, **14**(4):595-604.
54. Hwang YS, Karrer EE, Thomas BR, Chen L, Rodriguez RL: **Three cis-elements required for rice alpha-amylase Amy3 D expression during sugar starvation.** *Plant Mol Biol* 1998, **36**(3):331-341.
55. Morikami A, Matsunaga R, Tanaka Y, Suzuki S, Mano S, Nakamura K: **Two cis-acting regulatory elements are involved in the sucrose-inducible expression of the sporamin gene promoter from sweet potato in transgenic tobacco.** *Mol Genet Genomics* 2005, **272**(6):690-699.
56. Ishiguro S, Nakamura K: **The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots.** *Plant Mol Biol* 1992, **18**(1):97-108.
57. Ishiguro S, Nakamura K: **Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato.** *Mol Gen Genet* 1994, **244**(6):563-571.
58. Sun C, Palmqvist S, Olsson H, Boren M, Ahlandsberg S, Jansson C: **A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter.** *Plant Cell* 2003, **15**(9):2076-2092.
59. Acevedo-Hernandez GJ, Leon P, Herrera-Estrella LR: **Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4.** *Plant J* 2005, **43**(4):506-519.
60. Morita A, Umemura T, Kuroyanagi M, Futsuhara Y, Perata P, Yamaguchi J: **Functional dissection of a sugar-repressed alpha-amylase gene (RAMY1 A promoter in rice embryos.** *FEBS Lett* 1998, **423**(1):81-85.
61. Huang N, Sutliff TD, Litts JC, Rodriguez RL: **Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family.** *Plant Mol Biol* 1990, **14**(5):655-668.
62. Schneidereit A, Imlau A, Sauer N: **Conserved cis-regulatory elements for DNA-binding-with-one-finger and homeo-domain-leucine-zipper transcription factors regulate companion cell-specific expression of the *Arabidopsis thaliana* SUCROSE TRANSPORTER 2 gene.** *Planta* 2008, **228**(4):651-662.
63. Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JM, Murray JA: **Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(13):4513-4521.
64. Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt UG: **Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach.** *Plant Physiol* 2006, **141**(1):196-207.
65. Barth I, Meyer S, Sauer N: **PmSUC3: characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*.** *Plant Cell* 2003, **15**(6):1375-1385.
66. Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kuhn C: **Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways.** *Plant J* 2006, **45**(2):180-192.
67. Sauer N, Friedlander K, Graml-Wicke U: **Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*.** *Embo J* 1990, **9**(10):3045-3050.
68. Deluc LG, Grintple J, Wheatley MD, Tillett RL, Quilici DR, Osborne C, Schooley DA, Schlauch KA, Cushman JC, Cramer GR: **Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development.** *BMC Genomics* 2007, **8**:429.
69. Norholm MH, Nour-Eldin HH, Brodersen P, Mundy J, Halkier BA: **Expression of the *Arabidopsis* high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death.** *FEBS Lett* 2006, **580**(9):2381-2387.
70. Hayes MA, Feechan A, Dry IB: **Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5)**

- and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiol* 2010, **153**(1):211-221.
71. Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barrieu F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Leon C, Renaudin JP, et al: **Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development.** *Planta* 2005, **222**(5):832-847.
 72. Reinders A, Panshyshyn JA, Ward JM: **Analysis of transport activity of Arabidopsis sugar alcohol permease homolog AtPLT5.** *J Biol Chem* 2005, **280**(2):1594-1602.
 73. Klepek YS, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R, Sauer N: **Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺ symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose.** *Plant Cell* 2005, **17**(1):204-218.
 74. Klepek YS, Volke M, Konrad KR, Wippel K, Hoth S, Hedrich R, Sauer N: **Arabidopsis thaliana POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H⁺ symporters in pollen and young xylem cells.** *J Exp Bot* 2010, **61**(2):537-550.
 75. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(17):3389-3402.
 76. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, et al: **Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36** Web Server: W465-469.
 77. Edgar RC: **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(5):1792-1797.
 78. Guindon S, Gascuel O: **A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood.** *Syst Biol* 2003, **52**(5):696-704.
 79. Anisimova M, Gascuel O: **Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative.** *Syst Biol* 2006, **55**(4):539-552.
 80. Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Christen R: **TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees.** *BMC Bioinformatics* 2006, **7**:439.
 81. Gibeaut DM, Hulett J, Cramer GR, Seemann JR: **Maximal biomass of Arabidopsis thaliana using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions.** *Plant Physiol* 1997, **115**(2):317-319.
 82. Valtaud C, Foyer CH, Fleurat-Lessard P, Bourbonloux A: **Systemic effects on leaf glutathione metabolism and defence protein expression caused by esca infection in grapevines.** *Func Plant Biol* 2009, **36**:260-279.

doi:10.1186/1471-2229-10-245

Cite this article as: Afoufa-Bastien et al.: The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and microarray expression profiling. *BMC Plant Biology* 2010 **10**:245.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ADDITIONAL FILES

**The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview
and macroarray expression profiling**

Additional file 1 – Sucrose and Monosaccharide transporter genes identified in *Vitis vinifera* genome.
 Gene ID, attributed name, chromosomal position, gene length, number of introns and exons, ORF length, protein length, estimated protein molecular weight and pI, GenBank ID and reference are indicated when available. Genes written in italics are partial.

Vitis Proteome 8X ID	Name	Chr	Position	Gene (bp)	Intron	Exon	ORF (bp)	Prot AA	Prot kDa	Prot pI	GenBank ID	Reference
<i>VvSUC/VvSUT</i>												
GSVIVT00015035001	<i>VvSUC11/VvSUT1</i>	18	(-) 6597517 - 6607103	9587	4	5	1506	501	54.0	9.11	HQ323256	[30], [31]
GSVIVT00037013001 ^b	<i>VvSUC12</i>	1	(+) 2476369 - 2486447	10079	13	14	1818	606	64.9	6.49	HQ323257	[30]
GSVIVT00002302001	<i>VvSUC27</i>	Un	(+) 20463408 - 20465802	2395	3	4	1518	505	53.9	9.51	HQ323258	[30]
GSVIVT00002307001	<i>VvSUT2</i>	Un	(+) 20520485 - 20522864	2380	3	4	1521	506	54.1	8.14	HQ323259	
<i>VvHT</i>												
GSVIVT00004559001	<i>VvHT1</i>	Un	(+) 97905598 - 97908563	2966	3	4	1560	519	57.2	8.91	HQ323260	[35], [36]
GSVIVT00015239001	<i>VvHT2</i>	18	(+) 4309655 - 4315053	5399	3	4	1503	500	54.1	9.34	HQ323261	[35], [36]
GSVIVT00005628001	<i>VvHT3/VvHT7</i>	Un	(-) 33666349 - 33670069	3721	3	4	1581	526	57.1	8.68	HQ323262	[36], [37]
GSVIVT00030854001	<i>VvHT4</i>	Un	(+) 113352409 - 113355948	3540	2	3	1527	508	55.1	9.58	HQ323263	[37]
GSVIVT00019956001	<i>VvHT5</i>	5	(-) 4760129 - 4764785	4657	4	5	1611	536	58.9	8.68	HQ323264	[37]
GSVIVT00009747001	<i>VvHT8</i>	Un	(+) 64180804 - 64183768	2965	3	4	1560	519	57.2	8.91	HQ323265	
GSVIVT00038185001	<i>VvHT9</i>	14	(+) 11120535 - 11122564	2030	3	4	1569	522	57.8	8.84	HQ323266	
GSVIVT00038183001	<i>VvHT10</i>	14	(+) 11128172 - 11130189	2018	3	4	1569	522	57.6	8.69	HQ323267	
GSVIVT00038182001	<i>VvHT11</i>	14	(+) 11136404 - 11138838	2435	3	4	1608	535	59.0	9.57	HQ323268	
GSVIVT00019953001	<i>VvHT12</i>	5	(+) 4743399 - 4745342	1944	3	4	1521	506	56.1	9.28	HQ323269	
GSVIVT00016689001	<i>VvHT13</i>	11	(-) 2727346 - 2729634	2289	3	4	1539	512	56.3	9.06	HQ323270	
GSVIVT00025290001	<i>VvHT14</i>	9	(-) 13727720 - 13729869	2150	3	4	1521	506	56.0	8.85	HQ323271	
GSVIVT00028620001	<i>VvHT15</i>	13	(+) 12400674 - 12402822	2149	3	4	1521	506	56.0	8.75	HQ323272	
GSVIVT00028621001	<i>VvHT16</i>	13	(+) 12411681 - 12413829	2149	3	4	1521	506	56.0	8.85	HQ323273	
GSVIVT00028622001	<i>VvHT17</i>	13	(+) 12421262 - 12423413	2152	3	4	1521	506	55.9	9.46	HQ323274	
GSVIVT00028624001	<i>VvHT18</i>	13	(+) 12433785 - 12435932	2148	3	4	1521	506	55.9	8.85	HQ323275	
GSVIVT00028634001	<i>VvHT19</i>	13	(+) 12502337 - 12504485	2149	3	4	1521	506	55.9	8.64	HQ323276	
<i>GSVIVT00028629001^a</i>	<i>VvHT20</i>	13	(+) 12466333 - 12467430	1098	2	3	576	191			<i>HQ323277</i>	
<i>GSVIVT00028630001^a</i>	<i>VvHT21</i>	13	(+) 12467740 - 12468481	742	1	2	636	211			<i>HQ323278</i>	
<i>GSVIVT00028635001^{bc}</i>	<i>VvHT22</i>	13	(+) 12514643 - 12515322	680	1	1	639	209			<i>HQ323279</i>	
<i>GSVIVT00028636001^{bd}</i>	<i>VvHT23</i>	13	(+) 12516175 - 12517100	926	1	2	801	266			<i>HQ323280</i>	
<i>GSVIVT00013228001^e</i>	<i>VvHT24</i>	Un	(-) 152564138 - 152564842	705	1	2	455	147			<i>HQ323281</i>	
<i>VvTMT</i>												
GSVIVT00002919001	<i>VvTMT1/VvHT6</i>	18	(+) 593142 - 598663	5522	4	5	2223	740	79.4	4.78	HQ323282	[36]
GSVIVT00036283001 ^b	<i>VvTMT2</i>	3	(-) 2853987 - 2859495	5509	4	5	2220	740	79.2	5.15	HQ323283	
GSVIVT00019321001	<i>VvTMT3</i>	7	(-) 13510057 - 13514684	4628	4	5	2229	742	80.1	5.07	HQ323284	
<i>VvPMT</i>												
GSVIVT00010278001	<i>VvPMT1</i>	Un	(-) 63357751 - 63360120	2370	1	2	1569	522	55.6	7.51	HQ323285	
GSVIVT00016743001	<i>VvPMT2</i>	11	(+) 3153566 - 3155163	1598	1	2	1503	500	53.7	7.59	HQ323286	
GSVIVT00024964001	<i>VvPMT3</i>	4	(+) 12877974 - 12879707	1734	1	2	1494	497	53.4	9.28	HQ323287	
GSVIVT00025836001	<i>VvPMT4</i>	12	(+) 7679763 - 7681888	2126	1	2	1581	526	56.5	5.73	HQ323288	
GSVIVT00036419001	<i>VvPMT5</i>	3	(-) 3940283 - 3942288	2006	1	2	1587	528	57.1	8.67	HQ323289	

Additional file 1 – Sucrose and Monosaccharide transporter genes identified in *Vitis vinifera* genome.
Gene ID, attributed name, chromosomal position, gene length, number of introns and exons, ORF length, protein length, estimated protein molecular weight and pI, GenBank ID and reference are indicated when available. Genes written in italics are partial.

Vitis Proteome 8X ID	Name	Chr	Position	Gene (bp)	Intron	Exon	ORF (bp)	Prot AA	Prot kDa	Prot Pi	GenBank ID	Reference
<i>VvERD6-Like</i>												
GSVIVT00006081001		14	(-) 3917392 - 3921442	4051	17	18	1467	488	52.0	5.43	HQ323290	
GSVIVT00006082001		14	(-) 3922070 - 3927376	5307	17	18	1467	488	52.1	5.13	HQ323291	
<i>GSVIVT00006083001^{bg}</i>		<i>14</i>	<i>(-) 3941248 - 3943374</i>	<i>2127</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>720</i>	<i>240</i>			<i>HQ323292</i>	
GSVIVT00006084001 ^b		14	(-) 3947751 - 3955780	8030	17	18	1464	488	53.1	5.68	HQ323293	
GSVIVT00006086001		14	(-) 3969569 - 3973251	3683	17	18	1428	475	51.4	5.03	HQ323294	
GSVIVT00006087001		14	(-) 3974128 - 3978856	4729	17	18	1434	477	51.3	5.42	HQ323295	
GSVIVT00006088001		14	(-) 3981155 - 3985282	4128	17	18	1470	489	52.3	5.41	HQ323296	
GSVIVT00006090001		14	(-) 3992915 - 3997055	4141	16	17	1452	483	52.3	5.59	HQ323297	
<i>GSVIVT00006094001^f</i>		<i>14</i>	<i>(-) 4025915 - 4027430</i>	<i>1516</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>351</i>	<i>116</i>			<i>HQ323298</i>	
GSVIVT00006096001		14	(-) 4033585 - 4037683	4099	16	17	1452	483	52.6	5.80	HQ323299	
GSVIVT00006097001 ^b		14	(-) 4039757 - 4044440	4684	16	17	1296	431	47.9	5.98	HQ323300	
GSVIVT00006098001		14	(-) 4048971 - 4053915	4945	17	18	1473	490	52.6	5.02	HQ323301	
GSVIVT00006099001		14	(-) 4054745 - 4059458	4714	17	18	1425	474	51.2	7.30	HQ323302	
GSVIVT00006100001		14	(-) 4063818 - 4068605	4788	16	17	1422	473	51.4	7.14	HQ323303	
GSVIVT00014605001		18	(-) 10622720 - 10627729	5010	16	17	1419	472	51.1	8.51	HQ323304	
GSVIVT00019852001		5	(+) 3809382 - 3812501	3120	17	18	1317	438	47.0	8.26	HQ323305	
GSVIVT00019859001		5	(+) 3875707 - 3879134	3428	17	18	1467	488	53.5	6.46	HQ323306	
GSVIVT00019860001		5	(+) 3885752 - 3891653	5902	17	18	1467	488	53.4	6.26	HQ323307	
GSVIVT00023634001		7	(-) 2341086 - 2345987	4902	17	18	1473	490	52.6	5.44	HQ323308	
GSVIVT00024920001		4	(-) 13255030 - 13262040	7011	17	18	1461	486	52.6	8.22	HQ323309	
GSVIVT00035473001 ^f		12	(-) 17377258 - 17379290	2033	9	10	858				HQ323310	
GSVIVT00035474001 ^f		12	(-) 17367461 - 17371484	4024	14	15	933				HQ323311	
<i>VvVGT</i>												
GSVIVT00014041001 ^{bd}	<i>VvVGT1</i>	16	(-) 2220975 - 2228079	7105	11	12	1363	453	48.1	7.68	HQ323312	
GSVIVT00024269001	<i>VvVGT2</i>	6	(-) 6070317 - 6074777	4461	13	14	1686	561	60.1	7.94	HQ323313	
<i>VvINT</i>												
GSVIVT00001923001	<i>VvINT1</i>	5	(-) 20201875 - 20234788	32914	5	6	1500	499	53.3	5.25	HQ323314	
GSVIVT00028332001	<i>VvINT2</i>	10	(-) 3525662 - 3529939	4278	5	6	1734	577	63.0	7.97	HQ323315	
GSVIVT00012471001	<i>VvINT3</i>	Un	(-) 78691247 - 78698710	7464	5	6	1758	585	63.1	8.27	HQ323316	
<i>VvpGlcT</i>												
GSVIVT00025939001 ^f		12	(-) 6629242 - 6635937	6696	10	11	1320	439	47.8	5.35	HQ323317	
GSVIVT00016716001		11	(-) 2943941 - 2953717	9777	12	13	1467	488	52.5	8.10	HQ323318	
GSVIVT00034389001		9	(+) 3962829 - 3970463	7635	11	12	1488	495	53.4	7.00	HQ323319	
GSVIVT00038247001	<i>VvpGIT</i>	14	(-) 9924542 - 9932555	8014	12	13	1560	519	55.1	9.36	HQ323320	[20], [36]

^a: both ID might represent a single gene; ^b: modified annotation compared to Genoscope annotation

^c: partial ORF with 5' and 3'-ends not sequenced

^d: partial ORF with 5'-end not sequenced; ^e: partial ORF with 3'-end not sequenced

^f: partial ORF with 5'-term not clearly identified; ^g: partial ORF with 3'-end not clearly identified

Additional file 2 – Sucrose and Monosaccharide transporter genes promoter sequences identified in *Vitis vinifera* genome.

Gene ID, attributed name, chromosomal position and promoter length are indicated.

Vitis Proteome 8X ID	Names	Chr	Position	Length
<i>VvSUC/VvSUT</i>				
GSVIVT00015035001	<i>VvSUC11/VvSUT1</i>	18	(-) 6609103 - 6607104	1997
GSVIVT00037013001	<i>VvSUC12</i>	1	(+) 2474369 - 2476479	2108
GSVIVT00002302001	<i>VvSUC27</i>	Un	(+) 20461408 - 20463407	1997
GSVIVT00002307001	<i>VvSUT2</i>	Un	(+) 20518485 - 20520484	1997
<i>VvHT</i>				
GSVIVT00004559001	<i>VvHT1</i>	Un	(+) 97903598 - 97905752	2152
GSVIVT00015239001	<i>VvHT2</i>	18	(+) 4307655 - 4309798	2141
GSVIVT00005628001	<i>VvHT3/VvHT7</i>	Un	(-) 33672069 - 33669956	2111
GSVIVT00030854001	<i>VvHT4</i>	Un	(+) 113350409 - 113352408	1997
GSVIVT00019956001	<i>VvHT5</i>	5	(-) 4766785 - 4764786	1997
GSVIVT00009747001	<i>VvHT8</i>	Un	(+) 64178804 - 64180958	2152
GSVIVT00038185001	<i>VvHT9</i>	14	(+) 11118535 - 11120534	1997
GSVIVT00038183001	<i>VvHT10</i>	14	(+) 11126172 - 11128171	1997
GSVIVT00038182001	<i>VvHT11</i>	14	(+) 11134404 - 11136403	1997
GSVIVT00019953001	<i>VvHT12</i>	5	(+) 4741399 - 4743398	1997
GSVIVT00016689001	<i>VvHT13</i>	11	(-) 2731634 - 2729635	1997
GSVIVT00025290001	<i>VvHT14</i>	9	(-) 13731327 - 13729870	1455
GSVIVT00028620001	<i>VvHT15</i>	13	(+) 12398674 - 12400673	1997
GSVIVT00028621001	<i>VvHT16</i>	13	(+) 12409681 - 12411680	1997
GSVIVT00028622001	<i>VvHT17</i>	13	(+) 12419262 - 12421261	1997
GSVIVT00028624001	<i>VvHT18</i>	13	(+) 12431785 - 12433784	1997
GSVIVT00028634001	<i>VvHT19</i>	13	(+) 12500337 - 12502335	1997
<i>VvTMT</i>				
GSVIVT00002919001	<i>VvTMT1/VvHT6</i>	18	(+) 591820 - 593819	1997
GSVIVT00036283001	<i>VvTMT2</i>	3	(-) 2861495 - 2859490	1997
GSVIVT00019321001	<i>VvTMT3</i>	7	(-) 13516306 - 13514679	1619
<i>VvPMT</i>				
GSVIVT00010278001	<i>VvPMT1</i>	Un	(-) 63362120 - 63360121	1997
GSVIVT00016743001	<i>VvPMT2</i>	11	(+) 3152940 - 3153565	623
GSVIVT00024964001	<i>VvPMT3</i>	4	(+) 12875974 - 12877973	1997
GSVIVT00025836001	<i>VvPMT4</i>	12	(+) 7677763 - 7679762	1997
GSVIVT00036419001	<i>VvPMT5</i>	3	(-) 3944228 - 3942229	1997

Additional file 3 –Cis-acting elements potentially involved in sugar-regulated transcription identified in the *VvSUC/VvSUT*, *VvHT*, *VvTMT* and *VvPMT* promoter sequences.

Promoter sequence analysis was performed *via* PLACE. *Cis*-element names, sequence motifs, signalling pathways and the number of copies for each element are presented for each promoter. x(xx): number of motif types (total number of identified motifs). *i*) Elements for sugar responsiveness. *ii*) Elements for sugar and hormonal signals perception.

<i>Cis</i> -element name	Sequence	Response	SUC11 8(14)	SUC12 6(18)	SUC27 5(9)	SUT2 8(10)	HT1 9(23)	HT2 6(17)	HT3 6(19)	HT4 5(17)	HT5 7(14)	HT8 9(22)	HT9 5(10)	HT10 5(10)	HT11 6(14)	HT12 6(14)	HT13 5(16)	HT14 5(12)	HT15 5(12)	HT16 5(12)	HT17 6(12)	HT18 5(13)	HT19 5(13)	TMT1 5(11)	TMT2 5(6)	TMT3 7(14)	PMT1 5(12)	PMT2 3(3)	PMT3 4(6)	PMT4 6(9)	PMT5 7(15)	
<i>i</i>) SURE1STPAT21	AATAGAAA	sucrose induction	2			1	2			2		2			2	2		2	1					1		1						1
<i>i</i>) SURE2STPAT21	AATACTAAT	sucrose, root	1		1																											
<i>i</i>) SUCROSE BOX 3	AAATCA...AA	sucrose induction	1	2	2	3	2	2	3	1	2	2	2	2	3	1	3	1		3	3	2	1		1	1	2		1	1	4	
<i>i</i>) CGACGOSAMY3	CGACG	sucrose starvation					1		1		2	1			1																	
<i>i</i>) CMSREIIBSPOA	TGACGG	sucrose induction						1			1															1						
<i>i</i>) SP8BFIBSP8BIB	TACTATT	sucrose induction	2		1	1		2					3	3				1	1		1	1	1		1						2	
<i>i</i>) WBOXHVIS01	TGACT	Sugar, SUSIBA2	2	7	3	1	8	9	5	4	3	8	2	2	4	4	5	4	4	2	2	2	2	3	2	2	6	1	3	2	3	
<i>ii</i>) SBOXATRBCS	CACCTCCA	Sugar, ABA, ABI4					2					1			1																	
<i>ii</i>) MYBGHIV	TAACAAA	GA, sugar repression	2	3		1																		1	1		1	1		1	1	
<i>ii</i>) AMYBOX1	TAACARA	sugar, ABA, GA	2	4		1	1	1				1	2	2		2			1	1			1	2	1	1			2	1		
<i>ii</i>) AMYBOX2	TATCCAT	sugar, ABA, GA					2		3		1	2				2			1	3	2						1	1				
<i>ii</i>) PYRIMIDINEBOXHVEPB1	TTTTTCC	GA, ABA, sugar, seeds		1		1	1		1	1	2	1				2	2		1	2						2						
<i>ii</i>) PYRIMIDINEBOXSRAMY1A	CCTTTT	Sugar repression, seeds	2	1	2	1	4	2	6	9	3	4	1	1	3	3	4	4	5	4	4	5	6	6	1	5	2		1	2	3	

- Found only in *VvSUC/VvSUT*
- Found in all promoters except *VvHT15*, *VvTMT1* and *VvPMT2*
- Found only in some *VvHT* promoters
- Found only in *VvHT2*, *VvHT5*, *VvTMT3*
- Not found in *VvHT*
- Putative GARC complex

Additional file 4 – Oligonucleotide primers used to amplify specific 3'UTR of sugar transporter and reference genes.

Gene name, oligonucleotide sequences and length of the amplified cDNA fragments are indicated.

Gene	Primers (5' - 3')	Amplicon (pb)
<i>VvSUC11</i>	F : CCA TGG GAT CAA CTT TTT G R : CAT TTT ACC ACC CAT ATT GAT	191
<i>VvSUC12</i>	F : GGA TGC TTT ATT TGG TGG A R : AGC ACA AGG CAT CAA AGC	396
<i>VvSUC27</i>	F : TGT AGT GGG TGC GTT TGC R : GAT GAC CGT GGG CTC TAC A	369
<i>VvSUT2</i>	F : CTG AAT CGA AGA GTT GGA G R : CTT GTC TCA GCA CTT GGC	326
<i>VvHT1</i>	F : TCA ACG ATG GTT CTT ACA GC R : AAC CGA TAG TAT TGT ATT CG	262
<i>VvHT2</i>	F : GCG GTG TTG GTA CTG GTA C R : GGA CTT GAG AAG GAA TTT AGC	371
<i>VvHT3</i>	F : CAC TTG GGT GGA CAG TTC C R : GGA TTA TTT GAA GTT CAC CGA	400
<i>VvHT4</i>	F : ATT CGT GTA TTA TTT GCT GC R : CGG GCA ATT TAC GAT CAT	333
<i>VvHT5</i>	F : GGT GTG GAA GAA GCA TTG G R : GGC ACA AGA ACA CAT ATA C	323
<i>VvHT11</i>	F : GGA AAG GCA ACC CAA AGT G R : CTA TTT ATT GTA ATT TGA ATG C	187
<i>VvHT12</i>	F : AGA TGA GCT AGT GGC ACA AC R : AGA TAT CAT GGT GGA TGG	224
<i>VvHT13</i>	F : GGA CTA CTC TAT TGA AAT CC R : GGA AAT TCT TTG TTT ATA CTG C	139
<i>VvTMT1</i>	F : TGA CTG AAT GCG GGG GAA GC R : GTG TGG ATA TTT TGA TGG TCG	109
<i>VvTMT2</i>	F : TTT CGA TTC AGA TGC TCC R : CAT CAG AGA GCC CCT GAA AG	240
<i>VvTMT3</i>	F : CAT CCT GGA ACT GCC GGG R : CAT CAA AGA ATG CTG AGC	230
<i>VvPMT1</i>	F : AGC GTG CTT ATG CTG AAC CAC R : AGG GCT AGA GAC AAA CTA TAA	332
<i>VvPMT2</i>	F : AAC CCT TAC TTA CCG ATA G R : GGG ATC GAC GGA CAC CTG ATA	308
<i>VvPMT3</i>	F : CGT TTT ATA CTG GTT TAT TG R : AGT GAA GCC GCA TAT GCT	310
<i>VvPMT4</i>	F : AAG TTT CAT TTT ATG AGC TAA R : GCC AGT GAC TGG AAC AGC CAG	243
<i>VvPMT5</i>	F : AGA AGA AGT CAT GTA CTA AC R : TTC ATT CCA TAT TCA GCC CC	222
<i>VvEF1α</i>	F : GAA CTG GGT GCT TGA TAG GC R : AAC CAA AAT ATC CGG AGT AAA AGA	168
<i>VvEF1γ</i>	F : AGC TTT TAC CGC GGG CAA GAG ATA CC R : TTT GGA TAG GTA ACG TAT CAC TTA AAT AAC	318
<i>VvGAPDH</i>	F : CGA CCA TTG TTA CTG CTG T R : GAA ATC CAG GGG CAA AAC	377
<i>VvActin</i>	F : AGC TGG AAA CTG CAA AGA GCA G R : ACA ACG GAA TCT CTC AGC TCC A	95

Tableau 22 : Pourcentages d'homologie entre les invertases et les fructane exohydrolases d'*Arabidopsis thaliana*. Les différentes séquences protéiques sont issues de la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Les pourcentages d'homologie ont été calculés par le logiciel Lasergene (Megalign, DNASTAR, USA) après un alignement multiple des séquences protéiques (Clustal W). AtcwINV1 (X74514), AtcwINV2 (U11033), AtcwINV3 (AB029310), AtcwINV4 (AB049617), AtcwINV5 (AP001307) et AtcwINV6 (AY060553). ^a : invertase caractérisée, ^b : fructane exohydrolases caractérisées.

	<i>AtcwINV1</i> ^a	<i>AtcwINV2</i>	<i>AtcwINV3</i> ^b	<i>AtcwINV4</i>	<i>AtcwINV5</i>	<i>AtcwINV6</i> ^b
<i>AtcwINV1</i> ^a		53,6	69,7	51,1	68,3	51,7
<i>AtcwINV2</i>			51,0	76,3	49,9	47,2
<i>AtcwINV3</i> ^b				51,9	67,6	52,5
<i>AtcwINV4</i>					49,2	47,7
<i>AtcwINV5</i>						49,1
<i>AtcwINV6</i> ^b						

Tableau 23 : Séquences identifiées par Blastp de la séquence protéique VvcwINV1 sur le protéome de la vigne. La séquence protéique de VvcwINV1 (X74514) a été blastée sur le protéome (8X) de la vigne disponible sur le site du Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr>).

Accession	E value	Chr.	Position sur le chromosome	Nombre d'exons	Nombre d'introns	ORF (pb)	Protéine (AA)	Nom
GSVIVP00034185001	0,0	9	2103334 - 2107257	6	6	1728	575	VvcwINV1
GSVIVP00021585001	0,0	8	16034545 - 16037773	7	6	1719	572	VvcwINV2
GSVIVP00032195001	0,0	4	943556 - 946595	7	6	1698	565	VvcwINV3
GSVIVP00032196001	0,0	4	947775 - 950632	8	7	1692	563	VvcwINV4
GSVIVP00029907001	e-149	Un	114513529 - 114518023	6	5	1941	646	VvGIN1
GSVIVP00004764001	e-133	Un	143168483 - 143172097	7	6	1614	537	VvGIN2

2. Les invertases chez la vigne : Identification et profil d'expression

2.1. Identification de séquences codantes pour des invertases pariétales

Au début de ce travail (début 2007), seules trois invertases potentielles étaient répertoriées chez la vigne : deux invertases vacuolaires (VvGINs) et une invertase pariétale (VvcwINV) (Davies and Robinson, 1996 ; Hayes *et al.*, 2007). Afin d'identifier d'autres invertases potentielles, une analyse à l'aide du logiciel Blastp a été effectuée sur le protéome 8X (PN 40024, 8X) de la vigne en utilisant la séquence protéique de l'invertase VvcwINV de vigne ainsi que les six séquences d'invertases pariétales identifiées chez *Arabidopsis* (Sherson *et al.*, 2003). Bien qu'en réalité AtcwINV3 et AtcwINV6 aient été caractérisées comme des fructane exohydrolases (FEHs) (Coninck *et al.*, 2005), les séquences protéiques de ces deux enzymes sont cependant très proches de celles des invertases. En effet, AtcwINV3 présente ~70% de similarité avec AtcwINV1 et 67,6% avec AtcwINV5 (Tableau 22), alors qu'elle ne présente que 52,5% de similarité avec AtcwINV6. Ainsi, il apparaît très difficile, à partir d'une séquence protéique, de définir si une enzyme appartient à la famille des invertases ou à celle des FEHs. Les séquences d'AtcwINV3 et 6 ont donc également été utilisées pour la recherche d'invertases putatives chez la vigne.

Utilisant dans un premier temps la séquence VvcwINV, notre analyse a permis d'identifier quatre séquences ayant une forte similarité avec VvcwINV et deux autres avec une similarité plus faible (Tableau 23). Une recherche similaire avec les 6 séquences d'*Arabidopsis* (AtcwINV1-6) n'a pas abouti à l'identification de séquences d'invertases autres que les six déjà identifiées à l'aide de la séquence de vigne. Un alignement des six séquences obtenues avec les trois publiées chez la vigne a permis d'identifier que la première protéine GSVIVP00034185001 ainsi que les deux protéines moins similaires GSVIVP00029907001 et GSVIVG00004764001 correspondent respectivement à VvcwINV, VvGIN1 et VvGIN2 (similarité de 96,5%, 97,2% et 99,4% respectivement). Les trois autres séquences similaires à VvcwINV ont donc été nommées VvcwINV2, VvcwINV3 et VvcwINV4. Par commodité, VvcwINV a été renommée VvcwINV1 (Tableau 23).

Afin de prédire la fonction potentielle des protéines de vigne, leurs séquences ont été alignées avec celles d'*Arabidopsis*. Cependant l'arbre phylogénétique obtenu (Figure 116) ainsi que le calcul des pourcentages de similarité entre les différentes séquences (Tableau 24)

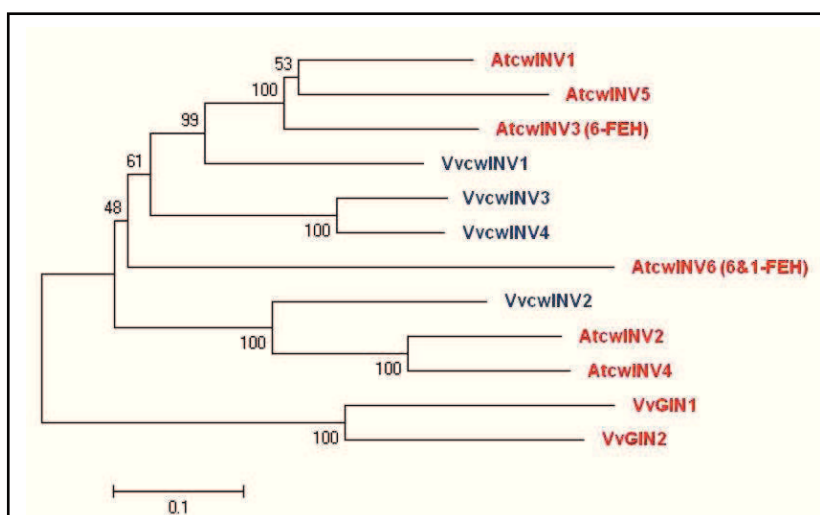


Figure 116 : Arbre phylogénétique des séquences protéiques d’invertases et FEH chez la vigne et *Arabidopsis*. L’arbre (Neighbor Joining, bootstrap : 500 répétitions) a été généré après un alignement multiple (Clustal W) des séquences protéiques dans le programme MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Les numéros d’accèsion des séquences d’*Arabidopsis* sont indiqués dans la légende du tableau 22, ceux des séquences de vigne sont listés dans le tableau 23.

Tableau 24 : Pourcentages d’homologie entre les invertases et fructane exohydrolases de vigne et d’*Arabidopsis*. Les pourcentages d’homologie ont été calculés par le logiciel Lasergene (Megalign, DNASTAR, USA) après un alignement multiple des séquences protéiques (Clustal W). Les numéros d’accèsion des séquences d’*Arabidopsis* sont indiqués dans la légende du tableau 22, ceux des séquences de vigne sont listés dans le tableau 23. ^a : invertase caractérisée, ^b : fructane exohydrolases caractérisées.

	<i>VvcwINV1</i>	<i>VvcwINV2</i>	<i>VvcwINV3</i>	<i>VvcwINV4</i>	<i>VvGIN1</i>	<i>VvGIN2</i>
<i>AtcwINV1</i> ^a	66,7	54,4	58,1	58,1	54,1	42,6
<i>AtcwINV2</i>	50,5	64,0	49,1	48,7	43,5	40,5
<i>AtcwINV3</i> ^b	63,9	53,3	56,8	56,4	44,1	43,2
<i>AtcwINV4</i>	50,6	63,3	50,3	49,7	42,9	39,4
<i>AtcwINV5</i>	60,6	50,4	54,7	52,4	43,3	40,4
<i>AtcwINV6</i> ^b	51,6	49,4	52,3	52,9	43,4	40,1

Tableau 25 : Pourcentages d’homologie entre les séquences d’invertases de vigne. Les pourcentages d’homologie ont été calculés par le logiciel Lasergene (Megalign, DNASTAR, USA) après un alignement multiple des séquences protéiques (Clustal W). Les numéros d’accèsion des séquences sont listés dans le tableau 23.

	<i>VvcwINV1</i>	<i>VvcwINV2</i>	<i>VvcwINV3</i>	<i>VvcwINV4</i>	<i>VvGIN1</i>	<i>VvGIN2</i>
<i>VvcwINV1</i>		56,5	60,6	62,6	43,8	47,9
<i>VvcwINV2</i>			55,7	54,2	41,6	46,1
<i>VvcwINV3</i>				81,9	44,6	46,9
<i>VvcwINV4</i>					45,1	47,9
<i>VvGIN1</i>						66,2
<i>VvGIN2</i>						

n'ont pas permis la formation de couples d'orthologues entre les deux espèces ni de prédire la fonction possible des protéines de vigne en tant qu'invertase ou fructane exohydrolase (FEH). VvcwINV1 révèle en effet une similarité comparable avec l'invertase AtcwINV1 (~67%) et la FEH AtcwINV3 (~64%). Cette observation est également faite avec VvcwINV3 et VvcwINV4 qui présentent toutes deux, dans une moindre mesure, une similarité avec AtcwINV1 (~58%) et AtcwINV3 (~56%). VvcwINV2 quant à elle, apparaît proche d'AtcwINV2 (64%) et AtcwINV4 (63%). Concernant les séquences d'invertases vacuolaires VvGIN1 et 2, celles-ci ne présentent, comme suspecté, qu'une faible similarité avec les séquences d'invertases pariétales et de FEH d'*Arabidopsis* (43% en moyenne).

Comparées entre elles, les séquences de vigne correspondant aux invertases pariétales ont une similarité moyenne d'environ 62%, les deux séquences les plus proches étant VvcwINV3 et VvcwINV4 (81,9%) (Tableau 25). VvcwINV1 montre la plus forte similarité avec VvcwINV4 (62,6%) alors que VvcwINV2 présente une plus faible similarité avec les trois autres séquences (autour de 55,5%). Comme précédemment observée, les séquences VvGIN1 et 2, respectivement proches (66,2%), sont peu similaires aux autres séquences d'invertases pariétales (45,5% en moyenne).

Ainsi, la recherche chez la vigne de séquences pouvant correspondre à des invertases pariétales a abouti à l'identification de trois nouvelles séquences VvcwINV2, 3 et 4 en plus des trois précédemment répertoriées VvcwINV1, VvGIN1 et VvGIN2. La fonction de ces différentes protéines n'ayant pas été caractérisée, leur appartenance potentielle à la famille des FEHs plutôt qu'à celle des invertases n'a pu être déterminée. Cependant, des sondes 3'UTR ont été définies pour ces six invertases afin d'étudier leur expression en condition de contraintes biotiques, parallèlement à celle des gènes de transporteurs de sucres.

