THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Ecologie et biologie des interactions - EBI (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Sciences pour l'environnement - Gay Lussac (La Rochelle)
Secteur de recherche : Biologie des organismes ; Biotechnologies animales, végétales et microbiennes

Présentée par :
Jonathan Parrilla

Rôles physiologiques des protéines ASR à l'égard de la signalisation, du transport et du métabolisme des sucres dans deux modèles cellulaires de vigne

Directeur(s) de Thèse :
Rossitza Atanassova

Soutenue le 27 mars 2015 devant le jury

Jury :

Président	**Dominique Rolin**	Professeur des Universités, Université de Bordeaux
Rapporteur	**Enrico Martinoïa**	Professeur, Université de Zurich
Rapporteur	**Christian Meyer**	Directeur de recherche, INRA de Versailles Grignon
Membre	**Rossitza Atanassova**	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	**Maryse Laloi**	Maître de conférences, Université de Poitiers

Pour citer cette thèse :
Jonathan Parrilla. *Rôles physiologiques des protéines ASR à l'égard de la signalisation, du transport et du métabolisme des sucres dans deux modèles cellulaires de vigne* [En ligne]. Thèse Biologie des organismes ; Biotechnologies animales, végétales et microbiennes. Poitiers : Université de Poitiers, 2015. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR de l'Université de POITIERS

Faculté des Sciences Fondamentales et App
(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 :

Jonathan PARRILLA

****

Rôles physiologiques des protéines ASR à l'égard de la signalisation, du transport et du métabolisme des sucres dans deux modèles cellulaires de Vigne

****

Directrice de Thèse :

Rossitza ATANASSOVA

****

Soutenue le 27 Mars 2015

devant la Commission d'Examen

****

JURY

Enrico MARTINOIA	Professeur Université de Zurich	Rapporteur
Christian MEYER	Directeur de Recherche INRA Versailles Grignon	Rapporteur
Dominique ROLIN	Professeur de l'Université de Bordeaux	Examinateur
Maryse LALOI	Maître de condérences HDR de l'Université de Poitiers	Examinateur
Rossitza ATANASSOVA	Professeur de l'Université de Poitiers	Examinateur

Rôles physiologiques des protéines ASR à l'égard de la signalisation, du transport et du métabolisme des sucres dans deux modèles cellulaires de Vigne

Les sucres, sont des signaux métaboliques, impliqués dans le développement des plantes et leurs réponses aux contraintes du milieu. Les transporteurs de sucres se révèlent à la fois acteurs de la répartition des sucres et cibles de leur signalisation. L'ASR (ABA, Stress and Ripening) de la Vigne, VvMSA, étant identifiée comme protéine régulatrice de l'expression génique du transporteur d'hexoses VvHT1, l'objectif de la thèse est d'appréhender ses rôles physiologiques dans une démarche de Biologie intégrée.

Le premier axe a été dédié à la mise en place des modèles biologiques, des cellules embryogènes et non embryogènes de Vigne, issues du même fond génétique mais cultivées sur deux sources de carbone différentes. La caractérisation des cinétiques de prolifération et l'analyse des métabolomes ont mis en évidence leur sensibilité/tolérance différentielle à la carence en sucres.

Le deuxième axe a porté sur la régulation de *VvHT1* dans les deux types cellulaires sauvages et leurs mutants de surexpression/répression de VvMSA. L'approche pharmacologique utilisant des analogues du glucose, l'analyse de l'expression génique, le transport du glucose et l'activité des enzymes de la glycolyse indiquent que VvMSA affecte l'expression de *VvHT1* par la voie dépendante du métabolisme du glucose.

Le troisième volet a été réalisé par une approche de protéomique quantitative et comparative des protéines nucléaires des cellules embryogènes sauvages et réprimées pour VvMSA. Les protéines à expression significativement affectée par l'absence de l'ASR, laissent entrevoir un nouveau rôle à l'interconnexion des réponses métaboliques aux stress et la régulation épigénétique de l'expression génique.

Physiological functions of ASR proteins in sugar signaling, transport and metabolism of two cell culture models in Grapevine

Sugars are metabolic signals involved in plant development and responses to environmental cues. Sugar transporters are both actors of sugar partitioning and targets of sugar signaling. As Grape ASR (ABA, Stress, Ripening), VvMSA, is identified as a regulatory protein controlling gene expression of the hexose transporter VvHT1, the aim of the PhD thesis is to assess its physiological functions by an Integrative Biology approach.

The first part of the study consisted in the establishment of biological models, embryogenic and non embryogenic grape cells, sharing the same genetic background but growing on distinct carbon sources. The characterization of proliferation kinetics and metabolomes of both cell types revealed differences in their sensitivity/tolerance to sugar starvation.

The second objective was focused on *VvHT1* expression regulation in both cell types and their mutants, overexpressing or silenced for VvMSA. The pharmacological approach using glucose analogues, coupled to the analysis of gene expression, glucose transport and glycolytic enzymes activity, suggests that VvMSA affects *VvHT1* expression through a glucose metabolism dependent pathway.

Finally, we carried out quantitative and comparative proteomic analysis of nuclear proteins in embryogenic wild type and VvMSA-silenced cells. Proteins whose expression is affected by ASR repression suggest a new functional role of VvMSA at the interplay between metabolic responses to stress and epigenetic regulation of gene expression.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier la région Poitou-Charentes pour avoir financé mes travaux de thèse.

J'adresse mes remerciements à Enrico Martinoia et Christian Meyer de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs et un grand merci à Dominique Rolin et Maryse Laloi pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je souhaite également remercier Philippe Gallusci, Martine Thomas, Sylvie Coursol et Emeline Teyssier pour avoir participé à mon comité de thèse et pour leurs conseils judicieux concernant la poursuite de ma thèse.

Mes remerciements vont à Rossitza Atanassova et Didier Bouchon pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe SEVE et du laboratoire EBI.

Merci tout particulièrement à toi Rossi, pour m'avoir accordé ta confiance depuis le premier jour pour mener à bien ces travaux de recherches. Et merci de m'avoir guidé vers la voie de mon futur métier, que de chemin parcouru depuis mon arrivée au laboratoire il y a trois ans !

Un grand merci à Cécile Gaillard et Jérémy Verbeke pour leur aide précieuse au cours des manips. Cécile pour m'avoir mis le pied à l'étrier et pour ta présence bienveillante en particulier au cours de ce début de thèse. Jérémy, merci beaucoup pour ton implication aussi bien technique qu'intellectuelle à ce travail, ce fut un plaisir de travailler avec toi. Merci enfin d'avoir gardé pour toi les intrigues futures de Game of Thrones et de ne pas m'avoir « spoilé » même si la tentation a dû être forte parfois !

Je tiens à remercier tout particulièrement Dominique Rolin et Mickaël Maucourt en ce qui concerne l'analyse métabolomique. Dominique, merci d'avoir rendu possible la réalisation de ces manips en m'accueillant personnellement sur la plate-forme. Merci à toi Mickael pour ton affabilité et ta grande disponibilité. Je garde un très bon souvenir de mon passage chez vous et j'espère que l'on aura l'occasion de collaborer à nouveau.

Mes remerciements vont également à Yves Gibon, pour m'avoir accueilli sans une hésitation sur sa plate-forme et sans qui toute l'analyse des activités enzymatiques n'auraient pas été possibles. Merci enfin pour ton regard critique et ton enthousiasme vis-à-vis de mes résultats. Je tiens par ailleurs à remercier l'ensemble du personnel de la plate-forme pour leur aide précieuse, Duyên en particulier ! Merci pour ton implication et ta sympathie. Camille également, avec qui j'ai eu le plaisir de participer à mon premier congrès international à l'étranger et de partager ma première bière au Temple bar.

Merci à Benoît Porcheron et Pierre Coutos-Thévenot pour votre aide concernant l'utilisation de l'HPLC et merci à tous les deux pour votre bonne humeur indéfectible !

Je tiens également à remercier chaleureusement Fabienne Dédaldéchamp, Mireille Faucher, Laurence Maurousset et Nathalie Pourtau pour m'avoir initié à l'enseignement et pour votre sollicitude au cours de cette période assez chargée.

Je remercie tous mes collègues thésards présents et passés du laboratoire (Cyril, Dany, Pauline, Mickaël, Florian, Chloë et Lucie). Dany merci pour ta bonne humeur contagieuse. Mickaël pour ton grain de folie, en revanche je ne te remercie pas pour toutes ces chansons que tu as réussi à me coller dans la tête ! Florian merci pour ta bonne humeur légendaire et pour l'intérêt que tu as porté à mon travail. Lucie, un énorme merci pour ton soutien au cours de cette fin de rédaction !

Bon courage à tous pour la suite de la thèse !

Je remercie enfin l'ensemble de mes collègues du laboratoire pour leur gentillesse et leur soutien au cours de mes trois années de thèse.

Merci à Guillaume Cornut et Radoslav Alexandrov pour leur participation précieuse à mes travaux de thèse. Rado en particulier, je te souhaite bon vent pour la poursuite de ta thèse. Sache que l'on n'a pas retrouvé d'attaquant de pointe aussi performant que toi pour notre équipe de foot en salle !

Enfin un énorme merci à ma famille et à mes amis pour leur soutien au cours de ces trois ans !

Je dédie l'ensemble de ces travaux à ma mère.

Liste des abréviations

2DOG	2-déoxyglucose
3OMG	3-O méthyl-glucose
ABA	Abscissic Acid
ACP	Analyse en Composante Principale
ADN	Acide désoxyribonucleique
ADN-T	ADN de transfert
ADNc	ADN codant
ADNg	ADN génomique
ADP	Adenosine DiPhosphate
AGPase	AGPase ADP Glucose Pyrophosphorylase
AIA	Acide indole 3 acétique
AMP	Adenosine MonoPhosphate
AMPK	5'AMP activated Protein Kinase
AMY	Amylase
ANA	Acide Naphtalène Acétique
APT	Adénine Phospho transferase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ASI	Anthesis Silking Interval
ASN	Asparagine Synthétase
ASR	ABA Stress Ripening
ATP	Adenosine tri Phosphate
BAP	Benzylaminopurine
BLASTp	Basic Local Alignment Search Tool protein
CAB	Chlorophyll A/b-Binding protein
CBL	Calcineurin B like
CCCP	Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl
CDK	Cyclin Dependent
ChIP	Immuno précipitation de la chromatine
CHS	Chalcone Synthase
CIPK	CBL Interacting Protein Kinase
CTR	Constitutive Triple Response
CwINV	Invertase pariétale 1
CYC	Cyclin
DHAP	DiHydroxyAcetonePhosphate
DMF	DIMéthylFormamide
DO	Densité Optique
EC	Enolase
EIN3 3	Ethylen Insensitive 3
ERD6-ERETIC	Early Response to Dehydration 6-like Electronic REferens To access In vivo Concentration
F2KP	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase
FBPAld	Fructose-1,6-BisPhosphate Aldolase
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
FruK	FructoKinase
G3P	Glyceraldehyde 3-phosphate

G6P	Glucose 6 Phosphate
GDH	Glycerol 3-phosphate DH
GluK	GlucoKinase
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
HIPP	heavy metal-associated isoprenylated plant proteins
HMA	Heavy Metal Associated
HMG	high mobility group
HMGR	Hydroxymethyl-3-MethylGlutaryl-CoA
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPP	heavy metal-associated plant proteins
HT	Hexose Transporter
HUP	Hexokinase Unconventional partner
HXK	Hexokinase
HYS INT	Hyper Senescence
iTRAQ	Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification
LST	Lethal with Sec Thirteen
LTR	Long terminal repeat
MFS	Major Facilitator Superfamily
miRNA	micro RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NR1	Nitrate Reductase 1
NUC	Nucleoline
PAL	Phénylalanine ammonia-lyase
PAL1	Phenylamonialyase 1
PAP1	Production of Anthocyanin Pigment 1
PC	Plastocyanine
PEP	Phosphoenolpyruvate
PEPC	PEP Carboxylase
PES	Phenazine Ethosiulfate
PFK	PhosphoFructoKinase
PGI	Phosphoglucose Isomerase
PGK	Phosphoglycérokinase
pGlcT	Plastidic Glucose Transporter
PGM	Phosphoglucomutase
PIF	Phytochrome Interactig Factor
PK	Pyruvate kinase
PKA	Protéine Kinase A
PLD	Phospholipase D
PMT	Polyol/Monosaccharides Transporter
PP2C	Protéine Phosphatase 2 C
PQL	Protein Quantity Loci
PR	Pathogenesis Related
QTL	Quantitative Trait Loci
R5P	Ribose 5 Phosphate
RAPTOR	Regulatory-Associated Protein of TOR
RBCS Small	Ribulose-Bisphosphate Carboxylase
RBR	Retinoblastoma Related Protein
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire

RNP	Ribonucléoprotéine
RPS6	Protéine ribosomique S6
Ru5P	Ribulose 5 Phosphate
SDR1	Short Chain Dehydrogenase 1
Snf	Sucrose non fermenting
SnRK1	Snf1 Related protein Kinase 1
SPS	Sucrose Phosphate Synthase
STP	Sugar Transport Protein
SUF	Sucrose Facilitator
SuSy	Sucrose Synthase
SUT (SUC)	Sucrose Transporter
SWEET	Sugar Will Eventually be Exported Transporters
T6P	Trehalose 6 Phosphate
TEAB	Triethylammonium bicarbonate
TMT	Tonoplast Monosaccharides Transporter
TOR	Target Of Rapamycin
TORC	TOR Complex
TPH	Trehalose Phosphate Hydrolase
TPI	Triose Phosphate Isomerase
TPP	T6P Phosphatase
TPS	T6P Synthase
UDP	Uridine DiPhosphate
UGPase	UDP Glucose Pyrophosphorylase
VGT	Vacuolar Glucose Transporter

Table des matières

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **1**
1.1 LA SIGNALISATION GLUCIDIQUE 2
1.1.1 Signalisation par le glucose *3*
1.1.1.1 Voie de signalisation du glucose dépendante de l'hexokinase 4
1.1.1.2 Voie de signalisation du glucose indépendante de l'hexokinase 5
1.1.1.3 Voie de signalisation du glucose dépendante du métabolisme du glucose 5
1.1.2 Interaction entre les signalisations hormonales et du glucose *6*
1.1.2.1 Interactions entre les signalisations du glucose, de l'ABA et de l'éthylène 6
1.1.2.2 Interaction avec la signalisation auxinique 9
1.1.2.3 Interaction avec la signalisation des cytokinines 10
1.1.3 La signalisation par le saccharose *11*
1.1.3.1 Implication dans la régulation du métabolisme de la plante 12
1.1.3.2 Implication dans la croissance et le développement de la plante 13
1.1.4 La signalisation par le tréhalose *15*
1.1.5 La voie de signalisation dépendante de la SnRK1 ..... *18*
1.1.6 La voie de signalisation dépendante de la TOR kinase *20*
1.2 LES TRANSPORTEURS DE SUCRES CHEZ LES VEGETAUX SUPERIEURS 22
1.2.1 La Major Facilitator Superfamily *23*
1.2.1.1 Les transporteurs de disaccharides (SUT/SUC) 24
1.2.1.2 Les transporteurs de monosaccharides 25
1.2.1.2.1 La sous famille des STP/HT (Sugar Transport Protein/Hexose Transporter) 25
1.2.1.2.2 Les transporteurs vacuolaires (TMT, ERD6-like, VGT) 28
1.2.1.2.3 Les sous familles des PMT (Polyol/Monosaccharide Transporter) et des INT (Inositol transporter) 29
1.2.2 La famille des SWEET *30*
1.2.3 Régulation des transporteurs de sucres *31*
1.2.3.1 Régulation des transporteurs de sucres au cours du développement 31
1.2.3.2 Régulation en réponse aux stress biotiques et abiotiques 32
1.2.3.3 Différents niveaux de régulation des transporteurs de sucres 32
1.2.3.4 Régulation des transporteurs de sucres par les sucres 33
1.3 LES PROTÉINES ASR (ABA STRESS RIPENING) 34
1.3.1 Identification des ASR *34*
1.3.2 Propriétés des ASR *35*
1.3.3 Localisation des ASR *35*
1.3.3.1 Localisation subcellulaire 35
1.3.3.2 Localisation 'in planta' 36
1.3.4 Implication des ASR dans les réponses aux stress *36*
1.3.5 Implication des ASR dans le développement *38*
1.3.6 Fonctions biologiques des protéines ASR *38*
1.3.6.1 Rôle de protection directe des macromolécules de la cellule 38
1.3.6.2 Rôle dans la régulation de l'expression des gènes 39
1.3.6.3 Implication dans la régulation du métabolisme glucidique et la redistribution des réserves carbonées 40
1.4 OBJECTIFS DE LA THESE 40

MATERIEL ET METHODES **44**
1.1 MATERIEL VEGETAL 45
1.1.1 Cellules embryogènes de Vigne du porte-greffe 41B *45*
1.1.2 Vitroplants de Vigne 41B *45*
1.1.3 Initiation des suspensions cellulaires non embryogènes de Vigne 41B *45*

1.2 METHODES DE CULTURE 46
1.2.1 Culture des cellules embryogènes de vigne 41B 46
1.2.2 Culture des vitroplants de Vigne 41B 46
1.2.3 Culture des cellules non embryogènes de Vigne 41B 46
1.3 SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES 46
1.3.1 Agrobactérium tumefaciens souche EHA105 46
1.3.2 Transformation stable des cellules embryogènes 41B 47
1.3.3 Contrôle de la transformation des cellules par le test histochimique GUS 48
1.4 APPROCHE PHARMACOLOGIQUE 48
1.4.1 Inititation de la carence en sucres et en nitrates 48
1.4.2 Traitement par le glucose et ses analogues 49
1.4.3 Récolte des cellules 49
*1.4.4 Traitement par le glucose et ses analogues ..... **Erreur ! Signet non défini.***
1.4.5 Analyse de la viabilité des cellules 49
1.4.6 Récolte des cellules 50
1.5 MESURES D'ABSORPTION DU GLUCOSE RADIOMARQUE 50
1.5.1 Extraction et dosage des protéines totales 51
1.5.1.1 Extraction des protéines totales 51
1.5.1.2 Dosage des protéines par la méthode de Bearden 51
1.6 EVALUATION DE LA PROLIFERATION DES CELLULES NON EMBRYOGENES 52
1.7 IDENTIFICATION ET DOSAGE DES SUCRES SOLUBLES DANS LES MILIEUX DE CULTURES PAR HPLC 52
1.8 ANALYSE DU METABOLOME DES CELLULES 41B EMBRYOGENES ET NON EMBRYOGENES 53
1.8.1 Culture des cellules prélevées à J2, J4, J6, J8, J10, J12, J14 53
1.8.2 Traitement des cellules pour la condition « J8 + 24h carence » 53
1.8.3 Prélèvement des cellules et des milieux de culture 54
1.8.4 Lyophilisation des cellules et du milieu de culture 54
1.8.5 Extraction des éléments soluble des cellules 54
1.8.6 Traitement des extraits issus des cellules 55
1.8.7 Tamponnage des extraits et acquisition des spectres RMN 55
1.8.8 Dosage de l'amidon 56
1.8.8.1 Hydrolyse de l'amidon 57
1.8.8.2 Dosage du glucose issu de l'hydrolyse de l'amidon 57
1.9 MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES MAXIMALES 57
1.9.1 Extraction des enzymes solubles 57
1.9.2 Mesure des activités enzymatiques 58
1.9.2.1 Enzymes du groupe A 58
1.9.2.1.1 Phosphoglucose isomerase 59
1.9.2.1.2 Enolase 59
1.9.2.1.3 Triose Phosphate isomerase 59
1.9.2.1.4 Phosphoglucomutase 60
1.9.2.2 Enzymes du groupe B, C, D 60
1.9.2.2.1 Glycérokinase (GK) 60
1.9.2.2.2 Pyruvate Kinase (PK) 61
1.9.2.2.3 PhosphoGlyceroKinase (PGK) 61
1.9.2.2.4 Glycerol-3-Phosphate DésHydrogenase (G3PDH) 62
1.9.2.2.5 Fructose-1,6-BisPhosphate Aldolase (FBPAld) 63
1.9.2.2.6 Glucokinase (GluK) et Fructokinase (FruK) 63
1.9.2.2.7 PEP Carboxylase (PEPc) 64
1.9.3 Mises aux points 64
1.9.4 Caractérisation des activités enzymatiques des différents échantillons 65
1.10 METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE 66

1.10.1 Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR *66*
1.10.2 Extraction des ARN totaux des vitro-plants et des cellules de Vigne 41B embryogènes et non embryogènes *66*
1.10.3 Dosage des acides nucléiques *66*
1.10.4 Contrôle de l'intégrité des ARN sur gel d'agarose *67*
1.10.5 Production des ADNc par rétrotranscription des ARNm *67*
1.10.5.1 Traitement des échantillons à la DNAse I 67
1.10.5.2 Contrôle de la qualité des ADNc 68
1.10.6 Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR *69*
1.10.6.1 Conception des amorces spécifiques des ADNc cibles 69
1.10.6.2 Amplification des ADNc 69
1.10.6.3 Détermination de l'expression normalisée et de l'induction/répression 70
1.10.6.4 Détermination de l'efficacité des amorces 70
1.11 ANALYSE COMPARATIVE DU PREOTEOME NUCLEAIRE DES CELLULES EMBRYOGENES ET NON EMBRYOGENES 70
1.11.1 Isolement des noyaux des cellules embryogènes 41B WT et 35S::VvMSA-RNAi *71*
1.11.2 Extraction différentielle des protéines nucléaires *71*
1.11.3 Principe de la quantification des protéines par le marquage iTRAQ 8-plex *72*
1.11.4 Annotation fonctionnelle des protéines identifiées *73*
1.12 ANALYSE STATISTIQUES 73
RESULTATS-DISCUSSIONS 74
1.1 CHAPITRE I : CARACTERISATION DES MODELES CELLULAIRES 75
1.1.1 Intérêts et limites de la culture cellulaire *75*
I.2 Modèles biologiques *75*
1.1.2 Mise en place de cultures de cellules non-embryogènes *76*
1.1.3 Caractérisation des cellules embryogènes et non embryogènes 41B de Vigne *77*
1.1.3.1 Evolution des biomasses fraîches et sèches au cours de la cinétique de croissance 78
1.1.3.2 Evolution de l'expression des gènes de cyclines 78
1.1.3.3 Evolution des sucres solubles 80
1.1.3.4 Analyse comparative du métabolome des cellules embryogènes et non embryogènes 81
1.1.3.4.1 Intérêt de l'analyse en RMN du proton pour l'étude envisagée 81
1.1.3.4.2 Identification et quantification des métabolites cellulaires 82
1.1.3.4.2.1 Intérêt de l'Analyse en Composante Principale pour l'analyse des données de métabolomique 82
1.1.3.4.2.2 Comparaison des métabolites intracellulaires des cellules embryogènes et non embryogènes de Vigne au cours de la cinétique de croissance 83
1.1.3.4.2.3 Comparaison des métabolites dans les milieux de culture des cellules embryogènes et non embryogènes de Vigne au cours de la cinétique de croissance 84
1.1.3.5 Analyse de l'activité maximale des enzymes de la glycolyse. 86
1.1.3.5.1 Comparaison des activités maximales des enzymes de la glycolyse des cellules embryogènes et non embryogènes de Vigne 87
1.2 CHAPITRE 2 : APPROCHE DE TYPE PHARMACOLOGIQUE 91
1.2.1 Expression de VvMSA chez les vitroplants, les cellules embryogènes et non embryogènes 41B 91
1.2.2 Evolution de l'expression de VvHT1 ..... *91*
1.2.3 Analyse de l'expression géniquedes transporteurs de sucres des sous familles VvHT et VvTMT 92
1.2.4 Mise en place des conditions expérimentales *94*
1.2.4.1 Mises en place des conditions expérimentales chez les cellules embryogènes 94
1.2.4.2 Mises en place des conditions expérimentales chez les cellules non embryogènes 95
1.2.4.3 Détermination de l'effet de l'étape de carence sur le métabolisme des cellules 96
1.2.4.4 Approche de type pharmacologique basée sur l'utilisation d'effecteurs glucidiques 98

1.2.4.4.1 Choix des effecteurs ... 98
1.2.4.4.1.1 Voie indépendante de HXK1 ... 98
1.2.4.4.1.2 Voies dépendantes de HXK1 et indépendantes de la glycolyse ... 99
1.2.4.4.1.3 Voie dépendante de HXK1 ... 100
1.2.4.5 Effet du mannoheptulose sur la régulation de l'expression de VvHT1 ... 101
1.2.4.6 Etude de l'expression de gènes marqueurs des voies de la signalisation du glucose ... 102
1.2.4.6.1 Voie indépendante de l'hexokinase 1 : CHS et PAL1 ... 103
1.2.4.6.2 Voie dépendante de l'hexokinase 1 : NR1 ... 105
1.2.4.6.3 Voie dépendante de la glycolyse : VvPR5 ... 106
1.2.4.6.4 Conclusions concernant l'effet des analogues sur la signalisation glucidique ... 110
1.3 CHAPITRE 3 : POSITIONNEMENT DE LA REGULATION DE *VvHT1* PAR VVMSA DANS LES VOIES DE LA SIGNALISATION DU GLUCOSE ... 112
1.3.1 Analyse de l'effet des effecteurs glucidiques sur l'expression de VvHT1 et VvHT5 ... 112
1.3.2 Etude de l'activité d'absorption du glucose ... 117
1.3.2.1 Mise au point de l'expérimentation ... 118
1.3.2.1.1 Optimisation du protocole ... 118
1.3.2.1.2 Conditions d'analyse de l'activité d'absorption du glucose ... 118
1.3.2.2 Absorption du glucose par les cellules embryogènes ... 119
1.3.2.3 Absorption du glucose par les cellules non embryogènes ... 121
1.3.3 Analyse des activités des enzymes de la glycolyse en conditions des traitements après la carence ... 122
1.3.3.1 Influences de la répression de VvMSA, des traitements et du temps d'incubation sur les activités enzymatiques ... 123
1.3.3.1.1 Cellules embryogènes ... 123
1.3.3.1.2 Cellules non embryogènes ... 125
1.4 CHAPITRE 4 : ANALYSE DU PROTEOME NUCLEAIRE DES CELLULES EMBRYOGENES SAUVAGES ET REPRIMEES POUR VVMSA ... 128
1.4.1 Conception et mise en œuvre de l'analyse protéomique ... 128
1.4.2 Comparaison des protéomes nucléaires des cellules sauvages et réprimées pour VvMSA 130
1.4.3 Classification des protéines à expression différentielle en catégories fonctionnelles ... 132
1.4.3.1 Recherche de corrélation entre l'expression génique et protéique ... 142

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ... 144

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... 153

ANNEXES ... 175
1.1 ANNEXE 1 : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE GM+ (CELLULES EMBRYOGENES) ... 176
1.2 ANNEXE 2 : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE M14 ... 177
1.3 ANNEXE 3: COMPOSITION DU MILIEU GAMBORG ANA/BAP ... 178
1.4 ANNEXE 4: COMPOSITION DU MILIEU MC COWN ANA ... 179
1.5 ANNEXE 5 : COMPOSITION DU MILIEU YEB (YEAST EXTRACT BROTH) ... 180
1.6 ANNEXE 6 : MILIEU GM° MINIMUM ... 181
1.7 ANNEXE 7 : COMPOSITION DU MILIEU GAMBORG ANA/BAP MINIMUM ... 182
1.8 ANNEXE 8 : COMPOSITION DU TAMPON GEB ... 183
1.9 ANNEXE 9 : COMPOSITION DU TAMPON TE UTILISE POUR TOUS LES TAMPONS DE L'EXTRACTION DES NOYAUX ... 184
1.10 ANNEXE 10 : COMPOSITION DES TAMPONS POUR L'ISOLEMENT DES NOYAUX ... 185
1.11 ANNEXE 11 : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE GAMBORG ANA/BAP –SUCRES ... 186
1.12 ANNEXE 12 : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE GAMBORG ANA/BAP MINIMUM ... 187

Etude bibliographique

1.1 La signalisation glucidique

La photosynthèse est le processus permettant la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique chez les plantes. En tant que photoassimilats, les sucres sont des substrats privilégiés du métabolisme énergétique. Ils sont également des molécules de base nécessaires à la synthèse d'un grand nombre de métabolites primaires et secondaires. Les sucres solubles forment des polymères glucidiques de réserve et aussi des constituants de la paroi cellulaire. Ils sont indispensables à l'homéostasie osmotique de la cellule végétale et par conséquent à sa croissance. Depuis une quinzaine d'années les sucres sont également considérés comme des signaux. La signalisation glucidique intervient dans la régulation de plusieurs processus au niveau cellulaire tels que la division et la différentiation, et au niveau de l'organisme végétal entier à l'image des différentes étapes du développement et des réponses aux contraintes biotiques et abiotiques.

Les organes photosynthètiques considérés comme des organes-sources sont les seuls à produire les photoassimilats, véhiculés sous forme de saccharose *via* le phloème jusqu'aux organes non chlorophylliens qualifiés d'organes-puits. Pour la plante, la capacité à gérer la production de sucres par les organes photosynthétiques et leur distribution dans l'ensemble de l'organisme apparaît primordiale. La synthèse de sucres, leur transport, leur mise en réserve et leur mobilisation sont des processus dynamiques, fortement dépendants du stade de développement de la plante et des conditions environnementales. La capacité de la plante à percevoir et à répondre aux variations de la disponibilité en sucres au niveau de ses différents organes, tissus et cellules s'avère cruciale pour sa survie.

Les sucres sont des signaux métaboliques, dont la perception et la transduction, «sugar sensing and signaling» permettent d'évaluer les ressources carbonées et l'état énergétique de la cellule et d'intégrer ces signaux aux autres signaux développementaux et environnementaux (Morkunas et al. 2012). La signalisation glucidique en interagissant avec la signalisation hormonale intervient dans l'intégration des signaux environnementaux et développementaux afin d'assurer la régulation de la croissance et du développement de la plante (Rolland et al. 2006; Eveland and Jackson 2011; Lastdrager et al. 2014). A la différence des phytohormones, des sucres comme le saccharose, le glucose ou le fructose sont aussi à la base de différentes voies métaboliques. De ce fait, il apparaît difficile de distinguer la fonction de signalisation des sucres de leur rôle de substrats/intermédiaires du métabolisme de la plante. Cependant des sucres, tels que le glucose, le saccharose, le tréhalose/tréhalose-6-P sont déjà bien établis en

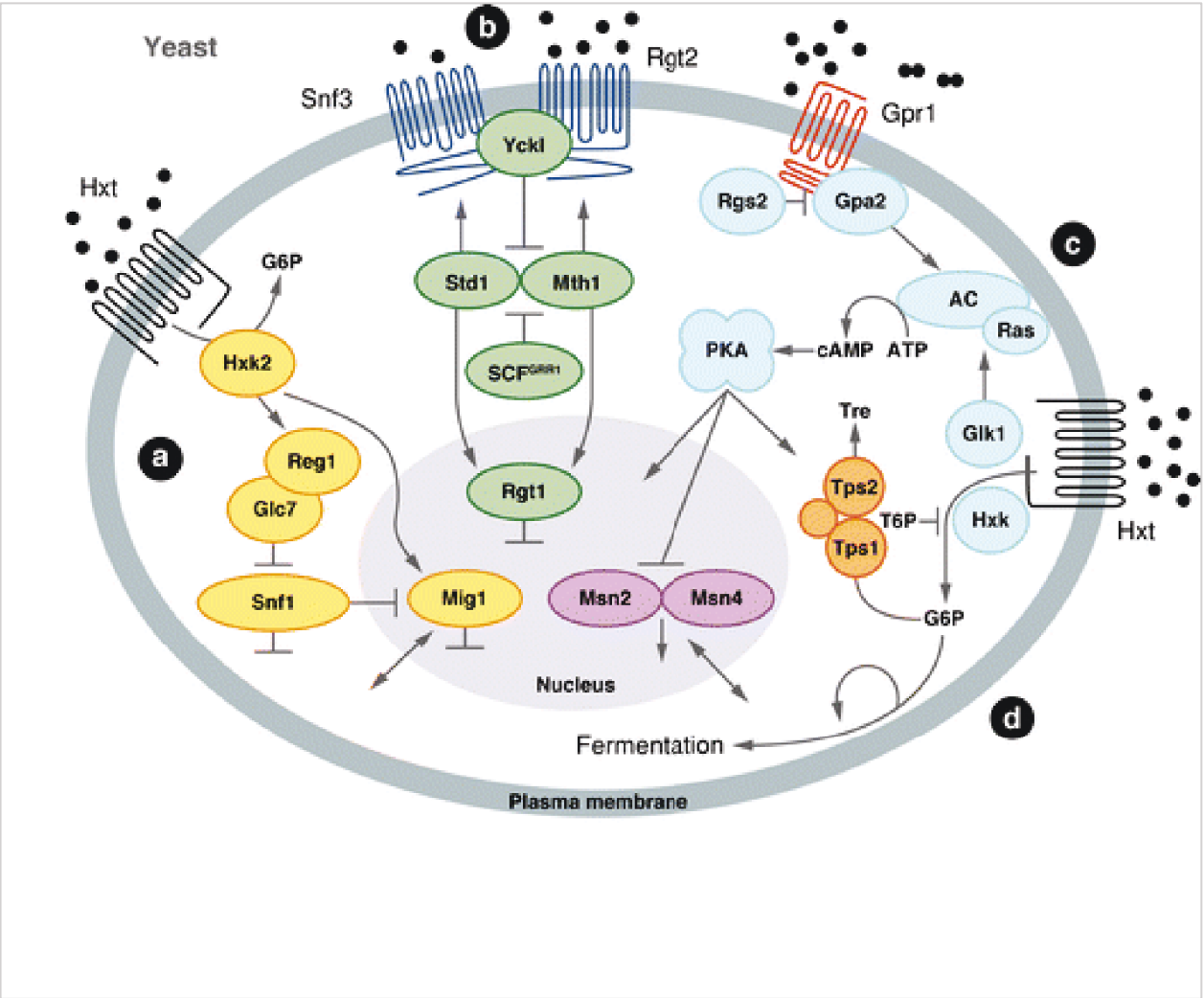


Figure 1 : Voies impliquées dans la perception et la signalisation du glucose chez la levure. (a) La principale voie de répression du glucose. L'hexokinase 2 (Hxk2) agit comme un senseur et migre vers le noyau en réponse au glucose. « Sucrose nonfermenting 1 » (Snf1) est nécessaire pour lever la répression de l'expression des gènes en condition de carence en glucose. (b) La voie d'induction dépendante d'HXT. Deux homologues de transporteurs de glucose, Snf3 et Rgt2, jouent le rôle de senseur du glucose au niveau de la membrane plasmique, où ils activent la caséine kinase 1 (Yck1). (c) La voie de la protéine kinase A (PKA) dépendante de l'AMP cyclique (AMPc) nécessite la perception du glucose extracellulaire et intracellulaire pour être activée, le glucose (et le saccharose) extracellulaire est perçu par le récepteur couplé à la protéine G (GPCR) et les hexoses intracellulaires suite à leur phosphorylation. (d) L'activité glycolytique et l'expression des gènes sont contrôlés par des intermédiaires métaboliques, incluant le tréhalose-6-P (T6P), qui inhibe l'activité d'HXK2. Une forte et faible concentration en glucose (points noirs) et en saccharose (doubles points noirs) sont indiqués. (Rolland et al. 2006)

tant que signaux chez les plantes (Rolland et al. 2006; Ramon et al. 2008; Paul 2008; Tognetti et al. 2013).

1.1.1 Signalisation par le glucose

Le glucose est le signal glucidique le plus étudié chez les plantes. Il s'agit du sucre préférentiellement métabolisé par la majorité des organismes et les mécanismes de perception de sa teneur sont très conservés au sein du monde du vivant. Chez la levure *S. cerevisiae,* trois voies de signalisation par le glucose et leurs senseurs respectifs ont été identifiées (Rolland et al. 2006). La voie de répression par le glucose requiert l'hexokinase II (HXK2). Le senseur cytoplasmique HXK2 permet de détecter le glucose intracellulaire, une fois qu'il est transporté dans le cytoplasme. La voie d'induction par le glucose implique les senseurs membranaires Snf3 et Rgt2, deux transporteurs d'hexoses ayant perdu le rôle de transport en faveur de la fonction de senseurs, respectivement de haute et faible affinité à l'égard du glucose extracellulaire. La dernière voie de régulation par les sucres chez la levure fait intervenir une protéine kinase A dépendante de l'AMP cyclique (PKA). L'activation de la voie de signalisation liée à la PKA nécessite la perception concomitante du glucose extracellulaire par le récepteur couplé à la protéine G (GPCR) et la phosphorylation du glucose à l'intérieur de la cellule. Par conséquent, la levure *S.cerevisiae* est capable de percevoir indépendamment la concentration en glucose extracellulaire, intracellulaire et d'estimer le flux de glucose entrant dans la cellule (Figure 1).

Les études portant sur l'identification des acteurs impliqués dans la signalisation du glucose chez les plantes se sont principalement appuyées sur les avancées réalisées chez la levure *S. cerevisiae* (Loreti et al. 2001). En dépit des recherches approfondies sur les transporteurs de sucres, aucun parmi eux n'a été clairement identifié comme impliqué dans la perception du glucose. Les seules données publiées suggèrent que la protéine membranaire AtRGS1, un régulateur négatif de la perception du glucose extracellulaire, couplée aux protéines G, serait impliquée dans la signalisation glucidique chez Arabidopsis (Chen et al. 2003; Chen and Jones 2004; Chen et al. 2006; Huang et al. 2006). A l'heure actuelle le seul senseur du glucose clairement identifié chez les plantes est l'hexokinase 1 (HXK1), responsable de la perception du signal au niveau du cytoplasme (Jang et al. 1997; Moore et al. 2003; Rolland et al. 2006). L'ensemble des résultats obtenus sur la signalisation du glucose sont en faveur de trois voies possibles : une voie dépendante du senseur cytoplasmique HXK1, une deuxième voie indépendante de HXK1 et potentiellement initiée par un senseur

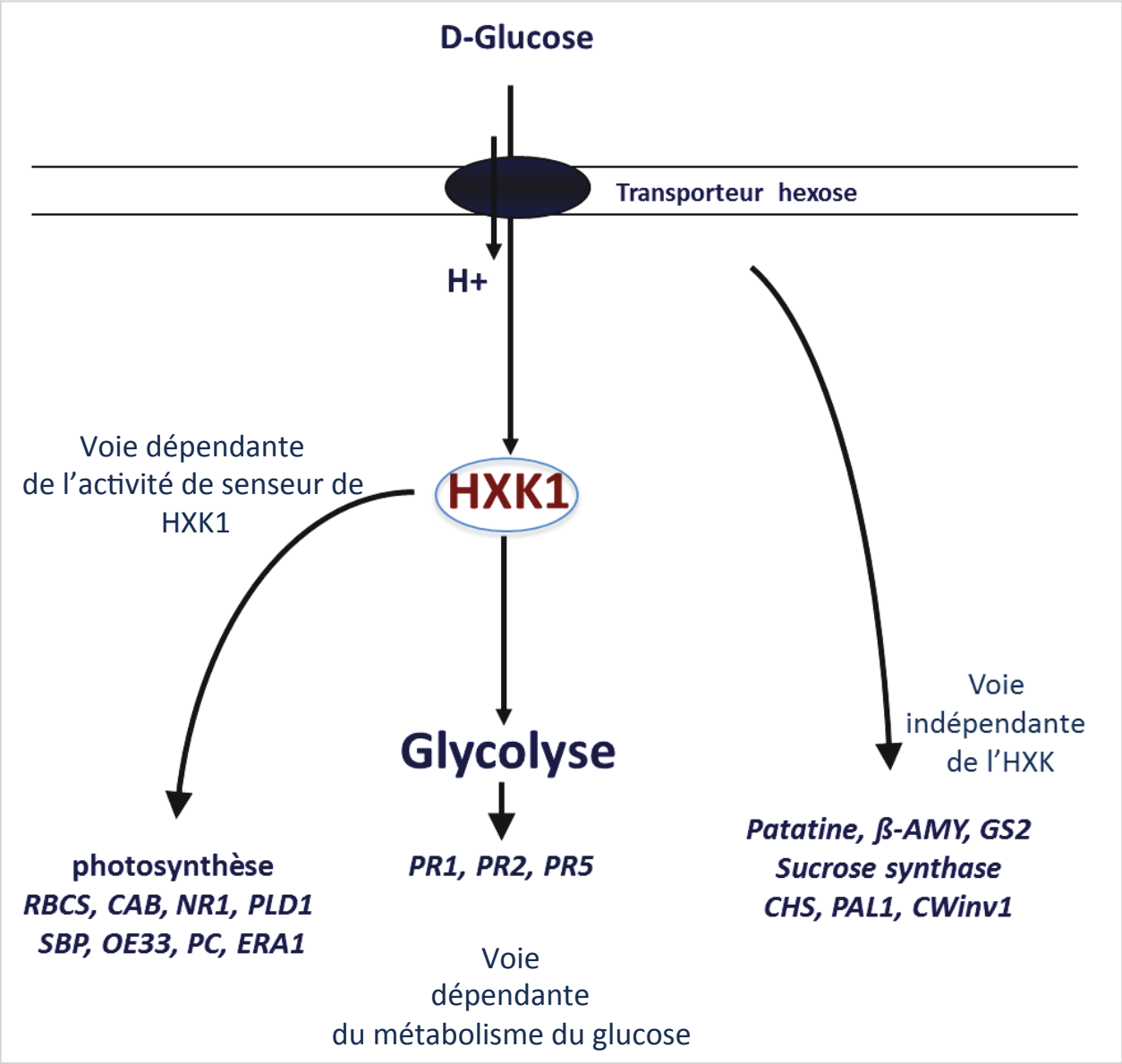


Figure 2 : Schéma représentant les trois voies de la signalisation du glucose, définies à l'égard du senseur cytoplasmique du glucose HXK1, ainsi qu'une liste non exhaustive des gènes régulés par les différentes voies. La voie dépendante de l'hexokinase régule l'expression de RBCS (Rubisco Small Subunit), CAB (Chlorophyll A/B Binding protein), NR1 (Nitrate Reductase 1), PLD1 (Phospholipase D 1), SBP (Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase), OE33 (Oxygen-Evolving Enhancer 33), PC (Plastocyanin), ERA1 (Enhanced Response to ABA). La voie dépendante des produits/intermédiares de la glycolyse, qui s'appuie uniquement sur l'activité catalytique de l'hexokinase, induit l'expression de PR1, 2, 5 (Pathogenesis-Related Proteins 1, 2, 5). La voie de signalisation indépendante de HXK1 est impliquée dans la régulation de la Patatine, la sucrose synthase, β-AMY (β amylase), GS2 (Glutamine Synthase 2), CHS (Chalcone Synthase), PAL1 (Phenylalanine Ammonia Lyase 1), CWinv1 (Cell Wall invertase 1).

membranaire et une troisième voie dépendante de l'activité catalytique de HXK1 mais indépendante de son rôle de senseur, la voie dépendante de la glycolyse (Sheen et al. 1999) (Figure 2).

1.1.1.1 Voie de signalisation du glucose dépendante de l'hexokinase

Le rôle d'une hexokinase en tant que senseur du glucose a tout d'abord été mis en évidence par Jang et Sheen (1994) chez des protoplastes de maïs. Les auteurs ont observé que l'activité de gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur de gènes de la photosynthèse (NOS et CAB) sont inhibés par différents sucres phosphorylables (glucose, 2-déoxyglucose) mais pas par des sucres non importés dans la cellule (L-glucose) ou très faiblement phosphorylables (3-*O*-méthylglucose et 6-déoxyglucose). De plus, des intermédiaires métaboliques de la glycolyse (Glucose-6-P et Phosphoénolpyruvate) internalisés dans les protoplastes par électroporation ne reproduisent pas l'effet du glucose. Enfin, l'utilisation du mannoheptulose, un inhibiteur compétitif des hexokinases, permet de lever l'inhibition imposée par le glucose ou le 2DOG (Jang and Sheen 1994). Par la suite, un mutant isolé *via* un crible portant sur la sensibilité au glucose : *gin2* (glucose insensitive 2), s'est révélé être muté au niveau du gène codant HXK1 (Moore et al. 2003). Les mêmes auteurs ont démontré que l'activité de senseur de HXK1 est maintenue chez des mutants d'*Arabidopsis* affectés uniquement au niveau de l'activité catalytique de HXK1. Cela confirme que la fonction de senseur de cette protéine est indépendante de son activité catalytique. Le mécanisme d'action de HXK1 dans la perception du signal glucidique reste peu connu. Cependant, il a été démontré que cette protéine est capable de s'associer avec deux autres protéines : HUP1 et HUP2 (=HXK1 Unconventional Partner) (Cho et al. 2006). Ces deux protéines présentent une activité bien connue en dehors du noyau : respectivement H^+-ATPase B1 (VHA-B1) vacuolaire et une sous unité du complexe régulateur 19S du protéasome (RPT5B) (Cho et al. 2006). En dehors du noyau, ces deux protéines n'interagissent ni l'une avec l'autre, ni avec l'hexokinase. En revanche, dans le noyau, elles sont capables d'interagir avec l'hexokinase 1, et sont semble-t-il impliquées dans la régulation de l'expression génique « hexokinase dépendante ». En effet, les mutants *hup* présentent une insensibilité au glucose similaire à celle des mutant *gin2*. VHA-B1, mais pas HXK1, est également capable d'interagir avec deux facteurs de transcription hypothétiques (At1g50420: SCARECROW-like TF1 et At3g11280: MYB-like TF2). L'hypothèse la plus probable est qu'en présence de glucose, HXK1 migre

dans le noyau. Elle forme alors un complexe de régulation transcriptionnel, en s'associant avec les protéines HUP1 et HUP2 et probablement d'autres protéines encore non identifiées.

1.1.1.2 Voie de signalisation du glucose indépendante de l'hexokinase

L'existence d'une voie de signalisation indépendante de HXK1 a été révélée par l'utilisation d'analogues du glucose non phosphorylables capables de mimer l'effet du glucose au niveau de la régulation de certains gènes. Le 6-déoxyglucose en particulier est un analogue du glucose transporté dans la cellule, non phosphorylé et non métabolisé. Il n'active pas la voie dépendante de HXK1, or l'expression de la sucrose synthase (SuSy), la phenylammonialyase 1 (PAL1) et de l'invertase pariétale 1 (CwINV1) sont induites par le 6DOG chez des suspensions cellulaires autrophes de chénopode (Godt et al. 1995; Roitsch et al. 1995; Ehness et al. 1997). Une autre étude basée sur l'utilisation de l'analogue du glucose non phosphorylable 3OMG suggère que le gène de la patatine est régulé par le glucose indépendamment de HXK1 (Martin et al. 1997). Cependant la méthodologie employée (traitement par le 3OMG à 90 mM en conjugaison avec le glucose à 30 mM) pose la question de la spécificité de cette régulation par le 3OMG. L'utilisation de mutants d'*Arabidopsis* affectés au niveau de l'expression de HXK1 a également permis d'identifier d'autres gènes régulés par cette voie. Xiao et collaborateurs ont pu observer que l'effet du glucose sur l'expression des gènes codant l'AGPase, la CHS (chalcone synthase), la PAL (phénylalanine ammonia-lyase) et l'ASN (asparagine synthétase) ne changeait pas suivant le niveau d'expression de HXK1 (Xiao et al. 2000). En d'autres termes, la régulation de l'expression de ces gènes en réponse au signal « glucose » ne dépend pas de l'hexokinase 1.

1.1.1.3 Voie de signalisation du glucose dépendante du métabolisme du glucose

Une troisième voie de signalisation du glucose a été mise en évidence, elle serait dépendante des intermédiaires/produits de la glycolyse et l'hexokinase interviendrait uniquement de par son rôle catalytique (Xiao et al. 2000). Cette hypothèse se base sur une étude de la régulation par le glucose de deux protéines de défense (PR1 et PR5) chez des plantules d'*Arabidopsis* sur- ou sous-exprimant *AtHXK1* ou surexprimant l'*HXK2* de levure. Les plantules surexprimant *AtHXK1* présentent une induction de PR1 et PR5 accentuée par rapport aux plantules sauvages. A l'inverse, les plantules sous exprimant *AtHXK1* présentent une induction beaucoup plus faible de PR1 et PR5 comparée aux plantules sauvages.

L'induction de PR1 et PR5 est donc dépendante du niveau d'expression de HXK1. La surexpression de l'*HXK2* de la levure engendre le même effet que la surexpression d'AtH*XK1*, ce qui laisse entendre que le phénomène observé n'est pas lié à une fonction de signalisation spécifique de l'hexokinase1. L'hexokinase est, dans ce cas, sans doute requise pour son activité catalytique, tandis que l'induction des gènes des protéines de défense PR1 et PR5 par le glucose serait donc indirecte et passerait par la perception d'un produit ou intermédiaire de la glycolyse (Xiao et al. 2000).

1.1.2 Interaction entre les signalisations hormonales et du glucose

1.1.2.1 Interactions entre les signalisations du glucose, de l'ABA et de l'éthylène

L'identification des acteurs impliqués dans la signalisation glucidique a en grande partie été réalisée *via* le criblage de mutants d'*Arabidopsis* mis en place en analysant le développement de jeunes plantules sur un milieu gélosé comportant de fortes concentrations en glucose (6%). Une telle concentration en glucose inhibe le développement de plantules sauvages. Dans ces conditions, les plantules sauvages sont caractérisées par une croissance réduite des cotylédons et de la radicule ainsi qu'un défaut d'accumulation de la chlorophylle au niveau des cotylédons. L'identification de mutants insensibles ou hypersensibles au glucose et la caractérisation des gènes affectés par ces mutations ont permis de révéler un certain nombre d'acteurs impliqués dans la signalisation dépendante du glucose. Ces études ont notamment décelé le lien étroit existant entre la signalisation glucidique et les signalisations dépendantes de l'ABA et de l'éthylène dans le contrôle des phases précoces du développement de la plante (Zhou et al. 1998; Arenas-Huertero et al. 2000; Cheng et al. 2002; León and Sheen 2003; Rook and Bevan 2003; Arroyo et al. 2003; Lin et al. 2007). Un certain nombre de mutants présentant une insensibilité au glucose ce sont révélés être des mutants aba (affectés dans la synthèse de l'ABA) ou abi (affectés dans la sensibilité à l'ABA). Les mutant gin5 (glucose insensitive 5) et gin6, par exemple, correspondent respectivement aux mutants aba3 et abi4 (Arenas-Huertero et al. 2000). ABI4 est un gène codant un facteur de transcription de type apetala2, impliqué dans la réponse spécifique de la graine vis-à-vis de l'ABA. Le fait que ce mutant soit insensible au glucose démontre l'existence d'une voie commune à la transduction des signaux glucidiques et ABA.

ABA3 est quant à lui un gène de la biosynthèse de l'ABA, de ce fait il semble que l'accumulation de l'ABA soit nécessaire à la mise en place de la réponse lié à la perception du

signal « glucose » (Arenas-Huertero et al. 2000). Confirmant ce résultat, un certain nombre de mutants aba (aba1-1, aba2-1 et aba3-2) sont insensibles au glucose (Arenas-Huertero et al. 2000). De plus, l'ajout d'ABA à une concentration physiologique (100 nM) permet de lever l'insensibilité au glucose des mutants gin5/aba3 (León and Sheen 2003). Le fait que tous les mutants abi ne soient pas insensibles au glucose montre qu'il existe à la fois une voie de signalisation spécifique à l'ABA et une autre ABA/glucose dépendante.

L'identification des mutants affectés dans la signalisation glucidique a également permis de mettre au jour des interactions avec la voie de signalisation de l'éthylène (Zhou et al. 1998). Le mutant gin1, présente un phénotype similaire à celui des mutants hypersensibles à l'éthylène. Les mutant gin4 et sis1 (sucrose insensitive) présentent des mutations au niveau du gène CTR1 (constitutive triple response) codant une protéine régulant négativement la réponse à l'éthylène (Gibson et al. 2001; Cheng et al. 2002). De plus, le mutant insensible à l'éthylène etr1-1 est, lui, hypersensible au glucose (arrêt du développement des plantules sur milieu contenant 3 à 4% de glucose) (Zhou et al. 1998). D'après Cheng et collaborateurs, GIN1 et ABA2 sont 2 allèles d'un même gène, codant la protéine SDR1 (short chain dehydrogenase-reductase 1). Cette protéine est requise pour la synthèse de l'ABA (Cheng et al. 2002). Le phénotype du mutant gin1 comparable à celui des mutants hypersensibles à l'éthylène résulte probablement d'un défaut au niveau de la biosynthèse de l'ABA. Cette observation suggère l'existence d'un lien entre les signalisations dépendantes du glucose, de l'ABA et de l'éthylène. Par ailleurs, il a été démontré que l'éthylène inhibe la production et la sensibilité à l'ABA chez les jeunes plantules d'*Arabidopsis* (Ghassemian et al. 2000; Beaudoin et al. 2000). Il est donc probable que l'effet antagoniste de l'éthylène sur la signalisation dépendante du glucose soit indirect et passe par son effet d'inhibition de la synthèse et de la sensibilité à l'ABA.

D'une façon intéressante, le glucose et l'ABA induisent d'une manière synergique l'expression de ABA1, ABA2, ABA3, AA03, gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ABA (Cheng et al. 2002), tandis que le glucose entraîne la dégradation d'un élément régulateur de la voie de signalisation de l'éthylène : EIN3 (ETHYLENE INSENSISTIVE 3) par une voie dépendante de HXK1. Les mutants sous-exprimant EIN3 sont hypersensibles au glucose alors que les mutants sur-exprimant EIN3 y sont insensibles (Yanagisawa et al. 2003). Le glucose semble inhiber le développement des jeunes plantules en stimulant la synthèse d'ABA et probablement en régulant la signalisation dépendante de l'éthylène, elle-même antagoniste de la signalisation de l'ABA. La perception du signal glucose dans ces conditions (6% glucose)

est dépendante de HXK1 étant donné que les mutants gin2/hxk1 présentent un phénotype d'insensibilité au glucose (Jang et al. 1997; Moore et al. 2003). Outre son effet d'inhibition sur le développement des jeunes plantules, le glucose retarde également la germination de graines d'Arabidopsis (Dekkers et al. 2004). Les auteurs ont également observé une diminution moins rapide de la concentration endogène en ABA au niveau des graines traitées par le glucose comparé aux graines non traitées. Cette observation confirme l'implication du glucose dans le contrôle de la concentration en ABA au cours des phases précoces du développement de la plante.

En revanche le mécanisme de perception et de transduction du signal « glucose » au cours de la germination semble différent de celui observé au cours du développement de la jeune plantule. En effet, au cours de la germination, les mutants gin2/hxk1, abi2, abi4 et abi5 se comportent d'une manière similaire au sauvage en réponse au traitement par le glucose. Cela indique que HXK1 n'est probablement pas impliqué dans la perception du signal glucose au cours de cette étape. De même, les facteurs de transcription de la voie de l'ABA liés à la répression du développement de la plantule par de fortes concentrations en glucose (ABI4 en particulier) ne semblent pas impliqués dans la transduction du signal « glucose » au cours de la germination.

La méthodologie visant à étudier l'effet d'un traitement exogène par le glucose sur le développement précoce des plantules d'*Arabidopsis* a été révisée récemment. En supprimant le nitrate du milieu gélosé employé pour le test, Cho et collaborateur ont pu réduire la concentration en glucose, permettant de réprimer le développement des plantules, à 2% (Cho et al. 2010). Les auteurs ont aussi démontré que, dans ces conditions, la répression du développement des jeunes plantules par le glucose est indépendante des signalisations de l'ABA et de l'éthylène. Cette observation suggère l'existence d'au moins 2 voies de signalisation impliquées dans la répression du développement des jeunes plantules d'*Arabidopsis* par le glucose. Une voie de signalisation déclenchée par de fortes concentrations en glucose (6%) en présence de nitrate. Cette voie nécessite la production et la perception de l'ABA et est inhibée par l'éthylène probablement du fait de son action antagoniste vis-à-vis de la signalisation de l'ABA. Une autre voie est déclenchée par des concentrations en glucose plus faibles (2%) en absence de nitrate. Cette voie est uniquement dépendante de HXK1. Ces observations témoignent de la complexité de la signalisation glucidique et de l'influence des conditions expérimentales de l'étude sur les observations réalisées.

1.1.2.2 Interaction avec la signalisation auxinique

Les signalisations dépendantes du glucose et des auxines semblent également être interconnectées. Les mutants affectés au niveau de la signalisation auxinique axr1, axr2 et tir1 sont en effet insensibles à l'arrêt du développement des plantules imposé par de fortes concentrations en glucose (6%) (Moore et al. 2003). Cette observation suggère que l'inhibition du développement des jeunes plantules par le glucose est dépendant de la signalisation auxinique. De plus le mutant gin2/hxk1 présente une insensibilité au traitement par l'AIA. Des hypocotyles du mutant gin2 traités par l'AIA présentent une forte réduction de la multiplication cellulaire et de la formation de racine par rapport au sauvage et au mutant gin2 exprimant une forme mutée d'HXK1, dépourvue d'activité catalytique mais conservant son activité de senseur (Moore et al. 2003). La signalisation et/ou le transport des auxines est donc dépendant de la signalisation du glucose liée à HXK1.

Une étude récente a également montré qu'un traitement par le glucose (1% à 5%) induisait la production d'auxines libres chez des plantules d'*Arabidopsis* (Sairanen et al. 2012). Le saccharose induit également la production d'auxine libre. Cet effet d'induction est sous le contrôle des facteur de transcription PIF (Phytochrome Interacting Factor) (Lilley et al. 2012). Le contrôle de l'élongation de l'hypocotyle exercé par le saccharose est également dépendant des facteurs de transcription PIF (Lilley et al. 2012). Les mutants AXR2/IAA7 et AXR3/IAA17 caractérisés par une répression constitutive de la signalisation auxinique, présentent une insensibilité au glucose au niveau du contrôle de l'élongation de l'hypocotyle de plantules placées à l'obscurité (Kushwah and Laxmi 2013). Ces observations suggèrent que le glucose et le saccharose participent au contrôle de l'élongation de l'hypocotyle à travers une voie de signalisation commune avec les auxines. Cette régulation passe potentiellement par l'induction de la synthèse des auxines par une voie de signalisation impliquant les facteurs de transcription PIF.

Une étude de micro-array réalisée sur des plantules d'*Arabidopsis*, indique que le glucose induit l'expression de 62% des gènes régulés par l'auxine (Mishra et al. 2009). Parmi ces gènes certains ne sont pas régulés par le glucose seul mais le sont d'une manière synergique par le glucose en présence d'auxine. Le glucose régule en outre des gènes impliqués dans la biosynthèse (AtYUCCA), le transport (AtPIN) et la signalisation (AtTIR1, AUX/IAA, GH3, SAUR) des auxines (Mishra et al. 2009). De plus, le glucose exogène accentue le défaut de croissance des racines secondaires, de l'élongation des poils absorbants

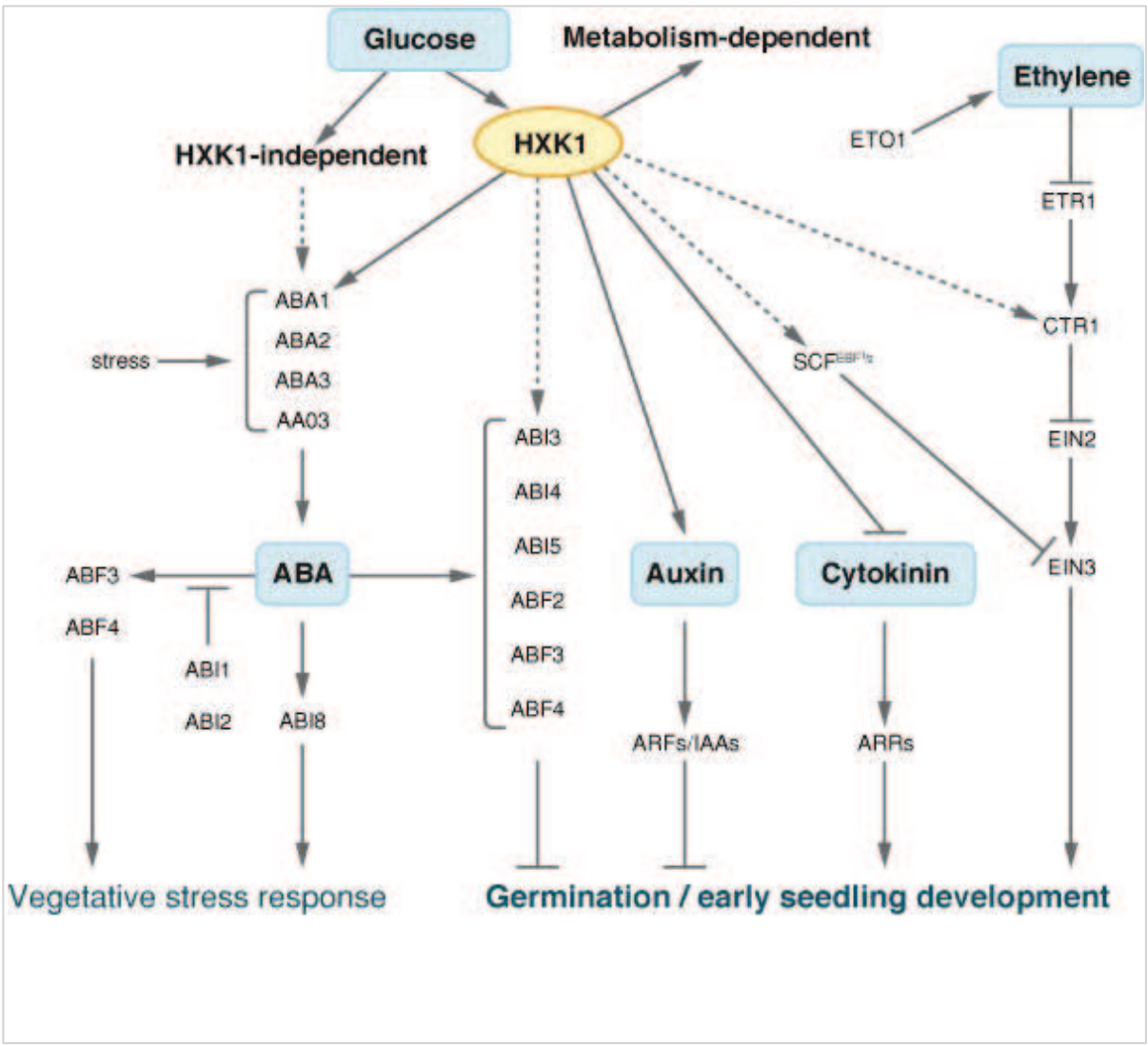


Figure 3 : Modèle représentant les interactions entres la signalisation glucidique et hormonale. Le contrôle du développement des plantules par la signalisation glucidique HXK-dépendante passe par une augmentation de la teneur en ABA et induit à la fois la synthèse et la sensibilité à l'ABA. La signalisation du glucose et de l'éthylène convergent au niveau du fateur de transcription ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3) en régulant diffénretiellement la stabilité de ce facteur de transcription. La signalisation dépendante de HXK interagit respectivement positivement et négativement avec la signalisation dépendante des auxines et des cytokinines. Sont indiqués en pointillés les interactions hypothétiques (Rolland et al. 2006).

et du gravitropisme chez des mutants d'*Arabidopsis* affectés au niveau de la signalisation auxinique (Mishra et al. 2009). Le mutant miniature 1 (mn1) du maïs est affecté au niveau de l'activité de l'invertase vacuolaire CWINV2. La protéine CWINV2 s'accumule principalement au niveau de la couche de transfert de l'endosperme basal du grain de maïs (Kang et al. 2009). Le mutant mn1 présente en conséquence une accumulation accrue du saccharose et des concentrations amoindries en glucose et en fructose au niveau de cette zone (LeClere et al. 2010). Cette mutation se traduit également par une diminution de la concentration en auxine dans l'ensemble du caryopse. Celle-ci est liée au faible niveau d'expression du gène ZmYUCCA impliqué dans la biosynthèse de l'AIA. Les auteurs ont démontré que, comme son homologue chez *Arabidopsis*, ZmYUCCA était fortement induit par le glucose (Mishra et al. 2009; LeClere et al. 2010). Le développement anormal du grain de maïs chez ce mutant est vraisemblablement lié à la concentration plus faible en glucose au niveau de la zone basale de l'endosperme, qui se traduit par une inhibition de la synthèse de l'AIA. Ces deux études témoignent de l'importance du glucose en tant que signal capable d'interagir avec la signalisation auxinique afin de réguler la croissance et le développement d'organes puits tels que la racine ou la graine.

1.1.2.3 Interaction avec la signalisation des cytokinines

Une étude de micro-array indique que le glucose affecte l'expression de 76% des gènes régulés par les cytokinines. Le glucose et les cytokinines sont probablement impliqués dans la régulation de processus biologiques communs (Kushwah and Laxmi 2013). Plusieurs observations suggèrent un effet antagoniste entre la signalisation dépendante du glucose et celle des cytokinines. La répression du développement des jeunes plantules d'*Arabidopsis* par le glucose à 6% peut être levée par un apport exogène de cytokinine (2-isopentenylaminopurine) (Moore et al. 2003). De plus, les mutants exprimant d'une manière constitutive les gènes CKI1 et ARR2 sont également insensibles à l'arrêt du développement imposé aux plantules par le glucose à 6% (Moore et al. 2003). Or l'expression ectopique de CKI1 ou ARR2 conduit à l'activation de la signalisation dépendante des cytokinines (Hwang and Sheen 2001). La répression du développement des jeunes plantules par le glucose à 6% nécessite que la signalisation dépendante des cytokinines soit inactive. Les mutants d'*Arabidopsis* hypersenescence 1 (hys1), présente une hypersensibilité au glucose caractérisée par un effet plus prononcé du glucose exogène (6%) sur l'inhibition de l'accumulation de la chlorophylle chez les jeunes plantules. L'action antagoniste des cytokinines et de l'éthylène

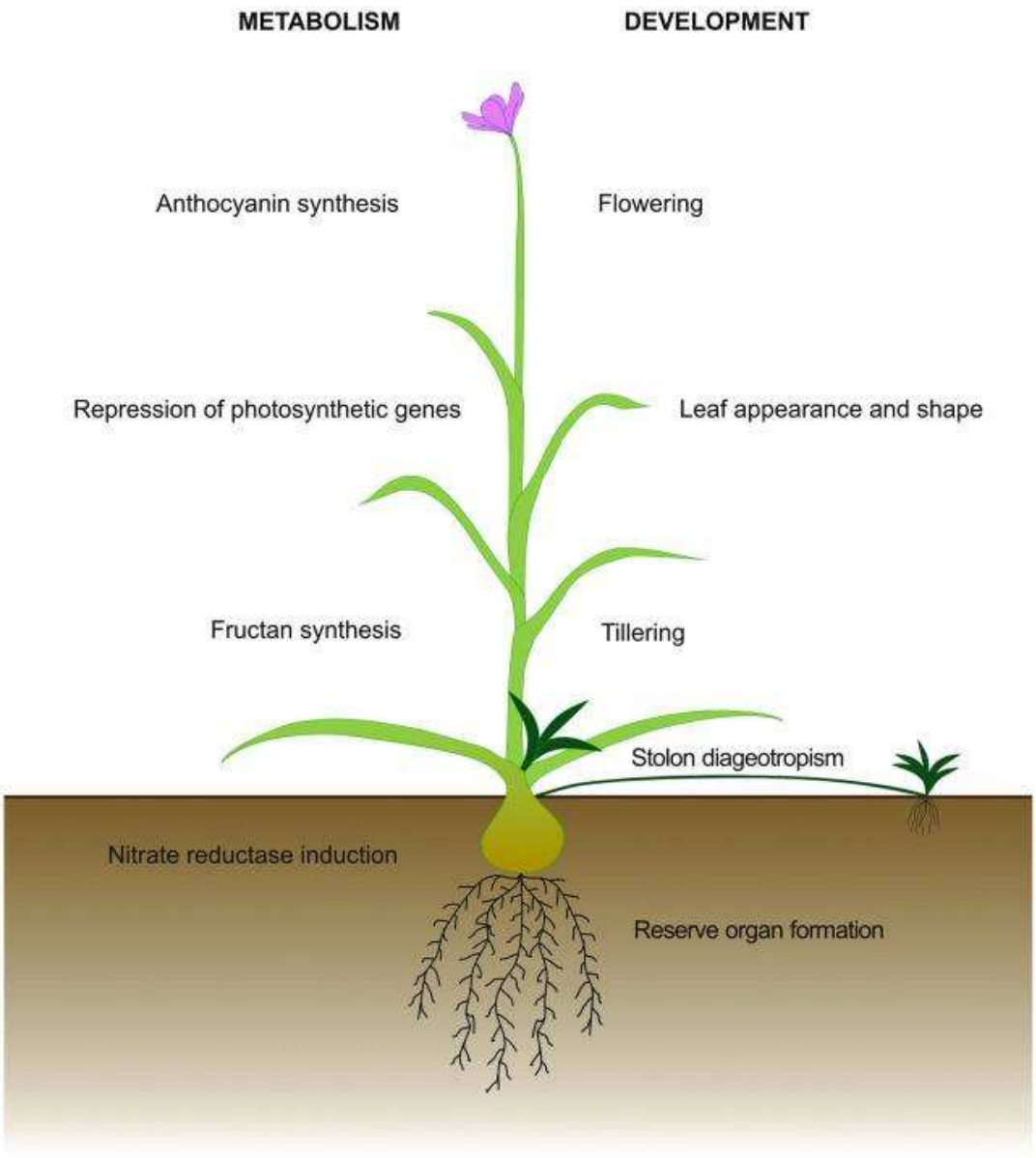


Figure 4 : Récapitulatif des différents processus métaboliques et développementaux régulés par le saccharose (Tognetti et al., 2013).

vis-à-vis du glucose est également moins marquée chez ce mutant (Aki et al. 2007). Cette observation suggère que la protéine HYS1 est probablement impliquée dans l'intégration des signalisations dépendantes du glucose, des cytokinines et de l'éthylène au cours de la transition des jeunes plantules vers l'autotrophie.

Un résumé des principales interactions entre les signalisations glucidique et hormonales est représenté sur la Figure 3.

1.1.3 La signalisation par le saccharose

Le saccharose, sucre non réducteur est le sucre préférentiellement transporté à longue distance chez la majorité des végétaux supérieurs. Il représente potentiellement un signal clé permettant d'harmoniser la croissance et le développement des organes puits avec la production ou la remobilisation des réserves glucidiques au niveau des organes sources. Les organes sources sont de 2 types : feuille mature photosynthétique ou organe de réserve. La teneur en saccharose dans la plante est affectée par un certain nombre de facteurs environnementaux. Sa production est en général positivement corrélée à l'intensité lumineuse à laquelle la plante est exposée. D'autres facteurs environnementaux tels que les basses températures tendent à augmenter la concentration en saccharose des tissus exposés. Or, le traitement par le saccharose reproduit certains effets de l'exposition à une forte intensité lumineuse ou au froid (Tognetti et al. 2013), ce qui suggère qu'une partie des réponses de la plante à ces modifications environnementales est perçue *via* l'augmentation de la concentration en saccharose qui en résulte. De nombreuses études rapportent que le saccharose serait impliqué dans la régulation de la croissance, du métabolisme ainsi que de différentes étapes du développement de la plante (Figure 4). Voir (Tognetti et al. 2013; Lastdrager et al. 2014) pour des revues récentes sur le sujet. La spécificité du signal saccharose n'est cependant pas toujours tranchée d'une manière non équivoque. Le saccharose étant fréquemment hydrolysé en glucose et fructose, il est souvent difficile de dissocier l'effet du saccharose de celui de ses produits d'hydrolyse. L'utilisation d'analogues non métabolisables du saccharose a cependant permis de caractériser des voies de signalisation spécifiques du signal saccharose. Parmi ces analogues, le palatinose n'est pas pris en charge par les transporteurs de saccharose et par conséquent très faiblement importé dans la cellule (M'Batchi et al. 1985; M'Batchi and Delrot 1988; Fernie et al. 2001). Le fait que le palatinose induise certaines réponses de la

plante de la même manière que le saccharose, suggère l'existence d'un système de perception du saccharose au niveau de la membrane plasmique. Certains auteurs suggèrent que des transporteurs du groupe SUT2, tels qu'AtSUT2/SUC3, seraient impliqués dans la perception du saccharose extracellulaire. Cette hypothèse se base sur l'analogie structurale des transporteurs de ce groupe avec les senseurs du glucose Snf3 et Rgt2 de la levure (Barker et al. 2000). Cependant aucunes données fonctionnelles ne viennent étayer cette hypothèse et le système de perception du saccharose extracellulaire reste encore à identifier.

1.1.3.1 Implication dans la régulation du métabolisme de la plante

Le saccharose est impliqué dans la régulation du stockage et de la remobilisation des réserves glucidiques. Il stimule notamment la production d'amidon en induisant l'ADP Glucose pyrophosphorylase (AGPase) (Nakamura et al. 1991; Harn et al. 2000; Wang et al. 2001; Tiessen et al. 2003; Hendriks et al. 2003; Nagata et al. 2012). Le saccharose induit l'AGPase aux niveaux transcriptionnels et post traductionnels (Tiessen et al. 2003). L'induction post traductionnelle de l'AGPase par le saccharose est dépendante de l'activité de la Snf1-Related protein Kinase 1 (SnRK1), une protéine majoritairement impliquée dans le contrôle du métabolisme en fonction du statut glucidique de la cellule (Polge and Thomas 2007). Le glucose induit également l'activité de l'AGPase *via* un mécanisme de régulation post traductionnel mais celui-ci est indépendant de SnrK1 et passe par la voie de signalisation de HXK1. De plus, le palatinose, un analogue du saccharose non métabolisable induit l'activité de l'AGPase d'une manière similaire au saccharose. Cette observation implique que l'activation post traductionnelle de l'AGPase ne nécessite pas la métabolisation du saccharose et que l'effet du saccharose est spécifique et indépendant de celui de ses produits d'hydrolyse (Tiessen et al. 2003). Le saccharose est également capable de contrôler le métabolisme de l'amidon en inhibant l'expression du gène de l'α-amylase (Loreti 2000) chez des embryons d'orges. (*Nb* : L'α-amylase est impliquée dans la dégradation de l'amidon en maltose.) Les auteurs ont démontré, par l'utilisation de différents disaccharides, que cet effet d'inhibition était dépendant de la « moitié » fructose de la molécule de saccharose. Le saccharose intervient également dans la régulation de la synthèse des fructanes (Pollock 1990; Nagaraj et al. 2001; Noël et al. 2001). Les fructanes sont des polysaccharides de réserves composés essentiellement de molécules de fructose (Pollock and Cairns 1991). Le saccharose est un précurseur de la synthèse des fructanes mais il intervient également dans la régulation

spécifique de certaines enzymes de la biosynthèse de ces composés. Il induit notamment l'expression du gène de la fructan-6-fructosyltransferase chez l'orge et le blé ainsi que celui de la fructosyl sucrose synthase chez le blé (Nagaraj et al. 2001; Noël et al. 2001). Plusieurs études rapportent que le saccharose entraine une inhibition de gènes et de protéines en lien avec la photosynthèse (Sheen 1990; Harter et al. 1993; Oosten et al. 1997; Cottage et al. 2010). Cependant le glucose inhibe également les gènes de la photosynthèse (Sheen 1990; Jang and Sheen 1994; Xiao et al. 2000), la régulation de ce processus par le saccharose pourrait donc être indirecte et dépendre de ses produits d'hydrolyse. En revanche le saccharose induit la synthèse d'anthocyanes indépendamment du glucose et du fructose chez des plantules d'Arabidopsis. Cette induction est corrélée à l'induction spécifique de gènes de la biosynthèse des anthocyanes (dihydroflavonol 4-réductase : DFR ; leucoanthocyanidine dioxygénase : LDOX …) et du gène du facteur de transcription PAP1 : PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1 (Solfanelli et al. 2006). La signalisation par le saccharose interviendrait également dans la régulation de l'assimilation et le métabolisme du nitrate. Il a été démontré qu'un traitement par le saccharose induit l'expression du gène de la NR1 chez Arabidopsis (Cheng et al. 1992) et l'activité de la nitrate réductase au niveau de feuilles de tabac (Morcuende et al. 1998). Cependant le glucose induit également l'expression du gène de la NR1 chez Arabidopsis (Xiao et al. 2000) et l'activité de la nitrate réductase chez le tabac (Morcuende et al. 1998). La régulation de la nitrate réductase par le saccharose pourrait être liée à l'hydrolyse du saccharose et à l'action du glucose. En revanche le saccharose, contrairement au glucose, stimule la redirection du flux de carbone issu de la glycolyse vers la production d'acides organiques (Morcuende et al. 1998). Il induit notamment la synthèse d' α-cétoglutarate, cet acide organique joue le rôle d'accepteur de l'ion ammonium et participe ainsi à l'assimilation de l'azote (Stitt 1999). Le saccharose est également impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle du facteur de transcription de type leucine zipper AtbZIP11 (Rook et al. 1998). AtbZIP11 est inhibé par le saccharose via l'expression d'un μORF présent dans son promoteur et codant un peptide de 42 acides aminés. AtbZIP11 régule, quant à lui, l'expression d'un grand nombre de gènes chez *Arabidopsis*, parmi lesquels ceux de l'asparagine synthétase 1 et de la proline déshydrogénase 2 (Hanson et al. 2008). Ces observations suggèrent une implication du saccharose dans la régulation de la biosynthèse des acides aminés.

1.1.3.2 Implication dans la croissance et le développement de la plante

Le saccharose stimule la croissance de la plante, probablement en induisant la prolifération cellulaire *via* l'induction de l'expression des gènes des cyclines B et D (Riou-Khamlichi et al. 2000). Il induit également l'expression du gène de la nucléoline 1, AtNUC-L1 fortement corrélé à la prolifération cellulaire chez *Arabidopsis*. Le glucose stimule également l'expression de ce gène mais d'une manière moins marquée que le saccharose. Outre les gènes liés au cycle cellulaire, le saccharose induit l'expression des gènes des sous unités C/D et H/ACA des ribonucléoprotéines (RNP), ainsi le saccharose a également un rôle dans la synthèse des ribosomes (Kojima et al. 2007).

Le saccharose est également impliqué dans la régulation de certains stades du développement de la plante (Tognetti et al. 2013; Lastdrager et al. 2014). Plusieurs études indiquent que le saccharose stimulerait la formation d'organes de réserves tels que les tubercules caulinaires de la pomme de terre ou les bulbilles chez l'oignon (Keller 1993; Fischer et al. 2008; Tognetti et al. 2013). D'autre part, le saccharose stimule la croissance plagiotrope des stolons chez le chiendent pied de poule (Cynodon dactylon) (Montaldi 1969). Le saccharose jouerait également un rôle au niveau du maintien de l'identité des méristèmes apicaux caulinaires et racinaires (Wu et al. 2005; Wahl et al. 2010). L'apport de saccharose exogène permet en effet de restaurer l'activité du méristème apical caulinaire chez les mutants d'*Arabidopsis* stip/wox9 (Wu et al. 2005) et du méristème racinaire chez les mutants surexprimant le gène FAF3 (Wahl et al. 2010). Ces deux mutants sont caractérisés par un défaut d'activation du gène *WUS* impliqué dans la stimulation de la division et la répression de la différenciation des cellules du méristème (Lenhard et al. 2002). Le saccharose jouerait également un rôle dans la régulation de la différenciation du Méristème Apical Caulinaire (MAC) au cours de l'initiation de la floraison (Bernier et al. 1993; Corbesier et al. 1998; Yang et al. 2011). Corbesier et collaborateurs ont observés une forte corrélation positive entre la quantité de saccharose exportée vers le phloème et l'induction de la floraison causée par une modification de la photopériode (Corbesier et al. 1998). Une accumulation de saccharose a aussi été observée au niveau du MAC, suite à l'induction de la floraison par des modifications du cycle photopériodique. Or cette accumulation de saccharose précède la mise en place de mécanismes couteux en énergie tels que la division cellulaire (Bodson and Outlaw 1985). Cela suggère que l'augmentation de l'export du saccharose des feuilles sources et son accumulation au niveau du méristème ne dépend pas directement des besoins énergétiques du méristème. L'accumulation du saccharose pourrait dans ce cas servir de signal pour initier la différenciation du méristème (Bernier et al. 1993). Une étude réalisée chez la vigne indique

qu'un traitement exogène par le saccharose induit l'expression du gène VFL au niveau du MAC au cours de la différenciation de l'inflorescence et du développement précoce des structures florales (Yang et al. 2011). Le gène VFL est l'orthologue du gène LEAFY d'*Arabidopsis* et serait impliqué dans la différenciation des cellules du méristème apical caulinaire liée à l'induction de la floraison (Carmona et al. 2002; Yang et al. 2011). La surexpression du seul gène *AtLEAFY* chez Arabidopsis, chez le bouleau ou un hybride d'agrumes conduit à une induction très précoce de la floraison (Weigel and Nilsson 1995; Peña et al. 2001). L'accumulation du saccharose au niveau des méristèmes pourrait donc participer à l'initiation de la floraison *via* l'induction du gène LEAFY/VFL.

Une étude récente suggère que le saccharose est impliqué dans le processus de mort cellulaire programmée (Chivasa et al. 2013). Les auteurs ont observés que le saccharose modulait l'effet d'un traitement par la toxine fongique FB1 (fumonisin B1), responsable de l'induction de la mort cellulaire programmée. L'apport de saccharose conduit à une mortalité cellulaire accrue chez des suspensions cellulaires et des feuilles d'*Arabidopsis* traitées par le FB1. Ces auteurs ont également démontrés que cet effet du saccharose est dépendant de l'expression du gène codant l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase). L'effet du saccharose est totalement aboli chez des mutants dont l'expression du gène de l'UGPase est éteinte. De plus, le saccharose induit spécifiquement l'expression de l'UGPase chez *Arabidopsis* (Ciereszko et al. 2001). L'ensemble de ces informations indique que le saccharose peut agir comme un signal stimulant la mort cellulaire programmée lorsque celle-ci est déclenchée par d'autres *stimuli*. L'absence d'effet du saccharose chez les mutants ugpase, indique que le saccharose stimule probablement la mort cellulaire programmée en induisant l'expression de l'UGPase. Le rôle de l'UGPase dans la régulation de ce mécanisme reste cependant à déterminer.

1.1.4 La signalisation par le tréhalose

Longtemps négligé car présent en très faible quantité (de l'ordre du femtomole) chez la majorité des plantes, le tréhalose et ses intermédiaires se sont révélés être des acteurs importants de la signalisation glucidique. Le tréhalose, formé de 2 molécules de glucose, est synthétisé à partir du tréhalose-6-phosphate (T6P), lui-même formé à partir du glucose-6-phosphate (G6P) et de l'UDP glucose *via* l'action de la tréhalose-6-phosphate synthase (TPS).

Le T6P est ensuite déphosphorylé par la tréhalose-6-phosphate phosphatase (TPP). Le séquençage d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier 11 gènes codant des TPS et 10 gènes codant des TPP (Rolland et al. 2006). Cette observation suggère l'existence d'une régulation complexe des niveaux de tréhalose et de ses intermédiaires.

Cependant parmi les 11 gènes codant des TPS, il semble que seul *TPS1* code une protéine catalytiquement active (Ramon et al. 2009; Vandesteene et al. 2010). La majeure partie des TPS sont régulés au niveau transcriptionnel par des signaux liés aux hormones, à la lumière et à la nutrition. (Ramon et al. 2009). La protéine AtTPS5 est capable de se fixer à l'UDP-glucose, en revanche il est probable qu'elle ne puisse interagir avec le G6P (Harthill et al. 2006). AtTPS5, 6 et 7 interagissent avec des protéines régulatrices de type 14-3-3 (Harthill et al. 2006) qui sont impliquées dans la transduction du signal liée à un large panel de modifications environnementales et qui agissent en modulant l'activité d'un grand nombre de protéines régulatrices et du métabolisme (Denison et al. 2011). L'ensemble de ses observations suggèrent que les AtTPS2-11 ont probablement une fonction régulatrice (Ramon et al. 2009). AtTPS5 se fixant à l'UDP-glucose, il est possible que cette régulation soit liée à la perception de l'UDP-glucose.

La mise en place de mutants affectés dans l'expression des enzymes de la biosynthèse du tréhalose a permis de mieux cerner le rôle du tréhalose et de ses intermédiaires. L'expression de TPS, de TPP et de TPH (Tréhalose Phosphate Hydrolase) de levure chez *Arabidopsis* modifie la teneur en T6P et entraine un phénotype marqué chez les plantes. En revanche, une modification de la teneur en tréhalose n'induit pas de phénotype marqué. Cela met en évidence un rôle prépondérant du T6P vis-à-vis du tréhalose lui-même.

Le T6P est, entre autre, indispensable au développement de l'embryon puisque le mutant tps1 voit son développement embryonnaire stoppé au stade torpille (Eastmond et al. 2002). De plus l'expression de la TPS d'*E.coli* chez les mutants tps1 permet de restaurer un développement embryonnaire normal contrairement à l'apport exogène de tréhalose (Schluepmann et al. 2003). L'expression transitoire de TPS1 au cours des phases précoces du développement des mutants tps1 permet de lever l'arrêt de développement au stade torpille de ces mutants et d'étudier l'impact de la répression de la synthèse de T6P sur le développement ultérieur de la plante (van Dijken et al. 2004; Gómez et al. 2006). Les mutants tps1 sont alors caractérisés par une croissance fortement ralentie et une incapacité à fleurir (van Dijken et al. 2004; Gómez et al. 2006). La génération de mutants tps1 n'abolissant pas totalement

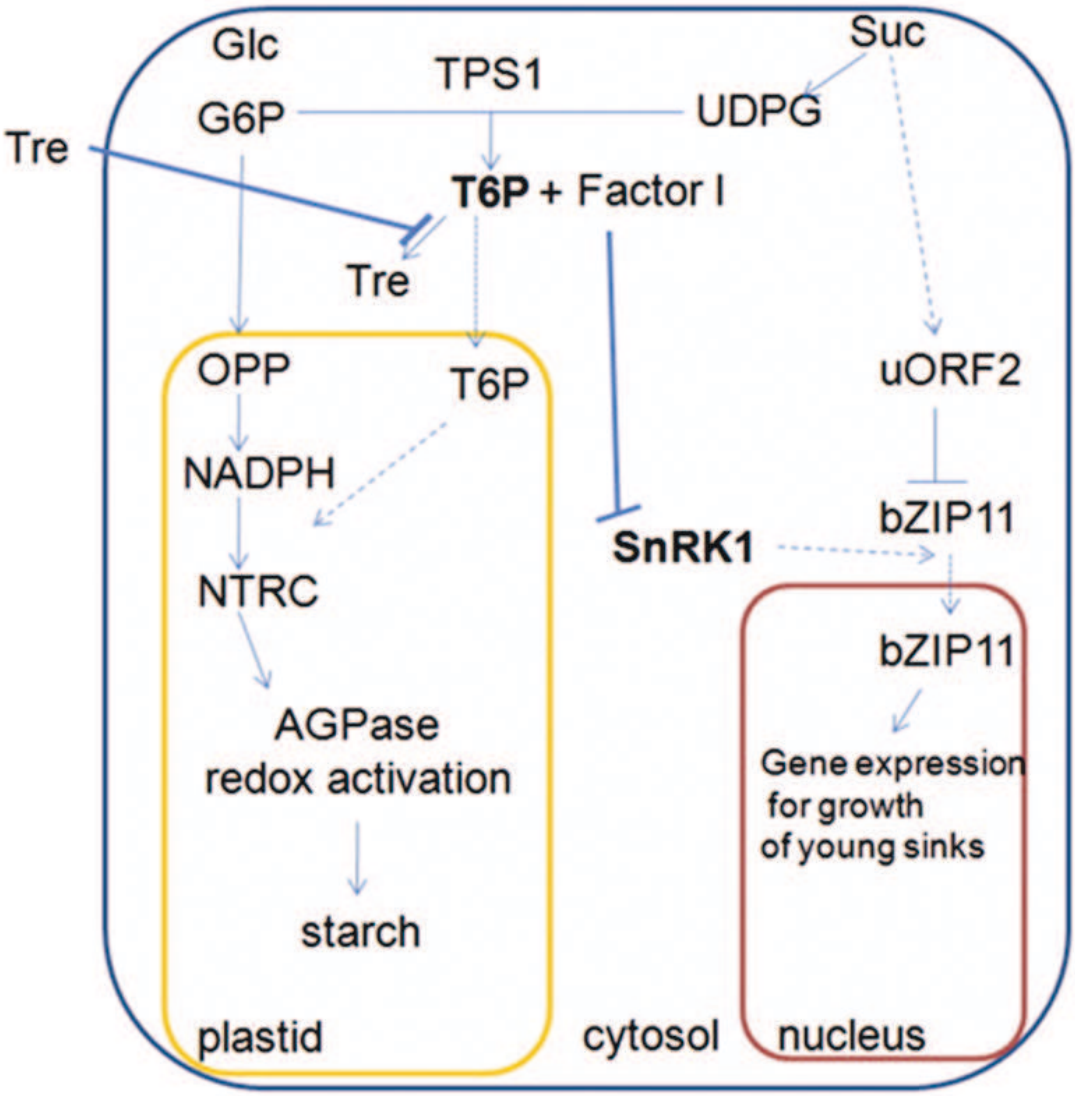


Figure 5 : Modèle de régulation intégrant l'hypothèse suivant laquelle le T6P inhibe l'activité de la SnRK1. La métabolisation du saccharose conduit à la formation des formes activées du glucose UDPG et G6P ce qui stimule la synthèse de T6P par la TPS1. Le T6P active ensuite l'AGPase ce qui se traduit par une accumulation d'amidon au niveau des plastes. Au niveau des tissus jeunes, un niveau élevé de T6P inhibe également la SnRK1, ce qui abouti à une induction du facteur de transcription bZIP11 afin de favoriser les processus anaboliques Delatte et al., 2011).

l'expression de TPS1 a également permis d'observer un lien entre la signalisation dépendante du T6P et celle de l'ABA (Gómez et al. 2010). Les mutants affectés au niveau de l'expression de TPS1 présentent une hypersensibilité à l'ABA, le degré de cette hypersensibilité étant corrélé au niveau de répression de la synthèse de T6P chez les différents mutants générés.