2.2. Expression des gènes VvcwINVs et VvGINs dans différents organes de la vigne au cours du développement.

2.2.1. Expression dans les organes végétatifs

L'avantage du système aéroponique pour la culture des vignes est qu'il permet d'une part une bonne croissance des plantes (production de matériel végétal non limitante), et donne d'autre part un accès facile aux différents organes. Contrairement à la culture en pot (terre) ou en système *in vitro*, il permet également une importante croissance racinaire sans « asphyxie »

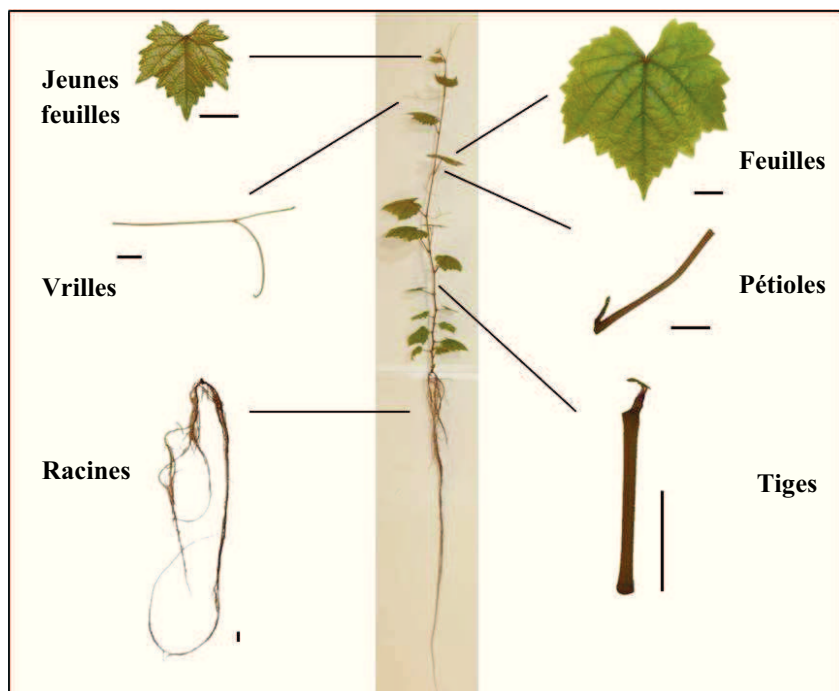


Figure 117 : Prélèvement des organes végétatifs de vignes cultivées en aéroponie. Les plants de vignes cv Chardonnay ont été cultivés en système aéroponique. Après 21 jours de croissance, les organes végétatifs de 20 plantes ont été prélevés afin d'en extraire les ARNs et analyser l'expression des différents gènes de transporteurs de sucres et d'invertases. (Trait : 1 cm)

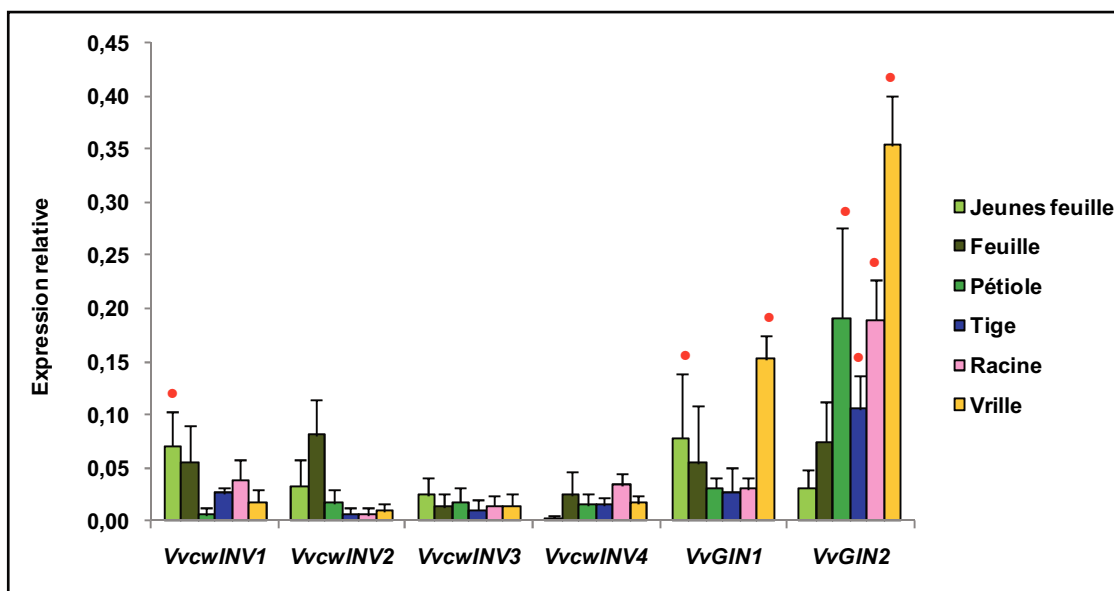


Figure 118 : Expression des gènes codant pour des invertases dans les différents organes végétatifs de la vigne. L'analyse de l'expression des différents gènes a été effectuée par macroarray. Les ARNs ont été isolés à partir des organes végétatifs de 20 plantes. Les niveaux d'expression de chaque gène ont été normalisés par rapport à l'expression moyenne des quatre gènes de référence *VvACT*, *VvEF1a*, *VvEF1γ* et *VvGAPDH*. Chaque valeur représente la moyenne de deux répétitions biologiques indépendantes. Les points rouges indiquent une valeur d'expression supérieure à la moyenne d'expression de l'ensemble des gènes dans chaque organe.

et évite les étapes de lavage des racines qui peuvent être à l'origine de blessures des tissus pouvant induire la transcription de certains gènes. Au terme de 21 jours de culture aéronique, des vignes de 75 cm en moyenne ont été obtenues, et les différents organes végétatifs tels que les feuilles, les tiges, les pétioles, les vrilles et les racines ont été prélevés (Fig. 117). Les deux à trois premières feuilles de l'apex ont été considérées comme « jeunes feuilles », les feuilles du deuxième tiers central comme « feuilles » et les cinq à six feuilles de la base n'ont pas été prélevées.

L'étude de l'expression des différents gènes codants pour des invertases a été effectuée par macroarray. Comme précédemment évoqué dans ce chapitre (§ I.), les valeurs d'expression de chaque gène ont été normalisées par la moyenne des valeurs obtenues pour les quatre gènes de référence *VvACT*, *VvEF1 α* , *VvEF1 γ* et *VvGAPDH*. Sur l'ensemble des organes testés, *VvcwINV3* et *VvcwINV4* révèlent un niveau d'expression relativement faible par rapport aux autres gènes d'invertases (Fig. 118). Ces deux gènes semblent en effet très peu exprimés quelque soit l'organe testé. *VvcwINV1* et *VvcwINV2* sont majoritairement exprimés dans les feuilles notamment dans les jeunes feuilles (organes puits). *VvcwINV1* présente aussi, contrairement à *VvcwINV2*, une légère expression dans la tige et les racines. L'analyse de l'expression de *VvGIN1* et *VvGIN2*, semble montrer un niveau d'expression proche de celui de *VvcwINV1* et *VvcwINV2* dans les feuilles, alors qu'ils sont relativement plus exprimés dans les autres organes, notamment les vrilles où les transcrits sont les plus abondants. Mise à part dans les feuilles, *VvGIN1* reste cependant moins exprimé que *VvGIN2* qui présente un niveau d'expression élevé dans tous les autres organes. Ces résultats indiquent donc une co-expression des gènes d'invertases pariétales et vacuolaires dans les feuilles de vigne avec une expression plus spécifique de *VvcwINV1* et *VvGIN1* dans les jeunes feuilles, celle de *VvcwINV2* et *VvGIN2* étant plus sensiblement localisée dans les feuilles matures. Au sein des autres organes végétatifs, la faible expression des *VvcwINVs* parallèlement à la forte expression de *VvGIN2* laisse supposer que l'hydrolyse du saccharose est localisée à l'intérieur de la vacuole.

2.2.2. Expression dans les baies en maturation et les pépins

L'expression des différents gènes codants pour des invertases a été analysée dans des baies de Chardonnay prélevées au vignoble au cours de différents stades de développement. Le premier stade prélevé correspond à la nouaison, qui suit la fécondation, (2 semaines après la floraison = SAF) et pour lequel les baies ont un diamètre compris entre 1 et 8 mm en

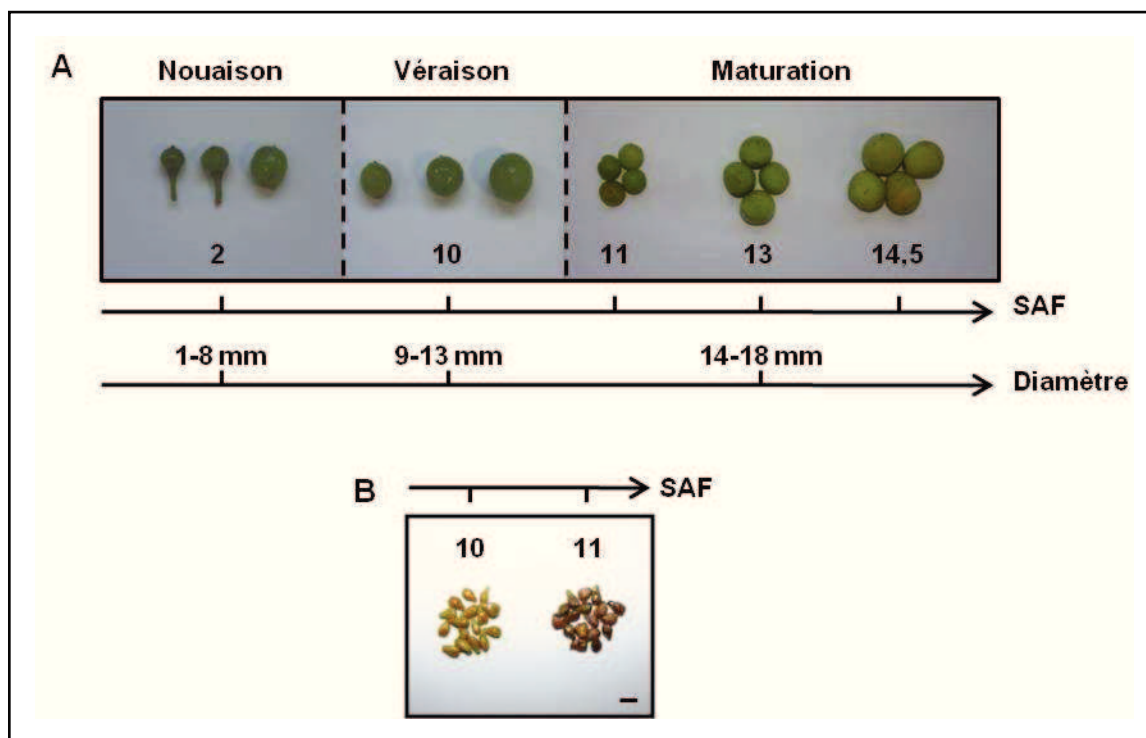


Figure 119 : Aspect et stades développementaux des baies et pépins de raisin utilisés lors de l'étude. Des baies de Chardonnay ont été prélevées au vignoble au stade « nouaison » (2 SAF), « véraison » (10 SAF), « maturation » (11 et 13 SAF) et « vendange » (14,5 SAF). Les baies ont été épépinées avant l'extraction des ARNs par la méthode de Chang *et al.* (1993). **A.** Aspect et diamètre des baies. **B.** Aspect des pépins (Trait : 0,5 cm)

moyenne et une couleur vert vif (Fig. 119 A). Le second prélèvement a été effectué à la mi-véraison (10 SAF) alors que la balance acides/sucres s'inverse au sein des baies au profit des sucres. Les baies ont alors un diamètre compris entre 9 et 13 mm et commencent à s'éclaircir. Les baies des deux derniers prélèvements utilisés ont été récoltées au cours de la maturation à 11 et 13 SAF, soit 10 jours avant les vendanges. A ce stade, les baies ont alors une couleur plus claire et un diamètre entre 14 et 18 mm ; elles sont molles et complètement vairées bien que les vendanges soient poussées jusqu'à environ 14,5 SAF. Le stade « vendanges » n'a cependant pas été analysé lors de cette étude.

Avant l'extraction des ARNs, les baies ont été épépinées excepté au stade nouaison pour lequel les baies et les pépins ne sont pas suffisamment développés pour être séparés. Le terme « baies » employé dans la suite de ce chapitre correspond donc à des baies épépinées (pulpe + pellicule) sauf pour le premier stade. A la mi-véraison, les pépins développés sont encore relativement mous et de couleur beige clair (Fig. 119 B). Au cours de la maturation, ils deviennent marron et durcissent. Parallèlement à l'utilisation des baies, l'étude de l'expression de nos gènes d'intérêt a donc également été analysée dans les pépins récoltés. Cependant, au dernier stade de maturation (13 SAF), les ARNs n'ont pas pu être extraits en quantités suffisantes pour une analyse par macroarray, limitant notre étude aux stades prélevés à 10 et 11 SAF.

La figure 120 A montre clairement, qu'au cours du développement des baies, les gènes *VvcwINVs* ne sont quasiment pas exprimés comparés aux deux gènes d'invertases vacuolaires *VvGIN1* et *VvGIN2*. Excepté pour le stade nouaison où *VvGIN1* révèle un niveau d'expression important, les deux gènes *VvGINs* présentent un profil d'expression similaire au cours du développement de la baie, leur quantité respective de transcrits diminuant au cours des stades de maturation avec l'accumulation des sucres dans les cellules de la pulpe. La représentation graphique ciblée sur l'expression des gènes *VvcwINVs* uniquement (Fig. 120 B) apporte peu d'informations supplémentaires, l'expression des gènes étant faible et les écartypes importants. Il semblerait cependant que *VvcwINV1* soit éventuellement le plus exprimé et que sa quantité de transcrits augmente au cours du développement des baies, excepté pour le stade maturation (11 SAF) où son expression diminue au profit de celle de *VvcwINV3* et *VvcwINV4*. Dans les pépins (Fig. 120 C), l'expression des gènes codants pour les six invertases est relativement faible même si globalement, l'expression de *VvcwINV1*, *VvcwINV3*, *VvGIN1* et

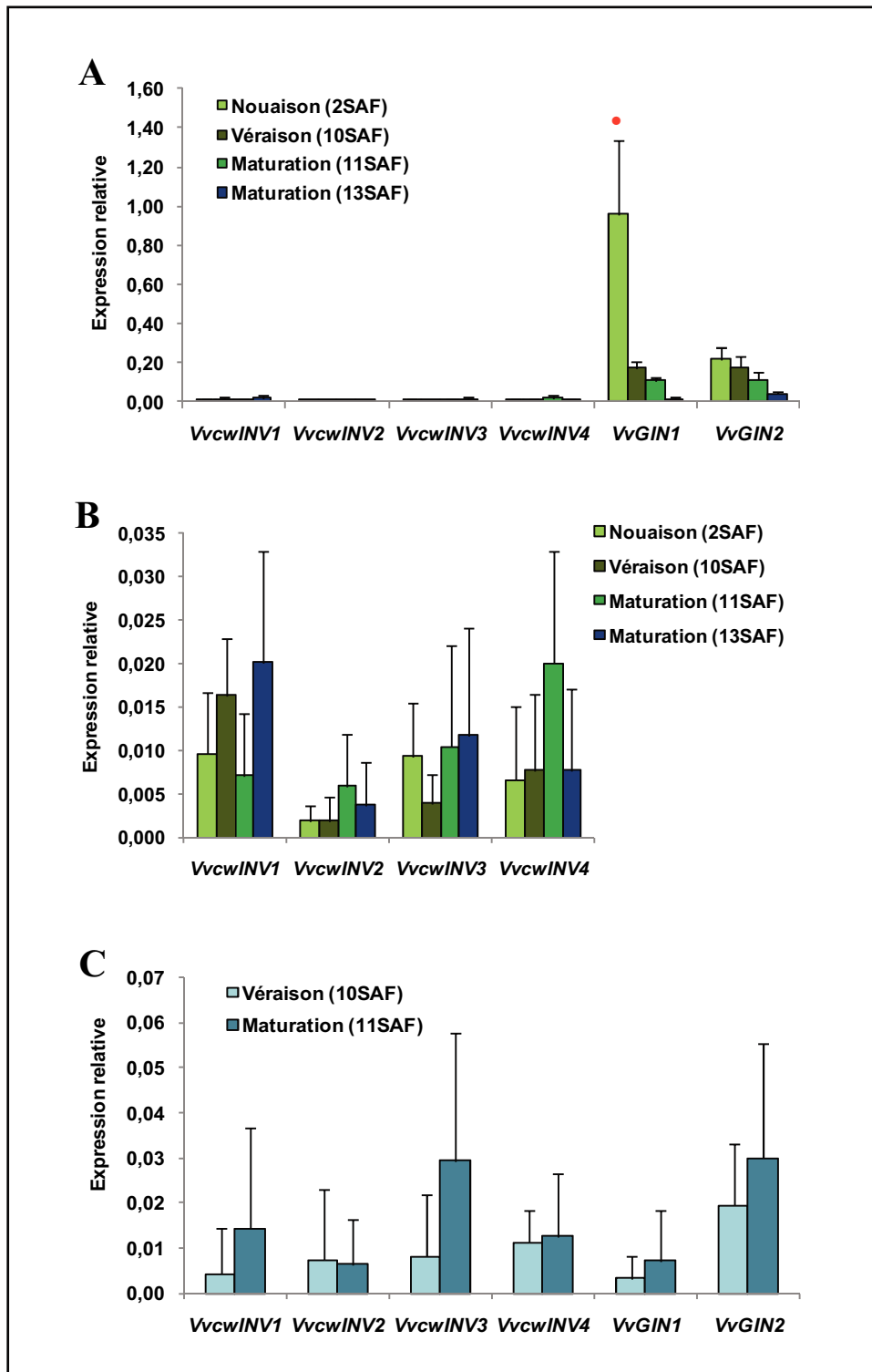


Figure 120 : Expression des gènes codant pour des invertases dans les baies et pépins de Chardonnay. L'analyse de l'expression des différents gènes a été effectuée par macroarray. Les ARNs ont été isolés à partir de baies épépinées et des pépins. Les niveaux d'expression de chaque gène ont été normalisés par rapport à l'expression moyenne des quatre gènes de référence *VvACT*, *VvEF1 α* , *VvEF1 γ* et *VvGAPDH*. Chaque valeur représente la moyenne de deux répétitions biologiques indépendantes. Les points rouges indiquent une valeur d'expression supérieure à la moyenne d'expression de l'ensemble des gènes dans chaque organe (*VvHT*, *SUC*, *PMT*, *INV*). **A.** Analyse de l'expression des 6 gènes d'invertases dans les baies. **B.** Analyse d'expression ciblée sur les gènes d'invertases pariétales. **C.** Analyse d'expression des invertases dans les pépins.

VvGIN2 semble augmenter au cours de la maturation. A 11 SAF, *VvcwINV3* et *VvGIN2* sont les plus exprimés.

3. Discussion

3.1. Recherche exhaustive de séquences codant pour des invertases

La recherche de séquences codant pour des invertases a permis d'identifier, dans le génome de la vigne, trois nouvelles séquences codant pour des invertases pariétales putatives appelées *VvcwINV2*, *VvcwINV3* et *VvcwINV4*. Les séquences protéiques de ces trois invertases ont révélé une taille de 572, 565 et 563 acides aminés et partagent entre 56 et 62% de similarité avec *VvwINV1* déjà identifiée chez la vigne (Hayes *et al.*, 2007). De façon intéressante, seules deux séquences codant pour des invertases vacuolaires ont pu être identifiées, celles-ci correspondant à *VvGIN1* et *VvGIN2* également décrite dans la littérature (Davies et Robinson, 1999). L'analyse phylogénétique des séquences protéiques de vigne avec celles d'*Arabidopsis* (INVs et FEHs) (Sherson *et al.*, 2003 ; Conninck *et al.*, 2005) n'a pas permis d'identifier des couples d'orthologues ni de prédire la fonction possible des invertases de vigne en tant qu'invertase ou fructane exohydrolase. Néanmoins, le profil d'expression de ces enzymes a été analysé dans différents organes de la vigne parallèlement aux trois autres séquences décrites dans la littérature (*VvcwINV1*, *VvGIN1* et 2).

3.2. Expression des gènes codant pour des invertases dans les organes végétatifs de la vigne

3.2.1. Analyse dans les jeunes feuilles et les feuilles de vigne

Les résultats ont d'une part révélé que *VvcwINV3* et *VvcwINV4* étaient peu exprimés dans tous les organes végétatifs testés, et d'autre part que les gènes *VvcwINVs* étaient globalement moins exprimés que les gènes *VvGINs* dans nos conditions expérimentales (sauf dans les feuilles). L'analyse dans les feuilles a indiqué une co-expression des deux types d'invertases (pariétales et vacuolaires) dans les jeunes feuilles et dans les feuilles plus âgées. Ces observations sont cohérentes avec celles effectuées par Davies et Robinson (1999) ainsi que Hayes *et al.* (2007) montrant une expression des *VvGINs* et de *VvcwINV1* dans les jeunes feuilles de vigne. Nos résultats ont indiqué que *VvcwINV2* était également exprimé bien que légèrement moins que *VvcwINV1*. La co-expression de gènes codant pour des invertases vacuolaires et pariétales a également été observée dans les jeunes feuilles d'*Arabidopsis*

(Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998). De plus, dans les jeunes feuilles de vigne, bien que l'activité invertasique soit majoritairement attribuée aux invertases solubles, une activité des invertases pariétales a également été mise en évidence (Ruffner *et al.*, 1990).

Dans les jeunes feuilles puits, il est généralement admis que le déchargement du phloème s'effectue par la voie symplastique *via* les plasmodesmes (Ilmau *et al.*, 1999 ; Turgeon, 1989). Cependant, l'expression d'un grand nombre de transporteurs de sucres (saccharose et hexoses) le long du complexe conducteur suggère que des fuites de saccharose s'opèrent le long du phloème. Certains transporteurs de saccharose tels que PmSUC1 (*P. major*), AtSUC2 (*A. thaliana*) ou StSUT1 (*S. tuberosum*) auraient pour rôle la récupération de ces fuites vers le complexe conducteur (Stadler *et al.*, 1995 ; Lalonde *et al.*, 2004). Parallèlement, plusieurs transporteurs d'hexoses tels qu'AtSTP1, 3, 4, 13 et 14 interviendraient également dans cette récupération de sucre (Büttner, 2000, 2010 ; Stadler *et al.*, 2003, Truernit *et al.*, 1996). Cette récupération du saccharose *via* les transporteurs d'hexoses n'étant possible qu'après l'hydrolyse du disaccharide, il est probable que les invertases pariétales assurent cette fonction dans la feuille puits. Dans la jeune feuille de vigne, cette hypothèse est cohérente avec le faible niveau d'expression des transporteurs de saccharose parallèlement à l'expression significative de certains transporteurs d'hexoses tels que *VvHT3*, *VvHT11* et *VvHT5* (§ I.). L'activité concomitante des deux types d'invertases permettrait de réguler la force de puits nécessaire à l'importation des photoassimilats sous forme de saccharose. Notons également que les 9 séquences d'invertases neutres identifiées chez la vigne (Nonis *et al.*, 2008) ainsi que la saccharose synthase (Susy), pourraient également participer à l'hydrolyse du saccharose dans les jeunes feuilles. Chez *Arabidopsis*, l'expression de la Susy est détectée dans les jeunes feuilles bien que ses transcrits soient bien moins abondants que ceux correspondant aux invertases acides (Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998).

Dans les feuilles plus âgées, qui exportent théoriquement du saccharose, les résultats obtenus sur l'expression des invertases sont moins cohérents avec les données de la littérature. Davies Robinson (1999) ont en effet montré que l'expression de *VvGIN1*, très élevée dans les jeunes feuilles de Syrah, n'était plus détectable dans les feuilles matures, tout comme celle de *VvGIN2*. D'autre part, Hayes *et al.* (2007) ont montré une augmentation importante de l'expression de *VvcwINV1* au cours du développement de la feuille de Cabernet Sauvignon, ce que nous n'avons pas observé chez Chardonnay. Il est possible que ces différences soient dues aux différents cépages utilisés au cours de ces études mais il est plutôt probable que les

« feuilles » prélevées après 20 jours de culture aéronique aient été en transition puits/source et donc toujours importatrices de photoassimilats. Parallèlement aux données obtenues sur vigne, cette dernière hypothèse est supportée par les données d'expression des invertases chez *Arabidopsis*. Chez cette dernière, des invertases vacuolaires et pariétales sont co-exprimées dans les jeunes feuilles de la rosette alors que les feuilles plus âgées n'expriment plus que des invertases pariétales (Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998). L'analyse de l'expression des gènes de la famille des *AtcwINVs* chez *Arabidopsis*, montre que cette expression dans les feuilles matures correspond à celle d'*AtcwINV1* (Sherson *et al.*, 2003), plus proche orthologue de *VvcwINV1* (~67%). Bien qu'une augmentation de l'expression de *VvcwINV1* n'ait pas été observée, celle de *VvcwINV2* augmente parallèlement à celle de différents transporteurs tels que *VvHT1* et *VvHT5* ce qui pourrait refléter une entrée en phase de transition puits/source. De façon intéressante, bien que l'expression des gènes codants pour les invertases vacuolaires (*VvGIN1* et 2) diminue au cours du développement des feuilles de vigne (Davies et Robinson, 1996) au profit des gènes codant pour des invertases pariétales (Hayes *et al.*, 2007), la majorité de l'activité invertasique de la feuille est généralement attribuée aux invertases solubles (Ruffner *et al.*, 1990). Le rôle des invertases dans les feuilles sources reste cependant encore flou. Tout comme supposé dans les jeunes feuilles, elles pourraient participer à la récupération du saccharose le long du complexe conducteur en générant des hexoses, substrats des transporteurs tels que *VvHT1* et *VvHT5*. D'autre part, Kingston-Smith *et al.* (1999) ont émis plusieurs hypothèses concernant l'activité invertasique des feuilles : (i) une partie de l'activité pourrait être localisée dans des cellules qui nécessitent spécifiquement un catabolisme du saccharose telles que les cellules de l'épiderme, les trichomes et les cellules des tissus vasculaires, (ii) les invertases pourraient avoir un rôle de régulation du métabolisme carboné dans les cellules photosynthétiques en influençant la répartition des sucres au sein du chloroplaste ainsi que le taux d'assimilation lui-même et (iii) elles pourraient fournir les résidus nécessaires à la synthèse d'oligosaccharides notamment chez les plantes qui accumulent des fructanes. Nous n'avons cependant aucune information sur l'accumulation de tels composés chez la vigne.

3.2.2. Analyse dans les pétioles et les tiges de vigne

Dans les pétioles et les tiges, le niveau d'expression des 4 gènes d'invertases pariétales s'est révélé très faible malgré l'expression de plusieurs transporteurs d'hexoses tels que *VvHT1*, *VvHT3* et *VvHT11* (§ I.). Dans la tige, *VvcwINV1* est cependant faiblement exprimé. Au niveau du complexe conducteur, il est possible que cette invertase participe à la

récupération du saccharose (fuites) le long du phloème. Après son hydrolyse, les hexoses générés seraient pris en charge par les transporteurs précédemment cités. *VvHT1* a d'ailleurs été localisé sur la membrane plasmique des cellules à l'interface tube criblé/cellule compagne (Vignault *et al.*, 2005). Cependant, contrairement aux gènes *VvcwINVs*, nos résultats ont montré que *VvGIN2* était très fortement exprimé dans les pétioles et les tiges de vigne. Cette observation, bien que difficilement interprétable, semblerait indiquer un stockage des hexoses dans la vacuole des cellules de ces organes. Il est envisageable que ces hexoses constituent une réserve de squelettes carbonés utilisés dans l'élaboration des parois lors de l'élongation cellulaire au cours de la croissance de la tige et des pétioles. De plus, l'expression de *VvGIN2* semble coïncider avec la forte expression de *VvSUC27* dans ces organes. Ce transporteur de saccharose pourrait alors importer du saccharose dans les cellules, qui serait ensuite hydrolysé au sein de la vacuole. Cette hypothèse suggérerait donc que *VvSUC27* soit impliqué dans le déchargement du phloème plutôt que dans son chargement. Sa forte expression au niveau des organes puits tels que la racine, la fleur et la graine parallèlement à sa plus faible expression dans les feuilles sources (Davies *et al.*, 1999) supporterait cette hypothèse.

3.2.3. Analyse dans les racines et les vrilles

Dans les racines, organes puits par excellence, les gènes d'invertases pariétales ont globalement révélé une faible expression malgré l'expression des gènes de transporteurs d'hexoses *VvHT1*, *VvHT2*, *VvHT3*, *VvHT5* et *VvHT11* (§ I.). Sur l'ensemble des gènes d'invertases pariétales, *VvcwINV1* et *VvcwINV4* pourraient potentiellement être suffisamment exprimés afin de générer des hexoses dans l'apoplaste. Néanmoins, le faible niveau d'expression des 4 transporteurs de saccharose parallèlement à la forte expression de *VvGIN2* (invertase vacuolaire) tendrait à supposer une diffusion préférentiellement symplastique des sucres au niveau de la racine. Les deux voies ne s'excluent cependant pas l'une de l'autre. Chez l'oignon (*A. cepa*), les couches cellulaires de la racine sont connectées par des plasmodesmes permettant un transport symplastique dans toutes les zones racinaires (Ma et Peterson, 2000). Chez d'autres espèces comme le maïs (*Z.mays*), la diffusion symplastique des sucres au niveau de la pointe racinaire ne satisfait pas la demande carbonée du méristème (Bret-Harte et Silk, 1994) ce qui conduirait à la mise en place de transporteurs. Chez *Arabidopsis*, le gène de transporteur de saccharose *AtSUC3* (Meyer *et al.*, 2000), les gènes de transporteurs d'hexoses *AtSTP1*, *AtSTP4*, *AtSTP7* et *AtSTP13* (Büttner, 2010 ; Truernit *et al.*, 1996), ainsi que celui de l'invertase pariétale *Atβfruct1* (Tymowska-Lalanne et Kries, 1998) sont tous exprimés dans la racine et pourraient catalyser l'import des sucres au niveau des

zones en croissance. De façon intéressante *AtSTP1*, *AtSTP7* et *AtSTP13* sont les orthologues respectifs de *VvHT1*, *VvHT3* et *VvHT5* dont l'expression a été détectée dans les racines de vigne.

Les vrilles ont révélé l'expression la plus élevée des gènes *VvGIN1* et (surtout) *VvGIN2*, comparés aux gènes *VvcwINVs* très peu exprimés. De façon intéressante, cette forte expression de *VvGIN2* s'accompagne également d'une forte expression du gène de transporteur de saccharose *VvSUC27* et du transporteur de polyols *VvPMT5*. Un aspect intéressant des vrilles est leur mouvement révolutif qui leur permet de s'accrocher en spirale à un support. Bien que ce mécanisme soit dépendant du statut auxinique endogène de la plante (Huglin et Schneider, 1998), il reste cependant peu décrit dans la littérature. Il est faible chez les jeunes vrilles et ferait intervenir des mouvements d'eau entre les faces ventrale et dorsale. D'autre part, des traitements par du saccharose ou du mannitol diminuent le phénomène d'enroulement (Jaffe et Galston, 1968). L'ensemble de ces données suggère que l'expression de *VvSUC27*, *VvGIN2* et *VvPMT5* pourraient permettre le maintien des jeunes vrilles à l'état « non enroulé » *via* un phénomène d'osmorégulation.

3.3. Etude du profil d'expression des gènes codant pour des invertases au cours du développement des baies de raisin

3.3.1. Analyse dans les baies épépinées

En raison de l'importance commerciale que représente l'accumulation des sucres dans la baie de raisin, il est d'intérêt majeur de comprendre la biochimie et la régulation génétique de ce processus (Davies et Robinson, 2000). Dans les baies de Chardonay, nos résultats ont indiqué une forte expression des deux gènes *VvGIN1* et *VvGIN2*. Ces deux gènes ont révélé une expression similaire, maximale à la nouaison puis diminuant ensuite à la véraison et au cours de la maturation. Ces résultats corroborent ceux de Davies et Robinson (1996) obtenus dans les baies de Syrah. Cependant, pour tous les stades accumulant des transcrits, ces auteurs ont montré un niveau d'expression de *VvGIN1* bien plus élevé que *VvGIN2* alors que chez Chardonay, excepté à la nouaison qui révèle la même tendance, l'expression des deux gènes reste comparable à partir de la véraison jusqu'au dernier stade de maturation. Ces résultats pourraient traduire une différence dans la voie d'accumulation des sucres entre les deux cépages. Dans les deux cas cependant, la diminution d'expression des *VvGINs* après la véraison pourraient suggérer l'expression d'autres types d'invertases telles que les invertases

apoplastiques. Nos résultats obtenus avec Chardonnay n'ont pas révélé d'augmentation de l'expression des gènes *VvcwINVs* au cours du développement de la baie. Hayes *et al.* (2007) ont cependant montré une augmentation de l'expression de *VvcwINVI* dans la baie de Cabernet Sauvignon au cours des 4 semaines précédant la véraison ; au-delà de laquelle l'expression du gène chute brutalement. De façon plus précise, cette augmentation de l'expression de *VvcwINVI* a été observée entre la 4^{ème} et la 8^{ème} semaine après la floraison (SAF). Nos premiers prélèvements de baies ayant été effectués à 2 SAF (nouaison) et 10 SAF (véraison) sans stades intermédiaires, il est hautement probable que l'expression d'un ou plusieurs *VvcwINVs* soit située entre ces deux points de la cinétique.

Considérant l'ensemble de ces données, il est intéressant de noter que les gènes d'invertases sont majoritairement exprimés avant la véraison c'est-à-dire avant l'accumulation massive des hexoses dans la baie de raisin. Davies et Robinson (1996) ont alors suggéré que la baie pouvait préparer sa maturation en synthétisant la « machinerie » enzymatique dont elle aurait besoin ultérieurement. Cette hypothèse pourrait suggérer une régulation post-traductionnelle des enzymes au sein des baies. De nombreux inhibiteurs d'invertases ont été mis en évidence chez plusieurs espèces telles que le tabac, la tomate, la pomme de terre ou encore *Arabidopsis* ; pouvant réguler l'activité invertasique au cours de certaines phases du développement (Krausgrill *et al.*, 1996 ; Pressey, 1994 ; Link *et al.*, 2004 ; Bracho et Whitaker, 1990). Quoi qu'il en soit, l'expression des deux types d'invertases suggère une implication des voies symplastique et apoplastique dans le déchargement du saccharose au cours du développement de la baie. A l'aide d'un traceur (CFDA), il a été démontré que la baie utilisait préférentiellement la voie symplastique au cours des deux premières phases du développement, ce mode de déchargement phloémien étant corrélé à la présence et à l'activité de nombreuses invertases solubles localisées dans les vacuoles (Zhang *et al.*, 2006). A partir de la véraison, le blocage du traceur symplastique, qui résulte d'une diminution de la conductivité des plasmodesmes, a permis de mettre en évidence un mode de déchargement préférentiellement apoplastique corrélé à la présence et à l'activité des invertases acides dans l'apoplaste. Ainsi, la véraison constituerait un point de transition entre les deux modes de déchargement. La voie apoplastique semble être particulièrement liée à la propriété des fruits charnus à accumuler une grande quantité de sucres solubles (Patrick, 1997 ; Zhang *et al.*, 2004). Dans la baie, l'accumulation des hexoses pourrait générer une augmentation de la pression osmotique au niveau du phloème et ainsi ralentir le flux d'importation de saccharose. L'isolement symplastique constituerait un moyen de maintenir le gradient osmotique entre les

feuilles sources et les fruits (puits) et donc le flux de saccharose après la véraison. Les invertases apoplastiques maintiendraient la force de puits en générant des hexoses qui seraient pris en charge par différents transporteurs vers l'intérieur des cellules de la pulpe. Dans notre étude, ce transport des hexoses pourrait potentiellement être catalysé par VvHT2, VvHT3 et/ou VvHT11, les trois gènes étant exprimés au cours de la maturation. Parallèlement, les deux transporteurs tonoplastiques VvTMT1 et VvTMT2 pourraient conduire les hexoses au sein de la vacuole. A l'heure actuelle, cette hypothèse reste cependant à nuancer puisqu'aucun des ces transporteurs n'a été caractérisé et seul VvHT3 a pu être localisé sur la membrane plasmique (Hayes *et al.*, 2007). De plus, dans la baie de Chardonnay, l'expression des deux gènes *VvGINs* parallèlement à la faible expression des *VvSUC/SUTs* après la véraison pourrait également indiquer un maintien plus ou moins important, si ce n'est préférentiel, de la voie de déchargement symplastique. Dans les baies de l'hybride *V. vinifera* Riesling x Silvaner, la proportion des invertases solubles reste environ 10 fois supérieure à celle des invertases pariétales pour tous les stades de développement (Ruffner *et al.*, 1990). Dans les baies de Pinot Noir, une étude d'immunohistochimie a également montré un niveau constant des invertases vacuolaires dans les cellules de la pulpe au cours de la phase d'accumulation des sucres (Famiani *et al.*, 2000). Parallèlement, les invertases neutres telles que VvNI3 et VvNI4, dont les gènes sont exprimés au cours de la maturation des baies de Merlot, pourraient aussi participer à l'hydrolyse du saccharose au niveau cytoplasmique (Nonis *et al.*, 2008). L'activité de la Susy, faiblement détectée au cours de la maturation, révèle une légère augmentation en fin de phase (Zhang *et al.*, 2006) ce qui indique qu'elle pourrait participer partiellement à l'hydrolyse du saccharose conjointement aux invertases cytoplasmiques. Son activité reste cependant très inférieure à celle des invertases acides (Davies *et al.*, 1999 ; Ruffner *et al.*, 1990). L'accumulation des sucres au sein des baies de raisin constitue un processus très complexe au sein duquel le site exact d'hydrolyse du saccharose est encore source de débat (Dai *et al.*, 2010). Les cépages (et hybrides) de vigne pouvant présenter des caractéristiques très différentes, il ne serait pas surprenant que le mode d'accumulation des sucres soit variable d'un cépage à l'autre.

3.3.2. Analyse dans les pépins

L'analyse dans les pépins de raisin prélevés au moment de la véraison et au cours de la maturation n'a pas révélé d'expression significative des invertases pariétales et vacuolaires (limite de détection de la technique). La croissance des pépins se termine généralement au cours de la seconde phase de croissance de la vigne avant la véraison (Huglin et Schneider,

1998 ; Galet, 2000). Tout comme observé dans la baie, il est hautement probable que ces enzymes soient exprimées avant la morphogenèse de l'embryon et l'accumulation des réserves. En considérant que les graines sont isolées symplastiquement des tissus maternels (Schneidereit *et al.*, 2003) et que les invertases sont des protéines très stables (Zhang *et al.*, 2006), la très forte expression de *VvHT3* et *VvHT5* observée à la véraison et au cours de la maturation (§ I.) supporterait l'hypothèse d'une activité des invertases apoplastiques. Chez d'autres espèces comme la fève (*V. faba*), les gènes du transporteur d'hexoses *VfSTP1* et de l'invertase pariétale *VfCWINV1* sont co-exprimés dans les cotylédons de l'embryon afin de fournir les substrats métaboliques nécessaires aux divisions cellulaires et à la morphogenèse (Weber *et al.*, 1997). Chez l'orge (*H. vulgare*), *HvSTP2* ainsi que *HvCWINV2* sont également exprimés dans les tissus du caryopse. Ces différentes observations seraient donc en faveur d'une activité invertasique apoplastique au cours du développement des pépins de raisin.

4. Conclusion

Les séquences protéiques des différents transporteurs de sucres et des invertases connues chez *Arabidopsis* nous ont permis d'identifier chez la vigne 65 gènes codants pour des transporteurs de sucres putatifs ainsi que 6 gènes codants pour des invertases pariétales putatives. Comme observés chez d'autres plantes telles que le riz et la tomate (Yu *et al.*, 2002 ; Godt et Roitsch, 1997), ces résultats ont donc montré que la vigne possédait des familles multigéniques de gènes de transporteurs de sucres et d'invertases. Le clonage de sondes 3'UTR spécifiques parallèlement au développement d'une technique d'analyse par macroarrays nous a permis d'étudier simultanément le profil d'expression de 20 gènes de transporteurs de sucres répartis dans 4 sous-familles (*VvHTs*, *VvSUC/SUTs*, *VvTMTs*, *VvPMTs*) ainsi que des 6 gènes d'invertases (*VvcwINVs* et *VvGINs*) dans différents organes végétatifs et dans les baies de raisin en développement. Nous avons donc utilisé cette technique afin d'étudier le profil d'expression de ces différents gènes en réponse à une contrainte biotique ou élicitation.

Chapitre IV

Induction de gènes codant pour des transporteurs de sucres et des invertases dans les cellules de vigne en réponse à une contrainte biotique.

Impact sur l'activité de transport

Chapitre IV

Induction de gènes codant pour des transporteurs de sucres et des invertases dans les cellules de vigne en réponse à une contrainte biotique.

Impact sur l'activité de transport

Dans le chapitre I de ce travail, nous avons mis en évidence une induction de l'expression des gènes *VvHT5* et *VvcwINV1* dans les feuilles de vigne en réponse à une infection fongique par *B. cinerea* et *E. necator*. Afin d'apporter une dimension fonctionnelle à cette réponse de la plante, c'est-à-dire analyser le transport vectoriel de sucre en corrélation avec l'induction des gènes de transporteurs de sucres (et d'invertases), une suspension cellulaire de vigne cv Chardonnay a été développée (Ch.II). Les suspensions cellulaires constituent en effet un système biologique homogène permettant une accessibilité plus aisée des cellules aux substrats et aux éliciteurs par rapport à des tissus complexes comme les feuilles. D'autre part, le séquençage complet du génome de la vigne a permis d'identifier des familles multigéniques de gènes de transporteurs de sucres et d'invertases, au sein desquelles de nombreux gènes pouvaient être induits en conditions de stress biotique (Ch.III). C'est pourquoi, dans un premier temps, une étude globale de l'expression des différents gènes de transporteurs de sucres et d'invertases a été effectuée par la technique des macroarrays en réponse à une contrainte biotique. Comme pour l'analyse d'expression réalisée sur plante (Ch.III), nous avons choisi de focaliser cette étude sur les familles de transporteurs de sucres les plus étudiées dans la littérature au niveau transcriptionnel et fonctionnel (HTs, TMTs, SUC/SUTs et PMTs). Parallèlement, l'expression de plusieurs gènes de défense a également été analysée afin de vérifier la perception de *B. cinerea* ou des éliciteurs fongiques par les cellules de vigne. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux effets que pouvait avoir un traitement éliciteur sur l'activité de transport des sucres au niveau cellulaire.

1. Mise en place d'une contrainte biotique sur des cellules de vigne en suspension

1.1. Obtention d'un dialysat de culture de *Botrytis cinerea*

Une électrophorèse SDS-PAGE a été réalisée à partir d'un dialysat du milieu de culture de *B. cinerea* après 14 jours de croissance du mycélium dans du milieu Nitsch liquide (cf Matériels et Méthodes § 1.3.4.). Le gel d'électrophorèse révèle la présence dans le dialysat d'un mélange de protéines de masses moléculaires apparentes située entre 33 et 75 kDa

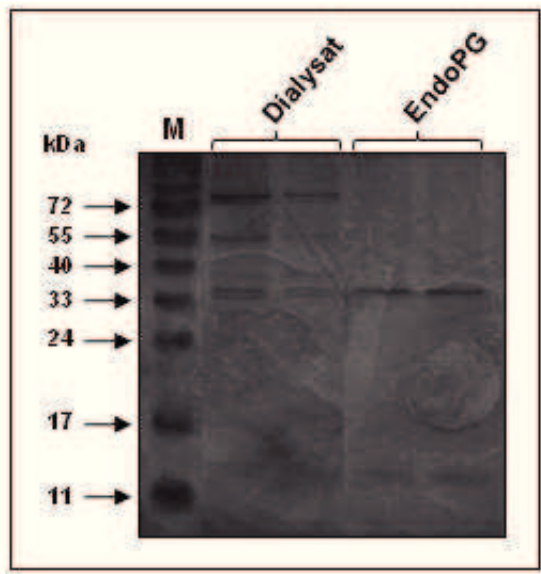


Figure 121 : Analyse du profil protéique du dialysat de culture de *Botrytis cinerea*. 1 µg de protéines totales (dialysat) ont été séparées sur gel SDS-PAGE 12% après dialyse sur membrane Diaflo®. L'endopolygalacturonase purifiée (1 µg) est déposée en parallèle comme témoin positif. M : marqueur de taille (PPL, Eurogentec®). Le gel a été révélé au nitrate d'argent.

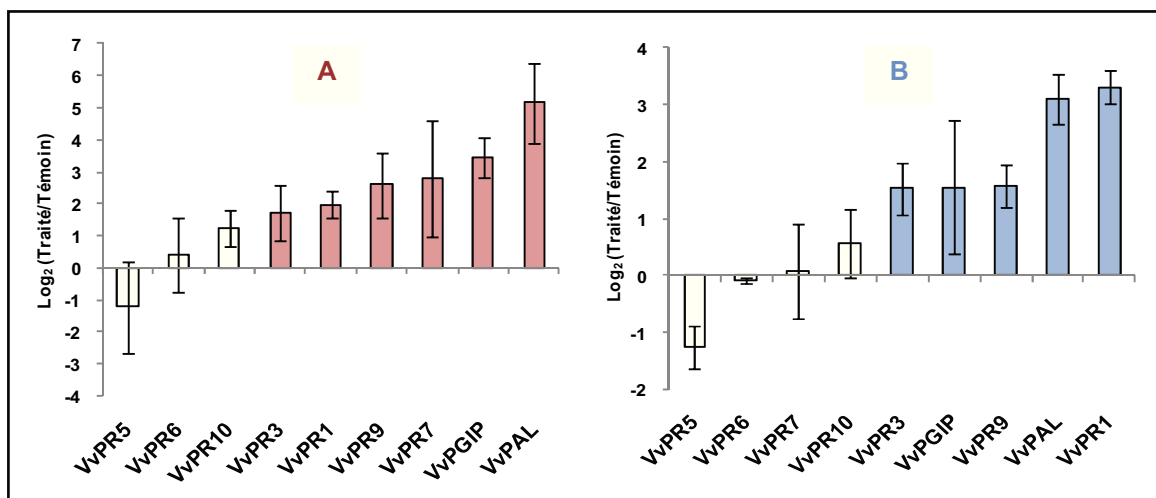


Figure 122 : Induction transcriptionnelle des gènes de défense dans les cellules de Chardonnay élicitées. Les cellules de Chardonnay ont été élicitées au 6^{ème} jour de culture avec (A) du dialysat de culture de *Botrytis* ($1,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et (B) de l'ergostérol ($2 \mu\text{M}$). Après extraction des ARNs totaux, l'expression de différents gènes de défense a été analysée à 8 hpi par macroarrays. Après 48 h d'exposition, les signaux ont été quantifiés puis normalisés par rapport à la moyenne des signaux correspondant aux 4 gènes de référence. Les triplicatas de chaque ADNc ont été moyennés et les résultats sont présentés comme le rapport d'expression de la condition « traité » par rapport au « témoin » et représenté en Log₂. Un gène a été considéré comme induit si Log₂>1,5 (couleur) et réprimé si Log₂<1,5. Les résultats sont représentatifs de trois répétitions biologiques indépendantes.

environ (Fig. 121). Parmi les bandes protéiques observées, une bande située entre 33 et 40 kDa semble correspondre à la même masse moléculaire que celle de l'endopolygalacturonase purifiée (endoPG) de *Botrytis* (contrôle positif). Même si cette protéine n'est pas la plus abondante, il semble qu'elle soit bien sécrétée par le champignon dans le milieu de culture. Ne disposant pas d'un anticorps dirigé contre l'endoPG de *Botrytis*, la confirmation par Western blot de l'identité de la protéine n'a pas pu être réalisée. De plus, la quantité d'endoPG purifiée disponible au laboratoire n'étant pas suffisante pour étudier l'induction transcriptionnelle des gènes de transporteurs et le transport de sucres associé, le dialysat a alors été utilisé comme éliciteur primaire pour le traitement des cellules de vigne.

1.2. Mise en évidence de réactions de défense dans les cellules de vigne élicitées

1.2.1. Analyse d'expression de gènes de défense par microarray

Afin de démontrer la mise en place de réactions de défense dans les cellules de vigne en réponse à une contrainte biotique, les cellules de Chardonnay ont été élicitées avec du dialysat de culture de *Botrytis* et de l'ergostérol. Dans un premier temps, plutôt que d'employer l'agent pathogène lui-même, notre choix s'est porté sur ces éliciteurs car ceux-ci permettaient (i) de maîtriser la quantité appliquée lors du traitement, (ii) d'éviter la contamination des ARNs de vigne par les ARNs du champignon lors de l'extraction et (iii) de limiter probablement la quantité de métabolites indésirables comme les toxines sécrétées par *Botrytis* et pouvant altérer la réponse et la viabilité cellulaire.

Les suspensions cellulaires ont été traitées au 6^{ème} jour de culture avec 1,22 µg.mL⁻¹ de protéines totales (dialysat) ou 2 µM d'ergostérol. Huit heures post-inoculation (hpi), les ARNs totaux ont été extraits et l'expression de plusieurs gènes de PR-protéines et des marqueurs de défense PGIP (polygalacturonase inhibitor protein) et PAL (phénylalanine ammonia lyase) a été étudiée par la technique de microarrays. Les signaux ont été normalisés par la moyenne des signaux correspondant aux gènes de référence *VvACT1*, *VvEF1α*, *VvEF1γ* et *VvGAPDH* après avoir éliminé les spots d'intensité inférieure au spot « H₂O ». La figure 122 représente le rapport d'expression traité/témoin exprimé en Log₂ pour chaque gène ainsi retenu. Deux « seuils de sureté » ont été fixés pour des valeurs en Log₂ de 1,5 et -1,5 au delà desquelles un gène a été considéré comme induit ou réprimé. Pour des valeurs de rapport situées dans l'intervalle [1,5/-1,5], l'expression des gènes a été considéré comme non modifiée. Les résultats montrent que plusieurs gènes de PR-protéines ainsi que les gènes *VvPGIP* et *VvPAL* sont induits suite au traitement par du dialysat ou de l'ergostérol. De façon générale, *VvPAL*

Tableau 26 : Rapports d'expression des gènes de défense obtenus par macroarray. (+) : facteur d'induction, (-) : facteur de répression

Gènes	Dialysat (1,22µg.mL ⁻¹)		Ergostérol (2 µM)	
	Log ₂ moyen (Traité/Témoin)	Facteur moyen d'expression	Log ₂ moyen (Traité/Témoin)	Facteur moyen d'expression
<i>VvPR1</i>	1,98 ± 0,40	(+) 3,94	3,30 ± 0,29	(+) 9,88
<i>VvPR3</i>	1,72 ± 0,89	(+) 3,29	1,53 ± 0,45	(+) 2,88
<i>VvPR5</i>	-1,23 ± 1,41	(-) 2,34	-1,27 ± 0,37	(-) 2,41
<i>VvPR6</i>	0,41 ± 1,14	(+) 1,33	-0,08 ± 0,04	(-) 1,06
<i>VvPR7</i>	2,77 ± 1,82	(+) 6,82	0,07 ± 0,82	(+) 1,05
<i>VvPR9</i>	2,61 ± 1,01	(+) 6,09	1,57 ± 0,37	(+) 2,97
<i>VvPR10</i>	1,24 ± 0,55	(+) 2,35	0,57 ± 0,59	(+) 1,49
<i>VvPGIP</i>	3,46 ± 0,62	(+) 11,02	1,56 ± 1,17	(+) 2,94
<i>VvPAL</i>	5,16 ± 1,24	(+) 35,64	3,12 ± 0,44	(+) 8,67

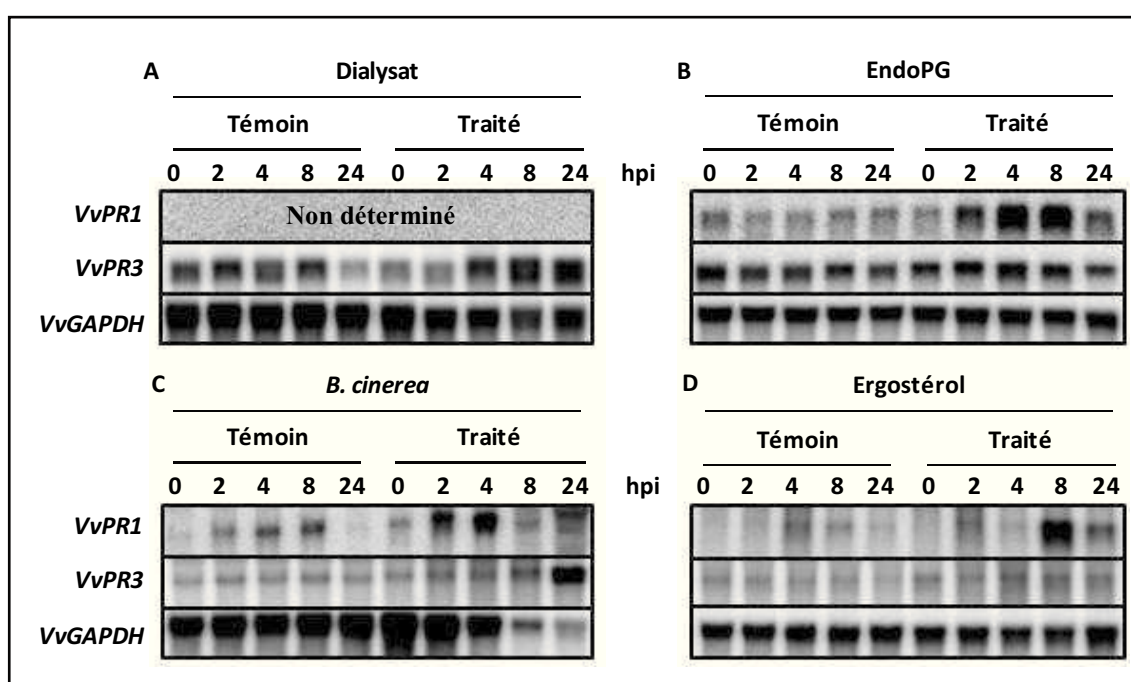


Figure 123 : Analyse par Northern blot du profil d'expression de deux PR-protéines en réponse à un traitement éliciteur. Les cellules de Chardonnay ont été élicitées au 6^{ème} jour de culture avec (A) du dialysat de culture de *Botrytis* (1,22 µg.mL⁻¹), (B) de l'endopolygalacturonase purifiée (0,1 µg.mL⁻¹), (C) des conidies de *Botrytis* (90000 conidies.mL⁻¹) et (D) de l'ergostérol (2 µM). Les ARNs ont été extraits de 0 à 24 hpi et l'expression de *VvPR1* et *VvPR3* analysée par Northern blot (20 µg par puits). Les membranes ont été exposées 16 h sur écrans PhosphoImager et les signaux correspondant à *VvGAPDH* utilisés comme référence. Les résultats sont représentatifs de deux répétitions biologiques indépendantes.

Tableau 27 : Rapports d'expression de *VvHT1*, *VvHT5*, *VvHT13*, *VvcwINV1* et *VvcwINV3* dans les cellules de Chardonnay en réponse aux différents traitements éliciteurs. Les rapports d'expression (traité/témoin) ont été calculés après calibration des signaux par rapport à l'expression de *VvGAPDH*. Les valeurs représentent la moyenne de deux répétitions biologiques indépendantes.

	Dialysat (1,22 µg.mL ⁻¹)			EndoPG (0,1 µg.mL ⁻¹)			Conidies (90000.mL ⁻¹)			Ergostérol (2 µM)		
	4 hpi	8 hpi	24 hpi	4 hpi	8 hpi	24 hpi	4 hpi	8 hpi	24 hpi	4 hpi	8 hpi	24 hpi
<i>VvPR1</i>	-	-	-	6,65	6,83	2,45	4,94	3,68	31,16	0,37	9,74	4,94
<i>VvPR3</i>	1,77	4,46	9,47	1,31	1,36	1,03	2,44	15,38	53,45	2,38	2,59	2,16

semble être un des gènes les plus induits dans les deux conditions avec un facteur d'induction de 35,64 fois en réponse au dialysat et 8,67 fois en réponse à l'ergostérol (Tableau 26). *VvPGIP* est également induit 11,02 et 2,94 fois respectivement suite aux traitements. Au niveau des gènes de PR-protéines, les deux éliciteurs provoquent l'induction transcriptionnelle de *VvPRI*, *VvPR3* et *VvPR9*; *VvPR7* n'étant induit que par le dialysat. Globalement, l'expression de *VvPR5* est réprimée dans les deux conditions alors que celle de *VvPR6* et *VvPR10* n'est pas modifiée. De plus, il est intéressant de noter que, malgré le panel de gènes induits relativement similaire entre les deux traitements, l'intensité de réponse de chaque gène apparaît sensiblement différente en fonction de l'éliciteur employé. L'induction de *VvPRI* est en effet plus importante avec l'ergostérol alors que la réponse de *VvPGIP* est plus élevée avec le dialysat.

Cette données indiquent donc que le traitement des cellules de vigne par du dialysat de culture de *B. cinerea* ainsi que par de l'ergostérol induit l'accumulation de transcrits de gènes de défense incluant un certain nombre de PR-protéines ainsi que *VvPGIP* et *VvPAL*.

1.2.2. Confirmation de l'induction de gènes de défense par Northern blot

Afin de conforter les résultats obtenus par macroarrays, l'expression de deux gènes de défense, *VvPRI* et *VvPR3*, a été analysée plus finement par Northern blot entre 0 et 24 hpi. Nous avons choisi de cibler notre analyse sur ces deux gènes car ceux-ci se sont révélés induits sur plantes entières en réponse à une infection par *B. cinerea* (Ch. I). De plus, afin de compléter les résultats obtenus avec le dialysat de culture de *Botrytis* et l'ergostérol, un autre éliciteur (endoPG) ainsi que le champignon lui-même ont également été utilisés. Les résultats montrent que le gène *VvPRI* est induit suite au traitement par l'endoPG, *Botrytis* et l'ergostérol (Fig. 123). L'induction de ce gène est maximale à 8 hpi pour les traitements avec l'endoPG et l'ergostérol, les facteurs d'induction étant de 6,83 et 9,74 fois respectivement (Tableau 27). Considérant les trois éliciteurs testés, l'ergostérol induit la réponse la plus élevée à 8 hpi ce qui était déjà observé lors de l'étude par macroarrays. Le traitement par des conidies semble également induire une réponse du gène *VvPRI* même si celle-ci est plus discutable. En effet, l'analyse visuelle des signaux (Fig. 123 C) tend à situer plus précocement la réponse aux alentours de 2 et 4 hpi alors que la normalisation des données par rapport au signal de la sonde *VvGAPDH* indique un maximum d'induction à 24 hpi (Tableau 27). Considérant la qualité de l'image et la difficulté de distinction des signaux lors de la quantification, ce dernier point a été ignoré.

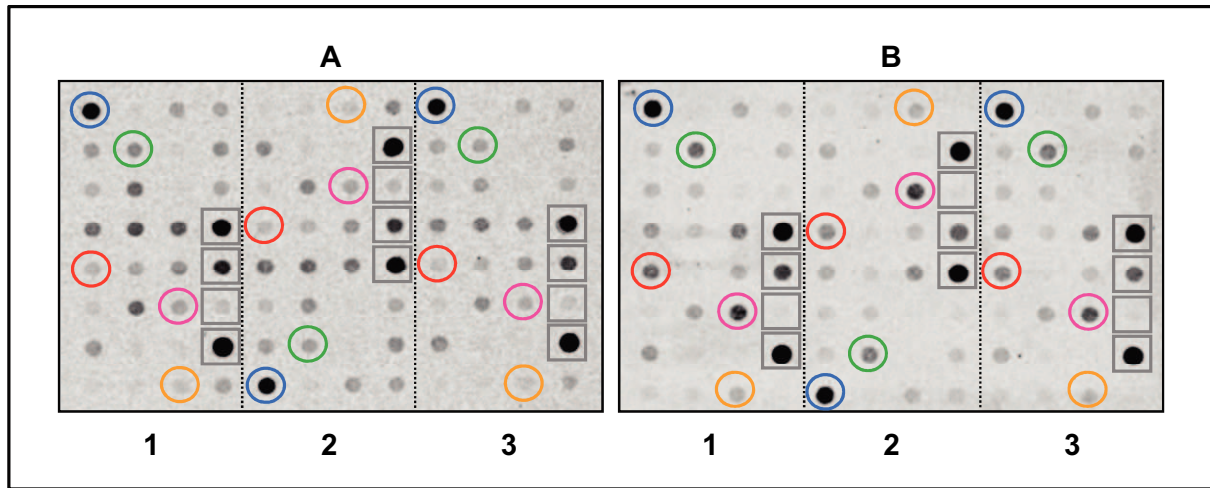


Figure 124 : Membranes macroarray obtenues après hybridation d'ADNc radiomarqués synthétisés à partir d'ARNs totaux extraits de cellules de Chardonnay. Les membranes ont été exposées 48 h sur écran PhosphorImager. **A** : Condition « témoin » (tampon mannitol 0,175). **B** : Condition « traité » (Dialysat 1,22 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Chaque ADNc sonde a été déposé en triplicatas sur les membranes. L'intensité des signaux reflète la quantité des transcrits correspondant aux ADNc sondes déposés. Exemple : *VvHT1* (bleu), *VvHT5* (rouge), *VvHT13* (vert), *VvcwINV1* (rose), *VvcwINV3* (orange), gènes de référence (carrés gris).

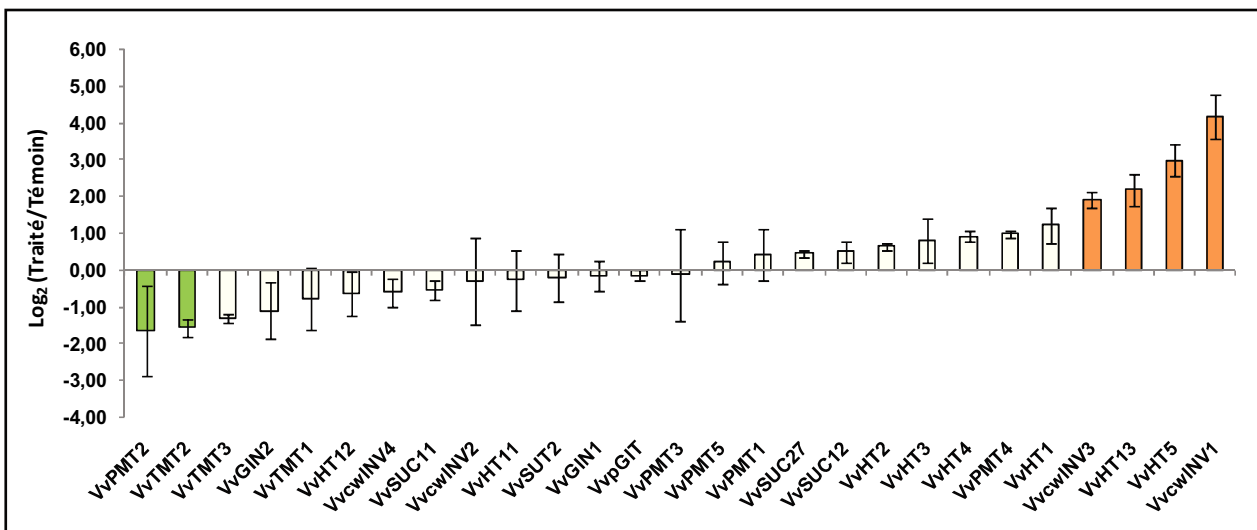


Figure 125 : Expression des gènes de transporteurs de sucres et d'invertases dans les cellules de Chardonnay traitées avec du dialysat de culture de *B. cinerea*. Les cellules de vigne ont été élicitées au 6^{ème} jour de culture par du dialysat de culture de *Botrytis* (1,22 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Après extraction des ARNs totaux, l'expression des différents gènes de transporteurs de sucres et d'invertases a été analysée à 4 hpi par macroarrays. Après 48 h d'exposition, les signaux ont été quantifiés puis normalisés par rapport à la moyenne des signaux correspondant aux 4 gènes de référence. Les triplicatas de chaque ADNc ont été moyennés et les résultats sont présentés comme le rapport d'expression de la condition « traité » par rapport au « témoin » et représenté en Log_2 . Un gène a été considéré comme induit si $\text{Log}_2 > 1,5$ (orange) et réprimé si $\text{Log}_2 < 1,5$ (vert). Les résultats sont représentatifs de trois répétitions biologiques indépendantes.

L'analyse d'expression du gène *VvPR3* confirme cependant que l'infection par des conidies de *Botrytis* déclenche des réactions de défense puisque une induction du gène est observée dès 4 hpi jusqu'à 24 hpi avec des facteurs d'induction respectifs de 2,44 et 53,45 fois. Le dialysat ainsi que l'ergostérol induisent également la transcription de *VvPR3* avec des valeurs d'induction respectives de 4,46 et 2,59 fois à 8 hpi, relativement proches des valeurs obtenues par macroarrays (3,29 et 2,88 fois). Tout comme précédemment observé avec les conidies de *Botrytis*, l'induction de *VvPR3* est maximale à 24 hpi en réponse au dialysat. L'endoPG, bien qu'induisant l'accumulation des transcrits *VvPR1* pour une concentration de $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ne semble cependant pas provoquer de modifications d'expression de *VvPR3* dans nos conditions expérimentales.

Ces résultats obtenus par Northern blot, confirment donc la mise en place de mécanismes de défense dans les cellules de vigne infectées par *B. cinerea* ou traitées par différents éliciteurs fongiques. Ces défenses semblent, entre autres, impliquer certains types de PR-protéines dont les classes 1 et 3.

2. Recherche de gènes codant pour des transporteurs de sucres et des invertases différentiellement exprimés en réponse à une élicitation

2.1. Crible global par macroarrays

Afin de démontrer l'implication des transporteurs de sucres dans la réponse de la vigne à une contrainte biotique, les cellules de Chardonnay ont été, dans un premier temps, élicitées à l'aide du dialysat de culture de *Botrytis*. En supposant que, d'un point de vue métabolique, la réponse des transporteurs de sucres pouvait légèrement précéder l'induction des gènes de défense, l'analyse par macroarrays a été effectuée à 4 hpi suivant la démarche évoquée précédemment. La figure 124 correspond aux membranes obtenues après révélation pour les deux conditions témoin (A) et traité (B). Au sein de chaque membrane, l'intensité des signaux apparaît relativement homogène entre les 3 triplicats d'un même gène alors qu'elle varie entre les différents gènes étudiés. En ne considérant que la condition témoin, cette dernière observation montre bien que tous les gènes de transporteurs de sucres ne sont pas exprimés constitutivement au sein de la suspension cellulaire.

La figure 125 représente le rapport d'expression traité/témoin exprimé en Log_2 pour chaque gène de transporteurs de sucres et d'invertases. Les résultats montrent que l'expression des 4 gènes *VvcwINV1*, *VvHT5*, *VvHT13* et *VvcwINV3* est induite 4 heures après élicitation avec des facteurs d'induction respectifs de 18,05 ; 7,94 ; 4,53 et 3,74 fois

Tableau 28 : Rapports d'expression des gènes de transporteurs de sucres et d'invertases obtenus par macroarrays. (+) : facteur d'induction, (-) : facteur de répression.

Gènes	Log ₂ moyen (Traité/Témoin)	Facteur moyen d'expression	Gènes	Log ₂ moyen (Traité/Témoin)	Facteur moyen d'expression
<i>VvcwINV1</i>	4,17 ± 0,58	(+) 18,05	<i>VvpGIT</i>	- 0,14 ± 0,16	(-) 1,10
<i>VvHT5</i>	2,99 ± 0,45	(+) 7,94	<i>VvGIN1</i>	- 0,16 ± 0,39	(-) 1,12
<i>VvHT13</i>	2,18 ± 0,44	(+) 4,53	<i>VvSUT2</i>	- 0,19 ± 0,65	(-) 1,14
<i>VvcwINV3</i>	1,90 ± 0,21	(+) 3,74	<i>VvHT11</i>	- 0,27 ± 0,83	(-) 1,20
<i>VvHT1</i>	1,22 ± 0,47	(+) 2,33	<i>VvcwINV2</i>	- 0,32 ± 1,18	(-) 1,25
<i>VvPMT4</i>	0,98 ± 0,08	(+) 1,98	<i>VvSUC11</i>	- 0,54 ± 0,26	(-) 1,45
<i>VvHT4</i>	0,92 ± 0,14	(+) 1,89	<i>VvcwINV4</i>	- 0,60 ± 0,40	(-) 1,52
<i>VvHT3</i>	0,81 ± 0,61	(+) 1,76	<i>VvHT12</i>	- 0,63 ± 0,62	(-) 1,55
<i>VvHT2</i>	0,66 ± 0,10	(+) 1,58	<i>VvTMT1</i>	- 0,78 ± 0,82	(-) 1,72
<i>VvSUC12</i>	0,5 ± 0,28	(+) 1,42	<i>VvGIN2</i>	- 1,09 ± 0,77	(-) 2,13
<i>VvSUC27</i>	0,46 ± 0,10	(+) 1,37	<i>VvTMT3</i>	- 1,31 ± 0,11	(-) 2,48
<i>VvPMT1</i>	0,44 ± 0,70	(+) 1,36	<i>VvTMT2</i>	- 1,56 ± 0,24	(-) 2,95
<i>VvPMT5</i>	0,21 ± 0,57	(+) 1,16	<i>VvPMT2</i>	- 1,65 ± 1,24	(-) 3,14
<i>VvPMT3</i>	- 0,12 ± 1,25	(-) 1,09			

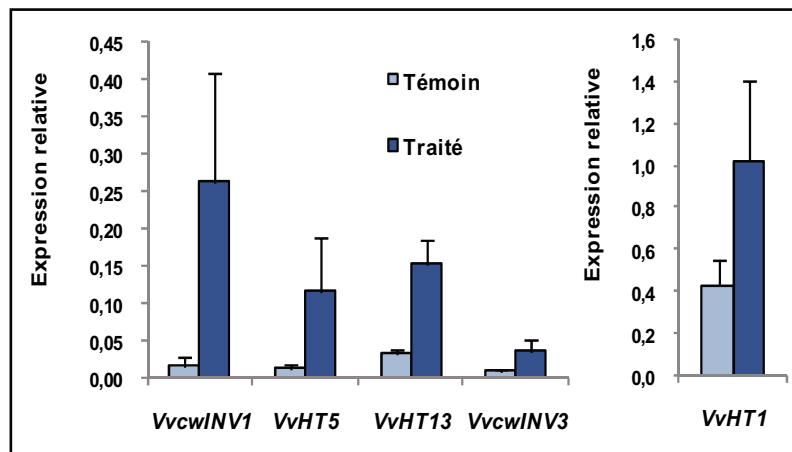


Figure 126 : Analyse de l'expression des gènes candidats sélectionnés par macroarrays. L'analyse macroarray a mis en évidence 5 gènes induits suite au traitement des cellules de vigne par le dialysat de culture de *Botrytis*. Les valeurs d'expression obtenues à 4 hpi en condition « témoin » sont confrontées à celles obtenues en condition « traitée ». Les résultats sont représentatifs de trois répétitions biologiques indépendantes.

(Tableau 28). Un autre gène, *VvHT1*, présente un facteur d'induction plus faible (2,33 fois) légèrement en dessous du seuil de 1,5 en Log₂. Lors de l'analyse des données, il a été observé que l'expression de *VvHT1* était plus élevée en condition standard que les 4 précédents gènes qui ne sont que très faiblement exprimés (Fig. 126). Ceci explique en partie son plus faible facteur d'induction. D'autre part, les gènes *VvPMT2* et *VvTMT2* sont légèrement réprimés en réponse au traitement éliciteur avec une diminution d'expression de 3,14 et 2,95 fois respectivement. De plus, il est intéressant de noter que, dans une moindre mesure, l'expression des gènes *VvTMT1*, *VvTMT3* et *VvGIN2*, dont les protéines correspondantes sont supposées être tonoplastiques, est aussi diminuée suite au traitement avec des facteurs respectifs de répression de 1,72 ; 2,48 et 2,13 fois. Enfin, l'expression des gènes de transporteurs de saccharose (*VvSUC/SUTs*) ainsi que celle de tous les autres gènes de transporteurs d'hexoses, de polyols et d'invertases ne semble pas modifiée dans nos conditions expérimentales.

Dans ce contexte de contrainte biotique, l'induction des gènes de transporteurs d'hexoses *VvHT5*, *VvHT13* et potentiellement *VvHT1* ainsi que des gènes d'invertases *VvcwINV1* et *VvcwINV3* tend à supposer que la stratégie de réponse de la plante se traduit par une modification du métabolisme et du transport des hexoses au niveau du compartiment apoplastique. A première vue, cette réponse semble être majoritairement supportée par *VvHT5* et *VvcwINV1* qui présentent un niveau d'induction plus élevé par rapport aux autres gènes.

2.2. Confirmation de l'induction transcriptionnelle des gènes candidats par Northern blot

Après l'étude globale réalisée à l'aide des macroarrays, le profil d'expression des 5 gènes candidats mis en évidence a été plus finement analysé par Northern blot entre 0 et 24 hpi. Pour compléter les résultats obtenus avec le dialysat de culture de *Botrytis*, deux autres éliciteurs (endoPG et ergostérol) ainsi que le champignon lui-même ont également été utilisés. Pour l'ensemble des traitements éliciteurs testés (Fig. 127), les résultats montrent que l'expression de *VvHT5*, *VvHT13* et *VvcwINV1* est induite dès 2 hpi avec un maximum d'induction entre 4 et 8 hpi. Ces premières observations confirment d'une part l'induction de ces gènes observée par macroarrays, et d'autre part, bien qu'à *posteriori*, la pertinence du temps choisi pour cette analyse (4 hpi). Au niveau de ce point de la cinétique et dans nos conditions expérimentales, les conidies de *Botrytis* semblent être l'éliciteur le plus efficace provoquant l'induction de *VvHT5*, *VvHT13* et *VvcwINV1* d'un facteur de 17,23 ; 5,96 et 44 fois respectivement (Tableau 29).

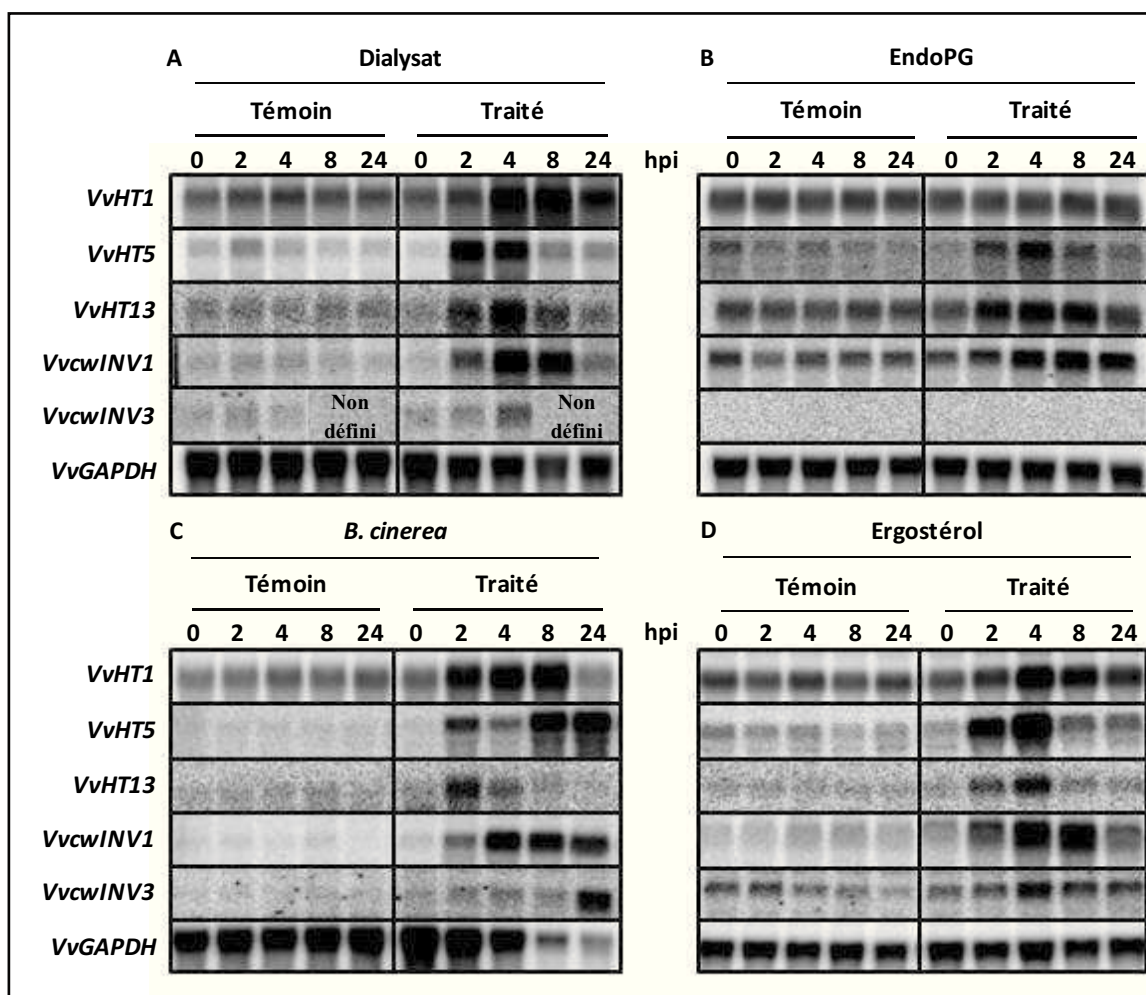


Figure 127 : Analyse par Northern blot du profil d'expression des 5 gènes candidats en réponse à un traitement éliciteur. Les cellules de Chardonnay ont été élicitées au 6^{ème} jour de culture avec (A) du dialysat de culture de *Botrytis* ($1,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$), (B) de l'endopolygalacturonase purifiée ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), (C) des conidies de *Botrytis* ($90000 \text{ conidies.mL}^{-1}$) et (D) de l'ergostérol ($2 \mu\text{M}$). Les ARNs ont été extraits de 0 à 24 hpi et l'expression de *VvHT1*, *VvHT5*, *VvHT13*, *VvcwINV1* et *VvcwINV3* analysée par Northern blot ($20 \mu\text{g}$ par puits). Les membranes ont été exposées 16 h sur écrans PhosphoImager et les signaux correspondant à *VvGAPDH* utilisés comme référence. Les résultats sont représentatifs de deux répétitions biologiques indépendantes.

Tableau 29 : Rapports d'induction de *VvHT1*, *VvHT5*, *VvHT13*, *VvcwINV1* et *VvcwINV3* dans les cellules de Chardonnay en réponse aux différents traitements éliciteurs. Les rapports d'induction transcriptionnelle (traité/témoin) ont été calculés après calibration des signaux par rapport à l'expression de *VvGAPDH*. Les valeurs concernent le point 4 hpi de la cinétique et représentent la moyenne de deux répétitions biologiques indépendantes.

	Dialysat ($1,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	EndoPG ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	Conidies ($90000.\text{mL}^{-1}$)	Ergostérol ($2 \mu\text{M}$)
<i>VvHT1</i>	3,02	1,23	5,70	2,13
<i>VvHT5</i>	14,39	4,31	17,23	7,80
<i>VvHT13</i>	6,28	2,44	5,96	3,83
<i>VvcwINV1</i>	21,06	1,80	44,00	7,85
<i>VvcwINV3</i>	4,37	-	4,25	1,17

Concernant les trois autres éliciteurs utilisés, l'induction des 4 gènes *VvHT5*, *VvHT13*, *VvcwINV1* et *VvcwINV3* est également significativement observée avec le dialysat ; et dans une moindre mesure avec l'ergostérol et l'endoPG (Tableau 29). Comme suspecté lors de l'analyse par macroarrays, l'induction du gène *VvHT1* est plus faible que celle de *VvHT5* et *VvHT13* avec une réponse maximale également observée avec les conidies de *Botrytis* à 4 hpi (5,7 fois). Pour chaque traitement éliciteur, l'intensité des signaux observés en condition témoin confirme que l'expression constitutive de *VvHT1* est plus importante comparée à celle des autres gènes étudiés. L'induction de *VvcwINV3* (3,73 fois) observée par macroarrays suite au traitement par du dialysat est également confirmée par Northern blot (4,37 fois) ainsi qu'avec les conidies de *Botrytis* (4,25 fois). Celle-ci est cependant moindre avec l'ergostérol (1,17 fois) et n'est pas détectée avec l'endoPG. Globalement, les résultats obtenus par Northern blot corroborent les données préliminaires obtenues par macroarrays et révèlent une induction marquée de *VvcwINV1* et *VvHT5* en réponse à une élicitation par des éliciteurs fongiques. A des niveaux plus faibles, *VvHT13*, *VvHT1* et *VvcwINV3* semblent également impliqués dans cette réponse chez les cellules de Chardonnay.

3. Effet d'un traitement éliciteur sur l'activité de transport de sucres

Pour déterminer si l'élicitation des cellules de vigne modifie l'activité de transport de sucres suite à l'induction des gènes de transporteurs, l'absorption de glucose a été mesurée dans les cellules de Chardonnay traitées par des éliciteurs.