L'apport de sucres (glucose, fructose ou saccharose à 100 mM) entraîne une inhibition de la croissance chez les plantules présentant un niveau de T6P élevé tandis qu'il induit la croissance des plantules présentant un niveau de T6P faible (Schluepmann et al. 2003). Ces résultats témoignent d'une implication du T6P dans la régulation de la croissance de la plante en fonction de la disponibilité en sucres. D'autre part, l'apport de T6P au niveau de feuilles de plantes d'*Arabidopsis* stimule la synthèse d'amidon et entraîne une activation post traductionnelle de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) (Kolbe et al. 2005). De plus, la surexpression de la TPS, conduisant à une augmentation de la teneur en T6P entraîne une induction de l'accumulation d'amidon et de l'activation de l'AGPase au niveau des feuilles. L'effet contraire est observé chez les plantes surexprimant la TPP et dont le niveau de T6P est moins élevé. Une étude du profil d'expression des gènes de plantules affectées au niveau de leur teneur en T6P montre une corrélation entre le niveau de T6P et l'expression d'un certain nombre de gènes parmi lesquels 15 sont également régulés par le saccharose (Schluepmann et al. 2004). Par ailleurs la surexpression de la TPP, responsable de teneurs amoindries en T6P, annule l'activation de l'AGPase liée à un apport exogène de saccharose (Kolbe et al. 2005). La régulation de cette enzyme par le saccharose semble donc passer par la voie du T6P. De plus, une forte corrélation entre la teneur en saccharose et en T6P a été observée chez *Arabidopsis (Lunn et al. 2006; Paul 2008; Martínez-Barajas et al. 2011; Nunes et al. 2013)*. Il est donc probable que les voies de signalisation du saccharose et du T6P soient liées et participent à la régulation du métabolisme en l'adaptant à la disponibilité en sucres.

Plusieurs revues et études récentes suggèrent que la signalisation du T6P serait dépendante de la protéine SnRK1. (Zhang et al. 2009; Delatte et al. 2011; Debast et al. 2011; Schluepmann et al. 2012). Sur la base de ces observations, un modèle de régulation a été proposé (Figure 5). Le T6P est synthétisé à partir du Glucose-6-P et de l'UDP-Glucose, 2 formes du glucose permettant d'alimenter les réactions anaboliques de la cellule (synthèse du saccharose, de l'amidon, des composés de la paroi, de différents acides aminés…) et la production de NADPH, nécessaire à l'ensemble des réactions anaboliques. On peut donc supposer que la synthèse de T6P par la TPS1 résulte de l'accumulation du G6P et de l'UDP-Glucose. D'autre part, la forte corrélation observée entre la teneur en T6P et en saccharose,

indique que le T6P est un marqueur d'une forte disponibilité en sucres. D'une manière intéressante, le T6P inhibe l'activité de la SnRK1 chez différentes espèces (Zhang et al. 2009; Debast et al. 2011; Delatte et al. 2011). La SnRK1 est une protéine kinase activée en condition de carence en sucre. L'activation de la SnRK1 induit un remodelage profond du métabolisme, favorisant les processus cataboliques au détriment des réactions anaboliques. L'accumulation de T6P dans des conditions non limitantes en sucres se traduit par une inactivation de la SnRK1. Cette inactivation de la SnRK1 favorise le déroulement des réactions anaboliques. Si l'approvisionnement en sucre s'épuise, le G6P et l'UDP-Glucose sont rapidement consommés par le métabolisme. Cela induit une diminution de la teneur en T6P, ce qui lève l'inactivation de la SnRK1. La forme active de la SnRK1 favorise alors les mécanismes cataboliques et limite les réactions anaboliques afin d'adapter le métabolisme aux conditions de faible disponibilité en sucres.

1.1.5 La voie de signalisation dépendante de la SnRK1

SnRK1 (SnF1 Related protein Kinase) est une sérine/thréonine kinase partageant une forte identité de séquence avec la protéine SnF1 (Sucrose non Fermenting 1) de la levure et la protéine AMPK (5' AMP-activated Protein Kinase) des mammifères. Chez la levure, SnF1 est impliqué dans la transition entre la fermentation et le métabolisme oxydatif lors du passage de conditions de forte disponibilité en glucose vers des conditions de faible disponibilité en glucose (Polge and Thomas 2007). L'AMPK des mammifères est impliquée dans le maintien de l'homéostasie énergétique notamment en conditions de stress cellulaire en induisant le catabolisme et en inhibant l'anabolisme (Hardie 2011). L'expression de la SnRK1 du seigle chez des mutants de levure SnF1 permet de restaurer le phénotype sauvage, à savoir la capacité à croître sur un milieu contenant pour seule source de carbone, du glycérol (Alderson et al. 1991). Il semble donc que la fonction de cette protéine ait été relativement bien conservée au cours de l'évolution. SnF1, AMPK et SnRK1 partagent également la même structure hétérotrimèrique composée de 3 sous-unités : une sous-unité catalytique α, et deux sous unités-régulatrices β et γ (Polge and Thomas 2007).

A l'instar de ses homologues chez la levure et les mammifères, SnRK1 est impliquée dans la régulation du métabolisme (Polge and Thomas 2007). Deux SnRK1 d'épinard phosphorylent et inactivent, *in vitro*, trois enzymes importantes du métabolisme : l'Hydroxymethyl-3-MethylGlutaryl-CoA Reductase (HMGR), la Sucrose Phosphate Synthase (SPS), la Nitrate Reductase (NR). La SnRK1 d'épinard phosphoryle et inactive la 6-

phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (F2KP) ; ainsi que la Tréhalose Phosphate Synthase 5 (TPS5) (Sugden et al. 1999; Harthill et al. 2006). La phosphorylation de la TPS5, de la NR et de la F2KP favorise leur interaction avec les protéines régulatrices 14-3-3 (Harthill et al. 2006). L'interaction entre la nitrate réductase et la protéine 14-3-3 conduit à une forte inhibition de l'activité de la NR (Harthill et al. 2006). Une des voies de transduction du signal mise en place par la SnRK est probablement dépendante de l'activité des protéines 14-3-3. La phosphorylation de certains résidus clés des protéines régulées par SnRK1 induirait la fixation de protéines 14-3-3 afin de moduler leur activité.

Une étude récente suggère que des miRNA serait également impliqués dans la transduction du signal dépendant de la voie de signalisation de la SnRK1 (Confraria et al. 2013). La SnRK1 AtKIN10, d'*Arabidopsis* serait également impliquée dans la régulation de l'expression de plus de 1000 gènes (Baena-Gonzalez et al. 2007). Parmi ces gènes, un grand nombre de gènes codent pour des facteurs de transcription et des facteurs de remodelage de la chromatine. Les auteurs ont notés une corrélation positive entre le profil d'expression des gènes régulés par KIN10 et celui des gènes régulés par la carence en sucres (Baena-Gonzalez et al. 2007). En se servant du niveau d'expression d'un gène spécifiquement régulé par les SnRK1 AtKIN10 et AtKIN11, comme témoin de l'activité SnRK1, Baena-Gonzalez et collaborateurs ont déduit que l'activité SnRK1 était également induite par différents stress tels que l'hypoxie ou le traitement par le DCMU (un inhibiteur de la photosynthèse). En revanche la régulation de ce gène n'est pas affectée par la répression de l'expression du gène de l'HXK1. Cela semble indiquer qu'au moins une partie des réponses liées à la voie de la SnRK1 sont indépendante de HXK1.

D'autres études rapportent une implication de la SnRK1 dans la réponse à différents stress biotiques et abiotiques (Confraria et al. 2013). La répression de la SnRK1 par stratégie antisens confère notamment une résistance accru à l'infection par les geminivirus chez *Arabidopsis* (Hao et al. 2003). Chez la pomme de terre, la répression de l'expression de la SnRK1 entraîne une sensibilité accrue au stress salin (Lovas et al. 2003). Un rôle dans la tolérance à l'herbivorie a également été suggéré chez le tabac (*N. atenuata*). Les larves du sphinx du tabac, en se nourrissant des feuilles de la plante, induisent une modification de l'allocation des réserves, favorisant l'accumulation de réserves au niveau des racines au détriment des organes aériens. Ce mécanisme est dépendant de l'inactivation de la sous unité régulatrice β de la SnRK1. Cette modification de l'allocation des réserves augmente la tolérance de la plante vis-à-vis de ce pathogène. L'allocation préférentielles des ressources

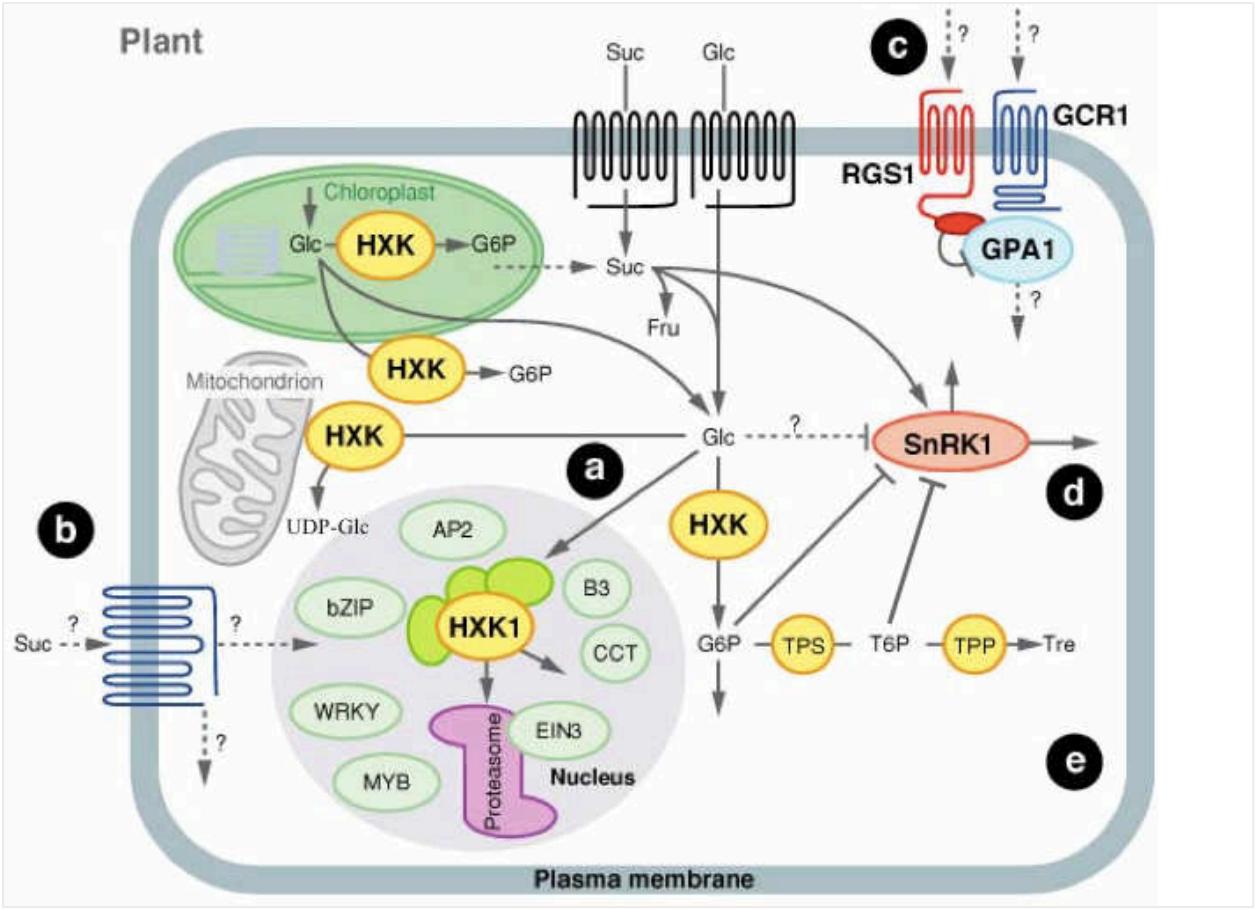


Figure 6 : Modèle illustrant les mécanismes de perception du glucose chez les plantes. (a) Le senseur cytoplasmique du glucose HXK1 est majoritairement associé à la membrane externe de la mitochondrie. HXK1 est également présent au niveau de complexe de haut poid moléculaire dans le noyau où elle contrôle la transcription et la dégradation du facteur de transcription EIN3 par le protéasome. D'autres HXK et hexokinase-like sont également associées à la membrane externe des plastes ou dans le cytosol. Certaines hexokinases sont également localisés dans les chloroplastes. (*b*) Le saccharose (ainsi que d'autres disaccharide) sont perçus au niveau de la membrane plasmique, potentiellement par des homologues de transporteurs. Des transporteurs de monosaccharides pourraient également avoir une fonction similaire de senseurs membranaires. (*c*) Les protéines G couplées aux récepteurs RGS1 et GPA1 sont impliquées dans le contrôle de la germination et du développement de la plantule, potentiellement par une voie indépendante de HXK1. (*d*) Les protéines SnRK1 joue un rôle important dans la signalisation par les sucres et la carence glucidique. (*e*) Le T6P est un signal important impliqué dans la régulation de la croissance de la plante en fonction de son statut glucidique. Il semble agir en inhibant l'activité des protéines SnRK1. Dans le noyau, plusieurs types de facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de la transcription dépendante des sucres.

carbonées au niveau des racines, où elles sont inaccessibles pour le pathogène, permet d'augmenter la proportion des réserves disponibles pour la production des graines à la fin du cycle de vie de la plante (Schwachtje et al. 2006). Chez le riz, la SnRK1 est impliquée dans la régulation du métabolisme permettant la croissance des plantules dans les conditions d'anoxie provoquée par l'immersion des racines dans l'eau (Lee et al. 2009).

La SnRK1 serait également impliqué dans la régulation de la division cellulaire. AtSnRK1 phosphoryle KRP6 et KRP7, 2 homologues de la protéine $p27^{KIP1}$ des mammifères impliquée dans l'inhibition du complexe CDK/cyclines. La phosphorylation de KRP6 semble limiter la capacité de fixation de KRP6 sur le complexe CDK/cycline et permet la progression du cycle cellulaire (Guérinier et al. 2013).

L'existence d'une kinase capable de réguler l'activité de SnRK1 est suggérée par le fait que la protéine LKB1 des mammifères permet d'activer SnRK1 (Polge and Thomas 2007). Chez le riz, la kinase CIPK15 (calcineurin B–like (CBL) – interacting protein kinase) semble impliquée dans l'activation de SnRK1 (Lee et al. 2009). En revanche, le G6P inhibe l'activité de la SnRK1 au niveau d'extraits de feuille d'épinard (Toroser et al. 2000; Zhang et al. 2009). De même, le G1P, le G6P, le T6P, le ribose-5-phosphate (R5P) et le ribulose-5-Phosphate (Ru5P) inhibent l'activité de la SnRK1 chez *Arabidopsis*. Le G1P inhibe son activité d'une manière synergique avec le T6P (Nunes et al. 2012). L'activité d'AtSnRK1 est également inhibée par 2 phosphatase de type PP2C : ABI1 et PP2CA (Rodrigues et al. 2013). Ces 2 phosphatases sont inhibées par la signalisation dépendante de l'ABA. Ce qui indique qu'en plus d'être régulée par les intermédiaires du métabolisme primaire, l'activité de la SnRK peut être spécifiquement activée par l'ABA en conditions de stress.

L'ensemble des acteurs de la signalisation glucidique détaillés précédemment forme un réseau complexe dont les fonctions sont résumées Figure 6.

1.1.6 La voie de signalisation dépendante de la TOR kinase

TOR (Target Of Rapamycin) est une protéine kinase conservée chez tous les organismes eucaryotes. Cette protéine joue un rôle central dans l'intégration des signaux environnementaux et endogènes (statut énergétique et nutritionnel) afin de moduler la croissance et le développement. Chez la levure, TOR est activée dans des conditions favorables afin de stimuler la croissance en maintenant la synthèse des ribosomes, l'initiation de la traduction et l'import des nutriments à un niveau élevé. Chez les mammifères, TOR joue

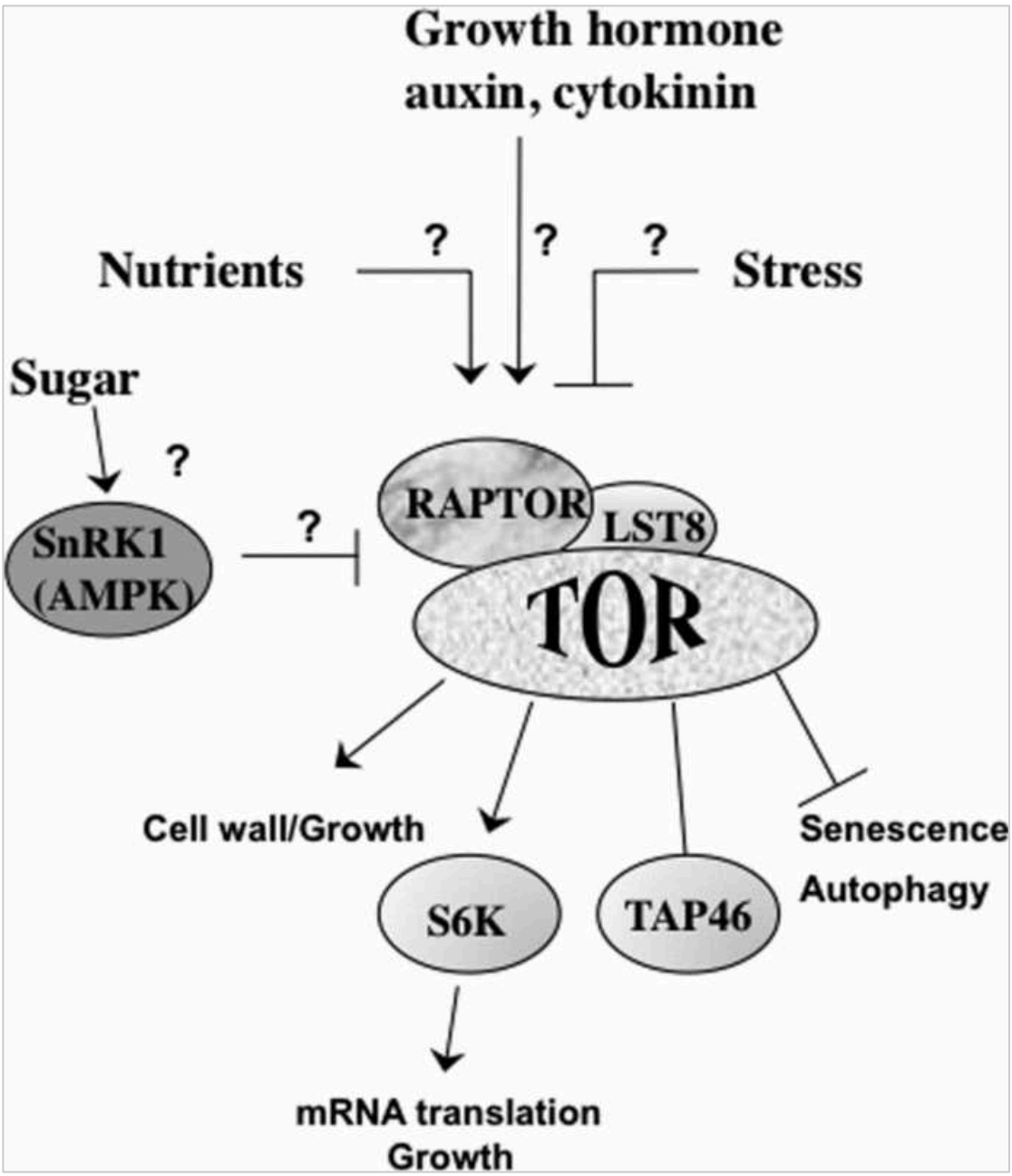


Figure 7 : Modèle de la voie de signalisation dépendante de TOR chez les plantes. Le complexe TORC1 est composé des protéines TOR, RAPTOR et LST8 et participe à la régulation de la croissance, de l'autophagie, de la traduction des ARNm, de la formation des parois cellulaires et du métabolisme en réponse à différents stress et signaux nutritifs et hormonaux (Dobrenel et al. 2011).

également un rôle central au niveau de la transduction des signaux liés aux stress, aux hormones, aux statuts énergétique et nutritionnel dans le contrôle du métabolisme, de la croissance et de la division cellulaire (Xiong and Sheen 2012). Chez les plantes, TOR a une fonction centrale dans la régulation du métabolisme et de la croissance et régule la synthèse des ribosomes et des protéines (Lastdrager et al. 2014).

La protéine TOR est associée aux complexes mTORC1 et 2 chez les mammifères et la levure. Tandis que seul le complexe mTORC1 a pu être identifié chez les plantes. Celui-ci est composé des protéines TOR, RAPTOR (Regulatory-Associated Protein of TOR) et LST8 (Lethal with Sec Thirteen 8) (Dobrenel et al. 2013) (Figure 7).

Chez les plantes la protéine TOR joue un rôle fondamental au cours de l'embryogénèse, de l'activation des méristèmes, de la croissance des feuilles et des racines, de la senescence et de la détermination de la durée de vie (Xiong and Sheen 2014). Les mutants d'insertions dont l'expression de *AtTOR* est éteinte dégénèrent au cours de leur développement embryonnaire (Menand et al. 2002). La protéine AtTOR s'accumule principalement au niveau des tissus présentant une division cellulaire active tels que les pointes racinaires ou les jeunes feuilles (Dobrenel et al. 2011). Ce qui suggère qu'AtTOR pourrait être impliqué dans la stimulation de la croissance et/ou du développement de la plante. AtTOR semble par ailleurs impliquée dans la répression de l'autophagie. En effet, la répression de son expression par stratégie antisens induit un niveau élevée d'autophagie chez les plantes transformées (Liu and Bassham 2010). Une étude s'appuyant sur la répression de l'expression de TOR par l'utilisation de micro ARN interférant inductibles, couplée à une analyse métabolomique témoigne du rôle central de cette protéine dans le contrôle du métabolisme primaire (Caldana et al. 2013). La répression de TOR entraîne un arrêt de la croissance de la plante corrélé à une accumulation d'amidon, de triglycérides, d'acides organiques et de certains acides aminés. L'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la modification des parois et la senescence sont également fortement affectées par la répression d'*AtTOR*.

D'une manière générale, les sucres tendent à induire l'activité de la TOR kinase (Robaglia et al. 2012; Ren et al. 2012; Dobrenel et al. 2013; Lastdrager et al. 2014). Le glucose induit l'activité d'AtTOR, ce qui se traduit par une stimulation de l'activité du méristème racinaire chez *Arabidopsis* (Xiong et al. 2013). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'activité d'AtTOR entraîne une inhibition de la croissance racinaire (Montané and Menand 2013). Suite à son activation par le glucose, AtTOR est directement impliqué

dans la phosphorylation du facteur de transcription e2Fa, ce qui stimule le cycle cellulaire. L'induction du cycle cellulaire par les facteurs de transcription de type e2F est classiquement dépendante de l'activation de ces facteurs de transcription par la cascade de signalisation CYC-CDK-RBR (cyclin - cyclin-dependent kinase - retinobastoma-related protein). Or l'activation de e2Fa par TOR liée au signal « glucose » est indépendante de cette cascade de signalisation (Xiong et al. 2013).

AtTOR interagit avec la protéine RAPTOR qui est impliqué dans la régulation de l'activité de la protéine kinase S6K1 (Mahfouz et al. 2006). Chez les mammifères S6K est une cible de mTOR et phosphoryle la protéine RBS6 de la sous unité ribosomique 40S, ce qui se traduit par une induction de la traduction des ARNm et de la croissance cellulaire (Iadevaia et al. 2012; Laplante and Sabatini 2012). Chez Arabidopsis, S6K1 réprime l'activité du cycle cellulaire en phosphorylant la protéine RBR (RetinoBlastoma-Related) dans des conditions défavorables (Henriques et al. 2010). D'une manière intéressante, il a été suggéré que RBR serait impliqué dans la transition de l'hétérotrophie vers l'autotrophie des plantules d'Arabidopsis. Tandis que le saccharose à un effet antagoniste vis-à-vis de l'action de la protéine RBR. Le contrôle de cette transition passe par une inhibition des gènes liés au cycle cellulaire et une inactivation des gènes liés au développement embryonnaire tardif par une augmentation de la triméthylation au niveau de la lysine de l'histone H3 : H3K27 (Gutzat et al. 2011).

Un rôle central de la protéine TOR au niveau de l'induction de la biosynthèse et de l'activité des ribosomes ainsi que de la traduction des ARNm est suggéré par Deprost et collaborateur (Deprost et al. 2007). Les auteurs ont en effet observés une corrélation entre le niveau d'expression d'AtTOR et l'accumulation des polysomes chez des plantes d'*Arabidopsis* affectés au niveau de l'expression de la protéine TOR (Deprost et al. 2007).

1.2 Les transporteurs de sucres chez les végétaux supérieurs

Les plantes chlorophylliennes sont des organismes autotrophes, capables de réduire le carbone inorganique du CO_2, en tirant partie de l'énergie lumineuse captée par des pigments (chlorophylles, caroténoïdes), afin de générer des sucres. Une partie des photoassimilats produits par les organes sources est utilisée afin d'assurer leurs besoins énergétiques et carbonés, une autre partie est stockée et/ou exportée vers les organes puits. Etant donné la

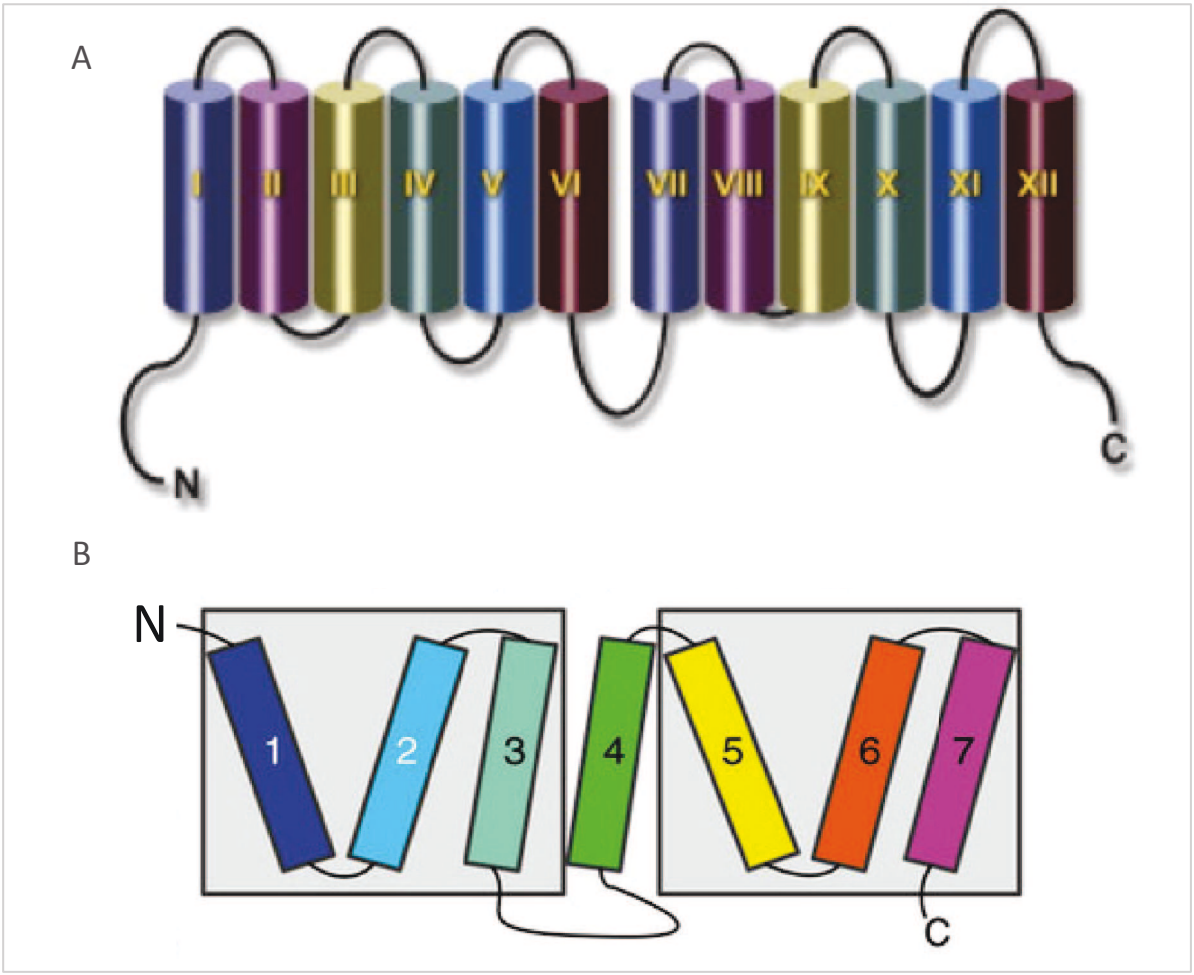


Figure 8 : Structures types des transporteurs de la superfamille de la MSF (A) et de la famille des SWEET (B). Les transporteurs de la MSF sont caractérisés par 12 hélices α transmembranaires reliés par 11 boucles tandis que les SWEET sont caractérisés par 7 hélices α transmembranaires reliés par 6 boucles. Adapté de (Sauer 2007) et (Jaehme et al. 2014).

faible capacité de diffusion des sucres à travers les membranes cellulaires, le transport des sucres de cellule à cellule peut s'effectuer de 2 manières : au travers des plasmodesmes ou grâce à l'action de transporteurs membranaires. Les plasmodesmes permettent de connecter les cytoplasmes de cellules adjacentes afin de former un continuum cytoplasmique appelé symplasme. Cependant certains tissus ou cellules sont isolés symplastiquement des tissus/cellules adjacentes. Le transport des sucres au niveau de ses tissus/cellules isolés symplastiquement nécessite des transporteurs de sucres. Les transporteurs de sucres sont également nécessaires au transport des sucres entre les différents compartiments subcellulaires. Parmi les étapes nécessitant l'action des transporteurs de sucres, il est possible de citer : l'export des produits de la photosynthèse du chloroplaste vers le cytosol des cellules photosynthétiques, le chargement du saccharose et/ou des polyols au niveau du phloème collecteur pour leur transport à longue distance depuis les organes sources jusqu'aux organes puits chez les espèces dont le chargement du phloème est apoplastique. Ou encore la gestion dynamique de la compartimentation cellulaire des sucres à travers leur stockage et leur remobilisation au niveau des vacuoles. La diversité de forme des sucres synthétisés chez les végétaux, associée à la multitude de fonctions biologiques auxquelles ils participent au niveau des différents organes et compartiments subcellulaires, est corrélée à la forte diversité de transporteur de sucres identifiés. Deux grands types de transporteurs de sucres ont été caractérisées chez les plantes : les transporteurs appartenant à la superfamille « Major Facilitator Superfamily » (MFS) et ceux appartenant à la famille « Sugar Will Eventually be Exported Transporters » (SWEET).

1.2.1 La Major Facilitator Superfamily

La Major Facilitator Superfamilly (MFS) comprend 8 sous-familles de transporteurs de sucres, regroupées en deux grandes familles : les transporteurs de disaccharides, principalement responsable du transport du saccharose et les transporteurs de monosaccharides responsable du transport d'un large panel de monosaccharides. La majorité de ces transporteurs sont constitués de deux unités de six hélices α transmembranaires, liées par une boucle centrale cytoplasmique (Nelissen et al. 1997) (Figure 8). Au vu de la forte homologie entre les deux unités de six hélices, il a été suggéré que leur structuration pourrait résulter d'une ou plusieurs duplications géniques en tandem (Saier 2000). La MFS représente une grande famille de transporteurs composée de 53 membres chez *Arabidopsis* et 59 chez la

Vigne (Afoufa-Bastien et al. 2010; Slewinski 2011). De même que chez *Arabidopsis*, les transporteurs de monosaccharides appartenant à la MFS sont également formés de 2 grandes sous-familles multigéniques : les STP/HT et les ERD6-like ainsi que de 5 plus petites sous familles (TMT, PMT, INT, VGT, pGlcT).

1.2.1.1 Les transporteurs de disaccharides (SUT/SUC)

Les transporteurs de disaccharides constituent des petites familles multigénique chez toutes les espèces étudiées (Sauer 2007). Ils transportent majoritairement le saccharose, mais sont également susceptibles de transporter le maltose et des β glucosides (Reinders et al. 2012). A l'exception de 3 Sucrose Facilitators (SUF) responsables du transport bidirectionnelle du saccharose d'une manière indépendante du pH chez *Pisum sativum* et *Phaseolus vulgaris* (Zhou et al. 2007), l'ensemble des SUC caractérisés fonctionnellement sont des symporteurs saccharose/H^+ présentant une stœchiométrie sucre : proton de 1 : 1 (Kühn and Grof 2010). Les dernières classifications font états de 5 groupes (SUT1-5) (Braun and Slewinski 2009; Kühn and Grof 2010) même si cette classification ne fait pas l'unanimité (Reinders et al. 2012).

Les transporteurs du groupe SUT1, spécifiques des dicotylédones, présentent une forte affinité pour le saccharose (Km compris entre 0,07 et 2 mM) (Kühn and Grof 2010) et sont exprimés au niveau de la membrane plasmique des cellules compagnes et/ou des tubes criblés (Stadler et al. 1995; Stadler and Sauer 1996; Kühn et al. 1997; Barker et al. 2000; Weise et al. 2000; Voitsekhovskaja et al. 2006). Ces transporteurs sont principalement impliqués dans le chargement du phloème (Riesmeier et al. 1994; Stadler et al. 1995; Kühn et al. 1997) ainsi que dans la récupération du saccharose s'échappant du phloème au cours du transport à longue distance (Srivastava et al. 2009) et probablement dans le transport du saccharose au niveau des organes puits (Sauer 2007).

Des transporteurs du clade SUT2 ont été identifiés à la fois chez les monocotylédones et les dicotylédones. Initialement décrits comme dépourvu d'activité de transport, un rôle de senseur membranaire du saccharose leur a été attribué (Barker et al. 2000). Cependant aucune donnée fonctionnelle ne vient étayer cette hypothèse qui fait l'objet de débats (Eckardt 2003).

Le clade SUT3 est spécifique des monocotylédones, bien qu'éloigné du clade SUT1 d'un point de vue phyllogénétique, les transporteurs de type SUT3 semblent jouer un rôle

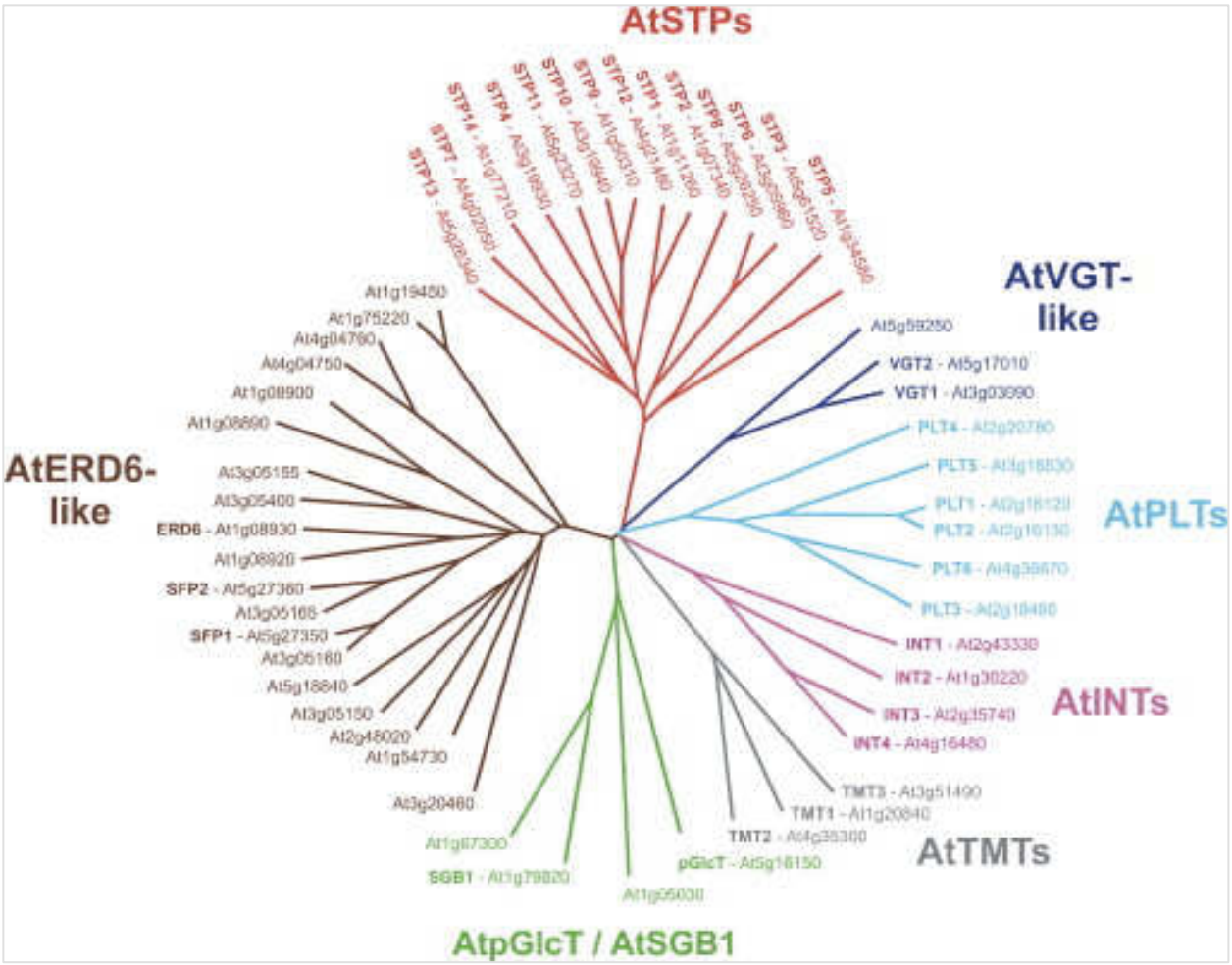


Figure 9 : Arbre phylogénétique représentant les 7 familles de transporteurs de monosaccharides identifiés chez Arabidopsis (Büttner 2007)

analogue à celui des transporteurs du clade SUT1 identifiés chez les dicotylédones (Ishimaru et al. 2001; Sauer 2007; Slewinski et al. 2009; Kühn and Grof 2010; Doidy et al. 2012).

Les transporteurs du clade SUT4 caractérisés à l'heure actuelle présentent une faible affinité pour le saccharose (Km compris entre 8 et 20 mM) (Kühn and Grof 2010). Ils ont été majoritairement localisés au niveau du tonoplaste et participe à l'efflux du saccharose de la vacuole vers le cytoplasme (Endler et al. 2006; Neuhaus 2007; Reinders et al. 2008; Eom et al. 2011; Frost et al. 2012). Certains membres de ce clade ont cependant été également localisés au niveau du chloroplaste (Rolland et al. 2003) et de la membrane plasmique (Chincinska et al. 2008). Ces transporteurs sont probablement impliqués dans la régulation de la compartimentation subcellulaire du saccharose.

Le clade SUT5 antérieurement regroupé avec le clade SUT3 est spécifique des monocotylédones. Aucun transporteur de ce clade n'a été caractérisé fonctionnellement à ce jour.

1.2.1.2 Les transporteurs de monosaccharides

Les transporteurs de monosaccharides constituent des familles multigéniques importantes, chez *Arabidopsis* 53 gènes codants des transporteurs de monosaccharides ont été identifiés. Une analyse phylogénétique a permis de regrouper ces 53 gènes en 7 sous familles, 2 grandes : les AtSTP et AtERD6-like ainsi que 5 petites : les AtVGT, AtTMT, AtpGlcT, AtPMT et AtINT (Figure 9).

1.2.1.2.1 La sous famille des STP/HT (Sugar Transport Protein/Hexose Transporter)

Les STP constituent la sous famille de transporteurs d'hexoses la plus étudiée chez *A. thaliana*. La majorité des STP identifiés à l'heure actuelle sont localisés au niveau de la membrane plasmique et catalysent l'influx d'hexose depuis l'apoplaste vers le cytosol (Truernit et al. 1999; Büttner and Sauer 2000; Scholz-Starke et al. 2003; Schneidereit et al. 2003; Schneidereit et al. 2005; Büttner 2010). Les STP caractérisés présentent une large spécificité de substrats, étant capable de transporter le glucose, le galactose, le xylose et des analogues du glucose tels que le mannose et le 3OMG. Seuls STP9 et STP14 transportent

spécifiquement le glucose et le galactose respectivement (Schneidereit et al. 2003; Poschet et al. 2010). A l'exception de STP3 qui est exprimé au niveau de tissues chlorophylliens et qui présente une affinité relativement faible pour le glucose, tous les STP identifiés sont des transporteurs d'hexoses préférentiellement exprimés au niveau d'organes puits et dotés d'une forte affinité vis-à-vis de leur substrats (Km de l'ordre du µM). Ces observations suggèrent que les STP sont impliqués dans le développement des organes puits (Büttner and Sauer 2000). Chez la vigne, des hexoses s'accumulent en très forte concentration (jusqu'à 1 M) au niveau de la baie au cours de son développement. Aussi, un intérêt particulier a été apporté à l'identification des transporteurs de monosaccharides exprimés dans la baie. Six séquences d'ADNc codant pour des transporteurs de monosaccharides ont été clonées à partir de baies provenant de différents cultivars de vigne : Chardonnay, Pinot noir et Ugni blanc (Fillion et al. 1999; Vignault et al. 2005; Glissant 2005; Hayes et al. 2007). Ces transporteurs de monosaccharides ont été nommés VvHT1-6. L'incapacité à cloner d'autres ADNc codant des transporteurs de monosaccharides suggère que parmi les 59 transporteurs putatifs nouvellement identifiés (Afoufa-Bastien et al. 2010), VvHT1-6 sont probablement les plus exprimés et ont un rôle prépondérant au cours du développement de la baie.

VvHT1 est le transporteur de monosaccharides le plus étudié chez la vigne. Son activité a été caractérisée chez la levure. Il s'agit d'un transporteur d'hexose à forte affinité pour le glucose (Km = 70 µM) présentant une spécificité de substrats relativement large, puisqu'il est également capable de transporter le galactose, le xylose et le 3-o-méthylglucose (Vignault et al. 2005; Lecourieux et al. 2013). Il a été décrit comme présentant 2 pics d'expression génique au niveau de la baie, un premier après la nouaison et un second en fin de maturation (Fillion et al. 1999). Cependant certaines études indiquent que l'expression de *VvHT1* diminue rapidement au cours du développement de la baie (Hayes et al. 2007; Deluc et al. 2007). La protéine VvHT1 ne semble d'ailleurs être détectable qu'aux stades précoces du développement de la baie (Conde et al. 2006). Atanassova et collaborateurs ont rapportés une expression préférentielle du gène GUS sous le contrôle du promoteur de *VvHT1* au niveau des organes puits (jeune feuille, racine, tige) chez des plantes de tabac transformées avec la construction *pVvHT1-GUS* (Atanassova et al. 2003). En revanche, trois autres études rapportent que chez la vigne, l'expression de *VvHT1* est plus importante au niveau des feuilles matures que des jeunes feuilles (Hayes et al. 2007; Afoufa-Bastien et al. 2010; Zeng et al. 2011). L'analyse de son niveau d'expression par macroarray et northern blot indique que *VvHT1* est principalement exprimé au niveau des organes végétatifs (feuille, tige, vrille,

racine) et plus faiblement exprimé au niveau de la baie aux différents stades de développements. Une analyse de sa localisation tissulaire réalisée par hybridation *in situ* indique que *VvHT1* est préférentiellement exprimé au niveau des tissus conducteurs du phloème de la feuille, du pétiole et de la baie. La localisation de la protéine VvHT1 étudiée par immunomarquage sur coupe de baie révèle que celle-ci est plus précisément localisée au niveau de la membrane plasmique à l'interface entre les cellules compagnes et les cellules du tube criblé (Vignault et al. 2005). L'ensemble de ces observations suggère que VvHT1 serait impliqué dans la récupération du glucose présent en faible concentration au niveau de l'apoplaste des cellules compagne et des cellules des tubes criblés. Le glucose présent au niveau de l'apoplaste de ces cellules pourrait être issu des processus de remodelage de la paroi cellulaire ou de l'hydrolyse apoplastique du saccharose s'échappant du complexe conducteur du phloème.

VvHT2 a été identifié en même temps que VvHT1 (Fillion et al. 1999) mais n'a pas encore été caractérisé fonctionnellement. Son expression est régulé au cours du développement de la baie : initialement faible, elle est induite au stade de la véraison et reste relativement élevée au cours de la maturation de la baie (Fillion et al. 1999; Glissant 2005; Hayes et al. 2007; Afoufa-Bastien et al. 2010).

VvHT3 est fortement exprimé dans l'ensemble des organes végétatifs de la vigne (Feuille jeune et mature, racine, vrille, tige) ainsi que dans la baie et la graine (Afoufa-Bastien et al. 2010). De plus son expression est induite au cours du développement de la feuille et de la graine (Hayes et al. 2007; Afoufa-Bastien et al. 2010).

VvHT5 est un transporteur d'hexose adressé à la membrane plasmique et présentant une forte affinité pour le glucose (Km = 89µM) (Hayes et al. 2007). Le transport du glucose lié à l'expression ectopique de *VvHT5* chez la levure est inhibé compétitivement par le fructose, ce qui suggère que VvHT5 est capable de transporter le glucose tout comme son orthologue AtSTP13 (Nørholm et al. 2006; Hayes et al. 2007). *VvHT5* est préférentiellement exprimé au niveau de la feuille mature et de la graine et semble induit au cours du développement de la graine (Afoufa-Bastien et al. 2010). Il est en revanche faiblement exprimé au niveau des feuilles jeunes et de la baie (Hayes et al. 2007; Afoufa-Bastien et al. 2010). Il est en outre induit au niveau de la feuille de vigne en réponse à l'infection par des agents biotophes et nécrotrophes, à la blessure ainsi qu'à un traitement exogène par l'ABA (Afoufa-Bastien 2010; Hayes et al. 2010). Hayes et collaborateurs suggèrent que l'induction

de *VvHT5*, en parallèle de celle de l'invertase pariétale *VvCwINV*, serait impliquée dans la stimulation de la force de puits en réponse aux stress et que ce processus est sous le contrôle de l'ABA (Hayes et al. 2010).

1.2.1.2.2 Les transporteurs vacuolaires (TMT, ERD6-like, VGT)

Les TMT (Tonoplaste Monosaccharides Transporter) représentent une petite sous famille de transporteurs d'hexoses tonoplastiques comprenant trois membres chez *Arabidopsis* (AtTMT1, AtTMT2 et AtTMT3). AtTMT1 et AtTMT3 sont localisés au niveau de la vacuole (Wormit et al. 2006). AtTMT1 et AtTMT2 sont des antiporteurs H^+/glucose, mais sont également capables de transporter le saccharose (Schulz et al. 2011). Ces transporteurs constituent les seuls antiporteurs Saccharose / H^+ identifiés à ce jour. Ils jouent donc probablement un rôle primordial en permettant l'influx du saccharose depuis le cytosol vers la vacuole contre son gradient de concentration.

La sous famille des ERD6-like (Early Response to Dehydration 6 – like) regroupe l'ensemble des homologues du gène AtERD6, codant un transporteur de sucre putatif induit en réponse au stress hydrique et au froid (Kiyosue et al. 1998). Un membre de cette sous famille, AtESL1 a été caractérisé comme un transporteur de monosaccharide de type facilitateur localisé au niveau du tonoplaste et présentant une faible affinité pour le glucose. Celui-ci est préférentiellement exprimé au niveau du péricycle et du parenchyme xylémien et est induit en réponse aux stress hydrique et salin (Yamada et al. 2010). Il a également été suggéré qu'un autre transporteur putatif de cette sous-famille, *AtSFP1* jouerait un rôle dans le processus de sénescence (Quirino et al. 2001). La fonction biologique de ces transporteurs reste cependant largement méconnue. Chez la vigne en particulier, aucun ERD6-like n'a été caractérisé fonctionnellement à l'heure actuelle.

Les VGT (Vacuolar Glucose Transporter) représentent une petite sous famille de transporteurs d'hexoses composée de 3 membres chez Arabidopsis : *AtVGT1*, *AtVGT2* et *AtVGT3*. AtVGT1 et AtVGT2 sont tous deux adressés au tonoplaste et il a été démontré qu'AtVGT1 transporte le glucose et le fructose suivant un mécanisme de type antiport sucre / H^+ (Aluri and Büttner 2007). Ce transporteur permet l'import du glucose et du fructose dans la vacuole et joue probablement un rôle important dans la compartimentation cellulaire de ces hexoses.

Les transporteur chloroplastiques : pGlcT (Platidic Glucose Transporter).

Cette sous famille est constituée des homologues du transporteur de glucose putatif pGlcT d'Epinard localisé au niveau de la membrane interne du chloroplaste (Weber et al. 2000). Chez *Arabidopsis*, AtpGlcT1 contribue à l'export des produits de dégradation de l'amidon, du chloroplaste vers le cytoplasme (Cho et al. 2011). En revanche, chez d'autres espèces (olive, abricot, tomate, pin et maïs) des homologues de *pGlcT* sont exprimés au niveau de tissus hétérotrophes (Fischer and Weber 2002). Cela suggère que la localisation des pGlcT au niveau du chloroplaste et sa fonction associée ne sont vraisemblablement pas commune à l'ensemble des transporteurs de cette sous famille.

1.2.1.2.3 Les sous familles des PMT (Polyol/Monosaccharide Transporter) et des INT (Inositol transporter)

Ces deux sous familles restent relativement peu étudiées. Les PMT identifiés chez *A. thaliana* sont adressés à la membrane plasmique. Les PMT caractérisés fonctionnellement sont des symporteurs monosaccharides / H^+ présentant une large spécificité de substrats capables de transporter le glucose, le fructose, le xylose, le galactose, le xylitol et le sorbitol (Klepek et al. 2005; Reinders et al. 2005; Klepek et al. 2009). Ils sont supposés jouer un rôle important dans le chargement des polyols au niveau du phloème chez les espèces transportant les polyols à longue distance (Slewinski 2011). En revanche leurs fonctions biologiques restent obscures chez des espèces telles qu'*Arabidopsis* favorisant le transport à longue distance du saccharose et caractérisées par une faible production de polyols (Doidy et al. 2012). Chez ces espèces, les PMT jouent probablement un rôle dans la récupération des monosaccharides autres que les polyol depuis l'apoplaste.

Les INT sont caractérisés par leur forte homologie vis-à-vis des transporteurs de myo-inositol humain et de levure. Quatre séquences de transporteurs putatifs de cette sous-famille ont été identifiées chez *Arabidopsis* mais seules 3 codent pour des protéines fonctionnelles. AtINT2 et 4 sont adressés à la membrane plasmique et AtINT2 est adressé au tonoplaste. Ces transporteurs présentent une forte affinité pour le myo-inositol et fonctionnent en symport H+ / myo-inositol (Schneider et al. 2006; Schneider et al. 2007; Schneider et al. 2008). Le myo-inositol constitue un précurseur de composés de la paroi cellulaire et de réserves au niveau de la graine ainsi que de composés impliqués dans la signalisation des phospholipides (Loewus

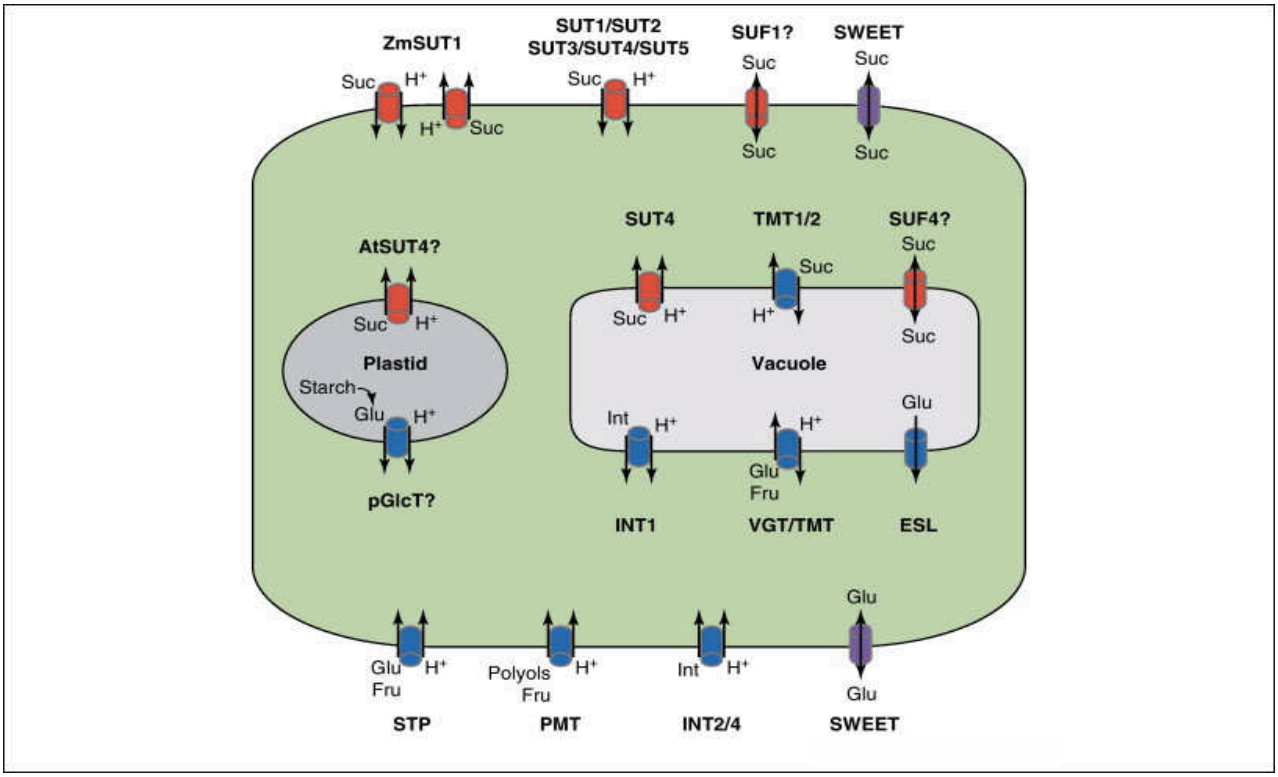


Figure 10 : Modèle de la localisation subcellulaire des transporteurs de sucres chez les plantes. Trois familles de transporteurs sont impliquées dans la compartimentation des sucres à l'intérieur de la cellule (saccharose sur la partie supérieure et hexoses sur la partie inférieure) : SUT (en rouge), MST (en bleu) et SWEET (en violet). Au niveau de la membrane plasmique, la plupart des transporteurs ont été caractérisés comme des importeurs H^+/sucre. En revanche, les SWEET et les SUF sont des facilitateurs responsable de l'import ou de l'export des sucres suivant leur gradient de concentration. Les VGT et TMT sont des antiporteurs H^+/sucre permettant d'importer les sucres dans la vacuole tandis que les protéines de la sous famille des ERD6–like sont probablement impliqués dans l'efflux de sucres de la vacuole. Deux autres familles pourraient également être impliquées dans l'efflux de sucres depuis les plastes, SUT4 et les transporteurs de la sous-famille des pGlcTs. Enfin les Transporteurs de la sous-famille des INT sont localisés à la fois au niveau de la membrane plasmique et du tonoplaste, ils transportent le myo-inositol, un précurseur d'un grand nombre de voies métaboliques. (Doidy et al. 2012)

and Murthy 2000; Munnik and Testerink 2009). Le myo-inositol est également capable d'interagir avec les auxines pour former un complexe non réactif, il est donc supposé jouer un rôle dans la modulation du signal auxinique (Nowacki and Bandurski 1980; Aki et al. 2007)

1.2.2 La famille des SWEET

Les SWEET représente une famille de transporteurs de sucres identifiés récemment (Chen et al. 2010). Ces transporteurs ont été identifiés grâce à l'utilisation d'un nanosenseur de sucres (saccharose et glucose) permettant de détecter de faible variation de la concentration intracellulaire en sucres. Cette technologie est basée sur l'utilisation du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Une construction chimérique constituée d'un senseur de sucres et de deux fluorofores (un donneur et un accepteur) est utilisée. Le changement conformationnel du senseur au contact du sucre modifie le transfert d'énergie entre les deux fluorofores. Ce changement peut alors être mesuré avec précision par spectrométrie.

Ces transporteurs forment une relativement petite famille de 17 membres chez *A.thaliana*. Une analyse phyllogénétique indique que cette famille compterait 16 membres putatifs chez la vigne (Lecourieux et al. 2013). Leur structure diffère singulièrement de celle des transporteurs de la grande famille des MSF. Les SWEET sont composés de 7 hélices transmembranaires issues d'une duplication d'un motif de 3 hélices α liés par une 7ème hélice (Figure 8). Cette différence structurale implique une différence fondamentale dans le fonctionnement des SWEET et des transporteurs de la MSF. Les SWEET dont l'activité est indépendante du gradient de pH, fonctionnent en tant qu'uniporteurs bidirectionnels suivant un mécanisme de type « diffusion facilitée ». Ces transporteurs présentent une faible affinité pour le glucose (AtSWEET 1, 4, 5, 7, 8, 13) ou pour le glucose et le saccharose (AtSWEET 9-15) (Chen et al. 2010; Chen et al. 2012). Ils pourraient participer à une étape clé du chargement apoplasmique du saccharose en permettant l'export du saccharose depuis les cellules compagnes et des tubes criblés vers l'apoplasme du phloème collecteur et semblent également impliqués dans la réponse aux stress biotiques (Chen et al. 2010) (Chen et al. 2010).

Un modèle résumant la localisation et les spécificités fonctionnelles des différents transporteurs de sucre a été proposé récemment par Doidy et al. (2012) (Figure 10).

1.2.3 Régulation des transporteurs de sucres

1.2.3.1 Régulation des transporteurs de sucres au cours du développement

L'expression des transporteurs de disaccharides AtSUC2 et StSUT1 sont induits au niveau des jeunes feuilles au cours de la transition de l'état feuille-puits à l'état feuille-source (Riesmeier et al. 1993; Truernit and Sauer 1995). L'induction de ces transporteurs semble liée à la mise en place de l'export de saccharose des feuilles vers le phloème collecteur. Les transporteurs de monosaccharide et de disaccharide VfSTP1 et VfSUT1 sont induits au cours de la germination chez la fève (*Vicia faba*) (Weber et al. 1997). Ils sont probablement impliqués dans la remobilisation des réserves des cotylédons afin d'initier le développement de la plantule. AtSTP2 et AtPMT1, deux transporteurs de monosaccharides sont induit au cours de la maturation et de la germination du grain de pollen chez *Arabidopsis* et le pétunia (Pétunia X Hybrida) respectivement (Ylstra et al. 1998; Truernit et al. 1999). Le transporteur de monosaccharides *AtVGT1* est également induit au cours du développement de la fleur et de la graine chez Arabidopsis (Aluri and Büttner 2007). Plusieurs observations indiquent une implication de la régulation des transporteurs de sucres au cours de la sénescence. L'expression du gène *AtSFP1* est induite au cours de ce processus (Kiyosue et al. 1998). *AtSFP1* est un gène codant un transporteur de la sous-famille des ERD6-like. Les ERD6-like dont la localisation est connue sont adressés au tonoplaste, ils participeraient à l'export du glucose de la vacuole vers le cytosol suivant un mécanisme de type diffusion facilitée (Yamada et al. 2010; Poschet et al. 2010; Poschet et al. 2011). De plus la surexpression de ERDL6 chez *Arabidopsis* induit une forte diminution de la teneur en glucose au niveau des cellules des feuilles (Poschet et al. 2011). AtSWEET15/SAC29 est également induit lors de la sénescence (Quirino et al. 2001; Slewinski 2011). Les SWEET participent à l'export du glucose et/ou du saccharose de la cellule en facilitant leur diffusion suivant leur gradient de concentration (Chen et al. 2012). L'ensemble de ces observations suggèrent que l'induction d'AtSFP1 et d'AtSWEET15 au cours de la senescence serait suceptible de participer à l'export le glucose de la vacuole puis de la cellule, afin de remobiliser les réserves glucidiques stockées au niveau des tissus sénescents avant qu'ils ne se nécrosent. Le gène du transporteur AtSTP13 est également induit au cours de la senescence. Ce transporteur participe à l'import du glucose dans la cellule et pourrait être impliqué dans les mécanismes précoces de la mise en place de la mort cellulaire programmée au niveau des tissus sénescent (Nørholm et al. 2006).

1.2.3.2 Régulation en réponse aux stress biotiques et abiotiques

Différentes contraintes abiotiques telle que les stress hydrique, salin et au froid induisent une augmentation de la concentration en sucres solubles au niveau des tissus de la plante. Cette augmentation est supposée participer à la stabilisation des membranes et à un ajustement osmotique (Slewinski 2011). La réponse de la plante à ces contraintes passe par la régulation de l'expression de différents transporteurs de monosaccharide et de disaccharide (Slewinski 2011). Le stress hydrique induit notamment l'expression de transporteur de sucres vacuolaires de la sous famille des ERD6-like (AtSFP1 et AtESL1), des SUC/SUT (VvSUC11 – localisation vacuolaire putative – et PtaSUT4) et des TMT (AtTMT1 et 2) (Kiyosue et al. 1998; Wormit et al. 2006; Yamada et al. 2010; Medici et al. 2014). La régulation de la compartimentation subcellulaire des sucres semble jouer un rôle important dans la réponse de la plante aux stress hydriques. Des transporteurs de sucres localisés au niveau de la membrane plasmique sont également induit en réponse à la contrainte hydriques, tels que les transporteurs de la sous famille des STP, VvHT1 et VvHT5 chez la vigne ou de la sous-famille des SUC tel que AgSUT1 chez le céleri (Noiraud et al. 2000; Medici et al. 2014). L'expression d'AtTMT1-2 et d'AgSUT1 est également régulée en réponse aux stress salin (Noiraud et al. 2000; Wormit et al. 2006). AtSFP1 et AtTMT1-2 sont induit en réponse au stress au froid (Kiyosue et al. 1998; Wormit et al. 2006). Certains transporteurs de la famille des SWEET (SWEET4,5,7,8,10,12,15,17) et de la sous-famille des STP (STP4,12,13) sont régulés en réponse aux stress biotiques (Truernit et al. 1996; Hofmann et al. 2009; Chen et al. 2010; Lemonnier et al. 2014).

1.2.3.3 Différents niveaux de régulation des transporteurs de sucres

Les mécanismes impliqués dans la régulation des différents transporteurs de sucres restent relativement méconnus. Un certain nombre d'études indique que la régulation des transporteurs de sucres s'effectue au niveau transcriptionnel et au niveau post transcriptionnel (Williams et al. 2000). La régulation de l'activité des transporteurs peut aussi s'exercer à un niveau post traductionnel par la phosphorylation/déphosphorylation de la protéine (Roblin et al. 1998; Nühse et al. 2004; Niittylä et al. 2007).

Un autre type de régulation post traductionnel est liée à l'interaction du transporteur avec une protéine régulant son activité. AtSUC6 par exemple interagit avec la protéine régulatrice 14-3-3 (Shin et al. 2011). Les protéines de type 14-3-3 ciblent généralement les

protéines phosphorylées au niveau de résidus spécifiques, ce qui indique qu'AtSUC6 est probablement phosphorylé (Krügel and Kühn 2013). Le transporteur StSUT1 de la pomme de terre interagit avec la grande sous-unité de l'AGPase, ce qui suggère une régulation directe de l'activité du transporteur en fonction de l'activité métabolique de la cellule (Krügel et al. 2012). La formation d'homodimère ou d'hétérodimère est également un mécanisme susceptible de moduler l'activité des transporteurs. Le transporteur d'Arabidopsis, AtSUC2, est notamment capable d'interagir avec AtSUC3 et AtSUC4 (Reinders et al. 2002; Schulze et al. 2003).

Des études récentes suggèrent qu'une composante importante de la régulation des transporteurs de sucre pourrait être associée à leur localisation au niveau de radeaux lipidique (Doidy et al. 2012). Les radeaux lipidiques constituent des petits domaines membranaires enrichis en sterols et sphingolipides (Pike 2006). L'association de certains transporteurs de sucre au niveau des radeaux lipidiques semble influencer leur activité de transport, leur localisation au niveau de la membrane et leur recyclage (Doidy et al. 2012).

1.2.3.4 Régulation des transporteurs de sucres par les sucres

Parmi les signaux impliqués dans la régulation des transporteurs de sucres, les sucres eux-mêmes semblent jouer un rôle prépondérant. L'analyse *in silico* des séquences promotrices des transporteurs de sucres de la vigne indique l'existence de nombreux motifs de réponse aux sucres (Afoufa-Bastien et al. 2010). Les promoteurs de VvHT1 et VvHT8 présentent 9 motifs de réponse aux sucres, VvSUC11 et VvSUT2 : 8 motifs et VvHT5, VvTMT3 et VvPMT5 : 7 motifs. Plusieurs études de transcriptomique indiquent que des membres de la sous famille des STP sont régulés par les sucres (Price et al. 2004; Villadsen and Smith 2004). *AtSTP1*, *4*, *13* et *14* sont notamment fortement inhibés par le glucose (Büttner and Sauer 2000; Price et al. 2004). L'expression de *VvHT1* est régulée par le glucose et le saccharose (Atanassova et al. 2003; Conde et al. 2006). Le glucose inhibe l'expression de *VvHT1* par la voie dépendante de HXK1, une régulation au niveau de la protéine semble également exister. Celle-ci serait en revanche indépendante de la signalisation par HXK1 (Conde et al. 2006). Le glucose inhibe également l'activité des symporteurs monosaccharide/H^+ chez une suspension cellulaire d'olive (*Olea europea*) (Oliveira et al. 2002). De même, l'absorption du sorbitol au niveau des bourgeons de pêchers (*Prunus persica*) est inhibée par le glucose *via* une voie de signalisation dépendante d'HXK1 (Maurel

et al. 2004). L'expression des transporteurs de disaccharides du riz (*Oriza sativa*) *OsSUT1* et du maïs (*Zea mays*) *ZmSUT1* est, en revanche induite par le saccharose (Aoki et al. 1999; Matsukura et al. 2000). Tandis que les transporteurs de la betterave (*Beta vulgaris*) *BvSUT1* et de la fève (*Vicia faba*) *VfSUT1* sont inhibés par le saccharose (Weber et al. 1997; Chiou and Bush 1998; Vaughn et al. 2002; Ransom-Hodgkins et al. 2003). La concentration en sucres semble également importante puisque l'expression du transporteur *VfSUT1* est inhibé par une forte concentration en glucose et en saccharose (150 mM) mais pas par une concentration plus faible (10 mM) (Weber et al. 1997).

Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression et de l'activité des transporteurs de sucres restent largement méconnues. Les études de (Maurel et al. 2004; Conde et al. 2006) suggèrent l'implication de HXK1 dans la régulation de l'activité de certains transporteur de monosaccharides. Une étude récente indique cependant qu'*AtSTP1* est induit par la carence en sucres et inhibé par le glucose d'une manière indépendante de HXK1. L'inhibition d'*AtSTP1* par le glucose nécessite cependant la phosphorylation du glucose (Cordoba et al. 2014). La SnRK1 pourrait également être impliquée dans la régulation de certains transporteurs. En effet, la surexpression de la sous-unité catalytique de la SnRK1, AtKIN10 affecte l'expression du gène *AtSTP1* (Baena-Gonzalez et al. 2007). Cependant, Cordoba et collaborateur n'ont pas observés d'effet marqué de la surexpression d'AtKIN10, sur l'inhibition d'AtSTP1 par le glucose (Cordoba et al. 2014). L'expression de *VvHT1* est régulée par l'ASR (ABA Stress Ripening) de la vigne VvMSA (Çakir et al. 2003). L'expression de VvMSA est elle-même régulée par le glucose (Saumonneau et al. 2012), ce qui pourrait indiquer un rôle des ASR dans la régulation des transporteurs de sucre, par les sucres. Plusieurs études confortent l'idée que les protéines ASR pourraient être impliquées dans la régulation des transporteurs de sucres par les signaux glucidiques (Frankel et al. 2007; Dominguez et al. 2013)

1.3 Les protéines ASR (ABA Stress Ripening)

1.3.1 Identification des ASR

Le 1er gène *ASR* a été identifié chez la tomate (*Solanum lycopersicum*), au niveau des feuilles et du fruit où il est respectivement induit en condition de stress hydrique et au cours de

la maturation (Iusem et al. 1993). Par la suite un nombre croissant d'ASR ont été identifiés chez diverses espèces, parmi lesquelles nous pouvons citer : la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (Silhavy et al. 1995), le pin (*Pinus taeda*) (Chang et al. 1996), le pamplemousse (*Citrus maxima*) (Canel et al. 1995), le maïs (*Zea mays*) (Riccardi et al. 1998), le lys (*Lillium longiflorum*) (Wang et al. 1998), le riz (*Oriza sativa*) (Vaidyanathan et al. 1999) ; la canne à sucre (*Saccharum officinarum*) (Sugiharto et al. 2002) et la vigne (*Vitis vinifera*) (Çakir et al. 2003). Les ASRs représentent une famille de protéines exclusives aux végétaux supérieurs pouvant constituer des familles multigèniques ou monogèniques suivant l'espèce considérée. On dénombre notamment 9 ASR chez le maïs (Virlouvet et al. 2011) contre un seul chez la vigne (Çakir et al. 2003). Ils semblent absents chez les Brassicacées où aucun gène d'*ASR* n'a pu être identifié jusqu'à présent. De ce fait, l'étude du rôle biologique des ASR requiert l'emploi d'espèces modèles autres que *A. thaliana.*

1.3.2 Propriétés des ASR

Les protéines ASR sont de petites protéines comprises entre 10,8 kDa et 28kDa (Canel et al. 1995; Hara et al. 2002) intrinsèquement non structurées (Kalifa et al. 2004) et riches en acides aminés chargés (Ala, Glu, His, Lys) (Iusem et al. 1993; Çakir et al. 2003). Cette composition particulière leur confère un caractère fortement hydrophile (Çakir et al. 2003). Ils partagent les caractéristiques propres aux hydrophilines et sont considérés par certains auteurs comme la classe 7 des protéines Late Embryogenesis Abundent - LEA (Battaglia et al. 2008). Les ASR présentent deux séquences conservées : un bloc de 6 à 7 histidines en N-terminal et une séquence conservée d'environ 70 acides aminés en C-terminal (Çakir et al. 2003). La majorité des ASR présentent un signal de localisation nucléaire au niveau de la partie C-terminale de la protéine (Hong et al. 2002; Çakir et al. 2003; Shen et al. 2005). Un site de fixation sur l'ADN, Zn^{2+} dépendant, a également été identifié dans la partie conservée en N-terminal chez l'ASR1 de la tomate (Rom et al. 2006). Enfin, les ASR présentent un motif ABA/WDS de réponse à l'acide abscissique et au stress hydrique (Canel et al. 1995; Padmanabhan et al. 1997).

1.3.3 Localisation des ASR

1.3.3.1 Localisation subcellulaire

Les études de localisation des ASR indiquent qu'il présenterait une localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique. L'ASR de la vigne VvMSA, l'ASR1 de la tomate et l'ASR du

lys LLA23 sont en effet localisés à la fois au niveau du noyau et du cytoplasme (Çakir et al. 2003; Kalifa et al. 2004; Wang et al. 2005). La plupart des ASR présentent un signal de localisation nucléaire : il est fonctionnel et nécessaire à l'adressage au noyau, comme c'est le cas pour l'ASR de la vigne (Çakir et al. 2003) ou l'ASR du lys (Wang et al. 2005), ou bien non fonctionnel et facultatif comme c'est le cas pour l'ASR1 de la tomate (Ricardi et al. 2012).

1.3.3.2 Localisation 'in planta'

Les gènes *ASR* présentent des profils d'expression différents suivant l'espèce considérée. Ils peuvent être exprimés au niveau d'organes sources tels que la feuille ou puits tels que le fruit, la racine, le grain de pollen ou la graine. Ils ont notamment été identifiés au niveau du fruit chez la tomate, le pamplemousse et la vigne (Iusem et al. 1993; Canel et al. 1995; Çakir et al. 2003; Golan et al. 2014), de la racine chez la tomate et le pin (Amitai-Zeigerson et al. 1995; Chang et al. 1996), du tubercule chez la pomme de terre (Schneider et al. 1997), du grain de pollen chez la tomate et le lys (Wang et al. 1998; Goldgur et al. 2007), de la graine chez la tomate (Goldgur et al. 2007), dans la feuille et la tige chez le maïs, la pomme de terre , le riz et la tomate (Silhavy et al. 1995; Riccardi et al. 1998; Vaidyanathan et al. 1999; Golan et al. 2014). Des études de localisation ont également permis d'observer que les gènes *ASR* sont exprimés au niveau du complexe conducteur. L'*ASR* de la canne à sucre *SoDIP22* est exprimé principalement au niveau de la gaine perivasculaire (Sugiharto et al. 2002), l'*ASR LB3* du pin au niveau de la nervure centrale de la feuille ainsi qu'au niveau des trichomes, des tissues vasculaires racinaires et de la coiffe racinaire (Wang et al. 2002). L'*ASR2* de la tomate est décrit comme exprimé au niveau des cellules compagnes du phloème et son expression semble s'étendre aux cellules du mésophylle de la feuille dans un contexte de stress hydrique (Maskin et al. 2008). L'expression de l'*ASR* de la vigne *VvMSA* est, elle aussi, localisée au niveau du complexe conducteur du phloème (Saumonneau et al. 2012).

1.3.4 Implication des ASR dans les réponses aux stress

Une étude portant sur le polymorphisme des différents allèles de l'*ASR2* chez 6 espèces de tomates sauvages semble indiquer qu'il serait la cible d'une sélection adaptative liée à la disponibilité en eau (Frankel et al. 2003). En effet, les séquences géniques des *ASR2* appartenant aux deux espèces adaptées aux environnements arides présentent un rapport :

substitutions non synonymes (susceptibles d'affecter la fonction de la protéine) / substitutions synonymes supérieur à 1, contrairement aux quatre autres espèces présentes au niveau d'habitats moins secs. A l'instar des observations effectuées chez la Tomate, la plupart des ASR identifiés semblent jouer un rôle dans les réponses des plantes aux stress. Chez le maïs, un PQL (Protein Quantity Loci) de l'*ASR1* a été colocalisé avec trois QTL de caractères liés au stress hydrique modéré : la sénescence, la teneur en ABA et l'intervalle entre la floraison mâle et femelle (ASI pour Anthesis Silking Interval) (de Vienne et al. 1999). En accord avec ces observations, la surexpression de l'*ASR1* du maïs induit une sénescence accrue chez les plantes en stress hydrique (Jeanneau et al. 2002). Les gènes *ASR*, *Ci21A* et *Ci21B,* de la pomme de terre sont induits par le stress au froid, principalement au niveau des tubercules et dans une moindre mesure au niveau des feuilles et des racines. Ils sont également induits en réponse au stress hydrique dans les feuilles (Schneider et al. 1997).

L'*ASR1* du riz est quant à lui induit par les stress osmotique et salin (Vaidyanathan et al. 1999). Les *ASR1* à *5* du riz et *l'ASR1* du blé sont induits en réponse au stress provoqué par la présence d'aluminium dans le sol (Arenhart et al. 2012a; Arenhart et al. 2012b; Arenhart et al. 2013; Guo et al. 2007). De plus, la répression de l'expression de l'ASR5 par stratégie antisens conduit à une sensiblité accrue à l'aluminum chez le riz. La répression de l'ASR se traduit également par une perturbation de la régulation d'un certains nombre de gènes impliqués dans la tolérance à l'aluminium (Arenhart et al. 2012b). L'ASR5 du riz semble jouer un rôle central dans la réponse de la plante au stress lié à l'aluminium. De plus, la répression de l'ASR5 n'affecte pas le degré de sensibilité de la plante au cadmium, ce qui semble indiquer un rôle spécifique de cet ASR dans le stress lié à l'aluminium (Arenhart et al. 2012b). Une étude récente indique que l'ASR5 du riz est capable de se fixer sur le promoteur de plusieurs gènes dont l'expression est régulée en réponse au stress induit par l'exposition à l'aluminium (Arenhart et al. 2013). Parmi ces gènes, STAR1 code un transporteur de type ABC nécessaire à la tolérance de la plante vis-à-vis de l'aluminium. L'ASR5 du riz semble jouer le rôle de facteur de transcription régulant l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la mise en place de la tolérance à l'aluminium. La majorité des gènes *ASR* sont également induits par l'ABA tels que les *ASR1* de la tomate et du riz (Rossi and Iusem 1994; Joo et al. 2013), l'*ASR1* du maïs (Virlouvet et al. 2011), l'*ASR1* du riz (Vaidyanathan et al. 1999), l'*ASR* de la vigne (VvMSA) (Çakir et al. 2003). En revanche, l'expression de *Ci21* et *DS2* de la pomme de terre n'est pas affectée par l'ABA (Schneider et al. 1997; Dóczi et al. 2005). Tandis que l'ASR3 du riz est fortement induit par l'acide gibérellique (Joo et al. 2013).

Enfin, une implication dans la réponse à l'infection par *Fusarium oxysporum* a été rapportée par Liu et collaborateurs (Liu et al. 2010), suggérant une possible fonction des ASR dans la réponse aux stress biotiques.

1.3.5 Implication des ASR dans le développement

Certaines ASR semblent également impliquées dans des processus développementaux. L'*ASR1* de la tomate notamment est induit au cours de la maturation de la baie (Iusem et al. 1993), de même que *VvMSA* chez la vigne (Çakir et al. 2003). L'*ASR LLA23* du lys est, quant à lui, induit au cours de la dessiccation du grain de pollen (Wang et al. 1998). La présence en forte quantité d'ASR1 au niveau de la graine de tomate (Goldgur et al. 2007) suggère également une implication dans le développement de la graine.

1.3.6 Fonctions biologiques des protéines ASR

1.3.6.1 Rôle de protection directe des macromolécules de la cellule

Certaines études ont démontré un rôle fonctionnel des ASR proche de celui des LEA lors de la réponse aux stress abiotiques (Konrad and Bar-Zvi 2008; Hsu et al. 2011; Dai et al. 2011). Une étude *in vitro*, portant sur le maintien de l'activité enzymatique suite à des cycles de congélation/décongélation a montré que l'ASR du lys LLA23 préservait l'activité enzymatique de deux enzymes, la lactate deshydrogénase et la malate deshydrogenase, et ceci de manière plus efficace que la BSA ou le tréhalose (Hsu et al. 2011). De la même manière, l'ASR1 de la tomate permet de préserver l'activité de la lactate déshydrogénase soumise à une série de congélation/décongélation ou à un traitement par la chaleur (Konrad and Bar-Zvi 2008). Il agirait d'une manière synergique avec l'osmolyte glycine-bétaïne (Konrad and Bar-Zvi 2008). Les plantes surexprimant *LLA23* présentent également un taux de survie supérieur aux plantes sauvages en condition de stress au froid (Hsu et al. 2011). Ces observations suggèrent donc une participation des ASR dans la protection des macromolécules de la cellule et notamment des enzymes en conditions de stress.

1.3.6.2 Rôle dans la régulation de l'expression des gènes

Outre le rôle de protection directe des macromolécules, un certain nombre d'études attribuent aux ASR un rôle de facteur de transcription. La première preuve de cette activité régulatrice a été apportée par la mise en évidence de la fixation de l'ASR de la vigne, VvMSA, sur le promoteur du gène de transporteur d'hexose VvHT1 (Çakir et al. 2003). Cette interaction observée *in vitro via* la technique du gel retard à ensuite été confirmée *in planta*. La co-expression de VvMSA et du gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur de *VvHT1*, chez des plants de tabac, a permis de démontrer une induction de l'activité GUS chez les plantes exprimant VvMSA par rapport aux plantes témoins (Çakir et al. 2003). Suite à cette observation le mécanisme de fixation de l'ASR sur l'ADN a été mis à jour *via* une étude chez la tomate (Kalifa et al. 2004). Intrinsèquement non structurés, les protéines ASR adoptent une conformation ordonnée en présence de Zn^{2+} et sont alors susceptibles de se fixer sur l'ADN. Sous sa forme ordonnée l'ASR1 est également susceptible de former des dimères voir des trimères et est capable de se fixer sur l'ADN sous sa forme mono- ou oligomèrique (Ricardi et al. 2012). Elles semblent également capables d'interagir avec d'autres protéines, comme c'est le cas chez la Vigne où VvMSA interagit avec la protéine DREB, pour former un complexe de régulation de la transcription (Saumonneau et al. 2008).

De nombreuses études basées sur la surexpression ectopique d'*ASR* ou la répression d'*ASR* endogènes, en système homologue ou hétérologue ont été réalisées afin de mieux cerner la fonction biologique de ces protéines. (Yang et al. 2005; Moretti et al. 2006; Frankel et al. 2007; Shkolnik and Bar‐Zvi 2008; Virlouvet et al. 2011; Hu et al. 2013). La surexpression de l'*ASR* du lys *LLA23* chez *Arabidopsis* entraîne une augmentation de la résistance au stress hydrique et salin (Yang et al. 2005) ainsi qu'une baisse de la sensibilité à l'ABA (Yang et al. 2005). Cela se traduit par un défaut d'inhibition de la germination en présence d'ABA exogène. Cette perte de sensibilité induit également un retard dans la fermeture des stomates en condition de contrainte hydrique (Yang et al. 2005). La surexpression de l'*ASR1* de la tomate chez *Arabidopsis* entraîne la mise en place d'un phénotype similaire (Shkolnik and Bar‐Zvi 2008). Ces auteurs ont démontrés que cet effet était lié à la fixation de l'ASR1 sur un élément-*cis* du promoteur du gène *ABI4*. La protéine ABI4 régule elle-même sa propre expression génique et participe à la régulation de plusieurs autres gènes de réponse à l'ABA (Shkolnik and Bar‐Zvi 2008). La fixation de l'ASR1 sur cet élément-*cis* perturbe la régulation du gène ABI4 et par conséquent, une partie des réponses

ABA dépendantes. Cette observation représente un nouvel exemple de la capacité des ASR à interagir avec l'ADN *in vivo* et suggère une implication dans la signalisation de l'ABA.

1.3.6.3 Implication dans la régulation du métabolisme glucidique et la redistribution des réserves carbonées

La surexpression de l'*ASR1* de la tomate chez la pomme de terre induit une modification du nombre de tubercules et inhibe l'expression d'un transporteur d'hexose au niveau des tubercules (l'homologue de LeHT2 chez la pomme de terre). D'une manière concomitante, les tubercules de plantes surexprimant l'*ASR1* présentent une teneur en glucose plus faible que celle des plantes sauvages (Frankel et al. 2007). Les auteurs suggèrent une implication de l'ASR endogène Ci21A dans le métabolisme glucidique au niveau des tubercules de pomme de terre (Frankel et al. 2007). La surexpression de l'*ASR1* du maïs permet d'améliorer le rendement en condition de stress hydrique (Virlouvet et al. 2011) et entraîne une modulation de l'expression de 3 transcrits et de 16 protéines, dont la plupart sont en lien avec le métabolisme des acides gras à chaîne ramifiée (Virlouvet et al. 2011). L'expression constitutive en orientation antisens de l'*ASR1* de la tomate chez le tabac induit un phénotype marqué (Dominguez et al. 2013). Les plantes ainsi obtenues présentent un phénotype nain, des teneurs en ABA réduites et des teneurs en glucose plus élevées dans les feuilles. Parallèlement, l'expression de plusieurs gènes est modifiée au niveau des feuilles. Les gènes d'un transporteur d'hexose (*NtHT1*) et d'un transporteur de saccharose (*NtSUT2*) sont réprimés. L'expression génique de deux protéine-kinases impliquées dans la signalisation glucidique est également modifiée : celle de l'hexokinase 1 est induite tandis que celle de la SnRK1 est réprimée. L'hexokinase 1 est le senseur cytoplasmique du glucose responsable notamment de la répression des gènes de la photosynthèse en réponse au glucose. La SnRK1 régule quant à elle les gènes du métabolisme en fonction de la disponibilité en sucres (Dominguez et al. 2013). Ces observations suggèrent une implication des protéines ASR dans la régulation du métabolisme glucidique et de l'allocation des réserves carbonées en tant que protéine régulatrice à l'interface des signalisations glucidique et hormonales.

1.4 Objectifs de la thèse

Le gène *VvMSA*, codant l'ASR de la Vigne, a été isolé par l'approche «simple hybride», lui attribuant une fonction potentielle de protéine régulatrice impliquée dans la

contrôle transcriptionnel du gène du transporteur d'hexoses *VvHT1* (Çakir et al. 2003). Cette hypothèse est confirmée par une étude *in planta*. Des feuilles de tabac transformées pour exprimer d'une façon stable la construction *pVvHT1::GUS* ont été agro-infiltrées de manière à exprimer transitoirement la construction *p35S::ADNc VvMSA*. La surexpression transitoire de VvMSA entraîne une augmentation de l'activité GUS (entre 3 et 4 fois) (Çakir et al. 2003). De plus l'expression de *VvHT1* et de *VvMSA* est colocalisée au niveau du complexe conducteur du phloème (Vignault et al. 2005; Saumonneau et al. 2012). Cette colocalisation conforte la significativité biologique de l'interaction observée *in vitro* et *in planta*. Il a été suggéré que VvMSA serait un facteur de transcription de type architectural capable de recruter d'autres protéines régulatrices, à l'exemple du facteur de transcription VvDREB (Dehydration Responsive Element Binding) (Saumonneau et al. 2008).

Afin d'aller au-delà de cette fonction moléculaire et de comprendre les rôles physiologiques de VvMSA, des suspensions de cellules embryogènes de Vigne, génétiquement modifiées pour la surexpression (*35S::VvMSA*) ou la répression de *VvMSA* (*35S::VvMSA-RNAi*), ont été établies. La caractérisation de l'effet de la surexpression et de la répression de VvMSA a tout d'abord été mise en place *via* une approche de transcriptomique ciblée sur les transporteurs de sucres de la Vigne.

Cette étude, réalisée par A. Medici en macroarray thématique, a révélé que VvHT1 est le transporteur de sucre le plus exprimé au niveau des suspensions cellulaires 41B embryogènes. De plus, la répression de l'expression de VvMSA chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* se traduit par un forte inhibition de l'expression de *VvHT1* (Medici 2010). Ce résultat confirme l'implication de VvMSA dans la régulation génique de VvHT1. Une étude au niveau des feuilles de plants de Vigne sauvages en condition de carence en eau, montre que les gènes de transporteur d'hexose *VvHT1* et *VvHT5,* ainsi que *VvMSA,* sont régulés de manière différentielle, au cours de la contrainte hydrique. La régulation contrastée de l'expression de ces gènes s'accompagne d'une forte augmentation de la teneur en glucose dans la phase précoce du stress hydrique (Medici et al. 2014). De plus, *VvMSA* et *VvHT1* sont rapportés tout deux régulés par le glucose (Conde et al. 2006; Saumonneau et al. 2012). Les deux questions biologiques concernant le rôle physiologique de VvMSA sont donc :

- VvMSA joue-t-il un rôle dans la signalisation glucidique et en particulier dans la régulation de l'expression des transporteurs *VvHT1* et *VvHT5* par le glucose ?