3.1. Effet à court terme sur le transport d'hexoses

Nous avons précédemment pu observer que plusieurs gènes de transporteurs d'hexoses étaient induits dans les cellules de vigne entre 2 et 8 hpi en réponse à un traitement éliciteur ou à une infection par *B. cinerea*. Ces résultats suggèrent une probable modification du transport de sucres dans la même échelle de temps. Cependant il est aussi fortement soupçonné que la perception d'une molécule élicitrice puisse induire des modifications précoces du transport de sucres, sans nécessairement modifier l'expression des gènes correspondants. Rappelons que, dans le contexte d'une interaction de type biotique, il est possible que l'agent pathogène tente par divers moyens de concentrer les sucres au point d'infection, en évitant leur absorption par les cellules végétales, afin de favoriser sa croissance. Dans la littérature, le seul exemple existant est celui de la cryptogéine, élicitrine protéique sécrétée par l'oomycète *Phytophthora cryptogea*, capable de bloquer le transport de

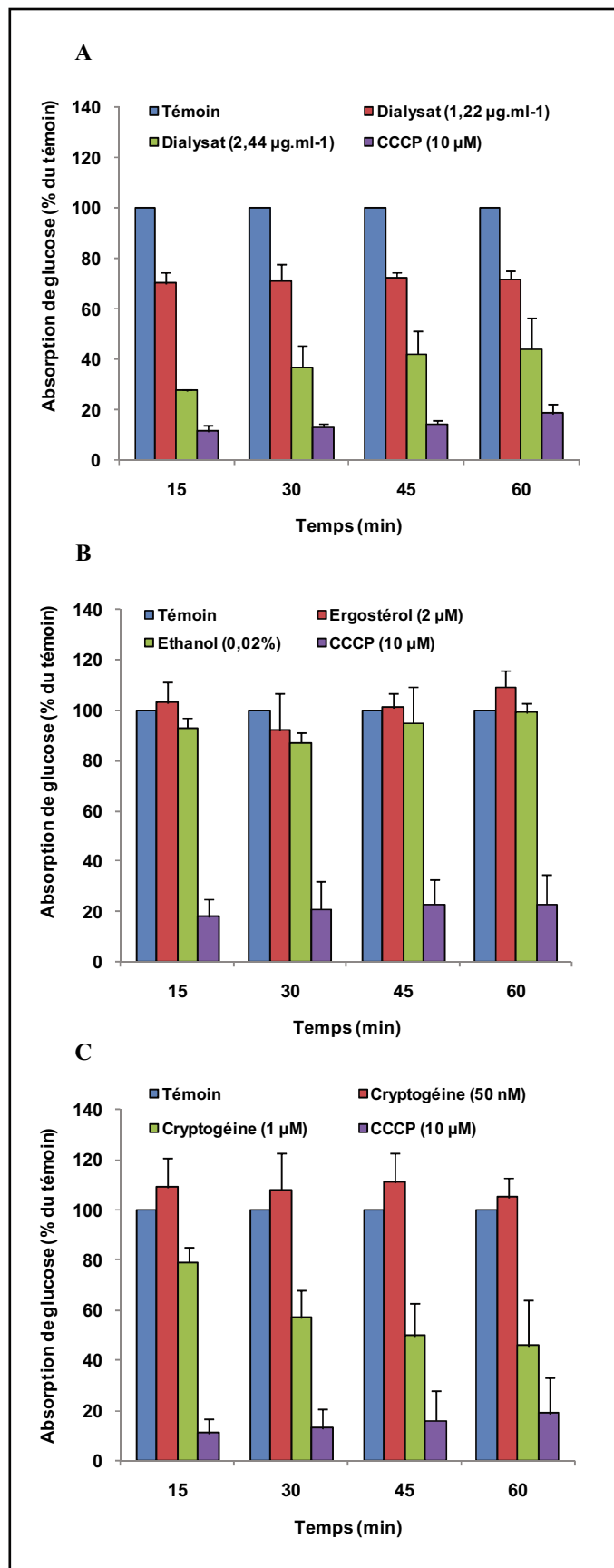


Figure 128 : Absorption de glucose par les cellules de Chardonnay traitées par différents éliciteurs. Les mesures d'absorption ont été réalisées sur la suspension cellulaire de Chardonnay traitée par différents éliciteurs. Ces mesures ont été effectuées sur une cinétique de 60 min en présence de glucose-³H (0,2 mM ; 18,5 MBq.mmol⁻¹). Pour chaque traitement, les résultats sont représentatifs de trois répétitions biologiques indépendantes et représentés en pourcentages par rapport à la condition témoin.

A. Dialysat de culture de *B. cinerea*.

Valeurs moyennes d'absorption du témoin en nmoles.g⁻¹ cellules sèches : 1429 ± 115 (15 min) ; 3562 ± 243 (30 min) ; 6107 ± 384 (45 min) ; 7847 ± 618 (60 min).

B. Ergostérol.

Valeurs moyennes d'absorption du témoin en nmoles.g⁻¹ cellules sèches : 2561 ± 858 (15 min) ; 5367 ± 1461 (30 min) ; 8774 ± 2296 (45 min) ; 11712 ± 2854 (60 min).

C. Cryptogéine.

Valeurs moyennes d'absorption du témoin en nmoles.g⁻¹ cellules sèches : 1641 ± 175 (15 min) ; 3332 ± 493 (30 min) ; 5108 ± 888 (45 min) ; 6592 ± 1754 (60 min).

glucose dans des suspensions cellulaires de tabac (Bourque *et al.*, 2002). Afin d'analyser si un tel éliciteur protéique pouvait conduire au même effet chez la vigne, les cellules ont été traitées à l'aide du dialysat de culture de *Botrytis* ainsi qu'avec de la cryptogéine, celle-ci pouvant constituer une référence positive. Parallèlement, l'ergostérol, stérol fongique général, a également été utilisé. Pour chaque traitement éliciteur, l'activité de transport du glucose a été étudiée dans les cellules de Chardonnay sur une échelle de temps courte de 0 à 60 min.

La figure 128 présente les résultats d'absorption obtenus. La comparaison des profils d'absorption des cellules témoins et traitées avec le carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) montre dans un premier temps que la majorité du glucose absorbé est bien la résultante d'un transport actif. En effet, le protonophore, qui élimine le gradient de proton, induit une inhibition du transport de sucre d'environ 80% (Tableau 30), celle-ci étant relativement maintenue au cours des 60 min d'expérience. L'absorption résiduelle observée au cours de la cinétique correspond à la constante diffusible, non affectée par le traitement éliciteur.

Nous pouvons observer que le dialysat de culture de *B. cinerea* induit une inhibition du transport de glucose pour une concentration de $1,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 128 A). Cette inhibition, qui est observée dès 15 min de traitement, atteint environ 30% et semble globalement se maintenir au cours de la cinétique. Un effet dose est également observé avec cet éliciteur puisque l'inhibition du transport est augmentée lors des traitements à $2,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A cette dernière concentration, l'inhibition moyenne atteint 63% considérant l'ensemble de la cinétique. A défaut de pouvoir utiliser l'endoPG purifiée lors de mesures d'absorption (quantité disponible insuffisante), il semble que le dialysat de culture du champignon contienne un ou plusieurs éliciteurs capables d'inhiber rapidement le transport de glucose.

Parallèlement à l'utilisation du dialysat, l'effet de l'ergostérol (éliciteur général) sur le transport de sucre a également été étudié. Dilué dans l'éthanol et testé à une concentration de $2 \mu\text{M}$, l'ergostérol ne semble pas induire de modification marquée du transport de glucose au cours des 60 min d'absorption (Fig. 128 B). Aucune modification n'est également mise en évidence dans le témoin éthanol 0,02%. Ces données indiquent donc qu'un éliciteur général tel que l'ergostérol n'induit pas d'inhibition du transport de glucose contrairement au dialysat de culture de *Botrytis*.

Testée à une concentration de 50 nM, la cryptogéine ne semble pas induire de modification du transport (Fig. 128 C) ; cependant, une inhibition de l'influx de glucose peut être observée lorsque cette élicitine est utilisée à $1 \mu\text{M}$. En effet, dès 15 min de traitement, le transport dans les cellules traitées est réduit de 21%, cette inhibition atteignant 54% au terme

Tableau 30 : Pourcentages d'inhibition du transport de glucose observés avec les différents éliciteurs testés. Pour chaque traitement éliciteur et chaque point de la cinétique, l'inhibition du transport de glucose est présentée en pourcentage par rapport à la condition témoin. La dernière colonne représente le pourcentage moyen d'inhibition du transport sur l'ensemble de la cinétique. Pour chaque traitement éliciteur, les résultats sont représentatifs de trois répétitions biologiques indépendantes. Le pourcentage inhibiteur du CCCP est représentatif de douze répétitions biologiques indépendantes.

	15 min	30 min	45 min	60 min	Moyenne
Dialysat (1,22 $\mu\text{g.ml}^{-1}$)	30 \pm 5	29 \pm 7	28 \pm 2	28 \pm 3	29 \pm 4
Dialysat (2,44 $\mu\text{g.ml}^{-1}$)	72 \pm 1	63 \pm 9	58 \pm 9	56 \pm 13	63 \pm 10
Ergostérol (2 μM)	0	8	0	0	0
Cryptogéine (50 nM)	0	0	0	0	0
Cryptogéine (1 μM)	21 \pm 6	43 \pm 11	50 \pm 13	54 \pm 18	42 \pm 17
CCCP (10 μM)	85 \pm 5	82 \pm 6	80 \pm 6	79 \pm 3	81 \pm 5

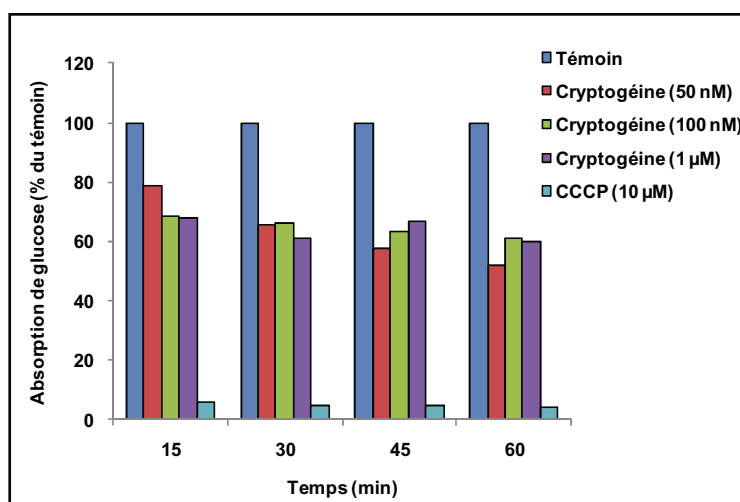


Figure 129 : Absorption de glucose par les cellules de tabac traitées par la cryptogéine. Les mesures d'absorption ont été réalisées sur la suspension cellulaire de tabac (BY2) traitée par différentes concentrations de cryptogéine. Ces mesures ont été effectuées sur une cinétique de 60 min en présence de glucose- ^3H (0,2 mM ; 18,5 MBq.mmol $^{-1}$). Les valeurs d'absorption sont représentées en pourcentages par rapport à la condition témoin. Valeurs moyennes d'absorption du témoin en nmoles.g $^{-1}$ cellules sèches : 3153 \pm 2050 (15 min) ; 6541 \pm 4090 (30 min) ; 10228 \pm 6544 (45 min) ; 14773 \pm 9111 (60 min).

Tableau 31 : Pourcentages d'inhibition du transport de glucose provoquée par la cryptogéine sur cellules de tabac. Pour chaque traitement et chaque point de la cinétique, l'inhibition du transport de glucose est présentée en pourcentage par rapport à la condition témoin. La dernière colonne représente le pourcentage moyen d'inhibition du transport sur l'ensemble de la cinétique. Le pourcentage inhibiteur du CCCP est représentatif de trois répétitions biologiques indépendantes.

	15 min	30 min	45 min	60 min	Moyenne
Cryptogéine (50 nM)	21	34	42	48	36
Cryptogéine (100 nM)	31	34	37	39	35
Cryptogéine (1 μM)	32	39	33	40	36
CCCP (10 μM)	94	95	95	96	95

de 60 min d'élicitation. Sur l'ensemble de la cinétique de transport et dans ces conditions expérimentales, les données obtenues situent le potentiel inhibiteur de la cryptogéine aux alentours de 42% pour une concentration de 1 μM (Tableau 30).

3.2. Comparaison de l'efficacité d'inhibition du transport de glucose par la cryptogéine sur cellules de vigne et de tabac

La cryptogéine provoquant la mise en place de réactions de défenses ainsi qu'une inhibition du transport de glucose sur cellules de tabac (Bourque *et al.*, 2002), nous avons voulu déterminer si dans nos conditions expérimentales, la cryptogéine pouvait avoir la même efficacité sur vigne que sur tabac. Ainsi, des mesures d'absorption de glucose- ^3H ont été effectuées dans des suspensions cellulaires de tabac (BY2) traitées par différentes concentrations de cryptogéine. Les résultats montrent qu'un traitement des cellules de tabac par la cryptogéine induit bien une inhibition du transport de glucose dès 50 nM (Fig. 129). L'effet de l'éliciteur semble quasi maximum à 50 nM puisque, globalement, une augmentation de sa concentration à 500 nM et 1 μM ne semble pas augmenter l'effet d'inhibition du transport. Cette observation tendrait à dire que chez le tabac, la perception de la cryptogéine est un phénomène saturable. Ainsi, sur l'ensemble des points de la cinétique d'absorption, la cryptogéine induit une réduction de l'influx de glucose d'environ 35% (Tableau 31), celle-ci se maintenant au cours des 60 minutes de mesures. Le transport mesuré correspond bien à un transport actif dépendant du gradient de protons puisque une inhibition de 95% peut être observée en présence de CCCP.

Une comparaison des effets d'inhibition provoqués par la cryptogéine sur suspensions cellulaires de vigne et de tabac révèle qu'à 1 μM , l'éliciteur a le même effet sur les cellules des deux espèces (Tableau 32). Après 15 min de traitement, il semblerait même que l'inhibition du transport de glucose soit légèrement supérieure dans la suspension de cellules de Chardonnay. Cependant, les cellules de tabac restent beaucoup plus sensibles à la cryptogéine puisque une concentration de 50 nM suffit à provoquer une inhibition du transport de glucose alors qu'il faut atteindre 1 μM pour observer un effet comparable sur vigne.

En considérant l'ensemble des données d'absorption obtenues sur une cinétique courte, deux éliciteurs, le dialysat de culture de *Botrytis* et la cryptogéine, sont capables d'inhiber l'influx de glucose dans les cellules de vigne de façon relativement précoce. Dans notre contexte biologique, ce blocage du transport pourrait être une stratégie de l'agent pathogène pour maintenir les sucres, notamment les hexoses, dans l'apoplaste.

Tableau 32 : Comparaison du pourcentage inhibiteur de la cryptogéine sur cellules de vigne et de tabac. Les valeurs représentent les pourcentages d'inhibition du transport par rapport aux cellules témoins. Les deux suspensions cellulaires ont été traitées avec 1 μM de cryptogéine.

	15 min	30 min	45 min	60 min	Moyenne
Vigne (Chardonnay)	21	43	50	54	42
Tabac (BY2)	32	39	33	40	36

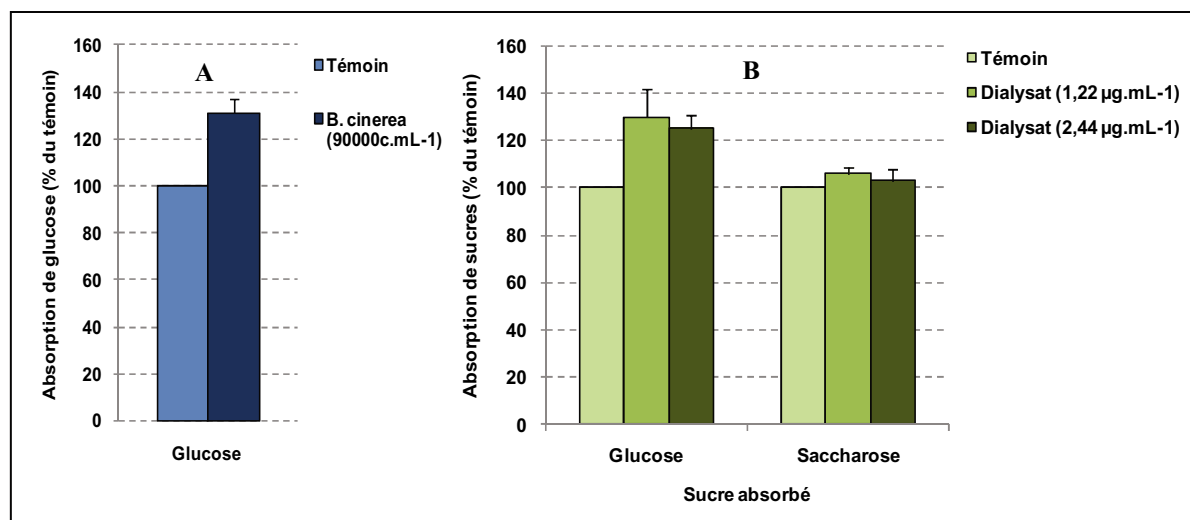


Figure 130 : Induction du transport de sucres en réponse à un traitement éliciteur. Les mesures d'absorption ont été réalisées sur la suspension cellulaire de Chardonnay traitée par *B. cinerea* et le dialysat de culture du champignon. Ces mesures ont été effectuées à 4 hpi en présence de glucose-³H (0,2 mM ; 18,5 MBq.mmol⁻¹) ou de saccharose-¹⁴C (0,2 mM ; 712,5 kBq.mmol⁻¹). Pour chaque traitement, les résultats sont représentés en pourcentages par rapport à la condition témoin. **A.** *B. cinerea*. Valeur moyenne d'absorption du témoin en nmoles.g⁻¹ cellules sèches : 3491 ± 1178. Avant la conversion des unités en nmoles de glucose absorbées, la valeur de DPM correspondant à l'absorption du champignon seul a été déduite à la valeur de DPM correspondant aux cellules infectées. **B.** Dialysat de culture de *B. cinerea*. Valeur moyenne d'absorption du témoin en nmoles.g⁻¹ cellules sèches : 6102 ± 2135 (glc) et 15497 ± 4238 (sacch). Les résultats obtenus sont représentatifs de trois répétitions biologiques indépendantes.

Tableau 33 : Pourcentages d'induction du transport de sucres après infection et élicitation des cellules de Chardonnay. Pour chaque traitement, l'induction du transport de sucre à 4 hpi est présentée en pourcentage par rapport au témoin. Résultats représentatifs de trois répétitions biologiques indépendantes.

	Glucose	Saccharose
<i>B. cinerea</i> (90000 conidies.mL ⁻¹)	31 ± 6	-
Dialysat (1,22 µg.mL ⁻¹)	30 ± 12	6 ± 3
Dialysat (2,44 µg.mL ⁻¹)	25 ± 6	3 ± 5

3.3. L'induction des gènes de transporteurs de sucres lors d'un traitement éliciteur a-t-elle un impact sur l'activité de transport ?

3.3.1. Effet sur le transport de glucose

L'analyse de l'expression des gènes de transporteurs de sucres en réponse à un traitement éliciteur a montré l'induction de trois gènes de transporteurs d'hexoses (*VvHT1*, *VvHT5*, *VvHT13*) parallèlement à l'induction de plusieurs gènes de défense. Afin de déterminer si l'induction transcriptionnelle de ces gènes conduit à une augmentation de l'activité de transport, la quantité de sucres absorbée par les cellules élicitées a été déterminée et comparée à celle des cellules témoins. Pour chaque traitement éliciteur testé jusqu'à présent, l'augmentation du nombre de transcrits étant détectable dès 2 hpi avec un maximum aux alentours de 4 hpi, les mesures d'absorption ont été effectuées à 4 hpi. Notre analyse s'est focalisée sur l'action du dialysat de culture de *Botrytis* qui s'est montré capable d'inhiber le transport de glucose en phase préliminaire de l'élicitation et d'induire certains gènes de transporteurs en phase plus tardive (dès 2 hpi). Parallèlement, des conidies de *Botrytis* ont également été utilisées afin d'effectuer une comparaison agent pathogène/éliciteur.

La figure 130 A présente les résultats d'absorption de glucose obtenus avec les conidies de *Botrytis* ($90000.\text{mL}^{-1}$). La part d'absorption du champignon a été retranchée à celle des cellules infectées afin de ne considérer que l'absorption des cellules de vigne (DPM soustraites avant la conversion des unités en nmoles de glucose). Même si cette méthode est approximative, il semble cependant que l'infection des cellules induise une augmentation d'environ 30% du transport de glucose à 4 hpi (Tableau 33). L'utilisation du dialysat de culture, qui permet de s'affranchir de la biologie du champignon, a alors permis de confirmer ces premiers résultats. En effet, une augmentation de 30% du transport de glucose est également observée dans les cellules traitées avec le dialysat par rapport aux cellules témoins (Fig. 130 B, Tableau 33). L'effet de l'éliciteur est maximum à $1,22 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ puisqu'une augmentation de sa concentration ($2,44 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) ne conduit pas à une augmentation de l'intensité de réponse. Les résultats obtenus avec le dialysat de culture et le champignon sont cependant cohérents, les deux traitements induisant une augmentation de l'activité de transport de glucose d'environ 29% en moyenne.

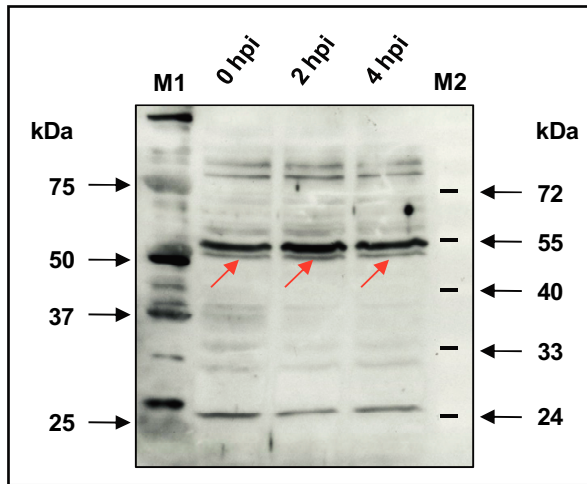


Figure 131 : Accumulation de la protéine VvHT1 dans les cellules de Chardonnay traitées par du dialysat de culture de *B. cinerea*. Après extraction des protéines totales, les fractions microsomales ont été isolées par ultracentrifugation. Les fractions (25 µg) ont été séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes puis transférées sur membrane. La membrane a été hybridée avec l'anticorps anti-VvHT1 (1/3000^{ème}) puis révélée par la méthode ECL Plus. **M1** : marqueur de taille PPPS ; **M2** : marqueur de taille PPL (Eurogentec). Résultats représentatifs de deux répétitions biologiques indépendantes.

3.3.2. Accumulation de la protéine VvHT1 dans les cellules de Chardonnay traitées par du dialysat de culture de *Botrytis*

L'ensemble des données précédemment obtenu a montré une induction transcriptionnelle de plusieurs transporteurs d'hexoses sous l'effet d'une élicitation, conduisant à une augmentation de l'activité de transport de glucose dans les cellules de vigne. Parmi ces gènes régulés, *VvHT1* s'est révélé être un candidat potentiel, la protéine duquel pourrait participer à l'augmentation de l'influx de sucre observée dans les cellules élicitées. Disposant d'un anticorps anti-VvHT1 au laboratoire, nous avons voulu vérifier si l'augmentation des transcrits du gène se traduisait par une accumulation de la protéine correspondante. Pour cela, un Western blot a été réalisé avec des fractions microsomales obtenues à partir de cellules élicitées par du dialysat de culture de *Botrytis* à 0, 2 et 4 hpi.

La détection de plusieurs bandes sur le film autoradiographique obtenu après révélation (Fig. 131) montre que l'anticorps anti-VvHT1 n'est pas ou peu spécifique du transporteur de sucres. Cependant, sur l'ensemble des protéines détectées dans chaque puits, une bande de masse moléculaire estimée à 52-53 kDa pourrait correspondre à la protéine VvHT1 (52 kDa). De façon intéressante, cette bande n'est pas la plus intense, les signaux les plus importants étant détectés pour une bande située à 55 kDa. Jugée de masse moléculaire trop importante pour correspondre à VvHT1, cette dernière bande de 55 kDa n'a pas été considérée. Ainsi, nous avons choisi de comparer l'intensité des bandes protéiques d'environ 52 kDa entre les trois points de la cinétique. Cependant, les observations montrent que l'intensité de cette bande ne semble pas varier entre 0 et 4 hpi malgré l'induction transcriptionnelle de *VvHT1* observée par macroarrays et en Northern blot. La protéine VvHT1 ne semble donc pas s'accumuler sur la membrane des cellules de vigne suite au traitement par du dialysat de culture de *Botrytis*.

3.3.3. Effet du dialysat de culture de *Botrytis* sur le transport de saccharose

Parallèlement à l'induction de certains gènes de transporteurs d'hexoses suite à un traitement par du dialysat de culture, nos précédents résultats ont également mis en évidence une induction des gènes d'invertases *VvcwINV1* et *VvcwINV3*. Afin de pouvoir corrélérer cette induction à une éventuelle augmentation de l'activité hydrolytique du saccharose et par conséquent à un influx plus rapide des hexoses dans les cellules traitées, une mesure d'absorption de sucres a été effectuée à 4 hpi en présence de saccharose-¹⁴C comme source de carbone. Contrairement à l'augmentation marquée de l'influx de glucose (~30%) observée

dans les cellules élicitées avec le dialysat, aucune augmentation significative de l'activité de transport de sucres n'est observée avec le saccharose quelque soit la concentration en éliciteur utilisée (Fig.130 B). Bien que ces résultats ne permettent pas de confirmer la synthèse d'invertases actives par les cellules élicitées, ils confirmeraient cependant que les gènes de transporteurs de saccharose ne sont pas induits par le traitement.

4. Discussion

Après avoir mis en évidence l'induction transcriptionnelle du gène de transporteur d'hexose *VvHT5* et du gène d'invertase pariétale *VvcwINV1* sur plante entière en réponse à *B. cinerea* et *E. nectaror*, nous avons voulu montrer que l'induction de ces gènes conduisait à une augmentation de l'activité de transport au sein des cellules. Pour des raisons pratiques et afin de maîtriser plus finement les paramètres d'infection/élicitation ainsi que les mesures d'absorption de sucres radioactifs, nous avons choisi de travailler avec des éliciteurs sur un modèle de suspension cellulaire de vigne. L'utilisation de ces éliciteurs tels que l'ergostérol ou l'endopolygalacturonase (endoPG) de *B. cinerea* n'a cependant pas exclu l'utilisation de l'agent pathogène lui-même. *Erysiphe necator* étant un ectoparasite biotrophe strict ne pouvant être inoculé en culture liquide, nous avons donc focalisé notre étude sur *Botrytis cinerea*. De plus, étant limités dans la quantité d'endoPG disponible au laboratoire, un dialysat de culture de *B. cinerea* (souche 112T) a été réalisé. Bien que le dialysat obtenu soit un mélange protéique, son analyse a révélé qu'il contenait certainement l'endoPG du champignon. Celui-ci a donc été utilisé comme éliciteur primaire.

4.1. Des éliciteurs fongiques ainsi que des conidies de *B. cinerea* induisent l'expression de gènes de défense dans les suspensions cellulaires de vigne

La technique des macroarrays a été utilisée afin d'étudier l'expression de plusieurs gènes de PR-protéines (PR1, 3, 5, 6, 7, 9, 10) ainsi que des gènes codant pour la phénylalanine ammonia lyase (*VvPAL*) et un inhibiteur de polygalacturonase (*VvPGIP*). Les résultats obtenus après l'élicitation des cellules de vigne avec du dialysat ($1,22\mu\text{g.mL}^{-1}$) ou de l'ergostérol ($2\mu\text{M}$) ont révélé une induction de plusieurs gènes de PR-protéines (PR1, 3, 7 et 9) ainsi que de *VvPAL* et *VvPGIP* à 8 heures post-inoculation. Afin d'affiner et de compléter ces résultats, l'expression des gènes *VvPR1* et *VvPR3*, tous deux induits dans les feuilles de vigne en réponse à *Botrytis*, a été analysée par Northern Blot en réponse au dialysat, à l'ergostérol mais également en réponse à l'endoPG purifiée et au champignon lui-même.

Cette analyse a permis de confirmer l'accumulation des transcrits des deux gènes de PR-protéines en réponse aux traitements éliciteurs ainsi qu'aux conidies du champignon. Considérant l'ensemble des données obtenues par les techniques de macroarrays et de Northern blot, nous en avons conclu que les éliciteurs étaient perçus par les cellules de vigne, et qu'ils induisaient bien la mise en place de réactions de défense dans notre système cellulaire. Dans la littérature, de nombreuses études menées à l'aide d'éliciteurs fongiques corroborent nos résultats obtenus avec les cellules de Chardonnay.

L'endopolygalacturonase (BcPG1) est une glycoprotéine d'environ 40 kDa capable de dégrader *in vitro* l'acide galacturonique (constituant pariétal) en sucres réducteurs (Poinssot *et al.*, 2003). Bien que cette enzyme puisse générer des oligogalacturonides (OGAs) inducteurs de l'expression de gènes de défense (PAL, stilbène synthase et chitinases par exemple) (Aziz *et al.*, 2004), il a été démontré que la protéine elle-même constituait un éliciteur indépendamment de son activité enzymatique. Elle serait donc reconnue par un récepteur de la cellule végétale. Dans des suspensions cellulaires de vigne (Gamay), une étude a montré qu'un traitement par l'endoPG conduisait à l'induction de plusieurs gènes de défense incluant la PAL, la stilbène synthase ainsi que l'inhibiteur de polygalacturonase PGIP (Poinssot *et al.*, 2003). Dans ces cellules, l'induction des gènes de la voie des phénylpropanoïdes a conduit à la production de resvératrol extracellulaire ainsi qu'à l'accumulation d' ϵ -viniférine au niveau intracellulaire. Dans les cellules de Chardonnay, l'induction des deux gènes *VvPAL* et *VvPGIP* suite au traitement par le dialysat de culture de *Botrytis* a également été observée. Ceci pourrait confirmer d'une part la présence de l'endoPG au sein du dialysat, et suggérerait d'autre part la production de phytoalexines par les cellules, cohérente avec celle observée dans les feuilles de vitoplants infectées par *B. cinerea*. De plus, Bézier *et al.* (2002), ont également montré une induction des gènes *PAL*, *StSy* (stilbène synthase) et *PGIP* dans les feuilles de Chardonnay infectée par le champignon.

Comme mentionné précédemment, l'induction du gène *PGIP* (Polygalacturonase Inhibitor Protein) est également impliquée dans la mise en place des réactions de défense. Les PGIPs sont des protéines apoplastiques ubiquistes (De Lorenzo et Ferrari, 2002) qui interféreraient avec la pénétration des champignons en inhibant leurs enzymes de dégradation de la paroi, les endopolygalacturonases (Bézier *et al.*, 2002). Induits dans les cellules de vigne en réponse à un traitement par du dialysat de culture de *Botrytis*, ou par l'endoPG (Poinssot *et al.*, 2003), les gènes codant pour les PGIPs sont également induits en réponse à un traitement par des OGAs (oligogalacturonides) ou des cellodextrines, des fragments pectiques et celluloses de la paroi (Aziz *et al.*, 2004, 2007). Nos résultats indiqueraient de

plus qu'ils sont induits par l'ergostérol (2 μ M) mais l'importante variabilité d'expression de *VvPGIP* en réponse à cet éliciteur tendrait à nuancer cette observation. Chez les plantes, plusieurs études montrent que les PGIPs pourraient avoir un rôle important dans la résistance à *B. cinerea*. Chez *Arabidopsis*, la surexpression des deux gènes *AtPGIP1* et *AtPGIP2* conduit à une réduction des symptômes provoqués par le champignon (Ferrari *et al.*, 2003). Chez la tomate, la surexpression d'un gène *PGIP* de la pêche abouti à des résultats similaires sur feuille et sur fruit (Powell *et al.*, 2000). Manfredini *et al.* (2005) ont également montré que *PvPGIP2* (*P. vulgaris*) inhibait efficacement l'endopolygalacturonase BcPG1 de *Botrytis*, et que sa surexpression chez *Arabidopsis* et le tabac réduisait la colonisation des feuilles par le champignon. Outre le fait de montrer l'importance que peuvent avoir les PGIPs dans les interactions plantes/*Botrytis*, ces résultats ont permis de confirmer que BcPG1 était un facteur essentiel à la pleine virulence de *Botrytis* (ten Have *et al.*, 1998).

Concernant l'induction de gènes codant pour des PR-protéines en réponse aux éliciteurs fongiques, il a été montré que l'endoPG induisait l'expression d'un gène de PR2 (glucanase) ainsi que l'accumulation de transcrits PR14 (LPTs) dans des suspensions cellulaires de Gamay et 41B (*V. vinifera* x *V. berlandieri*) respectivement (Gomès *et al.*, 2003 ; Poinssot *et al.*, 2003). Deux éliciteurs oligosaccharidiques purifiés à partir de *B. cinerea*, la botrycine et la cinéreuse, induisent également un grand nombre de gènes codant pour des PR-protéines (PR1, PR2, PR3, PR8 et PR9) dans des cultures cellulaires de Limberger (Repka, 2002, 2006). L'ergostérol, éliciteur fongique non spécifique, induit l'accumulation de transcrits de PR14 (LTPs) dans les cellules de 41B (Gomès *et al.*, 2003). Notons également que, sur plante, cet éliciteur induit l'expression du gène *VvLTP1* dans les feuilles d'Ugni Blanc (Laquitaine *et al.*, 2006). Chez le tabac, l'ergostérol induit une forte accumulation de transcrits *PR1*, ainsi que de transcrits *PR3* et *PR5* de façon moindre (Lochman et Mikes, 2006). L'accumulation de transcrits *PR3* est également observée en réponse à la cryptogéine chez le tabac (Lamotte *et al.*, 2004). Bien que toutes les classes de PR-protéines n'aient pas été analysées au cours de notre étude, nous avons cependant mis en évidence l'induction des gènes *VvPR1*, *VvPR3* et *VvPR9* dans les cellules de vigne en réponse au dialysat de culture de *Botrytis* ainsi qu'à l'ergostérol. Nous avons de plus confirmé l'induction des gènes *VvPR1* et *VvPR3* dans les cellules suite à l'inoculation de conidies du champignon. L'expression des gènes *VvPR5*, *VvPR7* et *VvPR10* n'a pas été induite suite aux traitements éliciteurs (dialysat et ergostérol) ce qui corrobore les résultats obtenus sur plantes entières. Ces trois gènes ne seraient pas impliqués dans la réponse de la vigne à *B. cinerea*.

Considérant l'ensemble de ces données, nous avons d'une part montré que les éliciteurs induisaient la mise place de réactions de défense dans les cellules de vigne en suspension, et d'autre part que l'utilisation de ces molécules pouvait constituer une bonne alternative à l'utilisation du champignon lui-même.

4.2. Induction des gènes codant pour des transporteurs de sucres et des invertases en réponse à une élicitation

La technique de macroarrays a été utilisée afin d'analyser de façon exhaustive l'expression des gènes de transporteurs de sucres et d'invertases dans les cellules élicitées. Dans un premier temps, cette analyse a été ciblée sur l'expression de ces gènes en réponse au dialysat de culture de *Botrytis cinerea*. Les résultats obtenus ont permis d'identifier 5 gènes candidats, trois gènes de transporteurs d'hexoses, *VvHT1*, *VvHT5* et *VvHT13*, ainsi que deux gènes d'invertases pariétales, *VvcwINV1* et *VvcwINV3*, induits en réponse à l'éliciteur 4 heures après l'inoculation. Les gènes *VvcwINV1* et *VvHT5* se sont révélés être les plus induits en réponse au traitement suivi de *VvHT13*, *VvcwINV3* et *VvHT1* respectivement. Ne considérant que les cellules non élicitées (témoins), l'analyse de l'expression du gène *VvHT1* a révélé qu'il était, en moyenne, 19 fois plus exprimé que les gènes *VvHT5* et *VvHT13*, ce qui pourrait expliquer son plus faible niveau d'induction en réponse au dialysat de culture. L'expression des 5 gènes candidats a été analysée plus finement par Northern blot. Ceci a non seulement permis de confirmer l'induction transcriptionnelle des 5 gènes candidats en réponse au dialysat de culture mais a également montré que cette réponse était commune à tous les éliciteurs utilisés. De façon générale, l'accumulation des transcrits des gènes étudiés est maximale autour de 4/8 hpi. La vitesse de réponse des cellules de vigne après la perception des éliciteurs coïncide avec celle observée dans les suspensions cellulaires d'*Arabidopsis*, lesquelles induisent l'expression du gène *AtSTP4* dès 2 heures après un traitement par un éliciteur bactérien (*P. syringae*) ou fongique (Truernit *et al.*, 1996). Sur l'ensemble des traitements appliqués aux cellules de vigne, l'induction des gènes *VvcwINV1* et *VvHT5* s'est révélée la plus importante confortant les données préliminaires obtenues à l'aide des macroarrays. L'induction transcriptionnelle des différents gènes de transporteurs de sucres et d'invertases s'est révélée être la plus faible suite au traitement par l'endopolygalacturonase, ce qui pourrait probablement s'expliquer par la faible quantité d'éliciteur ajoutée aux cellules en suspension (0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ soit $\sim 2,5$ nM). En revanche, les conidies de *Botrytis* se sont révélées être l'éliciteur le plus efficace provoquant l'induction des gènes *VvcwINV1* et *VvHT5* de 44 et 17 fois respectivement. Cette réponse transcriptionnelle a pu être corrélée au

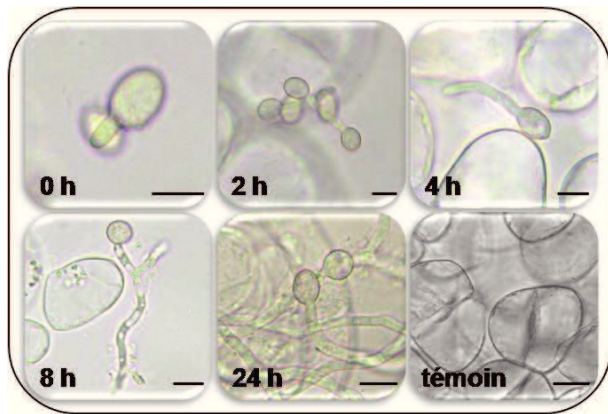


Figure 132 : Observations microscopiques de la croissance de *B. cinerea* dans les cultures cellulaires de vigne. Au cours de la cinétique d'infection des cellules, le développement de *Botrytis* a été observé au microscope (Motic®) en lumière transmise (Trait : 10 µm)

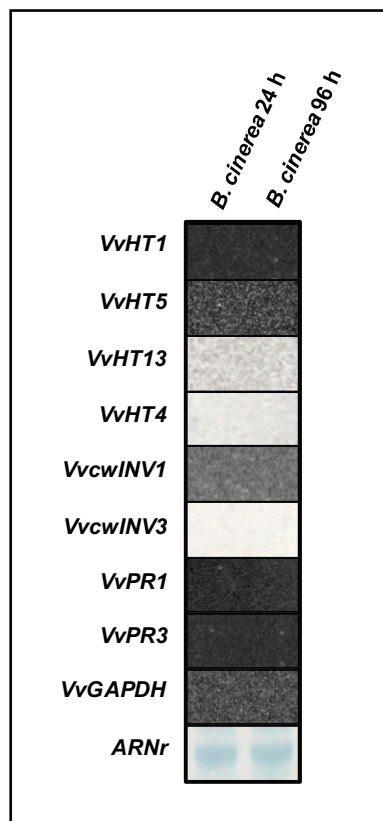


Figure 133 : Hybridation de sondes UTR3' de vigne sur les ARNs de *B. cinerea*. Des conidies de *B. cinerea* (90000 conidies.mL⁻¹) ont été inoculées dans 30 mL de milieu Gamborg B5 liquide additionné d'ANA. Après 24 et 96 h de croissance, le mycélium a été filtré puis broyé dans de l'azote liquide afin d'en extraire les ARNs totaux par la méthode de Chang *et al.* (1993). Après migration en conditions dénaturantes et transfert sur membrane de nylon, les ARNs de *Botrytis* ont été hybridés avec différentes sondes UTR3' (³²P) de vigne. Les membranes ont ensuite été exposées 16 h sur écran PhosphoImager.

développement de *Botrytis* dans le milieu de culture (Fig. 132) qui a abouti à la production d'un mycélium relativement dense après 24 hpi. La diminution progressive du signal d'hybridation de la sonde *VvGAPDH*, observée dès 4 hpi, pourrait d'ailleurs être expliquée par la croissance du champignon. En effet, au cours de la cinétique d'infection, il est hautement probable que le développement mycélien dans la suspension cellulaire de vigne ait impliqué la « pollution » des ARNs de vigne par des ARNs fongiques lors de l'extraction, la proportion de ces derniers augmentant au cours du temps. La sonde *VvGAPDH* utilisée ne s'hybridant pas sur les ARNs de *Botrytis* (Fig. 133), il a donc été logique d'observer une décroissance du signal associé. Puisque les analyses réalisées par Northern blot ont été effectuées par dépôt d'une quantité constante d'ARNs, cette dernière observation suggère que l'induction transcriptionnelle des gènes de transporteurs de sucres et d'invertases a été sous-estimée dans le traitement par les conidies.

L'induction des gènes de transporteurs de sucres et d'invertases pariétales *VvcwINV1* et *VvcwINV3* en réponse aux différents éliciteurs fongiques, suggèrent qu'une des stratégies de la vigne, en condition de stress biotique, serait de modifier le métabolisme et le transport des hexoses au niveau apoplastique. Les protéines VvHT1 et VvHT5 ayant été caractérisées comme des transporteurs d'influx (Hayes *et al.*, 2007 ; Vignault *et al.*, 2005), la cellule pourrait ainsi rapatrier les sucres dans le cytoplasme, les éloignant de l'agent pathogène confiné dans l'apoplaste. De plus ; l'expression des gènes de transporteurs de saccharose n'étant pas modifiée en réponse au traitement par le dialysat de culture de *B. cinerea*, l'induction des gènes d'invertases pariétales pourrait permettre l'hydrolyse du disaccharide dans l'apoplaste, les hexoses générés étant ensuite « pris en charge » par les transporteurs d'hexoses situés sur la membrane plasmique. Le gène de transporteur d'hexose (putatif) *VvHT13* faisant partie des séquences identifiées au cours de ce travail, aucune information concernant sa localisation et sa fonction n'est encore disponible dans la littérature. Cependant, nous avons pu montrer que celui-ci était le plus proche orthologue d'AtSTP14 chez *Arabidopsis*. Le transporteur AtSTP14 a récemment été localisé dans la membrane plasmique des cellules et caractérisé dans le système hétérologue de la levure comme transporteur spécifique de galactose (529 μ M) ne transportant pas le glucose ni le fructose (Poschet *et al.*, 2010). Au cours de leur étude, les auteurs ont suggéré qu'AtSTP14 pouvait avoir un rôle dans le recyclage du galactose provenant de la dégradation de la paroi. Chez la vigne, il est donc hautement probable que VvHT13 ait un rôle similaire. Lors d'une interaction de type biotique impliquant un champignon, l'activité des enzymes fongiques telles que

l'endopolygalacturonase de *Botrytis*, qui dégrade les composés pariétaux (Poinssot *et al.*, 2003), pourrait générer des résidus de galactose importés dans la cellules *via* VvHT13.