- Si oui, quelle est la place de VvMSA dans le réseau complexe de la signalisation glucidique ?

La première étape du travail de thèse a consistée à mettre en place et à caractériser les modèles d'étude. Les vitro-plants issus de la régénération des cellules embryogènes de vigne 41B, sauvage et transformées pour la surexpression ou la répression de VvMSA, s'avérant récalcitrants à l'acclimatation aux conditions de culture ex vitro, nous avons basé notre analyse sur le modèle « culture cellulaire ». Nous nous proposons de répondre aux questions posées plus haut par le biais d'une approche de type pharmacologique, basée sur l'utilisation du glucose et de ses différents analogues. Ces analogues constituent des effecteurs susceptibles d'induire spécifiquement les différentes voies de la signalisation du glucose : dépendante d'HXK1, indépendante d'HXK1 et dépendante du métabolisme.

Etant donné qu'il est difficile de clairement dissocier l'effet direct de signalisation du glucose, de son effet indirect sur le métabolisme, nous avons jugé opportun de réaliser cette analyse sur deux modèles cellulaires présentant le même fond génétique mais des différences nettes en termes de métabolisme glucidique. Ayant déjà à disposition les cellules embryogènes 41B sauvage et transformées, nous avons choisi de mettre en place une nouvelle culture de cellules non embryogènes (sauvages et transformées). Les cellules non embryogène sont cultivées sur le saccharose comme source de carbone, tandis que les cellules embryogènes prolifèrent sur maltose et glycérol. Une caractérisation approfondie des deux modèles cellulaires est envisagée à travers l'analyse de leur prolifération cellulaire et de leurs spécificités métaboliques.

En ce qui concerne l'approche de type pharmacologique, l'effet des différents analogues du glucose sur les deux modèles cellulaires sera d'abord défini vis-à-vis de l'expression de gènes considérés comme des marqueurs spécifiquement régulés par les différentes voies de la signalisation du glucose. Le but étant de préciser l'effet des analogues du glucose vis-à-vis des différentes voies de signalisation. Cette approche sera ensuite transposée à l'analyse de l'expression des gènes des transporteurs d'hexoses VvHT1 et VvHT5, au transport du glucose et à l'activité maximale d'enzymes en lien avec le métabolisme du glucose. La signalisation glucidique, le transport du glucose et le métabolisme énergétique étant des processus intimement interconnectés, les approches globales mises en oeuvre devraient nous permettre de positionner VvMSA dans le réseau complexe des voies de perception et de transduction du signal glucose.

Le troisième axe de la thèse consiste à la recherche des fonctions potentielles de l'ASR de la Vigne au niveau du noyau cellulaire. Notre étude est basée sur la comparaison quantitative des protéines nucléaires des cellules embryogènes sauvages et *35S::VvMSA-RNAi* par la technique iTRAQ 8 plex. Cette analyse est réalisée en collaboration avec la plateforme de protéomique du Functional Genomic Center de Zürich.

Matériel et méthodes

1.1 Materiel végétal

1.1.1 Cellules embryogènes de Vigne du porte-greffe 41B

Les cellules embryogènes de Vigne sont issues du porte-greffe 41B, un croisement entre l'espèce européenne *Vitis vinifera* (cv Chasselas) et l'espèce américaine *Vitis berlandieri Planch*. La suspension sauvage a été initiée par Lebrun et Branchard (1987). Les cellules embryogènes génétiquement modifiées sont transformées *via A. tumefaciens*, pour la surexpression (*35S::VvMSA)* et la répression (*35S::VvMSA*-RNA*i)* de VvMSA (Medici 2010). Ces suspensions cellulaires sont constituées de masses pro-embryonnaires maintenues dans un état indifférencié par la présence d'auxine (NOA) est d'une source de nutrition carbonée adéquate (maltose et glycérol) sur le milieu GM+ (Annexe 1).

1.1.2 Vitroplants de Vigne 41B

Les vitroplants de Vigne utilisés au cours de cette étude sont issus de la régénération par embryogenèse somatique, à partir des cellules de Vigne embryogènes sauvages ou transformées (Medici 2010).

1.1.3 Initiation des suspensions cellulaires non embryogènes de Vigne 41B

Les cellules non embryogènes de Vigne 41B sauvages et transgéniques, issues du même fond génétique que les cellules embryogènes 41B, sont créées à partir des vitroplants régénérées par embryogenèse somatique. Des fragments de tiges de vitroplants sauvages ou transgéniques sont placés dans 25 mL de milieu M14, un milieu MS (Murashige and Skoog 1962) agrémenté d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4D) (1 $mg.L^{-1}$) et de kinétine (0.5 $mg.L^{-1}$) (Annexe 2) dans une fiole d'Erlenmeyer de contenance 100 mL et sous agitation orbitale (115 rpm) en conditions contrôlées (obscurité, température constante de 21°C). Après environ 1 mois, des cellules isolées se sont dispersées dans le milieu et 1,3 mL de cellules sédimentées (PCV – Packed Cell Volume) sont placées dans 25 mL de milieu Gamborg (Gamborg et al. 1968) agrémenté d'acide naphtalène acétique (ANA) (0,18 $mg.L^{-1}$) et de 6-benzylaminopurine (BAP) (1 $mg.L^{-1}$) (Annexe 3).

1.2 Méthodes de culture

1.2.1 Culture des cellules embryogènes de vigne 41B

Les cellules embryogènes sauvages (41B-WT) sont cultivées dans le milieu GM+ (Annexe 1). Les cellules embryogènes transgéniques sont cultivées dans le même milieu agrémenté de 2 antibiotiques, la paromomycine (1,8 $mg.L^{-1}$) et la céfotaxime (200 $mg.L^{-1}$). Le premier permet la sélection des cellules transformées et le second inhibe la prolifération indésirable de *A. tumefaciens* dans la suspension. Le repiquage des cellules est effectué tous les 14 jours par le transfert de 0,3 mL de cellules PCV vers 25 mL de milieu frais dans des fioles d'Erlenmeyer de contenance 100 mL. Les cellules sont maintenues sous agitation orbitale (110 rpm), à l'obscurité et à une température constante de 21°C.

1.2.2 Culture des vitroplants de Vigne 41B

Les vitroplants de Vigne 41B sont cultivés en bocaux stériles sur milieu McCown Woody Plant (Lloyd and McCown 1980) agrémenté d'ANA (0,2 $mg.L^{-1}$) (Annexe 4), en conditions contrôlées (photopériode : jour/nuit 16 h/8 h, température constante : 23°C). Un repiquage est effectué par microbouturage des entrenoeuds tous les deux mois environ.

1.2.3 Culture des cellules non embryogènes de Vigne 41B

Les cellules non embryogènes sauvages et transgéniques sont cultivées sur milieu nutritif Gamborg ANA/BAP (Annexe 2). Les suspensions cellulaires sont repiquées tous les 14 jours par le transfert de 1 mL de cellules PCV dans 25 mL de milieu frais.

1.3 Souches bactériennes utilisées

1.3.1 Agrobactérium tumefaciens souche EHA105

La souche de *A. tumefaciens* EHA105 est de type agropine, elle contient le plasmide pEHA105 de type Ti (Tumor inducing), dérivé du pTiBo542 de la souche hypervirulente A281 (Hood et al. 1993). Le plasmide pEHA105 est désarmé, car dépourvu d'ADN-T, mais conserve la région de virulence nécessaire au transfert des gènes d'intérêt vers la plante hôte.

Figure 11 : Construction des gènes portés entre les bordures gauche LB et droite RB du vecteur binaire pFB8, introduit dans la souche d'*A. tumefaciens* EHA 105, utilisée pour la transformation génétique des cellules embryogènes 41B de Vigne. *NPTII* - gène codant la néomycine phosphotransférase, assurant la résistance à la kanamycine sous le contrôle des séquences promotrice et de terminaison du gène de la nopaline synthase (*NOS*). La cassette *VvMSA*-RNAi sous le contrôle des régions régulatrices de l'ARN 35S du Virus de la mosaïque de choux fleur (CaMV). Gène rapporteur *uidA,* codant la ß-gucuronidase (GUS) sous le contrôle du promoteur *p35S* et du terminateur *tNOS*.

Ces gènes sont insérés entre les séquences des bordures gauche et droite de l'ADN-T, portées par le vecteur binaire respectif. La souche EHA105 présente sur son ADN chromosomique, un gène de résistance à l'antibiotique rifampicine. Elle est cultivée sur milieu YEB (Annexe 5) additionné de rifampicine (100 $mg.L^{-1}$), sous agitation orbitale (200 rpm) et à une température de 28°C.

1.3.2 Transformation stable des cellules embryogènes 41B

Deux transformations génétiques indépendantes de cellules embryogènes 41B ont été réalisées avec la construction *35S::VvMSA*-RNAi par co-culture avec *A. tumefaciens* (souche EHA 105). Cette souche est préalablement transformée avec le vecteur binaire pFB8, portant entre les bordures de l'ADN-T le gène de sélection NPTII, conférant la résistance aux antibiotiques de la famille de la néomycine, y compris la paromomycine, la construction de répression *35S::VvMSA*-RNAi et le gène rapporteur *GUS* (*uidA*) ; les trois sous contrôle de séquences régulatrices eucaryotes (Figure 11).

Une préculture d'Agrobactérium est ensemencée la veille de la transformation dans 25 mL du milieu de culture suivant : YEB pH 7,2, $MgSO_4$ 5mM, rifampicine 100 $\mu g.mL^{-1}$, kanamycine 50 $\mu g.mL^{-1}$. Après 24 h de culture, 25 mL de suspension bactérienne sont centrifugés (15 min, 5000x*g*, 4°C). Le surnageant est jeté et le culot est repris dans 25 mL de milieu YEB pH 5,6, $MgSO_4$ 5 mM additionné d'acétosyringone (100 µM dans du DMSO) afin d'induire la virulence d'Agrobactérium. La culture bactérienne est incubée 2 h à 28°C sous agitation orbitale (200 rpm), centrifugée (15 min, 5000x*g*, 4°C) et lavée deux fois à l'aide de 25 mL de milieu GM+. La DO de la suspension à 600 nm est déterminée et une dilution de la culture est réalisée de manière à obtenir 10 mL de suspension présentant une DO 600 nm = 0,2. Zéro virgule cinq mL PCV de cellules embryogènes 41B âgées de 7 jours sont mises en contact des 10 mL de suspension d'Agrobactérium, et placées sous agitation (28°C, 110 rpm) pendant 30 min. La co-culture est ensuite « asséchée » en aspirant le milieu de culture, puis étalée sur du papier Whatmann 3MM stérile, posé sur du milieu GM+ gélosé dans une boîte de Pétri. Les boîtes sont ensuite scellées avec du film plastique (cell O'frais) et la co-culture est incubée pendant environ 60 h à 26°C à l'obscurité. Après deux rinçages avec 20 mL de milieu GM+ les cellules sont reprises dans 25 mL de milieu GM+ additionné de céfotaxime (200 µg. mL^{-1}) et de paromomycine (1,8 µg. mL^{-1}) et incubée à 21°C sous agitation (120 rpm) pendant 7 jours. Un ensemencement dense est alors effectué (0,8 à 0,9 mL de cellules PCV) dans 25 mL de milieu GM+, additionné de céfotaxime (200 µg. mL^{-1}) et de paromomycine (2 µg. mL^{-}

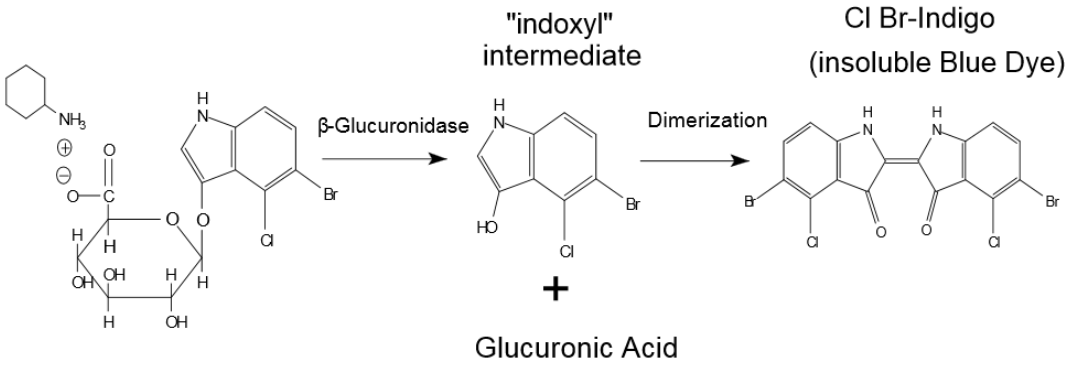


Figure 12 : Schéma illustrant l'hydrolyse du substrat X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide) par la β-glucuronidase pour former de l'acide glucuronique et de l'indoxyle. La dimerisation oxidative de l'indoxyle, catalysée par un mélange de ferro- et de ferri-cyanure de potassium aboutie à la formation d'un dimère (5,5'-diromo-4,4'-dichloro-indigo), composé insoluble et de couleur bleu indigo.

[1]). Les cellules sont repiquées ainsi chaque semaine durant 3 semaines. Une fois la suspension cellulaire stabilisée, les cellules sont repiquées comme décrit précédemment.

1.3.3 Contrôle de la transformation des cellules par le test histochimique GUS

Les cellules transgéniques sont supposées exprimer le gène rapporteur GUS, il est donc possible de différencier les cellules transformées des cellules non transformées à l'aide du test histochimique GUS. Le gène *GUS* code pour la β-glucuronidase, celle-ci hydrolyse le substrat : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) pour former une molécule d'acide galacturonique et d'indoxyle. L'indoxyle est soluble et incolore mais sa dimérisation catalysée par un mélange de ferro- et de ferri-cyanure de potassium aboutie à la formation d'un composé insoluble, de couleur bleu (Figure 12). Les cellules transformées présentent donc une coloration bleue à l'issu de ce test. Une solution stock de X-Gluc à 40 $mg.mL^{-1}$ est préparée dans du DMF (DiMéthylFormamide). Les cellules (0,2 mL PCV) sont incubées une nuit à 37°C dans 300 µL de la solution de coloration constituée de tampon Na-Phosphate 0,1 M, pH 7,0, K3[Fe(CN)6] 0,5 mM, K4[Fe(CN)6] 0,5 mM, Triton X100 0,1% (V/V), EDTA pH 8,0 10 mM, X-Gluc 0,5 $mg.mL^{-1}$

1.4 Approche pharmacologique

1.4.1 Inititation de la carence en sucres et en nitrates

Les traitements sont effectués sur les cellules 8 jours après repiquage. Un protocole différent est appliqué aux cellules embryogènes et non embryogènes.

Les cellules embryogènes subissent dans un premier temps 3 lavages dans le milieu GM° minimum (Annexe 6) : la totalité du milieu de culture est aspirée sans entraîner de cellules, puis un volume de milieu GM° minimum (Annexe 6) équivalent au volume de milieu de culture prélevé est ajouté. Les cellules sont ensuite replacées sous agitation orbitale (110 rpm) durant 15 minutes. Cette opération est répétée 3 fois puis 0,2 mL de cellules PCV sont placées dans 3 mL de milieu GM° minimum dans une plaque de culture 6 puits (Nunc).

Les cellules non embryogènes sont préalablement filtrées sur une grille métallique (dimensions des pores 2 mm/2 mm) permettant de retenir les amas cellulaires en laissant passer les cellules isolées, afin d'obtenir des suspensions homogènes. Ensuite, 0,3 mL de

cellules PCV sont placées dans 3 mL de milieu Gamborg ANA/BAP minimum (Annexe 7) dans une plaque de culture cellulaire à 6 puits (Nunc).

Les cellules (embryogènes et non embryogènes) sont ensuite replacées sous agitation (110 rpm), à l'obscurité et à une température constante de 21°C, pendant 24 h.

1.4.2 Traitement par le glucose et ses analogues

Les traitements sont réalisés par l'ajout de 30 µl de solutions concentrées (1 M) de glucose, mannose, 3-O-méthylglucose (3OMG) ou mannitol et de 27 µl de 2-déoxyglucose (2DOG) (100 mM) par puits contenant 3 mL de suspension cellulaire (concentration finale de 10 mM pour le glucose, le mannose, le 3OMG, le mannitol et 0,9 mM pour le 2DOG). Les cellules sont ensuite replacées sous agitation (110 rpm), à l'obscurité et à une température constante de 21°C, pendant 6 h.

1.4.3 Récolte des cellules

Les cellules embryogènes sont récoltées à l'aide d'un système de filtration sous vide partiel (Millipore) équipé de filtres en microfibres de verre (Fisherbrand). Les cellules sont ensuite rincées à l'aide de 10 mL de milieu GM° minimum.

Les cellules non embryogènes sont préalablement filtrées sur une grille métallique (dimensions des pores 2 mm/2 mm) permettant de retenir les amas cellulaires en laissant passer les cellules isolées, afin d'obtenir des suspensions homogènes. Ensuite, 0,3 mL de cellules PCV sont placées dans 3 mL de milieu Gamborg ANA/BAP minimum (Annexe 7) dans une plaque de culture cellulaire à 6 puits (Nunc). Les cellules sont ensuite replacées sous agitation (110 rpm), à l'obscurité et à une température constante de 21°C, pendant 24 h.

1.4.4 Analyse de la viabilité des cellules

Avant de récolter les cellules une analyse de leur viabilité est réalisée par coloration au bleu trypan (3,3'-[(3,3'-diméthyl[1,1'-biphényl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[5-amino-4-hydroxynaphtalène -2,7-disulfonate] de tétrasodium). Ce colorant à pour spécificité de ne pas diffuser à travers la membrane plasmique de la cellule vivante, contrairement à celle des cellules mortes. Les cellules mortes apparaissent donc colorées en bleu tandis que les cellules

vivantes ne sont pas colorées. Une goutte de suspension cellulaire est mélangée à un volume équivalent de solution de bleu trypan à 0,4% repris dans de l'eau extra pure (ddH_2O) directement sur une cellule de Mallasez. Une observation au microscope (Olympus BH ; grossissement X100) est effectuée afin de s'assurer que la viabilité des cellules n'est pas affectée par les traitements.

1.4.5 Récolte des cellules

Les cellules sont récoltées par filtration à l'aide d'un système de filtration sous vide partiel (Millipore) équipé de filtres en microfibres de verre (Fisherbrand). Les cellules sont ensuite rincées à l'aide de 10 mL de milieu Gamborg ANA/BAP minimum (Gb ANA/BAP mini). Pour l'étude de l'expression des gènes, les cellules sont ensuite recueillies dans une tube de 2 mL et congelées dans l'azote liquide, puis stockées à -80°C.

1.5 Mesures d'absorption du glucose radiomarqué

La vitesse d'absorption du glucose est évaluée chez les cellules embryogènes et non embryogènes après leur avoir imposé une incubation de 24h dans les milieux GM° minimum et Gb A/B minimum respectivement, suivie de 6 h ou 24 h de traitement par le glucose ou le 2DOG.

Les cellules sont filtrées à l'aide d'un système de filtration sous vide partiel puis sont lavées 3 fois à l'aide de 10 mL de milieu GM° minimum ou Gb A/B minimum (cellules embryogènes et non embryogènes respectivement). Pour chaque condition analysée, 225 mg ou 450 mg de cellules sont alors reprises dans 12 mL de milieu GM° minimum ou Gb A/B minimum (cellules embryogènes et non embryogènes respectivement). Les suspensions cellulaires sont ensuite placées sous agitation orbitale (115 rpm) pendant 30 min.

La concentration de glucose utilisée pour l'expérience est de 0,2 mM final (on néglige la concentration du glucose radiomarqué). Le ^{14}C-glucose est quant à lui, utilisé à une radioactivité spécifique de 0,1 $\mu Ci.mL^{-1}$. Une première cinétique d'absorption est réalisée sur une période de 30 min pour chaque condition analysée, des prélèvements étant réalisés toutes les 10 min. Trois prélèvements de 750 µL de suspension cellulaire sont réalisés afin d'avoir 3 réplicats techniques par point de la cinétique. La part du transport passif est également analysée en réalisant un traitement avec du Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl hydrazone CCCP (20 µM final). Le CCCP est un protonophore ; à ce titre il dissipe le gradient de protons

existant entre les milieux intra- et extracellulaire, ce qui inhibe totalement le transport actif du glucose.

Par la suite, ayant vérifié que la vitesse d'absorption est constante jusqu'à 20 minutes après l'ajout du glucose radiomarqué dans l'ensemble des conditions analysées, des prélèvements ne sont effectués qu'à t=0min et t=20min pour les expérimentations standardisées. Les cellules prélevées sont filtrées à l'aide d'un système de filtration sous vide partiel équipé de filtres en microfibre de verre (Fisherbrand). Filtres et cellules sont ensuite placés dans des tubes à scintillation en polyéthylène de contenance 18 mL (Perkin-Elmer) dans lesquels sont ajoutés 800 µL de milieu de digestion (acide perchlorique 13% (V/V) ; peroxyde d'hydrogène 12% (V/V) ; Triton X-100 0,04% (p/V)) et sont incubés durant 24 h à 60°C. Après avoir ajouté 10 mL de liquide à scintillation EcoLite(+)™ (MP Biomedical) et mélangé vigoureusement le contenu des tubes. La radioactivité absorbée par les cellules est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation (Liquid Scintillation Analyzer, PACKARD). On évalue également la radioactivité correspondant à 0,36 µmol (2 µL) du mélange de glucose froid - ^{14}C-glucose afin de déterminer la quantité de glucose absorbée par les cellules suivant l'équation suivante :

Glucose absorbé (µmol) = dpm échantillon / dpm dans 2 µl mélange * 0,36 µmol

La quantité de glucose absorbée par les cellules est alors rapportée à la quantité des protéines contenues dans chaque échantillon (en µg) évaluée par leur dosage dans 3 x 160 µL de suspension cellulaire pour chaque condition analysée.

1.5.1 Extraction et dosage des protéines totales

1.5.1.1 Extraction des protéines totales

Le milieu est aspiré indépendamment des cellules et éliminé, les cellules sont ensuite broyées à l'aide d'un potter rotatif (Sorvall). Le broyat cellulaire est alors repris dans 400 µL de tampon GEB (Annexe 8) additionné d'environ 5 mg de PVPP et de sable de Fontainebleau. Le tout est mélangé vigoureusement au vortex pendant environ 20 sec.

1.5.1.2 Dosage des protéines par la méthode de Bearden

Le dosage est effectué sur 50 µL de l'extrait protéique, repris dans un mélange contenant 100 µL de Triton X100 à 0,1%, 850 µL d'eau milliQ et 1 mL de réactif de Bearden (Bearden,

1978). Après 10 min d'incubation, la DO à 595 nm est mesurée et la quantité de protéines déterminée *via* l'utilisation d'une gamme étalon dédiée.

1.6 Evaluation de la prolifération des cellules non embryogènes

La prolifération des cellules non embryogènes WT, *35S::VvMSA* et *35S::VvMSA*-RNAi est évaluée en déterminant l'évolution de la masse fraîche des cellules filtrées tous les 2 jours. Les cellules ensemencées à l'identique (1,3 mL de cellules PCV dans 25 mL de GbA/B par récipient) dans 8 fioles d'Erlenmeyer sont mises en culture. Les cellules d'une fiole d'Erlenmeyer sont prélevées tous les deux jours (J0, J2, J4, J6, J8, J10, J12, J14), filtrées à l'aide d'un système de filtration sous vide partiel et pesées. Les cellules sont ensuite congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C. Une analyse de l'expression de gènes d'intérêt chez ces cellules est envisagée par la suite. Le milieu dans lequel se trouvent les cellules est également récolté lors de la filtration afin de doser les sucres solubles par HPLC (Chromatographie en phase liquide à haute performance). Les échantillons de milieu de culture sont alors stockés à -20°C jusqu'à leur analyse en HPLC.

1.7 Identification et dosage des sucres solubles dans les milieux de cultures par HPLC

Deux millilitres de milieu sont centrifugés 15 minutes à 13000x*g* afin d'éliminer d'éventuels débris cellulaires. Le milieu est ensuite filtré à l'aide d'une seringue équipée d'une membrane de cellulose régénérée hydrophile (pores de 0,22 µm – ref . 5174C, Fischer,). Le milieu ainsi filtré est alors injecté dans une colonne (Aminex HPX-87C, 300 x 7,8 mm ; ref.125-0095, Bio-Rad) combinant les mécanismes des chromatographies d'exclusion pour séparer les oligosaccharides et d'échange d'ions pour séparer les monosaccharides. Les sucres solubles sont ensuite détectés par un refractomètre différentiel IOTA2 (Refractive Index Detector 475, Kontron Instruments) et identifiés grâce au temps de rétention préalablement déterminés pour chaque molécule de référence. Trois réplicats techniques sont réalisés pour chaque mesure. L'analyse des données brutes est effectuée à l'aide du logiciel TotalChrom Navigator v6.3.2 (Perkin Elmer).

1.8 Analyse du métabolome des cellules 41B embryogènes et non embryogènes

L'analyse comparative du métabolome des cellules embryogènes et non embryogènes a été réalisée sur la plate-forme « Métabolome » de l'UMR 1332 INRA/Université de Bordeaux.

Le dosage des métabolites est réalisé sur des cellules prélevées tous les 2 jours (J2, J4, J6, J8, J10, J12, J14) au cours de leur cinétique de croissance, ainsi qu'à J8 après la période de carence en sucre et en nitrates imposée en amont des traitements avec les effecteurs.

1.8.1 Culture des cellules prélevées à J2, J4, J6, J8, J10, J12, J14

Cinquante millilitres de milieu GM+ sont ensemencés avec 0,6 mL PCV de cellules embryogènes. En ce qui concerne les cellules non embryogènes, 25 mL de suspension sont ensemencés à l'aide d'1 mL PCV de cellules non embryogènes. Trois cultures de cellules embryogènes et non embryogènes sont préparées pour chaque point de la cinétique analysé afin de disposer de 3 répétitions biologiques.

1.8.2 Traitement des cellules pour la condition « J8 + 24h carence »

Les cellules sont traitées de la même manière que pour l'approche pharmacologique.

Les cellules embryogènes subissent dans un premier temps 3 lavages dans le milieu GM° minimum (Annexe 6). La totalité du milieu de culture est aspirée, puis un volume de milieu GM° minimum équivalent au volume de milieu de culture prélevé est ajouté sur les cellules (50 mL). Les cellules sont ensuite replacées sous agitation orbitale (110 rpm) durant 15 minutes. Cette opération est répétée 3 fois, puis 5 mL de cellules PCV sont placés dans 50 mL de milieu GM°minimum dans une fiole d'erlenmeyer de contenance 250 mL. Les cellules sont ensuite replacées sous agitation (110 rpm), à l'obscurité et à une température constante de 21°C, pendant 24h.

Les cellules non embryogènes sont préalablement filtrées sur une grille métallique (dimension des pores 2 mm/2 mm) permettant de retenir les amas cellulaires en laissant passer les cellules isolées, afin d'obtenir des suspensions homogènes. Ensuite, 2,5 mL de cellules

PCV sont placées dans 25 mL de milieu Gamborg ANA/BAP minimum (Annexe 7) dans une fliole d'Erlemeyer de contenance 100 mL. Les cellules sont ensuite replacées sous agitation (110 rpm), à l'obscurité et à une température constante de 21°C, pendant 24 h.

1.8.3 Prélèvement des cellules et des milieux de culture

Pour chaque prélèvement, la totalité des cellules d'un Erlenmeyer sont filtrées sous vide. Le milieu de culture est également récolté puis stocké à -20°C. Les cellules subissent ensuite 3 lavages à l'aide de 50 mL ou 25 mL de ddH2O pour les cellules embryogènes et non embryogènes respectivement. La masse fraîche des cellules est ensuite déterminée et les cellules immédiatement congelées dans l'azote liquide ; elles sont ensuite conservées à -80°C.

1.8.4 Lyophilisation des cellules et du milieu de culture

L'ensemble des cellules prélevées et 15 mL pour les milieux de culture sont déshydratés dans des tubes Falcon de contenance 50 mL à l'aide du lyophilisateur FreeZone®Freeze Dry System (Labconco) durant 96 h. Les cellules lyophilisées sont pesées afin de déterminer la masse sèche des différents échantillons prélevés. Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C et transportés dans de la carboglace.

1.8.5 Extraction des éléments soluble des cellules

L'extraction est réalisée sur 30 mg de cellules lyophilisées (masse sèche). Il s'agit d'une extraction hydro-alcoolique en 3 étapes :

Etape 1. Dans des tubes à hémolyse, 2 mL d'éthanol à 80% sont ajoutés au 30 mg de cellules lyophilisées. Les échantillons sont ensuite brièvement agités au vortex et incubés 15 minutes dans un bain-marie à 80°C. Après centrifugation (10 min à 13000x*g*), le surnageant est alors récupéré par versement dans un autre tube a hémolyse.

Etape 2. Les cellules ayant subi la 1ère étape sont reprises dans 2 mL d'éthanol à 50% puis sont à nouveau agitées, incubées et centrifugées dans les mêmes conditions qu'à l'étape 1. Le surnageant est alors récupéré par versement ; celui-ci est ajouté au surnageant de la 1ère étape.

Etape 3. Les cellules ayant subi les 2 premières étapes sont reprises dans 3 mL de ddH_2O et sont traitées de la même manière qu'au cours des étapes 1 et 2. Le surnageant, également récupéré par versement, est ajouté au surnageant des étapes 1 et 2.

Les extraits sont ensuite déshydratés au Speedvac « SpeedVac Concentrator » (Jouan) pendant la nuit. Les tubes contenant les culots cellulaire sont stockés à -20°C. Les culots seront utilisés afin de doser l'amidon qui n'a pas été extrait par la méthode d'extraction hydro-alcoolique.

1.8.6 Traitement des extraits issus des cellules

La technique employée afin de caractériser le métabolome des cellules embryogènes et non embryogènes est la RMN du proton. Elle se base sur la perception du signal de résonnance émis par les noyaux des atomes d'hydrogène placés dans un champ magnétique, suite à l'émission d'une onde de radiofréquence spécifique. Or l'ensemble des noyaux d'hydrogène présents dans les molécules d'eau, plus ou moins liés aux métabolites que l'on cherche à identifier, génère un signal parasite qu'il faut éliminer. A cette fin, le solvant utilisé pour reprendre les extraits lyophilisés est le D_2O (eau lourde), constitué de 2 atomes de deuterium et d'un atome d'oxygène. Le deuterium est un isotope de l'hydrogène, dont le noyau est composé d'un neutron et d'un proton, contrairement au noyau d'hydrogène qui n'est composé que d'un proton. Cette composition différente des noyaux implique des spins nucléaires différents. La différence au niveau du spin rend le D2O très intéressant en tant que solvant dans le cadre de la RMN du proton. Il est ainsi possible de percevoir les signaux liés aux noyaux des atomes d'hydrogène des molécules que l'on souhaite doser, sans le signal parasite des atomes d'hydrogène de l'eau. Une des étapes préalable au dosage par RMN du proton consiste donc à substituer les molécules d'eau par des molécules de D2O.

1.8.7 Tamponnage des extraits et acquisition des spectres RMN

Les extraits de métabolites solubles lyophilisés sont repris dans 300 µL de tampon phosphate (KH_2PO_4/Na_2HPO_4) 400mM, pH=6. Le solvant utilisé pour réaliser le tampon phosphate est le D_2O pour les raisons expliquées plus haut. Le lyophilisat est re-solubilisé par une série d'aspiration/refoulement à l'aide d'une pipette, le tout est ensuite bien homogénéisé au vortex. Les 300 µL sont alors transférés dans un tube de contenance 1,5 mL équipé d'un capuchon à vis. Le tube dans lequel se trouve le lyophilisat est ensuite rincé à l'aide de 2 X 100 µL de tampon K. Ces deux fois 100 µL sont ajoutés au 300 µL d'extrait re-solubilisé. En ce qui concerne les milieux de culture, aucune extraction n'est nécessaire. Le milieu lyophilisé est directement re-solubilisé dans 500 µL de tampon phosphate. Le pH des extraits re-solubilisés est ensuite ajusté à 6 à l'aide d'un ajusteur automatique « BTpH » (Bruker). Celui-

ci est constitué d'une sonde pH-mètrique et d'un micro injecteur capable d'injecter du DCl ou du KOD (analogue deutérés de l'HCl et du KOH).

A ce stade l'eau fortement liée aux molécules subsistant après la première déshydratation a été en majeure partie substituée par le D_2O. L'extrait est à nouveau déshydraté au lyophilisateur "EZ Dry" (FTS Systems) sur la nuit, puis l'extrait est repris dans 500 µL de D_2O. Cinq microlitres de sodium trimethylsilyl [2,2,3,3-2H4] propionate (TSP, 0.01% final), utilisé pour calibrer l'échelle de déplacement chimique, sont également ajoutés. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 minutes à 17700x*g*, à température ambiante. Le surnageant est ensuite transféré dans un tube à RMN (diamètre 5 mm). L'acquisition des spectres RMN est réalisée à 500,162 MHz et à 300 K à l'aide d'un spectromètre RMN «Avance III» (Bruker) équipé d'un passeur d'échantillon et d'une sonde inverse 5mm 1H-13C. L'angle de basculement a été fixé à 90°. Une référence électronique (ERETIC : Electronic REferens To access In vivo Concentration) a été utilisée pour la quantification des métabolites. L'identification des signaux spécifiques des différents métabolites au niveau des spectres RMN a été réalisée en comparant le déplacement chimique des protons avec des données de la littérature et des bases de données. Pour les métabolites dont l'attribution des signaux spécifiques est incertaine, on procède à un ajout d'une solution standard des métabolites concernés directement dans le tube RMN. Après une nouvelle acquisition, les pics spécifiques au signal de ce métabolite ont gagnés en intensité. La superposition des 2 spectres (avant et après l'ajout de la solution standard) permet de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'identification initiale. Pour la quantification absolue des métabolites, quatre gammes sont réalisées et traitées en même temps que les échantillons (glucose et fructose 2,5 à 100 mM ; glutamate et glutamine 0 à 30 mM). La gamme de glucose a été utilisée pour la quantification de tous les autres composés (sauf le glutamate, la glutamine et le fructose qui ont leur gamme spécifique). Le phasage et la correction des lignes de base ont été réalisés manuellement à l'aide du logiciel Topspin (version 3.0, Bruker). Les concentrations en métabolites ont été calculées à l'aide des logiciels AMIX version 3.9.10 (Bruker) et Excel (Microsoft).

1.8.8 Dosage de l'amidon

Les culots cellulaires conservés après l'extraction des éléments solubles sont utilisés afin de doser l'amidon. Le dosage de l'amidon est réalisé en deux étapes. Dans un premier temps, l'amidon est hydrolysé en glucose puis la concentration en glucose est déterminée par

Figure 13 : Réactions enzymatiques impliquées dans le dosage du glucose résultant de l'hydrolyse de l'amidon. Le glucose est converti en Glucose-6-Phosphate (G6P) par l'action de l'hexokinase (HXK). Le Glucose-6-Phosphate est ensuite converti en 6-phosphogluconolactone par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, cette réaction s'accompagne de la réduction d'une molécule de $NADP^+$ et $NADPH,H^+$. On quantifie indirectement la quantité de glucose en déterminant la quantité de $NADP^+$ consommée par un suivi de l'absorbance à 340 nm.

voie enzymatique (Figure 13). La concentration en amidon est donc exprimée en équivalent glucose.

1.8.8.1 Hydrolyse de l'amidon

Chaque culot est repris dans 1,5 mL de NaOH à 0,1 M. Après agitation au vortex, ils sont incubés 30 minutes à 95°C. Le pH de l'extrait est alors tamponné à l'aide de 300 µL de tampon acétate/NaOH 0,1 M, pH 4,9. L'extrait est ensuite homogénéisé au vortex. Quarante µL d'extrait + cellules sont prélevés d'une manière homogène et placés dans une plaque 96 puits. On ajoute ensuite 60 µL de mélange de dégradation (500 µL d'amyloglucosidase (Roche), 5 µL d' α-amylase (Roche), 25 mL tampon acétate/NaOH 0,1M, pH 4,9)

1.8.8.2 Dosage du glucose issu de l'hydrolyse de l'amidon

La plaque est enveloppée dans de l'aluminium avant d'être incubée à 37°C pendant la nuit. La plaque est ensuite centrifugée (4000x*g* , 10 min) afin de faire sédimenter les débris cellulaires au fond des puits. On transfert ensuite 40 µL de surnageant dans une nouvelle plaque 96 puits et on ajoute 160 µL du mélange de détermination (480 µL ATP 100 mM, 480 µL $NADP^+$ 40 mM, 80 µL G6PDH (Roche), 15,5 mL HEPES/KOH 0,1 M pH 7,0 ; $MgCl_2$ 3 mM)

L'absorbance à 340 nm est mesurée en continu à l'aide d'un lecteur de plaque « MP96 » (SAFAS). Une fois les valeurs d'absorbance stabilisées (après environ 1h), 1 µL d'hexokinase (Roche) est ajouté dans chaque puits et l'absorbance à 340 nm est mesurée (1 mesure toutes les minute) jusqu'à ce qu'elle se stabilise.

1.9 Mesure des activités enzymatiques maximales

L'ensemble des analyses concernant les activités enzymatiques a été réalisée sur la plate-forme « Métabolome » de l'UMR 1332 INRA/Université de Bordeaux.

1.9.1 Extraction des enzymes solubles

Pour la préparation du tampon d'extraction, un tampon stock 10X est préalablement réalisé. Celui-ci est constitué d'HEPES/KOH 0,5 M, pH 7,5, de $MgCl_2$ 100 mM, d'EDTA 10 mM, d'EGTA 10 mM, de Benzamidine 10 mM, de ε-aminocapronate 10 mM, de BSA 2,5% (m/V), de polyvinylpyrolidone 1% (m/V). On prépare ensuite 100 mL de tampon d'extraction

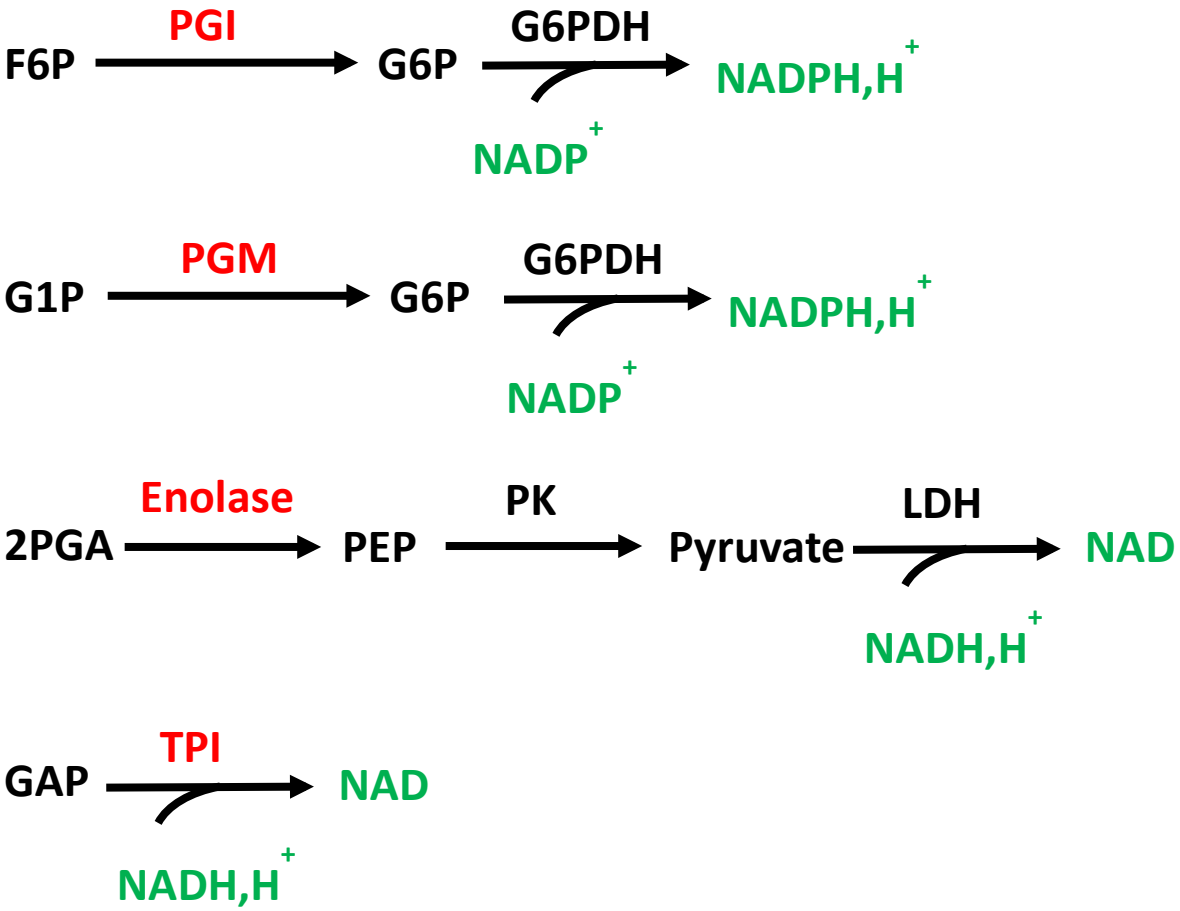


Figure 14 : Réactions enzymatiques impliquées pour la mesure de l'activité des enzymes du groupe A : PhosphoGlucose Isomérase (PGI), PhosphoGlucoMutase (PGM), Enolase, Triose Phosphate Isomérase (TPI). La mesure de l'activité de la PGI, de la PGM, et de l'Enolase requiert le couplage avec la Glucose-6-Phosphate DésHydrogénase (G6PDH) ou la Pyruvate Kinase (PK) et la Lactate Déshydrogénase (LDH). Dans ce cas, le couplage enzymatique est stœchiométrique. La vitesse de dégradation du $NADH,H^+$ ou de production du NADPH est proportionnelle à l'activité de l'enzyme analysée. L'apparition ou la disparition du NAD+, NADP+, NADH,H+ et NADPH,H+ sont déterminée en suivant l'absorbance à 340 nm.

(10 mL de tampon 10X, 1 mL de leupeptine 20 µM, 100 µL de DTT 500 µM, 10 mL de Triton 1% (V/V), 20 mL de glycerol et 58,9 mL de ddH2O)

Les extractions sont réalisées sur 10 ou 20 mg (en masse fraîche pour les cellules embryogènes et non embryogènes respectivement) de cellules broyées puis congelée et stockée à -80°C. Les cellules embryogènes ayant une teneur en eau relativement faible (84%) nous avons choisi de réduire la masse de cellules utilisée pour l'extraction à 10 mg au lieu de 20 mg classiquement utilisés. Les tubes Micronic® contenant les échantillons de cellules broyées dont la masse a été précisément mesurée sont placés sur glace. Puis 500 µL de tampon d'extraction sont ajoutés dans chaque tube, le contenu des tubes est homogénisé au vortex. Les tubes sont ensuite centrifugés 4 min à 13000x*g* et le surnageant contenant les enzymes solubles est récupéré.

1.9.2 Mesure des activités enzymatiques

Différents protocoles ont été établis pour la mesure des activités enzymatiques (A, B, C et D) (Protocoles mis en place par Yves Gibon avec la participation de Melanie Höhne, Benoit Biais, Guillaume Ménard, Duyên Prodhomme, Patricia Ballias, Joanna Cross, Jannecke Hendriks, Ronan Sulpice, Hendrik Tschoep, Marie-Caroline Steinhauser, Oliver Bläsing, Dominique Rolin, Pierre Baldet, Martine Dieuaide-Noubhani, Bertrand Beauvoit, Alistair Rogers, Alisdair Fernie, Mark Stitt).

La mesure de l'activité des enzymes du groupe A est réalisée directement en suivant l'apparition ou la disparition d'un cofacteur (NAD, NADP, NADH, NADPH) par spectrophotomètrie (λ=340 nm) (Figure 14). Les activités des enzymes du groupe B, C et D sont déterminées en 2 étapes. Une première étape aboutie à l'accumulation d'un produit : G3P ou DHAP pour les enzymes du groupe B (Figure 15); G6P ou $NADPH,H^+$ pour les enzymes du groupe C (Figure 16) et NAD pour les enzymes du groupe D (Figure 17). La quantité de produits formée est proportionnelle à la vitesse de l'enzyme étudiée. La deuxième étape consiste à mettre en place un cycle enzymatique dont la vitesse est proportionnelle à la quantité de produits formés au cours de la 1ère étape. On mesure ensuite la vitesse de ce cycle par un suivi en spectrophotométrie, ce qui nous permet de déterminer, indirectement, la vitesse de la réaction enzymatique étudiée.

1.9.2.1 Enzymes du groupe A

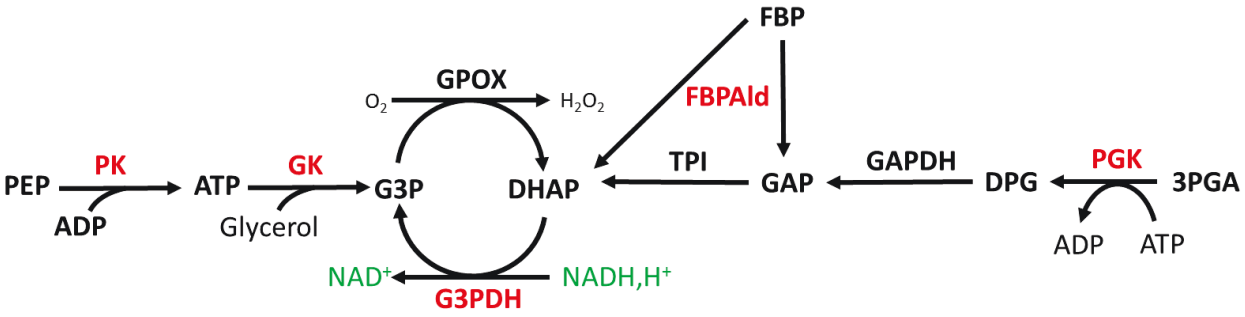


Figure 15 : Réactions enzymatiques impliquées dans la mesure de l'activité des enzymes du groupe B : GlycéroKinase (GK), Pyruvate Kinase (PK), PhosphoGlycéroKinase (PGK), Glycerol-3-Phosphate DésHydrogénase (G3PDH) et Fructose-1,6-BisPhosphate Aldolase (FBPAld). Pour une partie des enzymes étudiées un couplage avec une ou plusieurs réactions enzymatiques sont réalisées. Ce couplage est stoechiométrique, l'accumulation de G3P ou de DHAP est proportionnelle à l'activité de l'enzyme étudiée. Après la période d'incubation de la première étape, la réaction est arrêtée par l'ajout de HCl. Au cours de la 2^{e} étape, le mélange de détermination est ajouté. Celui-ci contient les enzymes Glycérol-3-Phosphate DésHydrogénase (G3PDH) et Glycerol-3-Phosphate OXidase (GPOX) qui vont former un cycle enzymatique. La vitesse de ce cycle est proportionnelle à la quantité de G3P ou de DHAP accumulé à l'issu de la 1^{e} étape. La vitesse du cycle et, indirectement, de la réaction enzymatique analysée est déterminée en suivant la disparition du NADH,H+ par la mesure de l'absorbance à 340 nm.

Pour l'ensemble des mélanges réactionnels, des tampons concentrés (5X) sont préparés à l'avance. Les composants sensibles à la congélation/décongélation sont en revanche ajoutés extemporanément.

1.9.2.1.1 Phosphoglucose isomerase

Un tampon concentré (5X) est préalablement réalisé ($MgCl_2$ 0,5 M, Tricine/KOH 0,5 M, pH 8,0, EDTA 10 mM, BSA 2,5% (m/V), Triton X100 0,25%). Cinquante µL de mélange réactionnel sont préparés par puits d'une plaque de 96 puits (20 µL tampon 5X, 6 µL $NADP^+$ 20 mM, 2 µL G6PDH classe II 50 unités.mL^{-1}, 1 µL $MgCl_2$ 1 M, 21 µL ddH_2O). A ces 50 µL de mélange réactionnel sont ajoutés 45µL de fructose-6-phosphate 5 mM (ou 45 µL de ddH_2O pour le blanc), puis 5 µL d'extrait enzymatique dilué au 1/2 (cellules non embryogènes) ou au 1/4 (cellules embryogènes). Après avoir brièvement mélangé au vortex, l'absorbance à 340 nm et à 25°C est lue jusqu'à ce qu'elle se stabilise.

1.9.2.1.2 Enolase

Un tampon concentré (5X) est préalablement réalisé ($MgCl_2$ 50 mM, Hepes/KOH 0,5 M pH 7,5, EDTA 10 mM, Triton X100 0,25%). Cinquante µL de mélange réactionnel sont préparés par puits d'une plaque à 96 puits (20 µL tampon 5X, 6 µL NADH 60 mM, 1 µL pyruvate kinase (Roche) (50 unités.mL^{-1}), 5 µL ADP 50 mM, 1 µL lactate déhydrogénase 60 unités.mL^{-1}, 21 µL H_2O). A ces 50 µL de mélange réactionnel sont ajouté 45 µL de 2 phosphoglycerate 1,5 mM (ou 45 µL de ddH_2O pour le blanc), puis 5 µL d'extrait enzymatique non dilué (cellules non embryogènes) ou dilué au 1/2 (cellules embryogènes). Après avoir brièvement mélangé au vortex, l'absorbance à 340 nm et à 25°C est lue jusqu'à ce qu'elle se stabilise.

1.9.2.1.3 Triose Phosphate isomerase

Un tampon concentré (5X) est préalablement réalisé (Hepes/KOH 0,5 M, pH 7,5, EDTA 25 mM, Triton X100 0,25%). Cinquante µL de mélange réactionnel sont préparés par puits d'une plaque à 96 puits (20 µL tampon 5X, 1 µL NADH 60 mM, 0,5 µL glycerol 3-phosphate DH (GDH) 200 unités.mL^{-1}, 28,5 µL H_2O). A ces 50 µL de mélange réactionnel sont ajoutés 45 µL de glyceraldehyde 3-phosphate 5 mM (ou 45 µL de ddH_2O pour le blanc), puis 5 µL d'extrait enzymatique dilué au 1/2. Après avoir brièvement mélangé au vortex, l'absorbance à 340 nm et à 25°C est lue jusqu'à ce qu'elle se stabilise.

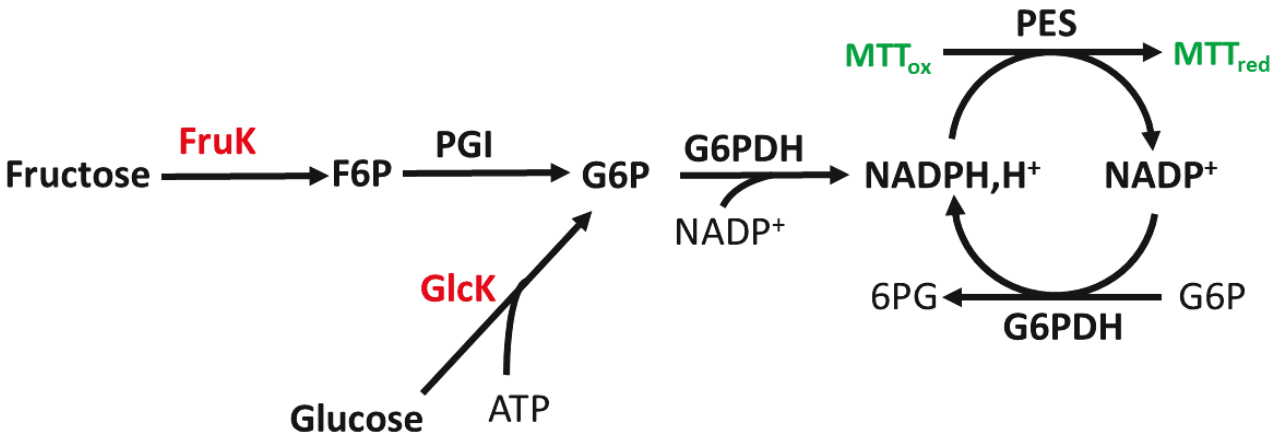


Figure 16 : Réactions enzymatiques impliquées dans la mesure de l'activité des enzymes du groupe C : FructoKinase (FruK) et GlucoKinase (GluK). En ce qui concerne la FruK, un couplage enzymatique avec la PGI est réalisé. Ce couplage est stoechiométrique, l'accumulation de G6P est proportionnelle à l'activité des enzymes étudiée. Après la période d'incubation de la première étape, la réaction est arrêtée par l'ajout de NaOH. Au cours de la 2nde étape, le mélange de détermination est ajouté. Celui-ci contient la Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PDH) et un catalyseur - la Phénazine EthoSulfate (PES) qui vont former un cycle réactionnel. La vitesse de ce cycle est proportionnelle à la quantité de G6P accumulée à l'issue de la 1^{e} étape. La vitesse du cycle, et donc indirectement, de la réaction enzymatique étudiée et déterminée en suivant la réduction du bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) par la mesure de l'absorbance à 570 nm.

1.9.2.1.4 Phosphoglucomutase

Un tampon concentré (5X) est préalablement réalisé (Tricine/KOH 0,5 M pH 8,0, EDTA 10 mM, Triton X100 0,25%, $MgCl_2$ 50 mM). Cinquante µL de mélange réactionnel sont préparés par puits d'une plaque à 96 puits (20 µL tampon 5X, 1 µL $NADP^+$ 20 mM, 2 µl G6PDH classe II (Roche) 50 unités.mL^{-1}, 2 µl glucose-1,6-bisphosphate 50 µM, 20 µL H_2O). A ces 50 µL de mélange réactionnel sont ajoutés 45µL de glucose-1P 7 mM (ou 45 µL de ddH2O pour le blanc). Puis 5 µL d'extrait enzymatique dilué au 1/2 (cellules non embryogènes) ou au 1/4 (cellules embryogènes). Après avoir brièvement mélangé au vortex, l'absorbance à 340 nm et à 25°C est lue jusqu'à ce qu'elle se stabilise.

1.9.2.2 Enzymes du groupe B, C, D

La mesure des activités enzymatiques des groupes B, C et D est réalisée en 2 étapes. Au cours de la première étape, la réaction enzymatique étudiée qui est couplée ou non à une ou plusieurs autres réactions, aboutit à la formation de G3P ou de DHAP. Ces réactions enzymatiques sont ensuite stoppées par l'ajout d'HCl ou de NaOH. Un mélange de détermination est alors ajouté, celui-ci permet de mettre en place le cycle enzymatique dont la vitesse est mesurée afin de déterminer l'activité de l'enzyme étudiée. Une gamme de standards chimiques est également réalisée. Cette gamme est composée de concentrations croissantes en produits de la réaction étudiée. Le but étant de déterminer le rapport entre la quantité de produit formé par l'enzyme étudiée et la vitesse du cycle enzymatique. Ce rapport permet alors de calculer l'activité de l'enzyme étudiée en mesurant la vitesse du cycle enzymatique.

1.9.2.2.1 Glycérokinase (GK)

Un tampon concentré (5X) est préalablement préparé (Tricine/KOH 0,5 M, pH 8,0, $MgCl_2$ 40 mM, Triton X100 0,25%, Glycerol 200mM). Seize µL de mélange réactionnel sont préparés par puits d'une plaque à 96 puits (4 µL tampon 5X, 12 µL H_2O). A ces 16 µL de mélange réactionnel sont ajoutés 2 µL d'ATP 8 mM ou de ddH2O pour le blanc. Puis 2 µL d'extrait enzymatique dilué au 1/8 (cellules non embryogènes) ou au 1/2 (cellules embryogènes) sont ajoutés. Une gamme de standards de G3P (0, 20, 50, 100 µM) est réalisée, celle-ci vise à déterminer la vitesse de réaction du cycle enzymatique en fonction de la quantité de G3P fournie. Après avoir brièvement mélangé au vortex, une incubation de 40 min à 25°C est réalisée, et 20 µL d'HCl 0,5 M / Tricine/KOH 100 mM pH 9,0 sont ajoutés dans

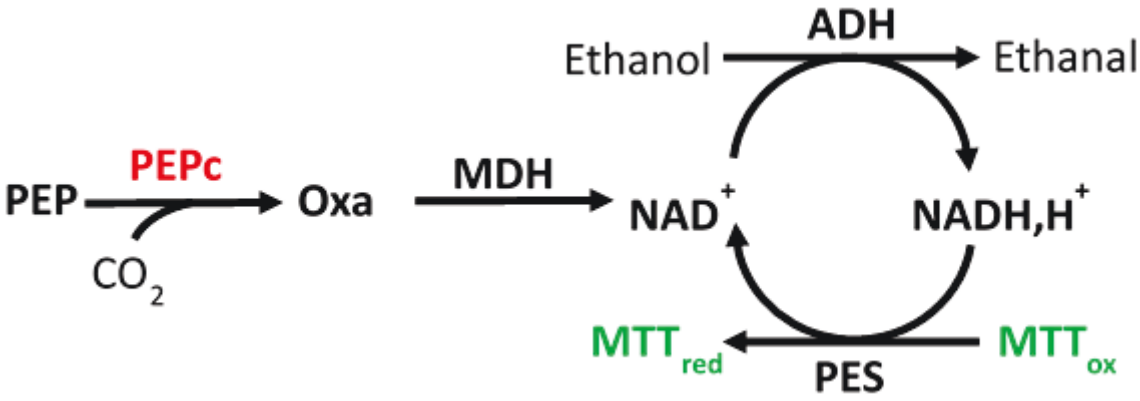


Figure 17 : Réactions enzymatiques impliquées dans la mesure de l'activité des enzymes du groupe D: PhosphoEnol Pyruvate carboxylase. Un couplage enzymatique avec la MDH est réalisé. Ce couplage est stoechiométrique, l'accumulation de NAD^+ est proportionnelle à l'activité de la PEPc. Après la période d'incubation de la première étape, la réaction est arrêtée par l'ajout de HCl. Au cours de la 2^e étape, le mélange de détermination est ajouté. Celui-ci contient l'Alcool DésHydrogénase (ADH) et un catalyseur - la phénazine éthosulfate (PES) qui vont former un cycle réactionnel. La vitesse de ce cycle est proportionnelle à la quantité de NAD^+ accumulée à l'issue de la 1^e étape. La vitesse du cycle, et donc indirectement, de la réaction enzymatique étudiée et déterminée en suivant la réduction du bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) par la mesure de l'absorbance à 570 nm.

chaque puits. Le mélange réactionnel est alors homogénéisé au vortex et incubé 10 min à température ambiante puis 20 µL de NaOH 0,5 M sont ajoutés dans chaque puits. Après avoir à nouveau mélangé au vortex, 50 µL du mélange de détermination (10 µL Tricine/KOH 1 M pH 8,0, 1 µL NADH 66 mM, 0,5 GPOX 500 $u.mL^{-1}$, 0,5 µL GDH 200 $u.mL^{-1}$, 0,2 µL $MgCl_2$ 1 M, 37,8 µL ddH_2O) sont ajoutés. Après avoir à nouveau homogénéisé le mélange réactionnel, l'absorbance à 340nm est lue jusqu'à ce qu'elle se stabilise.

1.9.2.2.2 Pyruvate Kinase (PK)

Un tampon concentré (5X) est préalablement réalisé (tricine/KOH 0,5 M, pH 8,0, $MgCl_2$ 50 mM, EDTA 2 mM, Triton X100 0,25%, KCl 0,5 M). Seize µL de mélange réactionnel sont préparés par puits d'une plaque à 96 puits (4 µL tampon 5X, 10,6 µL H_2O, 1 µL ADP 20mM, 0,2 µL AMP 100 mM, 0,2 µL glycerokinase 200 $unités.mL^{-1}$). A ces 16 µL de mélange réactionnel sont ajoutés 2 µL de phosphoenolpyruvate (PEP) ou de ddH_2O pour le blanc, puis 2 µL d'extrait enzymatique dilué au 1/2 (cellules non embryogènes) ou non dilué (cellules embryogènes). Une gamme de standards d'ATP (0, 50, 100, 200 µM) est réalisée ; celle-ci vise à déterminer la vitesse de réaction du cycle en fonction de la quantité d'ATP fournie. Le rapport entre la quantité d'ATP fourni et la vitesse du cycle permet ensuite de déterminer la quantité d'ATP formée par la glycérokinase. Après avoir brièvement mélangé au vortex, une incubation de 40 min à 25°C est réalisée, et 20 µL d'HCl 0,5 M / Tricine/KOH 100 mM pH 9,0 sont ajoutés dans chaque puits. Le mélange réactionnel est alors homogénéisé au vortex et incubé 10 min à température et 20 µL de NaOH 0,5 M sont ajoutés dans chaque puits. Après avoir à nouveau mélangé au vortex, 50 µL du mix de détermination (10 µL Tricine/KOH 1 M pH 8,0, 1 µL NADH 66 mM, 0,5 GPOX 500 $u.mL^{-1}$, 0,5 µL GDH 200 $u.mL^{-1}$, 0,2 µL $MgCl_2$ 1 M, 37,8 µL ddH_2O) sont ajoutés. Après avoir à nouveau homogénéisé le mélange réactionnel, l'absorbance à 340nm est lue jusqu'à ce qu'elle se stabilise.

1.9.2.2.3 PhosphoGlyceroKinase (PGK)

Un tampon concentré (5X) est préalablement préparé (Tricine/KOH 0,5 M pH 8,0, $MgCl_2$ 100 mM, EDTA 10 mM, Triton X100 0,25%, KCl 250 mM). Dix-sept µL de mélange réactionnel sont préparés par puits d'une plaque à 96 puits (4 µL tampon 5X, 10,6 µL H2O, 2

µL 3-phosphoglycérate (3-PGA), 2 µL Dithiothréitol (DTT), 0,4 µL NAD-GAPDH 50 mM, 0,2 µL Triose Phosphate Isomerase (TPI) 100 $u.mL^{-1}$, 0,2 µL GDH 200 $u.mL^{-1}$, 0,1 µL NADH 60 mM). A ces 17 µL de mélange réactionnel sont ajoutés 1 µL de phosphoenolpyruvate (PEP) ou de ddH_2O pour le blanc, puis 2 µL d'extrait enzymatique dilué au 1/2 (cellules non embryogènes) ou non dilué (cellules embryogènes). Une gamme de standards de DHAP (0, 50, 100, 200 µM) est réalisée ; celle-ci vise à déterminer la vitesse de réaction du cycle en fonction de la quantité de DHAP fournie. Après avoir brièvement mélangé au vortex, une incubation de 40 min à 25°C est réalisée, et 20 µL d'HCl 0,5 M / Tricine/KOH 100 mM pH 9,0 sont ajoutés dans chaque puits. Le mélange réactionnel est alors homogénéisé au vortex et incubé 10 min à température ambiante puis 20 µL de NaOH 0,5 M sont ajoutés dans chaque puits. Après avoir à nouveau mélangé au vortex, 50 µL du mix de détermination (10 µL Tricine/KOH 1 M pH 8,0, 0,5 GPOX 500 $u.mL^{-1}$, 0,5 µL GDH 200 $u.mL^{-1}$, 0,2 µL $MgCl_2$ 1 M, 37,8 µL ddH_2O) sont ajoutés. Après avoir à nouveau homogénéisé le mélange réactionnel, l'absorbance à 340nm est lue jusqu'à ce qu'elle se stabilise.

1.9.2.2.4 Glycerol-3-Phosphate DésHydrogenase (G3PDH)

Un tampon concentré (5X) est préalablement préparé (Hepes/KOH 0,5 M pH 7,0, $MgCl_2$ 50mM, Triton X100 0,25 %). Dix-sept virgule six µL de mélange réactionnel sont préparés par puits d'une plaque à 96 puits (4 µL tampon 5X, 13,2 µL H2O, 0,4 µL NADH. A ces 17,6 µL de mélange réactionnel sont ajoutés 0,4 µL de DHAP (ou de ddH_2O pour le blanc), puis 2 µL d'extrait enzymatique dilué au 1/2 (cellules non embryogènes) ou non dilué (cellules embryogènes) sont ajoutés. Une gamme de standards de G3P (0, 50, 100, 200 µM) est réalisée ; celle-ci vise à déterminer la vitesse de réaction du cycle en fonction de la quantité de G3P fourni. Après avoir brièvement mélangé au vortex, une incubation de 20 min à 25°C est réalisée, et 20 µL de NaOH 0,5 M sont ajoutés dans chaque puits. Le mélange réactionnel est alors homogénéisé au vortex, la plaque scellée et incubé à 95°C pendant 10 min. Une fois qu'elle est refroidie, la plaque est centrifugée (2 min à 2000x*g*) puis -20 µL d' HCl 0,5 M / Tricine/KOH 100 mM pH 9 sont ajoutés dans chaque puits. Après avoir à nouveau mélangé au vortex, 50 µL du mix de détermination (10 µL Tricine/KOH 1 M pH 8,0, 0,5µL GPOX 500 $u.mL^{-1}$, 0,5 µL GDH 200 $u.mL^{-1}$, 0,2 µL $MgCl_2$ 1 M, 1 µL NADH 25 mM, 37,8 µL ddH_2O) sont ajoutés. Mélanger et lire l'absorbance à 340nm jusqu'à ce qu'elle se stabilise. Après avoir

à nouveau homogénéisé le mélange réactionnel, l'absorbance à 340nm est lue jusqu'à ce qu'elle se stabilise.

1.9.2.2.5 Fructose-1,6-BisPhosphate Aldolase (FBPAld)

Un tampon concentré (5X) est préalablement préparé (Tricine/KOH 0,5 M pH 8,5, $MgCl_2$ 25 mM, EDTA 5 mM, Triton X100 0,25%). Treize µL de mélange réactionnel sont préparés par puits d'une plaque à 96 puits (4 µL tampon 5X, 8,5 µL H2O, 0,2 µL Triose Phosphate Isomerase 100 $u.mL^{-1}$, 0,2 µL glycerol-3P déshydrogénase 200 $u.mL^{-1}$, 0,1 µL NADH). A ces 13 µL de mélange réactionnel sont ajoutés 5 µL de fructose-1,6-bisphosphate à 20 mM (ou de ddH_2O pour le blanc), puis 2 µL d'extrait enzymatique dilué au 1/2 (cellules non embryogènes) ou non dilué (cellules embryogènes). Une gamme de standards de DHAP (0, 50, 100, 200 µM) est réalisée, celle-ci vise à déterminer la vitesse de réaction du cycle en fonction de la quantité de DHAP fournie. Après avoir brièvement mélangé au vortex, une incubation de 20 min à 25°C est réalisée, et 20 µL d' HCl 0,5 M / Tricine/KOH 100 mM pH 9,0 sont ajoutés dans chaque puits. Le mélange réactionnel est alors homogénéisé au vortex, la plaque scellée et incubée à 95°C pendant 10 min. Une fois qu'elle est refroidie, la plaque est centrifugée (2 min à 2000x*g*) puis 20 µL de NaOH 0,5 M sont ajoutés. Après avoir à nouveau mélangé au vortex, 50 µL du mix de détermination (10 µL Tricine/KOH 1 M pH 8,0, 0,5µL GPOX 500 $u.mL^{-1}$, 0,5 µL GDH 200 $u.mL^{-1}$, 0,2 µL $MgCl_2$ 1 M, 1 µL NADH 25 mM, 37, 3 µL ddH_2O) sont ajoutés. Après avoir à nouveau homogénéisé le mélange réactionnel, l'absorbance à 340nm est lue jusqu'à ce qu'elle se stabilise.

1.9.2.2.6 Glucokinase (GluK) et Fructokinase (FruK)

Un tampon concentré (5X) est préalablement prépapré (Tricine/KOH 0,5 M pH 8,0, $MgCl_2$ 25 mM, EDTA 5 mM, Triton X100 0,25%). Seize µL de mélange réactionnel sont préparés par puits d'une plaque à 96 puits (4 µL tampon 5X, 10,7 µL H2O, 0,4 µL G6PDH classe II 50 $u.mL^{-1}$, 0,5 µL $NADP^+$ 20 mM, 0,2 µL Glucose-6-Phosphate isomerase (pour la fructokinase uniquement) 100 $u.mL^{-1}$, 0,2 µL de glucose ou de fructose 200 mM (glucokinase et fructokinase respectivement). A ces 16 µL de mélange réactionnel sont ajoutés 2 µL d'ATP 8 mM (ou de ddH_2O pour le blanc), puis 2 µL d'extrait enzymatique dilué au 1/2 (cellules non embryogènes) ou non dilué (cellules embryogènes). Une gamme de standards de G6P ou F6P (0, 20, 50, 100 µM) est réalisée, celle-ci vise à déterminer la vitesse de réaction du cycle en

fonction de la quantité de G6P ou de F6P fournie. Après avoir brièvement mélangé au vortex, une incubation de 20 min à 25°C est réalisée, et 20 µL d' HCl 0,5 M / Tricine/KOH 100 mM pH 9,0 sont ajoutés. Le mélange réactionnel est alors homogénéisé au vortex, la plaque scellée et incubée à 95°C pendant 10 min. Une fois qu'elle est refroidie, la plaque est centrifugée (2 min à 2000x*g*) puis ajouter 20 µL de NaOH 0,5 M sont ajoutés. Après avoir à nouveau mélangé au vortex, 45 µL du mix de détermination (10 µL Tricine/KOH 1 M pH 9,0, 10 µL bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) 10 mM, 4 µL EDTA 200 mM, 2 µL G6P, 0,5 L G6PDH classe I, 18,5 µL ddH_2O) sont ajoutés. Cinq microlitres de Phenazine Ethosiulfate (PES) 4 mM sont ajoutés au dernier moment (à l'abri de la lumière). Après avoir à nouveau homogénéisé le mélange réactionnel, l'absorbance à 570nm est lue jusqu'à ce qu'elle se stabilise.

1.9.2.2.7 PEP Carboxylase (PEPc)

Un tampon concentré (5X) est préalablement préparé (Tricine/KOH 0,5 M pH 8,0, $MgCl_2$ 100 mM, $NaHCO_3$ 5 mM, Triton X100 0,25 %). Seize µL de mélange réactionnel sont préparés par puits d'une plaque à 96 puits (4 µL tampon 5X, 11,4 µL H2O, 0,4 µL NADH 5 mM, 0,2 µL malate déshydrogenase 100 $u.mL^{-1}$). A ces 16 µL de mélange réactionnel sont ajoutés 2 µL de phosphoénolpyruvate à 20 mM (ou de ddH_2O pour le blanc), puis 2 µL d'extrait enzymatique dilué au 1/2 (cellules non embryogènes) ou non dilué (cellules embryogènes). Une gamme de standards d'oxaloacétate (0, 50, 100, 200 µM) est réalisée, celle-ci vise à déterminer la vitesse de réaction du cycle en fonction de la quantité d'oxaloacétate fournie. Après avoir brièvement mélangé au vortex, une incubation de 20 min à 25°C est réalisée, et 20 µL d' HCl 0,5 M / Tricine/KOH 100 mM pH 9,0. Le mélange réactionnel est alors homogénéisé au vortex, incubé 20 min à 25°C et centrifugé (2 min à 2000x*g*).Après avoir ajouté 20 µL de NaOH 0,5 M, le mélange réactionnel est homogénéisé et 45 µL du mix de détermination (10 µL Tricine/KOH 1 M pH 9,0, 10 µL bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) 10 mM, 4 µL EDTA 200 mM, 2 µL Ethanol 50%, 1 µL Alcool déshydrogénase 2000 $u.mL^{-1}$, 18 µL ddH_2O) sont ajoutés. Cinq microlitres de Phenazine Ethosiulfate (PES) 4mM sont ajoutés au dernier moment (à l'abri de la lumière). Après avoir à nouveau homogénéisé le mélange réactionnel, l'absorbance à 570nm est lue jusqu'à ce qu'elle se stabilise.

1.9.3 Mises aux points

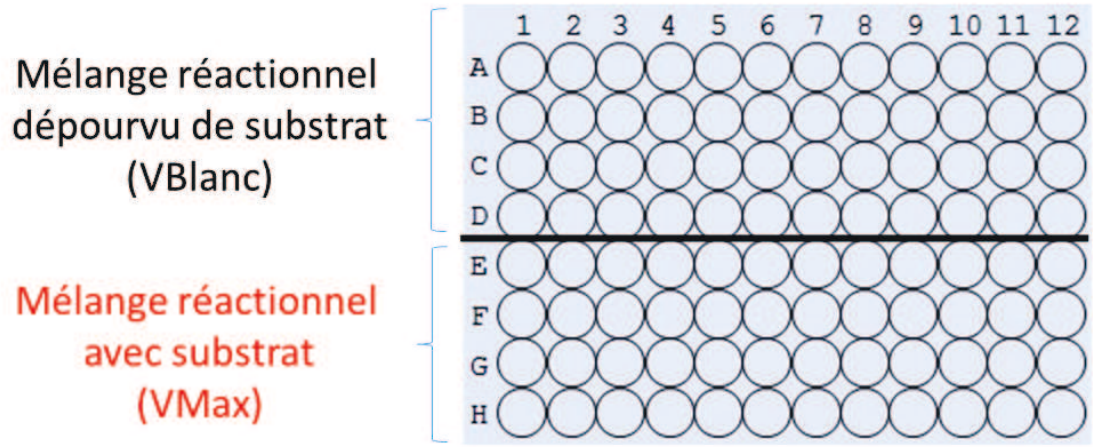


Figure 18 : Schéma d'une plaque contenant le mélange réactionnel.

Pour chaque réaction enzymatique analysée et pour chacun des 2 types cellulaires, des mises aux points sont réalisées afin de déterminer la dilution optimale de l'extrait enzymatique (non diluée, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32). Afin de contrôler l'effet de la dilution sur l'activité enzymatique, 2 paramètres sont étudiés : l'effet de la dilution sur la vitesse de la réaction et la « recovery » (ou récupération). La récupération est calculée de la façon suivante :

Récupération = *Soll wert* / *Ist wert* x 100

« *Soll wert* » correspond à la vitesse de la réaction enzymatique mesurée sur l'extrait de cellules/tissu à tester divisée par la vitesse de la réaction enzymatique mesurée sur un extrait de référence (feuille de tomate).

Ist wert correspond à la vitesse de la réaction enzymatique mesurée sur un mélange (50/50) de l'extrait à tester et de la référence.

En théorie, si la réaction est optimisée Soll wert = Ist wert et la récupération est de 100%. Cependant certains éléments de l'extrait à tester peuvent inhiber la réaction, si celui-ci est trop concentré par exemple. Dans ce cas la valeur de la « recovery » baisse. On estime que pour une dilution optimale la réaction doit avoir une « recovery » comprise entre 85 et 115 %.

1.9.4 Caractérisation des activités enzymatiques des différents échantillons

Pour chaque activité enzymatique analysée, des plaques de PCR 96 puits contenant le mélange réactionnel sont préparées manuellement comme décrit dans les protocoles ci-dessus. La moitié supérieure de la plaque correspond au blanc (mélange réactionnel dépourvu de substrat) (Figure 18). Si bien que pour chaque plaque de 96 puits ainsi préparée il est possible de tester 48 échantillons à la fois. Au cours de l'étude, nous avons utilisé 4 réplicats techniques pour chaque échantillon et 5 standards. Les standards correspondent à des échantillons de cellules non traités. Ce sont ces échantillons qui ont été utilisés pour les mises au point et qui on permit de déterminer la dilution de l'extrait enzymatique adéquate ainsi que l'activité de référence des différentes enzymes chez les cellules de Vigne utilisées. Les standards permettent de contrôler la fiabilité, avec laquelle les activités enzymatiques sont déterminées pour chaque plaque. Les tubes micronic® contenant les extraits enzymatiques sont randomisés, et les différentes dilutions nécessaires sont effectuées grâce au robot pipetteur Multiprobe II, équipé d'un incubateur, et d'une pince pour déplacer les plaques

(PerkinElmer). La dilution appropriée est ensuite utilisée pour les différentes enzymes testées. Le robot pipetteur ajoute l'extrait enzymatique dans le mélange réactionnel pour chaque enzyme analysée, agite la plaque et la place dans l'incubateur. Il ajoute ensuite la solution de HCl ou de NaOH pour les réactions B, C, D, afin de stopper les réactions enzymatiques. Le suivi de l'absorbance à 340nm ou 570nm est réalisé à l'aide des lecteurs de plaque MP96 (SAFAS). Le traitement des données est ensuite effectué à l'aide des logiciels SAFAS et PLATO.

1.10 Méthodes de biologie moléculaire

1.10.1 Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR

L'expression des gènes est évaluée en quantifiant les ADN complémentaires (ADNc) issus de la rétrotranscription des ARNm. La quantification des ADNc par la méthode de RT-qPCR est basée sur le suivi en temps réel de la fluorescence émise par un agent intercalant (SYBER Green) lorsqu'il se fixe à l'ADN double brin, au cours d'une réaction PCR. Partant du principe que l'efficacité de l'amplification est de 100%, la quantité d'ADN ciblée par les amorces utilisée double à chaque cycle de PCR et la fluorescence liée à l'agent intercalant également. Une fois que l'intensité de la fluorescence atteint un certain seuil correspondant à une quantité d'ADN donnée, le nombre de cycles de PCR nécessaire pour atteindre ce seuil (Ct) est déterminé. Etant donné qu'il y a une augmentation exponentielle du nombre de copies de l'ADNc ciblé par les amorces à chaque cycle, le Ct permet d'évaluer le nombre de copies de l'ADNc initialement présentes.

1.10.2 Extraction des ARN totaux des vitro-plants et des cellules de Vigne 41B embryogènes et non embryogènes

Les ARN totaux sont extraits à partir de 50 à 100 mg de matériel biologique broyé à l'aide du broyeur mécanique Tissue Lyser II (Qiagen) en tube de 2 mL. L'extraction des ARN est réalisée à l'aide du kit «Spectrum^{TM} Plant total RNA» (Sigma-Aldrich) suivant le protocole du fournisseur. L'élution est effectuée dans 35 µL de ddH_2O.

1.10.3 Dosage des acides nucléiques

La concentration des acides nucléiques est déterminée au spectrophotomètre «UviLight PC2» (SECOMAM) en mesurant l'absorbance à 260 nm (spécifique des acides nucléiques), à 280 nm (spécifique des protéines) et à 320 nm (absorbance correspondant à la ligne de base). Une microcuve « TrayCell » (Hëllma®, 105.800UVS) est utilisée. Cette microcuve permet de réduire le volume de la solution à doser, 5 µL d'acides nucléiques dilués au 1/10 sont utilisés pour le dosage en se servant du capuchon correspondant à un trajet optique de 1 mm. Le trajet optique étant de 1 cm sur une cuve classique, l'utilisation de la microcuve « Traycell » induit une dilution virtuelle au 1/10. Cette dilution virtuelle (1/10), ainsi que la dilution initiale de l'échantillon (1/10) sont prises en compte dans le calcul de la concentration en acide nucléiques :

Concentration ADN ($\mu g.\ \mu L^{-1}$) = $[(DO_{260}-DO_{320}) \times 50 \times 10 \times 10]/1000 = (DO_{260}-DO_{320}) \times 5$
Concentration ARN ($\mu g.\ \mu L^{-1}$) = $[(DO_{260}-DO_{320}) \times 40 \times 10 \times 10]/1000 = (DO_{260}-DO_{320}) \times 4$

Une évaluation de la contamination de l'extrait par des protéines est déterminée par le rapport DO_{260}/DO_{280}. Si ce rapport est compris entre 1,8 et 2,1, l'extrait est considéré comme suffisamment peu contaminé par des protéines.

1.10.4 Contrôle de l'intégrité des ARN sur gel d'agarose

Afin de vérifier l'intégrité des ARN extraits, 0,5 µg d'ARN totaux additionnés du tampon «Green GoTaq® Flexi Buffer» 5X (utilisé en tant que tampon de charge) sont analysés par séparation éléctrophorétique sur gel d'agarose. De l'agarose à 2% dissoute dans du TAE 1X (40 mM Tris-Acétate ; 1 mM EDTA pH 8,0) et contenant 0,5 $\mu g.mL^{-1}$ de bromure d'éthidium (BET) est utilisée pour la préparation des gels. Après 20 min de migration à 100 V dans un tampon TAE 0,5X, les ARNs sont révélés sous rayonnement UV (λ = 310 nm) avec la caméra «Infinity» (Vilber-Lourmat). La révélation permet d'observer les sous-unités 28S et 18S des ARN ribosomiques. Si ces 2 sous-unités ne sont pas dégradées, on considère que les ARNm ne le sont pas non plus.

1.10.5 Production des ADNc par rétrotranscription des ARNm

1.10.5.1 Traitement des échantillons à la DNAse I

Les échantillons d'ARN sont dans un premier temps traités à la DNAse I afin de dégrader d'éventuelles traces d'ADNg. Un microlitre de DNAse I et 1µL de son tampon

spécifique (Sigma-aldrich) sont ajoutés à 1 µg d'ARN totaux repris dans 8 µL de ddH_2O. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, 1 µL de tampon STOP est ajouté à la réaction et les tubes sont incubés pendant 10 minutes à 70°C afin de désactiver la DNAse I et d'éliminer les structures secondaires des ARN. Les tubes sont immédiatement placés dans la glace fondue afin de refroidir brusquement le mélange et de maintenir la structure ouverte des ARN avant de procéder à la rétrotranscription.

Le mélange réactionnel pour la transcription inverse (11 µL) est alors ajouté à l'extrait d'ARN (11 µL) traité à la DNAse I. La concentration finale des composantes est la suivante : oligos $(dT)_{16}$ 0,8 µM, dNTP 0,5 mM, 200 unités de la transcriptase inverse «M-MLV» (PROMEGA), tampon de l'enzyme «RT-reaction buffer» 1X (PROMEGA). Le mélange est ensuite incubé pendant 90 min à 37°C.

1.10.5.2 Contrôle de la qualité des ADNc

Afin de s'assurer que la totalité de l'ADNg a été dégradé par la DNAse I et que les ARNm ont été correctement rétrotranscrits, une PCR est réalisée sur les ADNc. Le couple d'amorces spécifiques du gène de l'actine (*VvACT*) qui a été utilisé présente la particularité d'être situé de part et d'autre d'une séquence intronique. Le produit d'amplification présente donc une taille différente suivant que la matrice est de l'ADNg ou de l'ADNc. Le mélange réactionnel (20 µL) est composé de 1,25 U de l'ADN polymérase «GoTag® Flexy» (Promega), du tampon de l'enzyme «Green GoTaq® Flexi» 1X, des amorces directe et indirecte (0,6 µM chacune), du $MgCl_2$ (2 mM), un mélange des 4 dNTP (0,25 mM chacun) et 5 µL des ADNc dilués au 1/10. L'amplification est réalisée suivant le programme suivant : une étape de dénaturation initiale (95°C, 2 min) permet de dénaturer efficacement les acides nucléiques, 35 cycles d'amplification sont ensuite réalisés. Chaque cycle est constitué d'une étape de dénaturation (95°C, 30 sec), d'une étape d'hybridation (60°C, 30 sec) au cours de laquelle les amorces se fixent sur la séquence d'intérêt et d'une étape d'élongation (72°C, 30 sec) permettant la synthèse du brin complémentaire à celui sur lequel les amorces se sont fixées. Enfin, une étape d'élongation finale (72°C, 30 sec) permet de finaliser la synthèse des brins d'ADN pour lesquels l'élongation n'a pas été complète.

La présence du seul fragment lié à l'amplification de l'ADNc est contrôlé par éléctrophorèse sur gel d'agarose 1% en utilisant 10 µL du produit de la PCR.

Tableau 1 : Amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes d'intérêt en q-RT PCR

Nom	Numéro d'accession NCBI	Séquences (5'-->3')
qVvCycA2.1	XM_010650250.1	F : CATGTTGCCAGGTCGATGTAAC R : GAATGGCTCTGACATCATACAAC
qVvCycD3.2	XM_002285284.3	F : GGCTGGCATTTCCGAACAGAAAGG R : GGGAACTGGGAACTGGGAAGAGAC
qVvACT	XM_002282480.3	F : GCATCCCTCAGCACCTTCCA R : AACCCCACCTCAACACATCTCC
qVvMSA	XM_002265554	F : GCATGTGTGCTTGTTGTGTAA R : TCACAAGGACACACAGAGAGA
qVvHT1	XM_002270328.1	F : TATATTGGTGTCGGATTGCT R : AAGAAGAACATAGGGAAAGC
qVvHT5	NM_001281278.1	F : TAGTGATGCGTCCCTCTACTCA R : CTTCCAGCAAGAGCAATCGAC
qVvNR1	NM_001281120	F : AGAGAAGCCCAACAAATACGG R : TCTCATCCCAGGCTCGAAC
qVvPLD1	NM_001280968	F : CATCCCCTGTTATGTTCCCT R : CTGCCTCTTCAGGTGTCTCA
qVvβAMY	XM_002280967	F : GAAAAGTCCAAGCCAAAGATTCC R : CCAACGCTCATATCTGTTTCC
qVvCHS	NM_001280950	F : GGGTCTGAAGGAAGAGAAACTG R : CTGGTCCGAATCCAAACAGTACC
qVvPAL1	XM_002281763	F : TGCTCCTCTCCCAATCTGT R : CCCGGACAATCTCAGGTTTTAC
qVvPR5	NM_001281159	F : GTGGCTGATCTGAACTCGAACTG R : GGGCACGCTTTCTTGAATATCTCC
qVvHMA	XM_002278506	F : CCAAAGTGCAGAGGAAAATCCAAAC R : ATGTGCCGTCCATGAAATAAAAAC
qVvHMG	XM_002273162	F : GACAAGCCACAGCAATGAAGAATG R : GCCAGACGTTCTACTTTATGTTCAAC
qVvHook	XM_002274720	F : ATTAGTTGGCTGATTCGGTAGG R : ATCACTCAGACGGTAAAACTCCA
qVvFKBP	XM_010664824	F : GAGCAGAAGACGCAAATGGAAG R : AACAGCTCAGTCAAACCTAAAGC

1.10.6 Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR

1.10.6.1 Conception des amorces spécifiques des ADNc cibles

Les séquences des amorces utilisées en RT-qPCR sont déterminées à l'aide du logiciel « *OLIGO 7* Primer Analysis Software » (Molecular Biology Insights). Celles-ci doivent répondre à plusieurs critères : une taille d'environ 20 nucléotides, une température de fusion (Tm) proche de 60°C, pas plus de 5°C d'écart entre le Tm de 2 amorces d'un même couple, une composition en GC supérieure à 40% et une capacité limitée à former des dimères d'amorces ou des structures en épingle à cheveu stables. Le produit d'amplification doit être compris entre 80 et 150 pb afin d'assurer une efficacité d'amplification optimale. Les amorces sont, dans la mesure du possible, conçues pour amplifier la séquence correspondant à la partie 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm. D'une part cette séquence est généralement moins bien conservée (donc plus spécifique) ; d'autre part la transcription inverse, amorcée par les oligos $(dT)_{16,}$ commence par synthétiser l'ADNc de l'extrémité 3' de l'ARNm. De ce fait en ciblant la séquence correspondant à la partie 3'UTR de l'ARNm, la quantification a moins de chances d'être affectée si la transcriptase inverse « se décroche » avant d'avoir fini de synthétiser le brin d'ADNc. Les amorces sont analysées à l'aide de l'outil Blast du NCBI afin de s'assurer qu'elles ne partagent pas une identité de séquence trop importante vis-à-vis d'autres séquences d'ARNm car cela risquerait d'occasionner des problèmes de spécificité. Les amorces utilisées au cours de l'étude sont résumées dans le tableau 1.

1.10.6.2 Amplification des ADNc

L'amplification des ADNc est réalisée à l'aide du thermocycleur « Realplex^2 ». La réaction se déroule dans un volume final de 15 µL, composé de 5 µL d'ADNc dilué au 1/10, du « GoTaq® PCR Mastermix » (Promega) 1X contenant l'enzyme, ainsi que des amorces directe et inverse, à 0,5 µM chacune. Le programme d'amplification est constitué d'une première étape de 2 min à 95°C permettant d'activer la polymérase et de dénaturer les hybrides double brins ARN/ADNc, suivi de 40 cycles d'amplification. Chaque cycle d'amplification comporte une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C et une étape d'hybridation/élongation de 1 min à 60°C. Une fois les 40 cycles d'amplification réalisés, le programme s'achève par une étape d'une durée de 20 minutes au cours de laquelle la température augmente progressivement de 60 à 95°C, par paliers de 0,1°C. Au cours de cette étape l'intensité de la fluorescence diminue fortement en approchant de la température de

fusion du ou des produit(s) d'amplification formés. L'analyse de la courbe de fusion ainsi déterminée permet d'observer si plusieurs produits d'amplification différant au niveau de leur température de fusion ont été obtenus. Si tel est le cas, les amorces ne sont probablement pas spécifiques ou bien forment des dimères générant des produits d'amplification.

Le logiciel « Mastercycler® ep Realplex» détermine le cycle seuil (Ct pour *Cycle threshold*) à partir duquel l'intensité de la fluorescence atteint une valeur donnée, déterminée par le logiciel. Pour chaque condition analysée, 3 réplicats techniques sont réalisés et les calculs sont effectués sur la moyenne des Ct de ces 3 réplicats.

1.10.6.3 Détermination de l'expression normalisée et de l'induction/répression

L'expression normalisée par rapport au gène de ménage et l'induction/répression par rapport à la condition témoin sont calculés à l'aide de la méthode décrite par Livak et Schmittgen (2001).
L'expression normalisée et l'induction/répression sont calculées à l'aide des formules suivante :

Expression normalisée : $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct\ gène\ cible - Ct\ gène\ de\ ménage)}$

Induction/Répression : $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct\ condition\ traitée - \Delta Ct\ condition\ témoin)}$

L'induction ou la répression sont ensuite transformées par la fonction $\log_2$.

1.10.6.4 Détermination de l'efficacité des amorces

L'efficacité des amorces est déterminée en réalisant des PCR en temps réel sur une série de dilution d'un même ADNc (1/5, 1/10, 1/20, 1/100). Un graphique représentant le Ct en fonction du $\log_{10}$ de la dilution est réalisé. La «pente» correspondant au coefficient directeur de la régression linéaire de la fonction Ct=f(log dilution) est ensuite déterminée. L'efficacité (en %) est ensuite calculée grâce à la formule suivante:

$E = 10^{(-1/pente)} - 1 \times 100$

Les amorces retenues au cours de l'étude ont toutes une efficacité comprise entre 90 et 110%.

1.11 Analyse comparative du préotéome nucléaire des cellules embryogènes et non embryogènes

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Functional Genomic Center Zürich (Suisse).

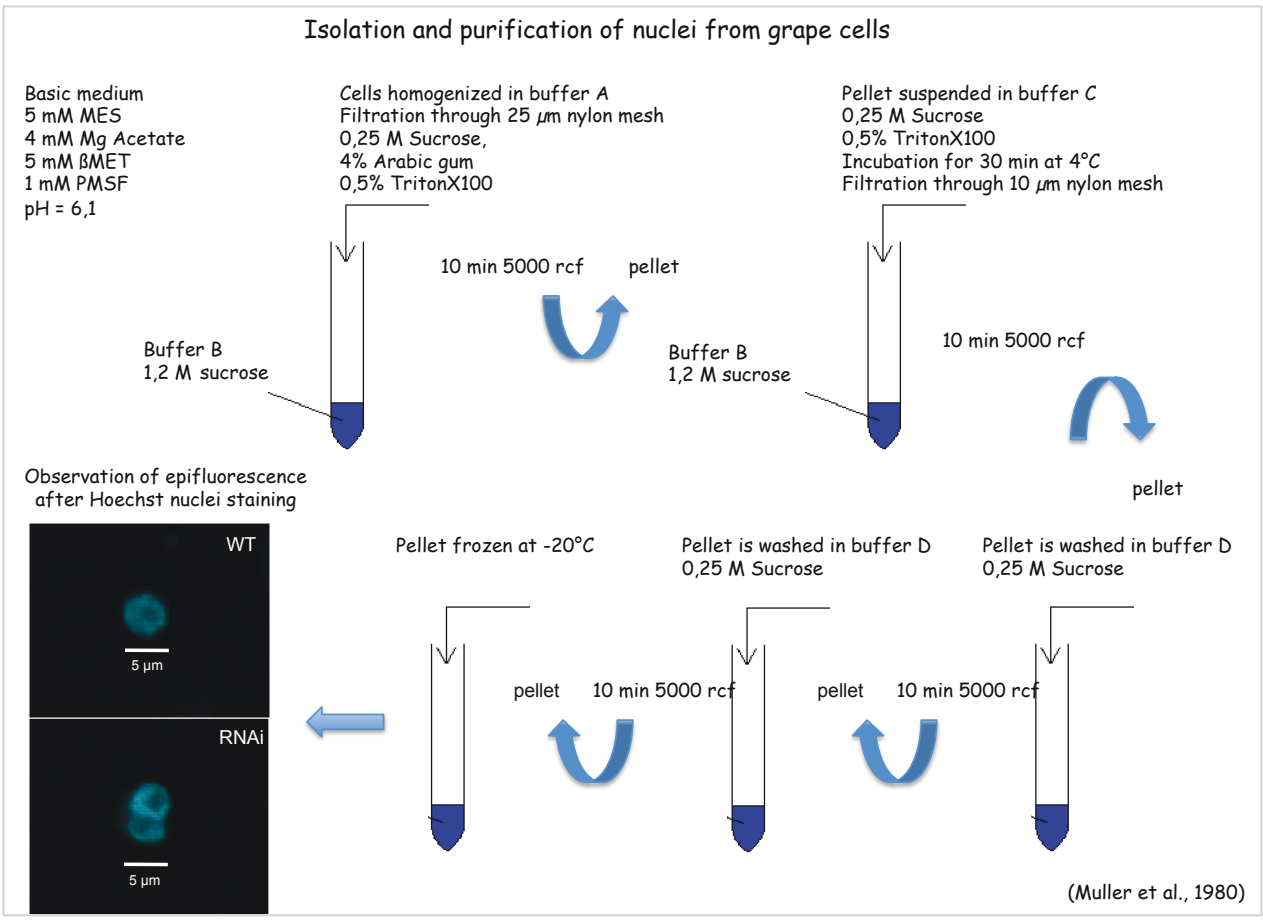


Figure 19 : Schéma illustrant les étapes de l'isolement des noyaux à partir des cellules embryogènes 41B de Vigne (Adapté de Muller et al. 1980).

1.11.1 Isolement des noyaux des cellules embryogènes 41B WT et 35S::VvMSA-RNAi

L'isolement des noyaux a été réalisé d'après le protocole adapté de (Muller et al. 1980) (Figure 19). Quatre à cinq g de cellules 41B embryogènes filtrées sont broyées à sec dans un mortier préalablement refroidi (4°C) et placé sur glace au cours du broyage. Le broyat est repris dans 2 x 12,5 mL de tampon A (Annexe 10) en rinçant bien le mortier. Le tout est homogénéisé à l'aide d'un potter rotatif (Sorvall), à 12000 tours.min^{-1}, 3 x 20 sec, en maintenant le bol du mortier dans la glace. L'extrait ainsi obtenu est ensuite filtré à l'aide d'une membrane de nylon (mailles de diamètre 25 µm). Le filtrat est ensuite déposé sur 25 mL de tampon B (Annexe 10) puis centrifugé 10 min, à 5000x*g*, à 4°C (Eppendorf 5804 R). Le culot est resuspendu dans 20 mL de tampon C (Annexe 10). Après 30 min d'incubation à 4°C sur glace et sous agitation (table rotative), l'extrait est filtré sur une membrane de nylon (mailles de diamètre 10 µm). Le filtrat est déposé sur 25 mL de tampon B, centrifugé 10 min à 5000x*g* à 4°C (Eppendorf 5804 R). Le culot est alors lavé 2 fois dans 20 mL de tampon D (Annexe 10). Après une centrifugation de 10 min à 5000x*g* à 4°C (Eppendorf 5804 R), le culot contenant les noyaux est congelé à -20°C pour la nuit. Les noyaux peuvent être conservées plus longtemps à -20°C dans 5 mL de tampon D agrémenté de glycerol (20% V/V final).

Avant de stocker les noyaux à -20°C, leur intégrité est contrôlée grâce à la coloration de Hoechst qui permet de visualiser l'ADN, et donc les noyaux, en microscope de fluorescence.

1.11.2 Extraction différentielle des protéines nucléaires

Le protocole appliqué pour l'extraction des protéines est adapté de (Murray and Key 1978) (Figure 20). Afin d'obtenir un maximum de protéines et dans le meilleur état de conservation possible, l'extraction des protéines nucléaires est réalisée en trois étapes aboutissant à trois fractions. La 1ère fraction correspond aux protéines de la matrice nucléaire et liées d'une manière non stable à la chromatine. La 2ème fraction est constituée des protéines associées à la chromatine : histones et autres protéines solubles dans l'acide. La 3ème fraction regroupe la majorité des protéines non-histones de la chromatine.

Fraction 1

La 1ère étape consiste à reprendre les noyaux dans un tampon composé de NaCl 0,15 M, β-mercaptoéthanol 10 mM, Tris/HCl 0,01 M, pH 7,5. Les tubes sont maintenus sur glace sous

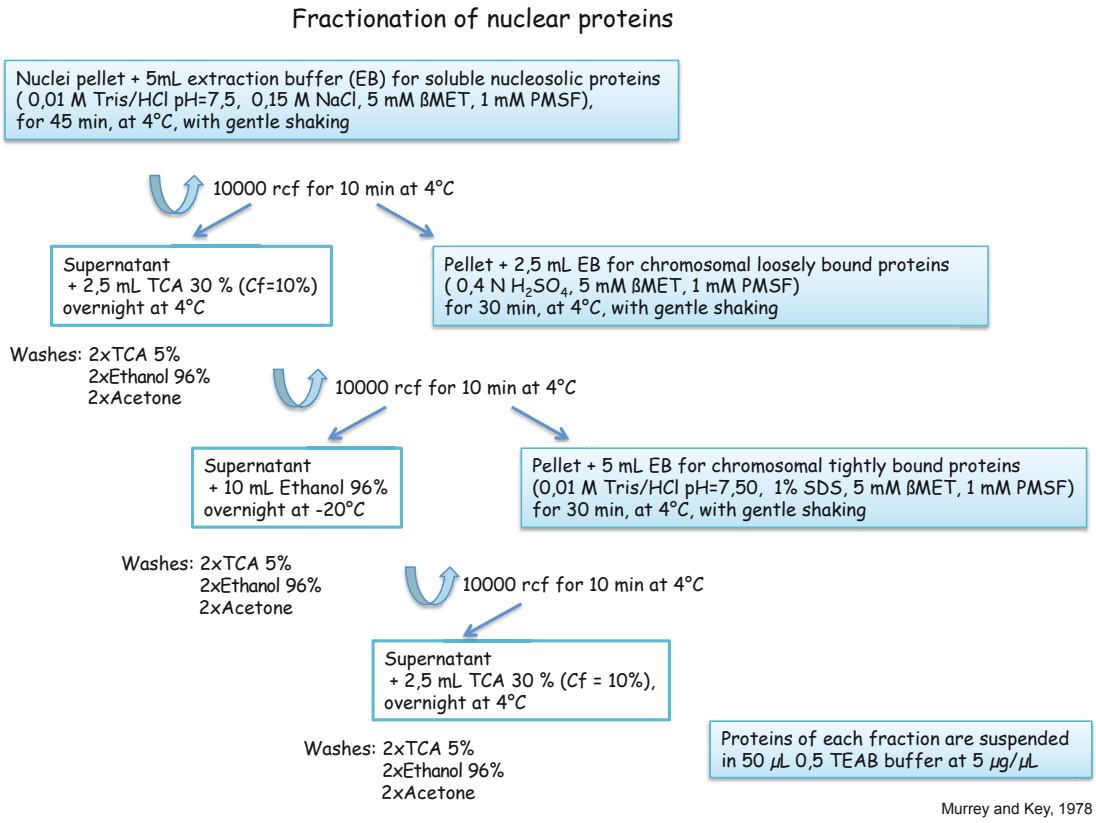


Figure 20 : Schéma illustrant les étapes de l'extraction différentielle des protéines nucléaires.

agitation pendant 30 min. Après centrifugation (30 min, 13000x*g*, 4°C) le surnageant est récupéré et les protéines précipitées en ajoutant de l'acide trichloroacétique (TCA) à une concentration finale de 10%.

Fraction 2

Le dépôt restant après l'extraction de la 1ère fraction protéique est repris dans une solution de H_2SO_4 0,4 M et de β-mercaptoéthanol 10 mM. Les extraits sont maintenus sur glace sous agitation pendant 30 min. Après centrifugation (30 min, 13000x*g*, 4°C), le surnageant est récupéré et les protéines qu'il contient sont précipitées avec 4 volumes d'éthanol absolu pendant 24 h à -20°C.

Fraction 3

Le dépôt obtenu à l'issu de la 2ème extraction est resuspendu dans une solution constituée de SDS 2%, de β-mercaptoéthanol 10 mM dans du Tris/HCl 0,01M, pH 7,5. L'extrait est incubé 3 min dans un bain bouillant. Après centrifugation (30 min, 13000x*g*, 4°C), les protéines du surnageant sont précipitées en ajoutant du TCA à une concentration finale de 10%.

Les protéines précipitées issues de chaque fraction sont reprisent dans un tampon TEAB (Triethylammonium bicarbonate), pH 8,5, SDS 0,1%. La teneur en protéines de chaque fraction a été déterminée par la méthode de Bearden (Bearden, 1978).

1.11.3 Principe de la quantification des protéines par le marquage iTRAQ 8-plex

Le marquage iTRAQ (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification) est réalisé sur les peptides issus de la digestion des protéines par la trypsine. L'étiquette iTRAQ est composée de 3 parties (Figure 21). Le groupement réactif de l'étiquette forme une liaison covalente avec les amines primaires présentes à l'extrémité N-terminale des peptides et des chaînes latérales des lysines. Un groupement rapporteur de masse variable : 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 ou 121 Da permet de marquer spécifiquement les peptides du chacun des 8 échantillons. On n'utilise pas de groupement rapporteur de 120 Da car cette masse correspond à celle d'un des ions immonium libérés par la phénylalanine. Ce marquage différentiel permet de quantifier en parallèle jusqu'à 8 échantillons au cours d'une seule expérimentation. Un

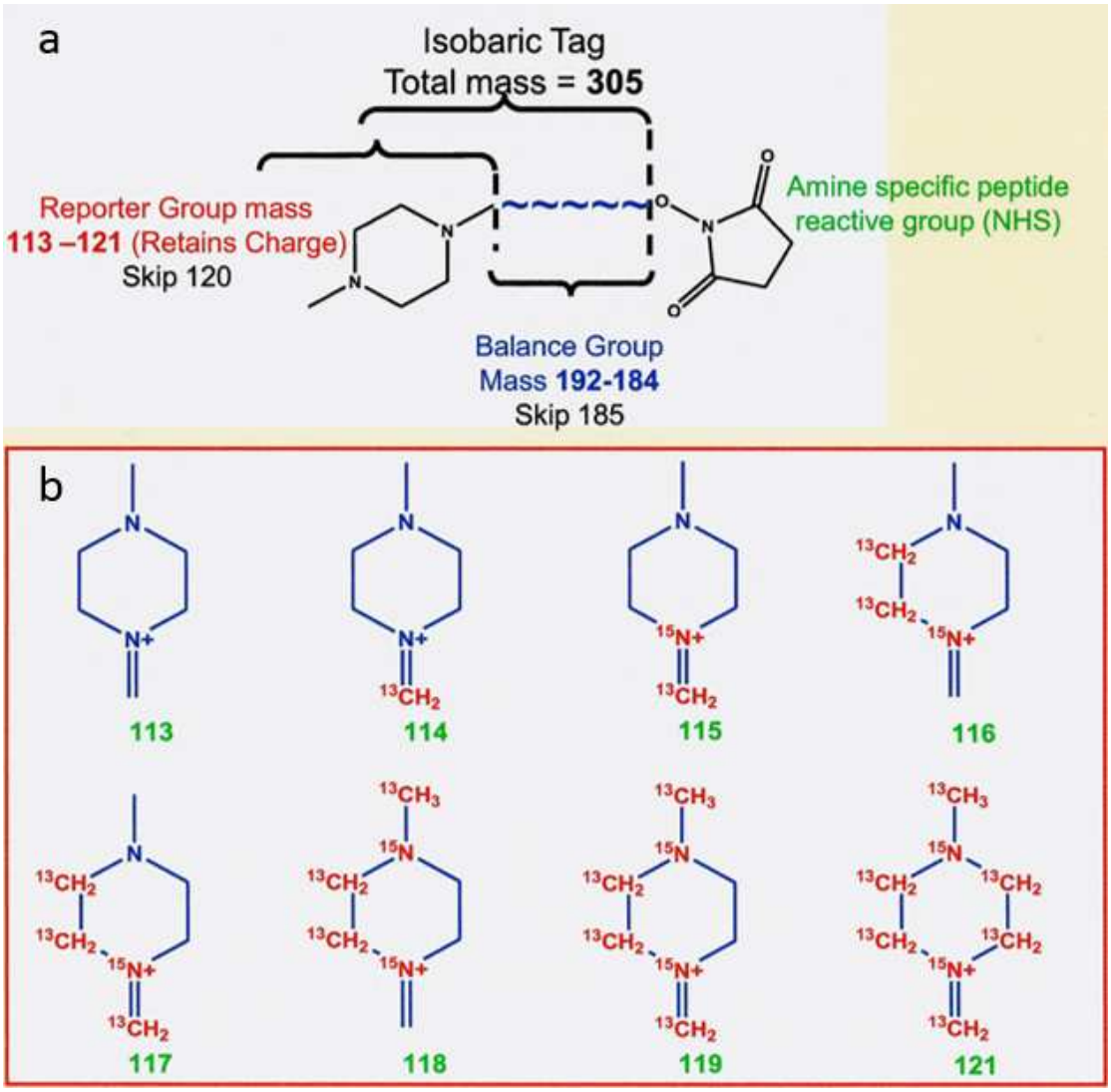


Figure 21 : **a.** Etiquette iTRAQ composée de trois groupes : le groupe réactif « Amine specific reactive group » permet la fixation de l'étiquette au niveau de la partie N-ter des peptides ; le groupe rapporteur « Reporter Group » de 113 à 121Da permet le marquage différentiel les peptides issus d'échantillons différents ; le groupe balance « Balance group » de 184 à 192 Da rééquilibre la masse globale de l'étiquette de manière à ce que la masse totale de l'ensemble : groupe rapporteur et groupe balance soit toujours de 305 Da. **b.** Formule chimique des différents groupes réactifs des étiquettes iTRAQ 8plex (113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121 Da), (d'après S. Uttenweiler 2007).

groupement « balance » permet de rééquilibrer la différence de masse liée au groupement rapporteur. De ce fait, 2 peptides identiques dans 2 échantillons différents auront la même masse malgré le marquage différentiel lié au groupement rapporteur. Une fois qu'ils sont marqués, les peptides des 8 échantillons sont mélangés puis fractionnés par chromatographie en phase liquide de haute performance (HPLC) et analysés par spectrométrie de masse en tandem. L'ensemble des peptides + étiquettes sont ionisés et séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) au cours d'une première étape de spectrométrie de masse. Au cours de cette étape un même peptide-ion issu de différents échantillons n'est pas séparé. Chaque peptide-ion est ensuite isolé, fragmenté et analysé au cours d'une deuxième étape de spectrométrie de masse. La fragmentation des peptides + étiquette permet de libérer le groupement rapporteur ; la différence de masse des groupements rapporteurs attribués aux différents échantillons permet alors de les différencier et de quantifier le peptide identifié pour chaque échantillon (Figure 22). Les protéines, desquelles sont issues les peptides quantifiés, sont identifiées en interrogeant différentes bases de données (Uniprot, Génoscope...). En comparant le profil de digestion par la trypsine des protéines prédites dans la base de données aux peptides identifiés par l'analyse de spectrométrie de masse en tandem, une partie des peptides est identifiée comme caractéristique d'une protéine donnée. L'analyse des données a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel Scaffold Q+ Version 3.0 (Proteome software) et Excel.

1.11.4 Annotation fonctionnelle des protéines identifiées

Afin d'attribuer une fonction putative aux différentes protéines identifiées (1086), leurs séquences ont été comparées aux bases de données protéiques de : UniProt, SwissProt et NCBI. Les protéines présentant une identité de séquence élevée avec des protéines de fonction connues ont été annotées.

1.12 Analyse statistiques

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel libre R et du module R-Commander. Le plugin FactoMineR a été utilisé pour réaliser les analyses en composante principale (ACP).

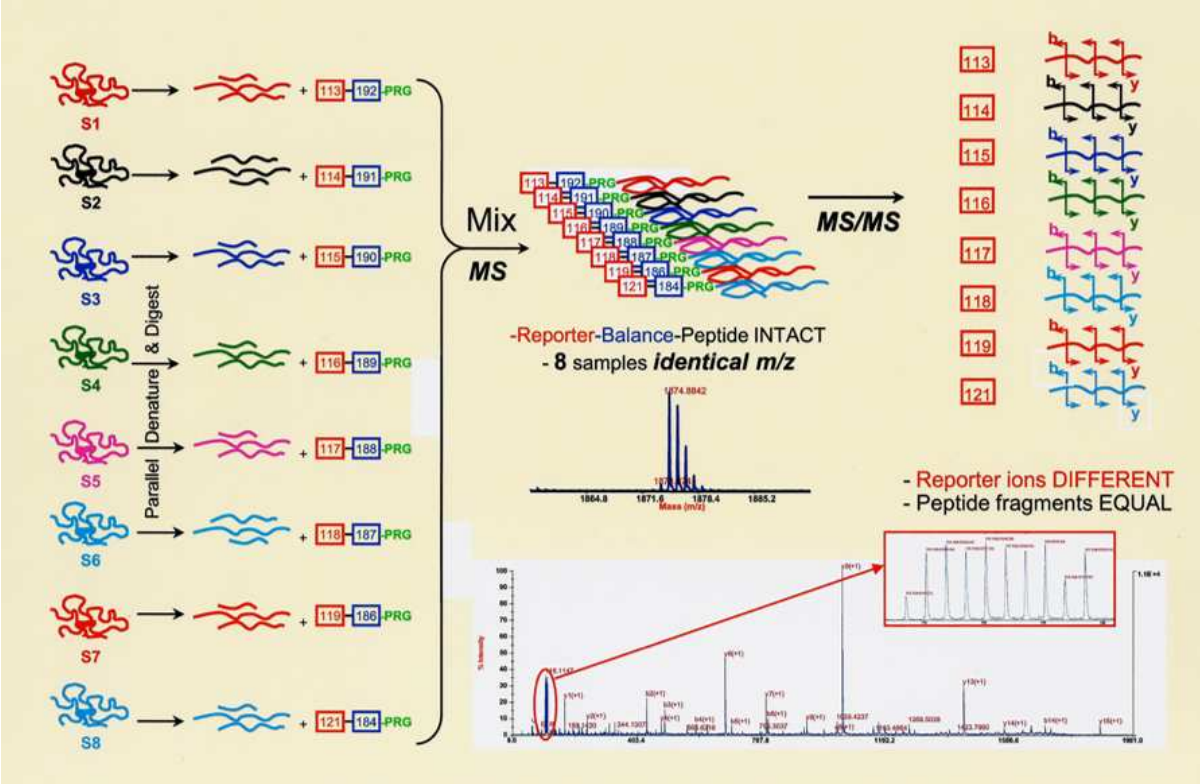


Figure 22 : Schéma descriptif de la technique iTRAQ 8plex. Huit échantillons différents sont digérés par la trypsine. Les peptides sont ensuite marqués par les étiquettes isobariques et regroupés. L'analyse en LC/MS permet de séparer les peptides avec la totalité de l'étiquette iTRAQ, les mêmes peptides présents dans plusieurs échantillons ne sont donc pas séparés à cette étape. Après co-fractionnement de chaque peptide, l'analyse en MS/MS induit une fragmentation des peptides et libère les groupements rapporteurs. La différence de masse des groupements rapporteurs attribués aux différents échantillons permet alors de les différencier et de quantifier le peptide identifié pour chaque échantillon, (d'après S. Uttenweiler, 2007).

Résultats-Discussions

Tableau 2 : Récapitulatif des étapes ayant permis la création des suspensions de cellules non embryogènes sauvages (WT), surexprimant VvMSA (*35S::VvMSA*) et *35S::VvMSA*-RNAi. En rouge sont indiquées les étapes retenues pour la mise en place des cultures cellulaires utilisées dans l'étude.

Suspensions cellulaires non embryogènes

I.Initiation : feuilles vitro-plants ⟶ Murashige-Skoog, 2,4-D/kinétine, 30 $g.L^{-1}$ saccharose = M14

1.Maintien ⟶ M14, 2,4-D/kinétine, 30 $g.L^{-1}$ saccharose = survie sans cloisonnement

2. Maintien ⟶ Gamborg, ANA, 20 $g.L^{-1}$ saccharose = division initiale, puis survie

3. Maintien ⟶ Gamborg, ANA/BAP, 20 $g.L^{-1}$ saccharose =prolifération + amas cellulaires

II. Initiation : tiges vitro-plants ⟶ Murashige-Skoog, 2,4-D/kinétine, 30 $g.L^{-1}$ saccharose = M14

1. Maintien ⟶ Gamborg, $ANA/BAP_{1/2}$, 20 $g.L^{-1}$ saccharose = peu/pas de croissance

2. Maintien ⟶ Gamborg, ANA/BAP, 20 $g.L^{-1}$ saccharose = prolifération + amas cellulaires

3. Maintien ⟶ M14, ANA/BAP, 30 $g.L^{-1}$ saccharose = WT + VvMSA-RNAi homogènes, mais 35S::VvMSA dégénératio

à tester Maintien ⟶ M14, ANA/BAP, 20 $g.L^{-1}$ saccharose

Concentrations : 2,4-D
kinétine
ANA
BAP

1.1 Chapitre I : Caractérisation des modèles cellulaires

1.1.1 Intérêts et limites de la culture cellulaire

Contrairement à une plante constituée de différents organes, tissus et types cellulaires, exposés à divers signaux, une culture cellulaire représente une population de cellules relativement uniformes et soumises aux mêmes conditions environnementales. L'utilisation de cultures cellulaires permet de limiter le nombre de facteurs exogènes susceptibles d'influencer la réponse biologique liée à un stimulus, dont on souhaite analyser l'effet. Dans le cas de la signalisation glucidique, l'utilisation de cultures cellulaires est particulièrement intéressante, car elles se prêtent facilement à l'application d'effecteurs des voies de signalisations étudiées. Pour cette raison, un grand nombre d'études portant sur la signalisation glucidique chez les plantes ont été envisagées au travers d'approches de type pharmacologique consistant à traiter des cultures cellulaires par différents effecteurs glucidiques (Yu et al. 1991; Graham et al. 1994; Godt et al. 1995; Ehness et al. 1997; Cheng et al. 1999; Fujiki et al. 2000; Vitrac et al. 2000; Ho et al. 2001; Sinha et al. 2002; Conde et al. 2006; Pavoković et al. 2007; Yim et al. 2012). Ce type d'analyse permet de mettre en lumière des mécanismes de régulation, qui restent cependant dépendants des conditions expérimentales (composition des milieux nutritifs, conditions physiques de la culture – lumière, température, caractéristiques physiologiques des cellules - cellules chlorophylliennes ou non, etc.). D'autre part, les cellules en culture présentent des mécanismes de fonctionnement fondamentalement différents de ceux des cellules au sein d'une plante entière. C'est pourquoi, même s'il est hasardeux de transposer directement aux plantes les observations réalisées sur des cellules en culture, ces dernières apportent des informations importantes quant aux signalisations impliquées dans le fonctionnement cellulaire. Les connaissances ainsi acquises permettent de mieux appréhender les mécanismes de réponse de la plante aux signaux hormonaux et métaboliques.

I.2 Modèles biologiques

A mon arrivée au laboratoire, nous avions à disposition trois suspensions de cellules embryogènes de Vigne (41B) et des vitroplants régénérés à partir de ces cellules : sauvages (WT), et transformées pour la surexpression (*35S::VvSMSA*) ou la répression (*35S::VvMSA-RNAi*) de *VvMSA*. L'étude de la signalisation glucidique étant fortement influencée par les conditions de l'analyse et les caractéristiques physiologiques du modèle, il nous a semblé

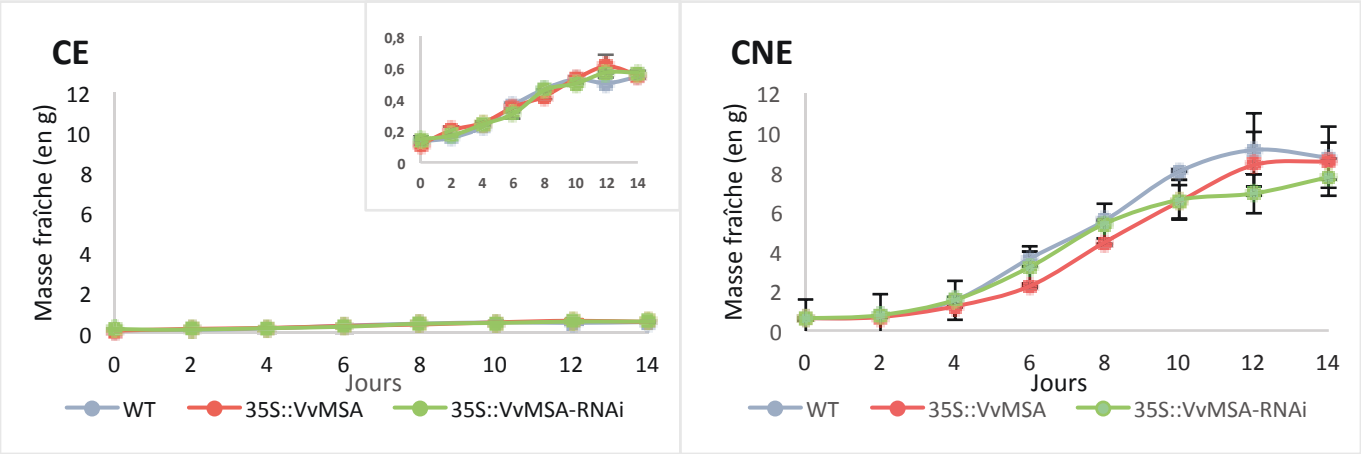


Figure 23 : Cinétique de croissance des cellules 41B embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE) suivie durant 14 jours. Huit erlenmeyers contenant 25mL de suspensions cellulaires ont été repiqués à l'identique à J0. Tous les deux jours les cellules d'un erlenmeyer sont prélevées, filtrées et leur masse fraîche déterminée. Les résultats présentés ici correspondent à la moyenne (± erreur standard) de deux répétitions biologiques indépendantes.

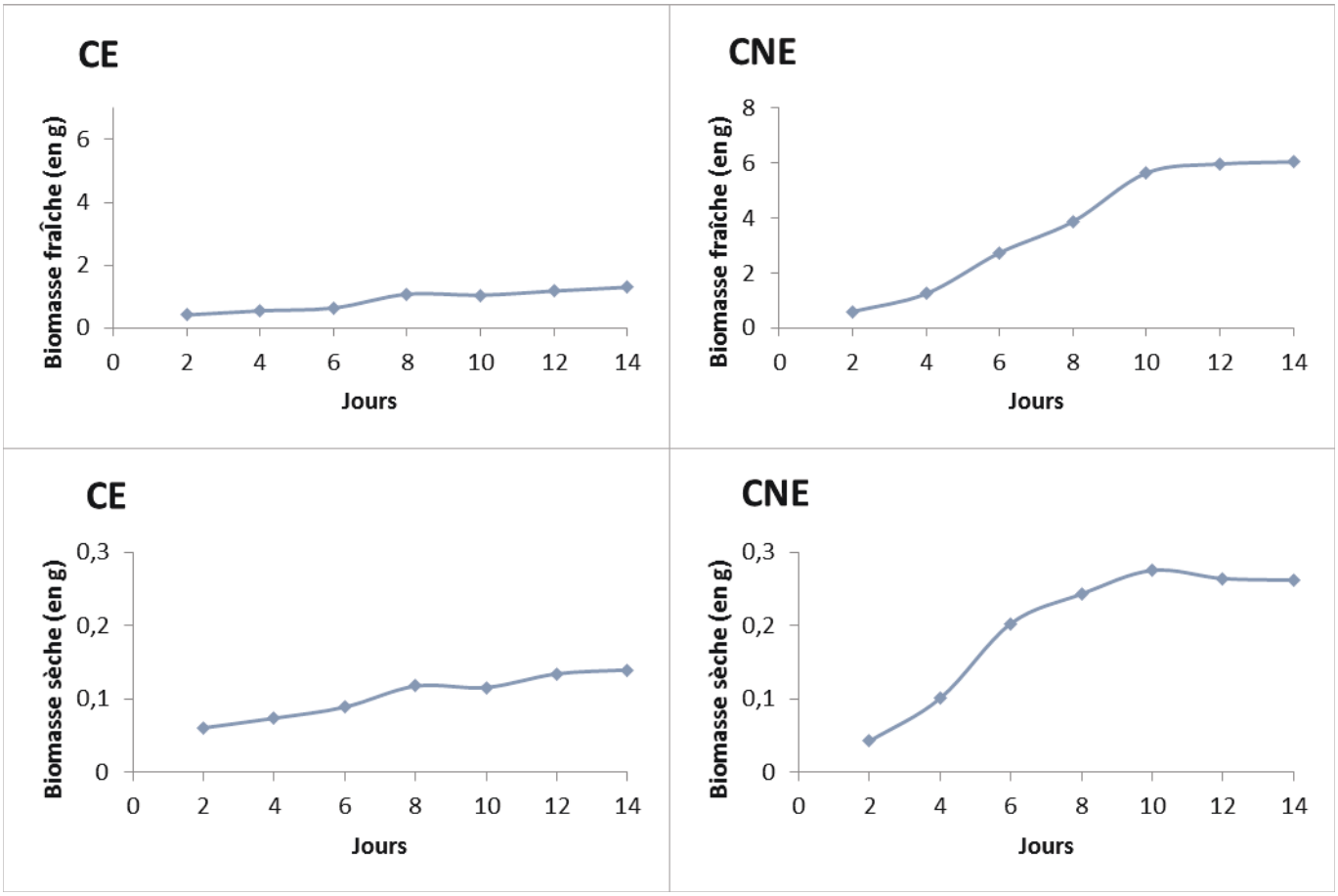


Figure 24 : Evolution de la biomasse fraîche et sèche chez les cellules embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE) sauvages suivie durant 14 jours. Huit erlenmeyers de suspensions cellulaires ont été repiqués à l'identique à J0. Tous les deux jours les cellules d'une fiole Erlenmeyer sont prélevées, filtrées et leur masse fraîche déterminée. Ces mêmes cellules sont placées 48h à l'étuve à 80°C et leur masse sèche est déterminée. Chaque prélèvement correspond à 50 mL de suspension pour les cellules embryogènes et 25 mL de suspension pour les cellules non embryogènes. Les résultats présentés correspondent à une seule répétition

intéressant de développer notre projet dans deux systèmes biologiques. Dans cette optique, nous avons dans un premier temps généré des suspensions de cellules non embryogènes à partir des vitroplants (WT, *35S::VvMSA*, *35S::VvMSA-RNAi*).

1.1.2 Mise en place de cultures de cellules non-embryogènes

Afin de créer des suspensions de cellules non embryogènes, sauvages et génétiquement modifiées pour la surexpression (*35S::VvMSA*) ou la répression (*35S::VvMSA-RNAi*) de VvMSA, nous avons utilisé les vitroplants régénérés à partir des cellules embryogènes correspondantes.

Deux stratégies ont été envisagées :

- Une stratégie indirecte d'induction de la callogenèse à partir de fragments de feuilles ou de tiges de vitroplants visant à obtenir des cals friables et à les mettre en suspension dans un milieu liquide, sous agitation, afin de produire des cultures cellulaires.

- Une stratégie directe, d'initiation des suspensions cellulaires en plaçant les fragments de feuilles ou de tiges de vitroplants en milieu liquide, sous agitation, et sous l'effet d'une balance hormonale en faveur des auxines induisant la prolifération cellulaire.

Nous avons retenu la seconde stratégie, car elle a permis d'obtenir une suspension cellulaire beaucoup plus rapidement que la première. En revanche, l'obtention de suspensions présentant un rythme de croissance satisfaisant à nécessité de nombreuses mises au point : huit milieux de cultures différents, différentes conditions d'agitation et fréquences de repiquage, ont été testés. Le milieu M14 (Annexe 2), utilisé pour initier les suspensions ne permet pas d'induire une multiplication cellulaire soutenue. Les cellules se maintiennent en vie mais la division cellulaire est très faible. Les observations au microscope montrent que les cellules sont de grande taille et allongées, ce qui semble indiquer un défaut dans le cloisonnement au cours de la division cellulaire. Parmi les milieux testés, le transfert des cellules sur le milieu Gamborg ANA (Annexe 14) a permis d'initier une forte multiplication cellulaire mais celle-ci s'estompe après environ un mois de culture. Nous avons ensuite transféré les cellules sur le milieu Gamborg ANA/BAP comparable au milieu Gamborg ANA mais complémenté avec des cytokinines (BAP 1mg.L^{-1}), afin de stimuler le cloisonnement cellulaire. L'utilisation de ce milieu nous a permis d'obtenir des suspensions cellulaires WT, *35S::VvMSA* et

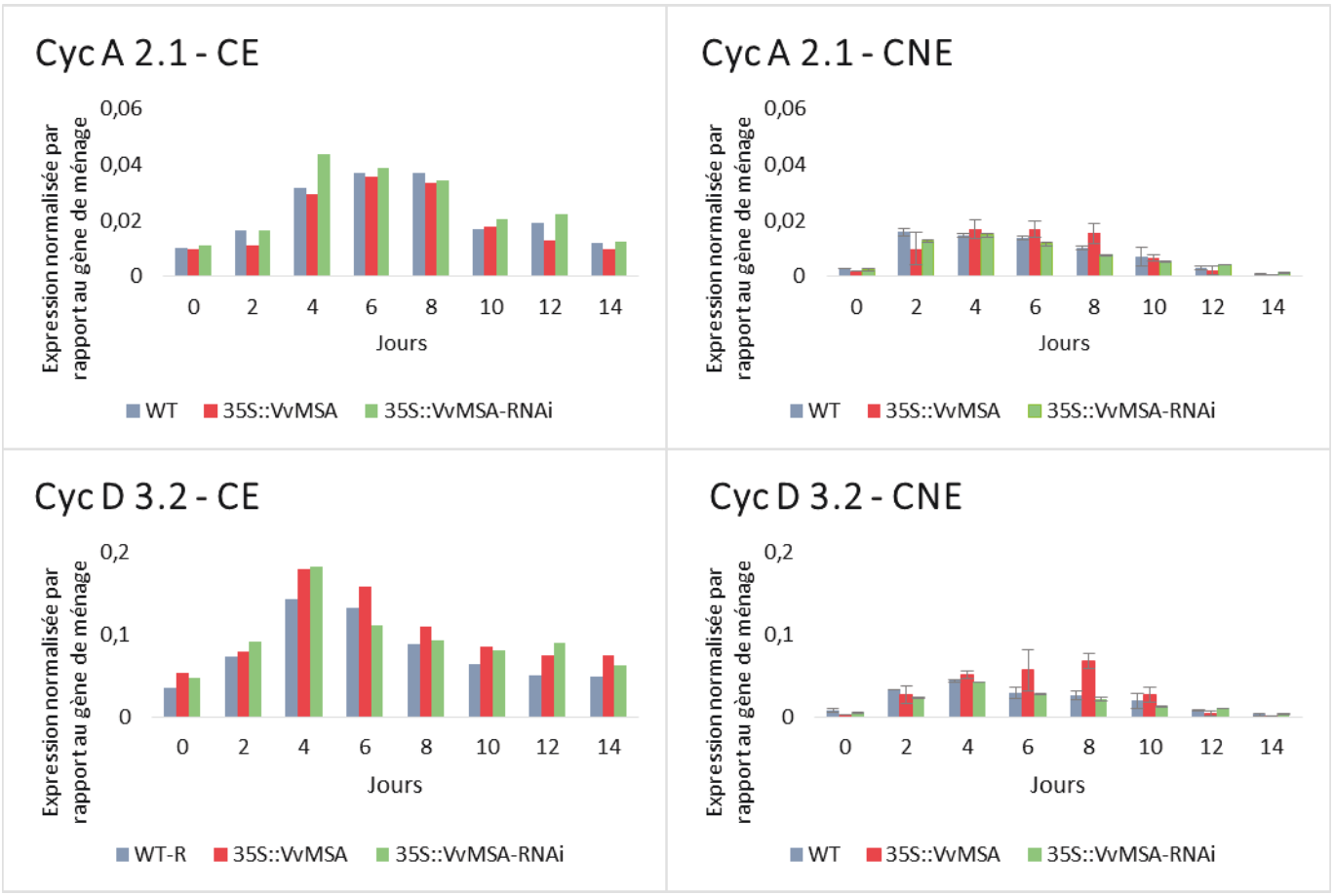


Figure 25 : Analyse de l'expression des cyclines A2.1 et D3.2 au cours de la cinétique de croissance des cellules 41B embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE) suivie durant 14 jours. L'expression des gènes étudiés est normalisée vis-à-vis de l'expression du gène de ménage Actine. L'expression normalisée est calculée suivant la méthode du 2-ΔCt. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de deux répétitions biologiques (cellules non embryogènes) ou d'une seule répétition biologique (cellules embryogènes).

35S::VvMSA-RNAi présentant un rythme de croissance semblable avec un passage sur milieu frais, tous les 14 jours.

Forts de cette réussite, nous avons initié à nouveau les suspensions cellulaires en plaçant des fragments de tiges de vitroplants dans du milieu M14 liquide. Au bout d'un mois, après leur dispersion, les cellules ont été transférées et maintenues dans du milieu Gamborg ANA/BAP, avec passage sur du milieu frais toutes les deux semaines.

Une particularité de cette culture réside dans sa propension à former des agglomérats de cellules qui nuisent à son homogénéité. Ce phénomène a également été observé par Wang et collaborateur lors du passage d'une suspension cellulaire de patate douce d'un milieu à base « Murashige-Skoog » (MS) vers un milieu à base « Gamborg » (Wang et al. 1999). Nous avons essayé d'acclimater les cellules cultivées dans le milieu Gamborg ANA/BAP à un milieu présentant une base « Murashige-Skoog », en conservant les mêmes phytohormones et leurs concentrations. Les cellules sauvages (WT) et *35S::VvMSA-RNAi* se multiplient bien dans ce milieu et ne forment plus d'agglomérats cellulaires. Cependant, les cellules *35S::VvMSA* ont vu leur prolifération cellulaire diminuer au fil des passages jusqu'à l'arrêt complet de la croissance. Nous avons donc réalisé l'ensemble des expérimentations sur les cellules non embryogènes en les maintenant sur le milieu Gamborg ANA/BAP (Tableau 2).

Cependant, après une nouvelle tentative d'initiation de la suspension de cellules non embryogènes *35S::VvMSA*, nous avons réussi à maintenir une prolifération cellulaire importante dans le milieu M14 ANA/BAP. La transition vers le milieu M14 ANA/BAP constitue donc une amélioration du protocole initial, ce qui devrait s'avérer utile à l'avenir pour la création de cultures de cellules non embryogènes de Vigne.

1.1.3 Caractérisation des cellules embryogènes et non embryogènes 41B de Vigne

Une fois les cultures de cellules non embryogènes créées, nous avons entrepris de caractériser leurs spécificités vis-à-vis des cellules embryogènes. Dans un 1er temps, nous avons évalué la prolifération des cellules en culture par des mesures de masse fraîche et sèche tous les deux jours. En parallèle, une évaluation de l'activité du cycle cellulaire par l'analyse de l'expression génique des cyclines A2.1 et D3.2 a été réalisée dans les mêmes conditions. L'utilisation des principales sources de carbone a été déterminée en mesurant l'évolution des

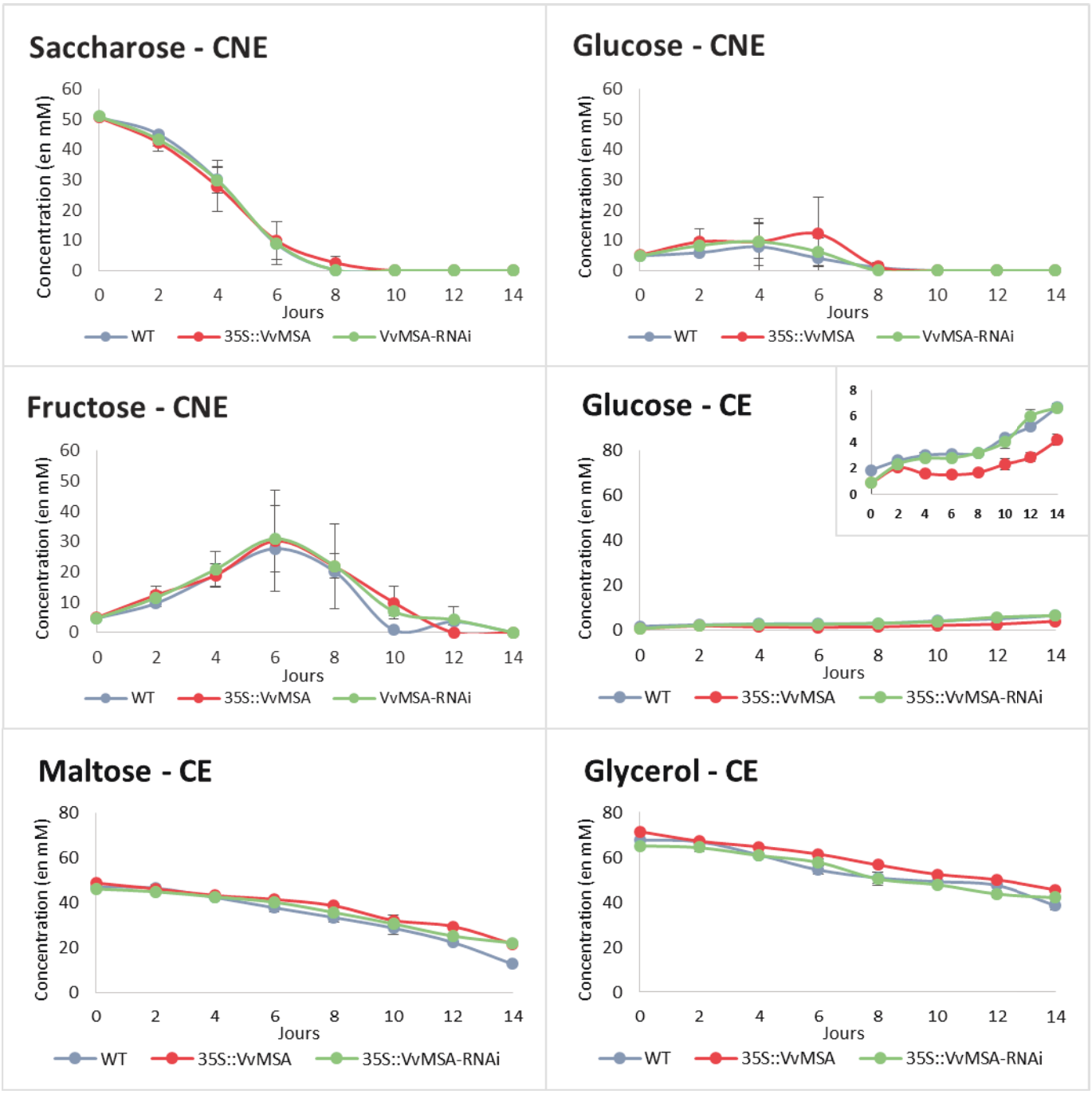


Figure 26 : Evolution des concentrations en sucres solubles et en glycerol dans le milieu de culture des cellules non embryogènes (CNE) et embryogènes (CE) au cours de la cinétique de croissance suivie durant 14 jours. Les principaux sucres solubles (saccharose, glucose, fructose, maltose) ainsi que le glycerol présents dans le milieu de culture des cellules embryogènes et non embryogènes ont été dosés par HPLC, à partir de prélèvements de milieux de culture effectués dans des erlenmeyer différents tous les deux jours suivant le repiquage des cellules. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de deux répétitions biologiques indépendantes.

concentrations en saccharose, en maltose, en glycérol, en glucose et en fructose dans les milieux de culture par HPLC. Une analyse approfondie du métabolome des cellules embryogènes et non embryogènes a ensuite été menée, afin de mettre en évidence les différences en termes de métabolisme existant entre nos deux modèles d'étude. Enfin, une analyse des activités maximales des enzymes en lien avec la glycolyse a été réalisée pour évaluer les différences au niveau des capacités métaboliques des deux types de cellules.

1.1.3.1 Evolution des biomasses fraîches et sèches au cours de la cinétique de croissance

L'accumulation de la masse fraîche est très similaire entre les trois types de cellules non embryogènes (WT, *35S::VvMSA* et *35S::VvMSA-RNAi*) (Figure 23). Trois phases bien délimitées peuvent être discernées : une phase de latence (J0 à J4) au cours de laquelle la masse fraîche évolue peu, une phase de croissance exponentielle (J4 à J10) caractérisée par une très forte augmentation de la masse fraîche et enfin, une phase stationnaire (J10 à J14) qui est marquée par un ralentissement et un arrêt de l'accumulation de la biomasse. Ces observations indiquent que les trois suspensions cellulaires ont un rythme de croissance stabilisé vis-à-vis de la fréquence de repiquage. La surexpression et la répression de *VvMSA* n'affectent pas la prolifération cellulaire. Les cellules embryogènes présentent un accroissement de la masse fraîche nettement plus faible que les cellules non embryogènes, sans phases bien marquées, mais avec une prolifération continue entre deux passages sur milieu frais.

L'évolution de la masse sèche chez les cellules embryogènes WT est très similaire à celle de la masse fraîche (Figure 24). En revanche, chez les cellules non embryogènes, la vitesse d'accroissement de la masse sèche commence à diminuer à partir de J6 tandis que l'accroissement de la biomasse fraîche est constant jusqu'à J10. La phase de croissance de J2 à J6 est probablement caractérisée par une phase de division cellulaire plus active, qui commence à ralentir à partir de J6 jusqu'à J10.

1.1.3.2 Evolution de l'expression des gènes de cyclines

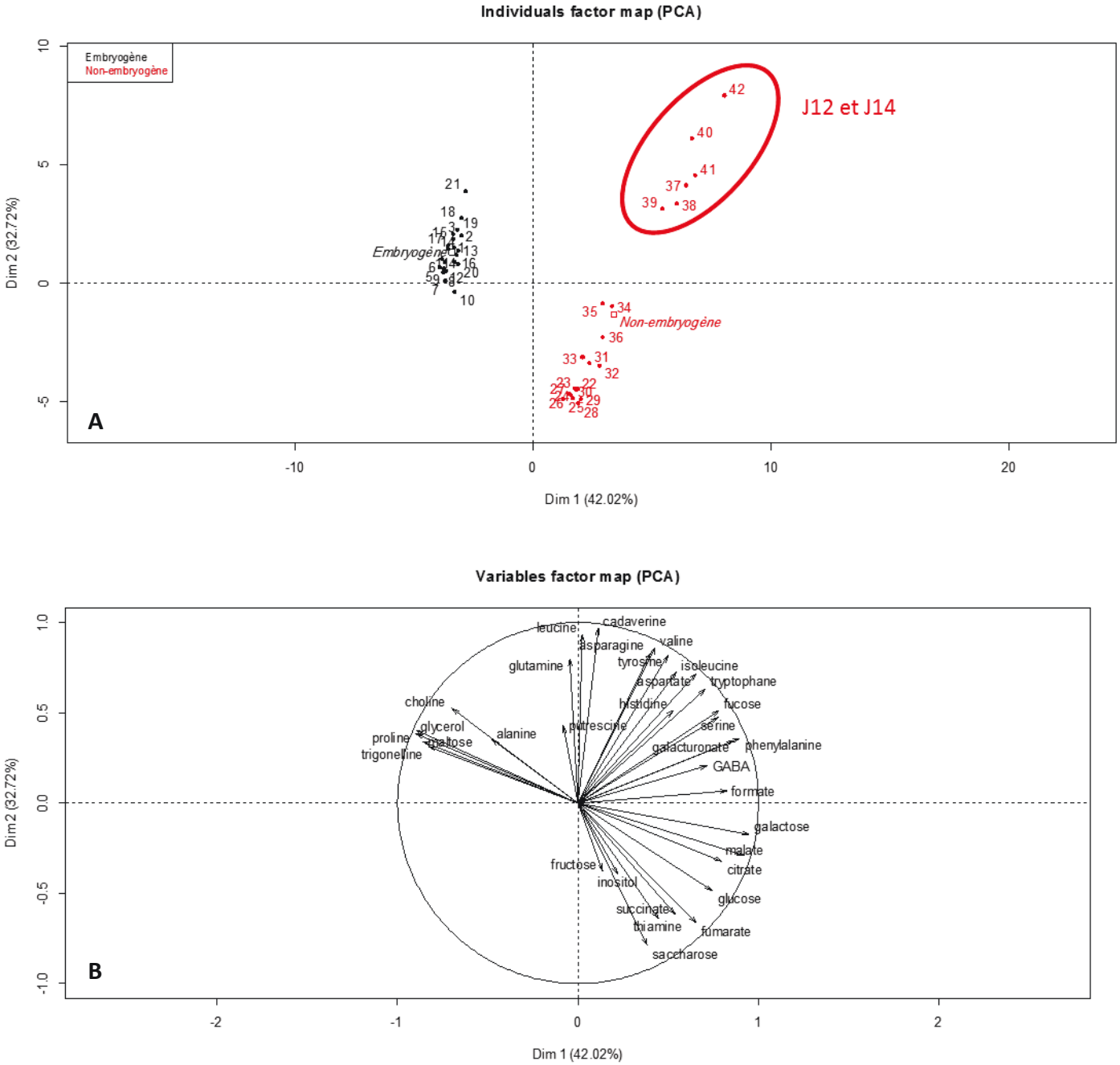


Figure 27 : Analyse en composante principale (ACP) des données du dosage des métabolites cellulaires des cellules embryogènes et non embryogènes WT au cours de leur cinétique de croissance. Carte des individus (A) et cercle des corrélations (B). Les cellules provenant des fioles Erlenmeyer indépendants ont été prélevées pour chaque point de la cinétique de croissance analysée. Les métabolites solubles ont été dosés par RMN du proton tandis que l'amidon a été quantifié par une méthode enzymatique. L'ensemble des données du dosage des métabolites ont été utilisées à l'exception de celles concernant le glutamate, dont la quantification chez les cellules non embryogènes n'a pas été possible. Le dosage des métabolites a été réalisé sur trois répétitions biologiques indépendantes.

Afin de mieux appréhender la prolifération cellulaire, nous avons choisi de suivre l'expression des cyclines A2.1 (*CycA 2.1*) et D3.2 (*CycD 3.2*) au cours de la cinétique de croissance. Les cyclines représentent une famille de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Il existe trois classes de cyclines chez les plantes (A, B, D), réparties en neuf groupes (A1, A2, A3, B1, B2, D1, D2, D3 et D4) (Renaudin et al. 1996; De Veylder et al. 1999). Les cyclines des différentes classes régulent spécifiquement les phases du cycle cellulaire. Elles agissent indirectement à travers l'activation des protéines kinases à Sérine/Thréonine dépendantes des cyclines - CDK (Cyclin Dependent Kinase). La fixation d'une cycline donnée sur sa/ses CDK associée(s) permet d'activer la CDK et aboutit à la régulation de la progression entre les phases du cycle cellulaire. Les cyclines D sont impliquées dans la régulation de la transition de la phase G1 à la phase S. Les cyclines A sont impliquées dans la régulation de la transition de la phase S à la phase G2 et participent avec les cyclines B, à la transition de la phase G2 à la phase M (Mironov et al. 1999). L'analyse de l'expression des gènes de deux cyclines appartenant à deux classes différentes nous a permis de comparer l'activité de division des cellules embryogènes et non embryogènes, sauvages et transformées, au cours de la culture.

Chez les trois cultures cellulaires non embryogènes (WT, *35S::VvMSA* et *35S::VvMSA-RNAi*) l'expression de la *CycD 3.2* est légèrement supérieure à celle de la *CycA 2.1* (Figure 25). En revanche, l'évolution de l'expression des deux cyclines au cours de la croissance est très similaire et présente trois phases : l'expression est faible de J0 à J2, elle augmente ensuite de J2 à J8, puis diminue entre J10 et J14. L'expression des gènes des deux cyclines diffère légèrement chez les cellules *35S::VvMSA* comparé aux cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi*. La différence s'exprime dans le fait que leur expression continue à augmenter entre J4 et J8 chez les cellules *35S::VvMSA* tandis qu'elle diminue chez les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi* au cours de cette même période.

Contrairement au niveau de l'accroissement des masses fraîche et sèche, l'expression des gènes des deux cyclines chez les cellules embryogènes se révèle être nettement plus élevée que chez les cellules non embryogènes et présentent trois phases bien marquées. *CycA 2.1* et *CycD 3.2* sont faiblement exprimés de J0 à J2, plus fortement de J2 à J8 et montrent une expression décroissante de J10 à J14. L'expression plus prononcée des gènes des deux cyclines chez les cellules embryogènes pourrait être expliquée par une synchronisation relative des phases de leur cycle cellulaire, absente chez les cellules non embryogènes. Ces différences si nettes entre les deux types cellulaires pourraient être dues à la source de nutrition carbonée

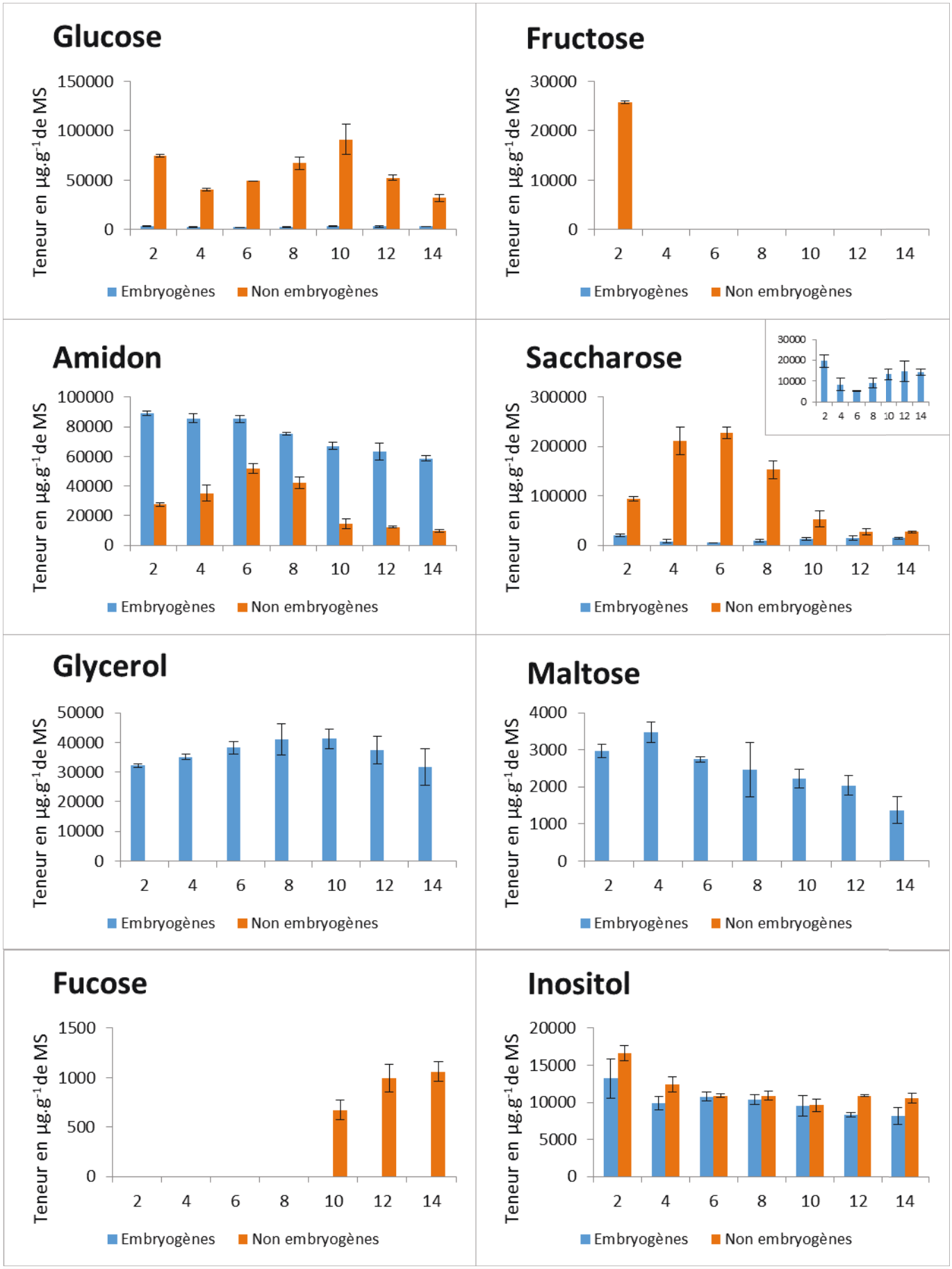


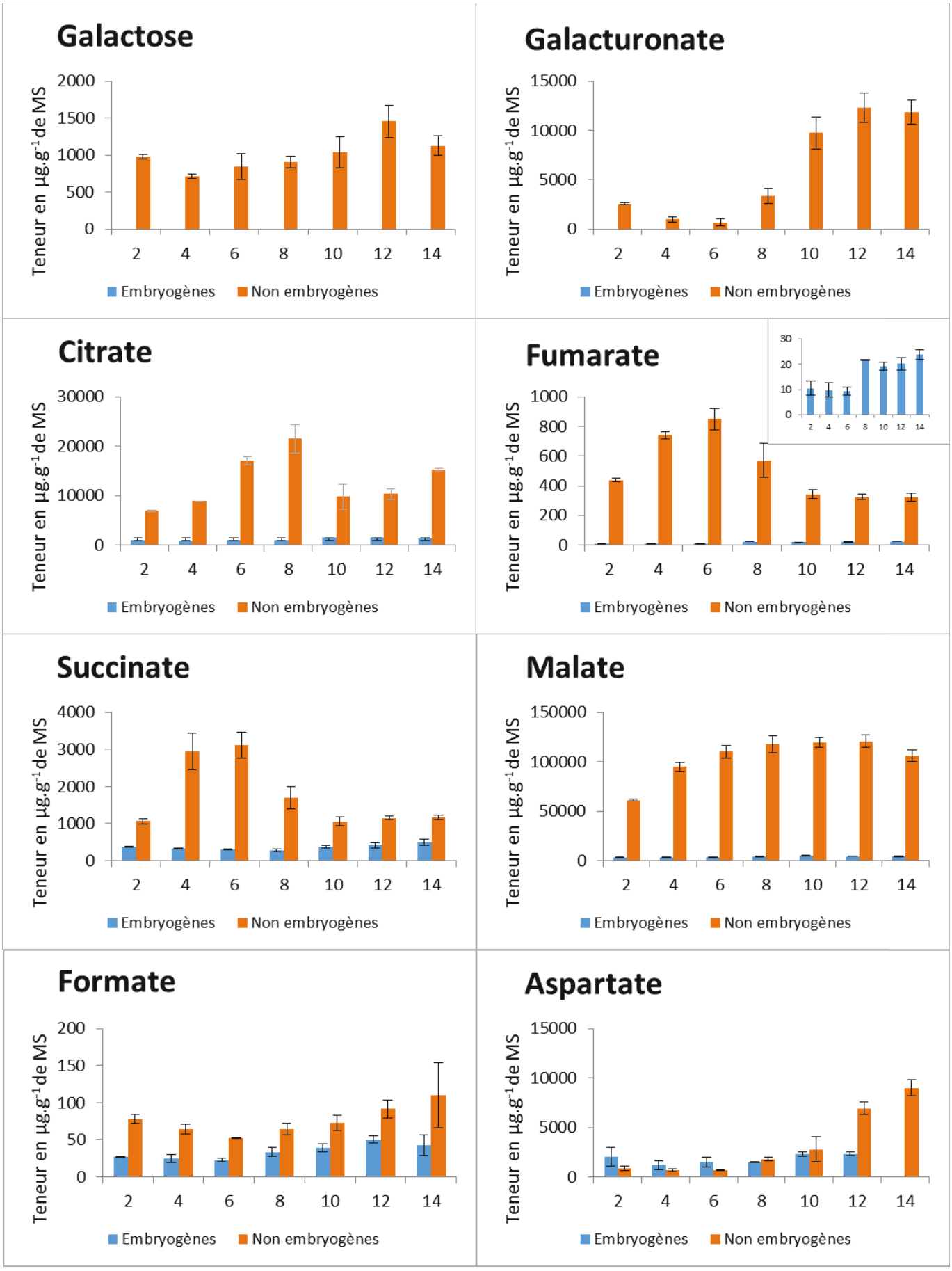
Figure 28 Evolution des concentrations en métabolites solubles et amidon dans les cellules embryogènes et non embryogènes au cours de leur cinétique de croissance. Les cellules provenant d'erlenmeyer indépendants ont été prélevées tous les deux jours. Les métabolites solubles ont été dosés par RMN du proton tandis que l'amidon a été quantifié par une méthode enzymatique. Les teneurs sont exprimées en µg de métabolites par gr de cellules en masse sèche. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de trois répétitions biologiques indépendantes.

(maltose/glycérol ou saccharose) utilisée et sensée induire de fortes différences en termes de métabolisme énergétique.

1.1.3.3 Evolution des sucres solubles

Les cellules embryogènes et non embryogènes sont cultivées sur deux milieux bien distincts, le Gb ANA/BAP (Annexe 3) et le GM + (Annexe 1), différant notamment au niveau de leur source de carbone. Les cellules non embryogènes sont cultivées sur un milieu contenant du saccharose tandis que les cellules embryogènes sont cultivées sur un milieu contenant du maltose et du glycérol. Les cellules non embryogènes hydrolysent et consomment rapidement le saccharose, celui-ci étant totalement absent du milieu après 8 jours de culture (Figure 26). L'accumulation de glucose et de fructose dans le milieu indique que le saccharose est en grande partie hydrolysé en glucose et fructose par les invertases pariétales à l'extérieur des cellules. La forte accumulation du fructose jusqu'à 30 mM semble montrer qu'à partir d'une concentration initiale de 50 mM de saccharose dans le milieu, une partie importante est hydrolysée avant d'être absorbée sous forme de glucose et de fructose. Le glucose est moins accumulé que le fructose (environ 10 mM), ce qui suggère qu'il est absorbé et utilisé préférentiellement par les cellules. Il est totalement absent du milieu après 8 jours de culture tandis que le fructose persiste jusqu'à 10 voire 12 jours. Notre observation est en accord avec une étude réalisée toujours dans notre équipe sur des cellules non embryogènes CSB (Cabernet Sauvignon Berry) de Vigne, qui montre que le glucose et le fructose sont absorbés par le même système de transport mais que celui-ci présente une affinité plus importante pour le glucose que pour le fructose (Conde et al. 2006).

Les cellules embryogènes consomment leurs ressources carbonées (le maltose et le glycérol) beaucoup plus lentement (Figure 24). Le maltose, initialement présent à la même concentration que le saccharose chez les cellules non embryogènes (50 mM) n'est qu'à moitié consommé à l'issu des 14 jours de culture. Le glycérol, dont la concentration initiale est de 65 mM est en partie absorbé par les cellules (≈ 1/3 de la quantité initiale). Dans le même ordre d'idées, l'accumulation du glucose en faible concentration dans le milieu suggère que le maltose semble beaucoup plus lentement hydrolysé que le saccharose. Cette différence dans l'activité des invertases et des maltases/glucosidases (responsables de l'hydrolyse du saccharose et du maltose respectivement) a déjà été décrite dans la littérature. L'hydrolyse du


Galactose
Teneur en µg.g-1de MS
2000
1500
1000
500
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
Galacturonate
Teneur en µg.g-1de MS
15000
10000
5000
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
Citrate
Teneur en µg.g-1de MS
30000
20000
10000
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
Fumarate
Teneur en µg.g-1de MS
1000
800
600
400
200
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
30
20
10
0
2 4 6 8 10 12 14
Succinate
Teneur en µg.g-1de MS
4000
3000
2000
1000
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
Malate
Teneur en µg.g-1de MS
150000
100000
50000
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
Formate
Teneur en µg.g-1de MS
200
150
100
50
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
Aspartate
Teneur en µg.g-1de MS
15000
10000
5000
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes

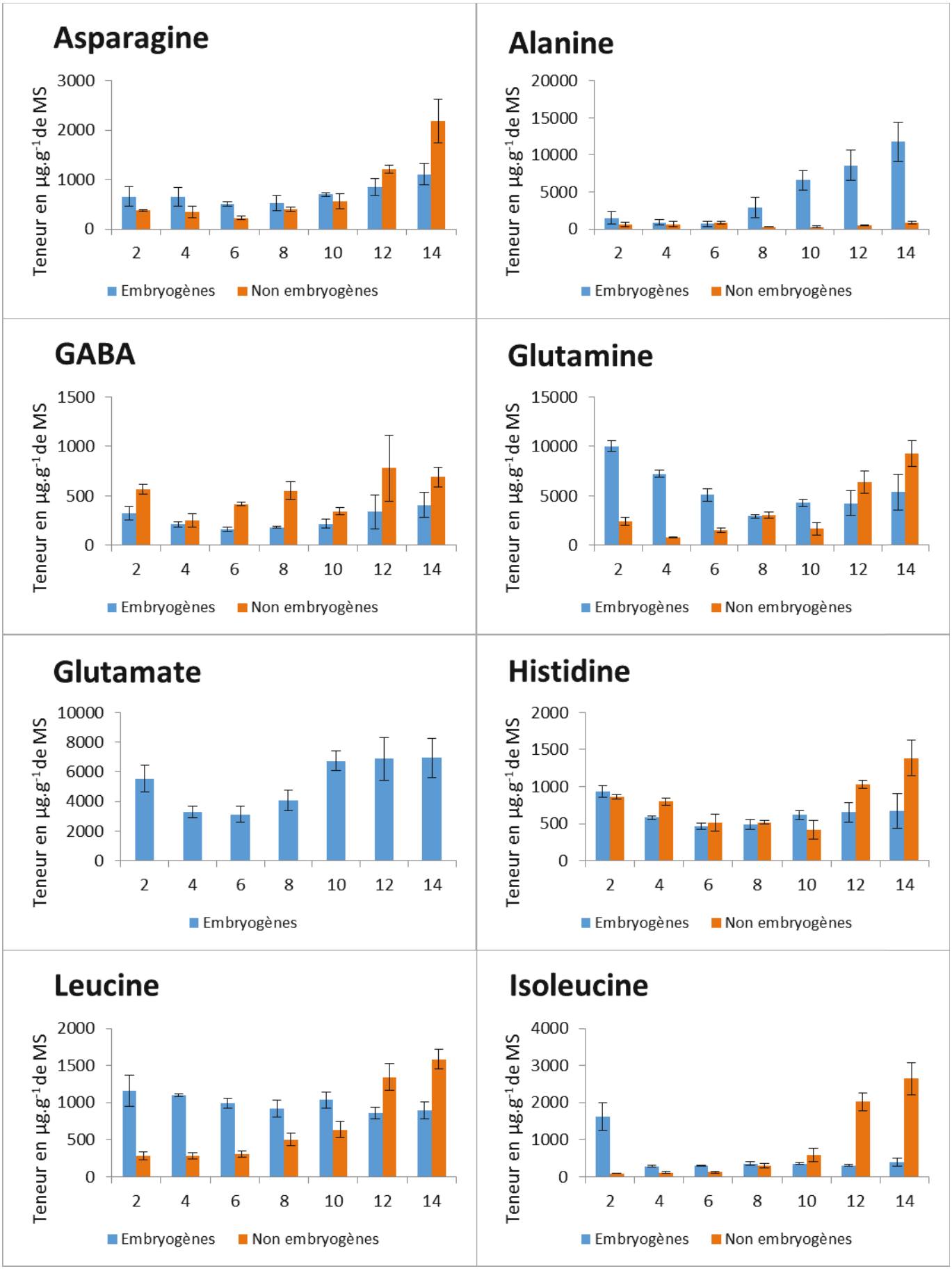
maltose est 20 fois plus faible que celle du saccharose chez des cultures cellulaires d'orge (*Hordeum vulgare*). Les auteurs suggèrent de stériliser le milieu par passage à l'autoclave, afin d'hydrolyser partiellement le maltose et ainsi fournir une petite quantité de glucose directement assimilable pour les cellules (Roberts-Oehlschlager, 1990).

1.1.3.4 Analyse comparative du métabolome des cellules embryogènes et non embryogènes

Au vu des fortes différences observées au niveau de la consommation des ressources carbonées entre les deux types cellulaires, nous avons souhaité approfondir leur caractérisation métabolique. Cette caractérisation est envisagée au travers d'une étude du métabolome global par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ^{1}H), des cellules embryogènes et non embryogènes 41B sauvages au cours de leurs cinétiques de croissance. Le but de l'analyse était de déterminer les différences en termes de métabolisme notamment glucidique existant entre les cellules embryogènes et non embryogènes. L'étude a porté en parallèle sur la quantification des métabolites dans les deux types de cellules et dans leurs milieux de culture respectifs. L'identification et la quantification par RMN des métabolites solubles contenus dans les cellules ont été réalisées à la suite d'une extraction à l'éthanol. L'amidon a été dosé par voie enzymatique, à partir de la fraction insoluble.

1.1.3.4.1 Intérêt de l'analyse en RMN du proton pour l'étude envisagée

L'utilisation des techniques de Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) et en particulier de la RMN du proton (RMN ^{1}H), sont de plus en plus couramment employées dans le cadre d'études métabolomiques chez les plantes (Rolin 2012). L'avantage de cette technique est qu'elle permet de détecter une large gamme de composés, puisque toute molécule comportant au moins un atome d'hydrogène est potentiellement quantifiable. La résolution des signaux issus de cette analyse aboutit à l'identification d'un grand nombre de composés simultanément (classiquement entre 20 et 40) au sein d'un extrait complexe sans fractionnement préalable. De plus, l'amplitude des concentrations détectables est de l'ordre d'un facteur 10^{-4}. Cette technique reste relativement moins sensible qu'une technique telle que la spectrométrie de masse (MS), la limite de détection en RMN étant estimée à 10 µM


Asparagine
Teneur en µg.g-1de MS
3000
2000
1000
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
Alanine
Teneur en µg.g-1de MS
20000
15000
10000
5000
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
GABA
Teneur en µg.g-1de MS
1500
1000
500
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
Glutamine
Teneur en µg.g-1de MS
15000
10000
5000
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
Glutamate
Teneur en µg.g-1de MS
10000
8000
6000
4000
2000
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Histidine
Teneur en µg.g-1de MS
2000
1500
1000
500
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
Leucine
Teneur en µg.g-1de MS
2000
1500
1000
500
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes
Isoleucine
Teneur en µg.g-1de MS
4000
3000
2000
1000
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes

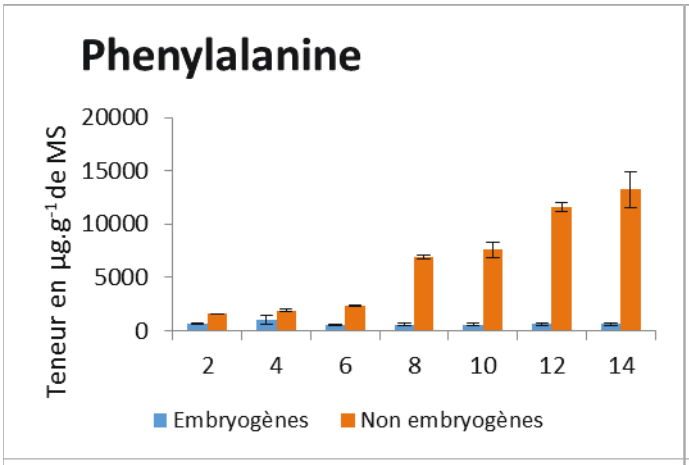
(Krishnan et al. 2005) contre une sensibilité d'environ 1 pM en MS. Une grande partie des métabolites secondaires sont donc difficilement détectables par cette technique.

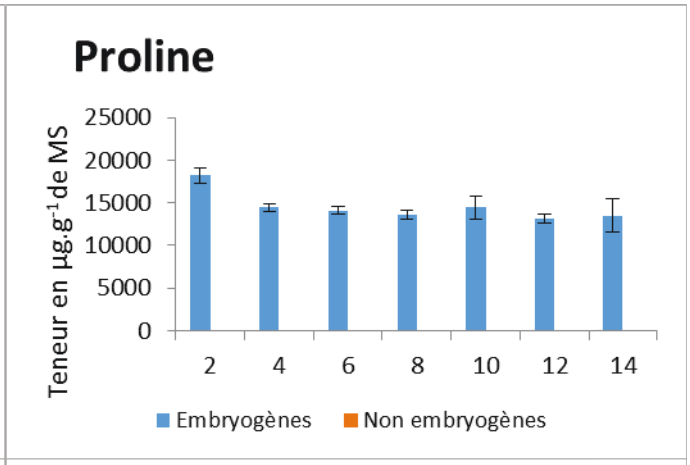
La limite de détection de RMN ^{1}H reste en adéquation avec le but de notre étude, notamment, de quantifier les principaux composés du métabolisme primaire (sucres, acides organiques et acides aminés). Par conséquent, pour cette première analyse comparative nous l'avons privilégiée en tant que méthode permettant d'identifier une large gamme de métabolites rapidement. En effet, la technique d'extraction choisie allie un très bon rendement des métabolites hydrosolubles (> 95%) à une très bonne répétabilité et rapidité. Cependant, elle n'est pas adaptée aux composés phosphorylés, dont l'intégrité n'est pas maintenue. L'analyse par RMN ^{1}H nous a permis de quantifier 42 métabolites différents dans l'extrait réalisé à partir des cellules. Parmi ces 42 métabolites, 37 ont pu être identifiés. En ce qui concerne les milieux, nous avons dosé 24 métabolites différents dont 21 ont pu être identifiés.

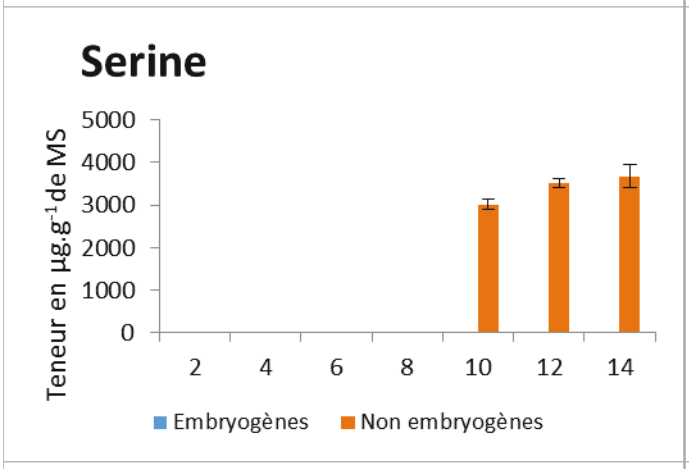
1.1.3.4.2 Identification et quantification des métabolites cellulaires

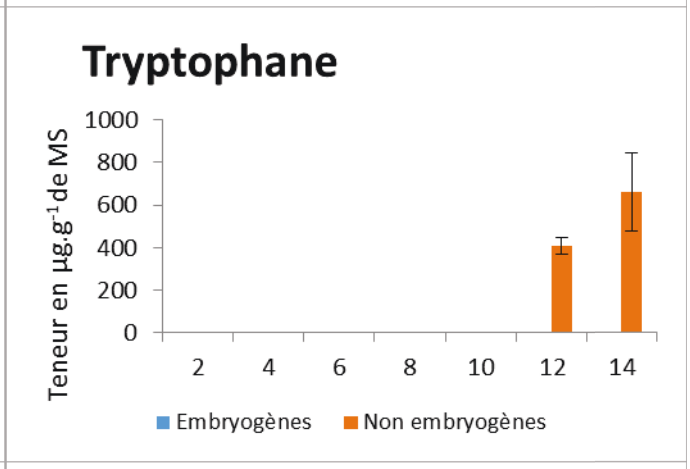
1.1.3.4.2.1 Intérêt de l'Analyse en Composante Principale pour l'analyse des données de métabolomique

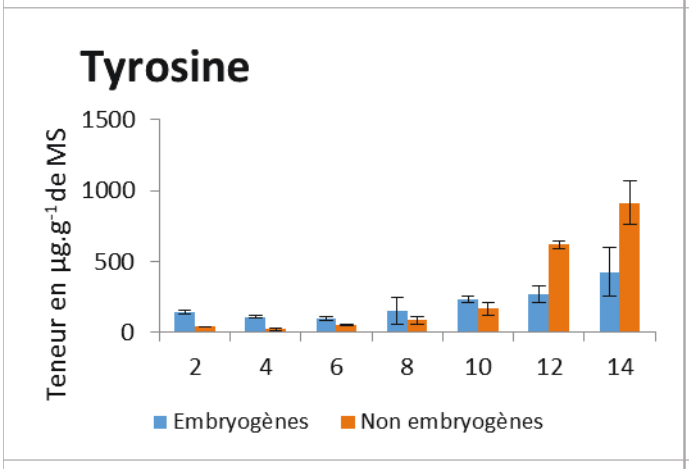
L'analyse en composante principale (ACP) est probablement une des méthodes d'analyse les plus couramment utilisées pour traiter des données de métabolomique (Bartel et al. 2013). Il s'agit d'une approche dite « multivariée », c'est-à-dire qu'elle repose sur l'analyse de la distribution conjointe de plusieurs variables. Ce type d'analyse de variance est particulièrement intéressant dans le cas d'études générant de nombreuses variables comme en métabolomique. En effet, la confrontation des informations portées par les différentes variables est beaucoup plus riche que leur examen séparé (Elias Pereira 2005). Le principe de l'ACP consiste à construire de nouvelles variables, artificielles, appelées composantes principales (CP). Les CP sont générées par combinaison linéaire des variables initiales de telle sorte que ces nouvelles variables aient la plus grande variance possible et soient mutuellement décorrélées. Les CP sont classées en fonction de la part de la variance qu'elles expliquent (Lindon et al. 2006; Shlens 2014). En pratique on retient généralement les 2 premières CP qui expliquent la majorité de la variance. Deux représentations graphiques sont générées, la carte des individus et le cercle des corrélations. Ces représentations graphiques sont constituées de deux axes orthogonaux, représentant les deux CP choisies.

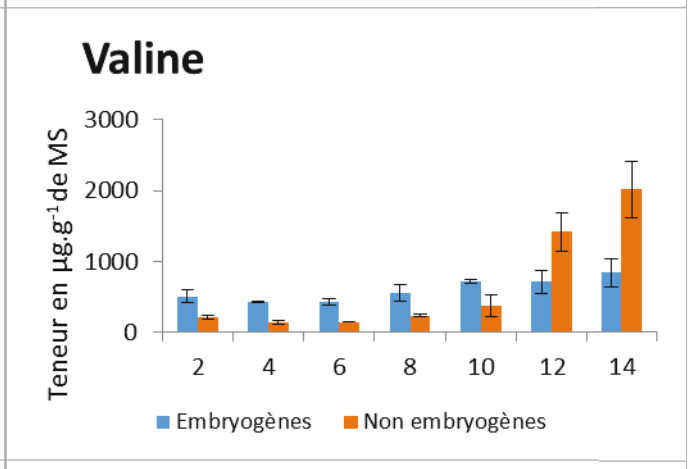

Phenylalanine
Teneur en µg.g-1de MS
20000
15000
10000
5000
0
2
4
6
8
10
12
14
Embryogènes
Non embryogènes

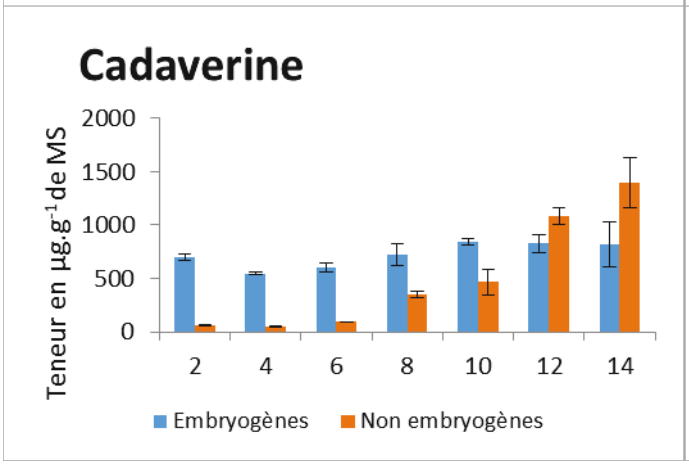

Proline
Teneur en µg.g-1de MS
25000
20000
15000
10000
5000
0
2
4
6
8
10
12
14
Embryogènes
Non embryogènes

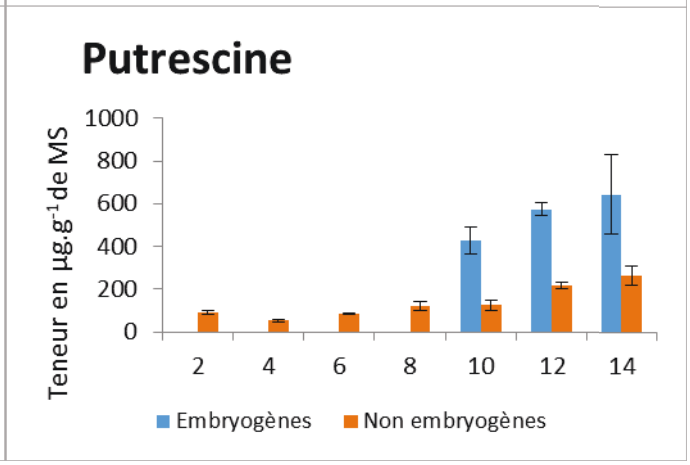

Serine
Teneur en µg.g-1de MS
5000
4000
3000
2000
1000
0
2
4
6
8
10
12
14
Embryogènes
Non embryogènes


Tryptophane
Teneur en µg.g-1de MS
1000
800
600
400
200
0
2
4
6
8
10
12
14
Embryogènes
Non embryogènes


Tyrosine
Teneur en µg.g-1de MS
1500
1000
500
0
2
4
6
8
10
12
14
Embryogènes
Non embryogènes


Valine
Teneur en µg.g-1de MS
3000
2000
1000
0
2
4
6
8
10
12
14
Embryogènes
Non embryogènes


Cadaverine
Teneur en µg.g-1de MS
2000
1500
1000
500
0
2
4
6
8
10
12
14
Embryogènes
Non embryogènes


Putrescine
Teneur en µg.g-1de MS
1000
800
600
400
200
0
2
4
6
8
10
12
14
Embryogènes
Non embryogènes

Dans le cadre de notre étude, chaque individu est caractérisé par des concentrations en métabolites spécifiques. Ce qui fait que chaque individu pourrait être représenté sur un graphique à n dimensions (n étant égal au nombre de métabolites mesurés). Le principe de l'ACP est de projeter le nuage de point des individus définis en n dimensions, sur le plan en deux dimensions de la carte des individus tout en conservant le mieux possible les distances entre individus. Plus les deux CP choisis expliquent une part importante de la variance, plus l'écart entre les points sera représentatif de l'écart existant entre les points dans l'espace à n dimensions. Le cercle des corrélations représente, quant à lui, l'influence de chaque variable sur la répartition des individus au niveau de la carte des individus.

En pratique, l'étude de la carte des individus permet de visualiser si certains individus se regroupent. Dans notre cas cela signifie qu'ils ont des profils métabolomiques proches. L'étude du cercle des corrélations nous donne des informations sur le profil spécifique de chaque groupe.

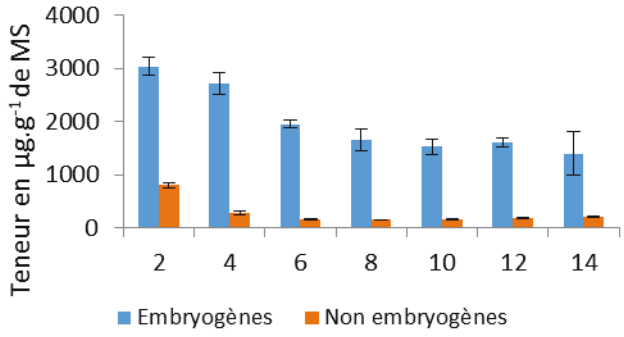
1.1.3.4.2.2 Comparaison des métabolites intracellulaires des cellules embryogènes et non embryogènes de Vigne au cours de la cinétique de croissance

Une ACP tenant compte de l'ensemble des données des métabolites cellulaires, dosés sur les échantillons prélevés tous les deux jours au cours de la cinétique de croissance a été réalisée (Figure 27 A et B).