4.3. Effet d'un traitement éliciteur sur le transport des sucres

4.3.1. Inhibition précoce du transport de glucose par les éliciteurs fongiques

L'induction transcriptionnelle de gènes codant pour des transporteurs de sucres et des invertases en réponse à différents éliciteurs fongiques a conduit à suggérer que le transport des sucres, et particulièrement celui des hexoses, pouvait être affecté et donc impliqué dans les relations plantes/microorganismes *via* les éliciteurs. Au début de ce travail de thèse, le seul exemple présent dans la littérature corroborant cette hypothèse au niveau fonctionnel était celui de la cryptogéine (Bourque *et al.*, 2002). Ainsi, dans un contexte de compétition pour les ressources carbonées entre la plante et son pathogène, nous avons voulu déterminer si le dialysat de culture de *Botrytis* ou l'ergostérol pouvait inhiber précocement l'influx de sucres dans les cellules de vigne. Parallèlement, nous avons également utilisé de la cryptogéine purifiée afin de déterminer si cette élicitine protéique induisait des modifications du transport de sucres chez la vigne.

Les résultats ont révélé que le traitement des cellules par de l'ergostérol (2 μM) n'induisait pas de modification du transport de glucose au cours des 60 minutes de la cinétique d'absorption. En revanche, nous avons pu montrer que le dialysat de culture de *Botrytis* provoquait une inhibition d'environ 30% de l'influx de glucose dans les cellules de vigne dès 15 minutes après l'inoculation. De plus, en augmentant la concentration d'éliciteur (2,44 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), une inhibition de 63% de l'activité de transport de glucose a pu être observée. Ces résultats ont donc montré qu'au sein du dialysat de culture de *Botrytis*, un éliciteur était capable d'inhiber l'influx de glucose de façon relativement précoce dans les cellules de vigne. Il est hautement probable que l'endoPG, qui n'a pas été testée en raison d'une quantité disponible trop faible, soit responsable de l'effet d'inhibition observé. Bien que l'ergostérol et l'endoPG induisent une réponse comparable au niveau transcriptionnel (gènes codant pour des transporteurs de sucres et des protéines de défense), nos résultats ont montré que ces deux éliciteurs n'induisaient pas le même effet sur le transport de glucose. Cette différence est certainement attribuable à la nature même de ces molécules, l'ergostérol étant un stérol et l'endoPG une glycoprotéine. De façon intéressante, un autre éliciteur protéique, la cryptogéine, s'est montré capable d'inhiber le transport de glucose dans les suspensions cellulaires de tabac (Bourque *et al.*, 2002). Bien que chez le tabac, un blocage total du

transport ait été observé à l'échelle de la minute avec 50 nM de cryptogéine, aucune modification du transport de glucose n'a pu être observée dans les cellules de vigne à cette concentration. Utilisée à une concentration de 1 μ M, l'élicitrine a néanmoins conduit à une diminution de l'activité de transport de glucose d'environ 42% dans les suspensions cellulaires de Chardonnay. Disposant d'une suspension cellulaire de tabac (BY2) au laboratoire, nous avons voulu analyser les effets de la cryptogéine sur cette suspension dans nos conditions expérimentales. Les résultats d'absorption de glucose en présence de cryptogéine ont mis en évidence une inhibition de l'activité de transport d'environ 36% en moyenne quelle que soit la concentration d'élicitrine employée (50, 100 nM et 1 μ M). Au cours de notre étude sur les cellules de tabac, les effets de la cryptogéine se sont donc révélés moins intenses que ceux obtenus par Bourque *et al.* (2002). Il est possible que la variété de tabac (Xanthi) utilisée par les auteurs ait été plus sensible à la cryptogéine que la variété BY2 utilisée dans notre étude. Le degré de pureté des lots de cryptogéine purifiée pourrait également constituer un facteur de variation dans l'intensité de réponse des cellules de tabac. Néanmoins, l'ensemble des résultats a conduit à suggérer que l'effet de l'élicitrine sur le transport du glucose était comparable dans les cellules de tabac et celles de vigne à 1 μ M.

L'ensemble de ces données a donc indiqué que deux éliciteurs protéiques, le dialysat de culture de *Botrytis* (certainement l'endoPG) ainsi que la cryptogéine, provoquaient une inhibition de l'activité de transport de glucose dès 15 minutes suivant l'inoculation des cellules. Chez le tabac, il a été montré que cette inhibition du transport résultait d'un processus dépendant du calcium et impliquant la phosphorylation de protéines (Bourque *et al.*, 2002). Les auteurs ont aussi démontré qu'elle n'était pas dépendante de la production d'AOS (Active Oxygen Species), ni d'un blocage de l'ATPase pompe à protons. Il a alors été suggéré un effet plus direct sur la protéine de transport tel que des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation. La phosphorylation des transporteurs de sucres conduirait à leur inactivation (Roblin *et al.*, 1998). La cryptogéine et l'endoPG de *Botrytis* induisant des réponses communes chez le tabac et la vigne respectivement, telles qu'un influx de calcium et la phosphorylation de protéines (Bourque *et al.*, 1999 ; Lamotte *et al.*, 2004 ; Vandelle *et al.*, 2006 ; Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000), il est probable que ces deux éliciteurs impliquent le même mécanisme d'inhibition du transport de sucres. Cependant, rien ne prouve actuellement la phosphorylation du transporteur lui-même et la possibilité d'une interaction directe de l'éliciteur avec la protéine de transport n'est pas exclue. Initialement décrites comme étant actives uniquement sur tabac (Ponchet *et al.*, 1999), il semble que certaines élicitines comme la cryptogéine pourraient avoir des effets physiologiques chez d'autres

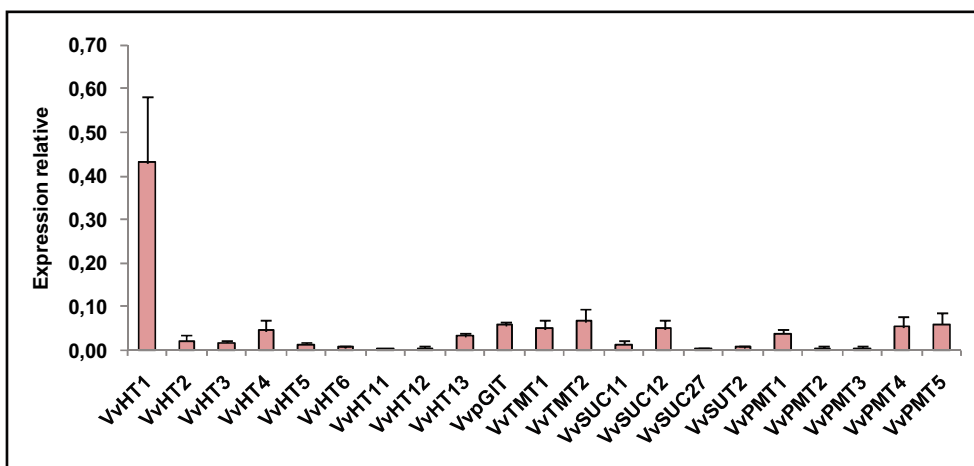


Figure 134 : Expression des différents gènes de transporteurs de sucres dans les cellules de Chardonnay. Après extraction des ARNs totaux, l'expression des gènes de transporteurs de sucres a été analysée au 6^{ème} jour de culture par macroarrays. Après 48 h d'exposition, les signaux ont été quantifiés puis normalisés par rapport à la moyenne des signaux correspondant aux 4 gènes de référence *VvACT*, *VvEF1 α* , *VvEF1 γ* et *VvGAPDH*. Les triplicatas de chaque ADNc ont été moyennés. Les résultats sont représentatifs de trois répétitions biologiques indépendantes.

plantes comme la vigne. Pour renforcer cette hypothèse, il aurait été intéressant de déterminer si la cryptogéine générait chez la vigne, des signaux comparables à ceux observés chez le tabac. Récemment, il a été montré qu'un traitement de plantules de vigne par de l'oligandrine, élicite de *P. oligandrum*, conduisait à une meilleure tolérance vis-à-vis de *B. cinerea* (Mohamed *et al.*, 2007).

4.3.2. Quels sont le ou les transporteur(s) cible(s)?

Afin de déterminer quels pourraient être les transporteurs de sucres impliqués dans le mécanisme d'inhibition du transport, leur expression a été analysée en condition standard de culture. Les résultats (Fig. 134) ont montré que sur l'ensemble des gènes de transporteurs étudiés, *VvHT1* présentait un niveau d'expression supérieur à tous les autres gènes. En moyenne, son expression s'est révélée 13 fois supérieure à celle des autres gènes exprimés. Ce constat a également été mis en évidence sur les cellules de vigne 41B dans lesquelles *VvHT1* est, en moyenne, 24 fois plus exprimé que l'ensemble des autres gènes de transporteurs de sucres (Medici, communication personnelle). De plus, la faible expression des 4 gènes de transporteurs de saccharose (*VvSUC11*, *SUC12*, *SUC27* et *SUT2*) observée dans les cellules a également confirmé qu'au cours de la culture, les sucres étaient absorbés sous forme d'hexoses et non de saccharose. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment (chapitre 2) indiquant une hydrolyse totale du saccharose du milieu durant les deux premiers jours de culture.

L'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence que dans les cellules de vigne, l'absorption des sucres sous forme d'hexoses était probablement assurée par *VvHT1*. Il est alors fortement probable que cette protéine ait été la cible de l'activité d'inhibition lors des traitements par du dialysat de culture de *Botrytis* ou la cryptogéine. L'analyse de la séquence protéique de *VvHT1* a révélé la présence de plusieurs sites de phosphorylation potentiels dans les boucles cytoplasmiques, au niveau des résidus Thr-11, Ser-228, Tyr-498 et Ser-505 (Fillion *et al.*, 1999, Delrot *et al.*, 2001). Parmi eux, le résidu Ser-228 s'est montré conservé entre les séquences protéiques de plusieurs orthologues dont *NtMST1* du tabac (Sauer et Stadler, 1993). Il est alors possible que *VvHT1* et *NtMST1* soient régulés négativement par phosphorylation du résidu Ser-228, lors d'un traitement par de l'endoPG et de la cryptogéine.

4.3.3. L'induction des gènes codant pour des transporteurs d'hexoses entraîne une augmentation de l'activité de transport

Suite à la reconnaissance d'un éliciteur, nous avons démontré que les cellules de vigne induisaient l'expression de plusieurs gènes de transporteurs d'hexoses dès deux heures après le traitement. Nous avons donc voulu apporter une dimension fonctionnelle à cette réponse transcriptionnelle en vérifiant que celle-ci s'accompagnait d'une augmentation de l'activité de transport des hexoses dans les cellules végétales. Utilisant dans un premier temps les conidies de *Botrytis* en tant qu'éliciteur, nous avons pu montrer que celles-ci induisaient une augmentation de 30% du transport de glucose dans les cellules en suspension. Dans un second temps, cette augmentation de l'influx de glucose a pu être confirmée par l'utilisation du dialysat de culture de *Botrytis*. Ces résultats ont permis de montrer que, dans les cellules de vigne, l'induction des gènes de transporteurs d'hexoses suite à un traitement éliciteur conduisait bien à une augmentation de l'activité de transport des hexoses, et notamment du glucose. Ces résultats sont cohérents avec les observations effectuées dans des suspensions cellulaires de pin (*P. pinaster*), dans lesquelles le transport de glucose est augmenté suite à l'inoculation de conidies de *Botrytis* (Azevedo *et al.*, 2006). Dans cette étude, les auteurs ont montré que les conidies du champignon induisaient une production d'AOS (Active Oxygen Species) dépendante de l'activité de la NADPH oxydase, de l'activation de MAP kinases ainsi que du signal calcique. Ils ont également démontré que l'induction du transport de glucose dans les cellules de pin, en réponse au champignon, était dépendante de la production d'AOS, partiellement dépendante du signal calcique ; et indépendante de l'activation des MAPKs.

Dans les cellules de vigne, nous avons également démontré que l'augmentation du transport de glucose suite à un traitement par des éliciteurs n'était pas due à la mise en place du transporteur d'hexoses VvHT1 dans la membrane plasmique. Au cours des étapes précoces d'une interaction vigne/*Botrytis*, en considérant que VvHT1 puisse être la cible de l'endoPG dans le mécanisme d'inhibition du transport précédemment observé, il semblerait relativement logique que la plante mette en place un transporteur différent au cours de sa réponse. L'ensemble de nos résultats montre que l'augmentation du transport de glucose est probablement due au transporteur VvHT5 ; VvHT13 étant supposé transporter le galactose.

Parallèlement à l'induction de gènes codant pour des transporteurs de sucres, nous avons également montré une induction des gènes d'invertases pariétales *VvcwINV1* et *VvcwINV3* en réponse à différents éliciteurs. Les gènes de transporteurs de saccharose n'étant pas induits dans les cellules suite aux traitements, nous avons voulu déterminer si l'induction des gènes d'invertases pouvait conduire à une hydrolyse plus rapide du saccharose dans les

Tableau 34 : Caractéristiques des invertases chez différentes espèces. Les différentes séquences protéiques d'invertases sont issues des bases de données GenBank et Genoscope (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ; <http://www.genoscope.cns.fr>). Le point isoélectrique de chaque protéine a été déterminé avec l'outil Compute pI/Mw du serveur ExPASy (<http://www.expasy.org>) et l'analyse des signaux d'adressage réalisée avec le serveur TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>). * : adressage autre que le chloroplaste, la mitochondrie et la voie de sécrétion.

Espèce	Désignation	Accession	Taille (AA)	Point isoélectrique	Prédiction d'adressage
<i>V. vinifera</i>	<i>cwINV1</i>	AAT09980	575	9,22	Voie de sécrétion
	<i>cwINV2</i>	GSVIVP00021585001	572	9,05	Voie de sécrétion
	<i>cwINV3</i>	GSVIVP00032195001	565	5,98	Mitochondrie
	<i>cwINV4</i>	GSVIVP00032196001	563	5,79	Voie de sécrétion
<i>A. thaliana</i>	<i>cwINV1</i>	X74514	584	9,14	Voie de sécrétion
	<i>cwINV2</i>	U11033	590	9,28	Voie de sécrétion
	<i>cwINV3 (6-FEH)</i>	AB029310	594	5,50	Voie de sécrétion
	<i>cwINV4</i>	AB049617	591	7,70	Voie de sécrétion
	<i>cwINV5</i>	AP001307	569	9,05	Voie de sécrétion
	<i>cwINV6 (6&1-FEH)</i>	AY060553	550	5,02	*
<i>Z. mays</i>	<i>cwINV1</i>	AF050129	590	7,23	Voie de sécrétion
	<i>cwINV2</i>	AF050128	593	9,43	Voie de sécrétion
	<i>cwINV3</i>	AF050631	593	9,43	Voie de sécrétion
	<i>cwINV4</i>	AF043347	597	5,49	Voie de sécrétion
<i>L. esculentum</i>	<i>Lin5</i>	AJ272304	584	9,20	Voie de sécrétion
	<i>Lin6</i>	AF506004	582	9,23	Voie de sécrétion
	<i>Lin7</i>	AF506006	583	6,93	Voie de sécrétion
	<i>Lin8</i>	AF506004	586	9,00	Voie de sécrétion
<i>V. faba</i>	<i>cwINV1</i>	Z35162	575	9,38	Voie de sécrétion
	<i>cwINV2</i>	Z35163	581	8,03	Voie de sécrétion
<i>T. aestivum</i>	<i>cwINV1</i>	AF030420	584	9,07	Voie de sécrétion
<i>D. carota</i>	<i>cwINV1</i>	M58362	592	9,15	Mitochondrie
<i>N. tabacum</i>	<i>INV1</i>	X81834	580	9,13	Voie de sécrétion
<i>S. tuberosum</i>	<i>INV1</i>	Z22645	582	9,38	Voie de sécrétion
<i>P. sativum</i>	<i>cwINV1</i>	AF063246	582	8,05	Voie de sécrétion
<i>O. sativa</i>	<i>cwINV</i>	AB073749	577	8,06	Voie de sécrétion
<i>B. vulgaris</i>	<i>cwINV1</i>	AJ278531	501	9,13	*
<i>C. rubrum</i>	<i>cwINV1</i>	X81792	573	9,15	Voie de sécrétion

Tableau 35 : Caractéristiques des fructane exohydrolases (FEH) chez différentes espèces. Les différentes séquences protéiques de FEH sont issues de la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Le point isoélectrique de chaque protéine a été déterminé avec l'outil Compute pI/Mw du serveur ExPASy (<http://www.expasy.org>) et l'analyse des signaux d'adressage réalisée avec le serveur TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>).

Espèce	Désignation	Accession	Taille (AA)	Point isoélectrique	Prédiction d'adressage
<i>T. aestivum</i>	<i>1-FEH</i>	ACI16117	596	4,90	Voie de sécrétion
	<i>6-FEH</i>	AM075205	598	6,77	Voie de sécrétion
	<i>6&1-FEH</i>	AB089269	595	5,28	Voie de sécrétion
<i>C. intybus</i>	<i>1-FEH</i>	AJ242538	568	6,77	Voie de sécrétion
	<i>1-FEH IIa</i>	AJ295033	581	5,34	Voie de sécrétion
	<i>1-FEH IIb</i>	AJ295034	581	5,34	Voie de sécrétion
<i>H. vulgare</i>	<i>1-FEH</i>	AJ605333	599	5,12	Voie de sécrétion
<i>L. perenne</i>	<i>1-FEH</i>	DQ073968	571	5,76	Voie de sécrétion
<i>B. vulgaris</i>	<i>6-FEH</i>	AJ508534	606	5,07	Voie de sécrétion

cellules traitées, et donc à une absorption des hexoses plus importante. Les résultats obtenus en présence de saccharose comme source de carbone n'ont cependant pas permis de mettre en évidence une modification du transport de sucres en réponse à un traitement éliciteur. Bien que ces résultats puissent confirmer que les transporteurs de saccharose ne sont pas induits en réponse à une contrainte biotique, ils n'ont cependant pas permis de mettre en évidence une activité invertasique plus importante dans les cellules élicitées. Les invertases extracellulaires ayant généralement une K_m de l'ordre du millimolaire (Roitsch *et al.*, 2003), il est possible que la concentration en saccharose utilisée lors de nos mesures d'absorption (0,2 mM) n'ait pas été suffisante pour mettre en évidence une activité invertasique. De plus, *VvcwINV1* (Hayes *et al.*, 2007) et *VvcwINV3* n'ayant pas été caractérisées au niveau fonctionnel, il est également possible que les produits des gènes correspondant ne soit pas des invertases.

4.4. Invertases, qu'en est il réellement?

Face aux derniers résultats d'absorption obtenus avec le saccharose comme source de carbone et au manque de données présentes dans la littérature, les séquences protéiques d'invertases pariétales de vigne ont été analysées plus finement. Comparées à d'autres séquences d'invertases chez d'autres espèces, les invertases de vigne ont révélé une taille caractéristique d'environ 580 acides aminés et, pour la plupart, un signal d'adressage à la voie de sécrétion (Tableau 34). Parmi l'ensemble des séquences analysées, cinq séquences se sont démarquées des autres par la valeur de leur point isoélectrique. En effet, bien que *VvcwINV1* et *VvcwINV2* possède un point isoélectrique caractéristique des invertases pariétales (~9), celui de *VvcwINV3*, *VvcwINV4*, *AtcwINV3*, *AtcwINV6* et *ZmcwINV4* a révélé une valeur plus faible d'environ 5,5 en moyenne. Les deux protéines *AtcwINV3* et *AtcwINV6* ayant été caractérisées comme des fructane exohydrolases (FEH), 6-FEH et 6&1-FEH respectivement (Coninck *et al.*, 2005), il est alors fortement possible que les trois dernières séquences *VvcwINV3*, *VvcwINV4* et *ZmcwINV4* appartiennent également à ce groupe d'enzymes. L'analyse de certaines caractéristiques des FEH de plusieurs espèces (Tableau 35), a montré que ces enzymes avaient une taille similaire à celle des invertases et que celles-ci étaient également destinées à la voie de sécrétion. Cependant, leur point isoélectrique étant plus faible que celui des invertases (~5,5), ceci a conduit à l'hypothèse que les 2 séquences de vigne (*cwINV3* et 4) ainsi que celle de maïs (*cwINV4*) ne codaient pas pour des invertases.

Un alignement des différentes séquences protéiques des 2 classes d'enzymes a alors été réalisé afin d'essayer de confirmer cette dernière hypothèse. L'arbre phylogénétique généré (figure 135) a pu être divisé en 3 catégories : (i) une catégorie regroupant uniquement

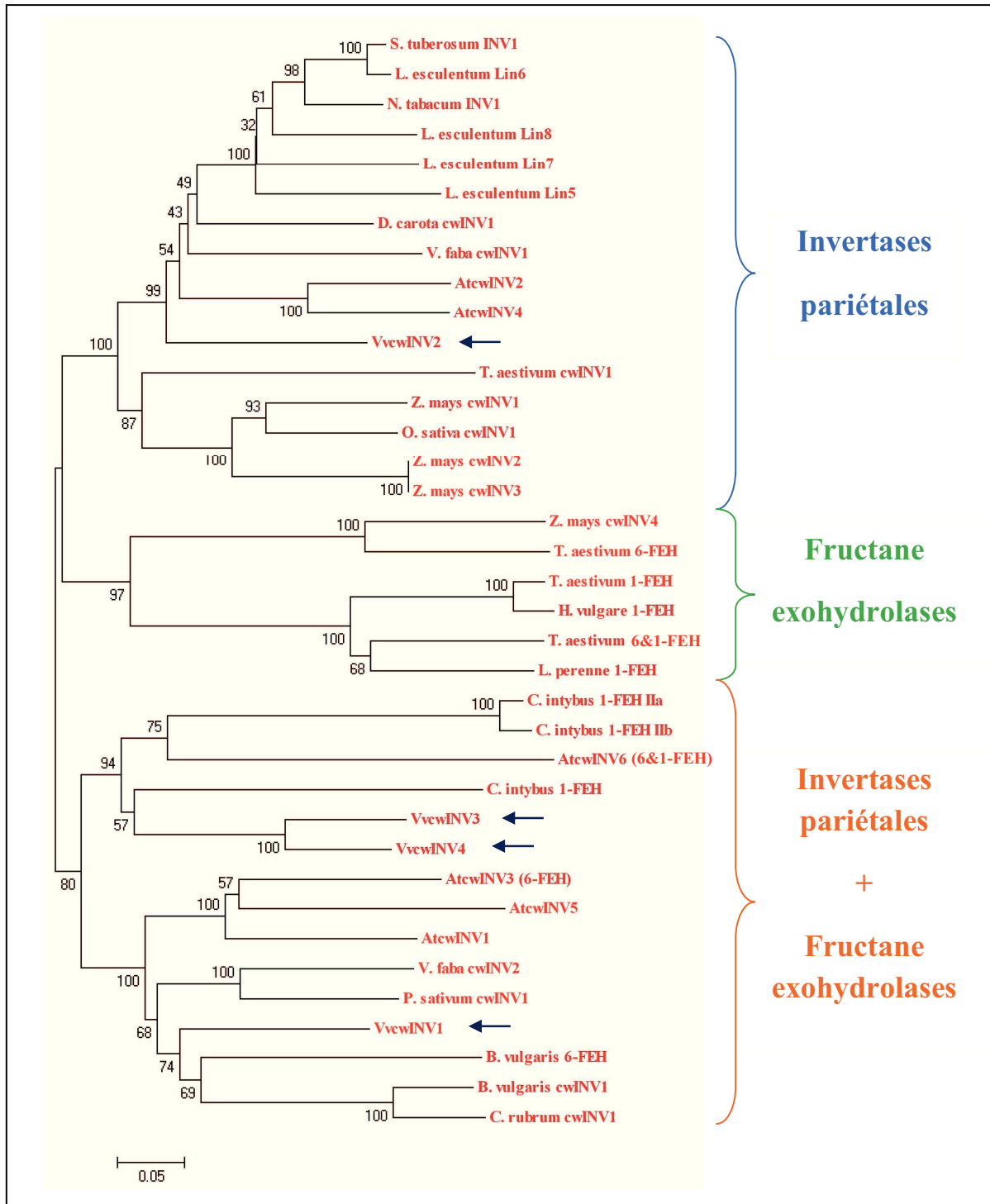


Figure 135 : Arbre phylogénétique des invertases et fructane exohydrolases. L'arbre non enraciné (Neighbor Joining, bootstrap : 500 répétitions) a été généré après un alignement multiple des séquences protéiques (accessions tableaux 34 et 35) dans le programme MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Les invertases de vigne sont indiquées par les flèches bleues.

des invertases pariétales, (ii) une catégorie regroupant uniquement des FEHs et (iii) une dernière catégorie regroupant les deux types d'enzymes. Cette dernière catégorie a confirmé qu'il était probablement difficile de prédire par simple alignement des séquences si une enzyme appartenait au groupe des invertases ou FEHs (Coninck *et al.*, 2005). Dans l'arbre généré, VvcwINV2 s'est positionnée dans le groupement des invertases pariétales alors que VvcwINV1, VvcwINV3 et 4 se sont rassemblées dans le groupe mixte des FEHs et invertases pariétales.

Le Roy *et al.* (2007) ont cependant montré qu'il serait possible de discriminer les deux types d'enzymes en fonction de la présence ou non d'un motif dans la séquence protéique. Afin d'approfondir nos résultats, l'alignement des séquences protéiques a été ciblé sur la région située entre les acides aminés 232 et 258 (séquence AtcwINV1 comme référence). Cet alignement (Fig. 136 A) a révélé l'existence d'un motif commun aux invertases constitué d'un acide aspartique en position 239 et d'une lysine ou arginine en position 241. Ce motif, qui n'est pas présent dans la séquence des fructane exohydrolases (Fig. 136 B) n'a pas été mis en évidence dans les séquences protéiques VvcwINV3, VvcwINV4 et ZmcwINV4.

L'ensemble des données obtenues indique que VvcwINV1 et 2 appartiennent probablement à la famille des invertases pariétales sécrétées. Contrairement, VvcwINV3 et 4 sembleraient appartenir, tout comme AtcwINV3 et 6, à la classe des fructane exohydrolases et plus précisément aux 1-FEH ou 6&1-FEH. Ces données sont cependant à nuancer puisqu'AtcwINV5, caractérisée par un point isoélectrique élevé (9,05), ne présente pas le motif commun aux invertases.

5. Quel est le rôle physiologique de l'induction de *VvHT5* et *VvcwINV* ?

5.1. Les Champignons : des compétiteurs pour les sucres

Les champignons phytopathogènes révèlent une certaine diversité dans leur mode de vie (Biemelt et Sonnewald, 2006). Les nécrotrophes (et hémibiotrophes) provoquent la mort des tissus colonisés et se nourrissent en tant que saprophytes, alors que les biotrophes dépendent de la viabilité des tissus et différencient des haustoria, véritables suçoirs, au voisinage des cellules de l'hôte. Dans les deux cas, le but *in fine* du champignon n'est pas de tuer la plante mais d'acquérir les ressources nutritives nécessaires à sa croissance et sa reproduction. Une fois dans les tissus de l'hôte, ces organismes vont donc pouvoir constituer de nouveaux « puits » de carbone, de façon transitoire pour les nécrotrophes (phases préliminaires de l'infection avant l'établissement de la nécrotrophie), et à plus long terme

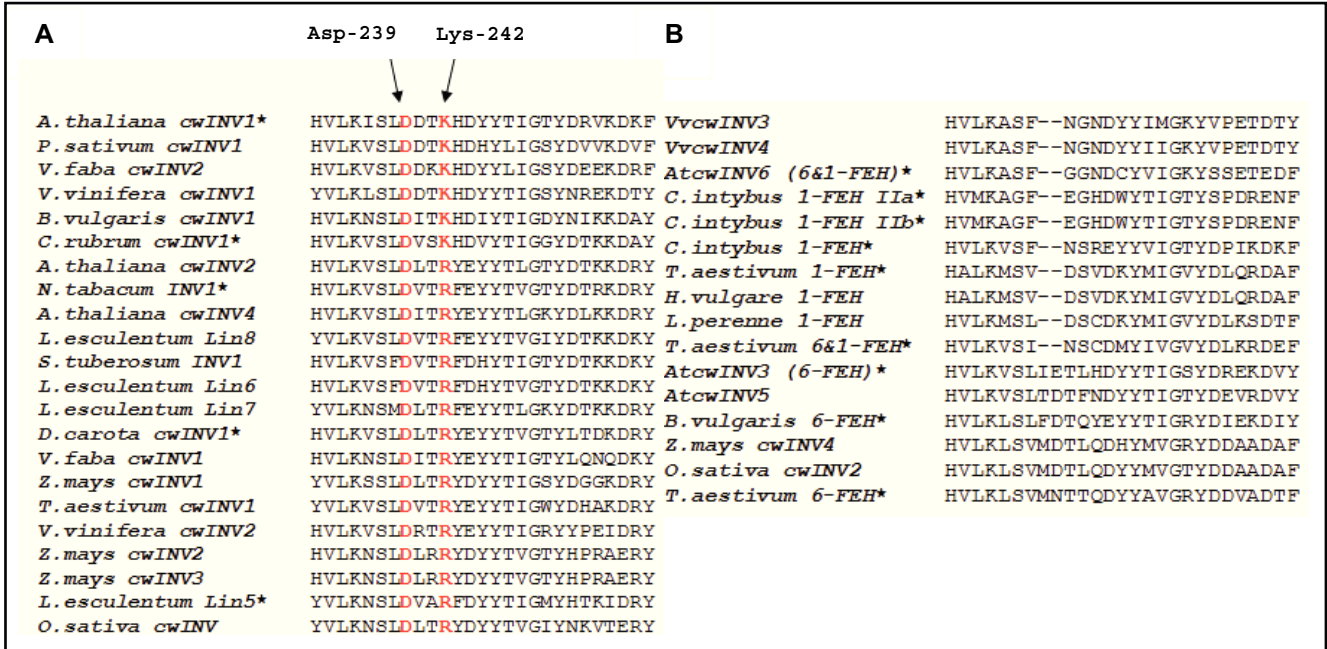


Figure 136 : Alignement multiple des régions 232-258 des séquences protéiques d'invertases et de fructane exohydrolases (FEH). Les accessions de chaque séquence sont regroupées tableau 34 et tableau 35. La séquence *At*cwINV1 a été utilisée comme référence pour l'alignement des autres séquences. **A.** Alignement des invertases. **B.** Alignement des fructane exohydrolases. Les enzymes caractérisées fonctionnellement sont marquées avec un astérisque.

pour les biotrophes. Il est alors logique de penser qu'une compétition pour les ressources carbonées s'opère au niveau de l'apoplaste entre la plante et le champignon. Chez les biotrophes, l'établissement de structures sophistiquées telles que les haustoria dans les cellules de l'hôte supporte cette hypothèse de manière évidente. Des travaux menés sur l'interaction entre *V.faba* et le champignon biotrophe obligatoire *Uromyces fabae* ont montré une forte expression d'un gène de transporteurs d'hexose (*Uf-HXT1*) et d'une H⁺-ATPase au niveau de la membrane plasmique de l'haustorium ainsi que d'une invertase fongique extracellulaire (*Uf-INV1*) pouvant contribuer à la mobilisation des hexoses par le champignon (Hahn et Mendgen, 2001 ; Voegelé *et al.*, 2001, 2006). *Uf-HXT1* a été caractérisé de façon fonctionnelle en tant que transporteur de glucose ($K_m = 360 \mu\text{M}$) pouvant également transporter le fructose et le mannose (Voegelé *et al.*, 2001). Ces mêmes auteurs ont également montré une concentration importante de mannitol dans les feuilles infectées de *V.faba* parallèlement à la forte expression d'un gène codant pour une mannitol déshydrogénase (*MADI*) dans l'haustoria fongique (Voegelé *et al.*, 2005). Il a alors été suggéré que le fructose absorbé par le champignon *via* HXT1 était converti en mannitol. Ce polyol pourrait ainsi constituer une réserve de carbone inaccessible pour l'hôte tout en protégeant le champignon des ROS produit par la plante au cours des réactions de défense. Plusieurs autres études ont pu montrer que les oïdiums (*E. graminis*, *E. pisi*) absorbaient majoritairement des hexoses et notamment le glucose (Clark et Hall, 1998 ; Sutton *et al.*, 1999, 2007). En utilisant du saccharose radioactif marqué de façon asymétrique, Sutton *et al.* (1999) ont pu montrer que celui-ci était hydrolysé dans la cellule hôte avant d'être absorbé par le champignon sous forme de glucose.

Les données concernant les processus d'acquisition des ressources carbonées chez les champignons nécrotrophes sont rares. Chez *Sclerotinia sclerotiorum*, le transporteur d'hexoses *Sshxt1* est fortement exprimé au cours de l'interaction avec le tournesol (*H. annuus*) et aurait un rôle prédominant dans l'absorption des hexoses (Jobic *et al.*, 2007). Le glucose est le sucre principalement détecté dans le mycélium du champignon et l'activité invertasique mesurée dans les tissus infectés serait majoritairement d'origine fongique. Au début de ces travaux de thèse, seul le transporteur de fructose BcFRT1 avait été identifié et caractérisé chez *Botrytis cinerea* (Doehlemann *et al.*, 2005). Une invertase du champignon avait également été mise en évidence dans des baies naturellement infectées au vignoble (Ruiz et Ruffner, 2002). Nous avons alors voulu déterminer si *Botrytis* possédait un nombre important de séquences pouvant correspondre à des transporteurs de sucres et invertases. Cette recherche a été effectuée par mot-clé dans la base de données du « Broad Institute » donnant accès au génome séquencé et

Tableau 36 : Identification de séquences codant pour des transporteurs de sucres et invertases chez *B. cinerea*. La recherche des séquences protéiques a été effectuée par mot-clé dans la base de données du « Broad Institute » (génom *B. cinerea* B05.10 ; <http://www.broadinstitute.org>). La détermination du nombre de domaines transmembranaires a été réalisée à l'aide des servers TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk>) et Toppred (<http://mobyle.pasteur.fr>). La présence de deux valeurs signifie que les deux servers n'ont pas abouti à la même prédiction.

Accession	Taille (AA)	Fonction putative prédite	Hélices transmembranaires
BC1G_09068.1	592		12
BC1G_10092.1	599		12
BC1G_09797.1	513		12
BC1G_11623.1	498		12
BC1G_12561.1	527		12
BC1G_08389.1	537		11 ou 12
BC1G_08241.1	501		13
BC1G_00589.1	518	Transporteurs de glucose haute affinité	10
BC1G_10717.1	538		11
BC1G_12060.1	447		9 ou 11
BC1G_05746.1	336		7
BC1G_11064.1	578		12
BC1G_03115.1	544		12
BC1G_04637.1	561		12
BC1G_09891.1	557		12
BC1G_01506.1	518		10 ou 11
BC1G_16090.1	396		8
BC1G_14115.1	536	Transporteur de glucose plastidial	11
BC1G_10026.1	524		12
BC1G_01032.1	302	Co-transporteurs H⁺/Hexose	6
BC1G_02639.1	504		10 ou 11
BC1G_12224.1	358		8
BC1G_01704.1	530		12
BC1G_02982.1	568		11 ou 8
BC1G_08140.1	536	Transporteurs de sucres	12 ou 10
BC1G_11527.1	580		9
BC1G_12022.1	585		10
BC1G_14590.1	565		12 ou 11
BC1G_13828.1	499		10 ou 12
BC1G_06327.1	615	Protéines similaires aux transporteurs de sucres	11 ou 12
BC1G_09522.1	522		12 ou 11
BC1G_03637.1	614	Protéines similaires aux transporteurs de saccharose	11 ou 12
BC1G_08533.1	635		11 ou 12
BC1G_12037.1	549	Symports Arabinose/Proton	12 ou 11
BC1G_13350.1	493		12
BC1G_00956.1	562	Transporteurs de myo-inositol	12
BC1G_13624.1	528		11 ou 12
BC1G_10771.1	644		11 ou 12
BC1G_15332.1	666	Transporteurs de Polyols	10 ou 11
BC1G_16010.1	484		0
BC1G_10247.1	511	Invertase et précurseur	0

annoté de la souche B05.10 (<http://www.broadinstitute.org>). Les résultats obtenus ont révélé un total de 32 séquences pouvant correspondre à de potentiels transporteurs de sucres (mono- et disaccharides) (Tableau 36). Cette recherche a également indiqué la présence de transporteurs d'autres sucres tels que l'arabinose, le myo-inositol et autres polyols. Globalement, la taille de ces protéines est comprise entre 302 et 666 acides aminés avec un nombre de domaines transmembranaires prédit entre 6 et 12. De façon intéressante, seules 2 séquences correspondant à une invertase putative et un précurseur ont été trouvées. Très récemment, il a été montré que *Botrytis cinerea* pouvait représenter un puits de carbone important *via* l'expression d'une famille multigénique codant pour des transporteurs d'hexoses (Dulermo *et al.*, 2009). Dans cette étude, les auteurs ont révélé l'existence d'au moins 17 gènes de transporteurs d'hexoses (*BcHXT1* à *17*) différenciellement exprimés au cours des phases de l'interaction avec *H. annuus*. Les auteurs ont aussi montré qu'une fois absorbé par le champignon, la majorité du glucose est converti en mannitol, en tréhalose et en glycogène alors que le fructose est entièrement converti en mannitol (Dulermo *et al.*, 2009).

Ces différentes données indiquent que les champignons, nécrotrophes et biotrophes, peuvent représenter une force de puits importante vis-à-vis des sucres et plus particulièrement des hexoses. Ainsi, une augmentation de la concentration en hexoses est généralement observée dans les tissus infectés comparés aux tissus sains (Chou *et al.*, 2000 ; Doehlemann *et al.*, 2008 ; Fotopoulos *et al.*, 2003 ; Sutton *et al.*, 2007). Le déploiement d'un important système de transport de sucres par les champignons phytopathogènes révèle l'importance de ces molécules dans leur développement. Lors des phases préliminaires d'une infection, la disponibilité des ressources carbonées au niveau des sites de pénétration dans les tissus pourrait donc avoir une influence majeure sur le devenir de l'interaction. Chez le tabac, Bourque *et al.* (2002) ont montré que la cryptogéine, élicite produite par *Phytophthora cryptogea*, inhibait rapidement et totalement le transport de glucose à l'échelle de la minute. Par ce mécanisme, le champignon augmenterait la concentration en hexoses dans l'apoplaste, les rendant disponibles pour sa croissance. Une des hypothèses émises par notre équipe de recherche est que la plante réagit afin de détourner ces sucres du point d'infection.

5.2. Mobilisation des sucres au cours des défenses : rôle des transporteurs et des invertases pariétales

Chez la vigne, nos résultats ont pu indiquer une induction des deux gènes *VvHT5* et *VvcwINV* suite à l'infection par *Botrytis cinerea* et *Erysiphe necator*. Cette induction d'un gène de transporteur de sucre et/ou d'une invertase pariétale a également pu être observée

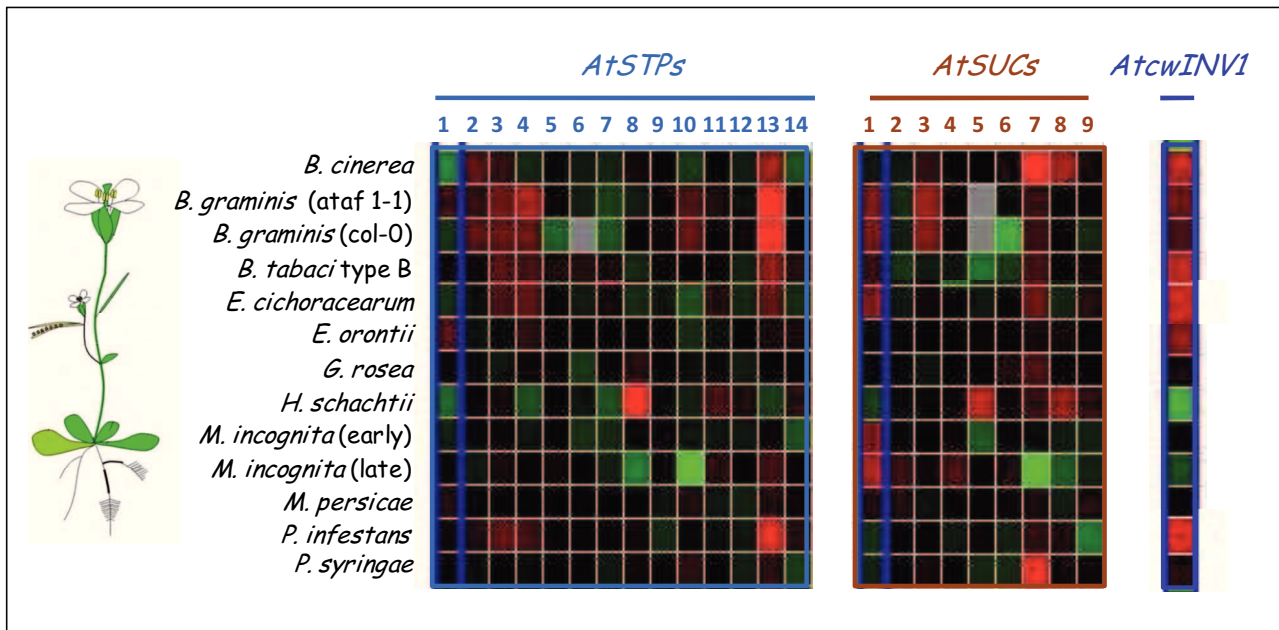


Figure 137 : Modulation de l'expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres et une invertase chez *Arabidopsis thaliana* en réponse à différentes contraintes biotiques. Les résultats ont été obtenus à partir de la base de données Genevestigator (www.genevestigator.com) qui regroupe des données d'expression obtenues par microarrays chez *A. thaliana*. La recherche a été ciblée sur les gènes de transporteurs d'hexoses *AtSTP1* (At1g11260), *AtSTP2* (At1g07340), *AtSTP3* (At5g61520), *AtSTP4* (At3g19930), *AtSTP5* (At1g34580), *AtSTP6* (At3g05960), *AtSTP7* (At4g02050), *AtSTP8* (At5g26250), *AtSTP9* (At1g50310), *AtSTP10* (At3g19940), *AtSTP11* (At5g23270), *AtSTP12* (At4g21480), *AtSTP13* (At5g26340), *AtSTP14* (At1g77210) ; sur les gènes de transporteurs de saccharose *AtSUC1* (At1g71880), *AtSUC2* (At1g22710), *AtSUC3* (At2g02860), *AtSUC4* (At1g09960), *AtSUC5* (At1g71890), *AtSUC6* (At5g43610), *AtSUC7* (At1g66570), *AtSUC8* (At2g14670), *AtSUC9* (At5g06170) ; et sur le gène d'invertase pariétale *AtcwINV1* (At3g13790).

chez d'autres espèces. Chez *Arabidopsis* par exemple, *AtSTP4* est également impliqué dans la réponse aux infections de type biotrophe et nécrotrophe. Le gène est en effet induit par *A. brassicicola* et *F. oxysporum* dès 24 hpi ainsi que par *E. cichoracearum* 4 jours après l'inoculation (Fotopoulos *et al.*, 2003 ; Truernit *et al.*, 1996). Ce dernier champignon ainsi qu'*Albugo candida* induisent aussi l'expression de l'invertase pariétale *Atβfruct1* associée à une augmentation de l'activité invertasique au sein des tissus infectés (Chou *et al.*, 2000 ; Fotopoulos *et al.*, 2003). L'expression d'*AtSTP3* est également induite en réponse à *E. cichoracearum* mais de façon beaucoup moins importante qu'*AtSTP4*. Les données Genevestigator (www.genevestigator.com) indiquent de plus que plusieurs *AtSTPs* tels qu'*AtSTP3*, *AtSTP4* et surtout *AtSTP13* sont induits en réponse à *Botrytis* (Fig.137). Chez le blé, l'expression d'un homologue d'*AtSTP4* et de l'invertase pariétale *TaINV2* est induite par l'oïdium (*B. graminis*) (Sutton *et al.*, 1999). L'induction des gènes de transporteurs de sucres et/ou d'invertases pariétales en réponse à une infection fongique semble donc constituer un mécanisme général chez plusieurs espèces de plantes.

Au niveau local, l'induction des gènes de transporteurs et leur mise en place dans la membrane plasmique pourraient avoir pour objectif le « rapatriement » des sucres de l'apoplaste vers l'intérieur des cellules afin « d'affamer » l'agresseur (Fotopoulos *et al.*, 2003 ; Truernit *et al.*, 1996). Une telle privation pourrait ainsi ralentir la croissance du pathogène et accorder à la plante le temps nécessaire à la mise en place des réactions de défense. Chez la vigne, nos résultats suggèrent que ce rôle puisse être joué par VvHT5, caractérisé en tant que symport haute affinité glucose/H⁺ (K_m = 89 μM) (Hayes *et al.*, 2007). De plus, à l'heure actuelle, sur les trois transporteurs d'hexoses caractérisés au niveau fonctionnel (VvHT1, VvHT4 et VvHT5), seul VvHT5 est capable de transporter significativement le fructose en plus du glucose. Ainsi, au cours d'une infection fongique, ce transporteur pourrait permettre le « rapatriement » d'une quantité plus importante d'hexoses au sein de la cellule comparé à VvHT1 ou VvHT4. Même si plusieurs transporteurs d'hexoses restent à caractériser chez la vigne, l'aptitude de VvHT5 à transporter le fructose pourrait constituer un avantage pour la plante au cours d'une infection. Chez *Arabidopsis*, qui compte 14 *AtSTPs*, seuls *AtSTP6* et *AtSTP13* peuvent transporter le fructose (Büttner, 2007, 2010). Or, de façon intéressante, *AtSTP13* est fortement induit en réponse à *Botrytis* (Genevestigator). Bien que la protéine VvHT5 n'ait pas été localisée au niveau subcellulaire, sa caractérisation positive dans le système hétérologue de la levure suggère que ce transporteur soit associé à la membrane plasmique. Bien évidemment, il est possible que d'autres transporteurs d'hexoses puissent être impliqués dans la réponse aux stress biotiques

au même titre que les transporteurs de saccharose. Aucune donnée de la littérature ne mentionne cependant l'induction de gènes de transporteurs de saccharose en réponse à une infection plante/champignon pathogène. Cependant, cette hypothèse n'est pas exclue puisque les résultats obtenus par macroarrays et collectés dans la base de données Genevestigator semblent indiquer une induction d'*AtSUC1*, *AtSUC3*, *AtSUC7* et *AtSUC9* en réponse à différentes espèces de *Botrytis* ainsi qu'à *E. cichoracearum* pour *AtSUC1* et 7 (Fig. 137). Chez la vigne, nous avons pu observer que *VvSUC11* n'était pas induit par *Botrytis*. A l'heure actuelle, le nombre de gènes codant pour des transporteurs de saccharose répertoriés chez la vigne n'étant que de 4, il serait facilement envisageable d'étudier l'expression de chacun d'entre eux en réponse à *Botrytis*. Lors de l'infection, que les transporteurs de disaccarides soient induits ou non, les invertases pariétales telles que *VvcwINV1* pourraient hydrolyser le saccharose en hexoses qui seraient ensuite transportés vers le cytoplasme *via* des transporteurs. L'induction des invertases pariétales ainsi qu'une augmentation de l'activité associée ont été démontrées dans de nombreuses interactions plante/pathogène (Benhamou *et al.*, 1991 ; Berger *et al.*, 2004 ; Chou *et al.*, 2000 ; Fotopoulos *et al.*, 2003). A l'échelle de la plante, l'activité de ces invertases au niveau des feuilles infectées maintiendrait une force de puits et un déchargement phloémien de saccharose tout en limitant son chargement (Stitt *et al.*, 1991). Cet apport d'assimilats au niveau des tissus lésés permettrait de fournir les squelettes carbonés et l'énergie nécessaires aux cascades de défenses (Roitsch, 1999) conduisant au renforcement des parois ainsi qu'à la synthèse de divers composés antimicrobiens (composés phénoliques). D'autres part, les hexoses générés par l'activité des invertases apoplastiques agiraient aussi en tant que signaux conduisant à l'induction de gènes de défense (Herbers *et al.*, 1996) et à la régulation négative des gènes liés à la photosynthèse (Kocal *et al.*, 2008 ; Pego *et al.*, 2000 ; Scholes *et al.*, 1994). De plus, il a également été montré chez des tabacs transgéniques que l'expression d'une invertase pariétale sous le control du promoteur *SAG12* (Senescence Associated Genes) conduisait à un retard de la sénescence soulignant ainsi le rôle centrale des sucres dans les voies de signalisation menant à ce processus physiologique (Balibrea Lara *et al.*, 2004). Chez *Arabidopsis*, l'accumulation des sucres (glucose, fructose, galactose) dans les tissus en sénescence s'accompagne de l'expression du gène de transporteur de monosaccharide *SFPI* qui pourrait alors intervenir dans le transport des hexoses au niveau intracellulaire (Quirino *et al.*, 2001). Un second gène de transporteur d'hexoses, *AtSTP13*, capable de transporter le glucose, le galactose, le mannose et le fructose, est également induit chez *Arabidopsis* lors de la mort cellulaire programmée (PDC) (Norholm *et al.*, 2006). Son expression est fortement induite chez les

mutants *acd11* qui déclenchent une mort cellulaire spontanée au cours de leur développement précoce. De plus, *AtSTP13* est également induit dans les feuilles en réponse à l'infection par une souche virulente (DC3000) ou avirulente (AvrRPM1) de *P. syringae*. Le rôle physiologique de ce transporteur est encore flou mais il est possible qu'il puisse fournir l'énergie nécessaire à l'initiation de la mort cellulaire à partir de formes réactives d'oxygène, la synthèse desquelles fait appel au métabolisme du glucose (Foreman *et al.*, 2003). Rappelons aussi que ce gène, orthologue de *VvHT5*, est également induit chez *Arabidopsis* en réponse à *Botrytis* (Genevestigator ; Fig. 137). Ce champignon provoquant une mort des tissus, il est possible que *VvHT5* chez la vigne, au même titre qu'*AtSTP13* chez *Arabidopsis*, ait un rôle clé au cours de l'interaction.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Au début de ce travail de thèse, les études menées sur la résistance de la vigne vis-à-vis des champignons phytopathogènes étaient principalement focalisées sur les voies de signalisation conduisant à la mise en place des réactions de défense ainsi que sur la synthèse de composés antimicrobiens tels que les PR-protéines et les phytoalexines (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001 ; Gomès *et al.*, 2003 ; Laquitaine *et al.*, 2006). Bien que chez certaines espèces les données de la littérature aient démontré une induction transcriptionnelle de gènes codant pour des transporteurs de sucres et des invertases en réponse à des champignons et éliciteurs fongiques (Fotopoulos *et al.*, 2003 ; Sutton *et al.*, 2007 ; Truernit *et al.*, 1996), aucune hypothèse faisant intervenir une compétition trophique dans les mécanismes de défense n'avait été émise. Notre équipe de recherche s'est donc intéressée à la fonction biologique que pouvaient avoir les transporteurs de sucres et les invertases au cours des phases précoces d'une interaction Vigne (*Vitis vinifera*)/champignons pathogènes.

Dans un premier temps, les séquences de transporteurs de sucres et d'invertases répertoriées chez la vigne (Davies et Robinson, 1996 ; Davies *et al.*, 1999 ; Hayes *et al.*, 2007 ; Vignault *et al.*, 2005), ont été utilisées pour mettre en évidence, sur plantes entières, l'induction transcriptionnelle d'un gène codant pour un transporteur d'hexoses, *VvHT5*, et pour une invertase pariétale, *VvcwINV1*, en réponse aux champignons *B. cinerea* (nécrotrophe) et *E. necator* (biotrophe). Nous avons également montré que l'induction des deux gènes était concomitante à la mise en place des réactions de défense *via* l'induction de gènes de PR-protéines et la production de phytoalexines (resvératrol).

Afin d'apporter une dimension fonctionnelle à cette réponse, c'est-à-dire mesurer une activité de transport de sucres en condition de contrainte biotique, un modèle de suspension cellulaire de vigne (cv Chardonnay) a été développé. Parallèlement, le séquençage complet du génome de la vigne en 2007 (Pinot Noir) nous a donné l'opportunité d'identifier de nouvelles séquences codant pour des transporteurs de sucres et des invertases pouvant également intervenir dans la réponse de la vigne aux champignons pathogènes. Après avoir isolé des sondes 3'UTR spécifiques de 20 gènes de transporteurs de sucres (hexoses, saccharose et polyols) ainsi que de 6 gènes d'invertases (pariétales et vacuolaires), la mise au point d'une membrane de macroarrays dédiée nous a alors permis d'analyser l'expression de ces différents gènes, dans notre modèle cellulaire, en réponse à différents traitements par des éliciteurs fongiques. Les résultats obtenus ont révélé une induction des deux gènes de

transporteurs d'hexoses *VvHT5* et *VvHT13* ainsi que du gène d'invertase pariétale *VvcwINV1* en réponse aux éliciteurs ainsi qu'au champignon *B. cinerea*. Les données d'expression obtenues sur les cellules en suspension ont d'une part permis de confirmer les résultats préliminaires obtenus sur plantes (induction de *VvHT5* et *VvcwINV1*), et ont d'autre part permis d'identifier un second transporteur putatif d'hexoses (*VvHT13*) impliqué dans la réponse de la vigne vis-à-vis du champignon.

Dans le but de resituer l'induction des gènes de transporteurs de sucres et d'invertases dans un contexte de compétition carbonée entre la vigne et son agent pathogène, nous avons démontré qu'un dialysat de culture de *B. cinerea*, pouvant contenir l'endopolygalacturonase (Poinssot *et al.*, 2003), provoquait une inhibition du transport de glucose dès 15 minutes de traitement. Parallèlement, nous avons également mis en évidence une augmentation de l'activité de transport de glucose lors des phases plus tardives (4 hpi) de l'élicitation. En accord avec les données existantes sur les modèles tabac/cryptogéine (Bourque *et al.*, 2002) et pin/*B. cinerea* (Azevedo *et al.*, 2006), nous postulons que la stratégie de *Botrytis*, lors des phases préliminaires de son développement, consisterait en la rétention des sucres de la plante au niveau de l'apoplaste, probablement *via* un mécanisme de phosphorylation ou d'interaction directe éliciteur/transporteur. Au cours de ce travail, nous avons émis l'hypothèse que le transporteur d'hexoses *VvHT1*, fortement exprimé en condition standard de culture, pouvait être la cible de ce blocage. Après la perception du champignon, la plante réagirait par la mise en place de nouveaux transporteurs tels que *VvHT5* et *VvHT13* afin de réabsorber les hexoses à l'intérieur des cellules. *VvHT5* serait impliqué dans le transport de glucose et de fructose, alors que *VvHT13* pourrait transporter le galactose issu de la dégradation de la paroi cellulaire. Le saccharose apoplastique serait clivé par *VvcwINV1* et les hexoses générés transportés *via* *VvHT5*.

Chez la vigne, sur l'ensemble des transporteurs d'hexoses caractérisés, *VvHT5* est actuellement le seul transporteur d'hexoses à pouvoir transporter le fructose en plus du glucose. Il serait alors envisageable de procéder à des mesures de transport de fructose radioactif en réponse à un traitement éliciteur. Une augmentation de l'influx de fructose dans les cellules élicitées renforcerait ainsi l'implication de *VvHT5* dans le phénomène d'augmentation de l'influx de sucres vers l'intérieur des cellules. De la même façon, des mesures d'absorption de galactose pourraient être conduites afin de renforcer le rôle de *VvHT13*. Concernant *VvcwINV1*, les expériences de transport de saccharose effectuées à 4 hpi n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de l'enzyme dans le milieu des

cellules élicitées. Il serait alors possible de prolonger les mesures d'absorption sur des temps plus longs (8 hpi) ou encore d'effectuer des mesures d'activité invertasique.

Bien qu'au cours de ce travail nous ayons pu corréler l'induction des gènes de transporteurs de sucres et d'invertases à une augmentation de l'activité de transport dans un contexte de mise en place des réactions de défense, un de nos objectifs à court terme est de pouvoir associer l'expression des gènes *VvHT5* et *VvcwINV1* à un phénotype de défense sur la vigne. Disposant au laboratoire d'une suspension de cellules de Chardonnay embryogènes (Coutos-Thévenot *et al.*, 1992), notre équipe entreprend actuellement de transformer et de régénérer des plants de vigne surexprimant les gènes *VvHT5* ou *VvcwINV1* sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Parallèlement, les cellules embryogènes seront également transformées à l'aide de constructions ARNi correspondant aux deux gènes afin de réduire leur expression dans les plantes. En espérant pouvoir régénérer des plantes de Chardonnay transformées, nous espérons pouvoir aboutir à un phénotype plus résistant chez les plantes surexprimant les gènes *VvHT5* ou *VvcwINV*; et à l'inverse, plus sensible chez les plantes « ARNi » vis-à-vis de *B. cinerea*. Chez le tabac par exemple, il a été démontré que les plantes n'exprimant pas une invertase pariétale par ARNi montraient une altération de l'induction de certains gènes de défenses (PR-protéine et PAL) et de la mise en place de la HR en réponse à *Phytophthora nicotianae* (Essmann *et al.*, 2008).

Bien que le but *in fine* de notre programme de recherche soit d'analyser fonctionnellement le rôle des protéines de transport et des invertases dans l'interaction vigne/*Botrytis*, la transformation et la régénération de plants de vigne transgéniques représentent un travail souvent difficile et long. Nous avons donc élargi notre étude au modèle *Arabidopsis thaliana*, chez qui nous avons recensé un transporteur (*AtSTP13*) très proche de *VvHT5* (82% de similarité). Comme observé chez la vigne pour *VvHT5*, les données de Genevestigator ont révélé que le gène *AtSTP13* était induit dans les feuilles d'*Arabidopsis* en réponse à *Botrytis cinerea*. Nous pouvons raisonnablement penser que ces deux gènes *VvHT5* et *AtSTP13* pourraient être des orthologues. Le mutant *stp13* étant à notre disposition, des expériences de phénotypage durant une infection par *Botrytis cinerea* sont en cours de réalisation. Afin de vérifier notre hypothèse précédente, notre équipe est actuellement en train de transformer ce mutant *stp13* à l'aide des constructions 35S-*AtSTP13* ainsi que 35S-*VvHT5* pour tenter des essais de complémentation. D'autre part, des plantes sauvages col-0 sont également en cours de transformation à l'aide des deux constructions. Des tests d'infection à l'aide de *Botrytis cinerea* sur les plantes transformées devraient bientôt permettre de conclure

sur le rôle physiologique de *VvHT5* et d'*AtSTP13* dans la mise en place des réactions de défense vis-à-vis de *Botrytis*.

A plus long terme, nous pourrions également infecter des plantes surexprimant *VvHT5* (et *AtSPT13*) à l'aide d'autres champignons tels qu'*Alternaria* ou *Fusarium* ainsi qu'avec des agents biotrophes tels que l'oïdium afin de compléter notre modèle. Au cours de la dernière année de ce travail de thèse, Hayes *et al.* (2010) ont démontré une induction des gènes *VvHT5* et *VvcwINV1* chez la vigne en réponse aux deux agents biotrophes *E. necator* et *P. viticola*. Les auteurs ont également montré que ces deux gènes étaient induits à la blessure ainsi qu'à l'ABA (Acide abscissique). L'expression de *VvHT5* a pu être localisée grâce à une construction p*VvHT5*-GUS au niveau des cellules à l'interface cellule compagne/parenchyme phloémien. La protéine aurait pour rôle le transport des hexoses générés par *VvcwINV1* dans l'apoplaste à la sortie du complexe conducteur. L'ensemble de ces données indique qu'au niveau des feuilles infectées, *VvHT5* et *VvcwINV1* seraient impliqués dans la transition d'un état source vers un état puits, leur rôle étant probablement déterminant dans la mise en place des réactions de défense *via* la distribution des ressources carbonées.

Un des objectifs de cette thèse, que nous n'avons pas pu aborder, est la régulation fine au niveau moléculaire des gènes *VvHT5* et *VvcwINV1*, c'est-à-dire l'étude des éléments régulateurs potentiellement impliqués dans l'induction transcriptionnelle de ces gènes en réponse à une contrainte biotique. Une analyse *in silico* effectuée sur le génome de Pinot Noir a permis d'identifier les régions promotrices des gènes de transporteurs de sucres (Afoufa-Bastien *et al.* 2010). Après l'identification de boîtes de défense (WRKY, ELRE par exemple), les promoteurs seront utilisés au cours d'un crible simple hybride afin d'identifier des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de *VvHT5* et *VvcwINV1*. Leur fonction sera ensuite validée par gel retard ou par coexpression des facteurs de transcription identifiés dans des plantes transgéniques transformées à l'aide de constructions promoteur-GFP en cours de réalisation.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- Abad LR, D'Urzo MP, Liu D, Narasimhan ML, Reuveni M, Zhu JK, Niu X, Singh NK, Hasegawa PM, Bressan RA** (1996) Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science* **118**: 11-23
- Afoufa-Bastien D, Medici A, Jeauffre J, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Atanassova R, Laloi M** (2010) The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and microarray expression profiling. *BMC Plant Biology* **10**:245
- Ageorges A, Issaly N, Picaud S, Delrot S, Romieu C** (2000) Identification and functional expression in yeast of a grape berry sucrose carrier. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 177-185
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemssen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh Y-S, Amasino R, Scheres B** (2004) The Plethora Genes Mediate Patterning of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche. *Cell* **119**: 109-120
- Albert JP, Asselin C, Avril J, Barillère JM, Benhamou ML, Boidron JN, Bondiou JC, Bouard J, Carbonneau A, Caro G, Cordonnier R, Courtois M, Dubourdiou D, Escudier JL, Flacelière C, Flandrin JL, Flanzky C, Fournier D, Galant P, Glories Y, Huglin P, Kauffmann-Samaras A, Lacoste J, Langevin-Mijangos F, Larue F, Lenoir J, Logette L, Mariette C, Martin B, Morlat R, Nahoum-Grappe V, Passelergue R, Perrot A, Pouget R, Puisais J, Ribereau-Gayon P, Rousseau G, Royer C, Séguin G, Sudraud P, Tinlot R, Vabre G, Vagny P, Van Quynh C, Vernes M, Woutaz F** (1988) *La vigne et le vin.*, Ed La Manufacture et La Cité des Sciences et de l'Industrie, Lyon
- Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E** (1993) Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 7327-7331
- Alleweldt G, Radler F** (1962) Interrelationship between photoperiodic behaviour of grapes and growth of plant tissue cultures. *Plant Physiology* **37**: 376-379
- Aluri S, Büttner M** (2007) Identification and functional expression of the Arabidopsis thaliana vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 2537-2542
- Amano M, Toyoda K, Ichinose Y, Yamada T, Shiraishi T** (1997) Association between Ion Fluxes and Defense Responses in Pea and Cowpea Tissues. *Plant and Cell Physiology* **38**: 698-706
- Anisimova M, Gascuel O** (2006) Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. *Syst Biol* **55**: 539-552
- Antoniw JF, Ritter CE, Pierpoint WS, Van Loon LC** (1980) Comparison of Three Pathogenesis-related Proteins from Plants of Two Cultivars of Tobacco Infected with TMV. *J Gen Virol* **47**: 79-87
- Aoshima H, Yamada M, Sauer N, Komor E, Schobert C** (1993) Heterologous expression of the H⁺/hexose cotransporter from chlorella in xenopus oocytes and its characterization with respect to sugar specificity, ph and membrane-potential. *Journal of Plant Physiology* **141**: 293-297
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399

- Arroyo-Garcia R, Ruiz-Garcia L, Bolling L, Ocete R, Lopez MA, Arnold C, Ergul A, Soylemezoglu G, Uzun HI, Cabello F, Ibanez J, Aradhya MK, Atanassov A, Atanassov I, Balint S, Cenis JL, Costantini L, Goris-Lavets S, Grando MS, Klein BY, McGovern PE, Merdinoglu D, Pejic I, Pelsy F, Primikirios N, Risovannaya V, Roubelakis-Angelakis KA, Snoussi H, Sotiri P, Tamhankar S, This P, Troshin L, Malpica JM, Lefort F, Martinez-Zapater JM** (2006) Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology* **15**: 3707-3714
- Arya HC, Hildebrandt AC, Ricker AJ** (1962) Growth in tissue culture of single clones from grape stems and phylloxera galls. *Plant Physiology* **37**: 387-392
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J** (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977-983
- Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thevenot P, Delrot S** (2003) Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiol* **131**: 326-334
- Augé R, Beauchesne G, Boccon-Gibod J, Decourtye L, Digat B, Jalouzot R, Minier R, Morand JC, Reynoird JP, Strullu DG, Vidalie H** (1989) La culture *in vitro* et ses applications horticoles., Ed Tec&Doc-Lavoisier, Paris
- Awad MA, de Jager A** (2002) Formation of flavonoids, especially anthocyanin and chlorogenic acid in 'Jonagold' apple skin: influences of growth regulators and fruit maturity. *Scientia Horticulturae* **93**: 257-266
- Ayolié K, El Yacoubi H, Rochdi A** (2007) Influence du 2,4-D et de l'explant embryonnaire sur la callogenèse du Blé dur. . *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux* **146**: 97-112
- Azevedo H, Conde C, Gerós H, Tavares RM** (2006) The non-host pathogen *Botrytis cinerea* enhances glucose transport in *Pinus pinaster* suspension-cultured cells. *Plant Cell Physiol* **47**: 290-298
- Aziz A, Gauthier A, Bézier A, Poinsot B, Joubert J-M, Pugin A, Heyraud A, Baillieul F** (2007) Elicitor and resistance-inducing activities of beta-1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with beta-1,3 glucans and alpha-1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1463-1472
- Aziz A, Heyraud A, Lambert B** (2004) Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* **218**: 767-774
- Baggiolini M** (1952) Stade repères du pêcher. *Revue Normande d'Agriculture, Viticulture et Arboriculture* **4**: 29
- Balibrea Lara ME, Gonzalez Garcia M-C, Fatima T, Ehness R, Lee TK, Proels R, Tanner W, Roitsch T** (2004) Extracellular Invertase Is an Essential Component of Cytokinin-Mediated Delay of Senescence. *Plant Cell* **16**: 1276-1287
- Baydar N** (2006) Phenolic compositions of grapevine shoot tips collected in different months and their effects on the explant browning. *Biotechnol. & Biotechnol.* <http://diagnosisp.com>
- Bechinger C, Giebel K-F, Schnell M, Leiderer P, Deising HB, Bastmeyer M** (1999) Optical Measurements of Invasive Forces Exerted by Appressoria of a Plant Pathogenic Fungus. *Science* **285**: 1896-1899
- Beers EP, McDowell JM** (2001) Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 561-567

- Ben Amar A, Cobanov P, Boonrod K, Krczal G, Bouzid S, Ghorbel A, Reustle G** (2007) Efficient procedure for grapevine embryogenic suspension establishment and plant regeneration: role of conditioned medium for cell proliferation. *Plant Cell Reports* **26**: 1439-1447
- Benhamou N, Grenier J, Chrispeels MJ** (1991) Accumulation of β -Fructosidase in the Cell Walls of Tomato Roots following Infection by a Fungal Wilt Pathogen. *Plant Physiol.* **97**: 739-750
- Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T** (2004) Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* **122**: 419-428
- Bessis R** (1986) Grape vine physiology: the contribution of culture in vitro. *Cellular and Molecular Life Sciences* **42**: 927-933
- Bezier A, Lambert B, Baillieul F** (2002) Cloning of a grapevine Botrytis-responsive gene that has homology to the tobacco hypersensitivity-related hsr203J. *J Exp Bot* **53**: 2279-2280
- Bézier A, Lambert B, Baillieul F** (2002) Study of Defense-related Gene Expression in Grapevine Leaves and Berries Infected with Botrytis cinerea. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 111-120
- Biemelt S, Sonnewald U** (2006) Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *J Plant Physiol* **163**: 307-318
- Blakeman JP, Szejnberg A** (1973) Effect of surface wax on inhibition of germination of Botrytis cinerea spores on beetroot leaves. *Physiological Plant Pathology* **3**: 269-278
- Blatt MR, Grabov A, Brearley J, Hammond-Kosack K, Jones JDG** (1999) K⁺ channels of Cf-9 transgenic tobacco guard cells as targets for Cladosporium fulvum Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *The Plant Journal* **19**: 453-462
- Bloesch B, Viret O** (2008) Stades phénologiques repères de la vigne. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et d'Horticulture* **40**
- Blouin J, Guimberteau G** (2000) Maturation et maturité des raisins., Ed Féret, Bordeaux
- Boller T, Felix G** (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 379-406
- Bonas U, Lahaye T** (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 44-50
- Bondada BR, Matthews MA, Shackel KA** (2005) Functional xylem in the post-veraison grape berry. *J. Exp. Bot.* **56**: 2949-2957
- Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Blein JP, Ricci P** (1996) Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 181-192
- Boorer KJ, Forde BG, Leigh RA, Miller AJ** (1992) Functional expression of a plant plasma membrane transporter in Xenopus oocytes. *FEBS Letters* **302**: 166-168
- Boorer KJ, Loo DD, Wright EM** (1994) Steady-state and presteady-state kinetics of the H⁺/hexose cotransporter (STP1) from Arabidopsis thaliana expressed in Xenopus oocytes. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 20417-20424
- Bouchet P, Guignard JL, Villard J** (1999) Les champignons. *Mycologie fondamentale et appliquée.*, Ed Masson, Paris
- Boudart G, Charpentier M, Lafitte C, Martinez Y, Jauneau A, Gaulin E, Esquerre-Tugaye M-T, Dumas B** (2003) Elicitor Activity of a Fungal Endopolygalacturonase in Tobacco Requires a Functional Catalytic Site and Cell Wall Localization. *Plant Physiol.* **131**: 93-101

- Bourque S, Binet MN, Ponchet M, Pugin A, Lebrun-Garcia A** (1999) Characterization of the cryptogin binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem* **274**: 34699-34705
- Bourque S, Lemoine R, Sequeira-Legrand A, Fayolle L, Delrot S, Pugin A** (2002) The elicitor cryptogin blocks glucose transport in tobacco cells. *Plant Physiol* **130**: 2177-2187
- Bracho GE, Whitaker JR** (1990) Characteristics of the Inhibition of Potato (*Solanum tuberosum*) Invertase by an Endogenous Proteinaceous Inhibitor in Potatoes. *Plant Physiol.* **92**: 381-385
- Brand MH** (1993) Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **35**: 203-209
- Braun AC** (1950) Comparison of normal, habituated and crown gall tumor tissue implants in the European grape. *American Journal of Botany* **37**: 499-501
- Bret-Harte MS, Silk WK** (1994) Nonvascular, Symplasmic Diffusion of Sucrose Cannot Satisfy the Carbon Demands of Growth in the Primary Root Tip of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **105**: 19-33
- Brezeanu A, Iordan M, Rosu A** (1980) The micropropagation of *Vitis vinifera*. I. The induction and characterisation of callus from tissues of somatic origin. *Rev. Roum. Biol. Veget.* **25**: 135-142
- Briskin DP, Thornley WR, Wyse RE** (1985) Membrane Transport in Isolated Vesicles from Sugarbeet Taproot : II. Evidence for a Sucrose/H⁺-Antiport. *Plant Physiol.* **78**: 871-875
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C** (1994) Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. *Plant Cell* **6**: 1703-1712
- Brito N, Espino JJ, Gonzalez C** (2006) The Endo-beta-1,4-Xylanase Xyn11A Is Required for Virulence in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 25-32
- Broekaert WF, Terras F, Cammue B, Osborn RW** (1995) Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System. *Plant Physiol.* **108**: 1353-1358
- Brown I, Trethowan J, Kerry M, Mansfield J, Bolwell GP** (1998) Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *The Plant Journal* **15**: 333-343
- Brunner F, Stintzi A, Fritig B, Legrand M** (1998) Substrate specificities of tobacco chitinases. *Plant Journal* **14**: 225-234
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL** (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists Eds, Rockville, Maryland
- Buhot N, Gomes E, Milat ML, Ponchet M, Marion D, Lequeu J, Delrot S, Coutos-Thevenot P, Blein JP** (2004) Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. *Mol Biol Cell* **15**: 5047-5052
- Büssis D, Heineke D, Sonnewald U, Willmitzer L, Raschke K, Heldt H-W** (1997) Solute accumulation and decreased photosynthesis in leaves of potato plants expressing yeast-derived invertase either in the apoplast, vacuole or cytosol. *Planta* **202**: 126-136
- Büttner M** (2007) The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **581**: 2318-2324
- Büttner M** (2010) The *Arabidopsis* sugar transporter (AtSTP) family: an update. *Plant Biology* **12**: 35-41

- Büttner M, Sauer N** (2000) Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 263-274
- Büttner M, Truernit E, Baier K, Scholz-Starke J, Sontheim M, Lauterbach C, Huss V, Sauer N** (2000) AtSTP3, a green leaf-specific, low affinity monosaccharide-H⁺ symporter of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **23**: 175-184
- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R** (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 2165-2180
- Calderón AA, Zapata JM, Pedreño MA, Muñoz R, Barceló AR** (1992) Levels of 4-hydroxystilbene-oxidizing isoperoxidases related to constitutive disease resistance in in vitro-cultured grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **29**: 63-70
- Camps C, Kappel C, Lecomte P, Leon C, Gomes E, Coutos-Thevenot P, Delrot S** (2010) A transcriptomic study of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon) interaction with the vascular ascomycete fungus *Eutypa lata*. *J Exp Bot*
- Candolfi-Vasconcelos MC, Candolfi MP, Kohlet W** (1994) Retranslocation of carbon reserves from the woody storage tissues into the fruit as a response to defoliation stress during the ripening period in *Vitis vinifera* L. *Planta* **192**: 567-573
- Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm Jr, Hedrich R** (2005) Phloem-localized, Proton-coupled Sucrose Carrier ZmSUT1 Mediates Sucrose Efflux under the Control of the Sucrose Gradient and the Proton Motive Force. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 21437-21443
- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV** (2004) The Vegetative Vacuole Proteome of *Arabidopsis thaliana* Reveals Predicted and Unexpected Proteins. *Plant Cell*: tpc.104.027078
- Cartolaro P, Steva H** (1990) Maîtrise de l'oïdium au laboratoire. *Phytoma* **419**: 37-44
- Champagnol F** (1984) *Eléments de physiologie de la vigne et de viticulture générale.*, Ed François Champagnol, Saint-Gély-du-Fesc
- Chang S, Puryear J, Cairney J** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**: 113-116
- Charity JA, Hughes P, Anderson MA, Bittisnich DJ, Whitecross M, Higgins TJV** (2005) Pest and disease protection conferred by expression of barley β -hordothionin and *Nicotiana glauca* proteinase inhibitor genes in transgenic tobacco. *Functional Plant Biology* **32**: 35-44
- Chatelet DS, Rost TL, Matthews MA, Shackel KA** (2008) The peripheral xylem of grapevine (*Vitis vinifera*) berries. 2. Anatomy and development. *J. Exp. Bot.* **59**: 1997-2007
- Chée R, Pool RM** (1987) Improved inorganic media constituents for in vitro shoot multiplication of *Vitis*. *Scientia Horticulturae* **32**: 85-95
- Cheng S-H, Willmann MR, Chen H-C, Sheen J** (2002) Calcium Signaling through Protein Kinases. The *Arabidopsis* Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family. *Plant Physiol.* **129**: 469-485
- Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Christen R** (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* **7**: 439
- Chittoor JM, Leach JE, White FF** (1997) Differential Induction of a Peroxidase Gene Family During Infection of Rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**: 861-871
- Cho J-I, Lee S-K, Ko S, Kim H-K, Jun S-H, Lee Y-H, Bhoo SH, Lee K-W, An G, Hahn T-R, Jeon J-S** (2005) Molecular cloning and expression analysis of the cell-wall invertase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports* **24**: 225-236

- Choquer M, Fournier E, Kunz C, Levis C, Pradier J-M, Simon A, Viaud M** (2007) *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters* **277**: 1-10
- Chou H-M, Bundock N, Rolfe SA, Scholes JD** (2000) Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Molecular Plant Pathology* **1**: 99-113
- Christensen AB, Cho BH, Næsby M, Gregersen PL, Brandt J, Madriz-Ordeñana K, Collinge DB, Thordal-Christensen H** (2002) The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology* **3**: 135-144
- Chung KM, Igari K, Uchida N, Tasaka M** (2008) New perspectives on plant defense responses through modulation of developmental pathways. *Mol Cells* **26**: 107-112
- Clark J, HALL JL** (1998) Solute transport into healthy and powdery mildew-infected leaves of pea and uptake by powdery mildew mycelium. *New Phytologist* **140**: 261-269
- Cole L, Dewey FM, Hawes CR** (1996) Infection mechanisms of *Botrytis* species: pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycological Research* **100**: 277-286
- Colmenares AJ, Aleu J, Durán-Patrón R, Collado IG, Hernández-Galán R** (2002) The Putative Role of Botrydial and Related Metabolites in the Infection Mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology* **28**: 997-1005
- Conde C, Agasse A, Glissant D, Tavares R, Gerós H, Delrot S** (2006) Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. *Plant Physiol* **141**: 1563-1577
- Conde C, Silva P, Agasse A, Lemoine R, Delrot S, Tavares R, Gerós H** (2007) Utilization and Transport of Mannitol in *Olea europaea* and Implications for Salt Stress Tolerance. *Plant and Cell Physiology* **48**: 42-53
- Coninck BD, Roy KL, Francis I, Clerens S, Vergauwen R, Halliday AM, Smith SM, Laere AV, Ende WVD** (2005) *Arabidopsis* AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant, Cell & Environment* **28**: 432-443
- Coombe BG** (1992) Research on Development and Ripening of the Grape Berry. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**: 101-110
- Corio-Costet MF** (2007) *Erysiphe necator*., Ed TEC&DOC, Paris
- Corpet F** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**: 10881-10890
- Couderc J-P, Hannin H, d'Hauteville F, Montaigne E** (2007) *Bacchus 2008*., Ed Dunod, Paris
- Coutos-Thevenot P, Goebel-Tourand I, Mauro M-C, Jouanneau J-P, Boulay M, Deloire A, Guern J** (1992) Somatic embryogenesis from grapevine cells. I-Improvement of embryo development by changes in culture conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **29**: 125-133
- Coutos-Thevenot P, Poinssot B, Bonomelli A, Yean H, Breda C, Buffard D, Esnault R, Hain R, Boulay M** (2001) In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *J Exp Bot* **52**: 901-910
- Crawford NM, Glass ADM** (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* **3**: 389-395
- Cutler HG, Jacyno JM, Harwood JS, Dulik D, Goodrich PD, Roberts RG** (1993) Botcinolide - a biologically-active natural product from *Botrytis-cinerea*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **57**: 1980-1982

- Czemmel S, Stracke R, Weisshaar B, Cordon N, Harris NN, Walker AR, Robinson SP, Bogs J** (2009) The Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor VvMYBF1 Regulates Flavonol Synthesis in Developing Grape Berries. *Plant Physiol.* **151**: 1513-1530
- D'Ovidio R, Mattei B, Roberti S, Bellincampi D** (2004) Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1696**: 237-244
- Daguin F, Letouzé R** (1986) Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. *Physiologia Plantarum* **66**: 94-98
- Dai ZW, Vivin P, Barrieu F, Ollat N, Delrot S** (2010) Physiological and modelling approaches to understand water and carbon fluxes during grape berry growth and quality development: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **16**: 70-85
- Dalton CC, Iqbal K, Turner DA** (1983) Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. *Physiologia Plantarum* **57**: 472-476
- Dangl JL, Jones JDG** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833
- Darvill A, Augur C, Bergmann C, Carlson RW, Cheong J-J, Eberhard S, Hahn MG, LÃ³pez V-M, Marfa Vr, Meyer B, Mohnen D, O'Neill MA, Spiro MD, van Halbeek H, York WS, Albersheim P** (1992) Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiology* **2**: 181-198
- Darvill AG, Albersheim P** (1984) Phytoalexins and their Elicitors-A Defense Against Microbial Infection in Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **35**: 243-275
- Davies C, Boss PK, Robinson SP** (1997) Treatment of Grape Berries, a Nonclimacteric Fruit with a Synthetic Auxin, Retards Ripening and Alters the Expression of Developmentally Regulated Genes. *Plant Physiol.* **115**: 1155-1161
- Davies C, Robinson SP** (1996) Sugar accumulation in grape berries. Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues. *Plant Physiol* **111**: 275-283
- Davies C, Robinson SP** (2000) Differential Screening Indicates a Dramatic Change in mRNA Profiles during Grape Berry Ripening. Cloning and Characterization of cDNAs Encoding Putative Cell Wall and Stress Response Proteins. *Plant Physiol.* **122**: 803-812
- Davies C, Wolf T, Robinson SP** (1999) Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues. *Plant Science* **147**: 93-100
- de Jong JC, McCormack BJ, Smirnoff N, Talbot NJ** (1997) Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**: 244-244
- De Lorenzo G, Ferrari S** (2002) Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 295-299
- Decendit A, Mérillon JM** (1996) Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* **15**: 762-765
- Deepak S, Shailasree S, Kini R, Hause B, Shetty S, Mithöfer A** (2007) Role of hydroxyproline-rich glycoproteins in resistance of pearl millet against downy mildew pathogen &Sclerospora graminicola&. *Planta* **226**: 323-333
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588
- Delrot S, Atanassova R, Gomès E, Coutos-Thévenot P** (2001) Plasma membrane transporters: a machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Science* **161**: 391-404