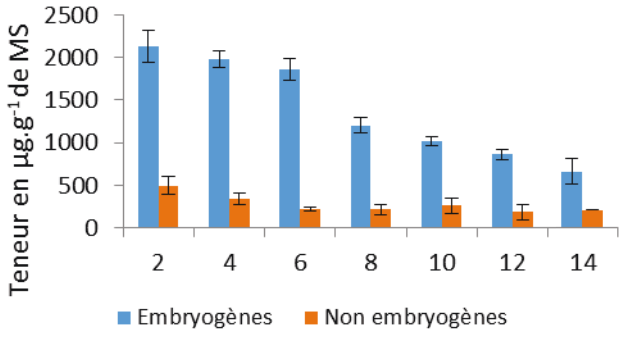
Le 1er axe de l'ACP expliquant 42,02% de la variance permet de séparer les cellules embryogènes et non embryogènes. Les deux types cellulaires présentent donc des profils différents en termes de métabolites cellulaires (Figure 27 A). Les résultats obtenus démontrent que le profil métabolique des cellules embryogènes est plus stable au cours de la cinétique de croissance que celui des cellules non embryogènes. Le groupe des cellules embryogènes est caractérisé par de fortes concentrations relatives en sucres dans le sens large (glycérol et maltose), acides aminés (alanine et proline), vitamines du groupe B (choline et trigonelline). Le groupe constitué des cellules non embryogènes de J0 à J10 est plutôt caractérisé par des concentrations élevées en sucres (saccharose, glucose, galactose) et acides organiques (succinate, fumarate, citrate et malate) (Figure 28).

Les plus fortes concentrations en maltose et en glycérol observées chez les cellules embryogènes sont probablement liées à leur absorption depuis le milieu de culture GM+, ces deux métabolites n'étant pas présents dans le milieu de culture des cellules non embryogènes.

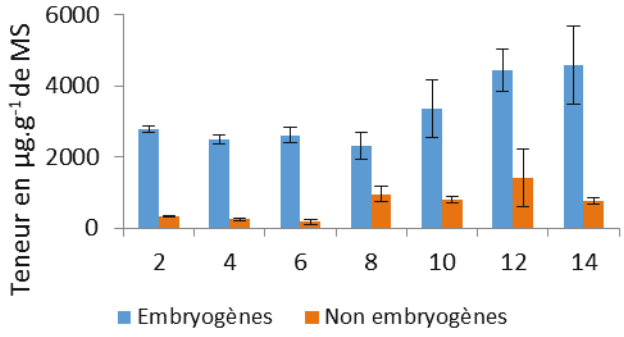
Trigonelline



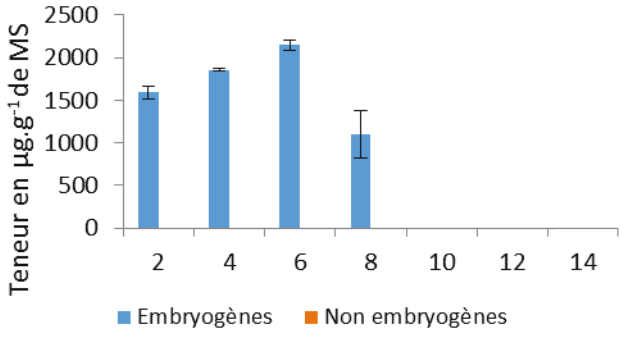
Adenosine -like



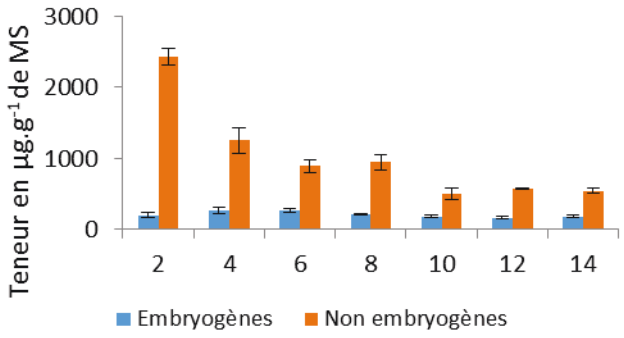
Choline



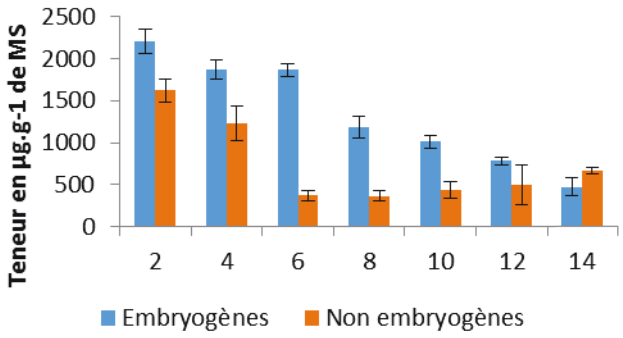
Choline-like



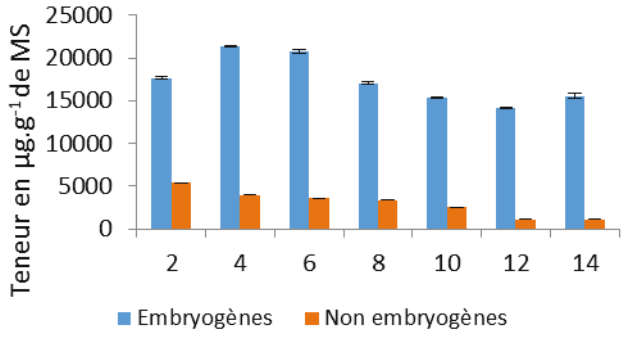
Thiamine



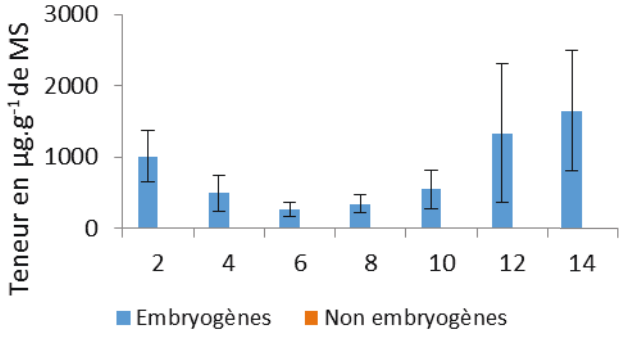
UDP-like



Ukn-0,91



Ukn-1,6



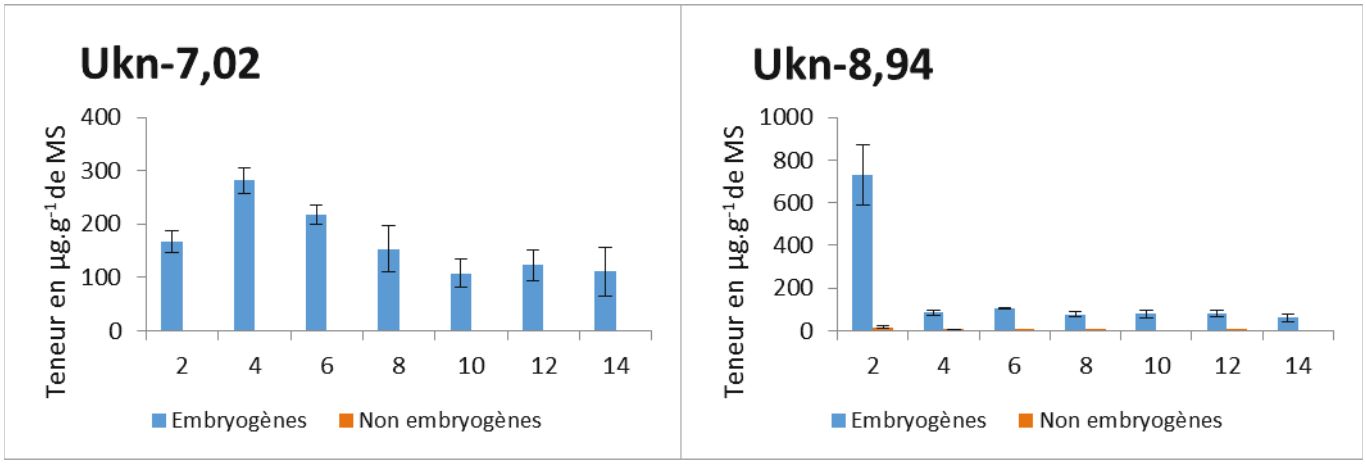
La plus forte concentration en amidon chez les cellules embryogènes et en saccharose, glucose et intermédiaires du cycle de Krebs (citrate, fumarate, succinate, malate) chez les cellules non embryogènes suggèrent des différences importantes dans le métabolisme du glucose entre les deux types cellulaires. Les cellules non embryogènes semblent caractérisées par un catabolisme actif du glucose à travers la glycolyse et le cycle de Krebs. Au contraire, les cellules embryogènes qui présentent des concentrations très faibles en glucose et en maltose, ainsi qu'en citrate, fumarate, succinate et malate, mais une plus forte concentration en amidon, semblent orienter préférentiellement le glucose et/ou le maltose vers la synthèse d'amidon plutôt que vers la glycolyse.

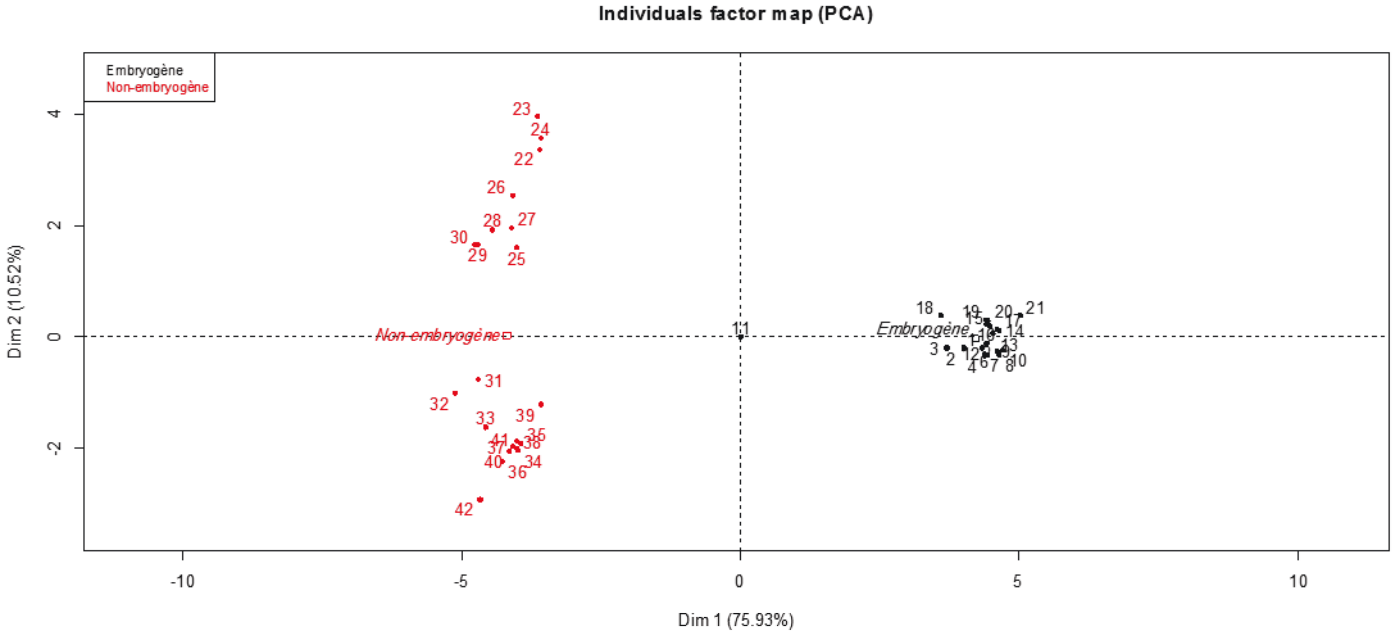
Le 2^{e} axe (Figure 27 B), expliquant 32,72% de la variance, permet de séparer le groupe des cellules non embryogènes en fin de cinétique de croissance (J12 et J14) du groupe constitué par les cellules non embryogènes en début de cinétique (J0 à J10). Cet axe est corrélé positivement avec la concentration cellulaire en acides aminés et en polyamines, à l'exemple de la cadavérine. La concentration en acides aminés libres est plus élevée chez les cellules non embryogènes en fin de cinétique de croissance J12-J14, ce qui pourrait traduire une induction de la protéolyse chez ces cellules en phase stationnaire de leur cinétique de croissance.

1.1.3.4.2.3 Comparaison des métabolites dans les milieux de culture des cellules embryogènes et non embryogènes de Vigne au cours de la cinétique de croissance

En complément de l'analyse des métabolites cellulaires nous avons souhaité évaluer l'évolution des métabolites présents dans les milieux de culture respectifs des deux types de cellules au cours de la cinétique de croissance (Figure 29 A et B).

Une ACP a été réalisée avec l'ensemble des données relatives à la cinétique de croissance des cellules. Le premier axe de l'ACP explique 75,93% de la variance et permet de séparer le groupe des cellules embryogènes et celui des cellules non embryogènes (Figure 29 A). Les deux types de cellules étant cultivés sur des milieux nutritifs différents, cette séparation nette entre les profils métabolomiques de leurs milieux de culture ne paraît pas surprenante. Le 2^{e} axe explique seulement 10,52% de la variance et permet de discriminer le milieu des cellules non embryogènes de J0 à J6 de celui de J8 à J14. On observe, là encore, une plus grande stabilité du profil des métabolites au niveau du milieu des cellules embryogènes, comparé à celui des cellules non embryogènes.





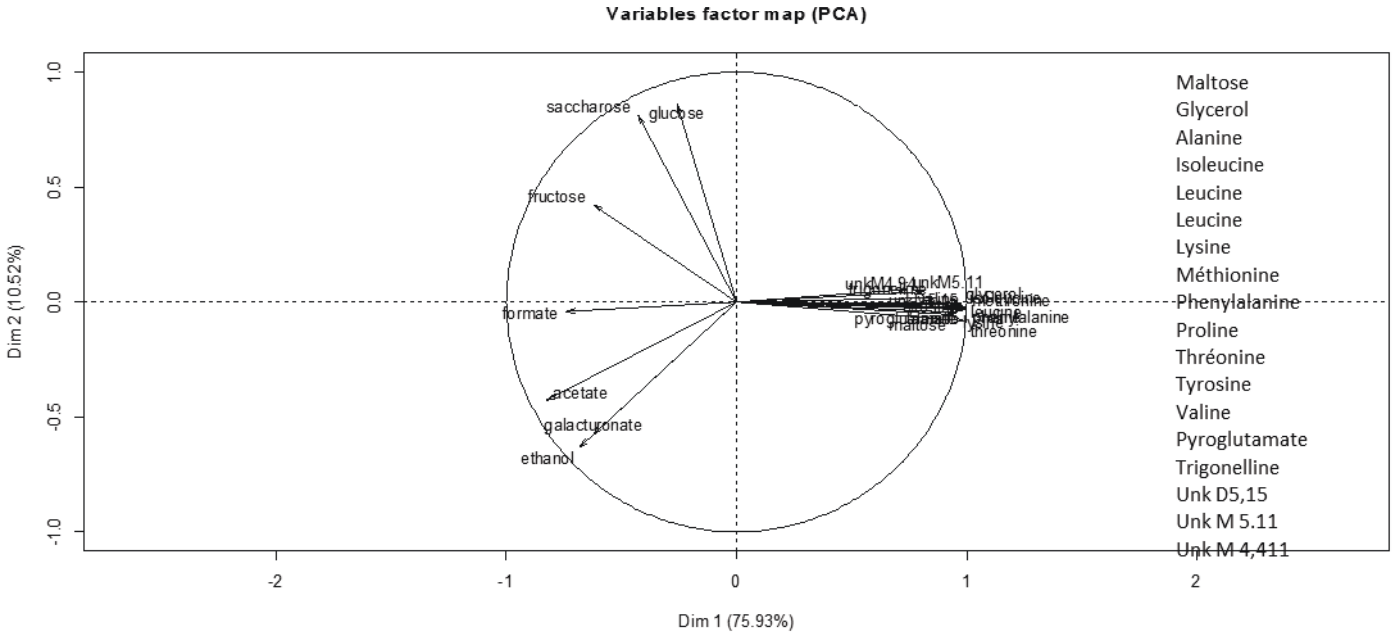


Figure 29 Analyse en composante principale (ACP) des données du dosage des métabolites dans le milieu de culture des cellules embryogènes et non embryogènes WT au cours de leur cinétique de croissance. Carte des individus (A) et cercle des corrélations (B). Les milieux provenant des fioles Erlenmeyer indépendants ont été prélevés pour chaque point de la cinétique de croissance analysé. Les métabolites solubles ont été dosés par RMN du proton. Le dosage des métabolites a été réalisé sur trois répétitions biologiques indépendantes.

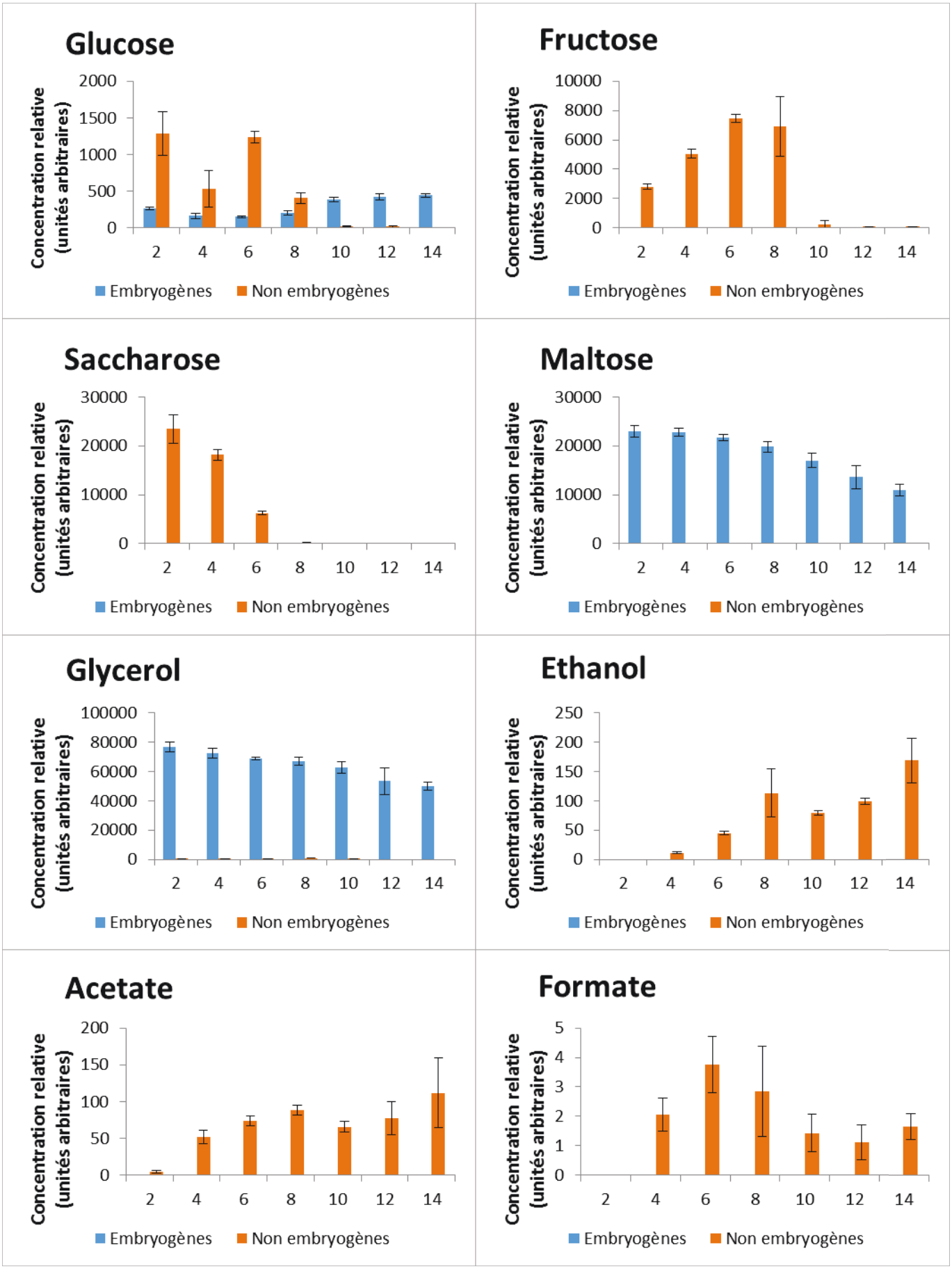


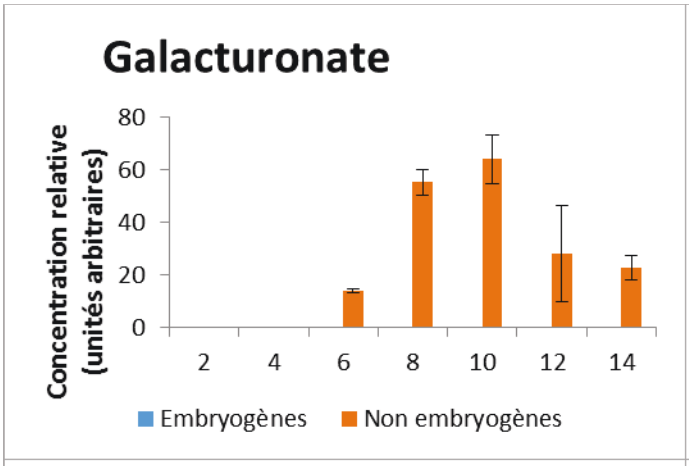
Figure 30 Evolution des concentrations en métabolites solubles dans le milieu des cellules embryogènes et non embryogènes au cours de leur cinétique de croissance. Les milieux provenant d'erlenmeyer indépendants ont été prélevés tous les deux jours. Les métabolites ont été dosés par RMN du proton et les concentrations relatives sont exprimées en unités arbitraires. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de trois répétitions biologiques indépendantes.

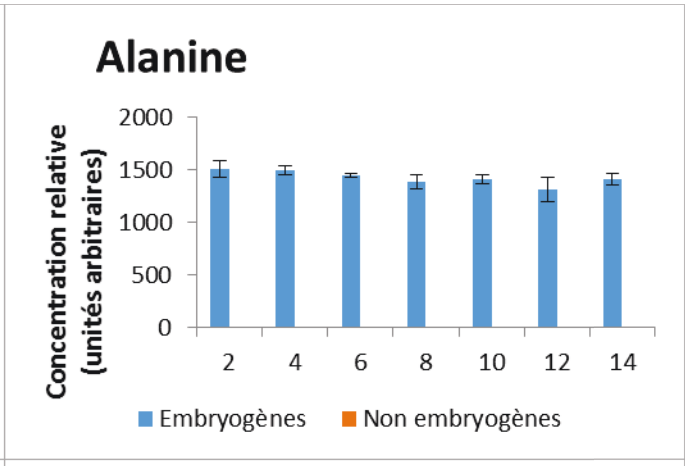
Le milieu de culture des cellules non embryogènes est caractérisé par de fortes concentrations relatives en glucose, saccharose et fructose de J0 à J6 et par la présence d'éthanol et d'acétate ainsi qu'une concentration relative élevée en galacturonate de J8 à J14 (Figure 29 B). Le milieu de culture des cellules embryogènes est, quant à lui, caractérisé par de fortes concentrations en acides aminés ainsi qu'en maltose et en glycérol tout au long de la cinétique de croissance. Les cellules embryogènes consomment avec parcimonie les ressources carbonées à disposition dans leur milieu de culture (maltose et glycérol). De la même manière, les teneurs en acides aminées dans leur milieu ne diminuent que très faiblement au cours de la culture (Figure 30). La faible variation de la concentration en acides aminés dans le milieu de culture, tend à montrer que l'absorption des acides aminés par les cellules est relativement faible.

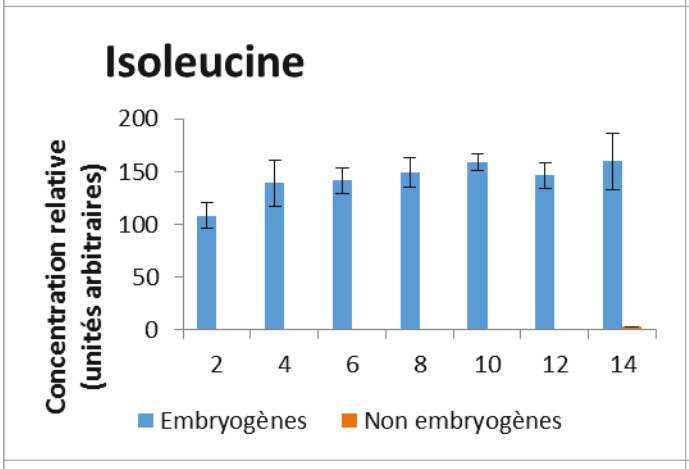
L'évolution des métabolites dans le milieu de culture des cellules non embryogènes au cours de leur prolifération témoigne de l'évolution du métabolisme de ces cellules. Dans un premier temps (J0 à J4), le milieu contient une concentration élevée en saccharose qui est hydrolysé en glucose et en fructose. L'absorption et la métabolisation du glucose sont privilégiées par les cellules et il n'est pas accumulé en forte concentration. A l'inverse, le fructose n'est utilisé par les cellules que lorsque le saccharose est complètement hydrolysé et le glucose presque épuisé (J8). Cette phase de la cinétique de croissance des cellules est caractérisée par une forte concentration intracellulaire en glucose, saccharose et intermédiaires du cycle de Krebs et probablement par une activité importante de la glycolyse et du cycle de Krebs.

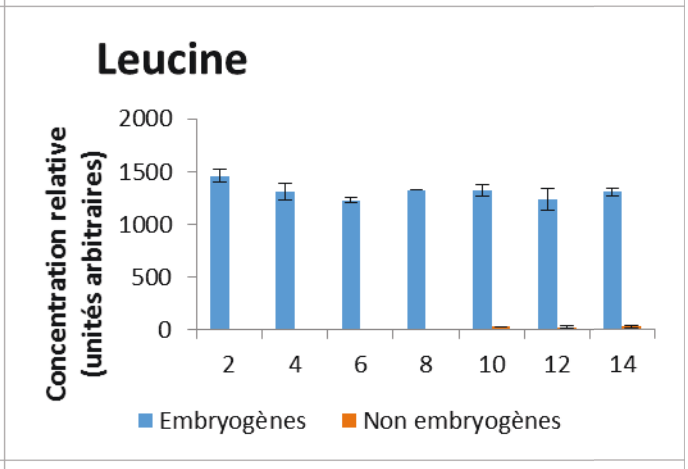
Au cours de la deuxième partie de la cinétique (J6 à J14), commencent à s'accumuler en faible proportion de l'éthanol, de l'acétate et du galacturonate. La production d'éthanol et d'acétate témoigne de la mise en place d'un métabolisme anaérobie pouvant être lié à la diminution de la disponibilité en O_2, qui découle probablement de la forte augmentation de la densité cellulaire au cours de la phase de croissance exponentielle (entre J4 et J10). L'augmentation des teneurs en galacturonate pourrait être la résultante de la dégradation des parois cellulaires en corrélation avec la mortalité cellulaire accrue au cours de la phase stationnaire.

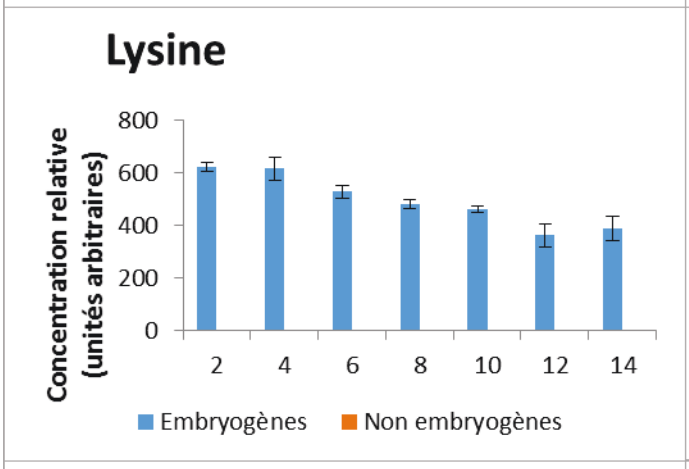
Les résultats de l'analyse métabolomique laissent entrevoir des activités de la glycolyse et du cycle de Krebs plus importantes chez les cellules non embryogènes que chez les cellules embryogènes. Afin d'approfondir la caractérisation des différences métaboliques

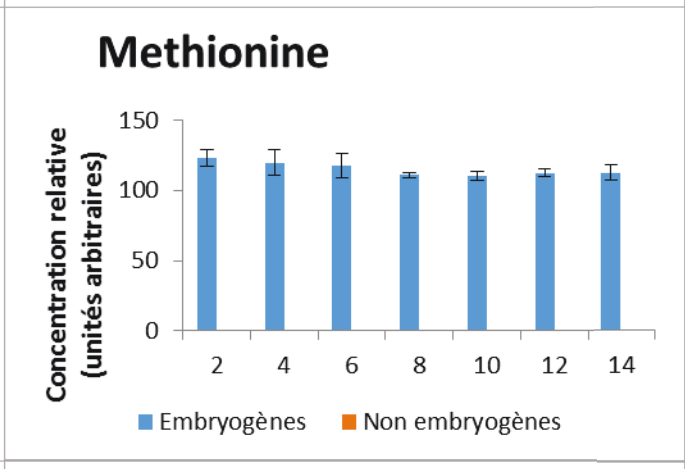

Galacturonate
Concentration relative (unités arbitraires)
80
60
40
20
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes

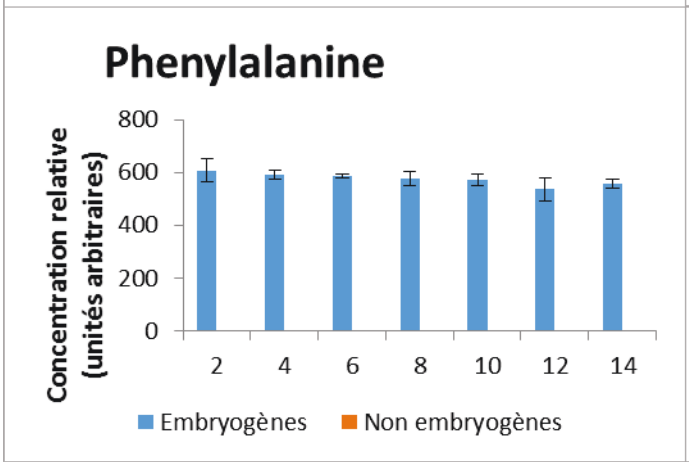

Alanine
Concentration relative (unités arbitraires)
2000
1500
1000
500
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes

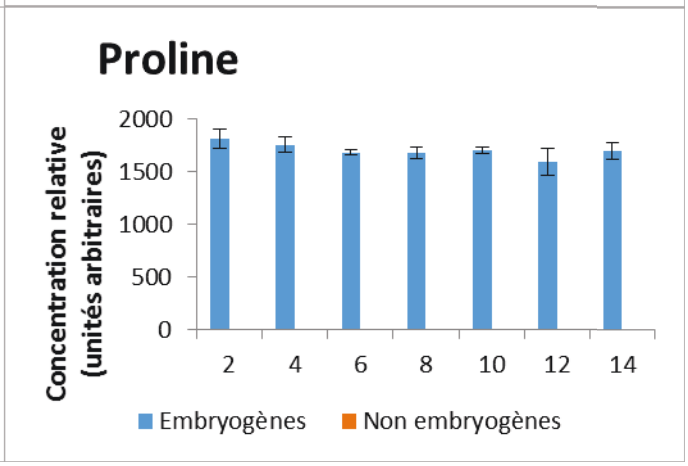

Isoleucine
Concentration relative (unités arbitraires)
200
150
100
50
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes


Leucine
Concentration relative (unités arbitraires)
2000
1500
1000
500
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes


Lysine
Concentration relative (unités arbitraires)
800
600
400
200
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes


Methionine
Concentration relative (unités arbitraires)
150
100
50
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes


Phenylalanine
Concentration relative (unités arbitraires)
800
600
400
200
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes

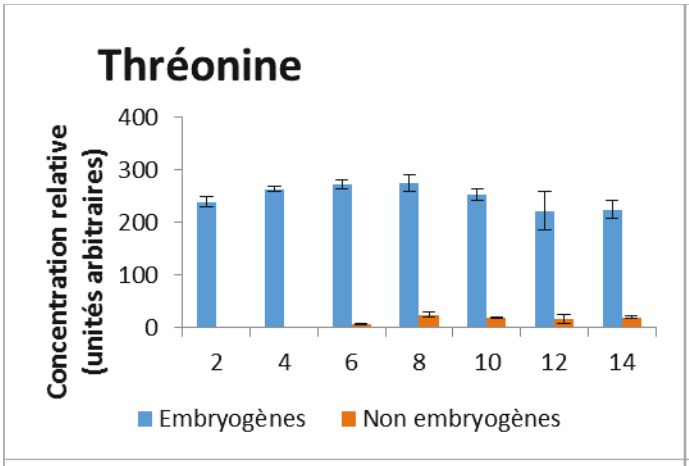

Proline
Concentration relative (unités arbitraires)
2000
1500
1000
500
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes

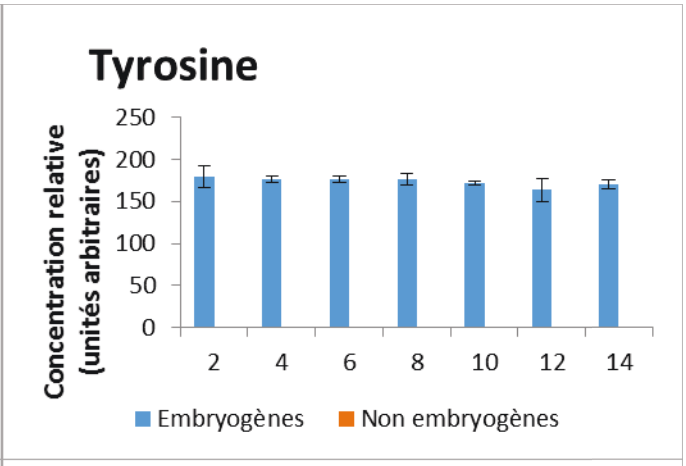
entre les cellules embryogènes et non embryogènes, nous avons mesuré l'activité maximale des enzymes liées au métabolisme du glucose chez les cellules embryogènes et non embryogènes WT et *35::VvMSA-RNAi*.

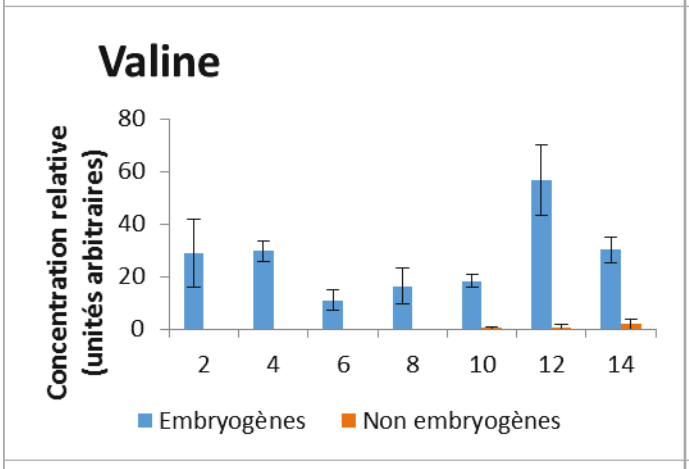
1.1.3.5 Analyse de l'activité maximale des enzymes de la glycolyse.

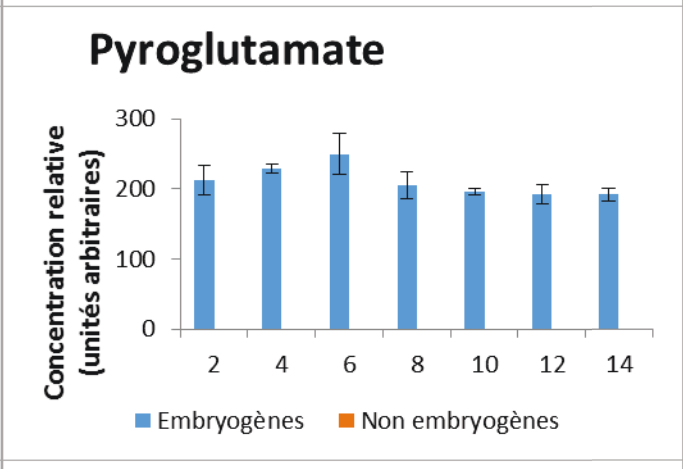
Nous avons mesuré l'activité d'enzymes de la glycolyse (glucokinase, fructokinase, phosphoglucose isomerase, phosphofructokinase ATP-dépendante, fructose-1,6-bisphosphate aldolase, triosephosphate isomerase, phosphoglycerokinase, énolase, pyruvate kinase) ainsi que d'autres enzymes en lien avec le métabolisme glucidique (phosphoglucomutase et phosphoénolpyruvate carboxylase).

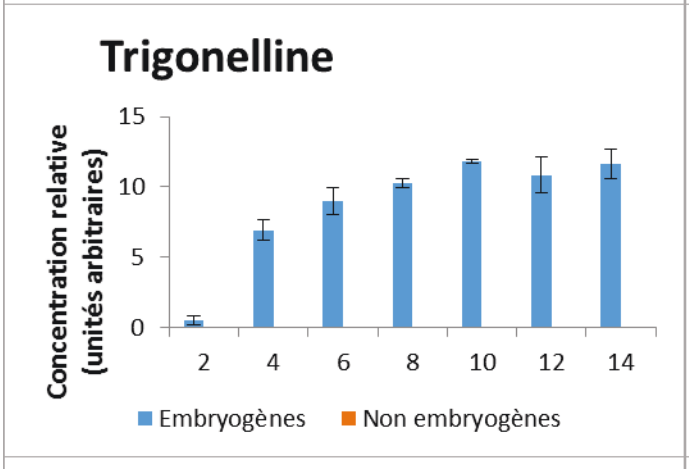
La glucokinase (GlcK; EC 2.7.1.2) et la fructokinase (FruK, 2.7.1.4) catalysent respectivement la phosphorylation du glucose et du fructose en glucose-6-P et en fructose-6-P. Ensemble avec les phosphorylations catalysées par la phosphofructokinase et la pyruvate kinase, ces réactions irréversibles sont considérées comme des points de contrôle majeurs dans la régulation de la glycolyse. Le glucose-6-P produit par l'action de la glucokinase peut ensuite être pris en charge par la phosphoglucomutase (PGM; EC 5.4.2.2) ou la phosphoglucose isomérase (PGI; EC 5.3.1.9). La PGM catalyse l'interconversion du glucose-6-Phosphate et du glucose-1-Phosphate, et constitue une enzyme clé du métabolisme du glucose de par son action à l'interface entre les réactions biosynthètiques (le glucose-1-P est un précurseur de la synthèse de l'amidon, du saccharose et des composés de la paroi cellulaire) et catabolique (le glucose-6-P est le substrat de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates). La PGI est, quant à elle, impliquée dans la 2^{e} réaction de la glycolyse et catalyse la conversion du glucose-6-P en fructose-6-P. La phosphofructokinase ATP dépendante (ATP-PFK; EC 2.7.1.11) catalyse ensuite la phosphorylation irréversible du fructose-6-P en fructose-1,6-bisphosphate, première réaction entièrement spécifique à la glycolyse. Elle constitue donc un point de contrôle important du flux entrant dans la glycolyse. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBP aldolase ; EC 4.1.2.13) et la triose phosphate isomerase (TPI ; EC 5.3.1.1) interviennent respectivement au niveau de la 4ème et de la 5ème réaction de la glycolyse et permettent de cliver le fructose-1,6-bisphosphate en glyceraldéhyde-3-phosphate (G3P) et en di-hydroxy-acetone-phosphate (DHAP) puis d'isomeriser la DHAP en G3P. La phosphoglycerokinase (PGK ; EC 2.7.2.3) intervient au niveau de la 7ème réaction de la glycolyse en catalysant le transfert d'un groupement phosphate du 1,3-bisphosphoglycerate vers une molécule d'ADP pour former du 3-phosphoglycerate et

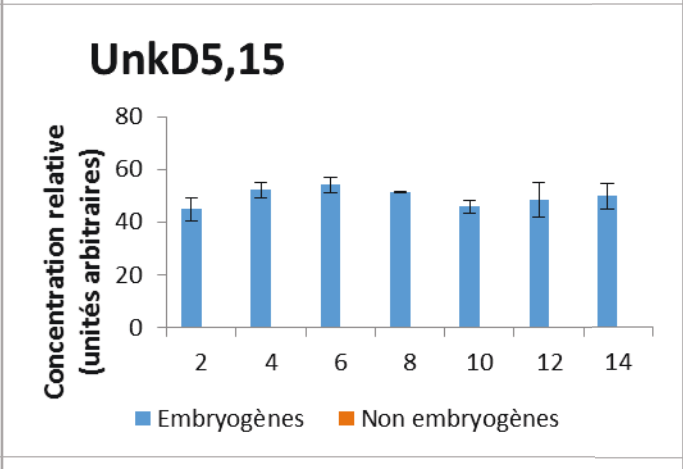

Thréonine
Concentration relative (unités arbitraires)
400
300
200
100
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes

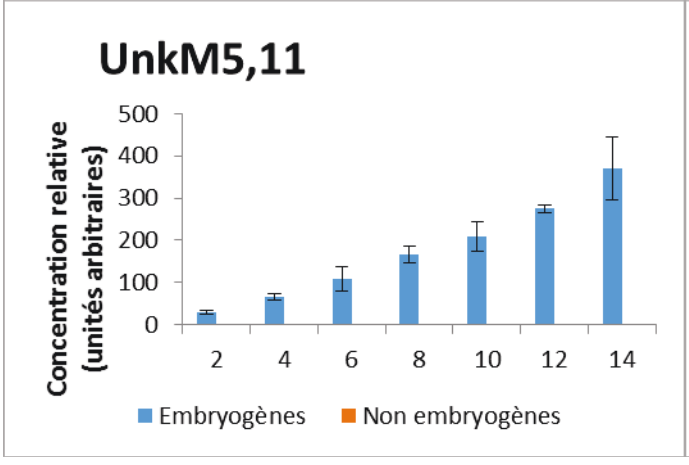

Tyrosine
Concentration relative (unités arbitraires)
250
200
150
100
50
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes

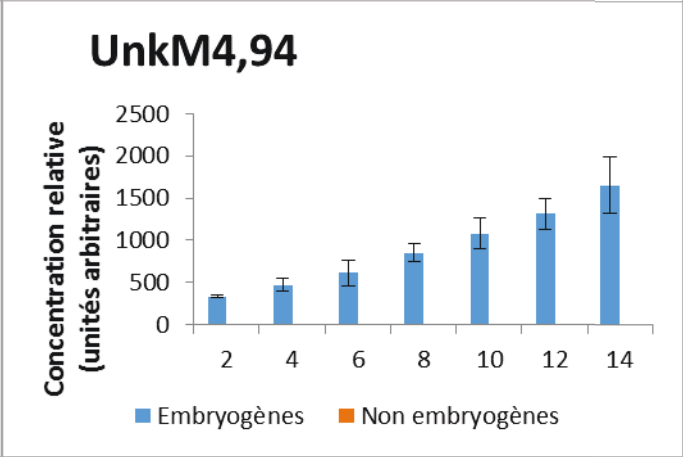

Valine
Concentration relative (unités arbitraires)
80
60
40
20
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes


Pyroglutamate
Concentration relative (unités arbitraires)
300
200
100
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes


Trigonelline
Concentration relative (unités arbitraires)
15
10
5
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes


UnkD5,15
Concentration relative (unités arbitraires)
80
60
40
20
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes


UnkM5,11
Concentration relative (unités arbitraires)
500
400
300
200
100
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes


UnkM4,94
Concentration relative (unités arbitraires)
2500
2000
1500
1000
500
0
2 4 6 8 10 12 14
Embryogènes
Non embryogènes

de l'ATP. L'énolase (EC 4.2.1.11) et la pyruvate kinase (PK; EC 2.7.1.40) interviennent respectivement dans la 9^{e} et la 10^{e} réactions de la glycolyse, en catalysant la conversion du 2-phosphoglycerate en phosphoénolpyruvate (PEP) puis du PEP en pyruvate. La PEP carboxylase (PEPC; EC 4.1.1.31) catalyse la formation d'oxaloacétate à partir du PEP. Cette enzyme joue un rôle primordial chez les plantes présentant un métabolisme de type C4 et CAM en participant à la fixation du CO2. L'activité de cette enzyme permet également de maintenir l'activité du cycle de Krebs. En effet, certains intermédiaires du cycle de Krebs sont les précurseurs de voies de biosynthèse d'acides aminés. En synthétisant de l'oxalacétate, ensuite converti en malate pour rentrer dans le cycle de Krebs, la PEP carboxylase permet de prévenir l'épuisement de ces intermédiaires (Voll et al. 2009).

Les activités enzymatiques mesurées *in vitro* sur des extraits cellulaires, correspondent à des activités maximales, donc uniquement dépendantes de la quantité d'enzymes fonctionnelles dans l'extrait. Il n'est donc pas possible d'observer une éventuelle régulation allostérique. Cette étude va cependant nous permettre de rendre compte des différences en terme de capacité métabolique existant entre cellules embryogènes et non embryogènes. Cela devrait nous permettre de mieux comprendre les différences observées au niveau du métabolisme des deux types cellulaires.

1.1.3.5.1 Comparaison des activités maximales des enzymes de la glycolyse des cellules embryogènes et non embryogènes de Vigne

L'analyse en composante principale des activités enzymatiques révèle des différences nettes entre les cellules embryogènes et non embryogènes (Figure 31 A et B). Le 1er axe qui explique 49,13% de la variance permet de séparer le groupe des cellules embryogènes de celui des cellules non embryogènes. Cette observation suggère que les 2 types cellulaires présentent de fortes différences au niveau des activités des enzymes du métabolisme du glucose (Figure 31 A).

Les cellules non embryogènes sont caractérisées par une activité relativement élevée des hexokinases (GluK et FruK), de l'ATP-PFK et de l'énolase (Figure 31 B). Tandis que les cellules embryogènes sont caractérisées par une activité relativement plus importante de la PGI, de la FBP aldolase, de la TPI, de la PEPC et de la PK. D'une manière intéressante, les cellules non embryogènes montrent une forte activité maximale de trois enzymes catalysant des réactions irréversibles de la glycolyse (GluK, FruK et ATP-PFK). Etant conscient qu'il n'existe pas de corrélation directe entre l'activité maximale d'une enzyme et son activité

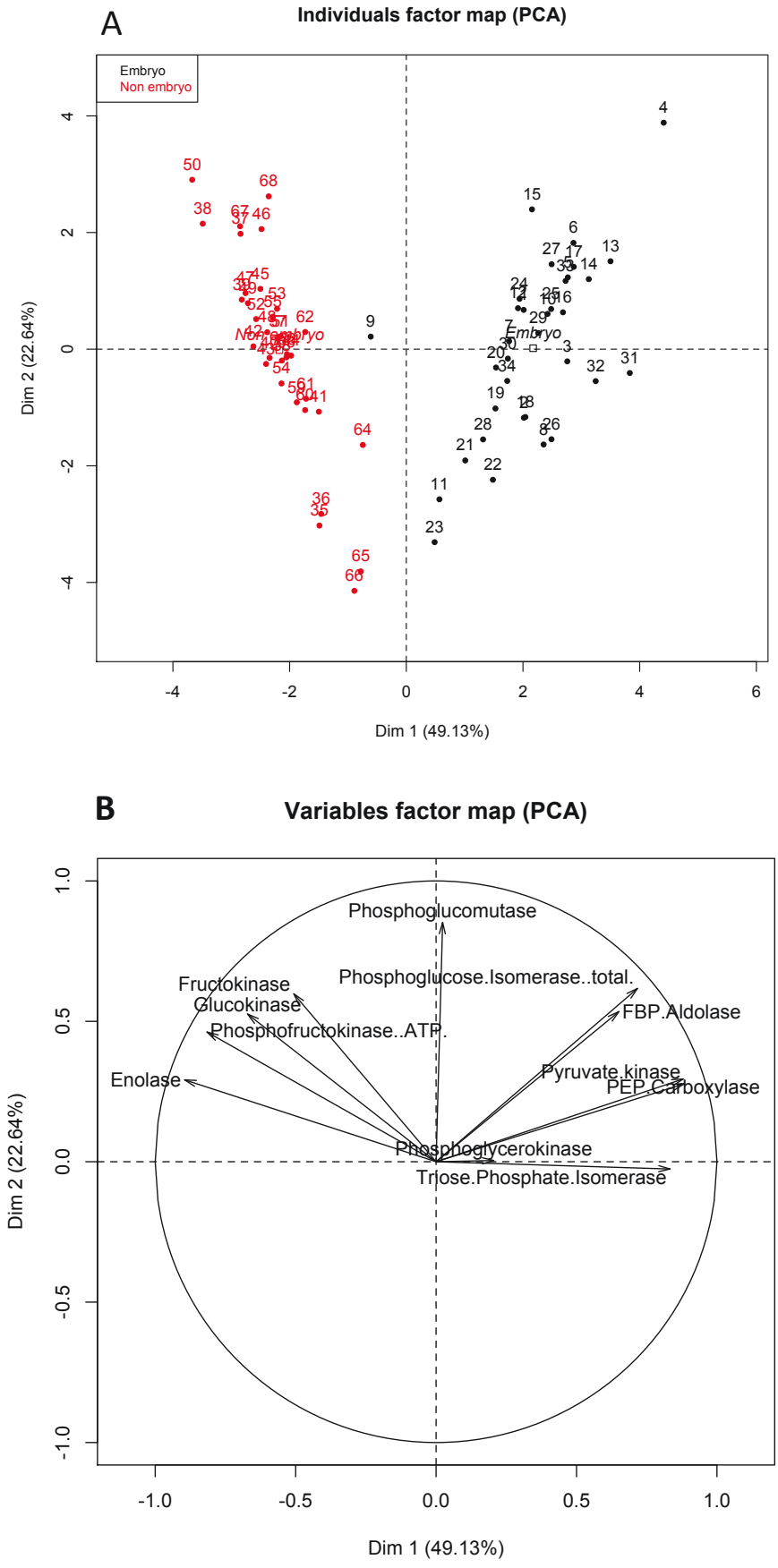


Figure 31 Analyse en composante principale (ACP) des données des activité enzymatiques sur les cellules embryogènes et non embryogènes WT et *35S::VvMSA*-RNAi. Carte des individus (A) et cercle des corrélations (B). L'activité maximale des enzymes a été déterminée sur des cellules prélevées après huit jours de culture (J8) et incubées 30h ou 48h dans leur milieu de culture complet (GM+ ou Gb ANA/BAP pour les cellules embryogènes et non embryogènes respectivement).

effective *in vivo* (Beauvoit et al. 2014), la plus forte production de ces trois enzymes chez les cellules non embryogènes semble confirmer l'idée, selon laquelle leur activité glycolytique est supérieure à celle des cellules embryogènes. D'autre part, la forte activité maximale de ces trois enzymes, consommatrices d'ATP, suggèrent que les cellules non embryogènes ont un mécanisme de type « turbo » (Biais et al. 2014). Un métabolisme de type turbo est caractérisé par un investissement énergétique, ici la consommation d'ATP au niveau des étapes catalysées par les hexokinases et l'ATP-PFK, suivi d'un retour sur investissement lié à la production d'énergie au niveau de la suite de la voie métabolique (Teusink et al. 1998). Ce type de métabolisme nécessite l'existence d'un équilibre entre l'activité des enzymes consommatrices d'énergie et la production énergétique de la cellule. De ce fait si l'activité de la GluK et de l'ATP-PFK est importante, il faudrait que la production d'ATP soit suffisante pour éviter un déséquilibre. Or, le fait que les cellules non embryogènes soient caractérisées par des concentrations élevées en intermédiaires du cycle de Krebs suggère qu'elles présentent une respiration et donc une production d'ATP importante.

Une différence fondamentale entre les deux types cellulaires concerne le système vacuolaire, bien développé chez les cellules non embryogènes contrairement aux cellules embryogènes (Yeung 1995; Charbit et al. 2004; Na et al. 2007; Shang et al. 2009; Pan et al. 2011; Wang et al. 2013b). En effet, les cellules embryogènes 41B contiennent deux fois moins d'eau que les cellules non embryogènes 41B (Figure 32 B) et en revanche plus de protéines (Figure 32 A). Les données de la littérature semblent en cohérence avec les différences observées entre les cellules embryogènes et non embryogènes 41B de Vigne. Les cellules embryogènes chez lesquelles la division est active, présentent néanmoins une phase d'expansion modérée. Or la phase d'expansion passe par une accumulation de solutés au niveau de la vacuole, sucre et acides organiques en particulier, (Beauvoit et al. 2014) permettant de générer la différence de potentiel osmotique nécessaire à l'expansion vacuolaire et par conséquent à la croissance cellulaire. Ce mécanisme est fortement coûteux en ATP car le transport actif des solutés à travers le tonoplaste contre leur gradient de concentration requiert le maintien d'une force protonmotrice par l'action d'ATPase pompe à proton (Beauvoit et al. 2014). Il est donc probable que les cellules non embryogènes aient un métabolisme glucidique plutôt axé vers la production d'ATP, afin de subvenir aux besoins énergétiques élevés, liés à leur rythme de division cellulaire très soutenu et à la mise en place de leur système vacuolaire développé. Cette stratégie se traduirait par une forte activité maximale des enzymes catalysant les réactions irréversibles de la partie haute de la glycolyse.

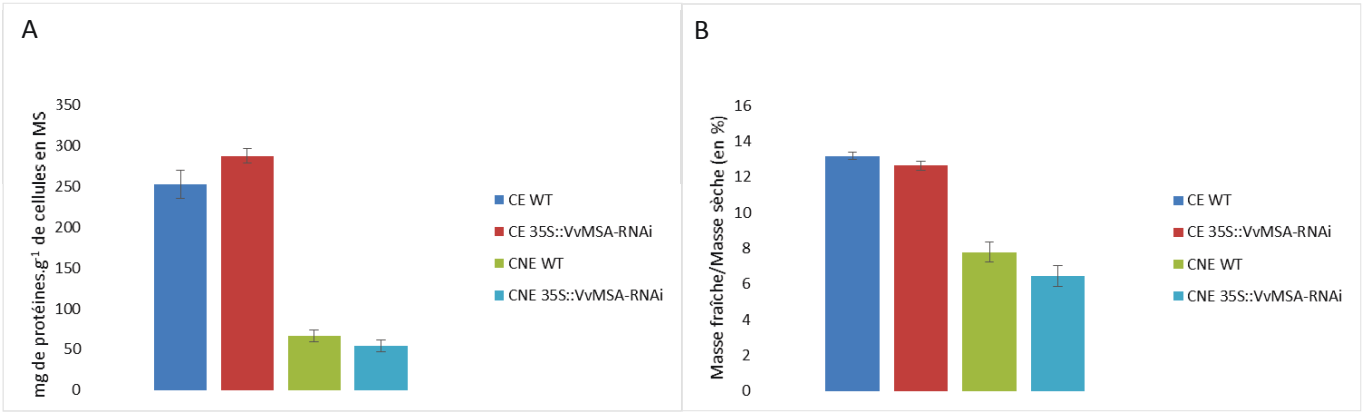


Figure 32 Analyse de la quantité de protéines totales (A) et du rapport masse sèche/masse fraîche (B) chez les cellules embryogènes et non embryogène 41B WT et *35S::VvMSA*-RNAi. Les mesures ont été réalisées sur trois prélèvements/réplicats techniques des cellules prélevées à J8.

Les cellules embryogènes sont quant à elles caractérisées par une activité relativement plus importante de la PGI, de l'aldolase, de la TPI, de la PK et de la PEPc. L'étude métabolomique a permis de démontrer que les cellules embryogènes utilisent probablement le glycérol comme source de nutrition carbonée. Chez les plantes, le glycérol est en effet susceptible d'entrer dans la glycolyse après avoir été phosphorylé par la glycerokinase et transformé en DHAP par la glycérol-3-P-déshydrogénase (Aubert et al. 1994). La forte activité maximale de la TPI permet potentiellement aux cellules embryogènes de métaboliser rapidement la DHAP formée à partir du G3P. La conversion rapide de la DHAP en Gal3P permettrait alors de stimuler la formation de DHAP à partir de G3P en maintenant un déséquilibre entre les concentrations en G3P et en DHAP de telle sorte que [DHAP] << [G3P] et ce, malgré une activité enzymatique maximale faible de la Glycerol-3-P-déshydrogénase (résultat non présenté).

Par ailleurs, les cellules embryogènes sont caractérisées par une activité maximale importante au niveau de l'aldolase et de la PGI. Les réactions catalysées par ses deux enzymes, contrairement à l'ATP-PFK et la GluK, sont réversibles. Elles interviennent aussi bien dans la glycolyse que dans la néoglucogenèse. Le sens de la réaction dépend des concentrations relatives des produits et des substrats des réactions qu'elles catalysent. Dans le cas des cellules embryogènes, le maltose est hydrolysé très lentement, ce qui se traduit par une concentration intracellulaire en glucose très faible. Il semble probable que les concentrations relatives en intermédiaires de la glycolyse/néoglucogenèse favorisent la néoglucogenèse plutôt que la glycolyse (du moins sur la partie supérieure de la voie). Aubert et collaborateur ont observé que l'accumulation de G3P suivant l'apport de glycérol à des pointes racinaire de maïs en carence glucidique impose une forte inhibition allostérique au niveau de la PGI. Ce mécanisme inhibe très fortement la néoglucogenèse (Aubert et al, 1994). Cependant, plusieurs études rapportent que l'apport de glycérol, comme seule source de nutrition carbonée, à des cultures cellulaires conduit à la formation de sucres solubles et d'amidon (Vu et al. 1993; Bellettre et al. 1999). Chez une suspension cellulaire de Chicorée, l'analyse des composés radiomarqués après incubation des cellules dans un milieu contenant du ^{14}C-Glycérol a été réalisée. Elle met en évidence qu'à partir du glycérol radiomarqué sont formés du saccharose, du glucose et du fructose. Ces études démontrent que le glycérol peut former des sucres solubles probablement *via* la néoglucogenèse dans des cultures cellulaires hétérotrophes (Belletre et al. 1999). De même, des cals d'agrumes placés sur un milieu, dont la seule source de nutrition carbonée est le glycérol, produisent des sucres soluble en faible quantité et de

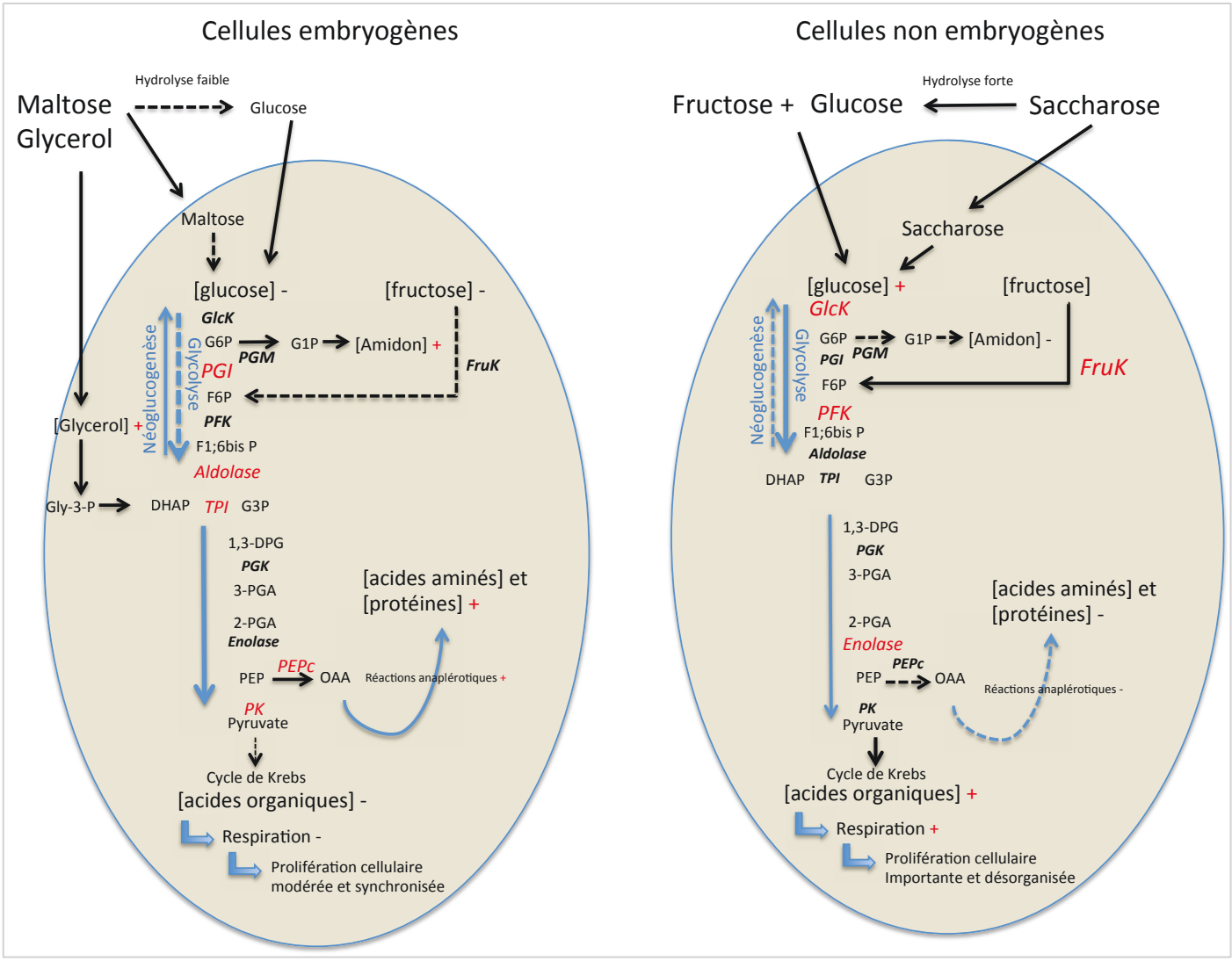


Figure 33 : Schéma récapitulatif de la caractérisation des modèles d'étude cellules embryogènes et cellules non embryogènes de Vigne. Les cellules embryogènes sont caractérisées par de faibles concentrations intracellulaires en hexoses et présentent une faible activité au niveau de la partie supérieure de la glycolyse. Le glycérol entre dans la glycolyse à partir de la DHAP. La forte activité maximale (en rouge) de la TPI et de l'aldolase indiquent que ces cellules ont la capacité d'orienter la DHAP ainsi produite soit vers la partie basse de la glycolyse soit vers la néoglucogenèse. La concentration élevée en acides aminés et en protéines et la faible concentration en acide organiques du cycle de Krebs indiquent que ces derniers sont consommés pour synthétiser des acides aminés. La forte activité maximale de la PEPc suggère qu'une partie du flux glycolytique est réorienté vers les réactions anaplérotiques permettant de maintenir l'activité du cycle de Krebs et la synthèse des acides aminés. L'ensemble de ces résultats indique que les cellules embryogènes présentent un métabolisme énergétique faiblement actif, ce qui se traduit par une prolifération cellulaire lente mais synchronisée. Les cellules non embryogènes sont caractérisées par de fortes concentrations intracellulaires en hexoses, les activités maximales élevées des hexokinases et de la PFK, catalysant les réactions irréversibles de la partie supérieure de la glycolyse, indiquent que ces cellules ont la capacité de diriger préférentiellement le glucose et le fructose vers la glycolyse. La forte concentration des intermédiaires du cycle de Krebs et la plus faible concentration en acides aminés indiquent également que ces cellules dirigent préférentiellement le flux glycolytique vers la respiration que vers la synthèse d'acides aminés. Cela leur permet de maintenir une prolifération cellulaire élevée mais désorganisée.

l'amidon en relativement forte quantité (Vu et al 1993). Ces observations sont en faveur d'une stimulation de la néoglucogenèse par l'apport du glycérol.

Il est également intéressant de constater que les cellules embryogènes sont caractérisées par une activité maximale très importante au niveau de la PEPc. En effet, les concentrations en acides aminés et en protéines sont élevées dans ces cellules. Or, un des rôles fondamentaux de la PEPc, consiste à convertir le PEP en oxaloacétate. Celui-ci est alors converti en malate et est importé dans la mitochondrie pour rentrer dans le cycle de Krebs. Cela permet de remédier à l'épuisement des intermédiaires du cycle de Krebs, consommés pour synthétiser des acides aminés. L'activité maximale élevée de la PEPc pourrait traduire une forte conversion du PEP en oxaloacétate afin de pallier l'épuisement des intermédiaires du cycle de Krebs lié à la synthèse d'acides aminés en forte quantité chez ces cellules. Cependant la forte activité maximale de la PK suggère que le PEP peut aussi bien être redirigé vers la synthèse de pyruvate.

Les différences observées au niveau des profils d'activités enzymatiques entre les deux types cellulaire confortent les hypothèses émises suite à l'étude métabolomique. A savoir que les cellules non embryogènes sont caractérisées par une activité glycolytique importante et un métabolisme plutôt axé sur la production d'ATP. Les cellules embryogènes semblent rediriger une part importante du flux glycolytique vers la production d'acides aminés *via* l'action de la PEPc et pourraient également présenter un niveau plus important de la néoglucogenèse (Figure 33).

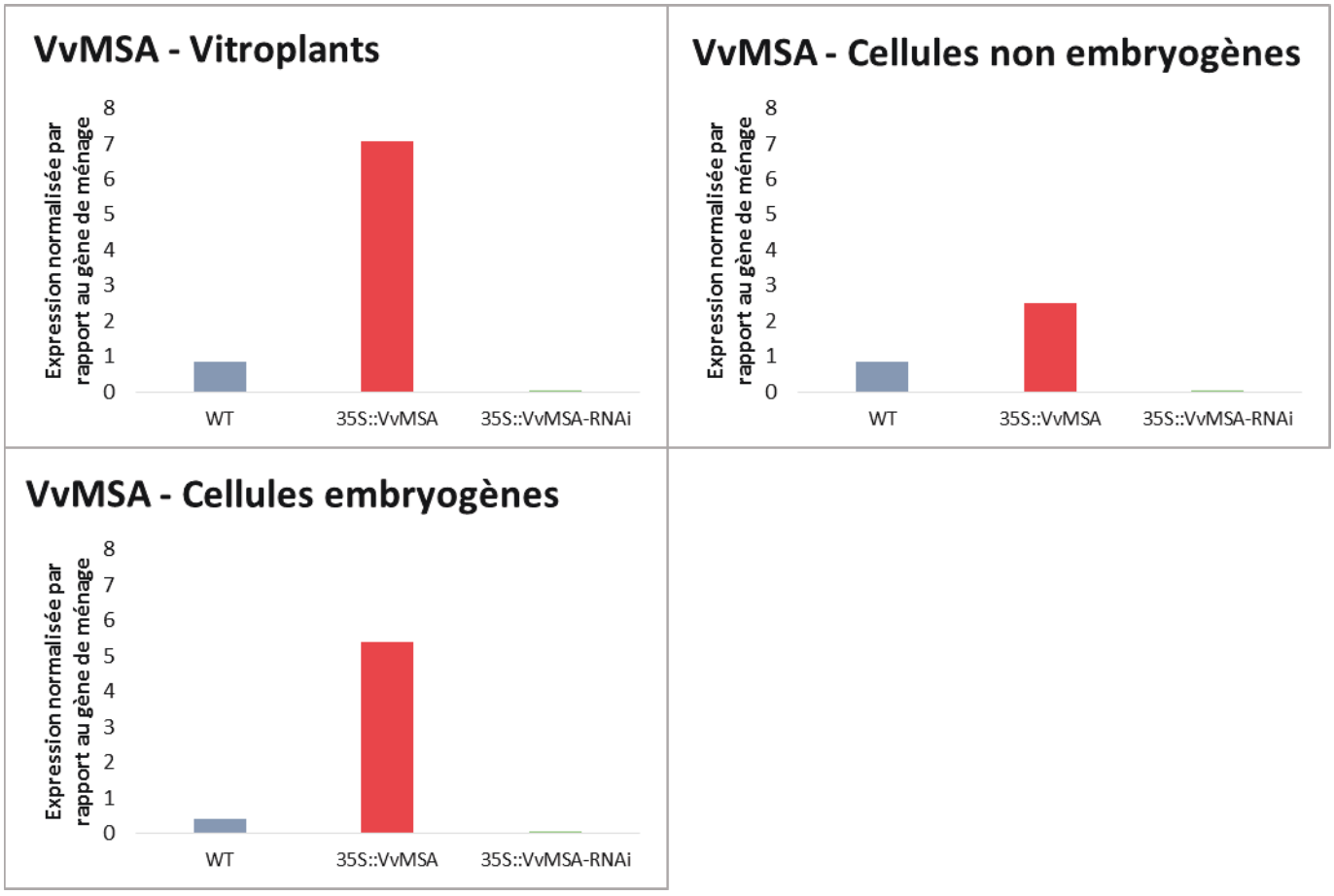


Figure 34 Analyse de l'expression de *VvMSA* au niveau des feuilles de vitroplants et des cellules embryogènes et non embryogènes 41B WT, *35S::VvMSA* et *35S::VvMSA*-RNAi. L'expression de VvMSA a été analysée sur des feuilles de vitroplants deux mois après leur micropropagation, et sur les cellules embryogènes et non embryogènes à J8 après leur repiquage. L'expression des *VvMSA* est normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage *Actine*. Les résultats présentés correspondent à une seule répétition

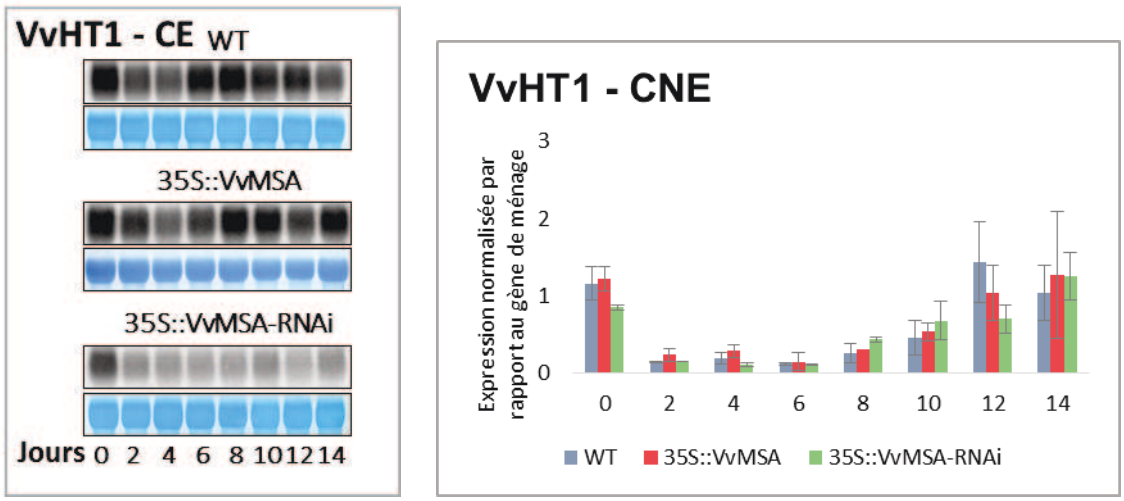


Figure 35 : Analyse de l'expression des *VvHT1* au cours de la cinétique de croissance des cellules 41B embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE) WT ; *35S::VvMSA* et *35S::VvMSA*-RNAi suivie durant quatorze jours. L'expression de *VvHT1* a été analysée par Northern blot (CE) et par qPCR (CNE). Northern blot : Les membranes sont issues du transfert de 20 µg d'ARN totaux, les signaux sont obtenus par hybridation des membranes avec une sonde radiomarquée au ^{32}P, correspondant à une portion de la région *3'UTR* du gène *VvHT1*. La calibration des dépôts d'ARN est réalisée par coloration des ARN ribosomiques *25S* avec une solution de bleu de méthylène. Les images sont représentatives de trois expériences indépendantes réalisées sur les cellules WT et *35S::VvMSA* et une expérience sur *35S::VvMSA*-RNAi. qPCR : l'expression normalisée est calculée suivant la méthode du 2-ΔCt. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de deux répétitions biologiques indépendantes.

1.2 Chapitre 2 : Approche de type pharmacologique

1.2.1 Expression de *VvMSA* chez les vitroplants, les cellules embryogènes et non embryogènes 41B

Le choix d'étudier d'abord l'expression du gène *VvMSA* est guidé par la nécessité de vérifier que sa surexpression et sa répression ont été bien conservées à partir des cellules embryogènes génétiquement modifiées, au travers des vitoplants régénérés, jusqu'aux cellules non embryogènes obtenues. Pour le WT le niveau d'expression de *VvMSA* est semblable entre les cellules non embryogènes à J8 (jour choisi par rapport à la phase de croissance cellulaire exponentielle) et les feuilles de vitroplants âgés de deux mois (âge des plants utilisés pour la création des suspensions cellulaires). Cependant, la comparaison de son expression entre les WT des deux types cellulaires à J8 montre un niveau plus faible chez les cellules embryogènes (≈ 2 fois) (Figure 34). La surexpression de *VvMSA* dans les cellules non embryogènes *35S::VvMSA* est bien marquée vis-à-vis des cellules sauvages (≈ 3 fois). Elle reste moins importante que l'expression dans les feuilles de vitroplants et les cellules embryogènes *35S::VvMSA*. La répression de *VvMSA* apparaît presque complète chez les trois modèles étudiés : les cellules non embryogènes, les vitroplants et les cellules embryogènes transformées avec *35S::VvMSA-RNAi*. Les effets des transgènes sur l'expression de *VvMSA* sont donc bien conservés chez les cellules non embryogènes même si la surexpression de *VvMSA* dans les cellules *35S::VvMSA* est légèrement moins marquée que chez les vitroplants et les cellules embryogènes.

1.2.2 Evolution de l'expression de *VvHT1*

L'analyse de l'expression de *VvHT1* au cours de la cinétique de croissance des cellules embryogènes a été réalisée par Northern blot dans le cadre de la thèse d'Anna Medici (Medici 2010) (Figure 35). Les membranes sont issues du transfert de 20 µg d'ARN totaux extraits des cellules 41B isolées après 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 14 jours de culture. Les signaux ont été obtenus par hybridation des membranes avec une sonde radiomarquée au ^{32}P, correspondant à une portion de la région 3'UTR du gène *VvHT1*. L'expression de *VvHT1* est importante lors du repiquage à J0 chez les cellules WT, *35S::VvMSA* et *35S::VvMSA-RNAi*, et diminue à J2 dans les trois types cellulaires mais d'une manière beaucoup plus marquée chez les cellules

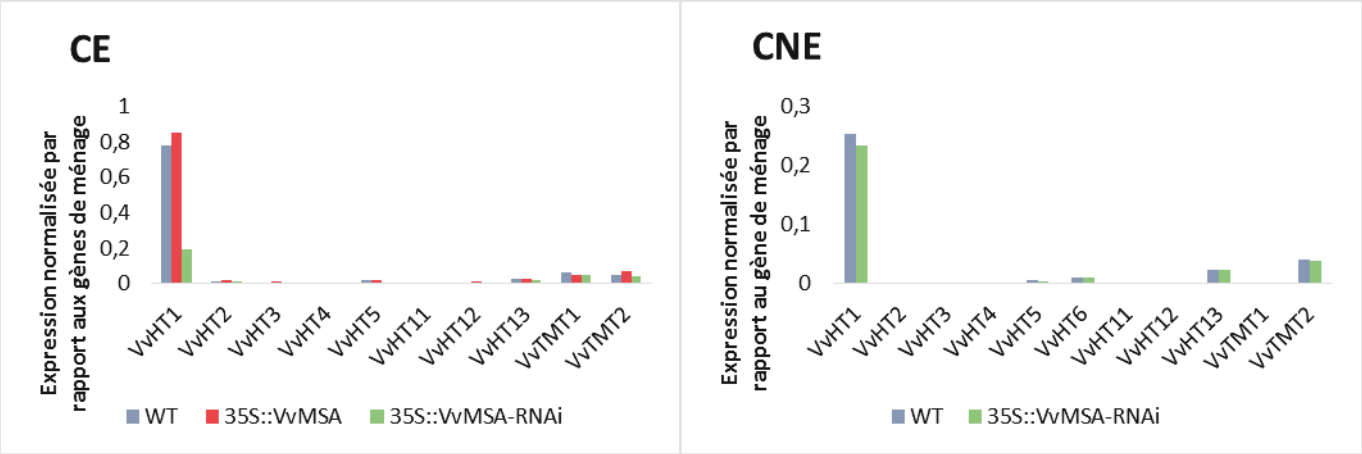


Figure 36 : Analyse de l'expression des principaux transporteurs de monosaccharides chez les cellules 41B embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE). L'expression des principaux transporteurs de monosaccharides a été déterminée huit jours après le repiquage des cellules 41B embryogènes WT, *35S::VvMSA*, *35S::VvMSA*-RNAi et non embryogènes WT et *35S::VvMSA*-RNAi. L'analyse de l'expression des transporteurs a été réalisée par macroarray thématique pour les cellules embryogènes et par qRT-PCR pour les cellules non embryogènes. L'expression des gènes présentés est normalisée par rapport à l'expression des gènes *Actine, EF1α, EF1γ* et *GAPDH* pour l'étude macroarray et *Actine* pour l'étude qRT-PCR. Les résultats présentés correspondent à une seule répétition biologique.

35S::VvMSA-RNAi. Le niveau d'expression de *VvHT1* chez les cellules WT et *35S::VvMSA* continue à diminuer entre J2 et J4 et commence à augmenter à partir de J6 pour atteindre son niveau le plus élevé à J8 puis son niveau d'expression tend à diminuer tout en restant relativement élevé. Chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* en revanche, le niveau d'expression de *VvHT1* reste très faible de J2 jusqu'à J14. Ce qui indique que la répression de VvMSA entraîne une inhibition de l'expression de *VvHT1* chez ces cellules de J2 à J14.

L'expression de *VvHT1* chez les cellules non embryogènes, analysée par RT-qPCR, est comparable entre les cellules WT, *35S::VvMSA* et *35S::VvMSA-RNAi* (Figure 35). Celle-ci est relativement importante à J0 au moment du repiquage puis diminue fortement à partir de J2 jusqu'à J8 ou elle commence à augmenter pour atteindre son maximum à J12 et J14. Il est intéressant de noter la corrélation inverse entre l'expression de *VvHT1* et la concentration en glucose dans le milieu chez les cellules non embryogènes. En effet, l'expression de *VvHT1* est faible de J2 à J8, période au cours de laquelle le saccharose est hydrolysé et le glucose encore présent dans le milieu de culture. Une fois le glucose devenu indétectable dans le milieu, l'expression de *VvHT1* commence à augmenter.

Le profil d'expression de *VvHT1* des cellules embryogènes et non embryogènes diffère fortement au cours de la cinétique de croissance. Chez les cellules embryogènes *VvHT1* est le plus fortement exprimé à J6 et J8, quand le niveau du glucose extracellulaire est maintenu faible. Chez les cellules non embryogènes son niveau d'expression est le plus élevé de J10 à J14, en parallèle de l'absence du glucose dans le milieu. Une autre observation importante concerne le fait que l'expression de *VvHT1* n'est pas inhibée par la répression de VvMSA chez les cellules non embryogènes contrairement aux cellules embryogènes.

1.2.3 Analyse de l'expression génique des transporteurs de sucres des sous familles VvHT et VvTMT

L'analyse de l'expression des transporteurs de sucres chez les cellules embryogènes WT, *35S::VvMSA* et *35S::VvMSA-RNAi* (Figure 36) a été réalisée par Anna Medici au cours de sa thèse (Medici 2010). Cette étude consistait à comparer le niveau d'expression des transporteurs de sucres de différentes sous familles (VvHT, VvTMT/VvpGlT, VvPMT, VvSUC) par macroarray thématique dans le but de déterminer si la surexpression ou la répression de VvMSA affecterait l'expression d'autres transporteurs que *VvHT1*. Ne sont

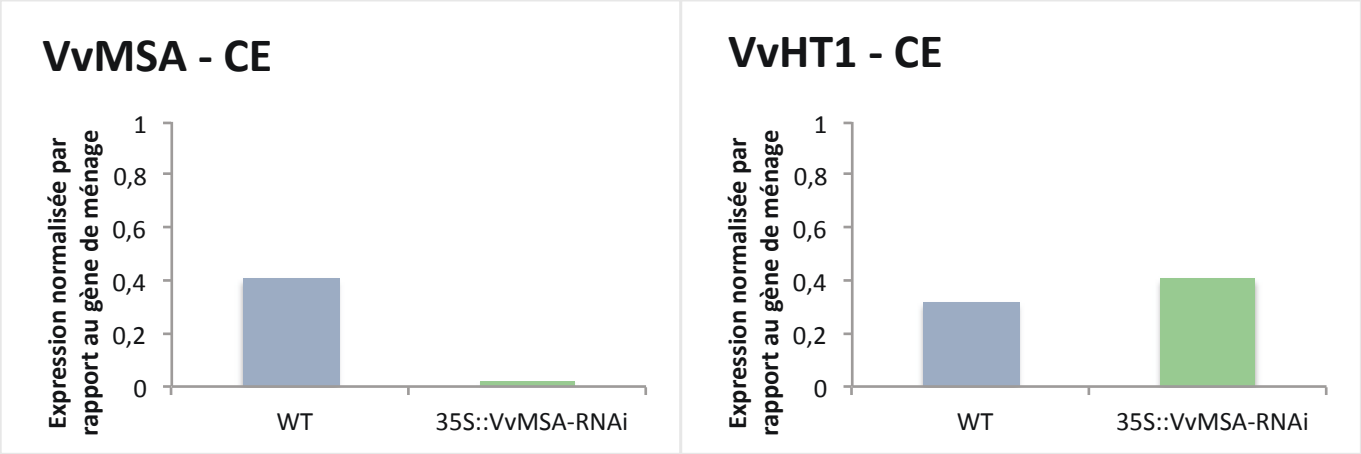


Figure 37 : Expression de *VvMSA* et *VvHT1* chez les cellules de vigne 41B embryogènes WT et *35S::VvMSA*-RNAi en 2012 à J8 après leur repiquage. L'expression des gènes étudiés est normalisée vis-à-vis de l'expression du gène de ménage *Actine*.

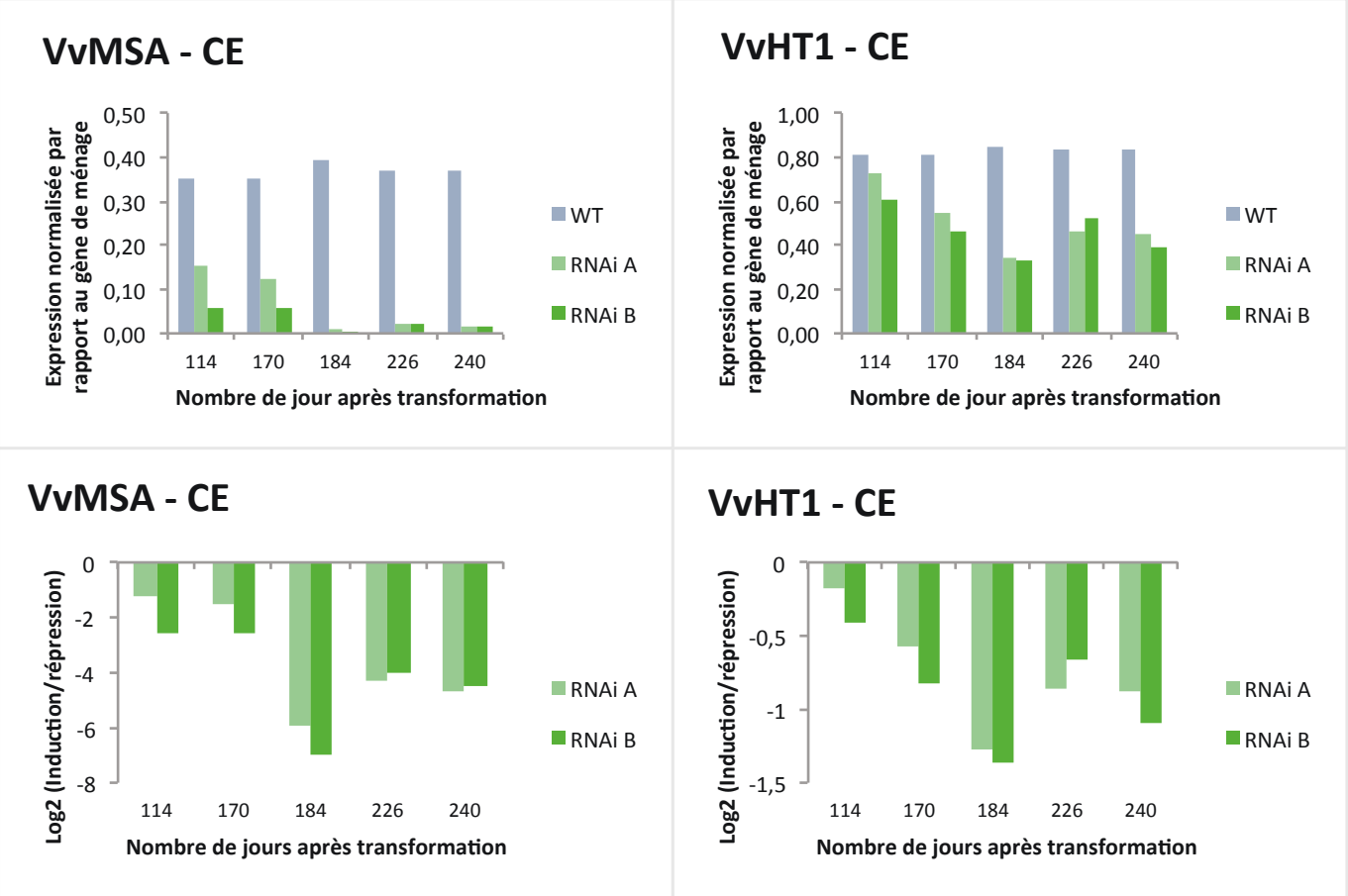


Figure 38 : Evolution de l'expression de *VvMSA* et *VvHT1* chez les cellules de vigne 41B embryogènes WT et *35S::VvMSA*-RNAi nouvellement transformées (RNAi A et B). L'expression des gènes étudiés est normalisée vis-à-vis de l'expression du gène de ménage *Actine* et rapportée à l'expression du WT pour le calcul de l'induction /répression. L'expression normalisée et l'induction/répression sont calculées suivant la méthode du 2-ΔCt et du 2-ΔΔCt respectivement.

présentés ici que les résultats concernant les gènes codant pour les transporteurs des sous familles VvHT et VvTMT. Afin de comparer les profils d'expression des gènes codant pour les transporteurs d'hexoses chez les cellules embryogènes et non embryogènes, l'analyse a également été réalisée sur les cellules non embryogènes sauvage et *35S::VvMSA-RNAi* par RT-qPCR. Le fait le plus marquant concerne l'expression de *VvHT1* qui est largement supérieure à celle des autres transporteurs de sucres analysés chez les cellules embryogènes et non embryogènes. La répression de VvMSA ne semble pas affecter l'expression des autres transporteurs de sucres étudiés et nous n'avons pas observé de complémentation fonctionnelle «spontanée» en réponse à l'inhibition de *VvHT1*. Ces résultats suggèrent que VvHT1 joue un rôle majeur dans le transport du glucose chez les cellules 41B embryogènes et non embryogènes en conditions hétérotrophes.

L'inhibition de *VvHT1* chez les cellules embryogènes *35S::VvMSA-RNAi* n'est observée ni chez les cellules non embryogènes, ni au cours de la cinétique de croissance, comme le montre l'analyse de l'expression de *VvHT1*. N'ayant pas observé d'inhibition de l'expression de *VvHT1* chez les cellules non embryogènes *35S::VvMSA-RNAi*, nous avons souhaité vérifier si cet effet était toujours présent chez les cellules embryogènes *35S::VvMSA-RNAi* (Figure 37). Il apparaît que malgré la répression de VvMSA chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi*, l'inhibition de l'expression de *VvHT1* n'est plus maintenue chez ces cellules. Etant donné que VvHT1 apparaît comme un transporteur majeur chez les cellules 41B hétérotrophes, il est probable qu'elles aient restaurées l'expression génique de ce transporteur par un mécanisme d'acclimatation.