- Delrot S, Atanassova R, Maurouset L** (2000) Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**: 281-306
- Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergeat V, Decendit A, Richard T, Carde JP, Merillon JM, Hamdi S** (2006) Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol* **140**: 499-511
- Deluc L, Grimplet J, Wheatley M, Tillett R, Quilici D, Osborne C, Schooley D, Schlauch K, Cushman J, Cramer G** (2007) Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* **8**: 429
- Dempsey DMA, Klessig DF** (1994) Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends in Cell Biology* **4**: 334-338
- Derckel J-P, Baillieux F, Manteau Sb, Audran J-C, Haye B, Lambert B, Legendre L** (1999) Differential Induction of Grapevine Defenses by Two Strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **89**: 197-203
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard J-F, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie J-M, Gascuel O** (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucl. Acids Res.*: gkn180
- Deus-Neumann B, Zenk MH** (1984) Instability of Indole Alkaloid Production in *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures. *Planta Med* **50**: 427,431
- Dibley SJ, Gear ML, Yang X, Rosche EG, Offler CE, McCurdy DW, Patrick JW** (2005) Temporal and spatial expression of hexose transporters in developing tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *Functional Plant Biology* **32**: 777-785
- Dickman MB, Park YK, Oltersdorf T, Li W, Clemente T, French R** (2001) Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6957-6962
- Doares SH, Syrovets T, Weiler EW, Ryan CA** (1995) Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4095-4098
- Doctrinal M, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS** (1989) In vitro gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **17**: 1-12
- Doehlemann G, Berndt P, Hahn M** (2006) Different signalling pathways involving a Galpha protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Mol Microbiol* **59**: 821-835
- Doehlemann G, Berndt P, Hahn M** (2006) Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea*. *Microbiology* **152**: 2625-2634
- Doehlemann G, Molitor F, Hahn M** (2005) Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet Biol* **42**: 601-610
- Doehlemann G, Wahl R, Horst RJ, Voll LM, Usadel B, Poree F, Stitt M, Pons-Kuhnemann J, Sonnewald U, Kahmann R, Kamper J** (2008) Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* **56**: 181-195
- Doll S, Rodier F, Willenbrink J** (1979) Accumulation of sucrose in vacuoles isolated from red beet tissue. *Planta* **144**: 407-411
- Dong X, Mindrinos M, Davis KR, Ausubel FM** (1991) Induction of Arabidopsis Defense Genes by Virulent and Avirulent *Pseudomonas syringae* Strains and by a Cloned Avirulence Gene. *Plant Cell* **3**: 61-72

- Dorey S, Baillieul F, Pierrel M-As, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S** (1997) Spatial and Temporal Induction of Cell Death, Defense Genes, and Accumulation of Salicylic Acid in Tobacco Leaves Reacting Hypersensitively to a Fungal Glycoprotein Elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**: 646-655
- Doss RP, Deisenhofer J, Krug von Nidda H-A, Soeldner AH, McGuire RP** (2003) Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **63**: 687-691
- Doster MA, Schnathorst WC** (1985) Effects of leaf maturity and cultivar resistance on development of the powdery mildew fungus on grapevines. *Phytopathology* **75**: 318-321
- Drennan PM, Goldsworthy D, Buswell A** (2009) Marginal and laminar hydathode-like structures in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **204**: 210-219
- Dubos B** (2002) *Maladies cryptogamiques de la vigne. Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne.*, Ed Féret, Bordeaux
- Dulermo T, Rasclé C, Chinnici G, Gout E, Bligny R, Cotton P** (2009) Dynamic carbon transfer during pathogenesis of sunflower by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*: from plant hexoses to mannitol. *New Phytol*
- Dumas B, Freyssinet G, Pallett KE** (1995) Tissue-Specific Expression of Germin-Like Oxalate Oxidase during Development and Fungal Infection of Barley Seedlings. *Plant Physiol.* **107**: 1091-1096
- Durrant WE, Dong X** (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185-209
- Edgar RC** (2004) Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids Res.* **32**: 1792-1797
- Eibl R, Eibl D** (2009) Plant Cell-Based Bioprocessing. *In Cell and Tissue Reaction Engineering*, pp 315-356
- Elad Y** (1988) Scanning electron microscopy of parasitism of *Botrytis cinerea* on flowers and fruits of cucumber. *Transactions of the British Mycological Society* **91**: 185-190
- Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N** (2004) *Botrytis: Biology, Pathology and Control.*, Ed Kluwer Academic Publishers
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt UG** (2006) Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis mesophyll* cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol* **141**: 196-207
- Endress R** (1994) *Plant Cell Biotechnology.*, Ed Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Essmann J, Schmitz-Thom I, Schon H, Sonnewald S, Weis E, Scharfe J** (2008) RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco. *Plant Physiol* **147**: 1288-1299
- Evans D, Coleman J, Kearns A** (2003) *Plant Cell Culture. The Basics from background to bench.*, Ed Taylor & Francis Inc
- Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y** (1983) *Handbook of Plant Cell Culture.*, Ed Macmillan Vol 1, New York
- Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, Hinarejos C, Tuset JJ, Arnau J, Pina JA, Navarro L, Peña L** (2001) Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding* **7**: 175-185
- Fallot J** (1955) Culture aseptiques de tiges de vigne prélevées juste avant et pendant le repos hivernal. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle* **90**: 173-181

- Famiani F, Walker RP, Tecsí L, Chen ZH, Proietti P, Leegood RC** (2000) An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *Journal of Experimental Botany* **51**: 675-683
- Fang Hsieh T, Wen Huang J, Hsiang T** (2001) Light and Scanning Electron Microscopy Studies on the Infection of Oriental Lily Leaves By *Botrytis Elliptica*. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 571-581
- Fauth M, Schweizer P, Buchala A, Markstadter C, Riederer M, Kato T, Kauss H** (1998) Cutin Monomers and Surface Wax Constituents Elicit H₂O₂ in Conditioned Cucumber Hypocotyl Segments and Enhance the Activity of Other H₂O₂ Elicitors. *Plant Physiol.* **117**: 1373-1380
- Felix G, Regenass M, Boller T** (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal* **4**: 307-316
- Felix G, Regenass M, Boller T** (2000) Sensing of Osmotic Pressure Changes in Tomato Cells. *Plant Physiol.* **124**: 1169-1180
- Ferrari S, Vairo D, Ausubel FM, Cervone F, De Lorenzo G** (2003) Tandemly Duplicated Arabidopsis Genes That Encode Polygalacturonase-Inhibiting Proteins Are Regulated Coordinately by Different Signal Transduction Pathways in Response to Fungal Infection. *Plant Cell* **15**: 93-106
- Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thevenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S** (1999) Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiol* **120**: 1083-1094
- Fischer K, Weber A** (2002) Transport of carbon in non-green plastids. *Trends in Plant Science* **7**: 345-351
- Flaishman MA, Kolattukudy PE** (1994) Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 6579-6583
- Flor HH** (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275-296
- Fondy BR, Geiger DR** (1977) Sugar Selectivity and Other Characteristics of Phloem Loading in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* **59**: 953-960
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446
- Fotopoulos V, Gilbert MJ, Pittman JK, Marvier AC, Buchanan AJ, Sauer N, Hall JL, Williams LE** (2003) The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, Atbetafruct1, are induced in Arabidopsis during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol* **132**: 821-829
- Fourie JF, Holz G** (1995) Initial infection processes by *botrytis-cinerea* on nectarine and plum fruit and the development of decay. *Phytopathology* **85**: 82-87
- Fritig B, Heitz T, Legrand M** (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology* **10**: 16-22
- Frommer WB, Sonnewald U** (1995) Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. *J. Exp. Bot.* **46**: 587-607
- Gahrtz M, Schmelzer E, Stolz J, Sauer N** (1996) Expression of the PmSUC1 sucrose carrier gene from *Plantago major* L. is induced during seed development. *The Plant Journal* **9**: 93-100
- Galet P** (2000) Précis de viticulture., Ed JF Impression, Saint-jean de Védas

- Galet P** (2006) Grands cépages., Ed Hachette, Paris
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**: 151-158
- Gao Z, Maurousset L, Lemoine R, Yoo S-D, van Nocker S, Loescher W** (2003) Cloning, Expression, and Characterization of Sorbitol Transporters from Developing Sour Cherry Fruit and Leaf Sink Tissues. *Plant Physiol.* **131**: 1566-1575
- García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodríguez-Palenzuela P** (1998) Plant defense peptides. *Peptide Science* **47**: 479-491
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid D, Thorpe T** (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **32**: 272-289
- Gear ML, McPhillips ML, Patrick JW, McCurdy DW** (2000) Hexose transporters of tomato: molecular cloning, expression analysis and functional characterization. *Plant Mol Biol* **44**: 687-697
- Gechev TS, Hille J** (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *The Journal of Cell Biology* **168**: 17-20
- Geigenberger P, Langenberger S, Wilke I, Heineke D, Heldt HW, Stitt M** (1993) Sucrose is metabolised by sucrose synthase and glycolysis within the phloem complex of *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta* **190**: 446-453
- Geiger DR, Sovonick SA, Shock TL, Fellows RJ** (1974) Role of Free Space in Translocation in Sugar Beet. *Plant Physiol.* **54**: 892-898
- Gibeaut DM, Hulett J, Cramer GR, Seemann JR** (1997) Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol* **115**: 317-319
- Giovannoni J** (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 725-749
- Giraud T, Fortini D, Levis C, Lamarque C, Leroux P, LoBuglio K, Brygoo Y** (1999) Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuina*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* **89**: 967-973
- Giraud T, Levis C, Fortini D, Leroux P, Brygoo Y** (1998) Plusieurs espèces sous le nom de *Botrytis cinerea*. *Phytoma* **504**: 56-60
- Girault T, Francois J, Rogniaux H, Pascal S, Delrot S, Coutos-Thevenot P, Gomes E** (2008) Exogenous application of a lipid transfer protein-jasmonic acid complex induces protection of grapevine towards infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol Biochem* **46**: 140-149
- Glazebrook J** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205-227
- Glicklis R, Mills D, Sitton D, Stortelder W, Merchuk JC** (1998) Polysaccharide production by plant cells in suspension: Experiments and mathematical modeling. *Biotechnology and Bioengineering* **57**: 732-740
- Glissant D** (2005) Approches transcriptomique et fonctionnelle du développement et du transport des sucres dans la baie de raisin (*Vitis vinifera* L.). Thèse de doctorat. Université de Poitiers
- Godt DE, Roitsch T** (1997) Regulation and Tissue-Specific Distribution of mRNAs for Three Extracellular Invertase Isoenzymes of Tomato Suggests an Important Function in Establishing and Maintaining Sink Metabolism. *Plant Physiol.* **115**: 273-282
- Goetz M, Godt DE, Guivarc'h A, Kahmann U, Chriqui D, Roitsch T** (2001) Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6522-6527

- Göktürk Baydar N, Harmankaya N** (2005) Changes in endogenous hormones levels during the ripening of grape cultivars having different berry set mechanisms. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **29**: 205-210
- Gomes E, Sagot E, Gaillard C, Laquitaine L, Poinssot B, Sanejouand YH, Delrot S, Coutos-Thevenot P** (2003) Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cells in response to fungal elicitor treatments. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 456-464
- Gorlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1996) Benzothiadiazole, a Novel Class of Inducers of Systemic Acquired Resistance, Activates Gene Expression and Disease Resistance in Wheat. *Plant Cell* **8**: 629-643
- Gotô N** (1986) Stimulation of polysaccharide formation by 2,4 dichlorophenoxyacetic acid in callus tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **66**: 49-52
- Govrin EM, Levine A** (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* **10**: 751-757
- Govrin EM, Rachmilevitch S, Tiwari BS, Solomon M, Levine A** (2006) An Elicitor from *Botrytis cinerea* Induces the Hypersensitive Response in *Arabidopsis thaliana* and Other Plants and Promotes the Gray Mold Disease. *Phytopathology* **96**: 299-307
- Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J** (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant Journal* **23**: 441-450
- Grassi F, Labra M, Imazio S, Spada A, Sgorbati S, Scienza A, Sala F** (2003) Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **107**: 1315-1320
- Greenberg JT, Yao N** (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**: 201-211
- Greenspan MD, Shackel KA, Matthews MA** (1994) Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits. *Plant Cell and Environment* **17**: 811-820
- Gregersen PL, Thordal-Christensen H, Förster H, Collinge DB** (1997) Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (syn. *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**: 85-97
- Grenan S, Truel P** (1983) Observations sur un aspect de la variabilité constatée au cours de la multiplication végétative de variétés de vigne issues de semis de *Vitis vinifera* L. *Agronomie* **3**: 675-680
- Greutert H, Martinola E, Keller F** (1998) Mannitol transport by vacuoles of storage parenchyma of celery petioles operates by facilitated diffusion. *Journal of Plant Physiology* **153**: 91-96
- Gross J, Bazak H, Blumenfeld A, Benarie R** (1984) Changes in chlorophyll and carotenoid-pigments in the peel of triumph persimmon (*diospyros-kaki* l) induced by pre-harvest gibberellin (*ga3*) treatment. *Scientia Horticulturae* **24**: 305-314
- Guindon S, Gascuel O** (2003) A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol* **52**: 696-704
- Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kuhn C** (2006) Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant J* **45**: 180-192
- Hahn M, Mendgen K** (2001) Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 322-327

- Hain R, Reif H-J, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, Wiese W, Schmelzer E, Schreier PH, Stocker RH, Stenzel K** (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**: 153-156
- Hajirezaei MR, Takahata Y, Trethewey RN, Willmitzer L, Sonnewald U** (2000) Impact of elevated cytosolic and apoplastic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. *Journal of Experimental Botany* **51**: 439-445
- Hammerschmidt R** (1999) Phytoalexins: What Have We Learned After 60 Years? *Annual Review of Phytopathology* **37**: 285-306
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang H-S, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA** (2000) Orchestrated Transcription of Key Pathways in Arabidopsis by the Circadian Clock. *Science* **290**: 2110-2113
- Harrison MJ** (1996) A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *The Plant Journal* **9**: 491-503
- Hausbeck MK, Moorman GW** (1996) Managing *Botrytis* in Greenhouse-Grown Flower Crops. *Plant Disease* **80**: 1212-1219
- Hayes MA, Davies C, Dry IB** (2007) Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues. *J Exp Bot* **58**: 1985-1997
- Hayes MA, Feechan A, Dry IB** (2010) Involvement of Abscisic Acid in the Coordinated Regulation of a Stress-Inducible Hexose Transporter (VvHT5) and a Cell Wall Invertase in Grapevine in Response to Biotrophic Fungal Infection. *Plant Physiol.* **153**: 211-221
- Heath M** (2001) Non-host resistance to plant pathogens: nonspecific defense or the result of specific recognition events? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **58**: 53-54
- Heath MC** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* **44**: 321-334
- Heineke D, Wildenberger K, Sonnewald U, Willmitzer L, Heldt HW** (1994) Accumulation of hexoses in leaf vacuoles: Studies with transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in the cytosol, vacuole or apoplast. *Planta* **194**: 29-33
- Herbers K, Meuwly P, Frommer WB, Metraux JP, Sonnewald U** (1996) Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase: Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway. *Plant Cell* **8**: 793-803
- Herbers K, Sonnewald U** (1998) Molecular determinants of sink strength. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 207-216
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucl. Acids Res.* **27**: 297-300
- Hipskind JD, Paiva NL** (2000) Constitutive Accumulation of a Resveratrol-Glucoside in Transgenic Alfalfa Increases Resistance to *Phoma medicaginis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 551-562
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H** (2001) A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant and Cell Physiology* **42**: 462-468
- Hirai T, Heymann JAW, Maloney PC, Subramaniam S** (2003) Structural Model for 12-Helix Transporters Belonging to the Major Facilitator Superfamily. *J. Bacteriol.* **185**: 1712-1718
- Hirose T, Imaizumi N, Scofield GN, Furbank RT, Ohsugi R** (1997) cDNA Cloning and Tissue Specific Expression of a Gene for Sucrose Transporter from Rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* **38**: 1389-1396
- Hopkins WG** (2003) *Physiologie Végétale.*, Ed De Boeck Université, Bruxelles

- Horwitz JP, Chua J, Curby RJ, Tomson AJ, Da Roo MA, Fisher BE, Mauricio J, Klundt I** (1964) Substrates for Cytochemical Demonstration of Enzyme Activity. I. Some Substituted 3-Indolyl- β -D-glycopyranosides Ia. *Journal of Medicinal Chemistry* **7**: 574-575
- Houndonougbo B** (1989) Influence de différentes concentrations d'acide indole-3-acétique, d'acide naphthalène-acétique, d'acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique et de kinétine sur la callogenèse et l'organogénèse in vitro de fragments d'entre-nœuds de deux variétés de patate douce (*Ipomoea batatas* L. Lam.). *Agronomie* **9**: 653-660
- Huckelhoven R** (2007) Cell wall - Associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* **45**: 101-127
- Huglin P, Schneider C** (1998) *Biologie et écologie de la vigne.*, Ed TEC&DOC, Paris
- Humphrey TV, Bonetta DT, Goring DR** (2007) Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. *New Phytologist* **176**: 7-21
- Ighilhariz Z, Bouabdallah L, Belkhodja M** (2008) Influence Hormonale sur l'Induction de la callogenèse chez *Atriplex Halimus* L. et *Atriplex Canescens* (Pursch. Nutt.). *European Journal of Scientific Research* **24**: 211-218
- Imlau A, Truernit E, Sauer N** (1999) Cell-to-Cell and Long-Distance Trafficking of the Green Fluorescent Protein in the Phloem and Symplastic Unloading of the Protein into Sink Tissues. *Plant Cell* **11**: 309-322
- Inaba A, Ishida M, Sobajima Y** (1976) Changes in endogenous hormone concentrations during berry development in relation to ripening of delaware grapes. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **45**: 245-252
- Iraki NM, Bressan RA, Carpita NC** (1989) Extracellular Polysaccharides and Proteins of Tobacco Cell Cultures and Changes in Composition Associated with Growth-Limiting Adaptation to Water and Saline Stress. *Plant Physiol.* **91**: 54-61
- Jacobs, Dry, Robinson** (1999) Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology* **48**: 325-336
- Jacquemont G, Style S** (1993) *Le Grand Livre des Vins d'Alsace.*, Ed du Chêne, Paris
- Jaffe MJ, Galston AW** (1968) The Physiology of Tendrils. *Annual Review of Plant Physiology* **19**: 417-434
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Huguency P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyere C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pe ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quetier F, Wincker P** (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**: 463-467
- Jayasankar S, Gray DJ, Litz RE** (1999) High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of grapevine. *Plant Cell Reports* **18**: 533-537
- Jeandet P, Bessis R, Sbaghi M, Meunier P** (1995) Production of the Phytoalexin Resveratrol by Grapes as a Response to Botrytis Attack Under Natural Conditions. *Journal of Phytopathology* **143**: 135-139
- Jeandet P, Douillet-Breuil A-Cl, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M** (2002) Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 2731-2741

- Ji X, Van den Ende W, Van Laere A, Cheng S, Bennett J** (2005) Structure, Evolution, and Expression of the Two Invertase Gene Families of Rice. *Journal of Molecular Evolution* **60**: 615-634
- Jobic C, Boisson AM, Gout E, Rascle C, Fevre M, Cotton P, Bligny R** (2007) Metabolic processes and carbon nutrient exchanges between host and pathogen sustain the disease development during sunflower infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Planta* **226**: 251-265
- Johnson R, Narvaez J, An G, Ryan C** (1989) Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 9871-9875
- Juchaux-Cachau M, Landouar-Arsivaud L, Pichaut J-P, Champion C, Porcheron B, Jeauffre J, Noiraud-Romy N, Simoneau P, Maurousset L, Lemoine R** (2007) Characterization of AgMaT2, a Plasma Membrane Mannitol Transporter from Celery, Expressed in Phloem Cells, Including Phloem Parenchyma Cells. *Plant Physiol.* **145**: 62-74
- Kanabus J, Bressan RA, Carpita NC** (1986) Carbon Assimilation in Carrot Cells in Liquid Culture. *Plant Physiol.* **82**: 363-368
- Kars I, Krooshof GH, Wagemakers L, Joosten R, Benen JA, van Kan JA** (2005) Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J* **43**: 213-225
- Kartsonas E, Papafotiou M** (2007) Mother plant age and seasonal influence on in vitro propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **90**: 111-116
- Kasparovsky T, Blein J-P, Mikes V** (2004) Ergosterol elicits oxidative burst in tobacco cells via phospholipase A2 and protein kinase C signal pathway. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 429-435
- Kataeva NV, Alexandrova IG, Butenko RG, Dragavtceva EV** (1991) Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **27**: 149-154
- Kato K, Shiozawa Y, Yamada A, Noguchi M, Nishida K** (1972) Jar fermentor culture of *nicotiana-tabacum* l cell suspensions. *Agricultural and Biological Chemistry* **36**: 899-902
- Kauffmann S, Legrand M, Geoffroy P, Fritig B** (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins - 4 pr proteins of tobacco have 1,3-beta-glucanase activity. *Embo Journal* **6**: 3209-3212
- Keller F** (1992) Transport of Stachyose and Sucrose by Vacuoles of Japanese Artichoke (*Stachys sieboldii*) Tubers. *Plant Physiol.* **98**: 442-445
- Keller H, Blein JP, Bonnet P, Ricci P** (1996) Physiological and Molecular Characteristics of Elicitin-Induced Systemic Acquired Resistance in Tobacco. *Plant Physiol.* **110**: 365-376
- Keller M, Smith JP, Bondada BR** (2006) Ripening grape berries remain hydraulically connected to the shoot. *J. Exp. Bot.* **57**: 2577-2587
- Keller M, Viret O, Cole FM** (2003) *Botrytis cinerea* Infection in Grape Flowers: Defense Reaction, Latency, and Disease Expression. *Phytopathology* **93**: 316-322
- Kende H, Zeevaart J** (1997) The Five "Classical" Plant Hormones. *Plant Cell* **9**: 1197-1210
- Kennedy JA** (2002) Understanding grape berry development. *Practical Winery & Vinyard.* www.practicalwinery.com

- Kennedy JA, Hayasaka Y, Vidal Sp, Waters EJ, Jones GP** (2001) Composition of Grape Skin Proanthocyanidins at Different Stages of Berry Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 5348-5355
- Kieran PM, MacLoughlin PF, Malone DM** (1997) Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology* **59**: 39-52
- Kim J-Y, Mahé A, Guy S, Brangeon J, Roche O, Chourey PS, Prioul J-L** (2000) Characterization of two members of the maize gene family, Incw3 and Incw4, encoding cell-wall invertases. *Gene* **245**: 89-102
- Kingston-Smith AH, Walker RP, Pollock CJ** (1999) Invertase in leaves: conundrum or control point? *Journal of Experimental Botany* **50**: 735-743
- Klarzynski O, Plesse B, Joubert J-M, Yvin J-C, Kopp M, Kloareg B, Fritig B** (2000) Linear beta -1,3 Glucans Are Elicitors of Defense Responses in Tobacco. *Plant Physiol.* **124**: 1027-1038
- Klepek Y-S, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R, Sauer N** (2005) Arabidopsis Polyol transporter 5, a New Member of the Monosaccharide Transporter-Like Superfamily, Mediates H⁺-Symport of Numerous Substrates, Including myo-Inositol, Glycerol, and Ribose. *Plant Cell* **17**: 204-218
- Klepek Y-S, Volke M, Konrad KR, Wippel K, Hoth S, Hedrich R, Sauer N** (2010) Arabidopsis thaliana Polyol/Monosaccharide Transporters 1 and 2: fructose and xylitol/H⁺ symporters in pollen and young xylem cells. *J. Exp. Bot.* **61**: 537-550
- Kliebenstein DJ, Rowe HC, Denby KJ** (2005) Secondary metabolites influence Arabidopsis/Botrytis interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *The Plant Journal* **44**: 25-36
- Klimecka M, Muszynska G** (2007) Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochimica Polonica* **54**: 219-233
- Kobayashi S, Ding CK, Nakamura Y, Nakajima I, Matsumoto R** (2000) Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). *Plant Cell Reports* **19**: 904-910
- Kocal N, Sonnewald U, Sonnewald S** (2008) Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Physiol* **148**: 1523-1536
- Koch K** (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 235-246
- Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM** (1997) Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* **2**: 379-384
- Komor E, Tanner W** (1974) The Hexose-Proton Cotransport System of *Chlorella*. *The Journal of General Physiology* **64**: 568-581
- Kortekamp A** (2006) Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiol Biochem* **44**: 58-67
- Krasnow M, Matthews M, Shackel K** (2008) Evidence for substantial maintenance of membrane integrity and cell viability in normally developing grape (*Vitis vinifera* L.) berries throughout development. *J. Exp. Bot.*: erm372
- Krausgrill S, Sander A, Greiner S, Weil M, Rausch T** (1996) Regulation of cell wall invertase by a proteinaceous inhibitor. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1193-1198
- Kretschmar F, Oliveira C, Braga M** (2007) Differential sugar uptake by cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **43**: 71-78
- Kuc J** (1995) Phytoalexins, Stress Metabolism, and Disease Resistance in Plants. *Annual Review of Phytopathology* **33**: 275-297

- Kühn C, Barker L, Burkle L, Frommer W-B** (1999) Update on sucrose transport in higher plants. *J. Exp. Bot.* **50**: 935-953
- Kühn C, Grof CP** (2010) Sucrose transporters of higher plants. *Curr Opin Plant Biol*
- Kühn C, Quick WP, Schulz A, Riesmeier JW, Sonnewald U, Frommer WB** (1996) Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant, Cell and Environment* **19**: 1115-1123
- Kumudini BS, Shetty HS** (2002) Association of lignification and callose deposition with host cultivar resistance and induced systemic resistance in pearl millet to *Sclerospora graminicola*. *Australasian Plant Pathology* **31**: 157-164
- Kunkel BN, Brooks DM** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 325-331
- Lachiver M** (1988) Vins, vignes et vigneron. Histoire du vignoble français., Ed Fayard, Paris
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Laloi M, Delrot S, M'Batchi B** (1993) Characterization of sugar efflux from sugar beet leaf plasma membrane vesicles. *Plant Physiol Biochem* **5**: 731-741
- Laloi C, Apel K, Danon A** (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 323-328
- Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB, Patrick JW** (2003) Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell & Environment* **26**: 37-56
- Lalonde S, Wipf D, Frommer WB** (2004) Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 341-372
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 251-275
- Lamotte O, Gould K, Lecourieux D, Sequeira-Legrand A, Lebrun-Garcia A, Durner J, Pugin A, Wendehenne D** (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol* **135**: 516-529
- Lang A, Doring H** (1991) Partitioning Control by Water Potential Gradient: Evidence for Compartmentation Breakdown in Grape Berries. *J. Exp. Bot.* **42**: 1117-1122
- Langecake P, Pryce RJ** (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology* **9**: 77-86
- Laquitaine L, Gomes E, Francois J, Marchive C, Pascal S, Hamdi S, Atanassova R, Delrot S, Coutos-Thevenot P** (2006) Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against botrytis cinerea: induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1103-1112
- Le Roy K, Lammens W, Verhaest M, De Coninck B, Rabijns A, Van Laere A, Van den Ende W** (2007) Unraveling the Difference between Invertases and Fructan Exohydrolases: A Single Amino Acid (Asp-239) Substitution Transforms Arabidopsis Cell Wall Invertase1 into a Fructan 1-Exohydrolase. *Plant Physiol.* **145**: 616-625
- Lebon G, Wojnarowicz G, Holzapfel B, Fontaine F, Vaillant-Gaveau N, Clément C** (2008) Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany* **59**: 2565-2578
- Lebrun-Garcia A, Ouaked F, Chiltz A, Pugin A** (1998) Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J* **15**: 773-781

- Leckband G, Lörz H** (1998) Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **96**: 1004-1012
- Lecourieux-Ouaked F, Pugin A, Lebrun-Garcia A** (2000) Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 821-829
- Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugin A** (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* **14**: 2627-2641
- Lecourieux F, Lecourieux D, Vignault C, Delrot S** (2010) A Sugar-Inducible Protein Kinase, VvSK1, Regulates Hexose Transport and Sugar Accumulation in Grapevine Cells. *Plant Physiol.* **152**: 1096-1106
- Legrand M, Kauffmann S, Geoffroy P, Fritig B** (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 6750-6754
- Lemoine R** (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 246-262
- Lemoine R, Bürkle L, Barker L, Sakr S, Kühn C, Regnacq M, Gaillard C, Delrot S, Frommer WB** (1999) Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Letters* **454**: 325-330
- Lemoine R, Kühn C, Thiele N, Delrot S, Frommer W** (1996) Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: effects on amount and activity. *Plant, Cell & Environment* **19**: 1124-1131
- Levadoux L** (1956) Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera* L. *Annales de l'Amélioration des Plantes*: 59-115
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- Levis C, Fortini D, Brygoo Y** (1997) Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Current Genetics* **32**: 157-162
- Link M, Rausch T, Greiner S** (2004) In *Arabidopsis thaliana*, the invertase inhibitors AtC/VIF1 and 2 exhibit distinct target enzyme specificities and expression profiles. *FEBS Letters* **573**: 105-109
- Linsmaier EM, Skoog F** (1965) Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **18**: 100-127
- Liu D, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA** (1994) Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 1888-1892
- Lloyd G, McCown B** (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings - International Plant Propagators' Society*
- Lochman J, Mikes V** (2006) Ergosterol treatment leads to the expression of a specific set of defence-related genes in tobacco. *Plant Molecular Biology* **62**: 43-51
- Lorrain S, Vaillau F, Balagué C, Roby D** (2003) Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends in Plant Science* **8**: 263-271
- Lou Y, Gou J-Y, Xue H-W** (2007) PIP5K9, an *Arabidopsis* Phosphatidylinositol Monophosphate Kinase, Interacts with a Cytosolic Invertase to Negatively Regulate Sugar-Mediated Root Growth. *Plant Cell* **19**: 163-181

- Ludwig AA, Saitoh H, Felix G, Freymark G, Miersch O, Wasternack C, Boller T, Jones JDG, Romeis T** (2005) Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 10736-10741
- Ma F, Peterson CA** (2000) Plasmodesmata in onion (*Allium cepa* L.) roots: a study enabled by improved fixation and embedding techniques. *Protoplasma* **211**: 103-115
- Mackey D, McFall AJ** (2006) MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology* **61**: 1365-1371
- Madhusudhan R, Ramachandra Rao S, Ravishankar GA** (1995) Osmolarity as a measure of growth of plant cells in suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology* **17**: 989-991
- Malnic E** (2004) *Bien connaître et déguster le vin.*, Ed SOLAR, Paris
- Manfredini C, Sicilia F, Ferrari S, Pontiggia D, Salvi G, Caprari C, Lorito M, Lorenzo GD** (2005) Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **67**: 108-115
- Manning K, Davies C, Bowen HC, White PJ** (2001) Functional Characterization of Two Ripening-related Sucrose Transporters from Grape Berries. *Ann Bot* **87**: 125-129
- Marbach I, Harel E, Mayer AM** (1984) Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase. *Phytochemistry* **23**: 2713-2717
- Margara J** (1984) *Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse.*, Ed INRA, Paris
- Marger MD, Saier Jr MH** (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends in Biochemical Sciences* **18**: 13-20
- Marois JJ, Nelson JK, Morrison JC, Lile LS, Bledsoe AM** (1986) The Influence of Berry Contact within Grape Clusters on the Development of *Botrytis cinerea* and Epicuticular Wax. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**: 293-296
- Martin JT, Batt RF, Burchill RT** (1957) Defence Mechanism of Plants Against Fungi: Fungistatic Properties of Apple Leaf Wax. *Nature* **180**: 796-797
- Martinez F, Blancard D, Lecomte P, Levis C, Dubos B, Fermaud M** (2003) Phenotypic Differences Between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 479-488
- Martinez F, Corio-Costet MF, Levis C, Coarer M, Fermaud M** (2008) New PCR primers applied to characterize distribution of *Botrytis cinerea* populations in French vineyards. *Vitis* **47**: 217-226
- Martinez F, Dubos B, Fermaud M** (2005) The Role of Saprotrophy and Virulence in the Population Dynamics of *Botrytis cinerea* in Vineyards. *Phytopathology* **95**: 692-700
- Martinoia E, Massonneau A, Frangne N** (2000) Transport Processes of Solutes across the Vacuolar Membrane of Higher Plants. *Plant Cell Physiol.* **41**: 1175-1186
- Matthews MA, Shackel KA** (2005) Growth and Water Transport in Fleshy Fruit. *In* *Vascular Transport in Plants*. Elsevier Academic Press edn., San Diego
- Mauro MC, Deloire A, Coutos-Thévenot P** (1992) Culture stabilisée d'agrégats cellulaires et procédé de développement d'embryons à partir d'une souche pro-embryogène destinée à la régénération de la Vigne. Brevet Ref: 233627D. 14156 FT: Dépôt: 12-05-1992/Numéro **92**.
- Mayer AM, Staples RC, Gil-ad NL** (2001) Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* **58**: 33-41

- McClellan WD, Hewitt WB** (1973) Early botrytis rot of grapes - time of infection and latency of *Botrytis cinerea* pers in *Vitis-vinifera* l. *Phytopathology* **63**: 1151-1157
- McDonald KA, Jackman AP** (1989) Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures. *Plant Cell Reports* **8**: 455-458
- Meharg AA, Blatt MR** (1995) NO₃⁻ transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: kinetic control by pH and membrane voltage. *J Membr Biol* **145**: 49-66
- Mehdy MC** (1994) Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol.* **105**: 467-472
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N** (2000) AtSUC3, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *The Plant Journal* **24**: 869-882
- Mikes V, Milat M-L, Ponchet M, Ricci P, Blein J-P** (1997) The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Letters* **416**: 190-192
- Miller AJ, Zhou JJ** (2000) *Xenopus* oocytes as an expression system for plant transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**: 343-358
- Miller ME, Chourey PS** (1992) The Maize Invertase-Deficient miniature-1 Seed Mutation Is Associated with Aberrant Pedicel and Endosperm Development. *Plant Cell* **4**: 297-305
- Mohamed N, Lherminier J, Farmer M-J, Fromentin J, Béno N, Houot V, Milat M-L, Blein J-P** (2007) Defense Responses in Grapevine Leaves Against *Botrytis cinerea* Induced by Application of a *Pythium oligandrum* Strain or Its Elicitor, Oligandrin, to Roots. *Phytopathology* **97**: 611-620
- Moiseyev GP, Fedoreyeva LI, Zhuravlev YN, Yasnetskaya E, Jekel PA, Beintema JJ** (1997) Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses: New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins. *FEBS Letters* **407**: 207-210
- Moller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH** (1992) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucl. Acids Res.* **20**: 6115-6116
- Monteiro S, Barakat M, Piçarra-Pereira MA, Teixeira AR, Ferreira RB** (2003) Osmotin and Thaumatin from Grape: A Putative General Defense Mechanism Against Pathogenic Fungi. *Phytopathology* **93**: 1505-1512
- Montesano M, Brader G, Palva ET** (2003) Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology* **4**: 73-79
- Morard P, Fulcheri C, Henry M** (1998) Kinetics of mineral nutrient uptake by *Saponaria officinalis* L. suspension cell cultures in different media. *Plant Cell Reports* **18**: 260-265
- Morel JB, Dangl JL** (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation* **4**: 671-683
- Mullins MG, Bouquet A, Williams LE** (1992) "Biology of grapevine". Ed Cambridge University Press, Cambridge
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497
- Murayama S, Handa H** (2007) Genes for alkaline/neutral invertase in rice: alkaline/neutral invertases are located in plant mitochondria and also in plastids. *Planta* **225**: 1193-1203
- Mysore KS, Ryu C-M** (2004) Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* **9**: 97-104

- Nadwodnik J, Lohaus G** (2008) Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica* and *Apium graveolens*. *Planta* **227**: 1079-1089
- Nagata T, Kumagai F** (1999) Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Methods in Cell Science* **21**: 123-127
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S, Kwang WJ, Martin F** (1992) Tobacco BY-2 Cell Line as the "HeLa" Cell in the Cell Biology of Higher Plants. *In International Review of Cytology*, Vol Volume 132. Academic Press, pp 1-30
- Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T, Kishigami A, Sokabe M, Kojima I, Sato S, Kato T, Tabata S, Iida K, Terashima A, Nakano M, Ikeda M, Yamanaka T, Iida H** (2007) Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 3639-3644
- Nelissen B, De Wachter R, Goffeau A** (1997) Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **21**: 113-134
- Neuhaus HE** (2007) Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Lett* **581**: 2223-2226
- Neuhaus HE, Wagner R** (2000) Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membranes of higher plant plastids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**: 307-323
- Neumann U, Vian B, Weber HC, Sallé G** (1999) Interface between haustoria of parasitic members of the Scrophulariaceae and their hosts: A histochemical and immunocytochemical approach. *Protoplasma* **207**: 84-97
- Nguyen-Quoc B, Foyer CH** (2001) A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *J Exp Bot* **52**: 881-889
- Niderman T, Genetet I, Bruyere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Mosinger E** (1995) Pathogenesis-Related PR-1 Proteins Are Antifungal (Isolation and Characterization of Three 14-Kilodalton Proteins of Tomato and of a Basic PR-1 of Tobacco with Inhibitory Activity against *Phytophthora infestans*). *Plant Physiol.* **108**: 17-27
- Nitsch JP, Nitsch C** (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* **163**: 85-87
- Noiraud N, Delrot S, Lemoine R** (2000) The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiol* **122**: 1447-1455
- Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R** (2001) Identification of a Mannitol Transporter, AgMaT1, in Celery Phloem. *Plant Cell* **13**: 695-705
- Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R** (2001) Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 717-728
- Nonis A, Ruperti B, Pierasco A, Canaguier A, Adam-Blondon A-F, Di Gaspero G, Vizzotto G** (2008) Neutral invertases in grapevine and comparative analysis with *Arabidopsis*, poplar and rice. *Planta* **229**: 129-142
- Nørholm MHH, Nour-Eldin HH, Brodersen P, Mundy J, Halkier BA** (2006) Expression of the *Arabidopsis* high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death. *FEBS Letters* **580**: 2381-2387
- Normanly J, Slovin JP, Cohen JD** (1995) Rethinking Auxin Biosynthesis and Metabolism. *Plant Physiol.* **107**: 323-329
- Nunan K, Davies C, Robinson S, Fincher G** (2001) Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta* **214**: 257-264