Afin d'appréhender la restauration du niveau d'expression de *VvHT1*, nous avons réalisé deux nouvelles transformations génétiques des cellules embryogènes 41B sauvages avec la construction *35S::VvMSA-RNAi* exactement dans les mêmes conditions que les précédentes. Afin de suivre les niveaux d'expression de *VvMSA* et *VvHT1* au cours du temps, des prélèvements de cellules ont été réalisés à plusieurs reprises après la transformation et la stabilisation des cellules transgéniques (Figure 38). Les résultats montrent clairement que la répression de VvMSA par l'approche RNAi se met progressivement en place avec la sélection des cellules génétiquement modifiées sous la pression de la kanamycine. En effet, au bout de 4 mois, la répression de VvMSA est significative dans les deux cultures cellulaires mais nettement plus prononcée pour la deuxième transformation. A ce stade, l'expression de *VvHT1* n'est pas encore très affectée, malgré la mise en place de l'inhibition de ce gène. A six mois, la répression de *VvMSA* se confirme et l'inhibition de *VvHT1* devient significative. A huit mois, les cellules issues des deux transformations indépendantes manifestent le même niveau de

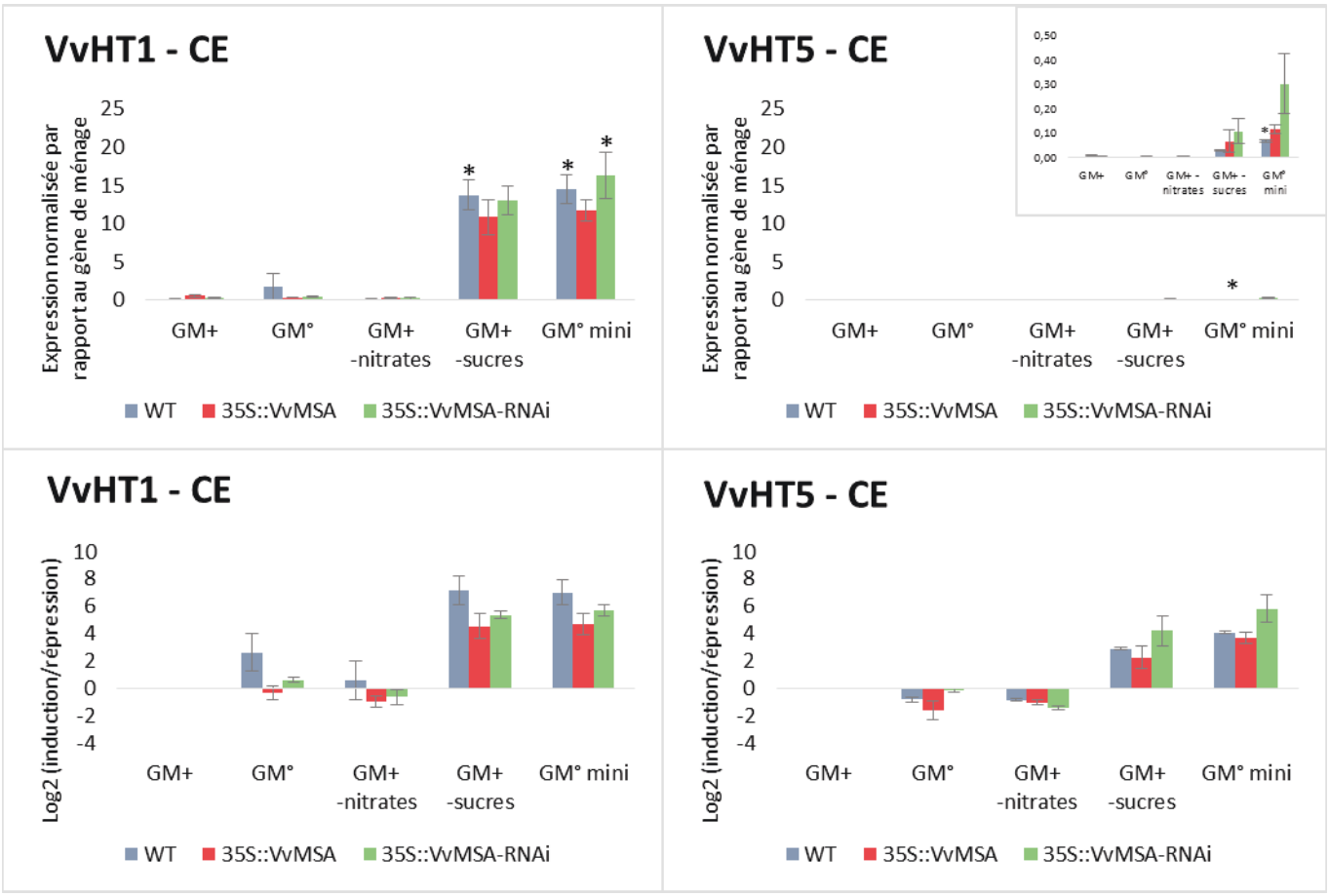


Figure 39 : Analyse de l'influence du milieu de culture sur l'expression de *VvHT1* et *VvHT5* chez les cellules embryogènes (CE) (GM+ : milieu de culture complet, GM° : milieu sans auxines, GM+ -KNO3 : milieu sans nitrate, GM+ -sucres : milieu sans maltose et sans glycerol, GM° mini : milieu sans auxines, nitrates, maltose ni glycerol). L'expression des gènes étudiés est normalisée vis-à-vis de l'expression du gène de ménage Actine rapportée à la condition témoin pour le calcul de l'induction/répression. L'expression normalisée et l'induction/répression sont calculées suivant la méthode du 2-ΔCt et du 2-ΔΔCt respectivement. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de trois répétitions biologiques. Les étoiles indiquent une différence statistiquement significative par rapport à la condition GM+ (p value < 0,05 ; test effectué : Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples).

répression de *VvMSA* et une inhibition soutenue de *VvHT1*. Cependant, à neuf mois, malgré la stabilisation de la répression de *VvMSA*, l'inhibition de *VvHT1* est pratiquement perdue. L'analyse de l'expression du *VvHT1*, considéré comme transporteur majeur de monosaccharides en conditions hétérotrophes, a permis de révéler la complexité du processus de sélection des cellules transgéniques par rapport à leur résistance à l'antibiotique et à l'égard de leur propre métabolisme énergétique.

1.2.4 Mise en place des conditions expérimentales

Nous avons choisi de réaliser les traitements par les effecteurs glucidiques sur les cellules de Vigne à J8, étape du cycle de prolifération à laquelle la teneur en glucose dans le milieu nutritif est très faible pour les deux types de cellules (embryogènes et non embryogènes). Le gène cible, *VvHT1*, est fortement exprimé à ce stade de la cinétique de croissance. En se basant sur les résultats obtenus dans notre équipe et ceux de la littérature, montrant que le glucose inhibe l'expression de *VvHT1* (Agasse 2004 ; Conde et al. 2006) et que les effets de la signalisation glucidique peuvent être contrecarrés par ceux de la signalisation du nitrate (Stitt and Krapp 1999 ; Moore et al. 2003), nous avons souhaité évaluer l'impact de la carence en sucre et/ou en nitrate sur les effets du glucose et ses analogues.

1.2.4.1 Mises en place des conditions expérimentales chez les cellules embryogènes

Nous avons cherché à déterminer les facteurs susceptibles de limiter la répression de *VvHT1* par le glucose chez les cellules embryogènes. Les sucres considérés dans le sens large, maltose et glycérol, les nitrates et la forte pression des auxines utilisées pour maintenir les cellules à l'état embryogène nous ont paru susceptibles de limiter la réactivité des cellules aux traitements par les effecteurs glucidiques. Nous avons étudié indépendamment l'impact de chacune de ces composantes du milieu sur l'expression de *VvHT1* (Figure 39). L'expression de *VvHT1* et *VvHT5*, deux transporteurs de monosaccharides, le premier dépendant et le second indépendant de la répression de VvMSA, est relativement faible dans le milieu nutritif complet, utilisé pour cultiver les cellules (GM+), ainsi que dans le même milieu dépourvu d'auxines (GM°) ou dépourvu de nitrate (GM+ - KNO3). En revanche leur expression est beaucoup plus élevée dans les milieux GM+ -sucres (dépourvu de maltose et de glycérol) et

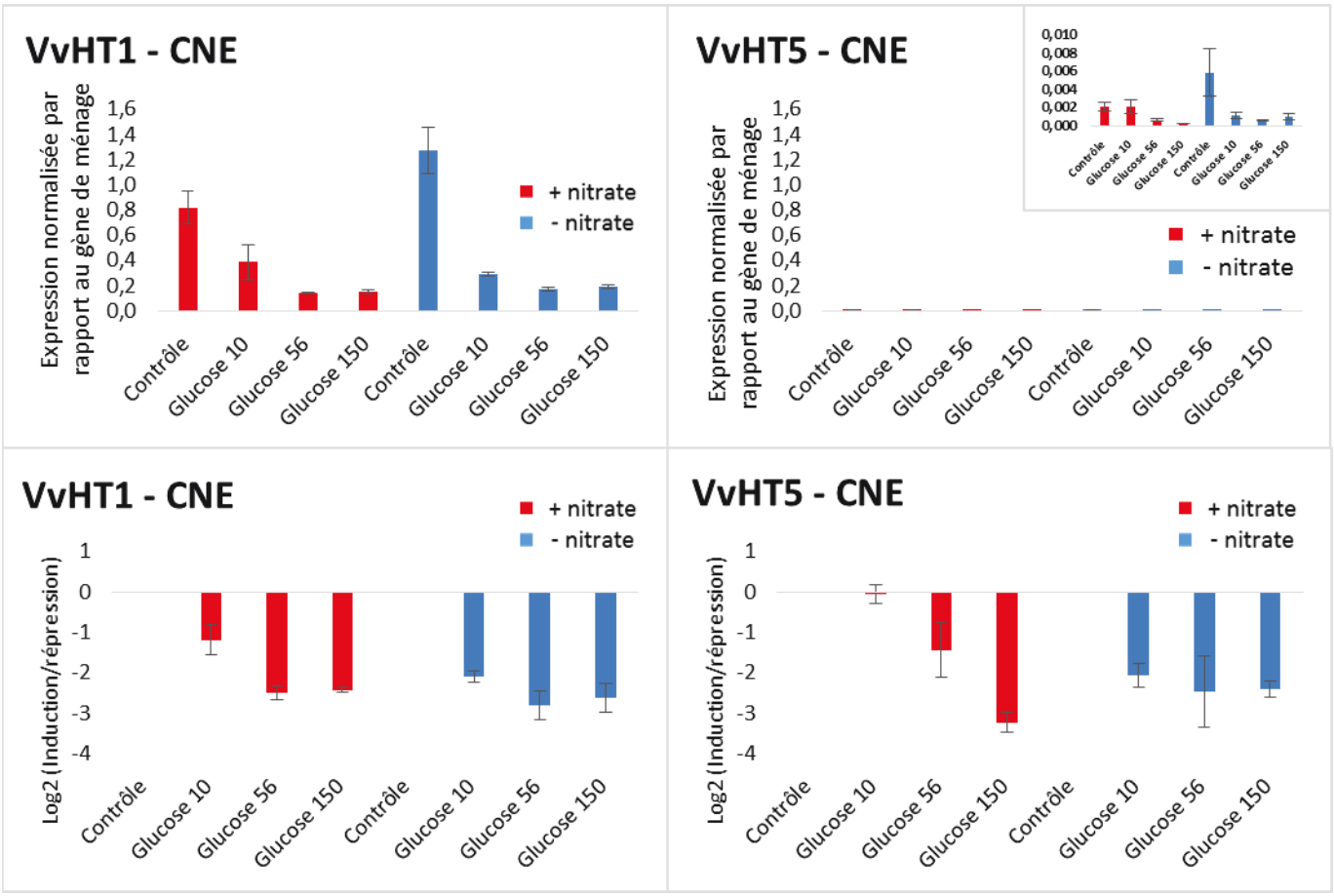


Figure 40 : Analyse de l'expression de *VvHT1* et *VvHT5* sur des cellules non embryogènes (CNE) sauvages soumises à différents traitements (Glucose10 = Glucose 10 mM, Glucose56 = Glucose 56 mM, Glucose150 = Glucose 150 mM), en présence (+ nitrate) et en absence (- nitrate) de nitrates. L'expression des gènes étudiés est normalisée vis-à-vis de l'expression du gène de ménage *Actine* et rapportée à la condition témoin pour le calcul de l'induction/répression. L'expression normalisée et l'induction/répression sont calculées suivant la méthode du 2-ΔCt et du 2-ΔΔCt respectivement. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de deux répétitions biologiques.

GM° minimum (dépourvu d'auxine, de nitrates et de sucres). Il semble donc que la composante limitant majoritairement les effets du glucose sur l'expression de *VvHT1* et *VvHT5* soit le sucre. Cependant, l'expression légèrement plus élevée de *VvHT1* et de *VvHT5* dans le milieu GM° minimum par rapport au milieu GM+ -sucre suggère un possible effet additif d'une ou plusieurs des composantes analysées. Le milieu GM° minimum sera donc utilisé comme milieu de base pour réaliser les traitements dans la suite de l'étude.

1.2.4.2 Mises en place des conditions expérimentales chez les cellules non embryogènes

Un autre résultat intéressant chez les cellules non embryogènes concerne l'effet d'induction de l'expression de *VvHT1* et *VvHT5* par la carence en nitrates dans le milieu dépourvu de sucre (Figure 40). Vingt quatre heures après avoir transféré les cellules non embryogènes sauvages sur un milieu de culture dépourvu de sucres (Gb ANA/BAP – sucre ; Annexe n°15) ou dépourvu à la fois de sucres et de nitrates (Gb ANA/BAP minimum; Annexe n°7), nous avons observé une induction de 1,5 fois pour *VvHT1* et de plus de 2,5 fois pour *VvHT5*. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus chez les cellules embryogènes et confirment que les sucres et les nitrates dans le milieu peuvent limiter la sensibilité des cellules au glucose exogène. Le milieu utilisé pour réaliser les traitements par les effecteurs glucidiques sur les cellules non embryogènes dans la suite de l'étude sera donc le milieu Gamborg ANA/BAP dépourvu de saccharose et de source de nitrates, appelé Gamborg ANA/BAP minimum.

Ensuite nous avons testé l'effet du glucose à différentes concentrations (Figure 40). Afin de pallier le stress lié au repiquage et d'épuiser les sucres et nitrates endogènes, les cellules sont incubées pendant 24 h sur les milieux cités plus haut avant que les traitements ne soient réalisés. Le fait de réaliser le traitement sur un milieu dépourvu de sucre permet d'observer une inhibition de l'expression de *VvHT1* de deux fois pour une concentration aussi faible que 10 mM. Cette inhibition est encore plus marquée pour les traitements réalisés sur le milieu dépourvu de nitrates (quatre fois). De même l'expression de *VvHT5* est réprimée d'une manière beaucoup plus significative en absence de nitrate par les traitements avec le glucose à 10 mM et 56 mM. Pour des concentrations en glucose plus élevées (150 mM) l'impact des nitrates sur la répression de *VvHT1* et de *VvHT5* ne semble plus significatif. La soustraction des sucres et des nitrates au milieu de culture lors des traitements, nous permet de diminuer la concentration efficace du glucose à 10 mM.

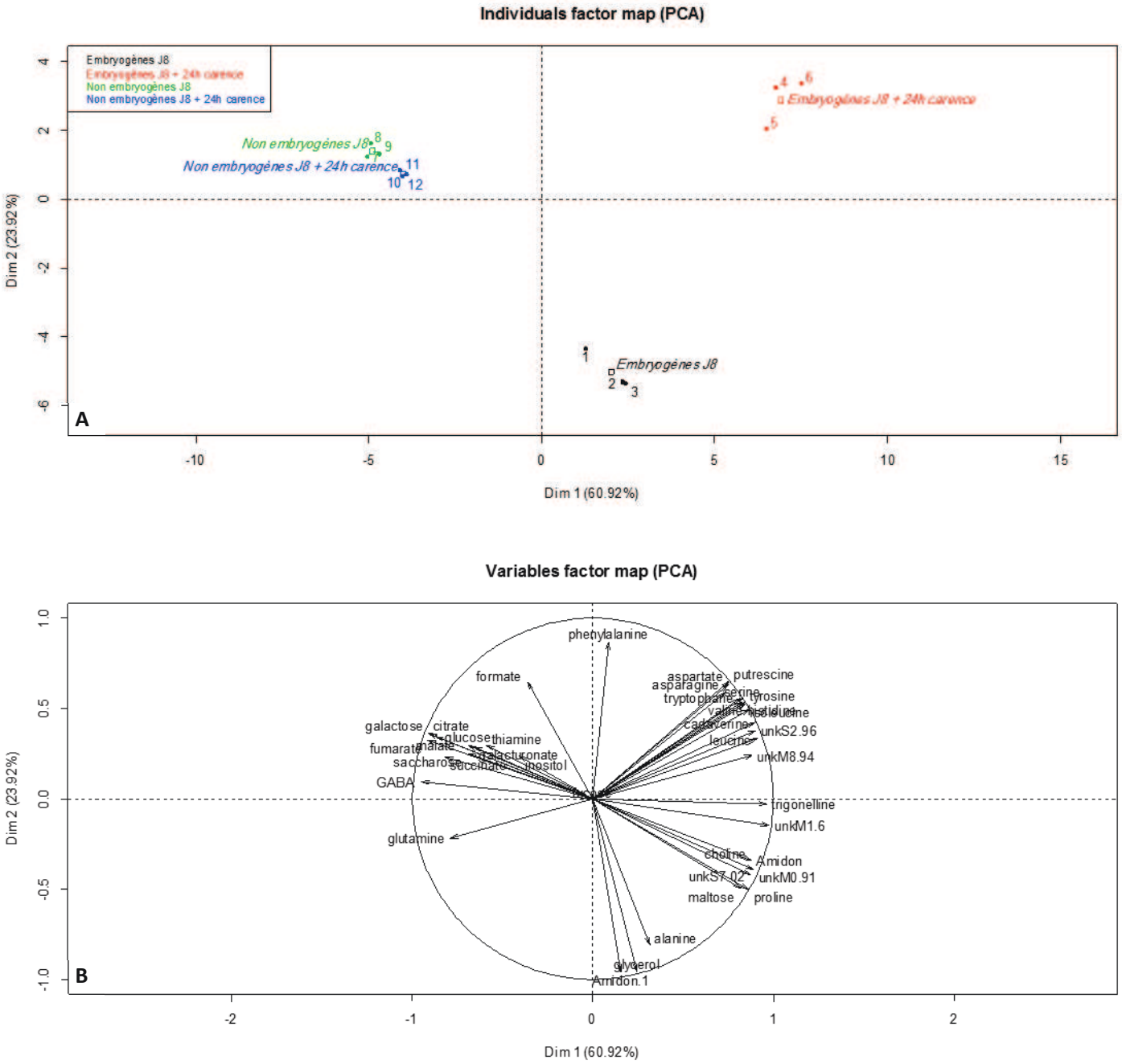


Figure 41 Analyse en composante principale (ACP) des données du dosage des métabolites cellulaires des cellules embryogènes et non embryogènes WT à J8 et J8 + 24h de carence. Carte des individus (A) et cercle des corrélations (B). L'ensemble des données du dosage des métabolites ont été utilisées à l'exception de celles concernant le glutamate, dont la quantification chez les cellules non embryogène n'a pas été possible. Les métabolites solubles ont été dosés par RMN du proton tandis que l'amidon a été quantifié par une méthode enzymatique. Le dosage des métabolites a été réalisé sur trois répétitions biologiques indépendantes.

1.2.4.3 Détermination de l'effet de l'étape de carence sur le métabolisme des cellules

L'étude du métabolome des cellules embryogènes et non embryogènes par RMN du proton a été élargie à l'analyse de l'effet du prétraitement de 24h visant à imposer une carence en sucres et en nitrates aux cellules. Le but de cette analyse est de déterminer l'état métabolique, dans lequel se trouvent les cellules au moment du traitement, afin de mieux appréhender la réponse des cellules aux effecteurs glucidiques.

Une ACP a été réalisée afin d'analyser l'effet de l'étape de 24h de carence sur le métabolome des cellules embryogènes et non embryogènes (Figure 41 A et B). Le premier axe de l'ACP expliquant 60,92% de la variance permet de séparer le groupe formé par les cellules non embryogènes (J8 et carence) du groupe formé par les cellules embryogènes J8 et de celui des cellules embryogènes en carence (Figure 41 A). Le 2^{e} axe expliquant 23,92% de la variance permet de séparer le groupe des cellules embryogènes J8 des autres groupes. D'une manière générale, ces résultats indiquent que le profil des métabolites cellulaires des cellules embryogènes est beaucoup plus affecté par le traitement de mise en carence que celui des cellules non embryogènes.

Comme observé au niveau des données concernant la cinétique de croissance, les cellules non embryogènes à J8 et J8 + 24h de carence sont caractérisées par de plus fortes concentrations en glucose et intermédiaires/produits du cycle de Krebs (citrate, succinate, fumarate, malate, acide γ-aminobutyrique (GABA)), que les cellules embryogènes (Figure 41 B). Le groupe des cellules embryogènes à J8 est caractérisé par de fortes concentrations relatives en glycérol et en alanine tandis que le groupe des cellules embryogènes à J8 + 24h de carence est caractérisé par des fortes concentrations en acides aminés libres ainsi qu'en polyamines - cadavérine et putrescine. Ces résultats indiquent que les cellules non embryogènes maintiennent des concentrations en glucose et en intermédiaires du cycle de Krebs plus élevées après la carence comparées aux cellules embryogènes. Tandis que l'induction de la carence chez les cellules embryogènes aboutit à la consommation de l'alanine et du glycérol et à une accumulation d'acides aminés libres et de polyamines (cadavérine et putrescine).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le métabolisme des cellules embryogènes est plus fortement affecté par la mise en carence que celui des cellules non embryogènes. Même si ces dernières présentent une forte diminution de leur concentration cellulaire en

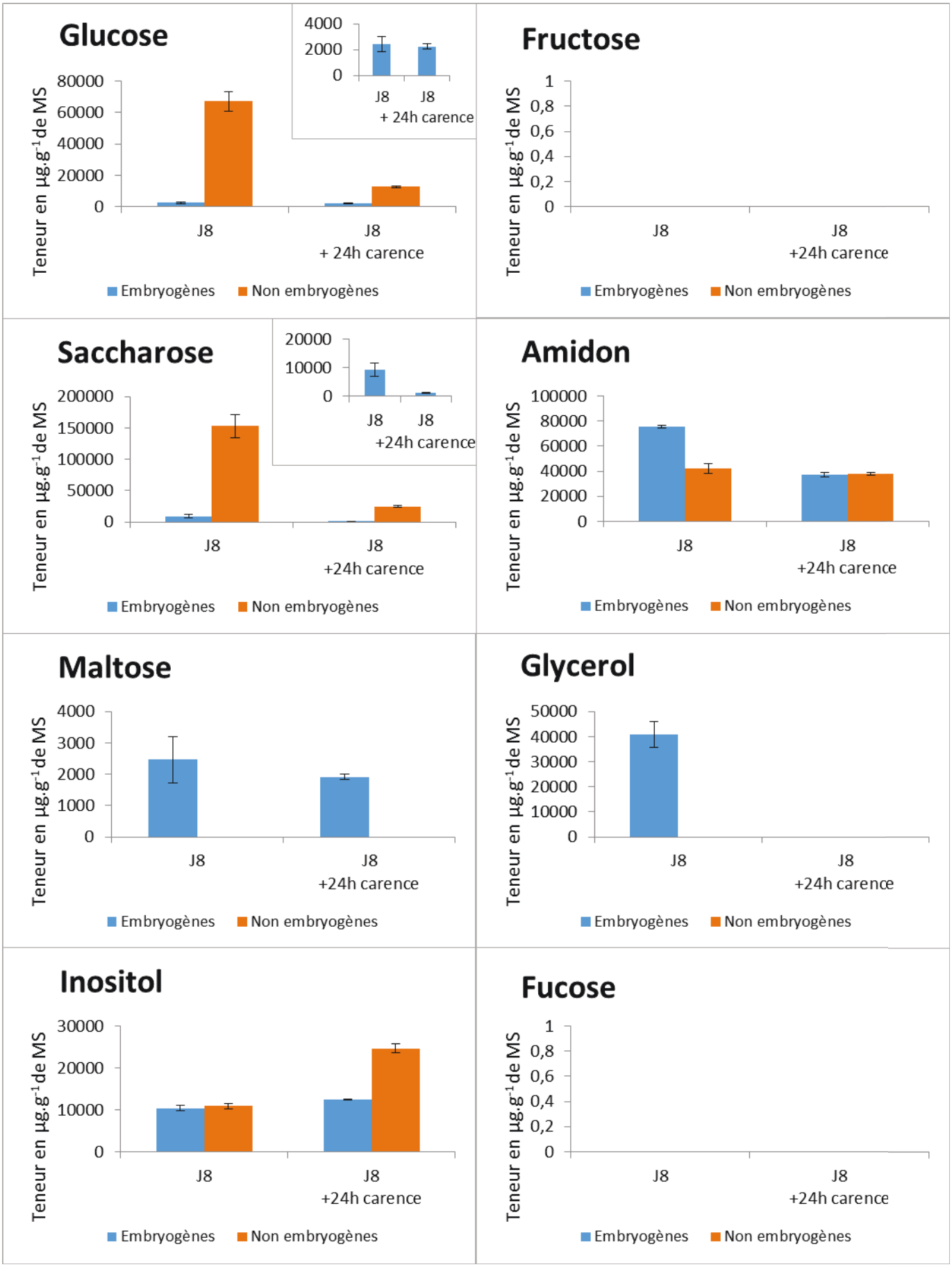
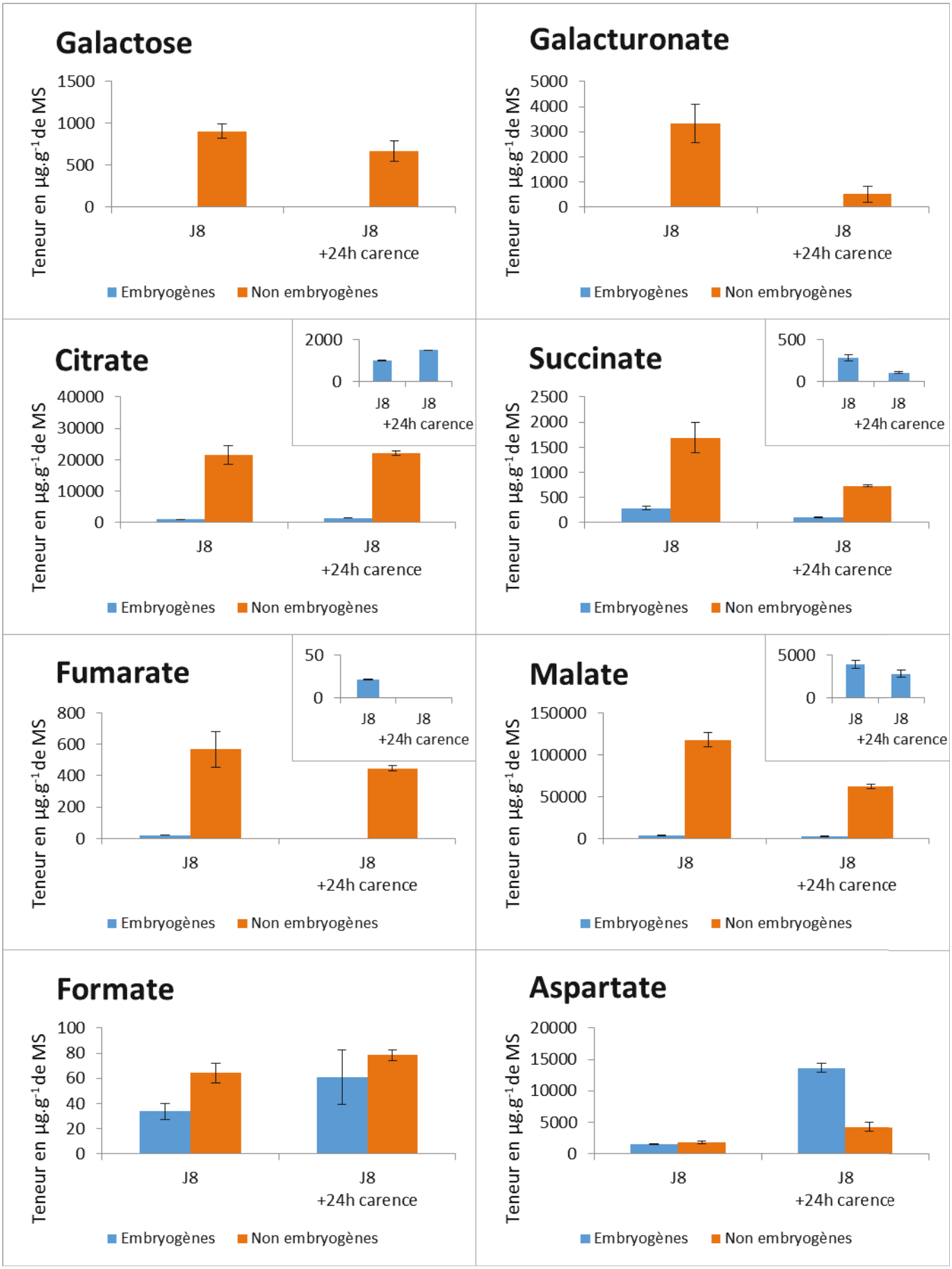
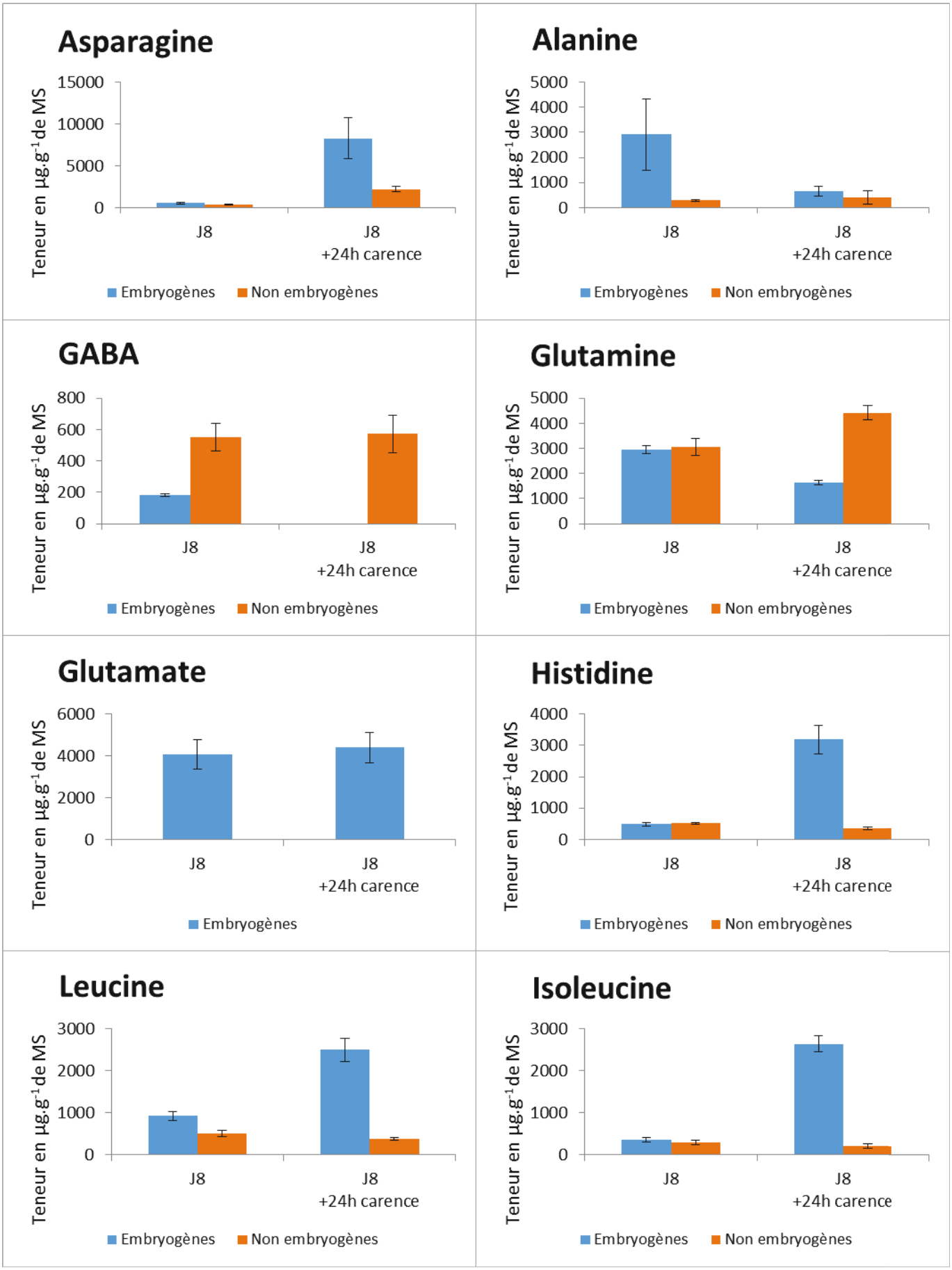
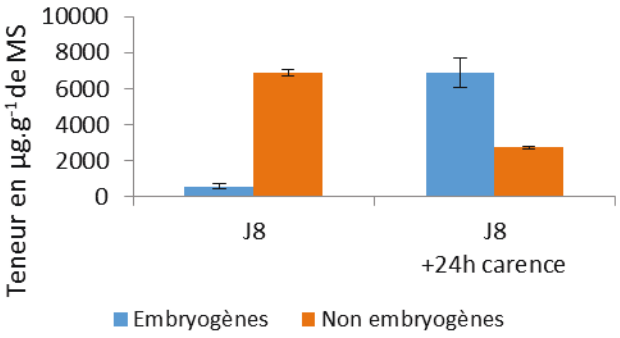


Figure 42 : Evolution des concentrations en métabolites solubles dans les cellules embryogènes et non embryogènes entre le jour 8 (J8) de la cinétique de croissance et J8 + 24h de carence. Les métabolites solubles ont été dosés par RMN du proton tandis que l'amidon a été quantifié par une méthode enzymatique. Les teneurs sont exprimées en µg de métabolites par gr de cellules en masse sèche. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de trois répétitions biologiques indépendantes.

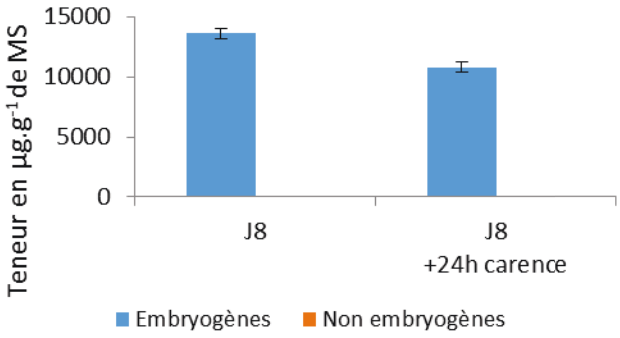

Galactose
Teneur en µg.g-1 de MS
1500
1000
500
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Galacturonate
Teneur en µg.g-1 de MS
5000
4000
3000
2000
1000
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Citrate
Teneur en µg.g-1 de MS
40000
30000
20000
10000
0
2000
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Succinate
Teneur en µg.g-1 de MS
2500
2000
1500
1000
500
0
500
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Fumarate
Teneur en µg.g-1 de MS
800
600
400
200
0
50
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Malate
Teneur en µg.g-1 de MS
150000
100000
50000
0
5000
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Formate
Teneur en µg.g-1 de MS
100
80
60
40
20
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Aspartate
Teneur en µg.g-1 de MS
20000
15000
10000
5000
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes


Asparagine
Teneur en µg.g-1de MS
15000
10000
5000
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Alanine
Teneur en µg.g-1de MS
5000
4000
3000
2000
1000
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
GABA
Teneur en µg.g-1de MS
800
600
400
200
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Glutamine
Teneur en µg.g-1de MS
5000
4000
3000
2000
1000
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Glutamate
Teneur en µg.g-1de MS
6000
4000
2000
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Histidine
Teneur en µg.g-1de MS
4000
3000
2000
1000
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Leucine
Teneur en µg.g-1de MS
3000
2000
1000
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Isoleucine
Teneur en µg.g-1de MS
3000
2000
1000
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes

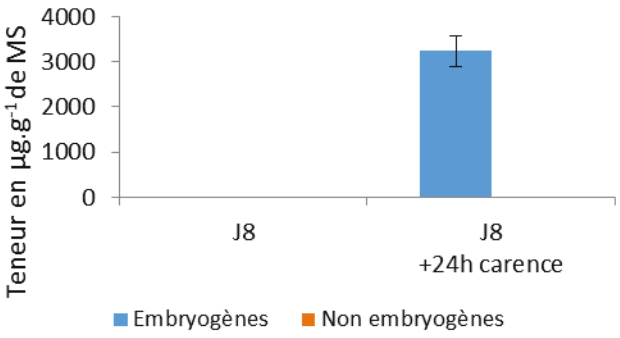
Phenylalanine



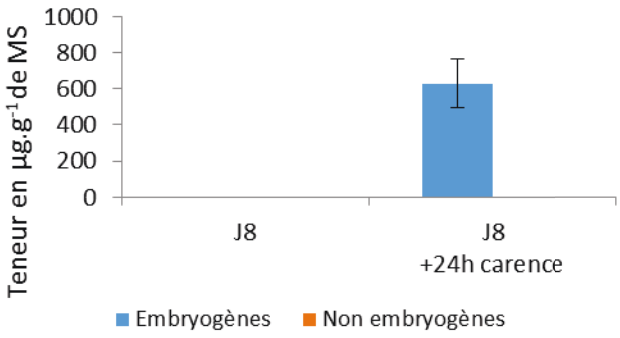
Proline



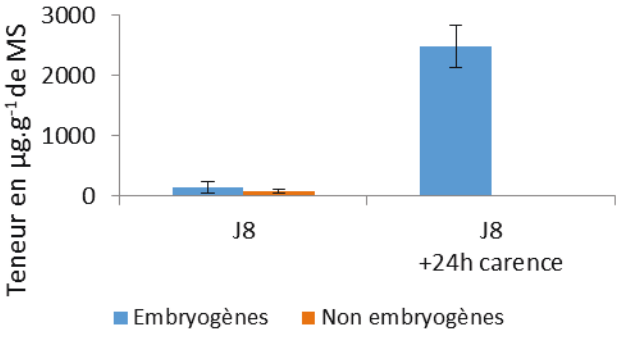
Serine



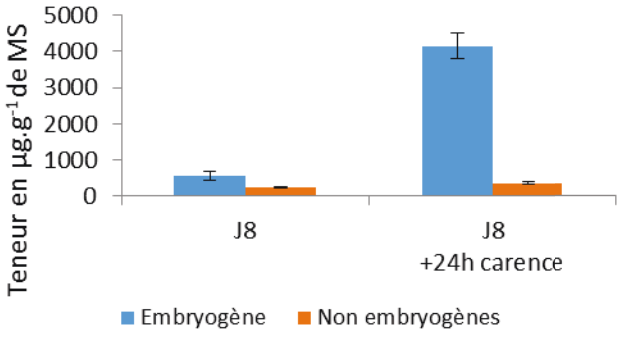
Tryptophane



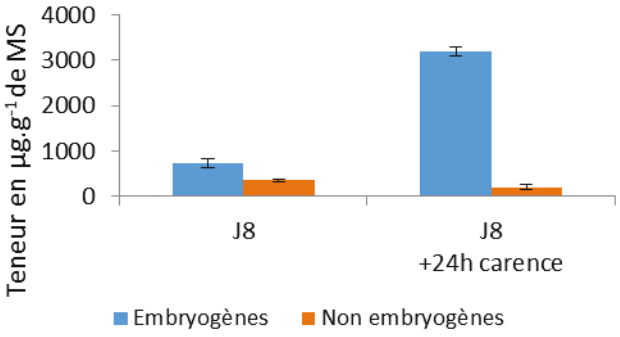
Tyrosine



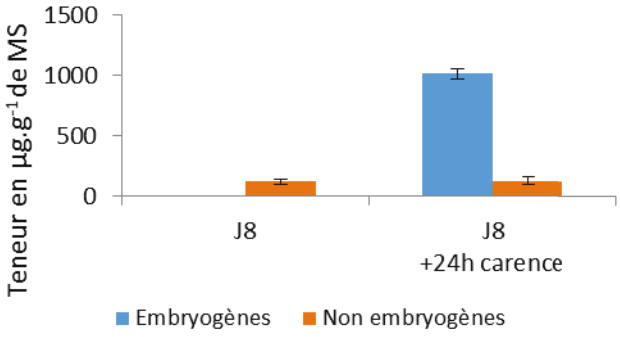
Valine



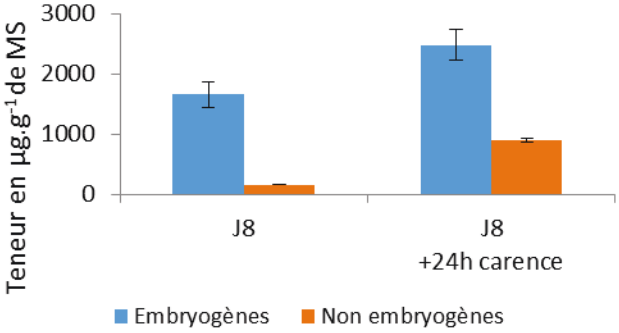
Cadaverine



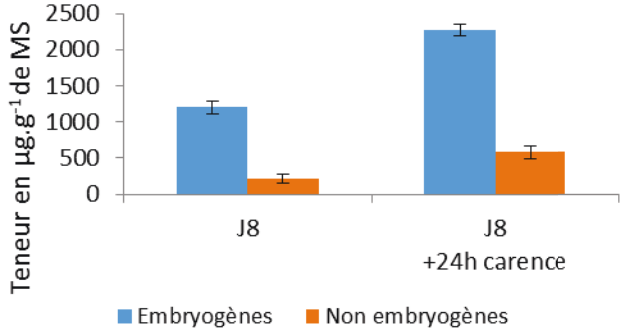
Putrescine



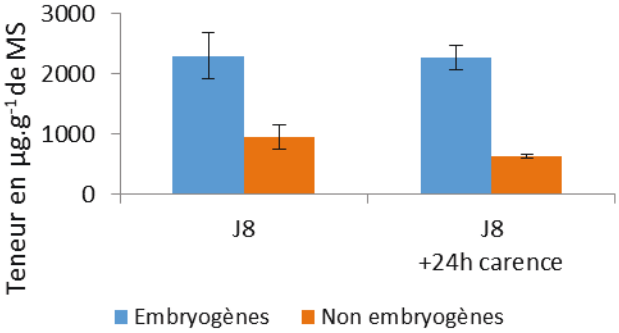
Trigonelline



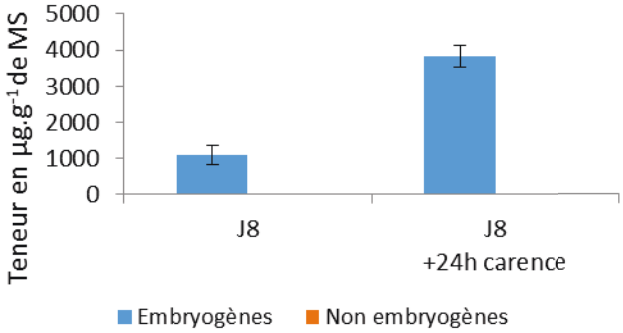
Adenosine-like



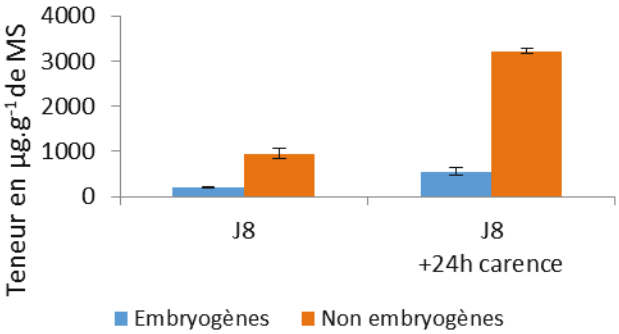
Choline



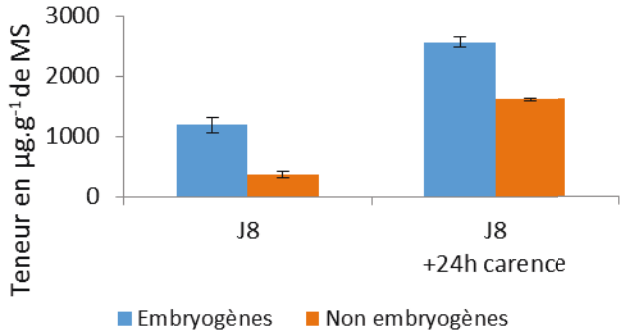
Choline-like



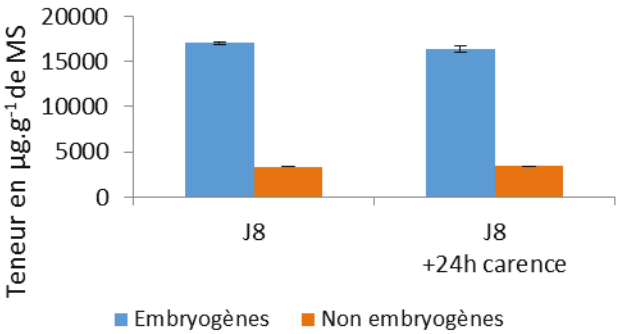
Thiamine



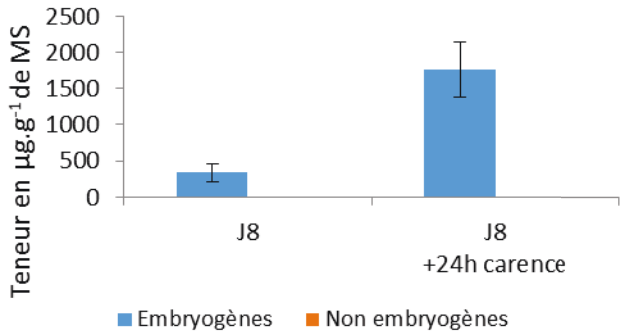
UDP-like

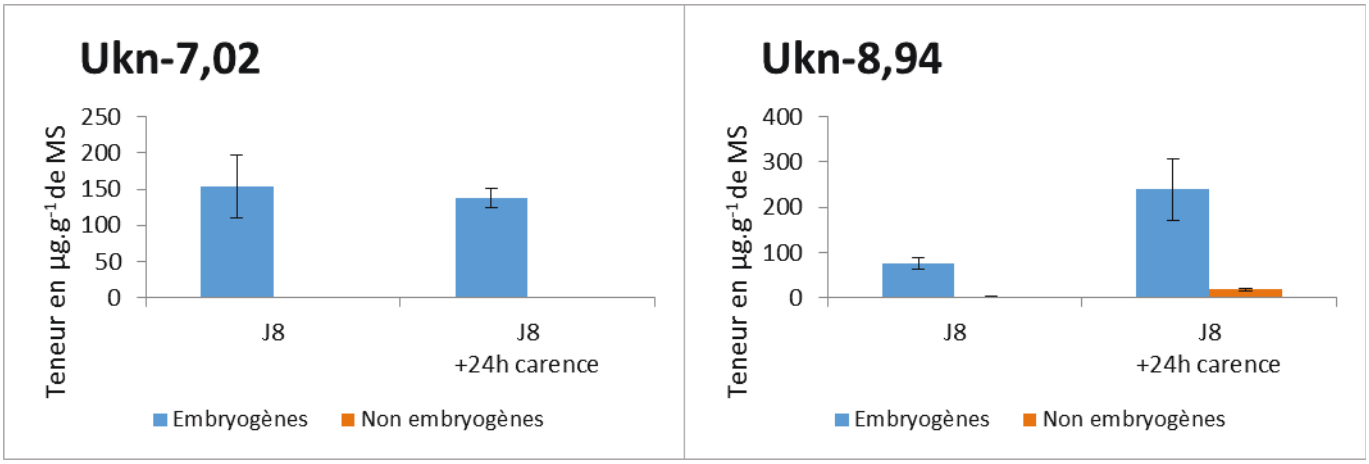


Ukn-0,91



Ukn-1,6




Ukn-7,02
Teneur en µg.g-1de MS
250
200
150
100
50
0
J8
J8
+24h carence
Embryogènes
Non embryogènes
Ukn-8,94
Teneur en µg.g-1de MS
400
300
200
100
0
J8
J8
+24h carence
Embryogènes
Non embryogènes

glucose et saccharose et dans une moindre mesure en succinate et en malate (Figure 42), ces métabolites restent plus élevés que chez les cellules embryogènes. Les « ressources glucidiques » des cellules embryogènes à J8 sont beaucoup plus faibles que celles des cellules non embryogènes. Au cours de la période de carence, la moitié de la teneur en amidon initialement présente est utilisée. Les teneurs en maltose et en glucose, déjà très faibles, ne diminuent pas d'avantage. En revanche, l'alanine et le glycérol sont totalement consommés. L'alanine est probablement convertie en pyruvate, afin d'alimenter le cycle de Krebs. Le glycérol est probablement converti en DHAP, afin d'alimenter la glycolyse et/ou la néoglucogenèse.

L'augmentation de la teneur en acides aminés libres suggère une induction de la protéolyse chez les cellules embryogènes contrairement aux cellules non embryogènes. La plus forte accumulation de l'asparagine notamment constitue un marqueur de l'induction de la protéolyse (Genix et al. 1990; Brouquisse et al. 1998). La protéolyse induite en réponse à la carence glucidique a pour but d'alimenter le cycle de Krebs en squelettes carbonés issus des acides aminés résultant de la dégradation des protéines. Ce processus s'accompagne d'une accumulation du NH_4^+ libre, potentiellement toxique à forte concentration (Givan 1979) mais recyclé en synthétisant de l'asparagine (Brouquisse et al. 1992). L'accumulation des acides aminés chez les cellules embryogènes pourrait également s'expliquer par la présence d'hydrolysat acide de caséine dans leur milieu de culture. Il est donc également possible que cette accumulation soit liée à un ralentissement de la synthèse des protéines, tandis que les acides aminés présents dans le milieu sont toujours absorbés par les cellules.

La comparaison des milieux de culture à J8 et du milieu minimum après 24h d'incubation des cellules tendent à démontrer que les métabolites intracellulaires épuisés au cours de la carence n'ont pas été excrétés vers le milieu de culture mais plutôt consommés par les cellules (Figure 43). Cette étude nous a permis de caractériser les différences existantes au niveau du métabolisme des cellules 41B embryogènes et non embryogènes sauvages, ainsi que de préciser leur état métabolique dans les conditions d'application des traitements au cours de l'étude de type pharmacologique.

Des différences importantes entre les deux types cellulaires sont à noter en ce qui concerne l'effet de la carence de 24h, imposée préalablement aux traitements par les effecteurs glucidiques. Chez les cellules non embryogènes la carence induit une forte diminution de la concentration intracellulaire en glucose et en saccharose et plus modérée en succinate et en

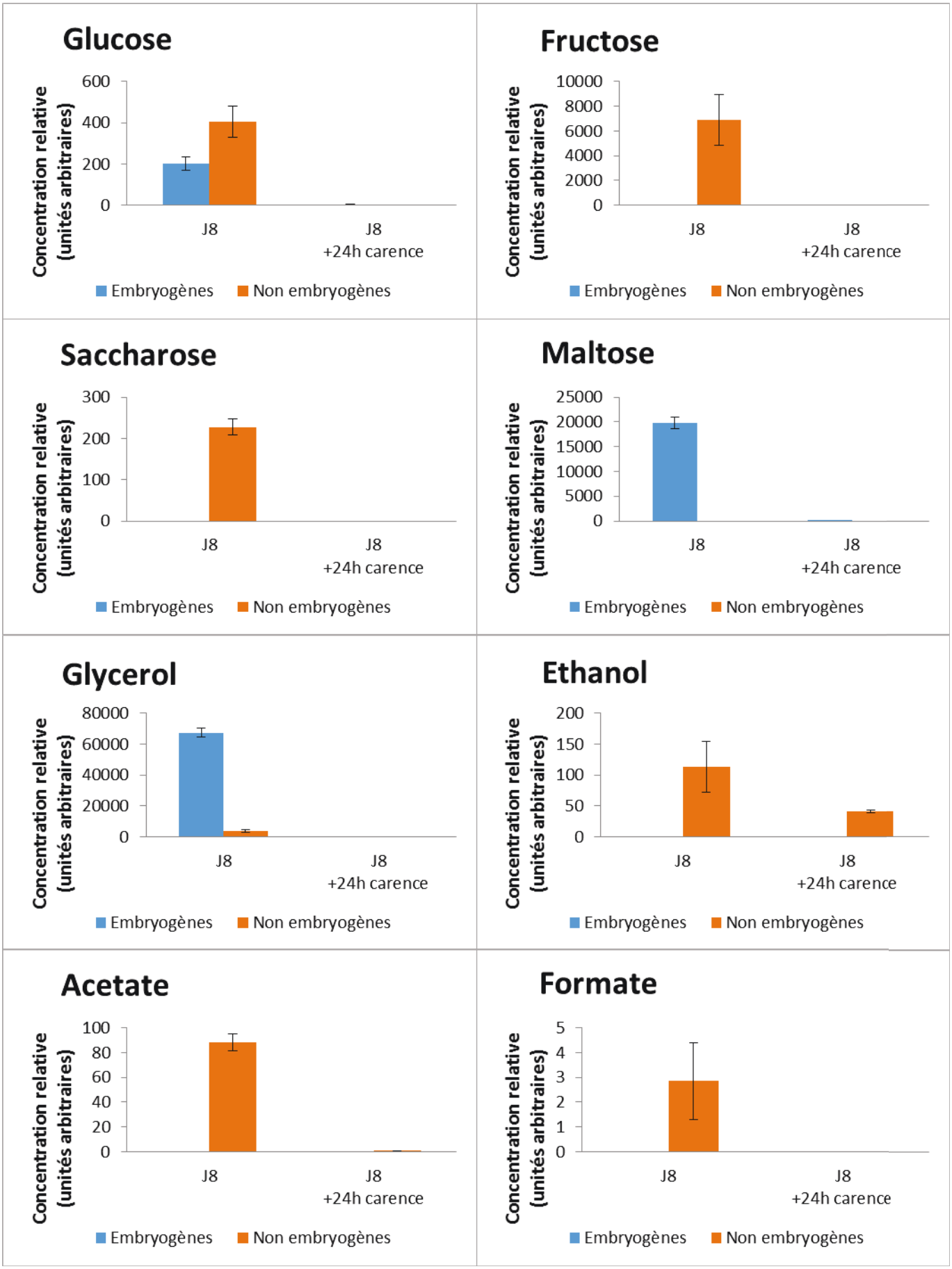


Figure 43 : Différences de concentrations en métabolites solubles dans le milieu de culture des cellules embryogènes et non embryogènes entre J8 de la cinétique de croissance et J8 + 24h de carence. Le milieu J8 correspond au milieu Gb ANA/BAP ou GM+ prélevés à J8 après le repiquage des cellules embryogènes et non embryogènes respectivement, tandis que le milieu J8+24h de carence correspond aux milieux Gb ANA/BAP minimum et GM° minimum prélevé après une période d'incubation de 24h des cellules embryogènes et non embryogènes à J8 après leur repiquage. Le dosage a été réalisé par RMN du proton, les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de trois répétitions biologiques.

malate. Cependant, les concentrations de ces métabolites, même après la carence, sont bien supérieures à celle des cellules embryogènes (> 6 fois pour le glucose, > 20 fois pour le saccharose, > 7 fois pour le succinate et > 20 fois pour le malate). Ces observations montrent que même si le réapprovisionnement en intermédiaires du cycle de Krebs commencent à décliner, le catabolisme du glucose est potentiellement toujours actif chez les cellules non embryogènes. Chez les cellules embryogènes, les concentration en glucose et en maltose très faibles à J8 ne diminuent pas d'avantage, ce qui suppose que dans ces cellules le glucose et le maltose sont très rapidement métabolisés soit *via* une voie du catabolisme oxydatif (glycolyse, voie des pentoses phosphates) ou des voies de biosynthèse. Les concentrations en amidon et en saccharose diminuent après la carence (> 2 fois et > 10 fois respectivement) pour atteindre des niveaux très bas. Le glycérol et l'alanine, susceptibles d'alimenter le cycle de Krebs, sont également consommés. La carence en sucres imposée avant les traitements avec les effecteurs glucidiques a des conséquences différentes sur chacun des deux types cellulaires. Le métabolisme des cellules non embryogènes semblent moins affecté par la carence que le métabolisme des cellules embryogènes. Contrairement aux cellules non embryogènes, les cellules embryogènes semblent avoir utilisées la totalité de leur réserves glucidiques et amorcent la protéolyse, afin d'alimenter le cycle de Krebs et ainsi maintenir un niveau basal de respiration.

1.2.4.4 Approche de type pharmacologique basée sur l'utilisation d'effecteurs glucidiques

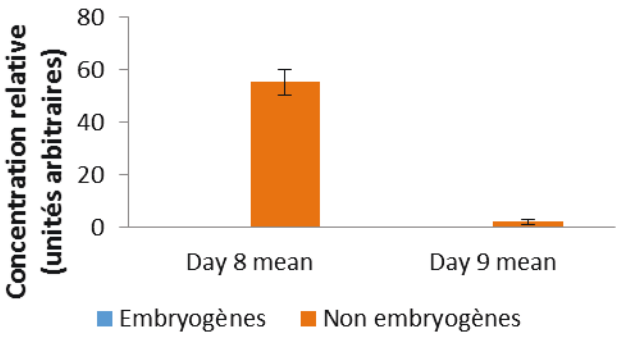
1.2.4.4.1 Choix des effecteurs

Dans un premier temps nous avons cherché à déterminer les effecteurs permettant d'activer ou d'inhiber spécifiquement les différentes voies de la signalisation du glucose décrites dans la littérature **(Figure 1)**.

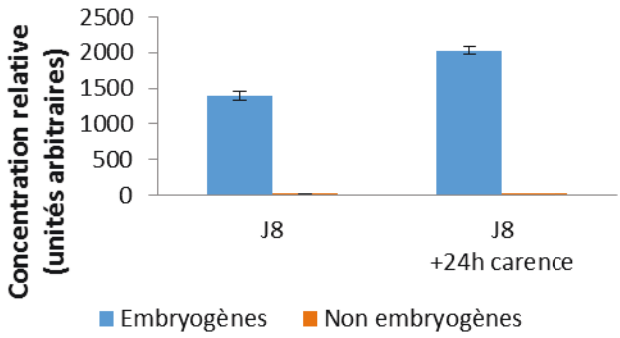
1.2.4.4.1.1 Voie indépendante de HXK1

Notre choix c'est porté sur le 3-*O*-Méthylglucose (3OMG) en tant qu'activateur des voies de signalisation indépendantes de HXK1. Le 3OMG est un analogue du glucose portant un groupement méthyl au niveau de l'oxygène du carbone 3. Il est transporté dans la cellule mais très faiblement phosphorylé par HXK1 et non métabolisable (Cortès et al. 2003), par

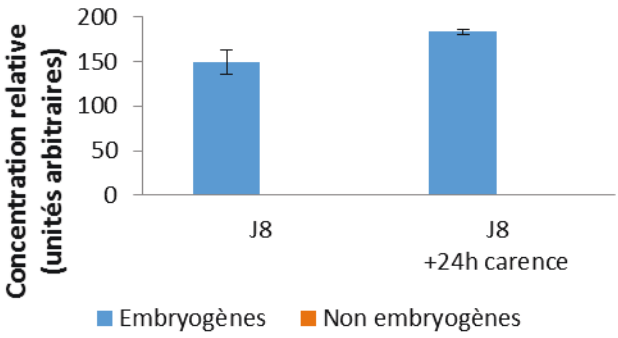
Galacturonate



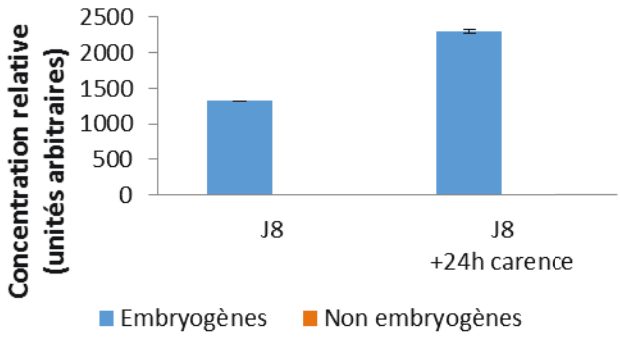
Alanine



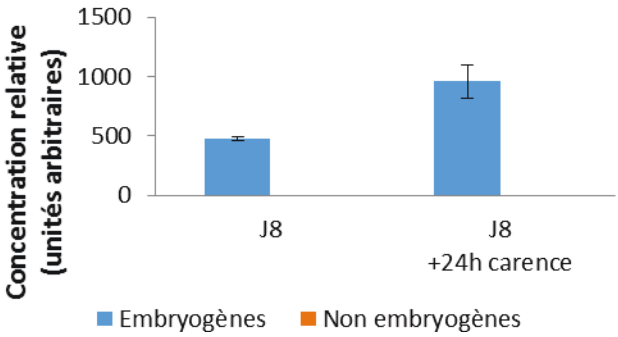
Isoleucine



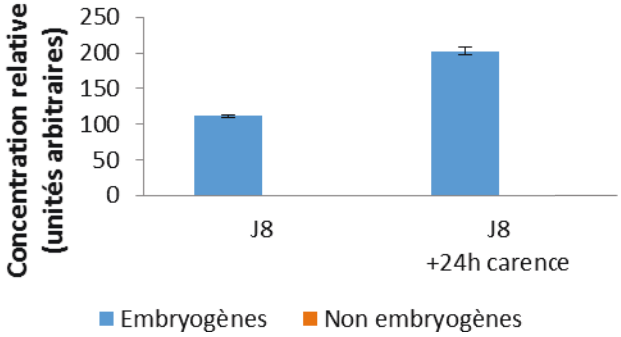
Leucine



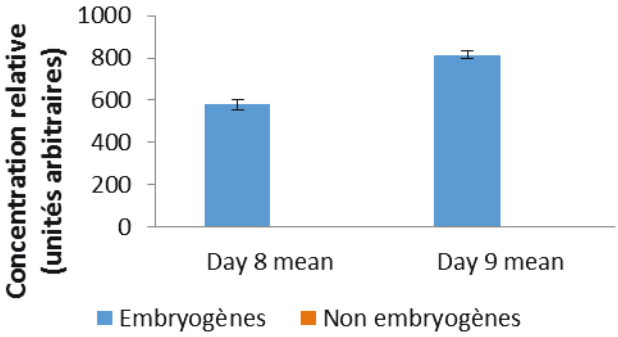
Lysine



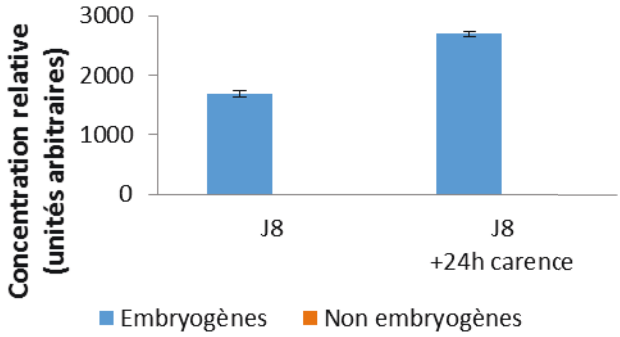
Methionine



Phenylalanine



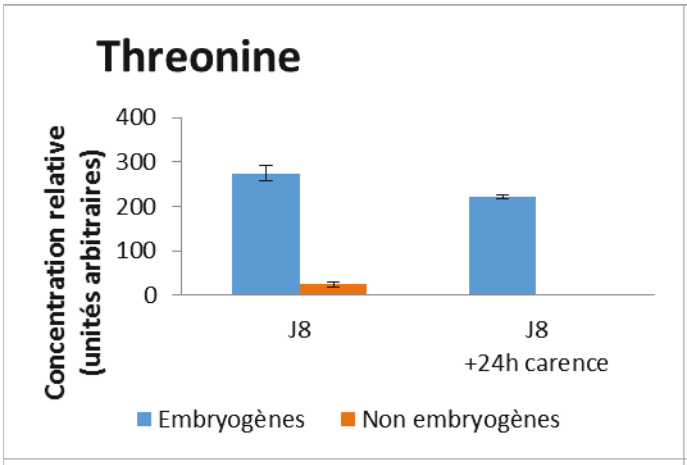
Proline

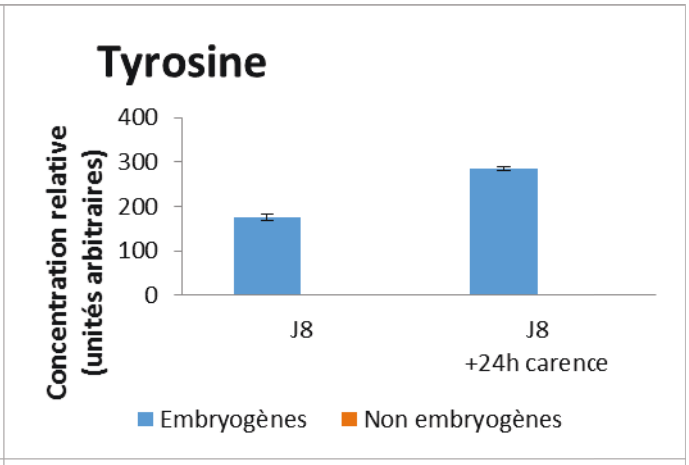


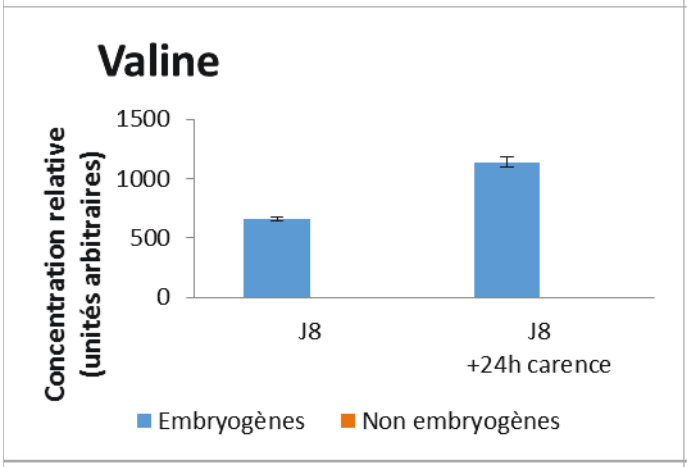
conséquent il ne déclenche ni la voie de signalisation dépendante de HXK1, ni celle liée au métabolisme du glucose. L'utilisation de cet analogue devrait donc nous permettre de discriminer les gènes régulés *via* une voie indépendante de HXK1 de ceux régulés par une voie dépendante de HXK1 ou de la glycolyse.

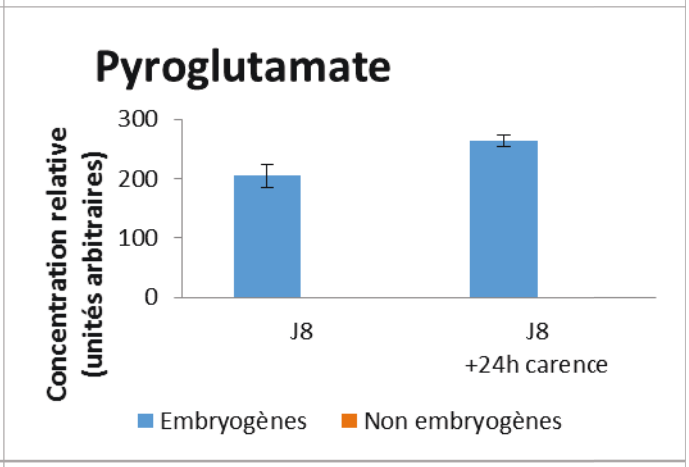
1.2.4.4.1.2 Voies dépendantes de HXK1 et indépendantes de la glycolyse

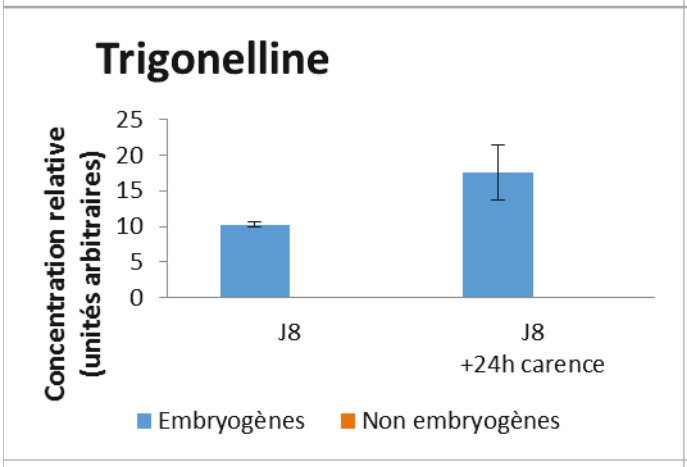
Le 2-Déoxyglucose (2DOG) est constitué d'une molécule de glucose présentant une substitution d'un groupement hydroxyl par un hydrogène au niveau du carbone 2. Il est phosphorylé par HXK1 mais n'est pas métabolisé *via* la glycolyse. Donc, le 2DOG est couramment utilisé pour induire la voie de signalisation dépendante de l'hexokinase mais indépendante de la voie de signalisation liée à la glycolyse (Graham et al. 1994; Jang et al. 1997; Vitrac et al. 2000; Fujiki et al. 2000; Conde et al. 2006). Cependant, les interprétations concernant le rôle du 2DOG vis-à-vis de la signalisation glucidique doivent être nuancées du fait de ses effets possibles sur le métabolisme glucidique et énergétique (Klein and Stitt 1998). Un traitement par une concentration aussi faible que 0,2 mM entraîne une forte diminution de la teneur en Glucose-1-P, en Glucose-6-P, en 3-Phosphoglycéraldéhyde, en ATP et en UDP-Glucose chez une suspension cellulaire chlorophyllienne de *Chenopodium rubrum* (Klein and Stitt 1998). A cette concentration, l'inhibition observée est réversible et n'est donc pas le résultat d'une toxicité globale et irréversible du 2DOG (Klein and Stitt 1998) mais est probablement liée à une inhibition compétitive vis-à-vis de différentes réactions du métabolisme du glucose (Zemek et al. 1975). Le 2DOG, s'il ne semble pas métabolisé *via* la glycolyse, est en effet susceptible d'être phosphorylé en 2DOG-6-P et de former du 2DOG-1-P et de l'UDP-2DOG, ainsi que différents disaccharides (Zemek et al. 1975; Zemek et al. 1976; Klein and Stitt 1998). Cet analogue est également considéré comme un puissant inhibiteur de la glycolyse chez les cellules animales du fait de la forte inhibition compétitive imposée par le 2DOG-6-P au niveau de l'isomérisation du Glucose-6-P en Fructose-6-P par la phosphoglucose isomérase et s'avère toxique à des concentrations élevées (Wick et al. 1957; Ho et al. 2001; Roth et al. 2009). Le traitement par le 2DOG peut donc générer, outre l'activation de la voie dépendante de HXK1, différents signaux liés à son action inhibitrice sur le métabolisme du glucose. Chez les mammifères, le 2DOG induit en effet l'AMP-kinase (Hardie 2005). Chez les plantes, il a été démontré que le 2DOG à 100 mM induisait l'activité de la SnRK1 chez des cellules d'*A. thaliana* (Harthill et al. 2006). Il convient donc d'utiliser

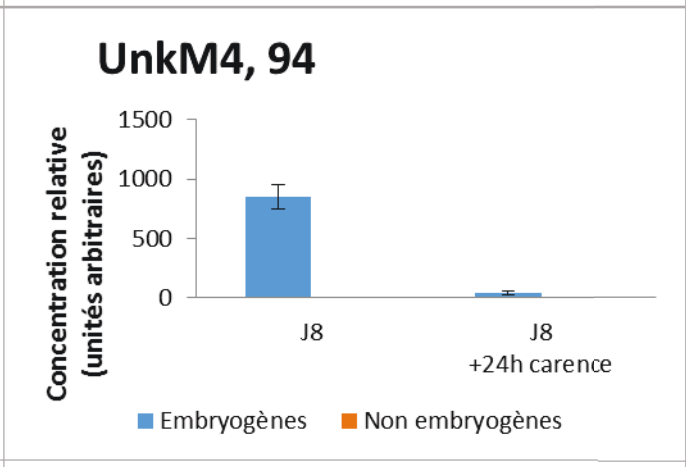

Threonine
Concentration relative (unités arbitraires)
400
300
200
100
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes

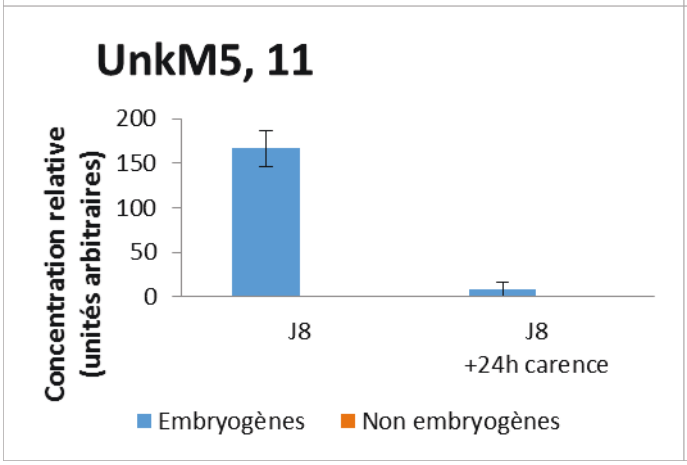

Tyrosine
Concentration relative (unités arbitraires)
400
300
200
100
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes

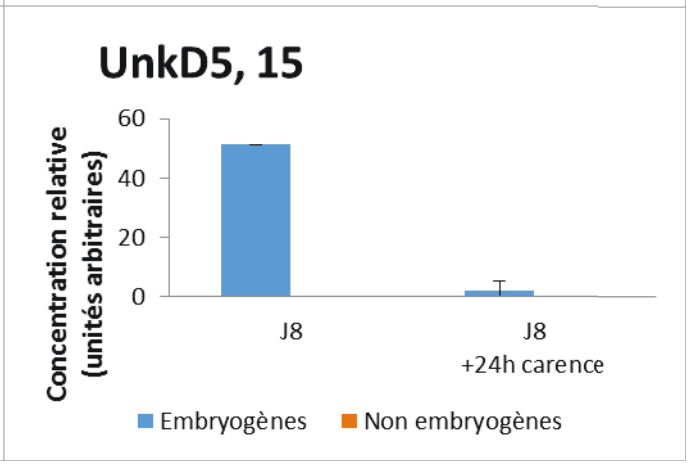

Valine
Concentration relative (unités arbitraires)
1500
1000
500
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes


Pyroglutamate
Concentration relative (unités arbitraires)
300
200
100
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes


Trigonelline
Concentration relative (unités arbitraires)
25
20
15
10
5
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes


UnkM4, 94
Concentration relative (unités arbitraires)
1500
1000
500
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes


UnkM5, 11
Concentration relative (unités arbitraires)
200
150
100
50
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes


UnkD5, 15
Concentration relative (unités arbitraires)
60
40
20
0
J8
J8 +24h carence
Embryogènes
Non embryogènes

des concentrations effectives les plus faibles possibles, afin d'éviter l'effet potentiellement toxique de cet analogue.

Le mannose a également été considéré en tant qu'activateur de la voie de signalisation dépendante de HXK1 indépendamment de la glycolyse. Il s'agit d'un épimère du glucose au niveau du carbone 2, transporté dans la cellule et phosphorylable par HXK1 mais très faiblement métabolisé (Pego et al. 1999). Il engendre, au même titre que le 2DOG, une diminution de la teneur en Glucose-1-P, Glucose-6-P et en 3-Phosphoglyceraldéhyde sans toutefois affecter le niveau d'UDP-glucose chez *C. rubrum* (Klein and Stitt 1998). Un traitement par le mannose induit potentiellement un effet d'inhibition sur le métabolisme du glucose. Cependant, diverses études indiquent que le mannose est métabolisé par la glycolyse dans certains systèmes biologiques, tels que la feuille de tabac et d'orge ou la racine de maïs (Herold and Lewis 1977). De plus, une étude réalisée par Vitrac et collaborateur (Vitrac et al. 2000) sur une suspension cellulaire de Vigne indique que de fortes concentrations en mannose (jusqu'à 100 mM) stimulent l'accroissement de biomasse chez ces cellules au lieu de l'inhiber. Cela suggère que le mannose est probablement métabolisé par les cellules de Vigne hétérotrophe en culture.

1.2.4.4.1.3 Voie dépendante de HXK1

Enfin, nous avons envisagé l'utilisation du mannoheptulose, un heptose considéré comme un inhibiteur compétitif vis-à-vis de la phosphorylation du glucose par les hexokinases (Coore and Randle 1964; Ashcroft and Randle 1970). Celui-ci est couramment utilisé pour étudier l'implication de HXK1 dans la régulation de l'expression de gènes dont l'expression est modulée par le glucose (Jang and Sheen 1994; Pego et al. 1999; Vitrac et al. 2000; Maurel et al. 2004; Conde et al. 2006; Lecourieux et al. 2010). Cependant, plusieurs études témoignent d'une efficacité relative du mannoheptulose suivant le modèle biologique considéré. Umemura et collaborateurs (Umemura et al. 1998) ont ainsi observé que le mannoheptulose ne permettait pas d'inhiber efficacement l'activité des hexokinases mesurée sur des extraits d'embryons de riz. D'autres études indiquent que les différentes hexokinases présentent une affinité différente pour le mannoheptulose chez le maïs (Galina and da Silva 2000; da-Silva et al. 2001). L'activité des hexokinases cytoplasmiques, associées à la membrane externe de la mitochondrie, semble beaucoup plus fortement inhibée par le mannoheptulose que celle des hexokinases cytosoliques.

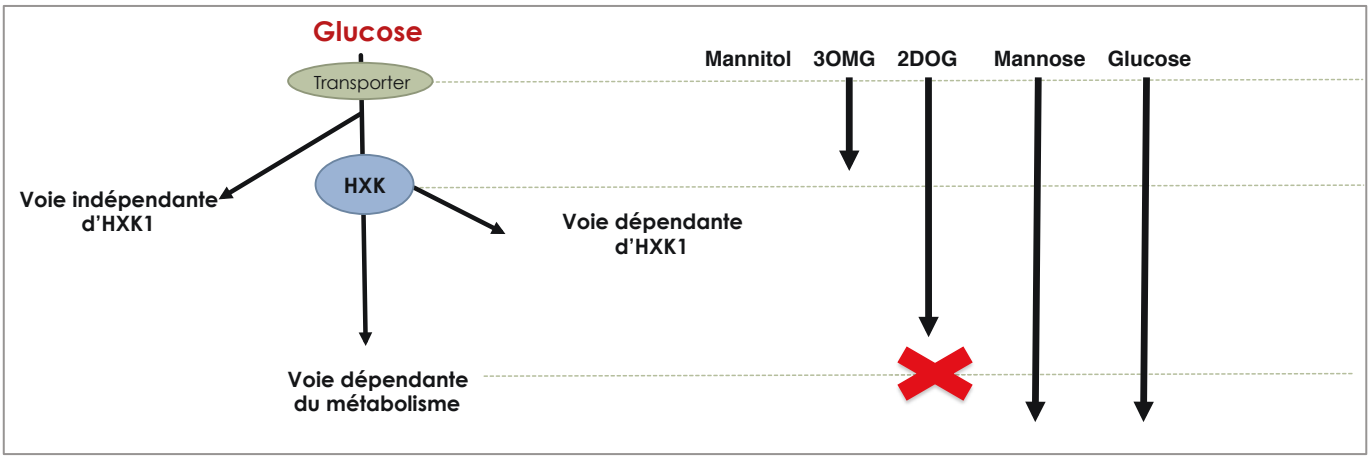


Figure 44 : Schéma récapitulatif de l'effet des effecteurs glucidiques sur les différentes voies de la signalisation du glucose. Le glucose est transporté dans la cellule, phosphotylé par HXK1 et entièrement métabolisé, il active donc les trois voies de signalisation. Le mannose semble également métabolisé chez la Vigne (Vitrac., 2000), il induit donc potentiellement également les trois voies de signalisation. Le 2DOG est transporté dans la cellule, phosphorylé par HXK1 mais entraîne une inhibition du métabolisme glucidique, il est donc susceptible d'activer les voies dépendante et indépendante d'HXK1 et d'inhiber la voie dépendante du métabolisme. Le 3OMG est transporté dans la cellule mais très faiblement phosphorylé et n'est pas perçu comme un signal par HXK (Cortes et al, 2003), il induit donc uniquement la voie indépendante d'HXK1. Le mannitol est utilisé en temps que témoin osmotique.

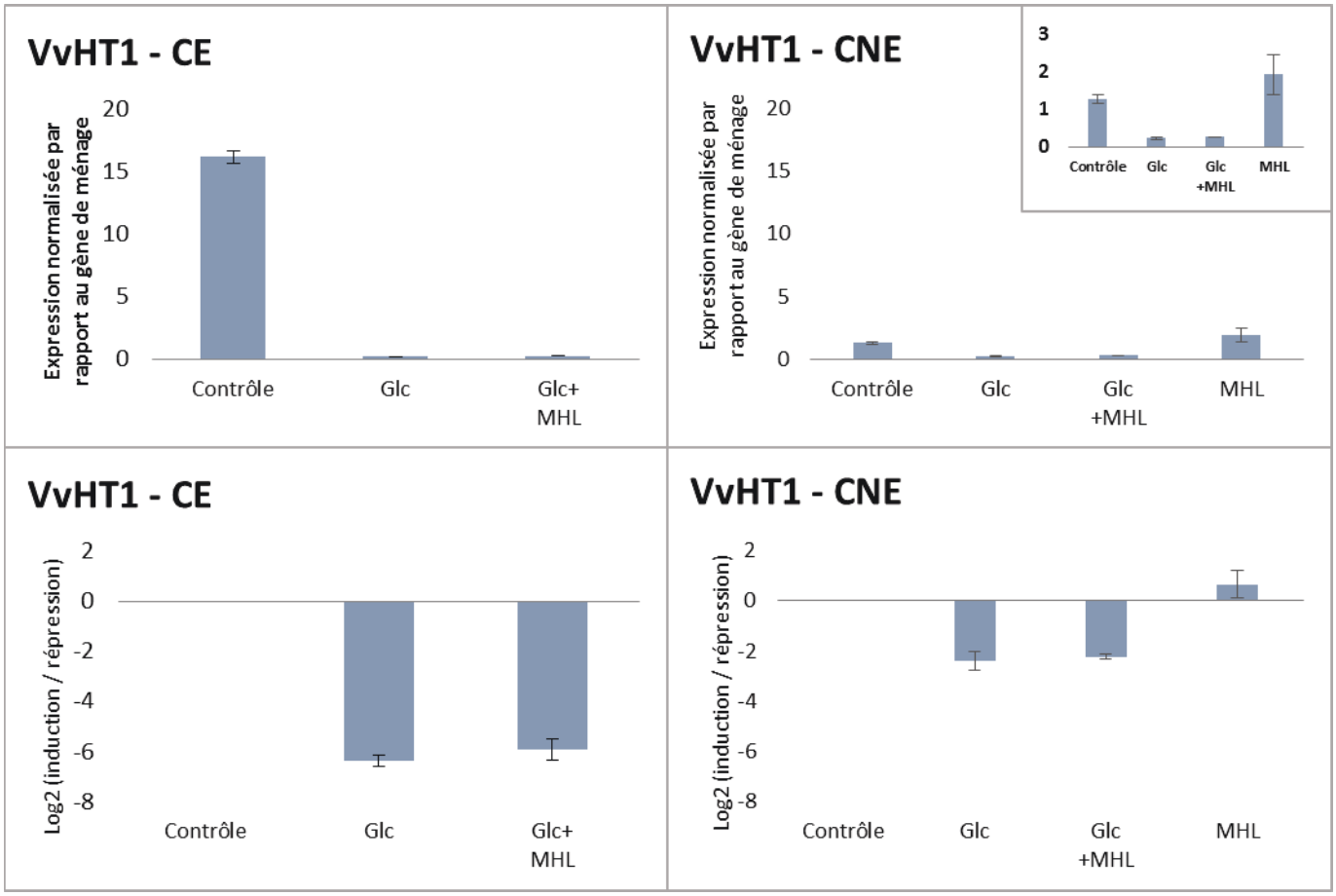


Figure 45 : Analyse de l'expression de *VvHT1* chez les cellules embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE) en réponse à différents traitements. Le glucose et le mannoheptulose sont à une concentration de 10 mM. Les cellules sont prélevées à J8 après leurs repiquage, incubées 24h dans le milieu Gb ANA/BAP minimum. Les effecteurs glucidiques sont alors ajoutés et le traitement prolongé pour 6h (CE) ou 24h (CNE). L'expression est normalisée par rapport au gène de ménage *Actine* et rapportée à la condition contrôle pour le calcul de l'induction/répression. L'expression normalisée et l'induction/répression sont calculées suivant la méthode du 2-ΔCt et du 2-ΔΔCt respectivement. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de deux répétitions biologiques.

Notre choix des effecteurs est résumé sur la Figure 44 permettant de positionner l'étape cible de chacun des effecteurs par rapport aux voies de la signalisation du glucose.

1.2.4.5 Effet du mannoheptulose sur la régulation de l'expression de VvHT1

Pour déterminer si l'inhibition de l'expression de *VvHT1* par le glucose passe par la voie dépendante de l'HXK1, nous avons voulu tester l'effet du manoheptulose vis-à-vis de celui du glucose. Ayant déterminé les conditions permettant de diminuer la concentration effective du glucose à 10 mM, teneur physiologique préconisée dans le cadre de l'étude de la signalisation glucidique (Jang et al. 1994), nous avons utilisé le mannoheptulose à 10 mM, concentration équimolaire susceptible de contrecarrer le signal glucose (Figure 45).

Dans les conditions témoins le niveau d'expression de *VvHT1* est beaucoup plus élevé (> 10 fois) chez les cellules embryogènes que chez les cellules non embryogènes. Le traitement par le glucose à 10 mM entraîne une très forte inhibition de l'expression de *VvHT1* chez les 2 types cellulaires (> 60 fois et 5 fois pour les cellules embryogènes et non embryogènes respectivement). Le traitement par le glucose à 10 mM en combinaison avec le mannoheptulose à 10 mM entraîne une inhibition tout à fait semblable à celle occasionnée par le traitement glucose seul. Malgré son utilisation à la même concentration que le glucose, le mannoheptulose ne permet pas de lever l'inhibition de l'expression de *VvHT1*, imposée par le glucose chez les cellules 41B comme observé par Conde et collaborateurs (Conde et al. 2006), chez les cellules de Vigne CSB. En théorie, le mannoheptulose est un inhibiteur compétitif de la phosphorylation du glucose par l'hexokinase et l'enzyme présente une affinité plus faible à l'égard du mannoheptulose qu'à l'égard du glucose (Ashcroft and Randle 1970; Galina and da Silva 2000; Vitrac et al. 2000). Cette présomption est confortée par l'étude réalisée par Umemura et collaborateurs (Umemura et al. 1998), qui montre que l'utilisation du mannoheptulose à 100 mM en combinaison avec du glucose à 20 mM ne permet d'inhiber que de 50% l'activité des hexokinases, mesurée *in vitro* sur des extraits d'embryons de riz. Cependant d'autres études *in vivo* rapportent un effet du mannoheptulose à de faibles concentrations en combinaison avec une forte concentration de glucose (150 mM glucose + 10 mM mannoheptulose dans le cas de l'étude de Conde et collaborateur) ou de saccharose (150 mM saccharose + 5 mM mannoheptulose) (Vitrac et al. 2000). L'explication plausible de ces résultats contradictoires se heurte aussi à l'absence d'information concernant le système de transport prenant en charge le mannoheptulose. Dans nos conditions expérimentales et sur nos

deux modèles d'études, cellules embryogènes et non embryogènes de Vigne 41B, le mannoheptulose ne permet pas de lever l'inhibition de l'expression de *VvHT1* par le glucose, et ce malgré l'utilisation de mannoheptulose provenant de deux fournisseurs différents (GLYCOTEAM GmbH et SIGMA ALDRICH). Nos résultats vont à l'encontre des données publiées chez la Vigne (Conde et al. 2006) et montrent clairement qu'à concentration équimolaire le mannoheptulose n'abolit pas l'effet du glucose. De ce fait, chez les cellules non embryogènes CSB de Vigne, la levée par le mannoheptulose à 10 mM de l'inhibition de l'expression de *VvHT1*, imposée par le glucose à 150 mM (concentration non physiologique), semble peu plausible. Nous ne pourrons donc pas tirer parti de l'utilisation de cet effecteur afin de déterminer l'implication de la voie dépendante de HXK1 dans la régulation de *VvHT1* et de *VvHT5* en réponse au traitement par le glucose.