- Nunan KJ, Sims IM, Bacic A, Robinson SP, Fincher GB** (1998) Changes in Cell Wall Composition during Ripening of Grape Berries. *Plant Physiol.* **118**: 783-792
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* **198**: 249-266
- Nürnberg T, Scheel D** (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Science* **6**: 372-379
- Nuutila AM, Kauppinen V** (1992) Nutrient uptake and growth of an embryogenic and a non-embryogenic cell line of birch (*Betula pendula* Roth.) in suspension culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **30**: 7-13
- O'Connell RJ, Panstruga R** (2006) Tete a tete inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol* **171**: 699-718
- Odjakova M, Hadjiivanova C** (2001) The Complexity of Pathogen defense in plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* **27**: 101-109
- Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H** (2000) Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* **42**: 479-488
- Ollat N, Diakou-Verdin P, Carde JP, Barrieu F, Gaudillère JP, Moing A** (2002) Grape berry development: a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **36**: 109-131
- Palavan-Unsal N, Arisan D** (2009) Nitric Oxide Signalling In Plants. *The Botanical Review* **75**: 203-229
- Pane C, Rekab D, Firrao G, Ruocco M, Scala E** (2008) A Novel gene coding for an abc transporter in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*) is involved in resistance to H₂O₂. *Journal of Plant Pathology* **90**: 453-462
- Panstruga R** (2003) Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 320-326
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr.** (1998) Major Facilitator Superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1-34
- Papafotiou M, Balotis G, Louka P, Chronopoulos J** (2001) In vitro plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **65**: 163-167
- Park C-J, An J-M, Shin Y-C, Kim K-J, Lee B-J, Paek K-H** (2004) Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta* **219**: 797-806
- Pasqualetto PL, Zimmerman RH, Fordham I** (1988) The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **14**: 31-40
- Patrick JW** (1997) Phloem unloading: Sieve Element Unloading and Post-Sieve Element Transport. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 191-222
- Pego JV, Kortstee AJ, Huijser C, Smeekens SC** (2000) Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* **51 Spec No**: 407-416
- Peña-Cortés H, Barrios P, Dorta F, Polanco V, Sánchez C, Sánchez E, Ramírez I** (2004) Involvement of Jasmonic Acid and Derivatives in Plant Response to Pathogen and Insects and in Fruit Ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**: 246-260
- Perata P, Loschiavo F, Alpi A** (1988) Ethanol-production and toxicity in suspension-cultured carrot cells and embryos. *Planta* **173**: 322-329

- Pérez Marin JL** (2007) Pourriture grise (*Botrytis cinerea* Pers.). In Les parasites de la vigne. Stratégies de protection raisonnée., Dunod edn. Paris
- Peros J, Torregrosa L, Berger G** (1998) Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. *J. Exp. Bot.* **49**: 171-179
- Piagnani C, Nisi PDe, Espen L, Zocchi G** (2003) Adaptive responses to iron-deficiency in callus cultures of two cultivars of *Vitis* spp. *Journal of Plant Physiology* **160**: 865-870
- Piagnani C, Zocchi G** (1997) Physiological responses of grapevine callus cultures to iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition* **20**: 1539 - 1549
- Pigeat JP** (2000) Les paysages de la vigne., Ed SOLAR, Paris
- Poinssot B, Vandelle E, Bentejac M, Adrian M, Levis C, Brygoo Y, Garin J, Sicilia F, Coutos-Thevenot P, Pugin A** (2003) The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 553-564
- Ponchet M, Panabieres F, Milat ML, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y, Blein JP** (1999) Are elicitors cryptogams in plant-Oomycete communications? *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**: 1020-1047
- Pontier D, Balagué C, Roby D** (1998) The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* **321**: 721-734
- Pontier D, Godiard L, Marco Y, Roby D** (1994) hsr203J, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *The Plant Journal* **5**: 507-521
- Portemer V** (2009) Impacts de la contrainte hydrique sur l'architecture du rosier miniature : étude de gènes impliqués et développement de protocoles de transformation génétique en vue de leur validation. Thèse de doctorat. Université de Poitiers
- Poschet G, Hannich B, Büttner M** (2010) Identification and Characterization of AtSTP14, a Novel Galactose Transporter from *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **51**: 1571-1580
- Powell ALT, van Kan J, ten Have A, Visser J, Greve LC, Bennett AB, Labavitch JM** (2000) Transgenic Expression of Pear PGIP in Tomato Limits Fungal Colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 942-950
- Pressey R** (1994) Invertase inhibitor in tomato fruit. *Phytochemistry* **36**: 543-546
- Pryce-Jones E, Carver TIM, Gurr SJ** (1999) The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f.sp.hordei. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 175-182
- Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R, Guern J** (1997) Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *Plant Cell* **9**: 2077-2091
- Puhl I, Stadler F, Treutter D** (2008) Alterations of Flavonoid Biosynthesis in Young Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Leaves, Flowers, and Berries Induced by the Dioxygenase Inhibitor Prohexadione-Ca. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 2498-2504
- Quirino BF, Reiter W-D, Amasino RD** (2001) One of two tandem *Arabidopsis* genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated. *Plant Molecular Biology* **46**: 447-457
- Ramsperger-Gleixner M, Geiger D, Hedrich R, Sauer N** (2004) Differential Expression of Sucrose Transporter and Polyol Transporter Genes during Maturation of Common Plantain Companion Cells. *Plant Physiol.* **134**: 147-160

- Rasmussen JB, Smith JA, Williams S, Burkhart W, Ward E, Somerville SC, Ryals J, Hammerschmidt R** (1995) cDNA cloning and systemic expression of acidic peroxidases associated with systemic acquired resistance to disease in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **46**: 389-400
- Reifenberger E, Boles E, Ciriacy M** (1997) Kinetic Characterization of Individual Hexose Transporters of *Saccharomyces Cerevisiae* and their Relation to the Triggering Mechanisms of Glucose Repression. *European Journal of Biochemistry* **245**: 324-333
- Reinders A, Panshyshyn JA, Ward JM** (2005) Analysis of Transport Activity of Arabidopsis Sugar Alcohol Permease Homolog AtPLT5. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 1594-1602
- Repka V** (2006) Early defence responses induced by two distinct elicitors derived from a *Botrytis cinerea* in grapevine leaves and cell suspensions. *Biologia Plantarum* **50**: 94-106
- Repka V, Fischerová I, Šilhárová K** (2004) Methyl Jasmonate is a Potent Elicitor of Multiple Defense Responses in Grapevine Leaves and Cell-Suspension Cultures. *Biologia Plantarum* **48**: 273-283
- Reuber TL, Plotnikova JM, Dewdney J, Rogers EE, Wood W, Ausubel F** (1998) Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants. *The Plant Journal* **16**: 473-485
- Riesmeier JW, Hirner B, Frommer WB** (1993) Potato Sucrose Transporter Expression in Minor Veins Indicates a Role in Phloem Loading. *Plant Cell* **5**: 1591-1598
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB** (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J* **11**: 4705-4713
- Rigotti S, Gindro K, Richter H, Viret O** (2002) Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria xananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiol Lett* **209**: 169-174
- Robert N, Roche K, Lebeau Y, Breda C, Boulay M, Esnault R, Buffard D** (2002) Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Science* **162**: 389-400
- Roberts AG, Cruz SS, Roberts IM, Prior D, Turgeon R, Oparka KJ** (1997) Phloem Unloading in Sink Leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a Fluorescent Solute with a Fluorescent Virus. *Plant Cell* **9**: 1381-1396
- Robinson SP, Jacobs AK, Dry IB** (1997) A Class IV Chitinase Is Highly Expressed in Grape Berries during Ripening. *Plant Physiol.* **114**: 771-778
- Roblin G, Sakr S, Bonmort J, Delrot S** (1998) Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. *FEBS Lett* **424**: 165-168
- Roitsch T** (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 198-206
- Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK** (2003) Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J Exp Bot* **54**: 513-524
- Roitsch T, Gonzalez MC** (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci* **9**: 606-613
- Roitsch T, Tanner W** (1994) Expression of a sugar-transporter gene family in a photoautotrophic suspension culture of *Chenopodium rubrum* L. *Planta* **193**: 365-371
- Romano A, Barros S, Martins-Loução MA** (2002) Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **68**: 35-41
- Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JDG** (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J* **20**: 5556-5567

- Romeis T, Piedras P, Jones JDG** (2000) Resistance Gene-Dependent Activation of a Calcium-Dependent Protein Kinase in the Plant Defense Response. *Plant Cell* **12**: 803-816
- Roubelakis-Angelakis KA** (2001) *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine.*, Ed Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Roussos PA, Pontikis CA** (2001) Phenolic Compounds in Olive Explants and their Contribution to Browning During the Establishment Stage *in vitro*. *Gartenbauwissenschaft* **66**: 298-303
- Rowe HC, Kliebenstein DJ** (2010) All Mold Is Not Alike: The Importance of Intraspecific Diversity in Necrotrophic Plant Pathogens. *PLoS Pathog* **6**: e1000759
- Ruan Y-L, Patrick JW** (1995) The cellular pathway of postphloem sugar transport in developing tomato fruit. *Planta* **196**: 434-444
- Ruffner HP, Adler S, Rast DM** (1990) Soluble and wall associated forms of invertase in *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* **29**: 2083-2086
- Ruiz E, Ruffner HP** (2002) Immunodetection of *Botrytis*-specific Invertase in Infected Grapes. *Journal of Phytopathology* **150**: 76-85
- Rusterucci C, Stallaert V, Milat ML, Pugin A, Ricci P, Blein JP** (1996) Relationship between Active Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Necrosis, and Phytoalexin Production Induced by Elicitins in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* **111**: 885-891
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD** (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819
- Ryan CA** (1990) Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**: 425-449
- Sagishima K, Kubota K, Ashihara H** (1989) Uptake and Metabolism of Sugars by Suspension Cultured *Catharanthus roseus* Cells. *Ann Bot* **64**: 185-193
- Saier MH, Jr., Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WH, Huang SC, Jack DL, Jahn PS, Lew K, Liu J, Pao SS, Paulsen IT, Tseng TT, Virk PS** (1999) The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**: 257-279
- Salzman RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM, Bressan RA** (1998) Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol* **117**: 465-472
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual.*, Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sauer N** (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett* **581**: 2309-2317
- Sauer N, Caspari T, Klebl F, Tanner W** (1990) Functional expression of the *Chlorella* hexose transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7949-7952
- Sauer N, Friedlander K, Gramlwicke U** (1990) Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis-thaliana*. *Embo Journal* **9**: 3045-3050
- Sauer N, Ludwig A, Knoblauch A, Rothe P, Gahrz M, Klebl F** (2004) AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different *Arabidopsis* ecotypes. *The Plant Journal* **40**: 120-130
- Sauer N, Stadler R** (1993) A sink-specific H⁺/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *The Plant Journal* **4**: 601-610

- Sauer N, Stolz J** (1994) SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *The Plant Journal* **6**: 67-77
- Sauer N, Tanner W** (1989) The hexose carrier from *Chlorella*: cDNA cloning of a eucaryotic H⁺-cotransporter. *FEBS Letters* **259**: 43-46
- Sbaghi M, Jeandet P, Bessis R, Leroux P** (1996) Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines.
- Schneidereit A, Scholz-Starke J, Buttner M** (2003) Functional Characterization and Expression Analyses of the Glucose-Specific AtSTP9 Monosaccharide Transporter in Pollen of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**: 182-190
- Scholes JD, Lee PJ, Horton P, Lewis DH** (1994) Invertase - understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate-metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist* **126**: 213-222
- Schwacke R, Schneider A, van der Graaff E, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flugge U-I, Kunze R** (2003) ARAMEMNON, a Novel Database for *Arabidopsis* Integral Membrane Proteins. *Plant Physiol.* **131**: 16-26
- Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BP, De Bolle MF** (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem* **46**: 941-950
- Servaites JC, Geiger DR** (2002) Kinetic characteristics of chloroplast glucose transport. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1581-1591
- Shakya R, Sturm A** (1998) Characterization of Source- and Sink-Specific Sucrose/H⁺ Symporters from Carrot. *Plant Physiol.* **118**: 1473-1480
- Sheng J, D'Ovidio R, Mehdy M** (1991) Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding. *The Plant Journal* **1**: 345-354
- Sherson SM, Alford HL, Forbes SM, Wallace G, Smith SM** (2003) Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **54**: 525-531
- Sherson SM, Hemmann G, Wallace G, Forbes S, Germain V, Stadler R, Bechtold N, Sauer N, Smith SM** (2000) Monosaccharide/proton symporter AtSTP1 plays a major role in uptake and response of *Arabidopsis* seeds and seedlings to sugars. *Plant J* **24**: 849-857
- Sie RS, Charles G, Sakhanokho HF, Toueix Y, Dje Y, Sangare A, Branchard M** Protocols for callus and somatic embryo initiation for *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): Influence of explant type, sugar, and plant growth regulators. *Australian Journal of Crop Science* **4**: 98-106
- Simon-Plas F, Elmayer T, Blein JP** (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* **31**: 137-147
- Sims IM, Bacic A** (1995) Extracellular polysaccharides from suspension cultures of *Nicotiana glauca*. *Phytochemistry* **38**: 1397-1405
- Singha S, Townsend EC, Oberly GH** (1990) Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **23**: 135-142
- Sivitz AB, Reinders A, Johnson ME, Krentz AD, Grof CPL, Perroux JM, Ward JM** (2007) *Arabidopsis* Sucrose Transporter AtSUC9. High-Affinity Transport Activity, Intragenic Control of Expression, and Early Flowering Mutant Phenotype. *Plant Physiol.* **143**: 188-198
- Slusarkiewicz-Jarzina A, Ponitka A, Kaczmarek Z** (2005) Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biologica Cracoviensia* **47**: 145-151

- Snow D** (1949) The germination of mould spores at controlled humidities. *Annals of Applied Biology* **36**: 1-13
- Sonnewald U, Brauer M, von Schaewen A, Stitt M, Willmitzer L** (1991) Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *The Plant Journal* **1**: 95-106
- Sonnewald U, Hajirezaei M-R, Kossmann J, Heyer A, Trethewey RN, Willmitzer L** (1997) Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nat Biotech* **15**: 794-797
- Souquet J-M, Labarbe B, Le Guerneve C, Cheynier V, Moutounet M** (2000) Phenolic Composition of Grape Stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 1076-1080
- Sovonick SA, Geiger DR, Fellows RJ** (1974) Evidence for Active Phloem Loading in the Minor Veins of Sugar Beet. *Plant Physiol* **54**: 886-891
- Sreenivasulu N, Altschmied L, Radchuk V, Gubatz S, Wobus U, Weschke W** (2004) Transcript profiles and deduced changes of metabolic pathways in maternal and filial tissues of developing barley grains. *The Plant Journal* **37**: 539-553
- Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrtz M, Sauer N** (1995) Phloem Loading by the PmSUC2 Sucrose Carrier from *Plantago major* Occurs into Companion Cells. *Plant Cell* **7**: 1545-1554
- Stadler R, Buttner M, Ache P, Hedrich R, Ivashikina N, Melzer M, Shearson SM, Smith SM, Sauer N** (2003) Diurnal and Light-Regulated Expression of AtSTP1 in Guard Cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**: 528-537
- Staudt G, Borner HG, Becker H** (1972) Studies on callus growth of di- and tetraploid grape *in vitro*. *Vitis* **11**: 1-9
- Stevenson TT, McNeil M, Darvill AG, Albersheim P** (1986) Structure of Plant Cell Walls : XVIII. An Analysis of the Extracellular Polysaccharides of Suspension-Cultured Sycamore Cells. *Plant Physiol.* **80**: 1012-1019
- Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B** (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* **75**: 687-706
- Stitt M, Schaewen A, Willmitzer L** (1991) "Sink" regulation of photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell wall involves a decrease of the Calvin-cycle enzymes and an increase of glycolytic enzymes. *Planta* **183**: 40-50
- Stoop JMH, Williamson JD, Mason Pharr D** (1996) Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science* **1**: 139-144
- Sturm A** (1999) Invertases. Primary Structures, Functions, and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning. *Plant Physiol.* **121**: 1-8
- Sutton PN, Gilbert MJ, Williams LE, Hall JL** (2007) Powdery mildew infection of wheat leaves changes host solute transport and invertase activity. *Physiologia Plantarum* **129**: 787-795
- Sutton PN, Henry MJ, Hall JL** (1999) Glucose, and not sucrose, is transported from wheat to wheat powdery mildew. *Planta* **208**: 426-430
- Sztejnberg A, Blakeman JP** (1973) Studies on Leaching of *Botrytis cinerea* Conidia and Dye Absorption by Bacteria in Relation to Competition for Nutrients on Leaves. *J Gen Microbiol* **78**: 15-22
- Taber RP, Zhang C, Hu WS** (1998) Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **76**: 863-871

- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599
- Tang GQ, Luscher M, Sturm A** (1999) Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell* **11**: 177-189
- Tattersall DB, van Heeswijck R, Hoj PB** (1997) Identification and Characterization of a Fruit-Specific, Thaumatin-Like Protein That Accumulates at Very High Levels in Conjunction with the Onset of Sugar Accumulation and Berry Softening in Grapes. *Plant Physiol.* **114**: 759-769
- Ten Have A, Mulder W, Visser J, van Kan JA** (1998) The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 1009-1016
- Tena G, Asai T, Chiu W-L, Sheen J** (2001) Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 392-400
- Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C** (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4158-4163
- Thevissen K, Ferket KKA, François IEJA, Cammue BPA** (2003) Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides* **24**: 1705-1712
- This P, Lacombe T, Thomas MR** (2006) Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* **22**: 511-519
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 15107-15111
- Thomma BPHJ, Penninckx IAMA, Cammue BPA, Broekaert WF** (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* **13**: 63-68
- Thompson MV, Wolniak SM** (2008) A plasma membrane-anchored fluorescent protein fusion illuminates sieve element plasma membranes in *Arabidopsis* and Tobacco. *Plant Physiol* **146**: 1599-1610
- Thomzik JE, Stenzel K, Stöcker R, Schreier PH, Hain R, Stahl DJ** (1997) Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**: 265-278
- Tornero P, Conejero V, Vera P** (1996) Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 6332-6337
- Toyofuku K, Kasahara M, Yamaguchi J** (2000) Characterization and Expression of Monosaccharide Transporters (OsMSTs) in Rice. *Plant and Cell Physiology* **41**: 940-947
- Trebitsh T, Goldschmidt EE, Riov J** (1993) Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in Citrus fruit peel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 9441-9445
- Trethewey N, AP Ress T** (1994) A mutant of *Arabidopsis thaliana* lacking the ability to transport glucose across the chloroplast envelope. *Biochemical Journal* **301**: 449-454
- Truernit E** (2001) Plant physiology: The importance of sucrose transporters. *Current Biology* **11**: R169-R171

- Truernit E, Schmid J, Epple P, Illig J, Sauer N** (1996) The sink-specific and stress-regulated Arabidopsis STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *Plant Cell* **8**: 2169-2182
- Truernit E, Stadler R, Baier K, Sauer N** (1999) A male gametophyte-specific monosaccharide transporter in Arabidopsis. *The Plant Journal* **17**: 191-201
- Turgeon R** (1989) The Sink-Source Transition in Leaves. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 119-138
- Tymowska-Lalanne Z, Kreis M** (1998) Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family. *Planta* **207**: 259-265
- Ullmann A, Jacob F, Monod J** (1967) Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the [beta]-galactosidase structural gene of Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology* **24**: 339-343
- Urwin PE, Atkinson HJ, Waller DA, McPherson MJ** (1995) Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to Globodera pallida. *The Plant Journal* **8**: 121-131
- Valtaud C, Larignon P, Roblin G, Fleurat-Lessard P** (2009) Developmental and ultrastructural features of phaeoconiella chlamydospora and phaeoacremonium aleophilum in relation to xylem degradation in esca disease of the grapevine. *Journal of Plant Pathology* **91**: 37-51
- Van Baarlen P, Staats M, Van Kan JAL** (2004) Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen Botrytis elliptica. *Molecular Plant Pathology* **5**: 559-574
- Van Baarlen P, Woltering EJ, Staats M, Van Kan JAL** (2007) Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of Arabidopsis with three Botrytis species: an important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology* **8**: 41-54
- Van der Salm TPM, Toorn CJG, Hänisch ten Cate CH, Dubois LAM, Vries DP, Dons HJM** (1994) Importance of the iron chelate formula for micropropagation of Rosa hybrida L. 'Moneyway'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **37**: 73-77
- Van Kan JAL** (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* **11**: 247-253
- Van Loon LC, Van Kammen A** (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from Nicotiana tabacum var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**: 199-211
- Van Loon LC, Van Strien EA** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 85-97
- Vandelle E, Poinssot Bt, Wendehenne D, Bentéjac M, Pugin A** (2006) Integrated Signaling Network Involving Calcium, Nitric Oxide, and Active Oxygen Species but Not Mitogen-Activated Protein Kinases in BcPG1-Elicited Grapevine Defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 429-440
- Vasil IK, Thorpe TA** (1994) *Plant Cell and tissue culture*, Dordrecht, Netherlands
- Vidal M** (2001) Histoire de la vigne et des vins dans le monde. XIX^e-XX^e siècle., Ed Féret, Bordeaux
- Vignault C** (2007) Etude de trois transporteurs de monosaccharides impliqués dans le développement de la baie de raisin (*Vitis vinifera* L.) : identification, caractérisation, localisation et régulation. Thèse de doctorat. Université de Poitiers
- Vignault C, Vachaud M, Cakir B, Glissant D, Dedaldechamp F, Buttner M, Atanassova R, Fleurat-Lessard P, Lemoine R, Delrot S** (2005) VvHT1 encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. *J Exp Bot* **56**: 1409-1418

- Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmioli N, Machray GC, Oparka KJ** (2001) Tuberization in Potato Involves a Switch from Apoplastic to Symplastic Phloem Unloading. *Plant Cell* **13**: 385-398
- Visarada KBRS, Sailaja M, Sarma NP** (2002) Effect of Callus Induction Media on Morphology of Embryogenic Calli in Rice Genotypes. *Biologia Plantarum* **45**: 495-502
- Voegelé RT, Hahn M, Lohaus G, Link T, Heiser I, Mendgen K** (2005) Possible Roles for Mannitol and Mannitol Dehydrogenase in the Biotrophic Plant Pathogen *Uromyces fabae*. *Plant Physiol.* **137**: 190-198
- Voegelé RT, Struck C, Hahn M, Mendgen K** (2001) The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8133-8138
- Voegelé RT, Wirsal S, Moll U, Lechner M, Mendgen K** (2006) Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 625-634
- Von Arnim AG, Deng XW, Stacey MG** (1998) Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* **221**: 35-43
- Vonschaewen A, Stitt M, Schmidt R, Sonnwald U, Willmitzer L** (1990) Expression of a yeast-derived invertase in the cell-wall of tobacco and Arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *Embo Journal* **9**: 3033-3044
- Wada H, Shackel K, Matthews M** (2008) Fruit ripening in *Vitis vinifera*: apoplastic solute accumulation accounts for pre-veraison turgor loss in berries. *Planta* **227**: 1351-1361
- Wang HX, Weerasinghe RR, Perdue TD, Cakmakci NG, Taylor JP, Marzluff WF, Jones AM** (2006) A Golgi-localized Hexose Transporter Is Involved in Heterotrimeric G Protein-mediated Early Development in Arabidopsis. *Mol. Biol. Cell* **17**: 4257-4269
- Wang Y, Xu H, Wei X, Chai C, Xiao Y, Zhang Y, Chen B, Xiao G, Ouwerkerk PB, Wang M, Zhu Z** (2007) Molecular cloning and expression analysis of a monosaccharide transporter gene OsMST4 from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* **65**: 439-451
- Watari J, Kobae Y, Yamaki S, Yamada K, Toyofuku K, Tabuchi T, Shiratake K** (2004) Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves. *Plant Cell Physiol* **45**: 1032-1041
- Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Groner F, Hebbeker U, Flugge U-I** (2000) Identification, Purification, and Molecular Cloning of a Putative Plastidic Glucose Translocator. *Plant Cell* **12**: 787-802
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobus U** (1997) A Role for Sugar Transporters during Seed Development: Molecular Characterization of a Hexose and a Sucrose Carrier in Fava Bean Seeds. *Plant Cell* **9**: 895-908
- Weschke W, Panitz R, Gubatz S, Wang Q, Radchuk R, Weber H, Wobus U** (2003) The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J* **33**: 395-411
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U** (2000) Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant Journal* **21**: 455-467
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N** (2000) Sugar transporters in higher plants--a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci* **5**: 283-290

- Williamson B, Duncan GH, Harrison JG, Harding LA, Elad Y, Zimand G** (1995) Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **99**: 1303-1310
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Kan Jalv** (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* **8**: 561-580
- Wingenter K, Schulz A, Wormit A, Wic S, Trentmann O, Hoermiller II, Heyer AG, Marten I, Hedrich R, Neuhaus E** (2010) Increased Activity of the Vacuolar Monosaccharide Transporter TMT1 Alters Cellular Sugar Partitioning, Sugar Signalling and Seed Yield in Arabidopsis. *Plant Physiol.*: pp.110.162040
- Winter H, Huber SC** (2000) Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: Localization and regulation of Activity of Key Enzymes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **19**: 31 - 67
- Wormit A, Trentmann O, Feifer I, Lohr C, Tjaden J, Meyer S, Schmidt U, Martinoia E, Neuhaus HE** (2006) Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from Arabidopsis involved in vacuolar sugar transport. *Plant Cell* **18**: 3476-3490
- Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ** (2000) A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization- mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**: 3666-3672
- Yang Y, Shah J, Klessig DF** (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Development* **11**: 1621-1639
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK-S, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H** (2002) A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* **296**: 79-92
- Zamski E, Wyse RE** (1985) Stereospecificity of the Glucose Carrier in Sugar Beet Suspension Cells. *Plant Physiol.* **78**: 291-295
- Zhang S, Klessig DF** (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6**: 520-527
- Zhang W-H, Zhou Y, Dibley KE, Tyerman SD, Furbank RT, Patrick JW** (2007) Nutrient loading of developing seeds. *Functional Plant Biology* **34**: 314-331
- Zhang X-Y, Wang X-L, Wang X-F, Xia G-H, Pan Q-H, Fan R-C, Wu F-Q, Yu X-C, Zhang D-P** (2006) A Shift of Phloem Unloading from Symplasmic to Apoplasmic Pathway Is Involved in Developmental Onset of Ripening in Grape Berry. *Plant Physiol.* **142**: 220-232
- Zhang Z, Henderson C, Gurr SJ** (2004) *Blumeria graminis* secretes an extracellular catalase during infection of barley: potential role in suppression of host defence. *Molecular Plant Pathology* **5**: 537-547
- Zhou F, Zhang Z, Gregersen PL, Mikkelsen JD, de Neergaard E, Collinge DB, Thordal-Christensen H** (1998) Molecular Characterization of the Oxalate Oxidase Involved in the Response of Barley to the Powdery Mildew Fungus. *Plant Physiol.* **117**: 33-41

- Zhou JJ, Theodoulou F, Sauer N, Sanders D, Miller AJ** (1997) A Kinetic Model with Ordered Cytoplasmic Dissociation for SUC1, an H⁺/Sucrose Cotransporter Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Journal of Membrane Biology* **159**: 113-125
- Zhu YJ, Agbayani R, Jackson MC, Tang CS, Moore PH** (2004) Expression of the grapevine stilbene synthase gene *VST1* in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora*. *Planta* **220**: 241-250
- Ziauddin A, Kasha KJ** (1990) Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*). II. Effect of auxins on chromosomal status of cultures and regeneration of plants. *Euphytica* **48**: 279-286
- Zimmermann S, Nurnberger T, Frachisse JM, Wirtz W, Guern J, Hedrich R, Scheel D** (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2751-2755.

Annexes

Annexe 1

➤ Production fruitière (fruits frais) mondiale. Sont regroupés sous le terme de « fruits frais » : azerole, papaye, sureau, jujube, litchi, nèfle, grenade, figue de Barbarie, sorbe, corne et tamarin ; « fruits tropicaux frais » : carambole, pomme cannelle, dourian, goyave, mombin, jaque, mangoustan, fruit de la passion, sapote ; « agrumes » : bergamote, cédrat, chinois, kumquat ; « baies » : mûres, ronce-framboise, baie de myrte, airelle, myrtille ; « fruits à noyau » : autres fruits non identifiés séparément. Données de la FAO (Food and Agriculture Organization), 2008.

Cultures	Surface (ha)	Production (tonnes)
Raisins	7408127	67708587
Bananes plantains	5390731	34343343
Pommes	4847610	69603640
Bananes	4817551	90705922
Mangues, mangoustans et goyaves	4690120	34343083
Oranges	4188870	67695802
Fruits Frais	3951274	26273771
Pastèques	3752568	99194223
Prunes et prunelles	2486542	10340902
Fruits tropicaux frais	2361494	16660985
Tangerines, mandarines et clémentines	2154345	28556834
Poires	1731066	20998473
Pêches et nectarines	1608768	18000853
Melons, cantaloups	1346962	28009921
Dattes	1264611	7048089
Agrumes	1094229	7452302
Citrons et limes	1013348	13439211
Ananas	848140	19166560
Plaqueminiers	762517	3627575
Pomme d'acajou	681003	1851015
Abricots	489798	3473710
Figues	462819	1108398
Avocats	423624	3532011
Cerises	388758	1875618
Papayes	386379	9095875
Pamplemousse (incluant les pomélos)	265473	4943602
Fraises	255366	4068454
Grillottes	227095	1153348
Cassis et groseilles	115110	602621
Caroubes	102939	191167
Baies	97807	869834
Framboises	90953	458885
Fruit à noyau	83309	466285
Kiwis	82258	1308424
Myrtilles	74015	331347
Coings	60103	480456
Groseilles à maquereaux	25566	114217
Canneberges	22608	440388
Fruit à pépins	9800	75500

Annexe 2➤ Composition du milieu de culture « McCown Woody Plant »

MICRO ELEMENTS		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25	mg/L
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	6,20	
MnSO ₄ .H ₂ O	22,30	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	
MACRO ELEMENTS		
CaCl ₂	72,50	mg/L
Ca(NO ₃) ₂ . 2H ₂ O	471,26	
KH ₂ PO ₄	170,00	
K ₂ SO ₄	990,00	
MgSO ₄	180,54	
NH ₄ NO ₃	400,00	
VITAMINES		
Glycine	2,00	mg/L
Myo-inositol	100,00	
Acide nicotinique	0,50	
Pyridoxine HCl	0,50	
Thiamine HCl	1,00	
AUTRES ELEMENTS		
Saccharose	30,00	g/L
AGAR (pour version solide uniquement)		
Agar type A	7,5	g/L
pH		
pH avec KOH	5,8	

Annexe 3➤ Composition de la solution nutritive employée pour la culture de vigne en système aéroponique.

Cette solution est adaptée de Gibeaut *et al.*, 1997 et de Dalton *et al.*, 1983.

MACROELEMENTS

KNO ₃	127	mg/L	1,25	mM
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	355		1,50	
MgSO ₄ .7H ₂ O	185		0,75	
KH ₂ PO ₄	69		0,50	

MICROELEMENTS

KCl	3,80	mg/L	50,00	μM
H ₃ BO ₃	3,10		50,00	
MnSO ₄ .H ₂ O	1,70		10,00	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,575		2,00	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,375		1,50	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,093		0,075	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	7,45		20,00	
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,57		20,00	

Annexe 4➤ Composition du milieu de culture « GM0 »

MICRO ELEMENTS		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	6,20	
KI	0,83	
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	
MACRO ELEMENTS		
CaCl ₂	166,00	mg/L
KH ₂ PO ₄	85,00	
KNO ₃	950,00	
MgSO ₄	87,86	
NH ₄ NO ₃	825,00	
VITAMINES		
Biotine	0,05	mg/L
Thiamine	0,50	
Acide nicotinique	5,00	
Pyridoxine HCl	0,50	
Myo-inositol	100,00	
AUTRES ELEMENTS		
Glycérol	4,60	g/L
Maltose	18,00	
Hydrolysate acide de caséine	1,00	
AGAR (pour version solide uniquement)		
Agar type A	7,00	g/L
pH		
pH avec KOH	5,8	

➤ Composition du milieu de culture « GM+ »

Identique à « GM0 » mais additionné d'acide β -naphtoxyacétique (NOA) à 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ final.

Annexe 5➤ Composition du milieu de culture « Gamborg B5 »

MICRO ELEMENTS		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	3,00	
KI	0,75	
MnSO ₄ .H ₂ O	10,00	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,00	
MACRO ELEMENTS		
CaCl ₂	113,23	mg/L
KNO ₃	2500,00	
MgSO ₄	121,56	
NaH ₂ PO ₄	130,44	
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00	
VITAMINES		
Myo-inositol	100,00	mg/L
Acide nicotinique	1,00	
Pyridoxine HCl	1,00	
Thiamine HCl	10,00	
HORMONES		
Acide 1-naphtalène acétique (ANA)	0,12	mg/L
AUTRES ELEMENTS		
Saccharose	20,00	g/L
pH		
pH avec KOH	5,8	

Annexe 6➤ Composition du milieu de culture « Murashige et Skoog CSB »

MICRO ELEMENTS		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	6,20	
KI	0,83	
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	
MACRO ELEMENTS		
CaCl ₂	332,02	mg/L
KH ₂ PO ₄	170,00	
KNO ₃	1900,00	
MgSO ₄	180,54	
NH ₄ NO ₃	1650,00	
VITAMINES		
Myo-inositol	100,00	mg/L
Acide nicotinique	1,00	
Panthothénate de calcium	1,00	
Biotine	0,01	
Pyridoxine HCl	1,00	
Thiamine HCl	1,00	
HORMONES		
Acide 1-naphtalène acétique (ANA)	0,46	mg/L
6-benzylaminopurine (BAP)	0,12	
AUTRES ELEMENTS		
Saccharose	20,00	g/L
Hydrolysate acide de caséine	0,25	
AGAR (pour version solide uniquement)		
Agar type A	9,00	g/L
pH		
pH avec KOH	5,8	

Annexe 7➤ Composition du milieu de culture « Murashige et Skoog BY2 »

MICRO ELEMENTS		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	6,20	
KI	0,83	
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	
MACRO ELEMENTS		
CaCl ₂	332,02	mg/L
KH ₂ PO ₄	370,00	
KNO ₃	1900,00	
MgSO ₄	180,54	
NH ₄ NO ₃	1650,00	
VITAMINES		
Myo-inositol	100,00	mg/L
Thiamine HCl	1,00	
HORMONES		
Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4D)	0,20	mg/L
AUTRES ELEMENTS		
Saccharose	30,00	g/L
pH		
pH avec KOH	5,8	

Annexe 8➤ Composition du milieu de culture « Nitsch et Nitsch »

MICRO ELEMENTS		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	mg/l
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	10,00	
MnSO ₄ .H ₂ O	18,94	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,00	
MACRO ELEMENTS		
CaCl ₂	166,00	mg/l
KH ₂ PO ₄	68,00	
KNO ₃	950,00	
MgSO ₄	90,27	
NH ₄ NO ₃	720,00	
VITAMINES		
Biotine	0,05	mg/l
Acide folique	0,50	
Glycine	2,00	
Myo-inositol	100,00	
Acide nicotinique	5,00	
Pyridoxine HCl	0,50	
Thiamine HCl	0,50	
AUTRES ELEMENTS		
Saccharose	20,00	g/L
Extrait liquide de feuilles de vigne	10,00	% (v/v)
pH		
pH avec NaOH	6,0	

➤ Préparation de l'extrait de feuilles de vigne

Huit grammes de feuilles de vitroplants de vignes cv Chardonnay sont mixés dans 100 mL d'eau ultra-pure à l'aide d'un blender. Le liquide obtenu est ensuite filtré sur papier filtre puis centrifuger 30 minutes à 18000 g, 4°C. L'étape de centrifugation est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de culot au fond du tube. Enfin, le surnageant est filtré sur filtre stérile 0,2 µm (Fisher Bioblock) avant d'être incorporé au milieu de culture autoclavé.

Annexe 9➤ Composition du milieu de culture « Murashige et Skoog NH₄⁺/2 tabac/41B »**MICRO ELEMENTS**

CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	6,20	
KI	0,83	
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	

MACRO ELEMENTS

CaCl ₂	332,02	mg/L
KH ₂ PO ₄	170,00	
KNO ₃	1425,00	
MgSO ₄	180,54	
NH ₄ NO ₃	825,00	

VITAMINES

Glycine	2,00	mg/L
Myo-inositol	100,00	
Acide nicotinique	0,50	
Pyridoxine HCl	0,50	
Thiamine HCl	0,10	

HORMONES

Acide 1-naphtalène acétique (ANA)	0,05	mg/L
6-benzylaminopurine (BAP)	2,00	

AUTRES ELEMENTS

Saccharose	30,00	g/L
------------	-------	-----

AGAR (pour version solide uniquement)

Agar type A	8,00	g/L
-------------	------	-----

pH

pH avec KOH	5,8	
-------------	-----	--

Annexe 10➤ Composition du milieu de culture « Chée et Pool *Vitis medium* »

MICRO ELEMENTS		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	6,20	
MnSO ₄ .H ₂ O	0,85	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	
MACRO ELEMENTS		
Ca(NO ₃) ₂	492,30	mg/L
KH ₂ PO ₄	170,00	
KNO ₃	1900,00	
MgSO ₄	180,54	
NH ₄ NO ₃	1650,49	
VITAMINES		
Myo-inositol	10,00	mg/L
Acide nicotinique	1,00	
Pyridoxine HCl	1,00	
Thiamine HCl	1,00	
AUTRES ELEMENTS		
Saccharose	30,00	g/L
AGAR (pour version solide uniquement)		
Agar type A	8,00	g/L
pH		
pH avec KOH	5,8	

➤ Déclinaisons du milieu par addition d'hormones

Le milieu « Chée et Pool *Vitis medium* » a été additionné d'acide 1-naphtalène acétique (0,46 mg/L) et de 6-benzylaminopurine (0,12 mg/L) ou d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (0,55 mg/L) et de kinétine (1,8 mg/L).

Annexe 11➤ Composition du milieu de culture « Murashige et Skoog *Van der Salm* »

MICRO ELEMENTS		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
FeEDDHA	96,00	
H ₃ BO ₃	6,20	
KI	0,83	
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	
MACRO ELEMENTS		
CaCl ₂	332,02	mg/l
KH ₂ PO ₄	170,00	
KNO ₃	1900,00	
MgSO ₄	180,54	
NH ₄ NO ₃	1650,00	
VITAMINES		
Glycine	2,00	mg/l
myo-inositol	100,00	
Acide nicotinique	0,50	
Pyridoxine HCl	0,50	
Thiamine HCl	0,10	
AUTRES ELEMENTS		
Saccharose	30,00	g/L
AGAR (pour version solide uniquement)		
Agar type A	7,50	g/L
pH		
pH avec KOH	5,8	

➤ Déclinaison du milieu par addition d'hormones

Le milieu « Murashige et Skoog *Van der Salm* » a été additionné d'acide 1-naphtalène acétique (0,46 mg/L) et de 6-benzylaminopurine (0,12 mg/L) ou d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (0,55 mg/L) et de kinétine (1,8 mg/L).

Annexe 12➤ Composition du milieu de culture « Murashige et Skoog NH₄⁺/2 Initiation »

MICRO ELEMENTS		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	6,20	
KI	0,83	
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	
MACRO ELEMENTS		
CaCl ₂	332,02	mg/L
KH ₂ PO ₄	170,00	
KNO ₃	1900,00	
MgSO ₄	180,54	
NH ₄ NO ₃	825,00	
VITAMINES		
Glycine	2,00	mg/L
Myo-inositol	100,00	
Acide nicotinique	0,50	
Pyridoxine HCl	0,50	
Thiamine HCl	0,10	
HORMONES		
Acide 1-naphtalène acétique (ANA)	1,00	mg/L
6-benzylaminopurine (BAP)	1,00	
AUTRES ELEMENTS		
Saccharose	30,00	g/L
AGAR (pour version solide uniquement)		
Agar type A	8,00	g/L
pH		
pH avec KOH	5,8	

Annexe 13➤ Composition du milieu de culture « Murashige et Skoog NH₄⁺/2,4D/Kinéline »

MICRO ELEMENTS		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	6,20	
KI	0,83	
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	
MACRO ELEMENTS		
CaCl ₂	332,02	mg/L
KH ₂ PO ₄	170,00	
KNO ₃	1900,00	
MgSO ₄	180,54	
NH ₄ NO ₃	825,00	
VITAMINES		
Glycine	2,00	mg/L
Myo-inositol	100,00	
Acide nicotinique	0,50	
Pyridoxine HCl	0,50	
Thiamine HCl	0,10	
HORMONES		
Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4D)	0,55	mg/L
Kinéline	1,80	
AUTRES ELEMENTS		
Saccharose	30,00	g/L
AGAR (pour version solide uniquement)		
Agar type A	8,00	g/L
pH		
pH avec KOH	5,8	

Annexe 14➤ Composition du milieu de culture « Murashige et Skoog *Multi-Vignes* »

MICRO ELEMENTS		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
FeNaEDTA	36,70	
H ₃ BO ₃	6,20	
KI	0,83	
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	
MACRO ELEMENTS		
CaCl ₂	166,00	mg/L
KH ₂ PO ₄	85,00	
KNO ₃	950,00	
MgSO ₄	87,86	
NH ₄ NO ₃	825,00	
VITAMINES		
Panthothénate de calcium	1,00	mg/L
Biotine	0,01	
Acide nicotinique	1,00	
Thiamine	1,00	
Pyridoxine	1,00	
AUTRES ELEMENTS		
Saccharose	20,00	g/L
AGAR (pour version solide uniquement)		
Agar type A	8,00	g/L
pH		
pH avec KOH	5,8	