1.2.4.6 Etude de l'expression de gènes marqueurs des voies de la signalisation du glucose

Afin de caractériser l'effet des traitements par les effecteurs glucidiques sur les différentes voies de signalisation dépendantes du glucose, nous avons analysé l'effet de ces traitements sur l'expression de gènes marqueurs de ces voies. Ces gènes sont décrits dans la littérature comme étant spécifiquement régulés par une des trois voies de la signalisation glucidique chez les plantes. Parmi les gènes dont l'expression est régulée spécifiquement par la voie dépendante de l'hexokinase 1, un grand nombre sont en lien avec la photosynthèse, tels que les gènes CAB1 (Chlorophyll A/b-Binding protein), PC (PlastoCyanin) et RBCS (Ribulose-Bisphosphate Carboxylase Small subunit) (Jang and Sheen 1994; Xiao et al. 2000). Or, l'étude de ces gènes chez nos cultures cellulaires hétérotrophes pour le carbone et cultivées à l'obscurité, manquerait cruellement de significativité biologique. Nous avons donc choisi d'étudier l'expression de *NR1* (Nitrate Reductase 1) et *PLD1* (PhosphoLipase D 1) décrits comme spécifiquement régulés par HXK1 chez des plantules d'Arabidopsis traitées par de fortes concentrations en glucose (6%) (Jang et al. 1997; Sheen et al. 1999; Xiao et al. 2000). Les gènes marqueurs sélectionnés pour l'étude de la voie indépendante de HXK1 sont *CHS* (Chalcone Synthétase), *β-AMY* (β-amylase) et *PAL1* (Phenylalanine Ammonia Lyase 1) dont l'expression est induite par le glucose d'une manière indépendante de HXK1 dans des feuilles détachées (CHS, β-AMY) et de jeunes plantules de *A.thaliana* (PAL1) (Xiao et al. 2000; Arenas-Huertero et al. 2000; Müller et al. 2005). Enfin, nous avons choisi d'étudier

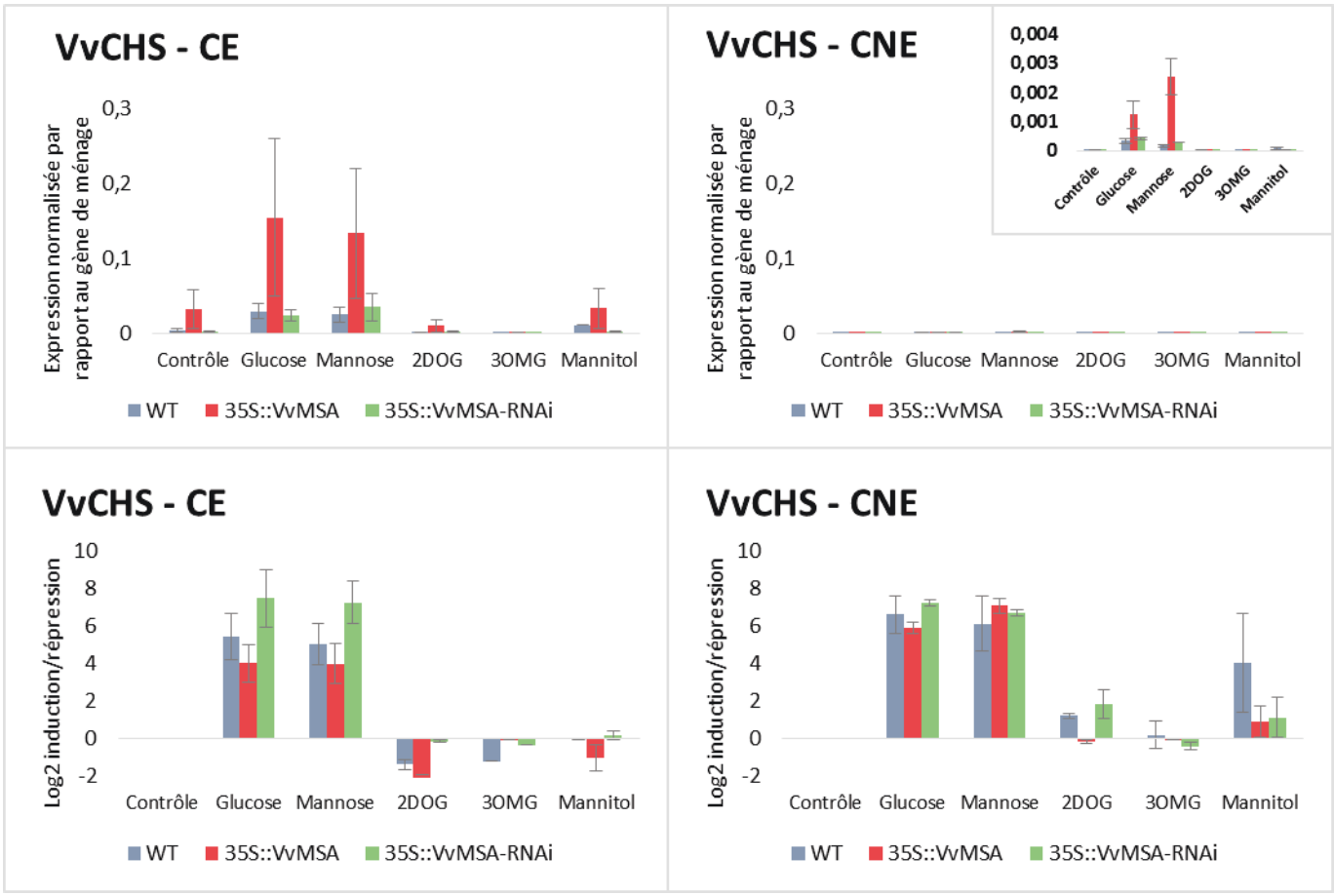


Figure 46 Analyse de l'expression de *VvCHS* chez les cellules embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE) en réponse à différents traitements. Le glucose, le mannose, le 3OMG et le mannitol sont à une concentration de 10 mM ; le 2DOG est à une concentration de 0,9 mM. Les cellules embryogènes et non embryogènes sont prélevées à J8 après leurs repiquage, incubées 24h dans les milieux GM° minimum et Gb ANA/BAP minimum respectivement. Les effecteurs glucidiques sont alors ajoutés et le traitement prolongé pour 6h (cellules embryogènes) ou 24h (cellules non embryogènes). L'expression est normalisée par rapport au gène de ménage *Actine* et rapportée à la condition contrôle pour le calcul de l'induction/répression. L'expression normalisée et l'induction/répression sont calculées suivant la méthode du 2-ΔCt et du 2-ΔΔCt respectivement. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de trois répétitions biologiques. Les étoiles indiquent une différence statistiquement significative par rapport à la condition témoin (p value < 0,05 ; test effectué : Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples).

l'expression de *PR5* (Pathogenesis Related protein 5) en tant que marqueur de la voie dépendante de la glycolyse. L'expression de *PR5* est induite par de fortes concentrations en glucose (6%) aussi bien chez des plantules de *A. thaliana* surexprimant le senseur *AtHXK1* que chez d'autres plantules de *A. thaliana* surexprimant *YHXK2*, l'hexokinase 2 de la levure, qu'ils supposent dépourvue de la fonction de senseur chez la plante. Ces résultats amènent les auteurs à suggérer l'implication d'un métabolite dérivant de la glycolyse dans la régulation de *PR5* par le glucose (Xiao et al. 2000).

Parmi les gènes marqueurs sélectionnés, *PLD1* et *β-AMY* ne sont pas régulés par le glucose et ses analogues dans nos conditions expérimentales. Nous avons donc poursuivi l'étude en analysant l'expression des orthologues présumés chez la Vigne (sur la base de leur homologie de séquence) de : *AtCHS* et *AtPAL1* pour la voie indépendante de HXK1, *AtNR1* pour la voie dépendante de HXK1 et *AtPR5* pour la voie dépendante de la glycolyse.

1.2.4.6.1 Voie indépendante de l'hexokinase 1 : CHS et PAL1

VvCHS est plus fortement exprimé chez les cellules non embryogènes (> 100 fois) que chez les cellules embryogènes (Figure 46). D'une manière intéressante, l'expression de *VvCHS* est plus élevée chez les cellules surexprimant VvMSA (*35S::VvMSA*) que chez les cellules sauvages (WT) et *35S::VvMSA-RNAi* dans les 2 types cellulaires (embryogènes et non embryogènes). Malgré ces différences d'expression absolue, les profils de réponse aux traitements par les effecteurs en termes d'induction/répression sont très similaires entre les cellules embryogènes et non embryogènes et entre cellules sauvages et transformées (Figure 46). Le glucose et le mannose induisent fortement l'expression du gène de la CHS (> 16 fois) tandis que le 2DOG, le 3OMG et le mannitol ne semble pas avoir un effet notable. Cela suggère que ni le 2DOG, ni le 3OMG ne sont capables de déclencher la voie indépendante de HXK1 dans nos 2 types cellulaires. La forte différence d'expression de *VvCHS* entre les cellules embryogènes et non embryogènes pourrait s'expliquer par une différence au niveau de la composition des milieux utilisés pour réaliser les traitements. Le milieu GM° minimum utilisé pour le traitement des cellules embryogènes contient de l'hydrolysat acide de caséine, une source importante d'acides aminés, contrairement au milieu Gamborg ANA/BAP minimum utilisé pour les cellules non embryogènes. Or, il a été démontré que l'expression de *CHS* était induite par un apport exogène de proline chez *A.thaliana* (Hellmann et al. 2000).

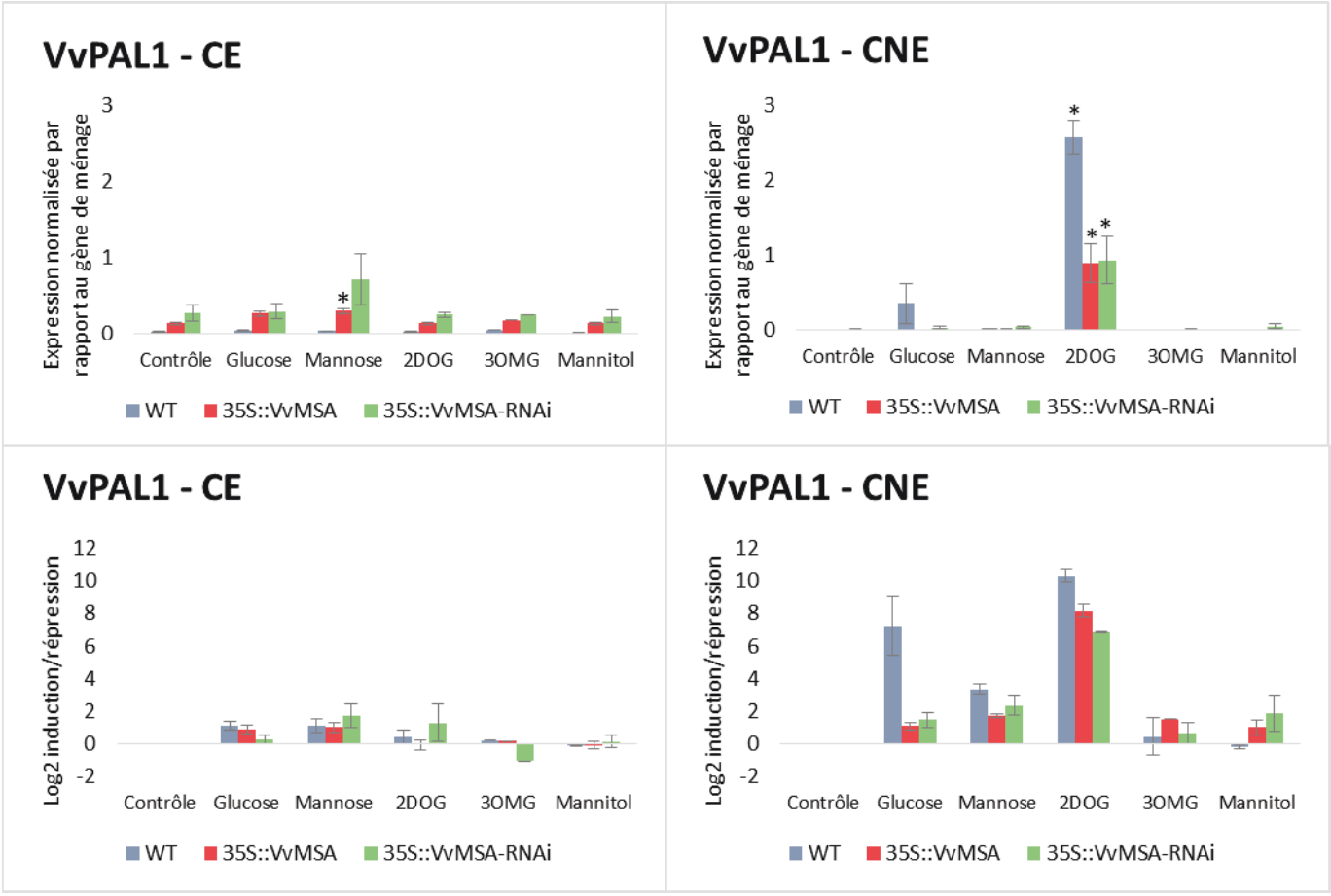


Figure 47 : Analyse de l'expression de *VvPAL1* chez les cellules chez les cellules embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE). Le glucose, le mannose, le 3OMG et le mannitol sont à une concentration de 10 mM ; le 2DOG est à une concentration de 0,9 mM. Les cellules embryogènes et non embryogènes sont prélevées à J8 après leurs repiquage, incubées 24h dans les milieux GM° minimum et Gb AABA/BAP minimum respectivement. Les effecteurs glucidiques sont alors ajoutés et le traitement prolongé pour 6h (cellules embryogènes) ou 24h (cellules non embryogènes). L'expression est normalisée par rapport au gène de ménage *Actine* et rapportée à la condition contrôle pour le calcul de l'induction/répression. L'expression normalisée et l'induction/répression sont calculées suivant la méthode du 2-ΔCt et du 2-ΔΔCt respectivement. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de trois répétitions biologiques. Les étoiles indiquent une différence statistiquement significative par rapport à la condition témoin (p value < 0,05 ; test effectué : Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples).

L'expression plus élevée de *VvCHS* chez les cellules embryogènes pourrait donc s'expliquer au moins en partie par la présence de proline dans leur milieu de culture.

Le gène *VvPAL1* est lui aussi plus exprimé (> 10 fois) chez les cellules embryogènes que chez les cellules non embryogènes, dans la condition témoin (Figure 47). Chez les cellules non embryogènes les traitements par le glucose et par le mannose induisent l'expression de *VvPAL1* d'une manière légèrement plus prononcée chez les cellules sauvages que chez les cellules transformées. On observe également une tendance à l'induction pour les traitements glucose et mannose chez les suspensions embryogènes mais celle-ci est beaucoup plus faible. Le traitement par le 2DOG entraîne une très forte induction de *VvPAL1* chez les cellules non embryogènes sauvages et génétiquement modifiées, beaucoup plus marquée chez les cellules WT (> 1000 fois) que chez les cellules *35S::VvMSA* (> 250 fois) et *35S::VvMSA-RNAi* (> 100 fois). Cette forte induction par le 2DOG n'est pas observée chez les cellules embryogènes. Le traitement par le 3OMG ne semble pas avoir d'effet significatif sur l'expression de *VvPAL1*. De même, le mannitol à 10 mM n'a pas d'effet marqué sur l'expression de *VvPAL1*, ce qui indique que les effets des effecteurs sur son expression ne sont pas dus à une modification du potentiel osmotique du milieu.

Les effets différentiels du traitement 2DOG sur l'expression de *VvPAL1* entre les cellules embryogènes et non embryogènes révèlent une différence au niveau de la perception de cet analogue entre les deux types cellulaires. D'autre part, le fait que le 2DOG ait un effet très marqué sur l'expression de *VvPAL1* mais pas sur celle de *VvCHS* semble indiquer que différentes voies de la signalisation du glucose indépendantes de l'hexokinase sont probablement impliquées. Une voie qui serait liée à la régulation de *VvPAL1*, activée par le traitement 2DOG chez les cellules non embryogènes mais pas chez les cellules embryogènes. Ainsi qu'une deuxième voie impliquée dans la régulation de la *CHS* par le glucose mais qui ne serait pas activée par le traitement 2DOG dans les deux types cellulaires. En gardant à l'esprit les effets secondaires potentiels du 2DOG sur le métabolisme du glucose, on peut supposer que la forte induction de *VvPAL1* chez les cellules non embryogènes par cette analogue soit due à une inhibition de la voie dépendante du métabolisme du glucose. Le 2DOG est susceptible d'activer la SnRK1 (Harthill et al. 2006). Il est donc possible que le gène *VvPAL1* soit induit par la voie de signalisation de la SnRK1. En ce qui concerne le gène codant la CHS, la voie de signalisation impliquée dans la régulation de son expression est indépendante de la SnRK1 chez *Arabidopsis*, étant donné que l'induction de *AtCHS* par le glucose est maintenue

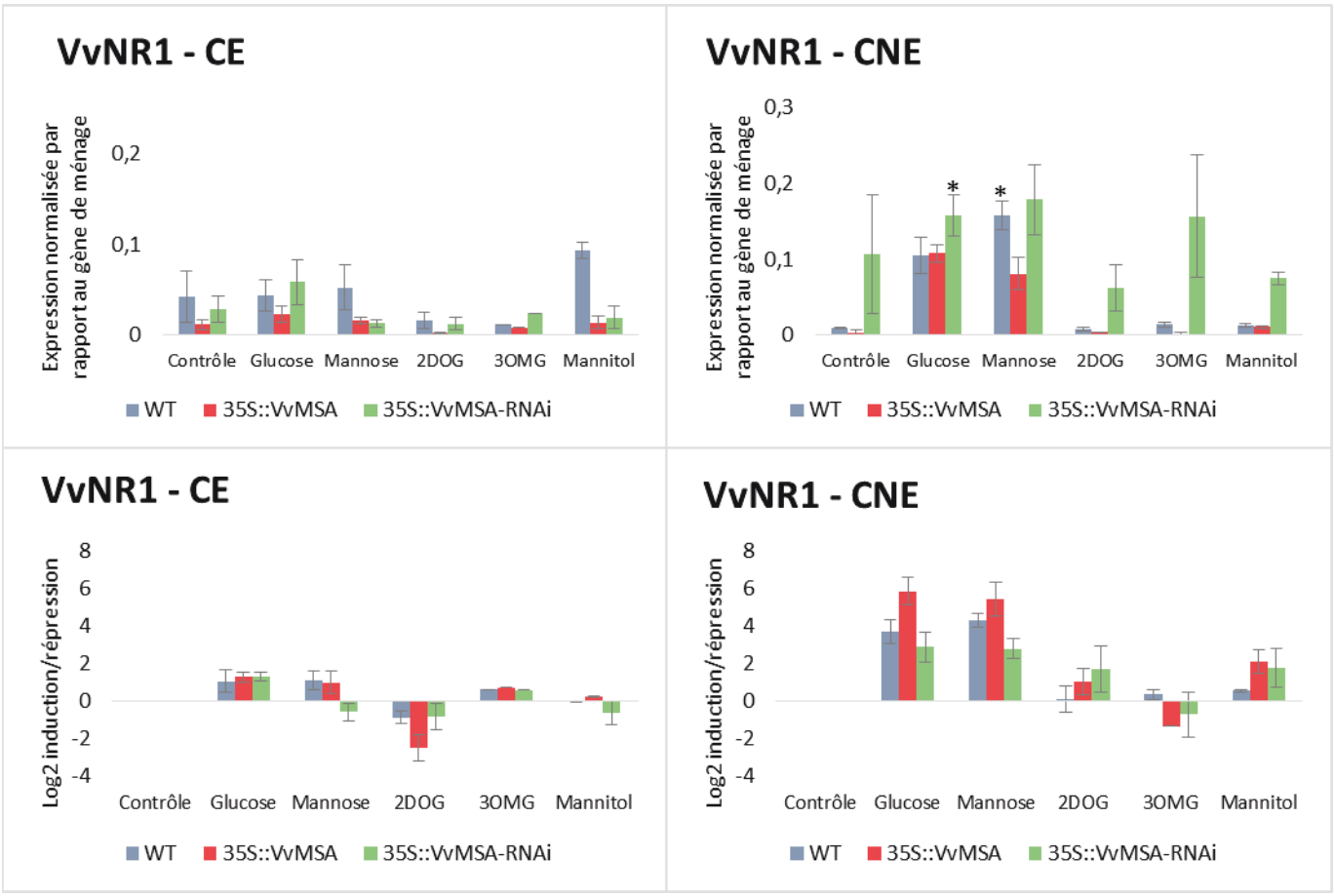


Figure 48 : Analyse de l'expression de *VvNR1* chez les cellules embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE). Le glucose, le mannose, le 3OMG et le mannitol sont à une concentration de 10 mM ; le 2DOG est à une concentration de 0,9 mM. Les cellules embryogènes et non embryogènes sont prélevées à J8 après leurs repiquage, incubées 24h dans les milieux GM° minimum et Gb ANA/BAP minimum respectivement. Les effecteurs glucidiques sont alors ajoutés et le traitement prolongé pour 6h (cellules embryogènes) ou 24h (cellules non embryogènes). L'expression est normalisée par rapport au gène de ménage *Actine* et rapportée à la condition contrôle pour le calcul de l'induction/répression. L'expression normalisée et l'induction/répression sont calculées suivant la méthode du 2-ΔCt et du 2-ΔΔCt respectivement. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de trois répétitions biologiques. Les étoiles indiquent une différence statistiquement significative par rapport à la condition témoin (p value < 0,05 ; test effectué : Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples).

chez les mutant *snrk1.1* (Jossier et al. 2009). Cela pourrait expliquer pourquoi le traitement par le 2DOG n'a que très peu d'effet sur l'expression de *VvCHS*.

Chez *Arabidopsis* outre le glucose, l'expression du gène codant la CHS est également induite par le fructose (Tsukaya et al. 1991) et par le saccharose (Hellmann et al. 2000; Martin et al. 2002; Müller et al. 2005). Tsukaya et collaborateur ont d'ailleurs observé une plus forte induction du gène rapporteur *GUS* sous le contrôle du promoteur de *CHS-A* de pétunia par le saccharose que par le glucose ou le fructose. De plus, ils ont noté une forte corrélation entre la teneur en saccharose et l'induction du promoteur de *CHS-A* sur des feuilles d'*Arabidopsis* traitées par le saccharose ou le glucose (Tsukaya et al. 1991). Il est donc possible que l'expression de *VvCHS* soit induite d'une manière indirecte par le saccharose plutôt que par le glucose.

1.2.4.6.2 Voie dépendante de l'hexokinase 1 : NR1

L'expression de *VvNR1* dans la condition témoin est relativement similaire entre les cellules embryogènes et non embryogènes (Figure 48) et ne semble pas significativement affectée par la surexpression ou la répression de *VvMSA*. Les traitements par le glucose et le mannose induisent (> 5 fois) l'expression de *VvNR1* chez les cellules non embryogènes, tandis que leur effet est beaucoup moins marqué chez les cellules embryogènes.

Le 2DOG ne modifie pas significativement l'expression de *NR1* chez les cellules non embryogènes mais semble induire une inhibition chez les cellules embryogènes sauvages et *35S::VvMSA-RNAi* (≈ 2 fois) et *35S::VvMSA* (≈ 5 fois).

Le 3OMG ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de *VvNR1* chez les cellules non embryogènes sauvages et *35S::VvMSA-RNAi* mais semble l'inhiber (> 3 fois) chez les cellules *35S::VvMSA*. Les cellules embryogènes sauvages et transformées traitées par le 3OMG semblent montrer une légère tendance à l'induction. Enfin, le mannitol n'as pas d'effet sur l'expression de *VvNR1* chez les cellules embryogènes mais semble l'induire (> 5 fois) chez les cellules non embryogènes *35S::VvMSA* et *35S::VvMSA-RNAi*.

Les résultats obtenus montrent que l'expression de *NR1* semble plus efficacement induite par le glucose et le mannose chez les cellules non embryogènes que chez les cellules embryogènes et que le 2DOG n'a pas d'effet. Cependant, le fait que l'expression de *NR1* soit régulée par le glucose *via* la voie de signalisation dépendante de HXK1 (Jang et al. 1997; Sheen et al. 1999) est remis en question par une étude récente (Reda 2013). L'hypothèse,

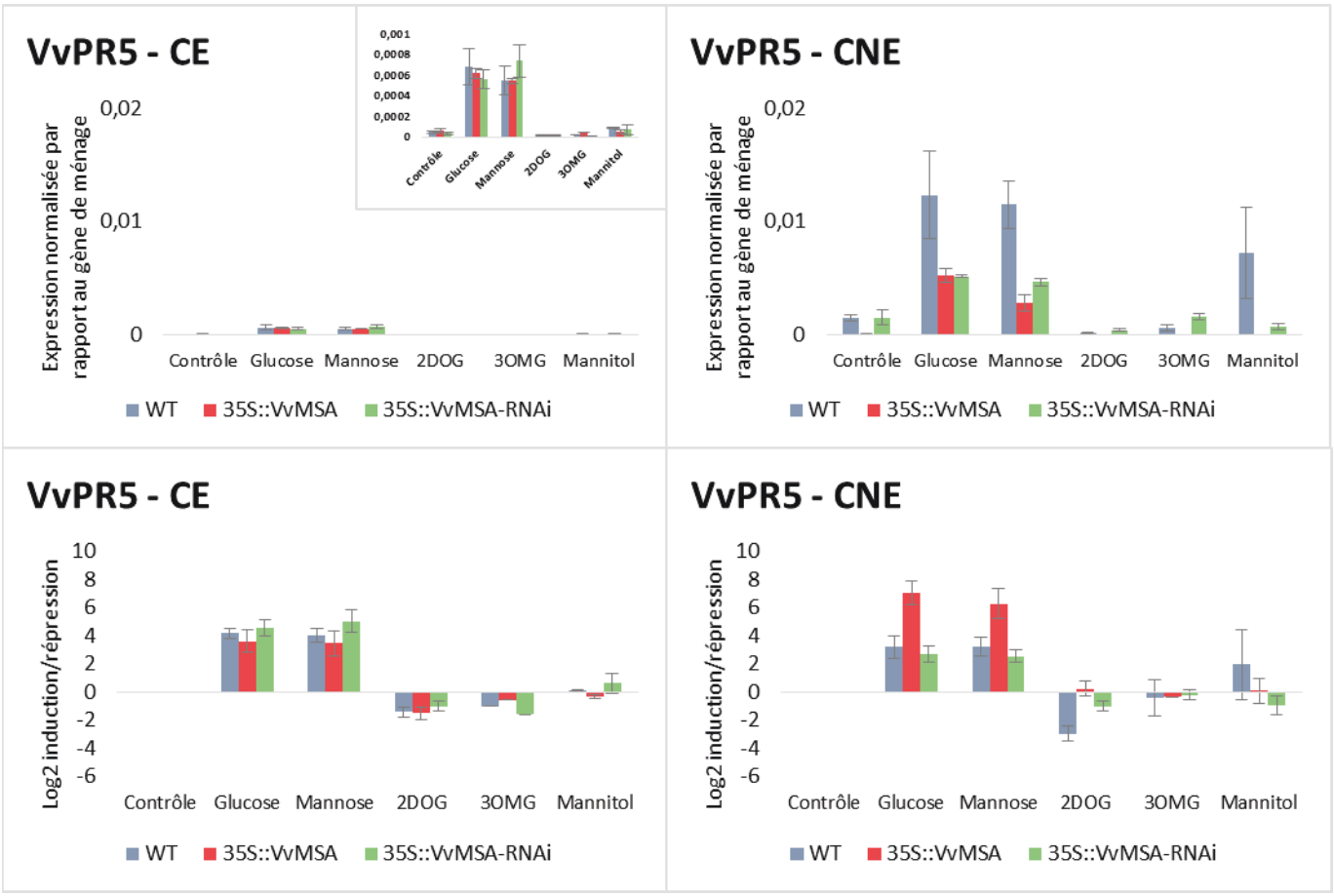


Figure 49 : Analyse de l'expression de *VvPR5* chez les cellules embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE). Le glucose, le mannose, le 3OMG et le mannitol sont à une concentration de 10 mM ; le 2DOG est à une concentration de 0,9 mM. Les cellules embryogènes et non embryogènes sont prélevées à J8 après leurs repiquage, incubées 24h dans les milieux GM° minimum et Gb ANA/BAP minimum respectivement. Les effecteurs glucidiques sont alors ajoutés et le traitement prolongé pour 6h (cellules embryogènes) ou 24h (cellules non embryogènes). L'expression est normalisée par rapport au gène de ménage *Actine* et rapportée à la condition contrôle pour le calcul de l'induction/répression. L'expression normalisée et l'induction/répression sont calculées suivant la méthode du 2-ΔCt et du 2-ΔΔCt respectivement. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de trois répétitions biologiques. Les étoiles indiquent une différence statistiquement significative par rapport à la condition témoin (p value < 0,05 ; test effectué : Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples).

avancée par Jang et collaborateurs, selon laquelle *NR1* est régulé *via* la voie dépendante de HXK1 repose sur le fait que la surexpression de *HXK1* chez des plantules d'*Arabidopsis* entraîne une induction importante de l'expression de *AtNR1* en réponse à un traitement par une forte concentration en glucose (6%). En revanche la répression de *AtHXK1,* par la stratégie antisens, n'abolie pas complètement l'induction de *AtNR1* par le glucose. Cette dernière observation suggère que HXK1 n'est pas indispensable à la régulation de *AtNR1* par le glucose. D'une manière similaire, dans son étude Reda a observé une induction d'*AtNR1* comparable entre plantes d'*Arabidopsis* sauvages et des mutants *hxk1*, lors d'un traitement par une faible concentration en glucose (2 mM) administré dans le milieu de culture hydroponique. L'auteur en a déduit que l'expression de *NR1* est régulée par une voie de signalisation indépendante de l'hexokinase 1. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la régulation de *NR1* est dépendante de l'activité catalytique de l'hexokinase 1 mais que la fonction de signalisation propre à HXK1 n'est pas indispensable. Il est donc probable que la régulation transcriptionnelle d'At*NR1* par le glucose passe, au moins en partie, par une voie dépendante du métabolisme du glucose.

1.2.4.6.3 Voie dépendante de la glycolyse : VvPR5

Dans la condition témoin, l'expression de *VvPR5* est beaucoup plus élevée chez les cellules non embryogènes que chez les cellules embryogènes (> 20 fois). Elle est également plus élevée chez les cellules non embryogènes WT et *35S::VvMSA-RNAi* que chez les cellules *35S::VvMSA*. Cependant elle ne montre pas de différences significatives entre les cellules embryogènes sauvages et transformées. (Figure 49).

Les traitements par le glucose et le mannose induisent l'expression de *VvPR5* d'une manière similaire pour les cellules embryogènes sauvages et transformées (> 10 fois), tandis que chez les cellules non embryogènes l'induction est plus faible chez les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi* (> 5 fois) que chez les cellules *35S::VvMSA* (> 50 fois). Cette différence en termes d'induction est probablement liée à la très faible expression de *VvPR5* chez les cellules non embryogènes *35S::VvMSA* dans la condition témoin.

Le traitement par le 2DOG entraîne une inhibition de la *PR5* chez les cellules embryogènes (> 2 fois chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* et > 3 fois chez les cellules WT et *35S::VvMSA*). En ce qui concerne les cellules non embryogènes, le 2DOG inhibe l'expression

du gène *PR5* chez les cellules sauvages (9 fois) et dans une moindre mesure chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* (2 fois), tandis qu'il ne semble pas avoir d'effet sur les cellules *35S::VvMSA*.

Le 3OMG ne semble pas avoir d'effet vis-à-vis de l'expression de *VvPR5*, tandis que le mannitol semble légèrement l'induire chez les cellules sauvages mais pas chez les cellules transformées. Cependant, la forte variabilité entre les répétitions biologiques ne semble pas indiquer un effet significatif.

Considérant que l'expression de la *PR5* est induite par la voie dépendante des intermédiaires/produits de la glycolyse, ce gène pourrait se comporter comme un marqueur de l'activité métabolique des cellules. Cette hypothèse est en accord avec les observations réalisées lors de la caractérisation des deux modèles cellulaires. Les cellules non embryogènes montrent en effet une forte consommation de saccharose et des concentrations intracellulaires beaucoup plus élevées en glucose, saccharose et intermédiaires du cycle de Krebs que les cellules embryogènes. Le fait que le mannose induise l'expression de *VvPR5* d'une manière très similaire au glucose conforte l'hypothèse avancée par Vitrac et collaborateurs (Vitrac et al. 2000) selon laquelle le mannose est métabolisé chez la Vigne.

En ce qui concerne les cellules embryogènes, la régulation de *VvPR5* est très similaire entre les cellules sauvages et transformées, le glucose et le mannose l'induisent tandis que le 2DOG et le 3OMG ont une légère tendance à l'inhiber. Chez les cellules non embryogènes, la réponse diffère sensiblement entre cellules sauvages et transformées. La *PR5* est moins exprimée dans la condition témoin chez les cellules *35S::VvMSA* ce qui pourrait témoigner d'une activité métabolique plus faible chez ces cellules dans les conditions de l'expérimentation. Les traitements par le glucose et le mannose induisent l'expression de la *PR5*. Cette induction est plus importante chez les cellules *35S::VvMSA* probablement du fait du faible niveau d'expression de *PR5* dans la condition témoin. Le 2DOG inhibe l'expression de la PR5 chez les cellules sauvages mais son effet est beaucoup moins marqué sur les cellules 35S::*VvMSA* et *35S::VvMSA-RNAi*. Ce qui suggère que le 2DOG a un effet plus prononcé sur la voie dépendante du métabolisme glucidique chez les cellules non embryogènes sauvages que les cellules *35S::VvMSA* et *35S::VvMSA-RNAi*.

L'étude de l'expression des gènes marqueurs nous renseigne sur les effets différentiels des analogues du glucose administrés chez les cellules embryogènes et non embryogènes, sauvages et transformées. Il apparaît que les traitements par le glucose et le mannose

conduisent systématiquement aux mêmes effets sur les différents gènes marqueurs. Cela semble montrer qu'ils activent les mêmes voies de la signalisation glucidique et conforte l'hypothèse selon laquelle le mannose est métabolisé d'une manière similaire au glucose chez la Vigne (Vitrac et al. 2000). En revanche le traitement par le 2DOG, induit un effet différent du glucose et du mannose. Compte tenu de ses effets secondaires, il est très probable que la régulation des gènes étudiés, en réponse au traitement par le 2DOG, soit en partie liée à l'inhibition du métabolisme du glucose.

Dans nos conditions expérimentales le traitement par le 3OMG n'affecte pas l'expression des gènes marqueurs de la voie indépendante de l'hexokinase. L'expression de *CrPAL1*, est induite par l'analogue du glucose non métabolisable 6-Déoxy-Glucose (6DOG) dans des cellules autotrophes de Chénopode (Ehness et al. 1997). En revanche, son orthologue *AtPAL1* n'est pas induit par le 6DOG au niveau de plantules et de feuilles d'*Arabidopsis* (Villadsen and Smith 2004), ce qui suggère que la régulation transcriptionnelle des deux gènes orthologues ne semble pas conservée. La spécificité observée au niveau du contrôle de leur expression pourrait également être liée aux différences existant entre les deux modèles biologiques (cellules de Chénopode en culture/ plantule-plante d'*Arabidopsis*).

L'hypothèse selon laquelle *AtCHS* serait régulée par une voie indépendante de HXK1 est basée sur l'utilisation de mutants affectés dans l'expression de *AtHXK1* (Xiao et al. 2000; Müller et al. 2005). Le fait que l'expression de *AtCHS* soit affectée de la même manière chez les mutants *hxk1* que chez les plantes sauvages traitées par le glucose, est bien la preuve que la régulation de *CHS* par le glucose est indépendante de l'activité de signalisation spécifique de HXK1. Cela n'indique en revanche pas que la voie de signalisation impliquée dans la régulation de la *CHS* soit indépendante du métabolisme glucidique et puisse donc être activée par l'analogue du glucose non métabolisable 3OMG.

En effet, la seule répression de l'HXK1 ne suffit pas à abolir la métabolisation du glucose. La forte inhibition de l'activité des hexokinases associées aux mitochondries, dont fait partie HXK1 (Damari-Weissler et al. 2007; Karve et al. 2008), par le mannoheptulose entraîne une diminution de la teneur en sucres nucléoside-diphosphate (sucres-NDP) mais a très peu d'effet sur la teneur en glucose-6-P chez le maïs (Galina and da Silva 2000). Cela suggère que la glycolyse est sans doute peu affectée par l'inhibition des hexokinases associées aux mitochondries et donc *a fortiori* par la répression de HXK1. De même, chez *Arabidopsis*, la répression de l'expression de *AtHXK1* n'induit qu'une légère diminution de la teneur en

G6P (Kim et al. 2006). Il est donc tout à fait possible que *CHS* soit régulé par le glucose *via* une voie indépendante de la fonction de signalisation de HXK1 mais dépendante de l'activité glycolytique. D'après cette hypothèse, le 3OMG qui n'est pas métabolisable, n'induirait pas l'expression de *VvCHS*. S'il a été utilisé dans de nombreuses études comme effecteur de la voie de signalisation indépendante de HXK1 (Godt et al. 1995; Martin et al. 1997; Fujiki et al. 2000; Ichimura et al. 2000; Vitrac et al. 2000; Ho et al. 2001; Conde et al. 2006), très peu ont fait état d'un effet de cet analogue vis-à-vis de l'expression de gènes régulés par le glucose chez les plantes (Martin et al. 1997; Conde et al. 2006). Une étude visant à identifier des gènes régulés à la fois par le glucose et par les analogues non ou peu phosphorylables 3OMG et 6DOG chez *A. thaliana*, n'a pu identifier aucun gène régulé par le 3OMG et le 6DOG parmi plus de 200 gènes dont l'expression est affectée par le glucose (Villadsen and Smith 2004). Ces observations suggèrent que la majorité des gènes régulés par les voies de signalisation indépendantes de l'hexokinase, nécessitent la métabolisation du glucose.

Au vu des résultats récents (Reda 2013), l'expression d'*AtNR1* ne semble pas régulée par une voie dépendante de l'activité du senseur cytoplasmique HXK1. Etant donné que la surexpression d'*AtHXK1* induit *AtNR1*, la régulation de NR1 est dépendante de l'activité catalytique de HXK1. Galina et collaborateur ayant démontré chez le maïs que l'inhibition des hexokinases associée à la mitochondrie (HXK1 est liée à la membrane externe de la mitochondrie) affecte la teneur en sucres-NDP mais pas en G6P, il est probable que la régulation de *NR1* soit dépendante de la production d'UDP-glucose et/ou des processus en découlant (synthèse de saccharose et d'amidon, de tréhalose-6-Phosphate et de composés de la paroi cellulaire, glycosylation des lipides et des protéines). Or, le gène d'*AtNR1* est également induit par le saccharose (Cheng et al. 1992). L'induction de ce gène en réponse au traitement par le glucose pourrait donc être liée à la synthèse du saccharose. De la même façon, ces résultats remettent en cause l'hypothèse selon laquelle le gène *PR5* serait régulé par une voie de signalisation dépendante de la glycolyse.

En effet, ces études indiquent que les hexokinases associées aux mitochondries ne sont pas impliquées dans la glycolyse (da-Silva et al. 2001). L'inhibition de *PR1* et *PR5* liée à la répression de *AtHXK1* et leur induction par la surexpression de *YHXK2* observée par Xiao et collaborateurs (Xiao et al. 2000) est bien liée à l'activité catalytique de HXK1, mais étant donné que l'activité de HXK1 semble n'influencer que faiblement la glycolyse chez *Arabidopsis*, il est probable que *AtPR1* et *AtPR5* soient régulés par une autre voie du métabolisme glucidique que celle de la glycolyse. Il existe néanmoins une voie de

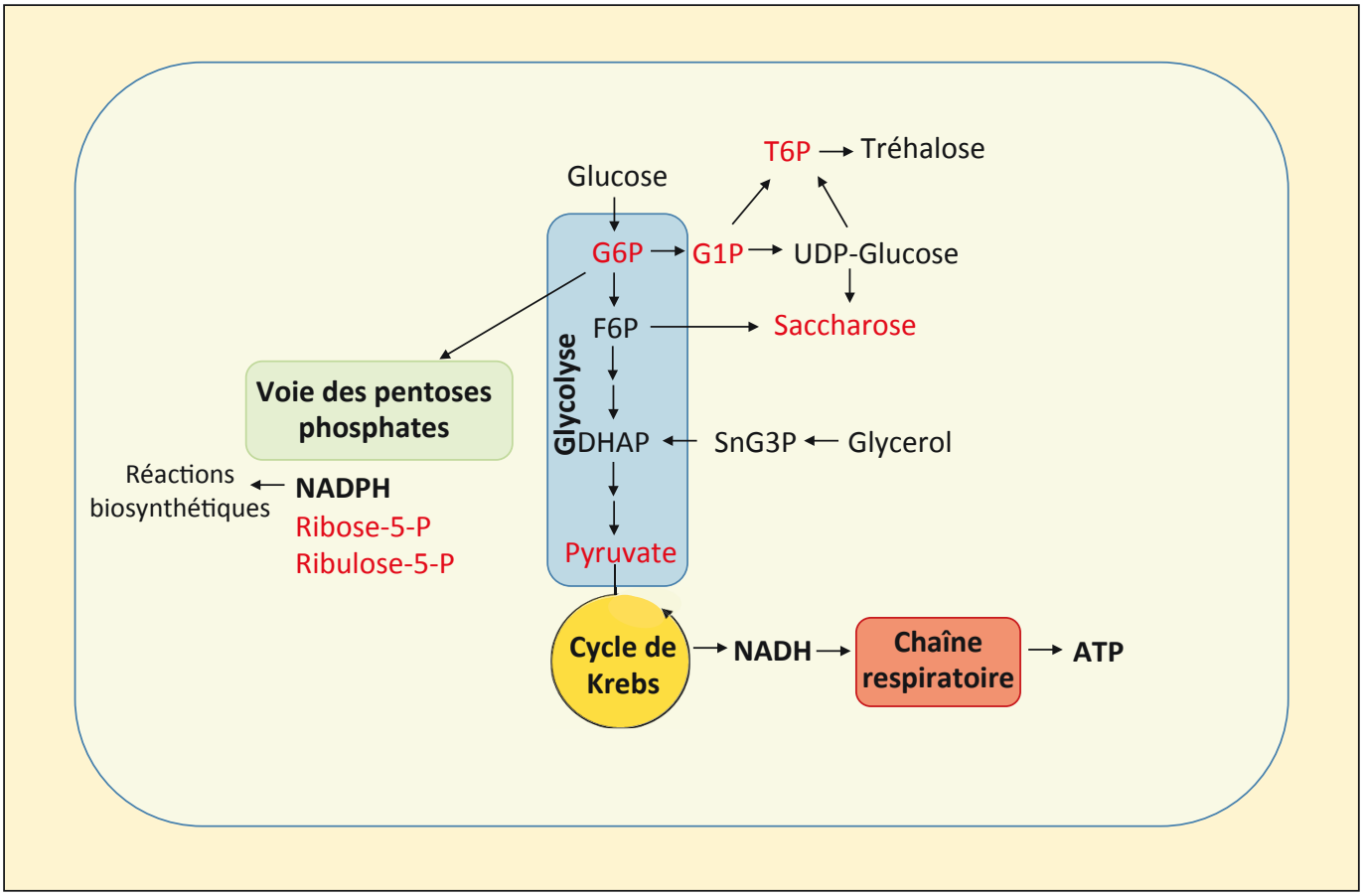


Figure 50 : Schéma représentant les principales voies du métabolisme du glucose. Sont représentés en rouge les produits et intermédiaires du métabolisme du glucose susceptibles d'influer sur la signalisation glucidique. Le T6P et le saccharose sont spécifiquement impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques. Le G6P, le G1P, le T6P, le Ribose-5-P et le Ribulose-5-P inhibent directement ou indirectement l'activité de la SnRK1. Un traitement par le pyruvate permet de lever l'induction de l'autophagie et de certains gènes en condition de carence en sucres.

signalisation dépendant indirectement de l'activité de la glycolyse puisqu'un apport de pyruvate (un des produits de la glycolyse) à des suspensions cellulaires de riz en carence glucidique lève l'induction de six gènes régulés par la carence (une α-amylase et cinq gènes de fonction inconnue) (Ho et al. 2001).

1.2.4.6.4 Conclusions concernant l'effet des analogues sur la signalisation glucidique

Pour conclure, nos résultats confirment l'hypothèse, selon laquelle la phosphorylation du glucose semble nécessaire à sa perception en tant que signal (Villadsen and Smith, 2004). La signalisation glucidique indépendante de HXK1 est donc probablement liée à l'activité des différentes voies métaboliques alimentées par le glucose. Parmi les signaux métaboliques potentiellement impliqués dans la réponse des cellules au traitement par le glucose on peut citer : le saccharose, le G1P, le G6P, le T6P, le ribose-5-phosphate (R5P) et le ribulose-5-Phosphate (Ru5P). Le saccharose et le T6P sont spécifiquement impliqués dans la régulation de nombreux processus biologiques (Paul 2008 ; Tognetti et al. 2013 ; Lastdrager et al. 2014). Le G1P, le G6P, le T6P, le R5P et le Ru5P inhibent l'activité de la SnRK1 (Figure 50), qui joue un rôle central dans le contrôle du métabolisme de la plante (Nunes et al. 2012). Cependant le fait que le 3OMG et le 6DOG puissent mimer l'effet du glucose dans différents modèles biologiques (Roitsch et al. 1995 ; Godt et al. 1995 ; Ehness et al. 1997 ; Martin et al. 1997) suggère tout de même l'existence d'une voie de signalisation indépendante de HXK1 et du métabolisme du glucose (Figure 51).

Une des voies de signalisation, impliquée dans la régulation de *VvPAL1*, est déclenchée en réponse au traitement par le glucose et par le mannose dans les deux types cellulaires. Cependant, cette voie est très fortement induite par le 2DOG chez les cellules non embryogènes mais pas chez les cellules embryogènes.

Au vu de la similitude des profils de régulation de *VvCHS* et *VvNR1* il est probable que les deux gènes soient régulés par la même voie de la signalisation du glucose. Cette voie, est induite par le glucose et le mannose mais faiblement affectée par le traitement au 2DOG, qui semble l'induire chez les cellules non embryogènes et l'inhiber chez les cellules embryogènes.

La voie de signalisation dépendante de la glycolyse potentiellement impliquée dans la régulation de *VvPR5* semble induite par le glucose et par le mannose mais légèrement inhibée par le2DOG dans les 2 types cellulaires.

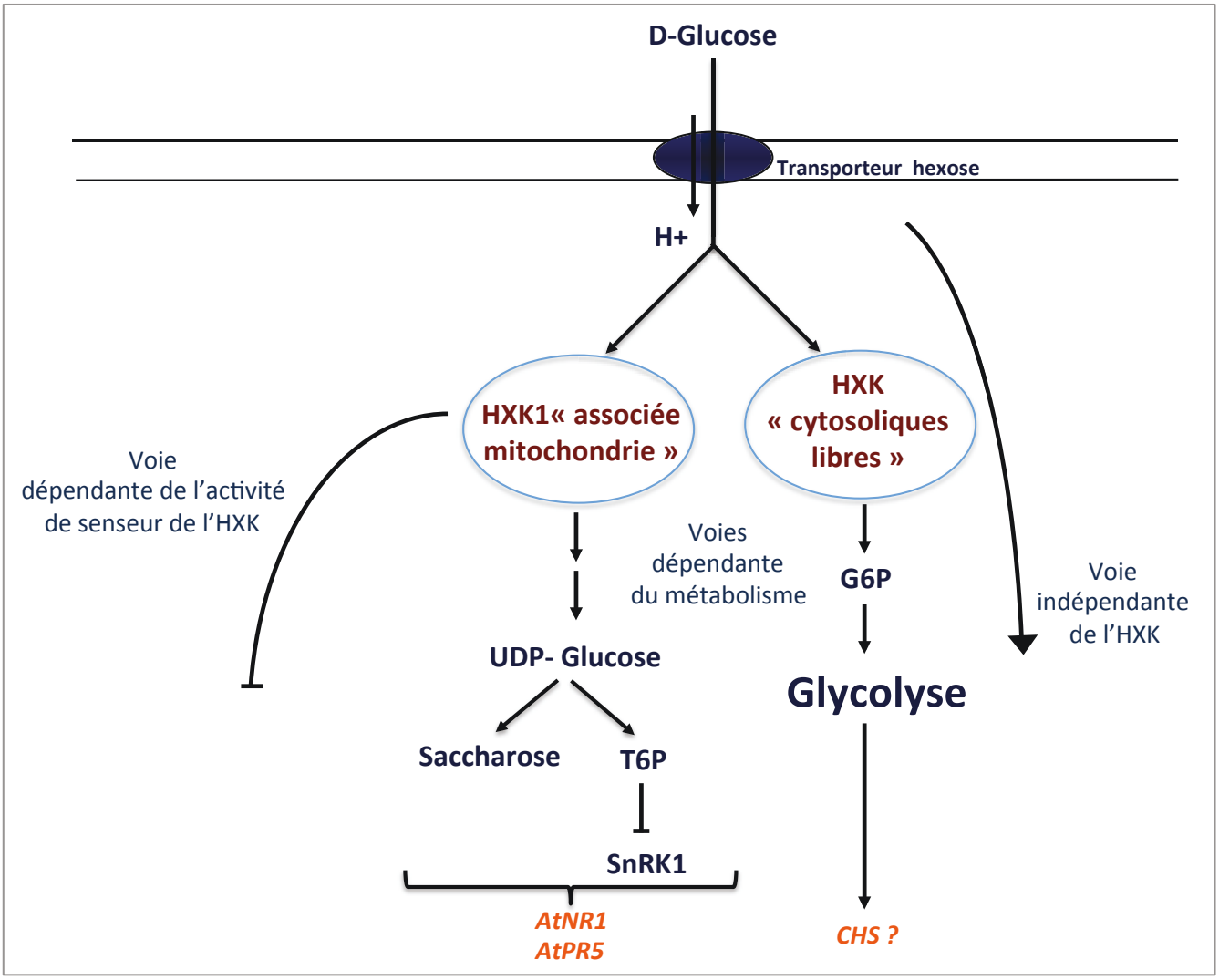


Figure 51 : Schéma illustrant la régulation des gènes marqueurs par les différentes voies de la signalisation dépendante du glucose. HXK1 est associée à la mitochondrie, son activité est principalement corrélée à la production de sucres-NDP. Les HXK « fraction soluble » correspondent aux hexokinases cytosoliques qui ne sont pas associées à un organite. Celles-ci sont majoritairement impliquées dans la glycolyse. L'expression de *NR1* et *PR5* est dépendante de l'activité de HXK1 mais indépendante de sa fonction de signalisation spécifique. *CrPAL1* est induit par l'analogue non métabolisable 6DOG donc régulé par une voie indépendante du senseur HXK. Tandis que l'expression du *CHS* est induite par le glucose d'une manière indépendante du niveau d'expression d'AtHXK1, ce gène est potentiellement régulé par la voie indépendante de l'HXK ou dépendante de la glycolyse. Termes en rouge à utiliser dans le schéma

Néanmoins, il faut considérer que les gènes analysés sont les orthologues probables, identifiés sur la base de leur homologie de séquence, parmi les membres de familles multigéniques des gènes marqueurs étudiés chez d'autres espèces végétales. Leur régulation est donc potentiellement différente de celle des gènes marqueurs décrits dans la littérature. De plus, les différences physiologiques et environnementales entre les modèles d'étude conditionnent également la régulation de ces gènes marqueurs par le glucose et ces analogues. Le comportement d'un gène marqueur reste donc largement tributaire du modèle biologique et des conditions de l'expérimentation.

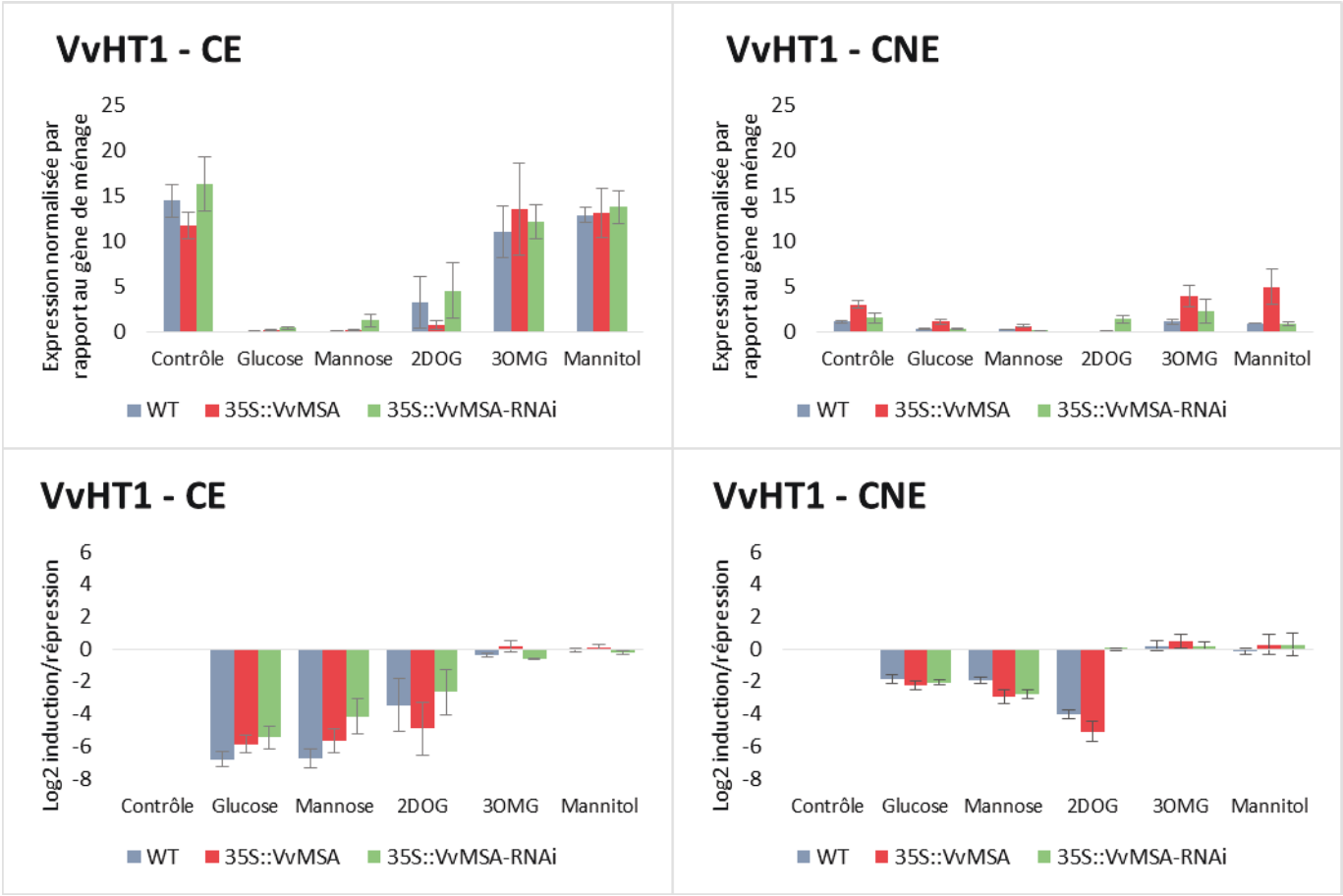


Figure 52 : Analyse de l'expression de *VvHT1* chez les cellules embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE) en réponse à différents traitements. Glucose, Mannose, 3OMG et Mannitol sont à une concentration de 10mM ; le 2DOG est à une concentration de 0,9mM. Les cellules embryogènes et non embryogènes sont prélevées 8 jours après leurs repiquage, incubées 24h dans les milieux GM° minimum et Gb A/B minimum respectivement. Les effecteurs glucidiques sont alors ajoutés et le traitement prolongé pour 6h (cellules embryogènes) ou 24h (cellules non embryogènes). L'expression est normalisée par rapport au gène de ménage actine et rapportée à la condition contrôle pour le calcul de l'induction/répression. . L'expression normalisée (A et B) et l'induction/répression (C et D) sont calculées suivant la méthode du 2-ΔCt et du 2-ΔΔCt respectivement. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de 3 répétitions biologiques. Les étoiles indiquent une différence statistiquement significative par rapport à la condition témoin (p value < 0,05 ; test effectué : Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples)

1.3 Chapitre 3 : Positionnement de la régulation de *VvHT1* par VvMSA dans les voies de la signalisation du glucose

1.3.1 Analyse de l'effet des effecteurs glucidiques sur l'expression de *VvHT1* et *VvHT5*

Le but de cette analyse est de déterminer l'implication des différentes voies de la signalisation glucidique dans la régulation de l'expression des gènes codant pour les transporteurs d'hexoses *VvHT1* et *VvHT5*. Le deuxième objectif de cette étude est de confirmer ou d'infirmer le rôle de VvMSA dans la régulation de l'expression de ces transporteurs et de le positionner vis-à-vis du réseau complexe de la signalisation glucidique. Pour ce faire, les cellules embryogènes et non embryogènes (WT ; *35S::VvMSA* et *35S::VvMSA-RNAi*) précédemment caractérisées sont traitées par les différents effecteurs glucidiques capables d'induire différentiellement les voies de la signalisation glucidique. L'analyse de l'expression de *VvHT1* et *VvHT5* est ensuite réalisée par qRT-PCR. L'étude de la régulation de l'expression de *VvHT1* est dictée par le fait que l'on sait que celui-ci est à la fois régulé par le glucose et par VvMSA, mais qu'il reste encore à déterminer si VvMSA est impliqué dans la régulation de *VvHT1* au travers d'une voie de la signalisation glucidique. En ce qui concerne *VvHT5*, dans des feuilles de Vigne en condition de stress hydrique, il est induit en parallèle de *VvMSA* et d'une augmentation de la teneur en glucose (Medici 2010). Il nous a semblé opportun de déterminer si le gène *VvHT5* pouvait répondre au signal glucose et si VvMSA jouait un rôle dans la régulation de son expression.

Dans les milieux standards (condition témoin) l'expression de *VvHT1* est similaire chez les cellules sauvages et génétiquement modifiées dans chacun des deux types cellulaires (embryogènes et non embryogènes) (Figure 52). En revanche son expression est plus élevée chez les cellules embryogènes que chez les cellules non embryogènes (> 4 fois). Cette différence est également observée pour l'expression de *VvHT5* qui apparaît aussi plus importante chez les cellules embryogènes que chez les cellules non embryogènes. L'expression de *VvHT5* semble plus élevée chez les cellules embryogènes *35S::VvMSA-RNAi* que chez les sauvages et *35S::VvMSA*, ce qui n'est pas observé chez les cellules non embryogènes. Cependant le faible niveau d'expression de *VvHT5* et la forte variabilité observée chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* ne permet pas d'affirmer que cette différence soit significative.

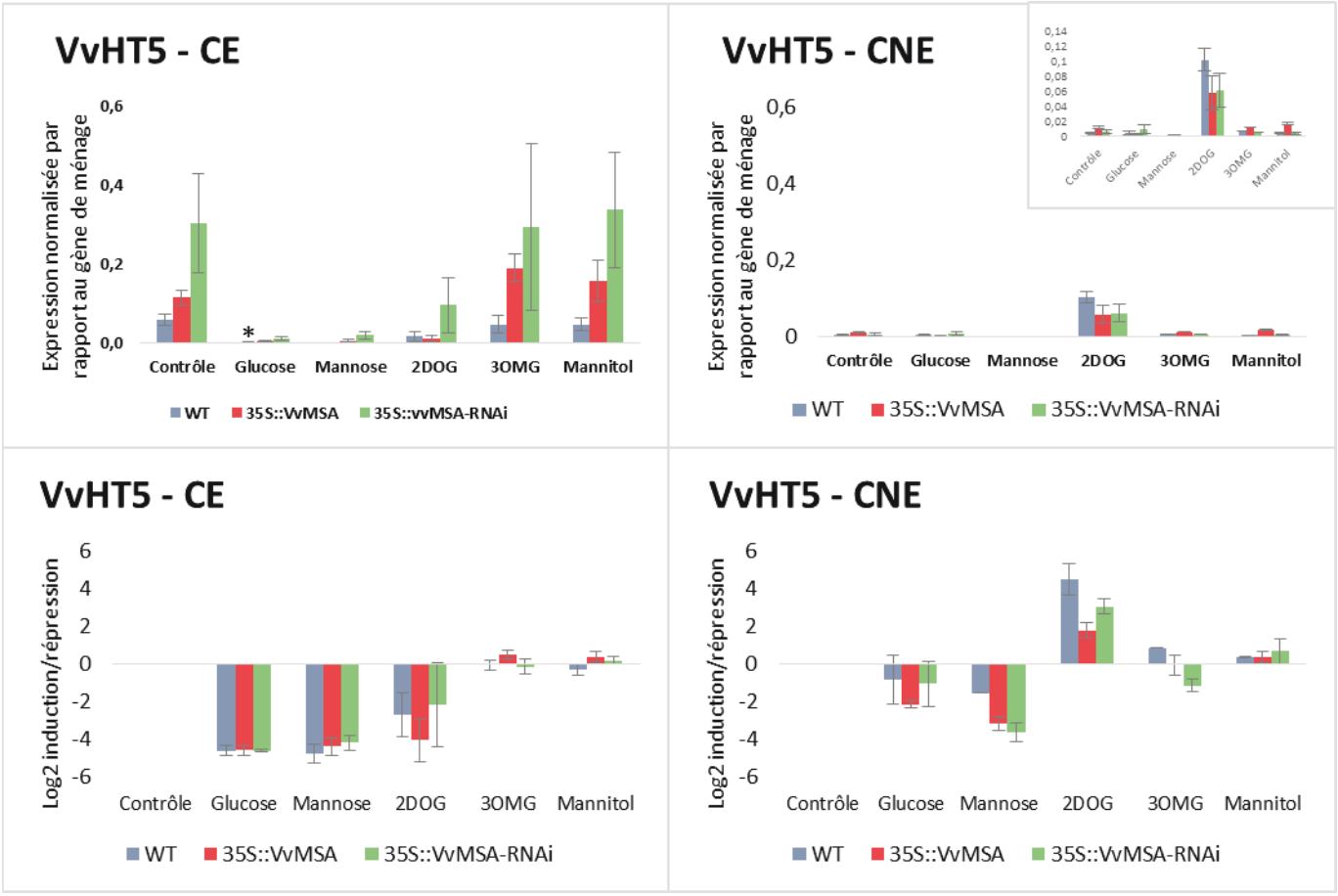


Figure 53 : Analyse de l'expression de *VvHT5* chez les cellules embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE) en réponse à différents traitements. Le glucose, le mannose, le 3OMG et le mannitol sont à une concentration de 10 mM ; le 2DOG est à une concentration de 0,9 mM. Les cellules embryogènes et non embryogènes sont prélevées 8 jours après leurs repiquage, incubées 24h dans les milieux GM° minimum et Gb ANA/BAP minimum respectivement. Les effecteurs glucidiques sont alors ajoutés et le traitement prolongé pour 6h (cellules embryogènes) ou 24h (cellules non embryogènes). L'expression est normalisée par rapport au gène de ménage *Actine* et rapportée à la condition contrôle pour le calcul de l'induction/répression. . L'expression normalisée (A et B) et l'induction/répression (C et D) sont calculées suivant la méthode du 2-ΔCt et du 2-ΔΔCt respectivement. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de trois répétitions biologiques. Les étoiles indiquent une différence statistiquement significative par rapport à la condition témoin (p value < 0,05 ; test effectué : Kruskal-Wallis avec comparaisons multiples)

Le traitement par le glucose inhibe *VvHT1* d'une manière plus marquée chez les cellules embryogènes (> 32 fois) que chez les cellules non embryogènes (> 4 fois) (Figure 52). Cette différence est probablement en partie liée au niveau d'expression de *VvHT1* initialement plus élevé chez les cellules embryogènes dans la condition témoin. Concernant *VvHT5*, son expression est inhibée par le glucose de manière plus marquée chez les cellules embryogènes (> 16 fois) que chez les cellules non embryogènes où l'on discerne une tendance à l'inhibition mais beaucoup moins marquée (Figure 53).

Le traitement par le mannose produit un effet très similaire à celui du glucose vis-à-vis de l'expression de *VvHT1* dans les deux types cellulaires. L'inhibition de *VvHT5* imposée par le traitement mannose est également très proche de l'effet du glucose chez les cellules embryogènes. Chez les cellules non embryogènes en revanche, l'inhibition de *VvHT5* par le mannose semble plus marquée que pour le traitement glucose (Figures 52 et 53).

Le traitement des cellules embryogènes par le 2DOG à 0,9 mM entraîne une inhibition de *VvHT1* et *VvHT5* moins prononcée (> 8 fois) que les traitements par le glucose et le mannose à 10 mM. Cette inhibition ne semble pas différente entre les cellules sauvages et les cellules transformées pour la surexpression ou la répression de VvMSA. Ce même traitement chez les cellules non embryogènes conduit à une répression beaucoup plus importante (> 16 fois) que celle imposée par les traitements glucose et mannose (> 4 fois) chez les cellules sauvages et *35S::VvMSA*. En revanche, on n'observe aucune inhibition de l'expression de *VvHT1* par le 2DOG chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi*. L'effet de ce traitement sur l'expression de *VvHT5* est également différent chez les cellules non embryogènes puisque *VvHT5* est induit par le 2DOG (> 3fois), sans que l'on observe de différence marquée entre cellules sauvages et génétiquement modifiées (Figures 52 et 53).

Enfin, le 3OMG et le mannitol ne semblent pas avoir d'effet significatif sur l'expression de *VvHT1* et de *VvHT5* dans aucun des deux types cellulaires analysés (Figures 52 et 53).

D'une manière générale, on observe que le traitement par des hexoses phosphorylables : Glucose, Mannose et 2DOG, conduit à la régulation de l'expression de *VvHT1* et *VvHT5* contrairement à l'analogue non phosphorylable 3OMG. Cette première observation suggère que la phosphorylation du glucose est nécessaire à la régulation de l'expression de *VvHT1* et *VvHT5*. Parmi les sucres phosphorylables, les traitements par le glucose et par le mannose conduisent à des profils de régulations très semblables, à savoir une

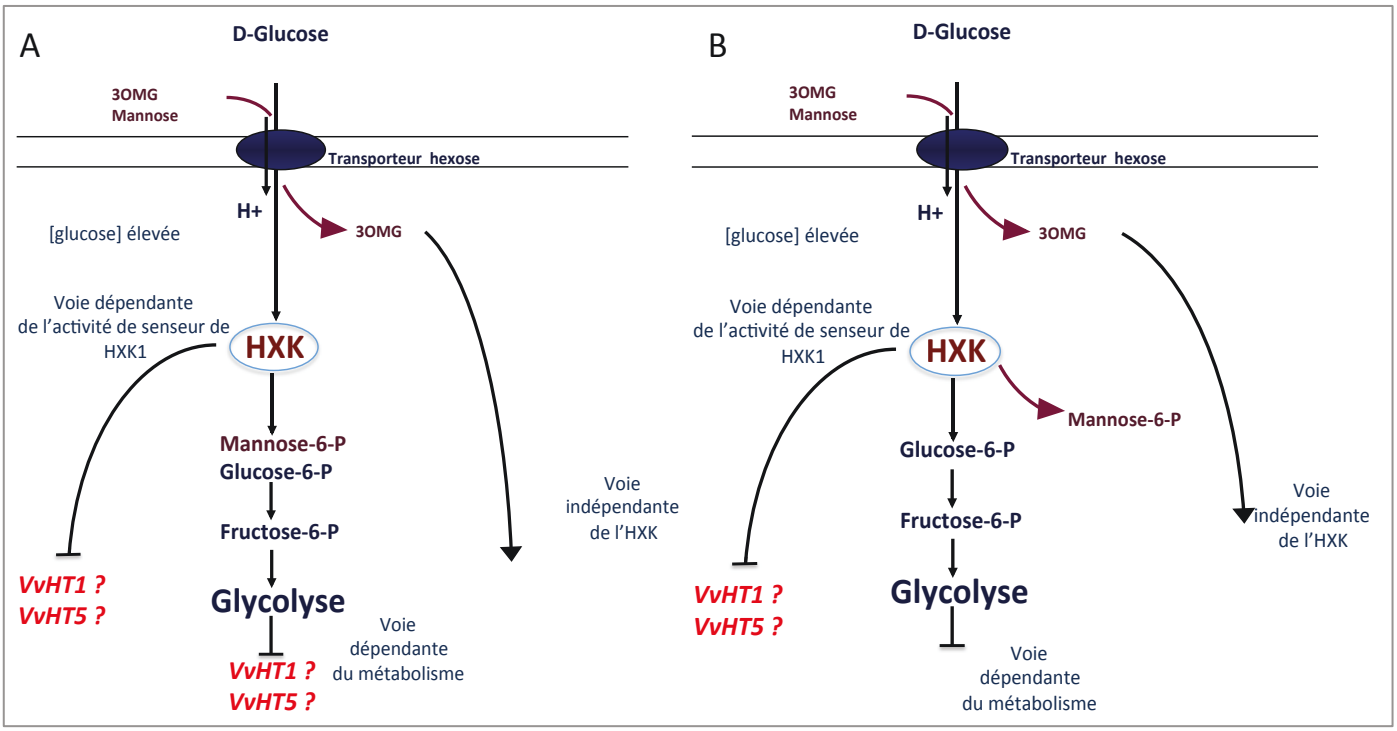


Figure 54 : Schéma illustrant les hypothèses concernant la régulation de *VvHT1* et *VvHT5* par les voies de la signalisation du glucose, suivant que le mannose-6-P soit isomérisé en Fructose-6-P puis métabolisé (A) ou non (B)

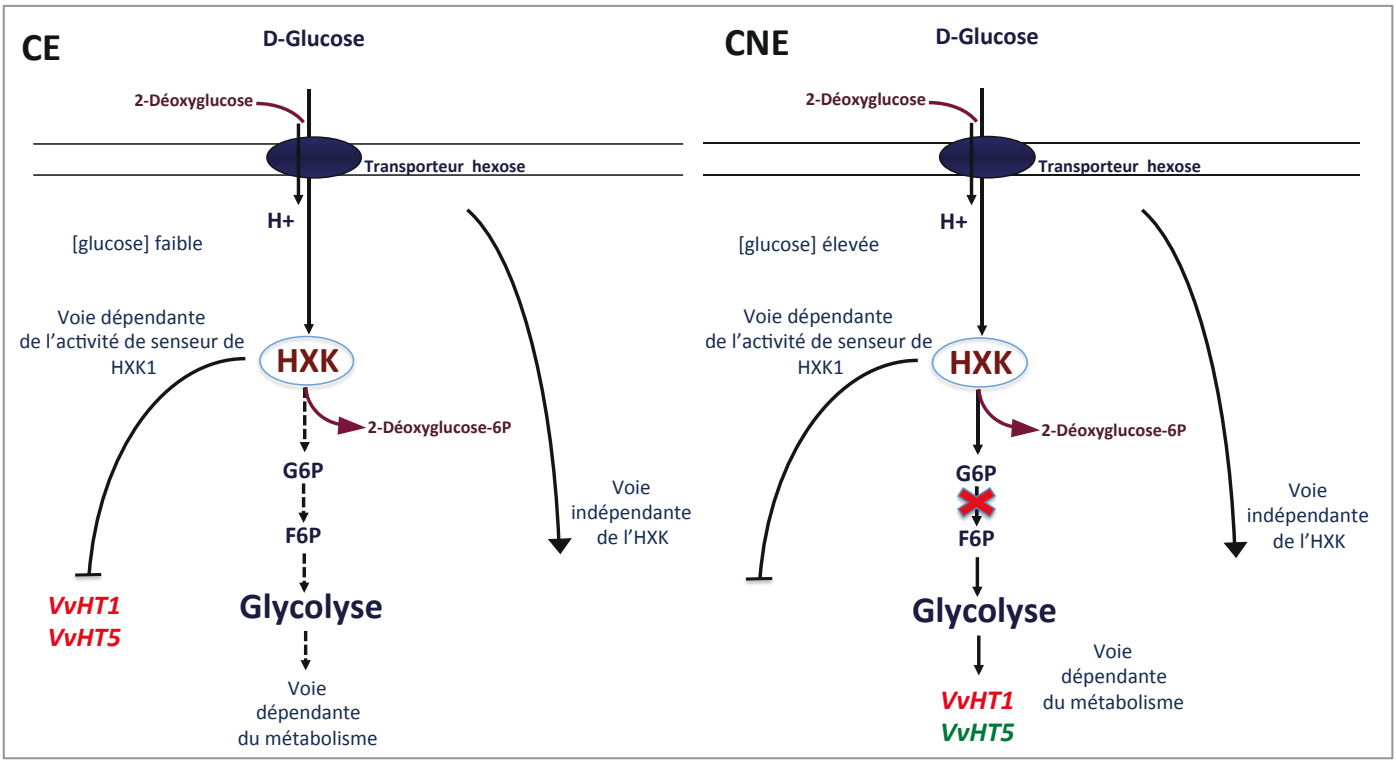


Figure 55 : Schéma illustrant les hypothèses concernant la régulation de l'expression de *VvHT1* et *VvHT5* par les voies de la signalisation du glucose en réponse au traitement par le 2DOG. L'hypothèse est basée sur le fait que les cellules embryogènes sont caractérisées par un métabolisme glucidique moins actif que les cellules non embryogènes. Dans ces conditions le 2DOG n'inhibe pas d'avantage le métabolisme glucidique et n'affecte pas la voie de signalisation qui en dépend. Chez les cellules embryogènes l'inhibition de *VvHT1 et de VvHT5* par le 2DOG serait liée à la voie dépendante de l'hexokinase. Chez les cellules non embryogènes, supposées présenter un métabolisme glucidique plus actif, le 2DOG inhiberait l'isomérisation du G6P en F6P. La perturbation du métabolisme généré par cet analogue aboutirait alors à l'inhibition de *VvHT1* et à l'induction de *VvHT5*. La régulation de l'expression de *VvHT1* mais pas celle de *VvHT5* par ce signal serait dépendante de VvMSA.

inhibition de *VvHT1* et de *VvHT5* plus marquée chez les cellules embryogènes que chez les cellules non embryogènes mais ne semblent pas être significativement affectée par la surexpression ou la répression de VvMSA. Cette inhibition plus marquée chez les cellules embryogènes est probablement liée au fait que les gènes *VvHT1 et VvHT5* sont plus exprimés dans la condition témoin chez les cellules embryogènes que chez les cellules non embryogènes. L'expression de *VvHT1* et *VvHT5* étant inhibée par le glucose, cette différence peut s'expliquer par la plus faible concentration cellulaire en glucose chez les cellules embryogènes que chez les cellules non embryogènes. Etant donné que le mannose a été suggéré comme métabolisé par une suspension de cellules de Vigne (*V. vinifera L.* cv Gamay Fréaux var. Teinturier) (Vitrac et al. 2000), l'interprétation concernant son effet sur les voies de la signalisation glucidique doit prendre en compte cette hypothèse. Si le mannose n'est pas métabolisé par les cellules, alors il active la voie dépendante de l'hexokinase sans affecter la voie dépendante du métabolisme du glucose.

De plus, le 3OMG n'ayant pas d'effet, la voie indépendante de HXK1 ne serait pas non plus impliquée dans la régulation de *VvHT1* et de *VvHT5*. Dans ce contexte, la régulation de l'expression de *VvHT1* et de *VvHT5* serait donc uniquement liée à la voie dépendante de l'hexokinase 1. En revanche, si le mannose est métabolisé, il n'est pas possible de déterminer si nos gènes d'intérêt sont régulés *via* la voie dépendante de HXK1 ou par une voie dépendante du métabolisme du glucose (Figure 54). L'étude de la régulation des gènes marqueurs en réponse aux traitements par les différents analogues semble indiquer que le mannose induit la voie de signalisation dépendante du métabolisme glucidique au même titre que le glucose. L'effet du mannose sur l'expression de *VvHT1* ne permet donc pas d'affirmer que son expression est uniquement régulée par la voie dépendante de HXK1.

Le 2DOG induit des réponses très contrastées au niveau de la régulation de l'expression de *VvHT1* et de *VvHT5* suivant les cellules. Il semble donc que le(s) signal(aux) généré(s) par le traitement au 2DOG soit(ent) différent(s) de celui/ceux généré(s) par les traitements « glucose » et « mannose ». L'étude des gènes marqueurs indique que le 2DOG n'a pas le même effet en fonction du type cellulaire considéré (embryogène ou non embryogène). De plus, le fait que le 2DOG inhibe *VvHT5* chez les cellules embryogènes et l'induise chez les cellules non embryogènes peut être expliqué de deux manières : soit il active deux voies de signalisation différentes suivant le type cellulaire considéré soit il a des effets opposés sur une seule et même voie de signalisation. Le fait que l'inhibition de *VvHT1* soit dépendante de VvMSA (absence d'inhibition chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi*) chez les

cellules non embryogènes et pas chez les cellules embryogènes suggère cependant que deux voies de signalisation différentes et indépendantes sont probablement activées par le traitement au 2DOG chez les cellules embryogènes et chez les cellules non embryogènes.

La différence du niveau d'inhibition de *VvHT1* entre les cellules embryogènes et non embryogènes liée au traitement par le 2DOG est également intéressante. En effet, l'inhibition de *VvHT1* par le glucose et par le mannose est plus marquée chez les cellules embryogènes que chez les cellules non embryogènes. En revanche le traitement par le 2DOG entraîne une inhibition de *VvHT1* plus prononcée chez les cellules non embryogènes que chez les cellules embryogènes. Considérant les effets secondaires potentiels du 2DOG et les différences existant entre les deux types cellulaires, il est tentant de supposer que l'effet plus marqué du 2DOG sur les cellules non embryogènes soit lié à un effet d'inhibition de leur métabolisme énergétique plus actif que celui des cellules embryogènes.

En revanche, l'inhibition de *VvHT1* et *VvHT5* par le 2DOG observée chez les cellules embryogènes dépendrait plutôt de la perception directe de la molécule de 2DOG probablement *via* HXK1 (Figure 55), étant donné que le 3OMG, qui n'est pas perçu comme un signal par l'hexokinase, ne déclenche pas d'effet. La plus faible inhibition de *VvHT1* et de *VvHT5* par le 2DOG chez ces cellules semble en accord avec cette hypothèse. Cet analogue utilisé à une concentration de 0,9 mM génère probablement un signal moins marqué que le glucose et le mannose, tous deux utilisés à 10 mM. Tandis que chez les cellules non embryogènes, la forte inhibition de *VvHT1* et l'induction de *VvHT5* par le 2DOG suggèrent qu'un autre signal est perçu par la cellule. Etant donné que les ressources glucidiques des cellules non embryogènes ne sont pas totalement épuisées lorsque les traitements sont réalisés, il est fort probable que l'effet du 2DOG sur l'expression de *VvHT1* et *VvHT5* soit liée à l'inhibition d'une des voies du métabolisme du glucose. Il est possible que la perception du signal « glucose » concomitante à l'arrêt de sa métabolisation conduise à l'inhibition de *VvHT1* et à l'induction de *VvHT5*. L'inhibition de *VvHT1* par ce signal serait dépendante de l'expression de VvMSA contrairement à l'induction de *VvHT5*.

Pour résumer, il apparaît que *VvHT1* et *VvHT5* sont régulés à plusieurs niveaux, par le signal « glucose » probablement perçu *via* l'hexokinase 1 qui tient compte des ressources glucidiques de la cellule, à cette régulation se superpose probablement un contrôle lié aux besoins métaboliques de la cellule. *VvHT1* présente un niveau d'expression largement supérieur à l'ensemble des gènes de transporteur de monosaccharides (*VvHT* et *VvTMT*)

analysés chez les cellules de Vigne 41B embryogènes et non embryogènes. Cela suggère que parmi ces transporteurs il joue un rôle majeur dans l'absorption du glucose chez les cellules en conditions hétérotrophes.

En ce qui concerne *VvHT5*, le très faible niveau d'expression observé dans les cellules embryogènes et non embryogènes suggère que ce transporteur n'a que peu d'influence vis-à-vis de l'activité de transport d'hexoses chez ces cellules. Cependant, l'influence des effecteurs glucidiques sur son expression nous donne des informations concernant les signaux impliqués dans la régulation du gène de ce transporteur dans des organes où il est susceptible de jouer un rôle physiologique. *VvHT5* est fortement exprimé dans la graine en cours de développement et au niveau de la feuille mature (Afoufa-Bastien et al. 2010). Il est induit dans différentes conditions de stress biotiques (infection par les agents biotrophes et nécrotrophes) (Hayes et al. 2010; Afoufa-Bastien 2010) et abiotiques (contrainte hydrique sévère, blessure) (Medici 2010; Hayes et al. 2010). Dans ces contextes de stress, caractérisés entre autre par une augmentation des teneurs en glucose et en fructose, *VvHT5* est induit. Dans notre étude, le traitement par le glucose et le mannose ont tendance à inhiber *VvHT5* dans les 2 types cellulaires, tandis que le traitement par le 2DOG induit son expression chez les cellules non embryogènes mais l'inhibe chez les cellules embryogènes. Il apparaît donc que le seul signal « glucose » conduit à l'inhibition de *VvHT5* et que son induction en contexte de stress semble liée à un autre signal. Cette observation est en accord avec le fait que *VvHT5* est induit au cours de la phase sévère du stress hydrique au niveau des feuilles de Vigne (après 12 jours d'arrêt d'arrosage) alors que l'augmentation de la concentration en glucose à lieu au court de la phase plus précoce du stress (0 à 8 jours) (Medici 2010). Il a été suggéré que l'induction de *VvHT5,* en parallèle de celle de l'invertase pariétale *VvCwINV,* était impliquée dans la stimulation de la force de puits en réponse aux stress.

Etant donnée qu'un traitement par l'ABA induit une réponse similaire, ce mécanisme est probablement contrôlé par l'ABA (Hayes et al. 2010). Il est intéressant de constater que le traitement par le 2DOG chez les cellules non embryogènes induise une réponse similaire au niveau de la régulation de *VvHT5* à celle observée en réponse aux stress biotiques, abiotiques et au traitement par l'ABA. Une étude de transcriptomique par micro-array indique qu'un grand nombre de gènes (>100) sont régulés à la fois par le glucose et par l'ABA (Li et al. 2006). Ces résultats suggèrent que le glucose et l'ABA régulent probablement des processus physiologiques communs. Un lien entre la signalisation glucidique et celle de l'ABA, hormone impliquée dans la réponse aux stress, a déjà été démontré (Arenas-Huertero et al.

2000; Cheng et al. 2002; León and Sheen 2003). Plusieurs mutants d'Arabidopsis présentant un phénotype d'insensibilité au glucose sont mutés au niveau de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ABA (*ABA1*, *ABA2*, *ABA3*, *AAO3*) (Arenas-Huertero et al. 2000; Cheng et al. 2002; Dekkers et al. 2008) ou de la signalisation dépendante de l'ABA (*ABI2*, *ABI3*, *ABI4*, *ERA1*) (Arenas-Huertero et al. 2000; Dekkers et al. 2008). Ces études indiquent que la signalisation par le glucose est au moins en partie dépendante de celle de l'ABA. Les signalisations glucidique et de l'ABA convergent également au niveau de la protéine régulatrice SnRK1. La répression de la SnrK1 induit un phénotype similaire à celui des mutants insensibles à l'ABA (*abi*) chez des plantules de pois (Radchuk et al. 2006). En revanche, des plantules d'*Arabidopsis* surexprimant la SnRK1 sont hypersensibles à un traitement exogène par l'ABA (Jossier et al. 2009). Une partie des réponses de la signalisation de l'ABA passe donc par la SnRK1. L'ABA inhibe les phosphatases de type PP2C (protéines phosphatases 2C), elles-mêmes impliquées dans l'inactivation de la SnRK1. L'ABA participe donc à induire l'activité de la SnRK1 chez *Arabidopsis* (Rodrigues et al. 2013). D'une manière intéressante, l'activité de la SnRK1 est également induite par un traitement par le 2DOG chez des cellules d'*Arabidopsis* (Harthill et al. 2006). Il est donc possible que l'induction de *VvHT5* par l'ABA chez des plantes de Vigne et par le 2DOG chez les cellules non embryogènes soit toutes les deux liées à l'activation de la SnRK1.

1.3.2 Etude de l'activité d'absorption du glucose

L'approche de type pharmacologique a permis d'éclaircir les voies de la signalisation du glucose, impliquées dans la régulation de l'expression des gènes des transporteurs *VvHT1* et *VvHT5*. VvHT1 étant le transporteur d'hexoses le plus exprimé chez les cellules embryogènes et non embryogènes 41B, il joue probablement un rôle primordial dans l'absorption du glucose. Cependant, étant donné les différents niveaux de régulation possibles : transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel, la régulation de l'expression de *VvHT1* ne se traduit pas nécessairement par une modification de l'activité de transport du glucose. Nous avons donc souhaité élargir l'approche de type pharmacologique à l'analyse de l'activité d'absorption du glucose par les cellules embryogènes et non embryogènes. Afin de limiter le nombre de conditions à tester, seules les conditions présentant des différences marquées au niveau de la régulation de l'expression des gènes précédemment étudiés ont été analysées. C'est pourquoi nous n'avons pas étudié l'activité de transport chez les cellules *35S::VvMSA* qui ne présentait pas de différence par

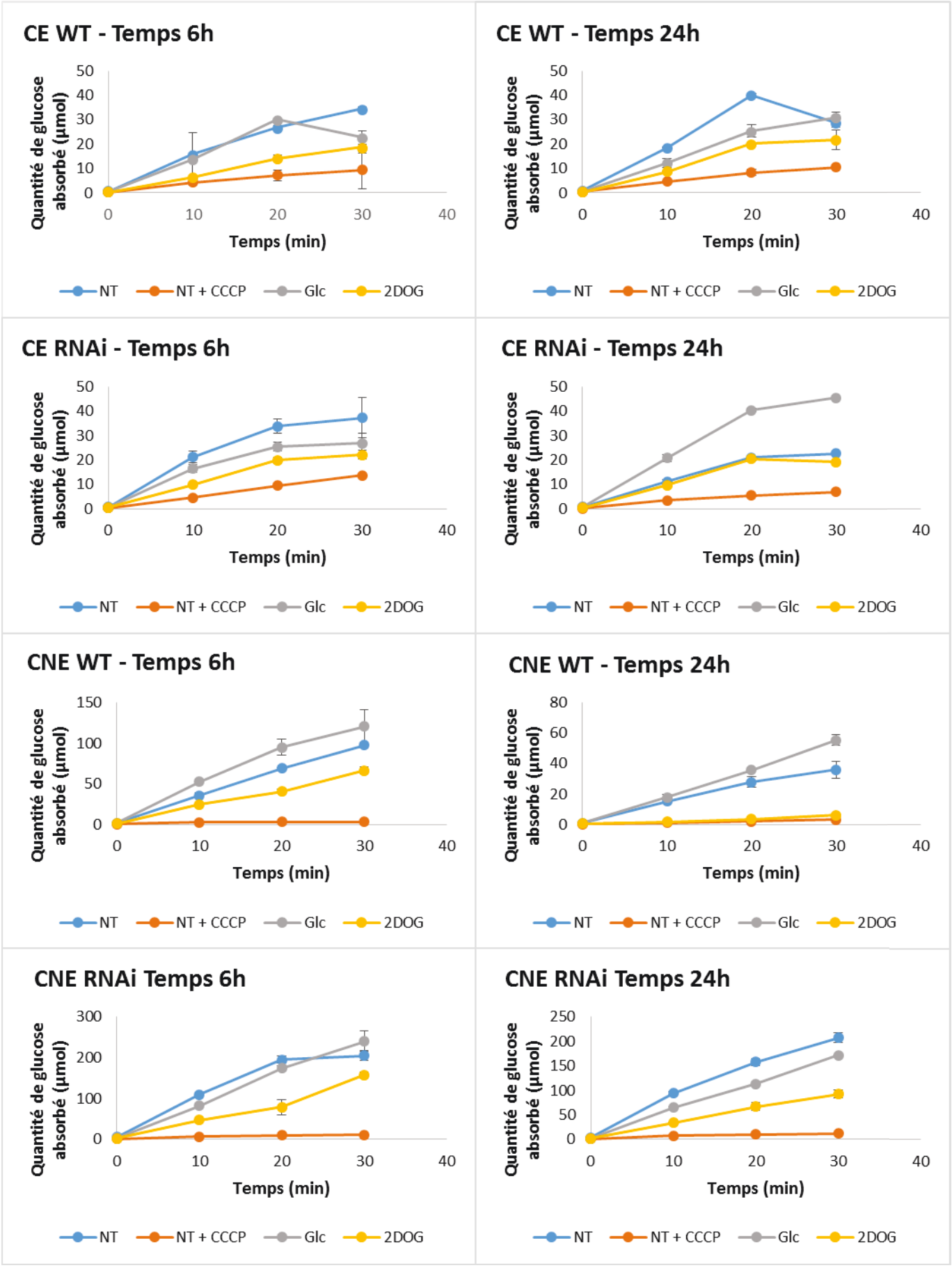


Figure 56 : Evolution de la quantité de glucose absorbée au cours du temps chez les cellules embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE), WT et 35S::VvMSA-RNAi. Les cellules embryogènes et non embryogènes sont prélevées à J8 après leur repiquage, incubées 24h dans les milieux GM° minimum et Gb ANA/BAP minimum respectivement. Les effecteurs glucidiques (glucose à 10 mM et 2DOG à 0,9 mM) sont alors ajoutés et le traitement prolongé pour 6h ou 24h. Le CCCP (20 µM final) est ajouté 10 min avant le glucose radiomarqué afin d'estimer la part du transport passif chez les cellules non traitées. Après l'ajout du mélange glucose radiomarqué/glucose froid (0,2mM/0,1µCi.mL^{-1}), des prélèvements sont effectués à 0, 10, 20 et 30 min (trois prélèvements de 750µl de suspension cellulaire). La quantité de glucose absorbée (en µmol) est évaluée en mesurant la quantité de ^{14}C-Glucose absorbée. Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de trois réplicats techniques, représentatifs de 2 de répétitions biologiques.

rapport au WT. De la même manière, le mannose, vraisemblablement métabolisé chez la Vigne et semblant générer une réponse similaire au glucose, n'a pas été utilisé. De même, les effets du 3OMG et du mannitol ne seront pas étudiés car ils n'induisent aucun effet significatif au niveau de l'expression de *VvHT1*. L'absorption du glucose a été analysée après 6h et 24h de traitement afin d'analyser l'évolution du transport au cours du temps. Initialement l'expression de *VvHT1* et *VvHT5* avait été mesurée après 6h de traitement pour les cellules embryogènes et 24h pour les cellules non embryogènes. Afin de pouvoir comparer l'expression de ces transporteurs à l'activité de transport du glucose des cellules, leur expression a par la suite été déterminée après 6h de traitement pour les cellules non embryogènes et 24h pour les cellules embryogènes.

1.3.2.1 Mise au point de l'expérimentation

1.3.2.1.1 Optimisation du protocole

Le protocole initialement utilisé pour analyser l'activité de transport des cellules incluait une étape de normalisation en pesant la quantité de cellules prélevée pour chaque point de la cinétique. Cette procédure nécessitait donc d'utiliser une grande quantité de cellules afin de pouvoir effectuer une mesure fiable (environ 30 mg de cellules en matière sèche par prélèvements). Au vu de la forte densité de la suspension utilisée pour l'expérimentation, des quantités relativement élevées du glucose radiomarqué étaient nécessaires. De plus, l'imprécision liée à la pesée des cellules induisait une variabilité importante entre les réplicats techniques. Afin de pallier ces différentes difficultés nous avons choisi de ne plus normaliser chaque échantillon par une pesée des cellules. Un dosage des protéines est réalisé sur plusieurs aliquots de la suspension utilisée pour chaque condition testée au cours de l'expérimentation. Cette méthode de normalisation nous a permis de très fortement réduire la quantité de cellules, et par la même occasion la concentration du glucose radiomarqué utilisée et la variabilité entre réplicats techniques.

1.3.2.1.2 Conditions d'analyse de l'activité d'absorption du glucose

Afin de pouvoir déterminer la vitesse de transport du glucose, il est primordial de se trouver dans des conditions pour lesquelles la quantité de glucose absorbée est proportionnelle au temps d'incubation des cellules dans le milieu contenant le glucose radiomarqué. Nous avons donc dans un premier temps réalisé un suivi de la quantité de glucose absorbé au cours du temps durant 30 min, à raison d'un prélèvement toutes les 10 min (Figure 56). La quantité

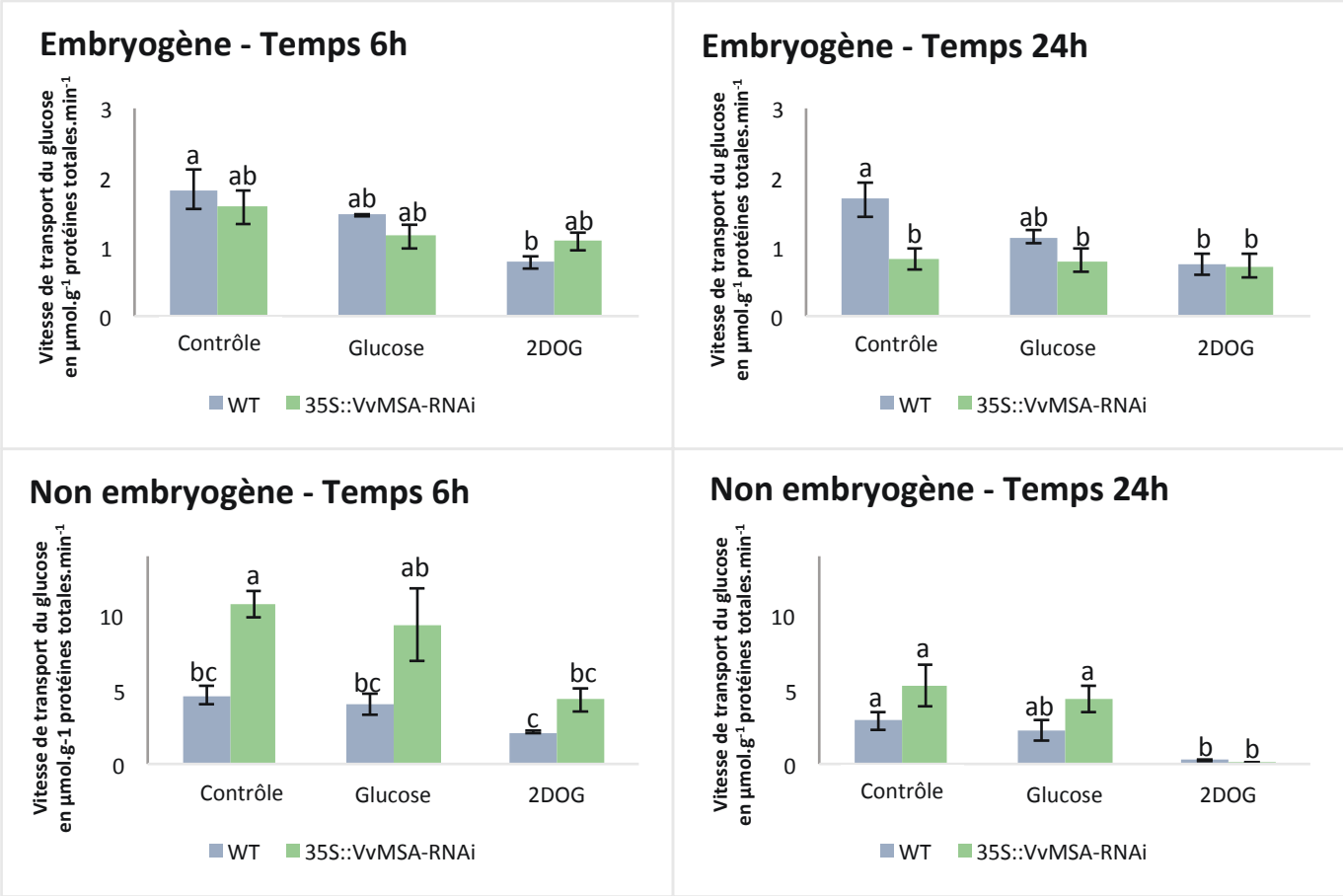


Figure 57 : Analyse de la vitesse de transport du glucose chez les cellules embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE), WT et 35S::VvMSA-RNAi. Les cellules embryogènes et non embryogènes sont prélevées à J8 après leurs repiquage, incubées 24h dans les milieux GM° minimum et Gb ANA/BAP minimum respectivement. Les effecteurs glucidiques (glucose à 10 mM et 2DOG à 0,9mM) sont alors ajoutés et le traitement prolongé pour 6h ou 24h. La vitesse du transport du glucose est évaluée sur la base de la vitesse du transport du ^{14}C-Glucose au cours des 20 minutes suivants l'ajout de l'effecteur (vitesse préalablement déterminée constante sur cet intervalle de temps dans nos conditions expérimentales). Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de 3 répétitions biologiques indépendantes. Les différentes lettres représentent les groupes déterminés comme significativement différents par une ANOVA à un facteur suivi du test HSD de Tukey (p value < 0,05).

de glucose absorbée par les cellules est proportionnelle au temps d'incubation suivant l'ajout du glucose radiomarqué, durant les 20 premières minutes, et ce pour l'ensemble des conditions analysées au cours de l'étude. Pour la suite de l'étude, la vitesse sera donc déterminée sur la base de la quantité de glucose absorbée par les cellules durant les 20 minutes suivant l'ajout du glucose radiomarqué. L'absorption du glucose observée est en majeure partie liée au transport actif. En effet l'utilisation du CCCP, qui abolit le transport actif, induit une très forte inhibition de l'absorption du glucose chez les cellules non traitées. La part du transport passif est très similaire chez les cellules embryogènes (25%) entre les cellules WT et RNAi et les deux temps analysés (6h et 24h). Il en est de même chez les cellules non embryogènes WT et RNAi à 6h et 24h (5%). Cependant la part du transport passif est plus importante chez les cellules embryogènes. Cette différence est probablement liée à leur morphologie. Celles-ci sont constituées de masse pro-embryonaires et le lavage précédent le prélèvement est sans doute moins efficace chez ces cellules que chez les cellules non embryogènes qui sont beaucoup plus fines. Du milieu contenant du glucose radiomarqué reste donc probablement piégé au sein de l'amas de cellules, ce qui augmente le transport passif.

1.3.2.2 Absorption du glucose par les cellules embryogènes

Pour rappel, le protocole expérimental consiste à placer les cellules dans un milieu minimum dépourvu de sucres et de nitrates pendant 24h, avant les traitements avec les effecteurs. Dans la condition contrôle et aux temps 6h et 24h de traitement, les cellules sont incubées dans un milieu minimum depuis 30h et 48h respectivement. Au temps 6h la vitesse du transport est similaire chez les cellules sauvages et les cellules *35S::VvMSA-RNAi* (Figure 57). Le traitement par le glucose semble amorcer une légère inhibition du transport chez les cellules sauvages et transformées (inhibition de 20 et 31% de la vitesse de transport respectivement). Le 2DOG inhibe plus fortement le transport chez les cellules sauvages (inhibition de 57% de la vitesse de transport) mais semble avoir un effet moins prononcé vis-à-vis des cellules *35S::VvMSA-RNAi* (inhibition de 31% de la Vitesse de transport).

Après 24h de traitement, l'activité de transport de glucose des cellules WT dans la condition témoin est sensiblement la même qu'après 6h de traitement (diminution de 8% de la vitesse de transport), en revanche celle des cellules *35S::VvMSA-RNAi* a fortement diminué (diminution de 48% de la vitesse de transport). Cette diminution de la vitesse de transport dans le traitement contrôle suggère que la carence en sucre et/ou en nitrate prolongée, induite par ces conditions, conduit à une capacité d'absorption du glucose plus faible.

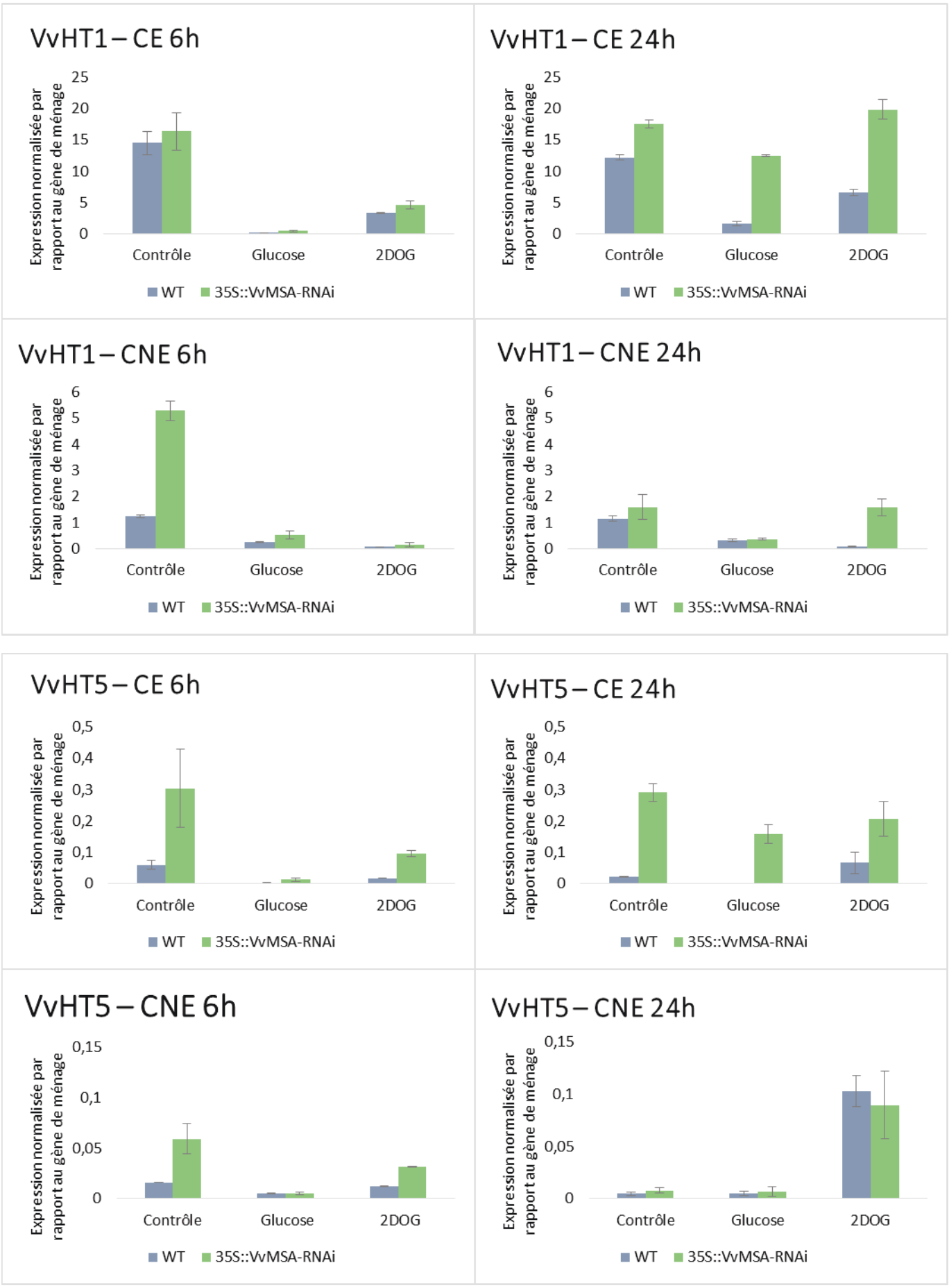


Figure 58 : Analyse de l'expression normalisée de *VvHT1* et *VvHT5* après 6h et 24h de traitement par le glucose ou le 2DOG. Les cellules embryogènes et non embryogènes sont prélevées à J8 après leur repiquage, incubées 24h dans les milieux GM° minimum et Gb ANA/BAP minimum respectivement. Les effecteurs glucidiques (glucose à 10 mM et 2DOG à 0,9 mM) sont alors ajoutés et le traitement prolongé pour 6h ou 24h. L'expression est normalisée par rapport au gène de ménage *Actine*. L'expression normalisée est calculée suivant la méthode du $2^{-\Delta Ct}$. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques pour les conditions CE 6h et CNE 24h et deux répétitions biologiques pour les conditions CE 24h et CNE 6h.

La tendance à l'inhibition du transport en réponse au traitement par le glucose observée au temps 6h, semble être plus prononcée après 24h de traitement chez les cellules sauvages (inhibition de 32% de la vitesse) tandis que chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi*, le transport, déjà plus faible dans la condition témoin, ne semble pas inhibé par le traitement « glucose » (inhibition de 3% de la vitesse de transport). L'inhibition du transport imposée par le traitement 2DOG sur les cellules embryogènes sauvages reste inchangée après 24h de traitement (56% d'inhibition de la vitesse contre 57% au temps 6h). En ce qui concerne les cellules embryogènes *35S::VvMSA*-RNAi, l'activité de transport chez les cellules traitées au 2DOG reste très proche de celle observée dans la condition contrôle (inhibition de 12% de la vitesse).

Dans l'ensemble, l'étude de l'absorption du glucose indique qu'il n'y a pas de corrélation directe entre la régulation de l'expression des gènes des transporteurs VvHT1 et VvHT5 et la régulation de l'activité de transport du glucose (Figure 58). De manière intéressante, la suspension de cellules embryogènes *35S::VvMSA-RNAi* semble moins « sensible » aux traitements glucose et 2DOG que la suspension sauvage, en particulier après 24h de traitement. Le transport est moins inhibé par les deux traitements, au temps 6h chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* que chez les cellules WT. Il est en revanche inhibé par les conditions de carence prolongée (condition « Contrôle » temps 24h) chez les cellules transformées mais pas chez les cellules sauvages. Les traitements par le glucose et le 2DOG à 24h n'ont alors plus d'effet sur la vitesse de transport des cellules *35S::VvMSA-RNAi* contrairement à la vitesse de transport observée chez les cellules sauvages. En ce qui concerne l'expression de *VvHT1* et de *VvHT5*, le glucose et le 2DOG ont des effets similaires après 6h de traitement chez les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi*. En revanche à 24h de traitement, l'inhibition des gènes de ces transporteurs par les sucres s'estompe chez les cellules transformées tandis qu'elle perdure chez les cellules sauvages. Cette observation suggère un effet plus transitoire des signaux liés à ces traitements chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* que chez les cellules sauvages. L'activité de transport étant inhibée par la carence prolongée chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* et pas chez les cellules WT, il est possible que les deux types cellulaires soient dans un état physiologique différent à l'issu des 30h dans le milieu minimum. Les signaux liés aux traitements par le glucose et le 2DOG ne seraient alors plus perçus dans l'état physiologique dans lequel se trouvent les cellules *35S::VvMSA-RNAi*. Cette observation suggère que la répression de VvMSA semble affecter plus largement le fonctionnement de la cellule au delà de son action sur la régulation de l'expression de *VvHT1*.

1.3.2.3 Absorption du glucose par les cellules non embryogènes

Premièrement, on observe une activité d'absorption du glucose significativement plus importante (>2 fois) dans la condition témoin, chez les cellules de la suspension non embryogène *35S::VvMSA-RNAi* comparée à la suspension sauvage après 6h de traitement (Figure 57). De même, l'expression de *VvHT1* et *VvHT5* est plus élevée chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* que chez les cellules sauvages (> 4 fois pour *VvHT1* et 3 fois pour *VvHT5*) (Figure 58).

Le traitement par le glucose semble induire une légère inhibition de l'absorption du glucose (diminution de 13% et 14% de la vitesse de transport chez les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi* respectivement) vis-à-vis des cellules non traitées. Cette diminution reste cependant beaucoup plus faible que celle de l'expression de *VvHT1* (> 4 fois et 9 fois pour les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi* respectivement), ou de *VvHT5* (> 2 fois et 4 fois pour les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi* respectivement).

Le traitement par le 2DOG conduit à une inhibition plus marquée du transport (diminution de 54 et 60% de la vitesse de transport chez les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi* respectivement) et de l'expression de *VvHT1* (> 15 fois et > 35 fois chez les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi* respectivement). L'expression de *VvHT5* est en revanche moins fortement inhibée par le 2DOG que par le glucose (> 2 fois). Après 24h de traitement, l'activité de transport a diminué dans la condition contrôle de même que chez les cellules traitées par le glucose et par le 2DOG. Cette diminution de la vitesse de transport dans le traitement contrôle suggère que la carence en sucres et/ou en nitrate induite par ces conditions inhibe l'absorption du glucose. L'expression de *VvHT1* diminue fortement chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* pour rejoindre le même niveau d'expression que celui des cellules WT à 6h et 24h tandis que l'expression de *VvHT5* est fortement réprimée à la fois chez les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi*. Il est intéressant de noter que le transport des cellules non embryogènes *35S::VvMSA-RNAi* est plus fortement affecté par la carence prolongée (diminution de 50% de la vitesse de transport) que celui des cellules sauvages (diminution de 36% de la vitesse de transport). L'inhibition du transport liée au traitement par le glucose est légèrement plus marquée au temps 24h qu'au temps 6h (inhibition de 23% et 19% de la vitesse de transport chez les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi* respectivement). L'expression de *VvHT1* et *VvHT5* est fortement réprimée et reste similaire à celle du temps 6h. Le traitement par le 2DOG aboli quasiment complétement l'absorption du glucose après 24h de traitement. La répression de

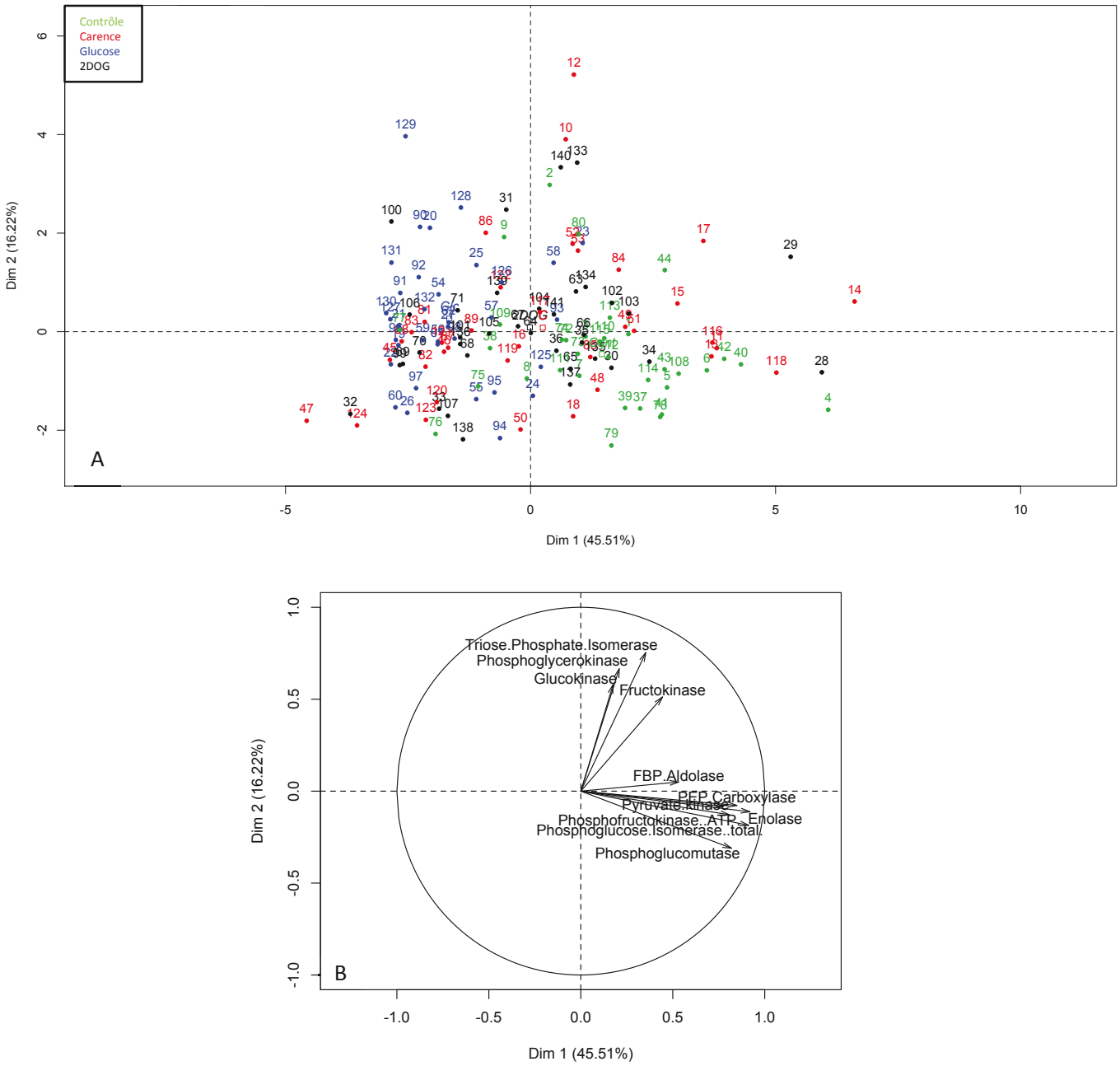


Figure 59 : Analyse en composante principale (ACP) des données de l'analyse des activités enzymatiques sur les cellules embryogènes WT et 35S::VvMSA-RNAi. Carte des individus (A) et cercle des corrélations (B). L'ensemble des données de l'analyse des activités enzymatiques concernant les cellules non embryogènes ont été utilisées. Les différentes conditions analysées sont : **Contrôle** - cellules transférées dans le milieu de culture complet, GM+ durant 30h ou 48h), **Carence** - cellules transférées dans le milieu GM°minimum durant 30h ou 48h), **Glucose** et **2DOG** (cellules transférés dans le milieu GM° miminum pour 24h et traitées par le glucose à 10 mM ou le 2DOG à 0,9 mM pendant 6h ou 24h). Trois répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées pour chaque condition analysée, avec au moins trois réplicats techniques par répétition.

l'expression de *VvHT1* imposée par le traitement 2DOG au temps 6 h est maintenue chez les cellules WT. En revanche, cette répression est levée chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi*, ce qui suggère que, comme dans le cas des cellules embryogènes, l'effet du 2DOG semble plus transitoire chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* que chez les cellules WT.

Dans l'ensemble, l'étude de l'absorption du glucose nous indique que la régulation de l'expression de *VvHT1* est découplée de la régulation du transport de glucose. Cette observation suggère que d'autres transporteurs d'hexoses contribuent au transport du glucose. Cette différence peut également s'expliquer par l'existence d'une régulation de VvHT1 à un autre niveau que le niveau transcriptionnel. Le transport est inhibé dans les conditions de carence en sucre/nitrate prolongée et par le 2DOG mais très peu par le traitement Glucose. Il semble donc que le transport du glucose soit majoritairement inhibé dans des conditions limitant ou perturbant le métabolisme glucidique. La répression de VvMSA affecte la régulation du transport dans les conditions de carence en sucre et en nitrate du traitement contrôle. Ces observations suggèrent que la répression de VvMSA affecte le métabolisme des cellules ou bien la perception et/ou la réponse de la cellule aux changements métaboliques.

1.3.3 Analyse des activités des enzymes de la glycolyse en conditions des traitements après la carence

Les résultats précédemment obtenus suggèrent que l'expression de *VvHT1* ainsi que l'activité de transport du glucose pourraient être influencés par l'état métabolique des cellules. Plus particulièrement, la répression de VvMSA semble influencer la réponse des cellules aux modifications du métabolisme glucidique. Pour cette raison, nous avons souhaité déterminer l'effet des différentes conditions expérimentales sur l'activité des enzymes du métabolisme du glucose analysées au chapitre I. Nous avons donc établi le profil des activités d'enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose chez les cellules embryogènes et non embryogènes WT et *35::VvMSA-RNAi*. Ces activités ont été mesurées dans les conditions de l'approche de type pharmacologique ayant permis d'observer les effets les plus marqués (Carence, Glucose, 2DOG) au cours des études portant sur l'expression génique et le transport du glucose. Afin d'évaluer l'impact du transfert des cellules sur le milieu minimum (Carence), nous avons également analysé les activités enzymatiques de cellules placées sur leur milieu de culture complet. Les conditions testées sont donc les suivantes : Témoin (cellules transférées dans le milieu de culture complet durant 30 ou 48h), Carence (cellules transférées dans le

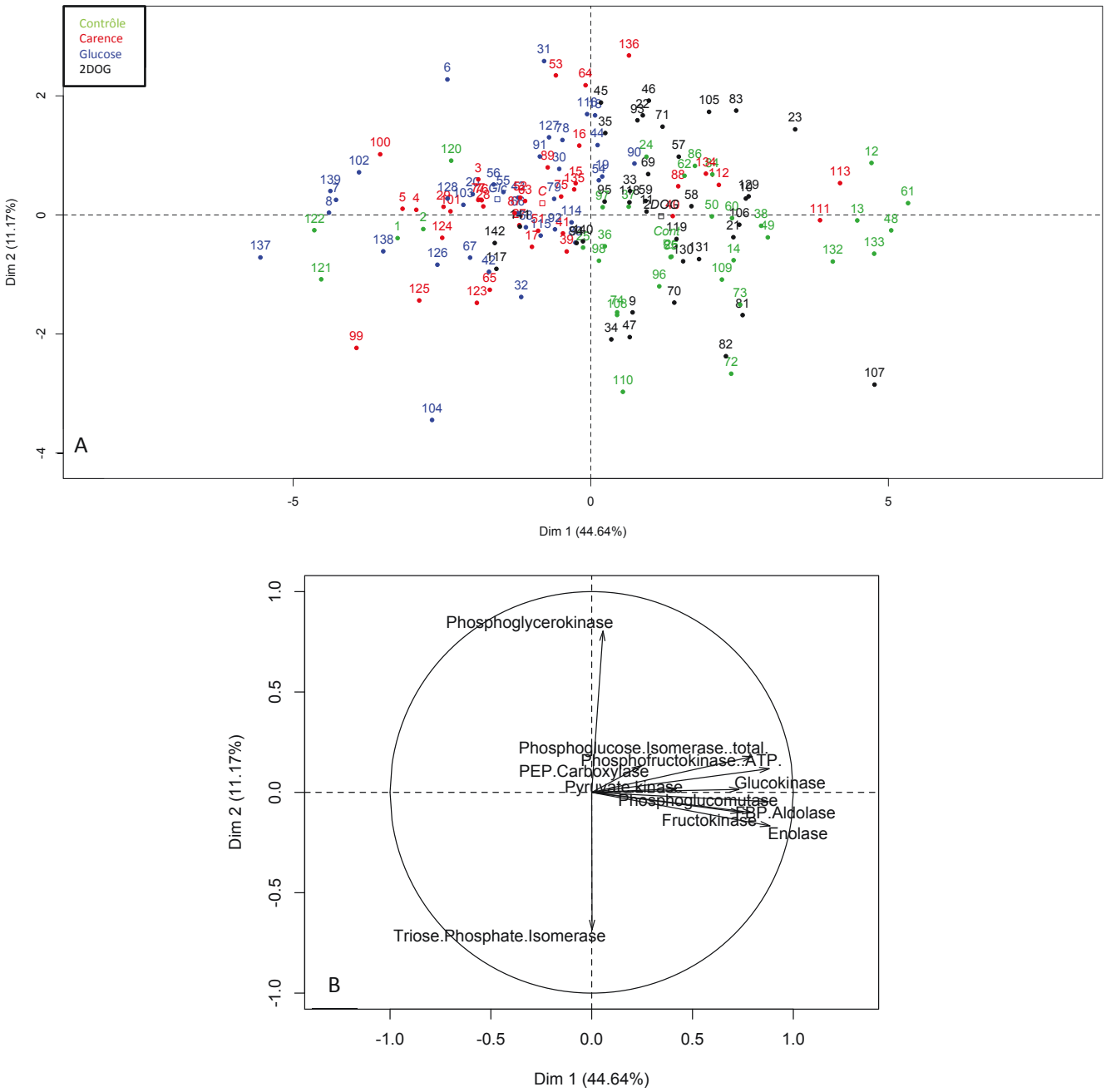


Figure 60 : Analyse en composante principale (ACP) des données de l'analyse des activités enzymatiques sur les cellules non embryogènes WT et 35S::VvMSA-RNAi. Carte des individus (A) et cercle des corrélations (B). L'ensemble des données de l'analyse des activités enzymatiques concernant les cellules non embryogènes ont été utilisées. Les différentes conditions analysées sont : **Contrôle** - cellules transférées dans le milieu de culture complet, Gb ANA/BAP durant 30h ou 48h), **Carence** - cellules transférées dans le milieu Gb ANA/BAP minimum durant 30h ou 48h), **Glucose** et **2DOG** (cellules transférés dans le milieu GB ANA/BAP minimum pour 24h et traitées par le glucose à 10 mM ou le 2DOG à 0,9 mM pendant 6h ou 24h). Trois répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées pour chaque condition analysée, avec au moins trois réplicats techniques par répétition.

milieu minimum durant 30 ou 48h), Glucose et 2DOG (cellules transférées dans le milieu minimum pour 24h et traitées par le glucose à 10 mM ou le 2DOG à 0,9 mM pendant 6h ou 24h). L'analyse des activités enzymatiques dans ces conditions expérimentales devrait nous permettre de déterminer l'impact des différents traitements employés au cours de l'approche de type pharmacologique, sur la reprogrammation des enzymes du métabolisme du glucose. Les buts de cette analyse sont plus particulièrement de caractériser les différences de réponses des cellules embryogènes et non embryogènes à ces traitements, et de déterminer l'impact de la répression de VvMSA sur la reprogrammation des activités maximales des enzymes du métabolisme du glucose.

1.3.3.1 Influences de la répression de VvMSA, des traitements et du temps d'incubation sur les activités enzymatiques

Dans un premier temps, une ACP pour chaque type cellulaire (embryogène : Figures 59 A et B et non embryogène : Figures 60 A et B) ont été réalisées afin de dégager une tendance générale au niveau de l'effet des traitements sur l'activité maximale des enzymes. Puis une ANOVA à plusieurs facteurs a été réalisée afin de déterminer plus précisément quels paramètres influaient significativement sur l'activité maximale des différentes enzymes chez les deux types cellulaires (Tableau 3). Une ANOVA à un facteur suivi du test de Tukey a ensuite été réalisée afin de déterminer les différences significatives pour chaque condition testée (Figure 61)

1.3.3.1.1 Cellules embryogènes

Le 1er axe de l'ACP réalisée expliquant 45,51% de la variance permet de séparer les groupes formés par les individus correspondant à la condition « Contrôle » de ceux correspondant à la condition « Glucose » (Figure 59 A). Tandis que les individus correspondant aux conditions « Carence » et « 2DOG » sont dispersés sur l'ensemble de la carte. Cela semble indiquer que les conditions « Carence » et « 2DOG » n'ont que peu d'influence sur l'activité des enzymes de la glycolyse chez les cellules embryogènes.

Le 1er axe est corrélé à l'activité de la majorité des enzymes (PEPc ; PK ; ATP-PFK ; PGI ; PGM ; FBP Aldolase) (Figure 59 B). Il semble donc, d'une manière générale, que les cellules dans la condition « Contrôle » soient caractérisées par une plus forte activité maximale de ces enzymes que les cellules dans la condition « Glucose ».

Tableau 3 : ANOVA à plusieurs facteurs sur les données des activités maximales des enzymes de la glycolyse pour chaque type cellulaire (cellules embryogènes et non embryogènes). Les différentes facteurs analysés sont le **génotype** : WT ou 35S::VvMSA-RNAi ; le **traitement** : Témoin (cellules transférées dans le milieu de culture complet durant 30h ou 48h), Carence (cellules transférées dans le milieu minimum durant 30h ou 48h), Glucose et 2DOG (cellules transférées dans le milieu minimum pour 24h et traitées par le glucose à 10 mM ou le 2DOG à 0,9 mM pendant 6h ou 24h) ; le **temps** du traitement : 6h ou 24h ; ainsi que **l'interaction entre ces différents facteurs**. Les différences significatives sont indiquées par : * - p value < 0,05 ; ** - p value < 0,01 ; *** - p value < 0,001.

Cellules embryogènes							
Enzyme	**Génotype**	**Traitement**	**Temps**	**Génotype X Temps**	**Génotype X Traitement**	**Temps X Traitement**	**Génotype X Temps X Traitement**
Glucokinase						***	
Fructokinase				***			
Phosphofructokinase		***	**	*			**
Phosphoglucomutase		***		*			
Phosphoglucose Isomérase		***	**	*			*
FBP Aldolase		*	*				
Triose Phosphate Isomérase							
Phosphoglycerokinase							
Enolase		***	**				
Pyruvate Kinase		**					
PEP Carboxylase		***	***				

Cellules non embryogènes							
Enzyme	**Génotype**	**Traitement**	**Temps**	**Génotype X Temps**	**Génotype X Traitement**	**Temps X Traitement**	**Génotype X Temps X Traitement**
Glucokinase	***	***					
Fructokinase		***	*			**	
Phosphofructokinase	*	***				*	
Phosphoglucomutase		***					*
Phosphoglucose Isomérase	***	***					
FBP Aldolase		***					
Triose Phosphate Isomérase							
Phosphoglycerokinase	**						
Enolase		***				*	*
Pyruvate Kinase		***					
PEP Carboxylase							

D'après l'ANOVA à plusieurs facteurs, il apparaît que chez les cellules embryogènes, la répression de VvMSA n'a pas d'effet significatif sur l'activité des différentes enzymes (Tableau 3). Il y a en revanche un effet très significatif (p value < 0,001) lorsque l'on considère l'interaction entre le génotype et le temps d'incubation vis-à-vis de l'activité de la FruK et dans une moindre mesure pour l'ATP-PFK, la PGI et la PGM (p value < 0,05). Cela signifie que l'activité de ces enzymes évolue d'une manière significativement différente entre 6h et 24h de traitement chez les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi* (Figure 61). En ce qui concerne la FruK et la PGM, leurs activités diminuent fortement entre 6h et 24h chez les cellules sauvages mais pas chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* dans la condition « Carence ». De même, les activités de la PGI et de la PFK diminuent entre 6h et 24h chez les cellules sauvage mais pas chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* dans les conditions « Carence » et « 2DOG ».

Les traitements ont un effet très significatif (p value < 0,001) sur l'activité de l'ATP-PFK, de la PGM, de la PGI, de l'enolase, de la PEPc (Tableau 3). Ils ont également un effet significatif sur l'activité de la PK (p value < 0,01) et de la FBP aldolase (p value < 0,05). Les activités de l'ATP-PFK, de la PGM, de la PGI et de l'enolase sont inhibées par le traitement par le glucose (Figure 61). L'activité de la PEPc est, elle, inhibée dans les conditions Carence, Glucose, et 2DOG au temps 24h et dès le temps 6h chez les cellules *35S::VvMSA*-RNAi mais pas chez les cellules sauvages (Figure 61). Une étude réalisée sur des cultures cellulaires d'agrume rapporte que l'activité de la PEPc est fortement induite lorsque le glycérol est substitué au saccharose dans le milieu de culture cellulaire. Il est donc possible que l'inhibition observée dans les conditions Carence, Glucose et 2DOG soit liée à l'absence de glycérol dans le milieu minimum utilisé pour ces traitements contrairement au milieu de culture complet (Contrôle). Il y a également un effet très significatif (p value < 0,001) au niveau de l'interaction entre le traitement et le temps de traitement vis-à-vis de l'activité de la GluK (Tableau 3).

La durée du traitement à un effet très significatif vis-à-vis de l'expression de la PEPc (p value < 0,001) et dans une moindre mesure vis à vis de la PFK, de la PGI, de l'enolase (p value < 0,01) et de la FBP aldolase (p value < 0,05) (Tableau 3). L'activité de la PEPc diminue entre le temps 6h et le temps 24h, principalement pour les traitements « Carence », « Glucose » et « 2DOG » pour lesquels les milieux utilisés sont dépourvus de glycérol (Figure 61). En ce qui concerne la PFK, la PGI et l'enolase, l'effet de la durée du traitement est moins

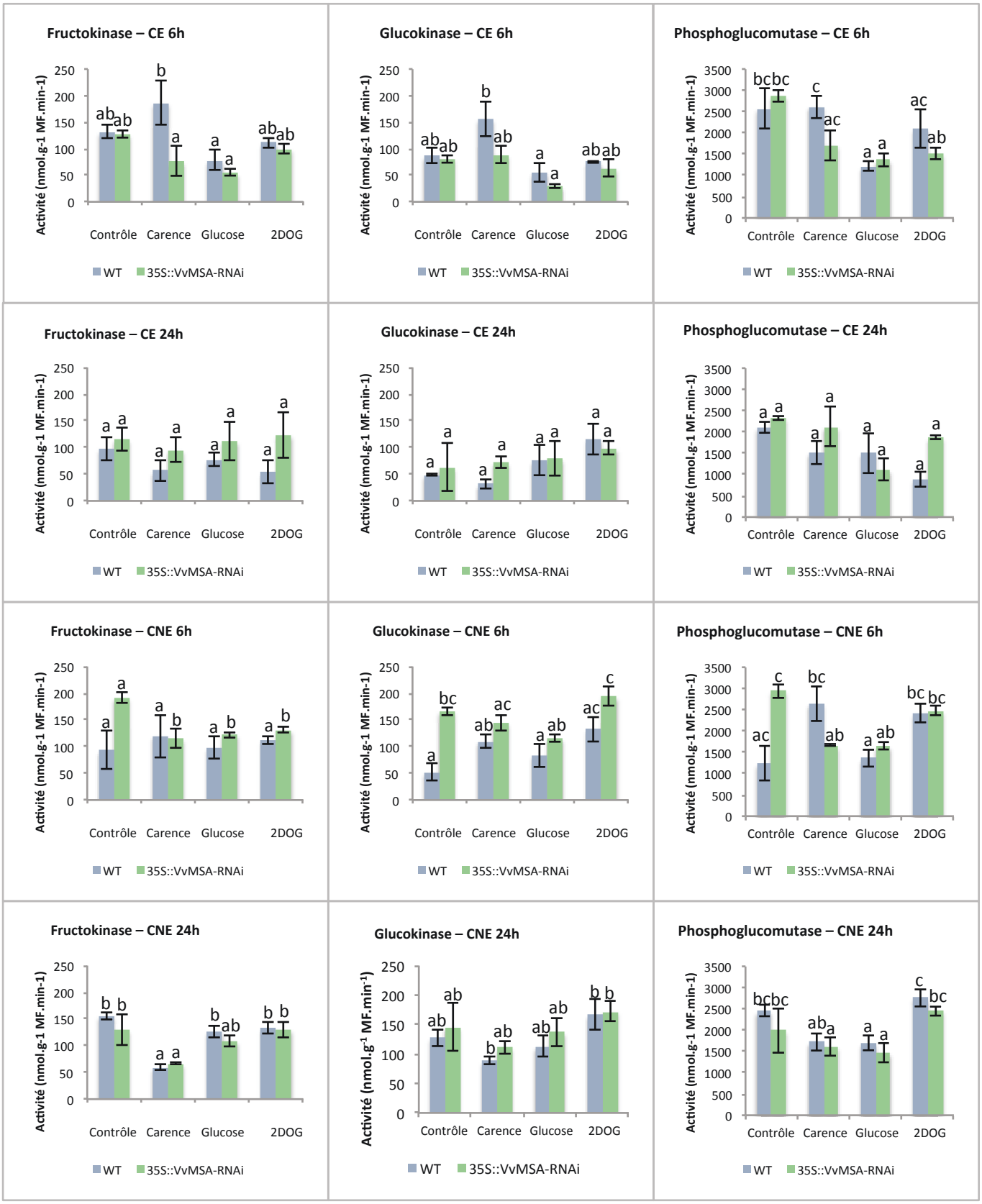


Figure 61 : Analyse des activités des enzymes en lien avec la glycolyse chez les cellules embryogènes (CE) et non embryogènes (CNE) WT et *35S::VvMSA*-RNAi. Les différentes conditions analysées sont : Contrôle (cellules transférées dans le milieu de culture complet, GM+ ou Gb ANA/BAP, durant 30h ou 48h), Carence (cellules transférées dans le milieu minimum durant 30h ou 48h), Glucose et 2DOG (cellules transférés dans le milieu miminum pour 24h et traitées par le glucose à 10 mM ou le 2DOG à 0,9 mM pendant 6h ou 24h). Les résultats présentés correspondent à la moyenne (± erreur standard) de trois répétitions biologiques. Pour chaque répétition biologique, au moins trois réplicats techniques ont été réalisés. Les différentes lettres représentent les groupes déterminés comme significativement différents par une ANOVA à un facteur suivi du test HSD de Tukey (p value < 0,05).

clair. L'activité de l'aldolase en revanche semble diminuer dans la plupart des conditions entre le temps 6h et le temps 24h (Figure 61).

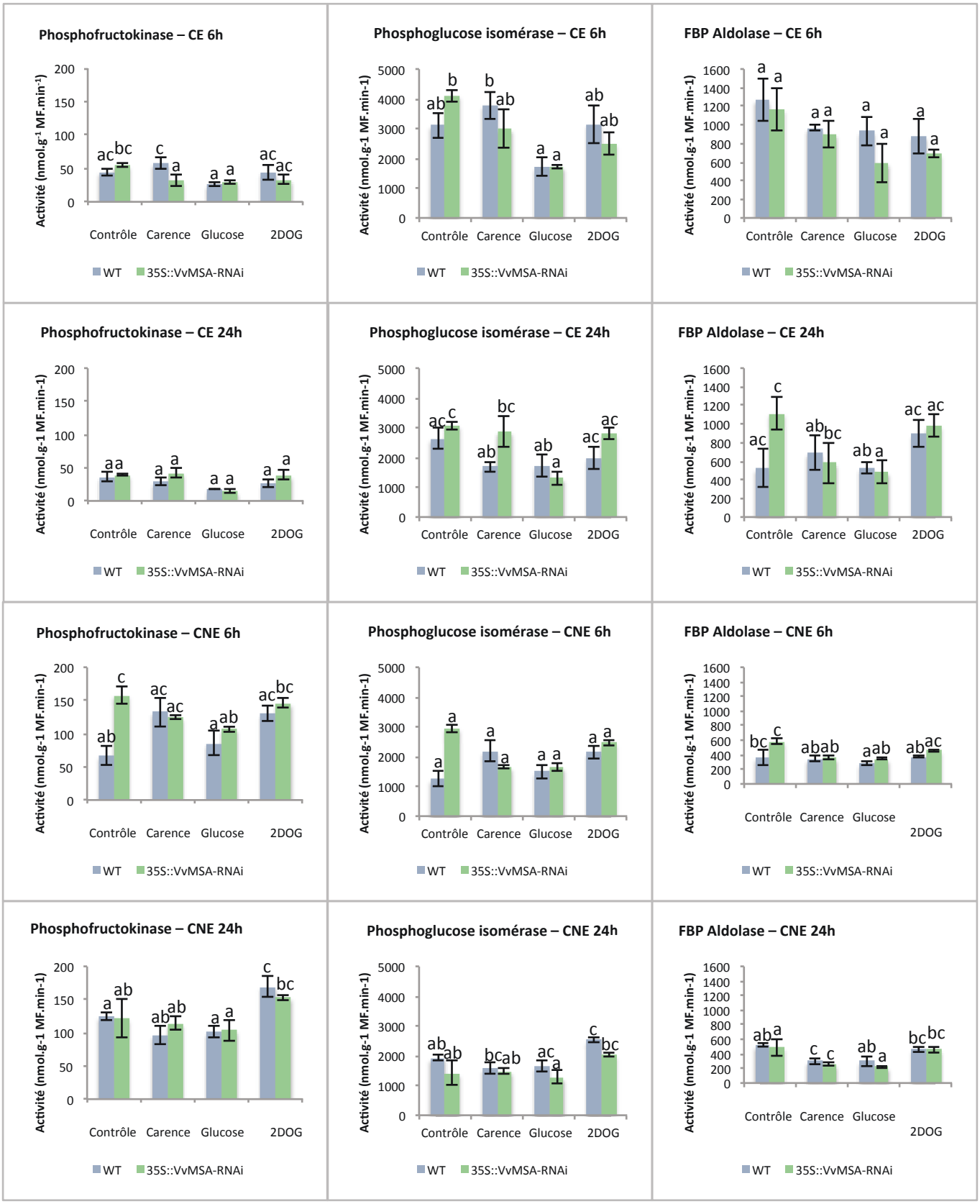
1.3.3.1.2 Cellules non embryogènes

Le 1er axe de l'ACP réalisée expliquant 44,64% de la variance permet de séparer le groupe formé par les individus correspondant aux conditions « Contrôle » et « 2DOG » d'une part et « Carence » et « Glucose » d'autre part (Figure 60). Même si la séparation n'est pas totalement tranchée, cela suggère que le profil des activités maximales enzymatiques des cellules dans la condition « Contrôle » se rapproche de celui des cellules dans la condition « 2DOG » et montre des différences vis-à-vis du profil des cellules dans les conditions « Carence » et « Glucose ».

Le 1er axe est positivement corrélé à l'activité de l'ensemble des enzymes à l'exception de la PGK et de la TPI. Cela signifie que la plupart des enzymes tendent à avoir une activité maximale plus élevée chez les cellules dans les conditions « Contrôle » et « 2DOG » que les chez les cellules dans les conditions « Carence » et « Glucose »

Chez les cellules non embryogènes, la répression de VvMSA a un effet très significatif vis-à-vis de l'activité maximale de la GluK et de la PGI (p value < 0,001), de la PGK (p value < 0,01) et de la PFK (p value < 0,05) (Tableau 3). L'activité de la GluK, de la PGI et de la PFK est plus élevé chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* que chez les cellules sauvages au temps 6h dans la condition « Contrôle » (Figure 61). On n'observe en revanche pas de différence significative au niveau de l'activité de ces enzymes entre les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi* dans les conditions « Carence », « Glucose » et « 2DOG » pour ce même temps et dans l'ensemble des conditions au temps 24h (Figure 61).

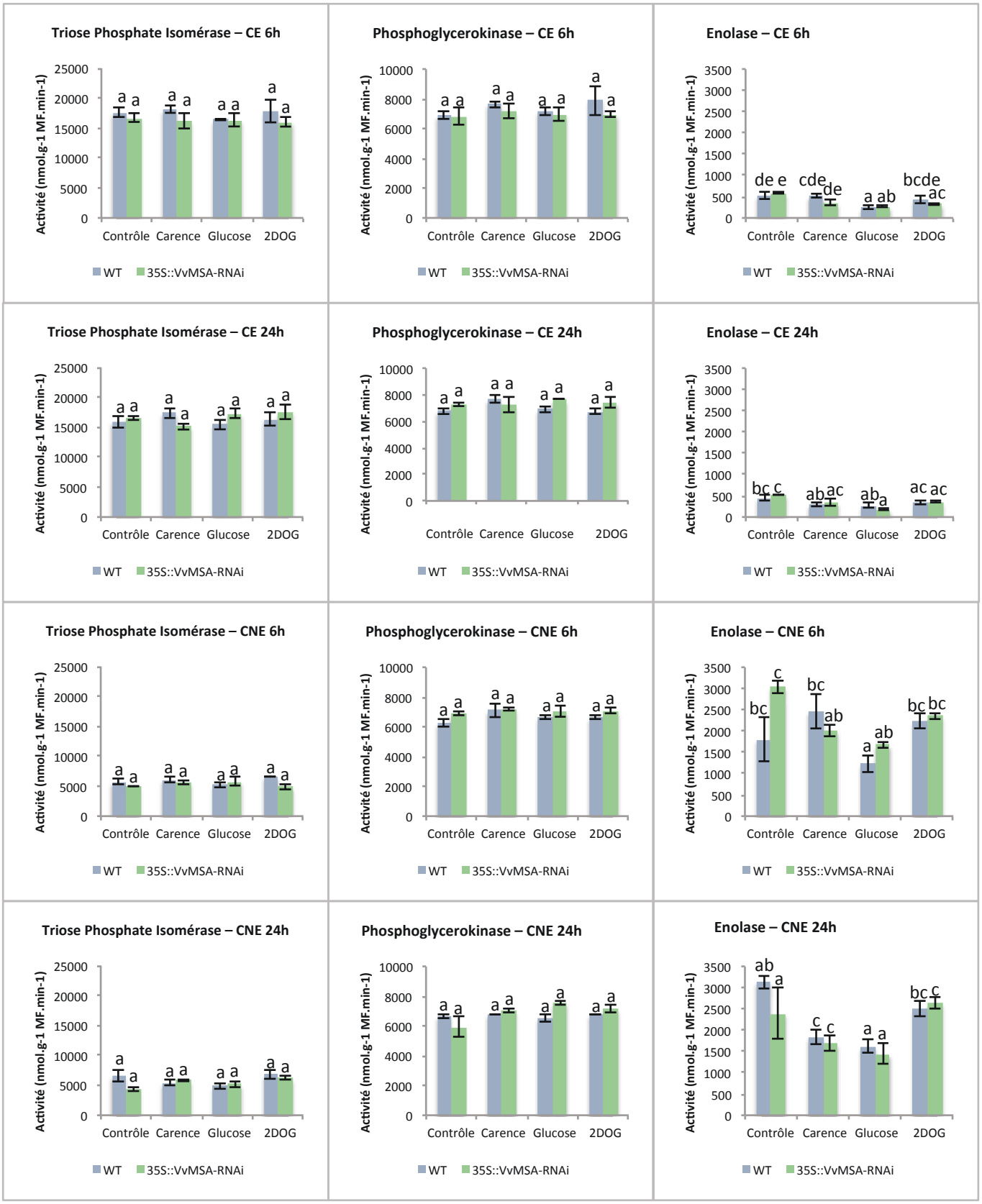
Les traitements ont un effet très significatif (p value < 0,001) sur l'ensemble des activités enzymatiques mise à part la PGK et la TPI (Tableau 3). Les différences les plus marquées sont observées après 24h de traitement. L'activité de la FruK est inhibée uniquement dans la condition « Carence ». Il en est de même pour la GluK mais d'une manière moins significative (Figure 61). Les activités de la PGM, de l'aldolase et de l'enolase sont inhibées par les traitements « Carence » et « Glucose » mais pas par le traitement « 2DOG » ni dans la condition « Contrôle ». L'activité de la PFK et de la PGI est en revanche induite par le traitement « 2DOG » mais pas affectée significativement par les autres conditions. L'activité de la PK est, elle, inhibée par les traitements « Glucose » et « 2DOG » et n'est pas affectée


Phosphofructokinase – CE 6h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
Phosphoglucose isomérase – CE 6h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
FBP Aldolase – CE 6h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
Phosphofructokinase – CE 24h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
Phosphoglucose isomérase – CE 24h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
FBP Aldolase – CE 24h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
Phosphofructokinase – CNE 6h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
Phosphoglucose isomérase – CNE 6h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
FBP Aldolase – CNE 6h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
Phosphofructokinase – CNE 24h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
Phosphoglucose isomérase – CNE 24h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
FBP Aldolase – CNE 24h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi

dans les autres conditions. L'activité de la PEPc semble légèrement inhibée par les traitements « Carence » et « Glucose » mais pas dans les autres conditions.

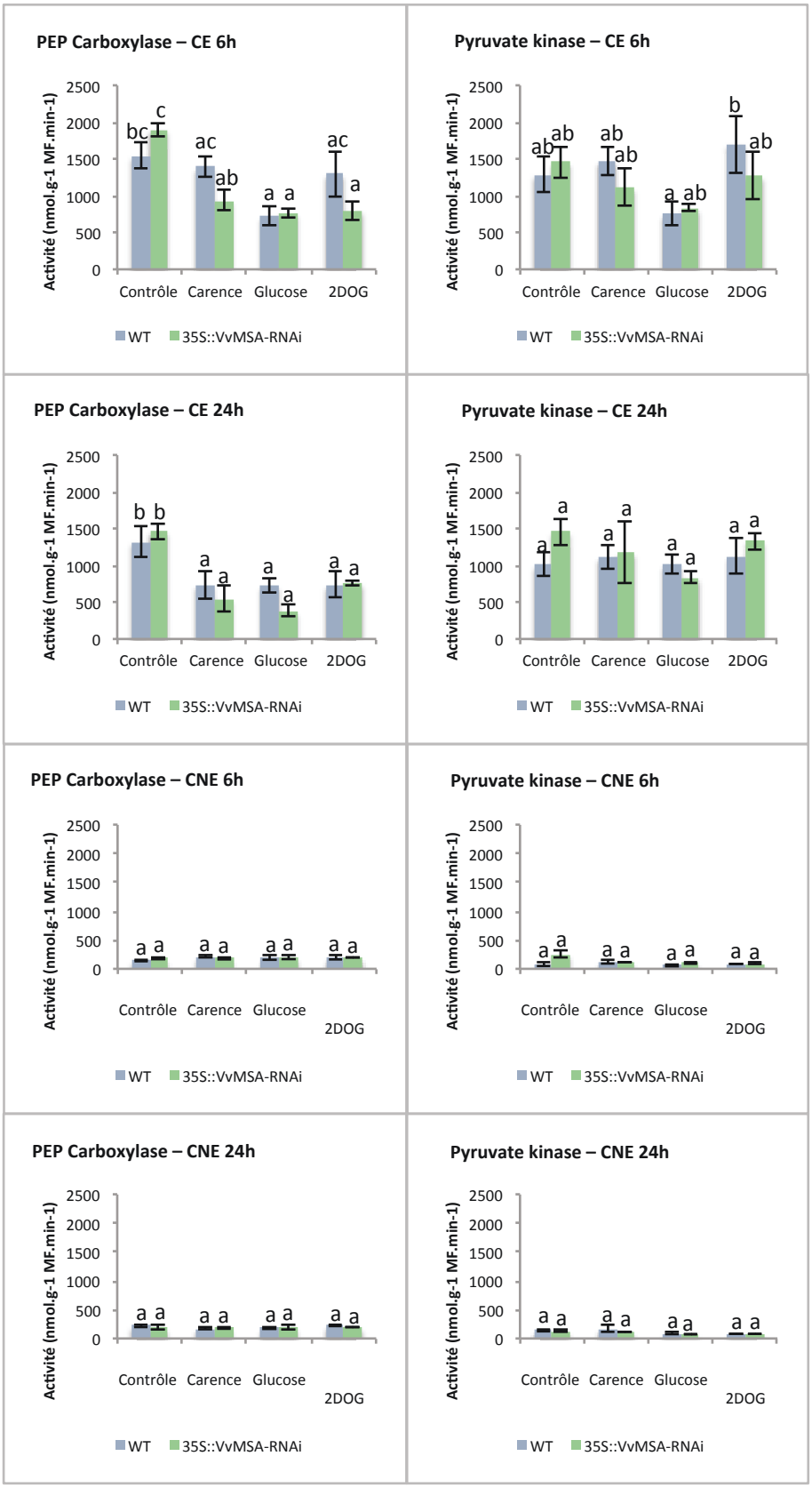
Le fait que la fructokinase, et dans une moindre mesure la GluK, soient inhibées dans la condition « Carence » uniquement mais pas dans les autres conditions suggère que la régulation de leur activité maximale soit liée à une voie dépendante de la signalisation par l'hexokinase. En effet, le fait que l'analogue non métabolisable « 2DOG » reproduise l'effet du glucose suggère que le métabolisme n'est pas directement impliqué dans la régulation de la synthèse de cette enzyme. De même la PK est inhibée d'une manière similaire par le glucose et par le 2DOG ce qui suggère que la régulation de la synthèse de cette enzyme passe par une voie dépendante de la signalisation dépendante d'HXK1. Cependant son activité maximale est équivalente dans la condition « Carence » et dans la condition « Contrôle ». Dans cette dernière condition, les cellules ont à disposition du saccharose qui est rapidement hydrolysé en glucose + fructose. Le fait que l'activité maximale de la PK ne soit pas affectée dans la condition « Contrôle » signifie probablement qu'un autre élément présent dans le milieu complet et absent dans le milieu minimum (utilisé pour les traitements « Glucose » et « 2DOG ») a un effet antagoniste vis-à-vis de l'inhibition opérée par le glucose. Sachant que la signalisation dépendante du nitrate a un effet antagoniste vis-à-vis de celle dépendante du glucose (Stitt 1999), il est possible que le nitrate présent dans le milieu de culture complet soit responsable de l'absence d'inhibition de l'activité maximale de la PK dans la condition « Contrôle ».

La PGM, l'aldolase et l'enolase ont une activité maximale inférieure lorsque les cellules sont transférées dans le milieu minimum (condition « Carence ») comparé au milieu complet (condition « Contrôle »). L'apport de glucose à 10 mM ne modifie pas l'effet du transfert des cellules sur le milieu minimum, ce qui suggère que la signalisation dépendante de l'hexokinase n'est pas impliquée dans la régulation de l'activité maximale de ces enzymes. En revanche, l'apport de 2DOG à 0,9 mM permet de maintenir l'activité maximale de ces enzymes à un niveau comparable à celui observé dans la condition témoin. Par ailleurs, le 2DOG induit spécifiquement l'activité maximale de la PGI et de la PFK. Il apparaît donc que cet analogue est perçu différemment du glucose et induit une reprogrammation des activités maximales d'une partie des enzymes de la glycolyse. Ces observations sont en adéquation avec l'hypothèse selon laquelle le traitement par cet analogue perturbe le métabolisme du glucose chez les cellules non embryogènes. Au contraire, chez les cellules embryogènes,


Triose Phosphate Isomérase – CE 6h
Phosphoglycerokinase – CE 6h
Enolase – CE 6h
Triose Phosphate Isomérase – CE 24h
Phosphoglycerokinase – CE 24h
Enolase – CE 24h
Triose Phosphate Isomérase – CNE 6h
Phosphoglycerokinase – CNE 6h
Enolase – CNE 6h
Triose Phosphate Isomérase – CNE 24h
Phosphoglycerokinase – CNE 24h
Enolase – CNE 24h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
Contrôle
Carence
Glucose
2DOG
WT
35S::VvMSA-RNAi

l'activité maximale des enzymes chez les cellules traitées par le 2DOG ne diffère pas significativement par rapport aux cellules dans la condition « Carence ».

Dans l'ensemble, ces observations suggèrent que l'apport de 2DOG n'a pas autant d'impact sur le métabolisme glucidique chez les cellules embryogènes que chez les cellules non embryogènes. Chez les cellules embryogènes, le traitement ayant l'effet le plus significatif au niveau des activités des enzymes de la glycolyse est le traitement « glucose ». Les cellules embryogènes sont caractérisées par de faibles teneurs en glucose, aussi bien au niveau de leur milieu de culture que dans les cellules. Ceci est dû au fait que le maltose présent dans leur milieu de culture est hydrolysé beaucoup plus lentement que le saccharose présent dans le milieu de culture des cellules non embryogènes. Dans ces conditions de faible disponibilité en glucose, la métabolisation du glycérol est probablement favorisée. C'est pourquoi l'apport de glucose à 10 mM, induit une modification marquée au niveau du métabolisme de ces cellules. La répression de VvMSA ne semble pas avoir d'effet significatif vis-à-vis de l'activité maximale des enzymes de la glycolyse chez les cellules embryogènes. En revanche, chez les cellules non embryogènes, il est intéressant de noter que l'activité maximale des enzymes de la partie supérieure de la glycolyse (FruK, GluK, PGI, PFK) et de la PGM tendent à être plus élevées chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* que chez les cellules WT aux temps 6h de traitement dans la condition contrôle. En revanche, au temps 24h de traitement cette différence s'estompe. Cette observation indique potentiellement une différence au niveau de la vitesse à laquelle les 2 suspensions cellulaires adaptent leur métabolisme à une modification de la disponibilité en éléments nutritifs dans le milieu extérieur. Dans la condition « Contrôle », les cellules sont en effet transférées de leur milieu de culture au sein duquel la quasi-totalité des sucres a été consommée vers un milieu de culture frais comportant une forte concentration en saccharose.


PEP Carboxylase – CE 6h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
2500
2000
1500
1000
500
0
bc c
ac ab
a a
ac a
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
Pyruvate kinase – CE 6h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
ab ab
ab ab
a ab
b ab
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
PEP Carboxylase – CE 24h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
b b
a a
a a
a a
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
Pyruvate kinase – CE 24h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
a a
a a
a a
a a
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
PEP Carboxylase – CNE 6h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
a a
a a
a a
a a
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
Pyruvate kinase – CNE 6h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
a a
a a
a a
a a
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
PEP Carboxylase – CNE 24h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
a a
a a
a a
a a
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi
Pyruvate kinase – CNE 24h
Activité (nmol.g-1 MF.min-1)
a a
a a
a a
a a
Contrôle Carence Glucose 2DOG
WT 35S::VvMSA-RNAi

1.4 Chapitre 4 : Analyse du protéome nucléaire des cellules embryogènes sauvages et réprimées pour VvMSA

1.4.1 Conception et mise en œuvre de l'analyse protéomique

La dualité fonctionnelle des ASR, en tant que chaperonnes, protéines de protection directe des macromolécules biologiques en condition de stress et en tant que facteurs de transcription non traditionnels, impliqués dans le recrutement des complexes de régulation de l'expression génique, soulève toujours la question de leurs fonctions physiologiques. Malgré les preuves apportées par différentes approches (retardement sur gel - EMSA, simple hybride – Yeast one hybrid, immunoprécipitation de la chromatine - ChIP) et chez plusieurs espèces (Tomate, Vigne, Riz) pour les interactions des ASR avec l'ADN (Gilad et al, 1997; Cakir et al, 2003; Zhang et al, 2015), leurs rôles biologiques dans le noyau restent difficiles à appréhender. Les ASR permettent le maintien de certaines activités enzymatiques du métabolisme glucidique en conditions de stress abiotiques (Konrad and Bar-Zvi 2008; Hsu et al. 2011) et pourraient donc être des cibles d'une sélection adaptative liée à la disponibilité en eau, à l'image de l'ASR2 chez la Tomate (Frankel et al, 2003). Dans ce contexte, le choix de l'étude du protéome nucléaire des cellules embryogènes WT et *35S::VvMSA-RNAi* nous paraît judicieux. Cette partie de la thèse est réalisée dans le cadre d'un projet européen bilatéral PRIME-XS Project 1070 entre notre équipe de l'Université de Poitiers et l'Université de Zürich sur la plateforme de Functional Genomic Center Zürich – FGCZ. Afin de mettre en œuvre le projet, nous avons choisi la technologie d'analyse protéomique quantitative par marquage iTRAQ (*isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification*). Cette approche, appliquée dans sa version iTRAQ 8-plex, se prête parfaitement à la comparaison quantitative des protéines nucléaires des cellules sauvages - exprimant l'ASR de la vigne - et *35S::VvMSA-RNAi* - privées de la protéine étudiée-, avec quatre répétitions biologiques indépendantes pour chaque population cellulaire.

La première étape a consisté en l'isolement des noyaux à partir des deux types cellulaires. À cette fin, nous avons appliqué avec modifications une méthode classique de purification des noyaux sur coussins de saccharose avec différentes densités (Muller et al, 1980). La fraction des noyaux obtenue est soumise à vérification par observation en microscopie après coloration avec le réactif de Hoechst, mettant en évidence la pureté de la

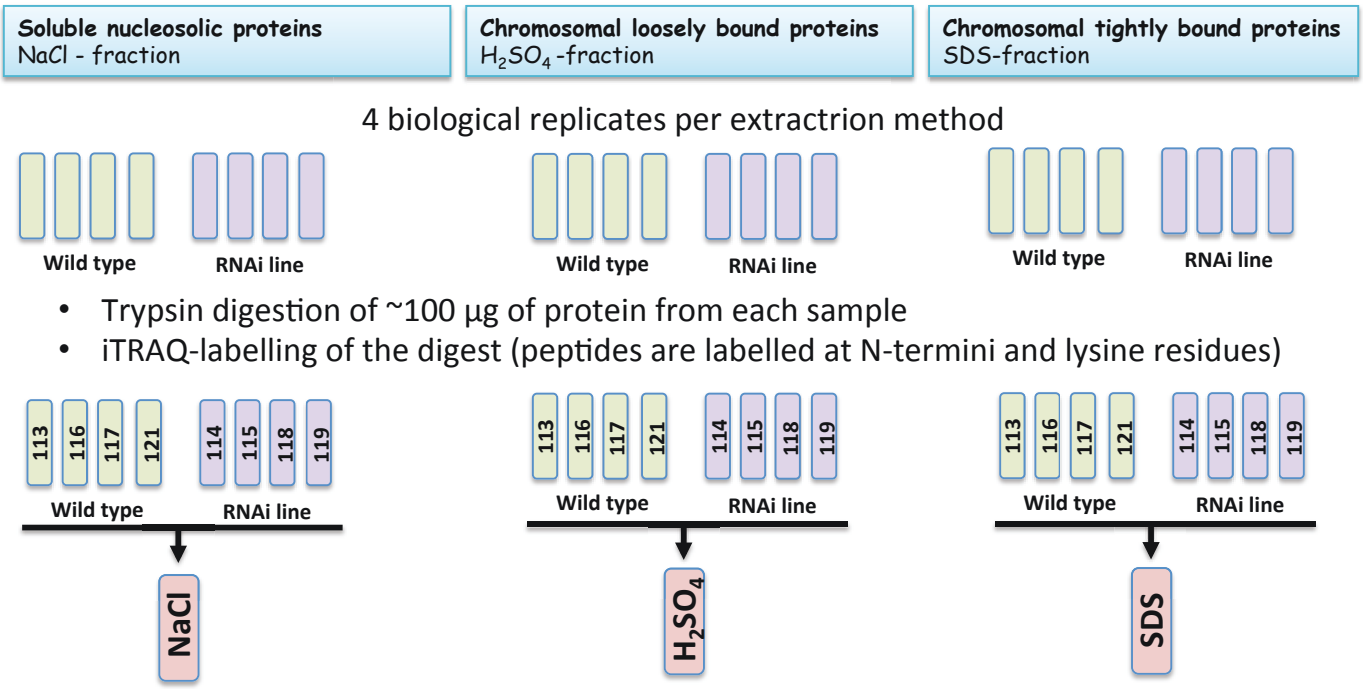


Figure 62 : Schéma illustrant le marquage différentiel par iTRAQ. Les protéines nucléaires ont été extraites suivant une extraction différentielle en 3 étapes (Fraction « NaCl », fraction « H_2SO_4», fraction « SDS »). Environ 100 µg de protéines nucléaires de cellules sauvages et 35S::VvMSA-RNAi correspondant à 4 répétitions biologiques indépendantes sont digérés par la trypsine. Les peptides issus de cette difestion sont ensuite marqué à l'aide des étiquette isobariques de masse différente (113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 et 121 Da). La raison pour laquelle l'étiquette à 120 Da n'est pas utilisée réside dans le fait que les ions immoniums, issus de la phénylalanine des peptides, possèdent une masse de 120,08 Da. Ainsi, ces ions pourraient interférer avec la quantification des peptides marqués par cette étiquette. L'ensemble des peptides générés pour chaque fraction sont ensuite regroupés.

préparation et la conservation de l'intégrité des membranes nucléaires (Figure 19). Afin de procéder à une extraction optimale des protéines nucléaires, nous avons réalisé leur fractionnement différentiel permettant d'obtenir : *i)* les protéines solubles du nucléosol (fraction NaCl 0,15 M) ; *ii)* les protéines chromosomales, associées à l'ADN de manière réversible (fraction H_2SO_4 0,4 N, comportant majoritairement les histones) et *iii)* les protéines plus fortement fixées à l'ADN (fraction SDS 1%, essentiellement des protéines chromosomales non histones). Dans leur ensemble ces trois fractions correspondent à une préparation très complète des protéines nucléaires, qui se prête à une vraie analyse quantitative et comparative (Figure 20). Un autre avantage réside dans le fait que les éventuelles contaminations, surtout dues aux protéines du réticulum endoplasmique, dont les structures membranaires sont intimement liées à celles du noyau, sont éliminées dès la première fraction. Enfin, l'analyse indépendante de chacune des fractions des protéines nucléaires permettrait de mieux appréhender le rôle de VvMSA dans les différents domaines du noyau.

La culture cellulaire, l'isolement des noyaux, le fractionnement différentiel des protéines nucléaires, leur précipitation et leur purification, ainsi que le dosage des protéines par la méthode de Bearden (Bearden 1978) ont été entièrement réalisés par notre groupe à Poitiers (pour les détails voir le chapitre « Matériels et Méthodes »).

Les traitements des protéines nucléaires préalables à leurs identification et quantification par LC-MS/MS en phase inverse ont été faits par Dr. Thomas Schneider de l'Université de Zürich, sur la plateforme de FGCZ. Suite aux réactions de réduction/alkylation, les protéines nucléaires de chacune des trois fractions ont été digérées par la trypsine, puis marquées par iTRAQ 8-plex *in vitro*. Ce marquage permet de rajouter les huit étiquettes isobariques, d'une masse moleculaire identique de 305 Da. Chaque étiquette est constituée d'un groupement rapporteur (masse de 113 à 121 Da), spécifique de la répétition biologique, d'un groupement de balance (masse de 192 à 184 Da), permettant de compenser la différence liée à la masse molaire du groupe rapporteur, et d'un groupement réactif, correspondant à l'amine du peptide spécifique. Grâce à ce marquage isobarique, l'approche iTRAQ 8-plex s'avère puissante dans la discrimination de chacune des quatre répétitions biologiques par type cellulaire, sauvage et génétiquement modifié. Enfin, c'est le mélange des 8 produits de digestion marqués pour chaque fraction qui est soumis à la spectrométrie de masse (Figure 62).

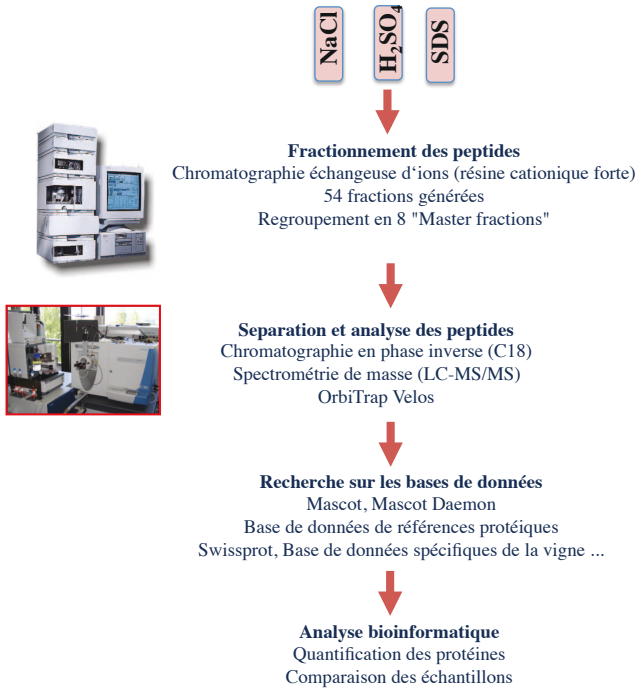


Figure 63 : Schéma illustrant la démarche expérimentale appliquée pour l'analyse de protéomique quantitative comparative des protéines nucléaire des cellules embryogènes WT et *35S ::VvMSA*-RNAi. Les peptides de chaque fractions (« NaCl » ; « H_2SO_4» ; « SDS ») subissent un premier fractionnement par chromatographie échangeuse d'ion, ce qui permet de générer 54 fractions. Les peptides des 54 fractions sont rassemblées de manière à générer 8 « Master fractions ». La quantification des différents peptides marqués et ensuite réalisée par LC-

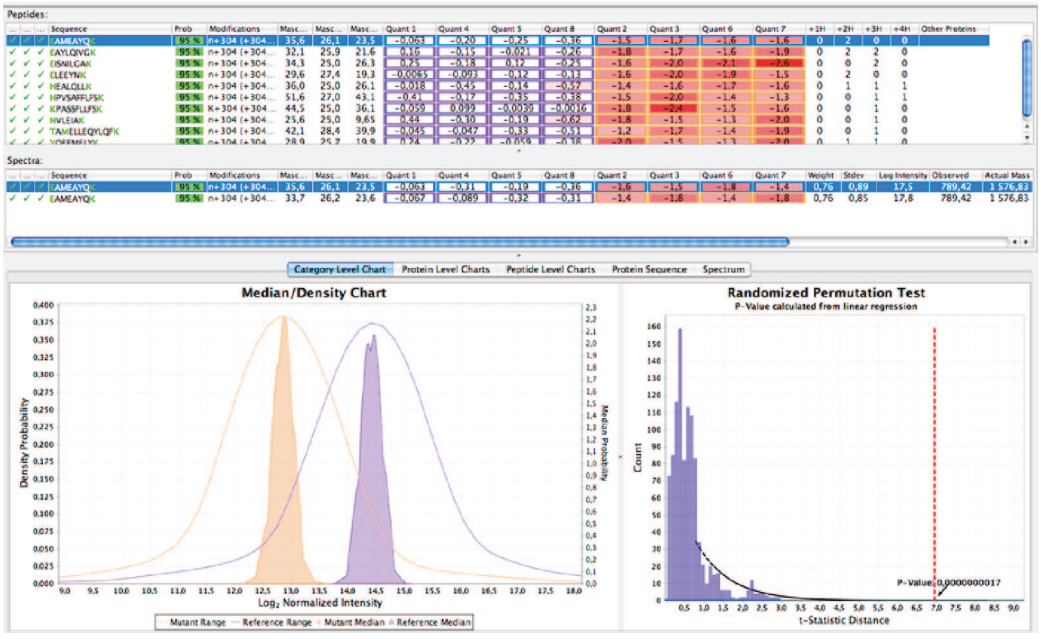


Figure 64 : Illustration de l'analyse bioinformatique menée sur le logiciel Scaffold Q+. Pour chaque protéine identifiée, sont répertoriés les différents peptides ayant permis son identification, leur niveau relatif dans les différents échantillons, ainsi que la densité de probabilité en fonction de l'intensité (normalisée par le log2) du signal de l'ion rapporteur libéré à partir de l'étiquette utilisée pour marquer spécifiquement les peptides issus de la digestion des protéines nucléaires des cellules WT ou 35S ::VvMSA-RNAi. Cette analyse permet de contrôler que la quantification des différents peptides est conforme à la quantification des protéines correspondantes et que les différences d'intensité de l'ion rapporteur sur l'ensemble des peptides sont bien tranchées entre cellules WT et 35S::VvMSA-RNAi.

Les peptides marqués ont par la suite été préfractionnés par chromatographie liquide (LC) à échangeur cationique fort. Les « master » fractions obtenues sont ensuite analysées par spectrométrie de masse (MS) couplée à la LC en phase inverse C-18, LC-MS/MS. Il y a donc séparation dans l'espace et dans le temps par la technologie « OrbiTrap Velos » (Figure 63).

L'identification des protéines auxquelles correspondent les peptides quantifiés a été réalisée par une approche bio-informatique (Figure 64), grâce à la recherche dans les bases de données Mascot, Mascot Daemon, UniProt (Swissprot and TrEMBL), Grapevine specific database Genoscope. Ce travail a été effectué par Dr. Berd Roschitzki, Dr. Hristo Atanassov et Prof. Rossitza Atanassova sur la plate-forme protéomique du FGCZ.

Pour ma part, je me suis investi dans l'analyse fonctionnelle des protéines identifiées et quantifiées. Cette partie du travail a été entièrement réalisée dans notre groupe à Poitiers et a consisté en l'annotation, dans la mesure du possible, de toutes les protéines des trois fractions et la sélection des protéines exprimées de manière différentielle entre les cellules sauvages et les cellules *35S::VvMSA*-RNAi, sur la base de tests statistiques. L'analyse des données a été automatiquement réalisée avec le logiciel Proteome Software Scaffold Q+, permettant la quantification des peptides, l'identification de leur appartenance protéique, l'estimation du nombre de peptides par protéine et le taux de recouvrement de la séquence respective, ainsi que la présentation graphique de la différence quantitative entre peptides/protéines dans les deux conditions étudiées.

Les données du test non paramétrique Mann-Whitney, appliqué par Scaffold Q+, nous ont servi de base pour estimer l'expression différentielle des protéines entre cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi*. Cependant, l'analyse statistique finale a été affinée par deux approches différentes, d'une part, par T-Test et normalisation de la moyenne et, d'autre part, par T-Test et normalisation de la médiane, travail réalisé par Dr. Jonas Grossmann du FGCZ.

1.4.2 Comparaison des protéomes nucléaires des cellules sauvages et réprimées pour VvMSA

Dans les trois fractions nucléaires, toutes confondues, nous avons identifié 1086 protéines, chacune de ces séquences ayant été comparée par « Blast » aux bases de données protéiques et nucléotidiques. Malgré le fait que le séquençage du génome de la Vigne ait été réalisé une première fois en 8x et une deuxième fois en 12x (Génoscope – Projet *Vitis*),

Tableau. 4 Récapitulatif des protéines différentiellement exprimées d'une manière significative entre les cellules embryogènes de vigne WT et 35S::VvMSA-RNAi. Pour chaque protéine est indiqué son numéro d'accession (UniProt ou Génoscope), le niveau d'expression normalisé vis-à-vis de la moyenne (gris) ou de la médiane (bleu) ainsi que le rapport (transformé par la fonction log2) entre son expression chez les cellules WT et 35S::VvMSA-RNAi, le test t de student a été réalisé afin de déterminer la significativité des différences observées. La normalisation par la médiane à été retenue (car plus stringeante et jugée plus fiable que la normalisation par la moyenne). Les protéines présentées ici sont donc les protéines pour lesquelles une différence statistiquement significative (p value < 0,05) a été détectée entre l'expression normalisée par la médiane des cellules WT et 35S::VvMSA-RNAi. Ont été surlignées en vert et en rouge les numéro d'accession correspondant aux protéines présentant une expression respectivement plus et moins élevée chez les cellules 35S::VvMSA-RNAi que WT .

Uniprot accession number	Normalisation vis-à-vis de la moyenne				Normalisation vis-à-vis de la médiane			
	Moyenne ± erreur standard				Médiane ± erreur standard			
	Wild-type	Mutant	log2(induction/ répression)	P value (t test)	Wild-type	Mutant	log2(induction/ répression)	P value (t test)
tr|A5AFA0|A5AFA0_VITVI	96.29 ± 25.67	-2.91 ± 2.48	#NOMBRE!	0.000	75.99 ± 36.51	-1.47 ± 1.35	#NOMBRE!	0.000
tr|F6H147|F6H147_VITVI	-1.27 ± 1.22	43.46 ± 3.01	#NOMBRE!	0.001	-0.98 ± 1.08	22.93 ± 12.12	#NOMBRE!	0.000
tr|A5BQF7|A5BQF7_VITVI	18976.47 ± 4735.73	6665.9 ± 2158.05	1,50933985	0.002	14956.54 ± 7167.11	3838.95 ± 3127.15	1,961991522	0.019
tr|A5AVJ0|A5AVJ0_VITVI	4826.47 ± 1652.97	1650.92 ± 288.52	1,547702331	0.006	3737.35 ± 1811.65	891.54 ± 568.46	2,067648223	0.009
tr|A5AQI6|A5AQI6_VITVI	8991.07 ± 2564.84	3943.07 ± 1004.64	1,189173761	0.008	7134.97 ± 3676.63	2094.86 ± 1368.41	1,768053131	0.018
tr|A5B1Q9|A5B1Q9_VITVI	1594.45 ± 607.21	565.04 ± 273.52	1,49664258	0.009	1286.15 ± 824	341.5 ± 333.81	1,913110949	0.032
tr|F6HFR3|F6HFR3_VITVI	375.74 ± 47.58	185.78 ± 58.78	1,01616532	0.009	288.41 ± 98.55	105.51 ± 86.76	1,450820226	0.033
tr|A5BCS2|A5BCS2_VITVI	360585.27 ± 73124.6	123592.44 ± 63453.85	1,544750022	0.010	281453.39 ± 120239.02	75493.87 ± 75150.64	1,898464598	0.030
tr|F6HF17|F6HF17_VITVI	2290.54 ± 695.34	606.3 ± 380.01	1,91758953	0.010	1812.23 ± 1001.93	382.94 ± 413.48	2,242559699	0.027
tr|D7SHM0|D7SHM0_VITVI	19952.05 ± 5241.61	5667.71 ± 3731.15	1,815699143	0.012	15736.98 ± 7696.89	3611.24 ± 4032.6	2,123591897	0.030
tr|D7TI65|D7TI65_VITVI	10992.29 ± 5186.99	2728.58 ± 1641.75	2,010268556	0.012	8901.62 ± 6089.78	1368.03 ± 880.38	2,701963686	0.011
tr|D7TVB7|D7TVB7_VITVI	2477.83 ± 884.24	1058.79 ± 377.51	1,226662747	0.013	1994.57 ± 1202.38	614.99 ± 522.99	1,697447523	0.041
tr|D7TV62|D7TV62_VITVI	2791.19 ± 776.02	955.14 ± 573.64	1,547103796	0.014	2210.24 ± 1119.25	596.22 ± 646.54	1,890287399	0.036
tr|E0CRN7|E0CRN7_VITVI	652702.25 ± 288304.56	240208.97 ± 122275.63	1,442134972	0.015	531597.76 ± 372733.68	146523.83 ± 146177	1,859199714	0.041
tr|F6HUD0|F6HUD0_VITVI	172641.63 ± 30986.21	88239.5 ± 29034.79	0,968283914	0.015	134306.94 ± 58070.43	50605.84 ± 40055.44	1,408157955	0.048
tr|A5BD13|A5BD13_VITVI	189458.16 ± 59127.81	86938.69 ± 35366.64	1,12380898	0.016	149876.45 ± 85825.36	51361.56 ± 46195.83	1,545012766	0.047
tr|A5C7R4|A5C7R4_VITVI	432626.46 ± 132253.43	174672.81 ± 91224.66	1,30846684	0.016	343007.12 ± 193620.47	106964 ± 108258.53	1,681113194	0.044
tr|F6HXU9|F6HXU9_VITVI	12022 ± 4422.47	4935.04 ± 1733.63	1,284542292	0.016	9659.92 ± 5967.04	2781.8 ± 2076.26	1,795992041	0.037
tr|A5AHH6|A5AHH6_VITVI	169.12 ± 48.12	46.89 ± 23.05	1,850770146	0.018	134.37 ± 72.37	26.82 ± 21.33	2,32460644	0.026
tr|A5CB91|A5CB91_VITVI	472366.95 ± 221771.18	190738.69 ± 76626.61	1,308310476	0.021	386313.57 ± 280870.4	112181.39 ± 99552.08	1,783939	0.045
tr|F6GTX4|F6GTX4_VITVI	143979.36 ± 54319.62	57001.3 ± 30522.83	1,336795412	0.021	116120.21 ± 74021.23	35009.09 ± 35548.83	1,729817768	0.049
tr|F6HX38|F6HX38_VITVI	26187.8 ± 7743	9750.75 ± 6801.4	1,425309474	0.023	20785.98 ± 10766	6223.45 ± 7379.41	1,739823943	0.045
tr|D7TDM1|D7TDM1_VITVI	11120.31 ± 2679.59	4387.36 ± 2688.02	1,34177282	0.024	8751.19 ± 4345.27	2750.61 ± 3008.32	1,669725034	0.047
GSVIVT01008758001	2030.95 ± 903.21	889.51 ± 368.48	1,19107245	0.025	1657.01 ± 1163.49	521.85 ± 482.95	1,666877481	0.049
tr|A5C5G8|A5C5G8_VITVI	155725.45 ± 55348.07	48154.28 ± 37357.7	1,693268703	0.025	124486.2 ± 68731.53	31723.45 ± 38492.71	1,972364399	0.048
tr|D7SK33|D7SK33_VITVI	4441.43 ± 1640.35	1935.24 ± 750.57	1,198512618	0.026	3548.34 ± 2115.6	1119.73 ± 922.74	1,663989627	0.048
GSVIVT01032972001	244.45 ± 63.56	97.3 ± 53.37	1,329019271	0.036	191.88 ± 99.72	57.88 ± 55.01	1,729092632	0.050
tr|A5B7F0|A5B7F0_VITVI	53.99 ± 8.86	7.52 ± 19.24	2,842892874	0.051*	41.42 ± 15.9	2.07 ± 6.43	4,319323973	0.025
tr|D7SZY7|D7SZY7_VITVI	1669.16 ± 881.42	48.54 ± 62.5	5,103865444	0.071*	1378.07 ± 1052.97	22.21 ± 24	5,955101824	0.037
tr|F6H6M8|F6H6M8_VITVI	1108.69 ± 244.88	2365.34 ± 414.76	-1,093194188	0.002	965.85 ± 354.22	1964.69 ± 638.85	-1,024432329	0.041
tr|D7TVU9|D7TVU9_VITVI	7764.49 ± 1594.39	3479.22 ± 934.38	1,15812881	0.004	6825.54 ± 2552.13	2855.4 ± 886.82	1,257247965	0.036
rr|REV_A5AP66_VITVI	67479.97 ± 14509.11	28585.78 ± 8623.87	1,239161408	0.009	59115.66 ± 21848.88	23799.68 ± 9814.59	1,312598259	0.034

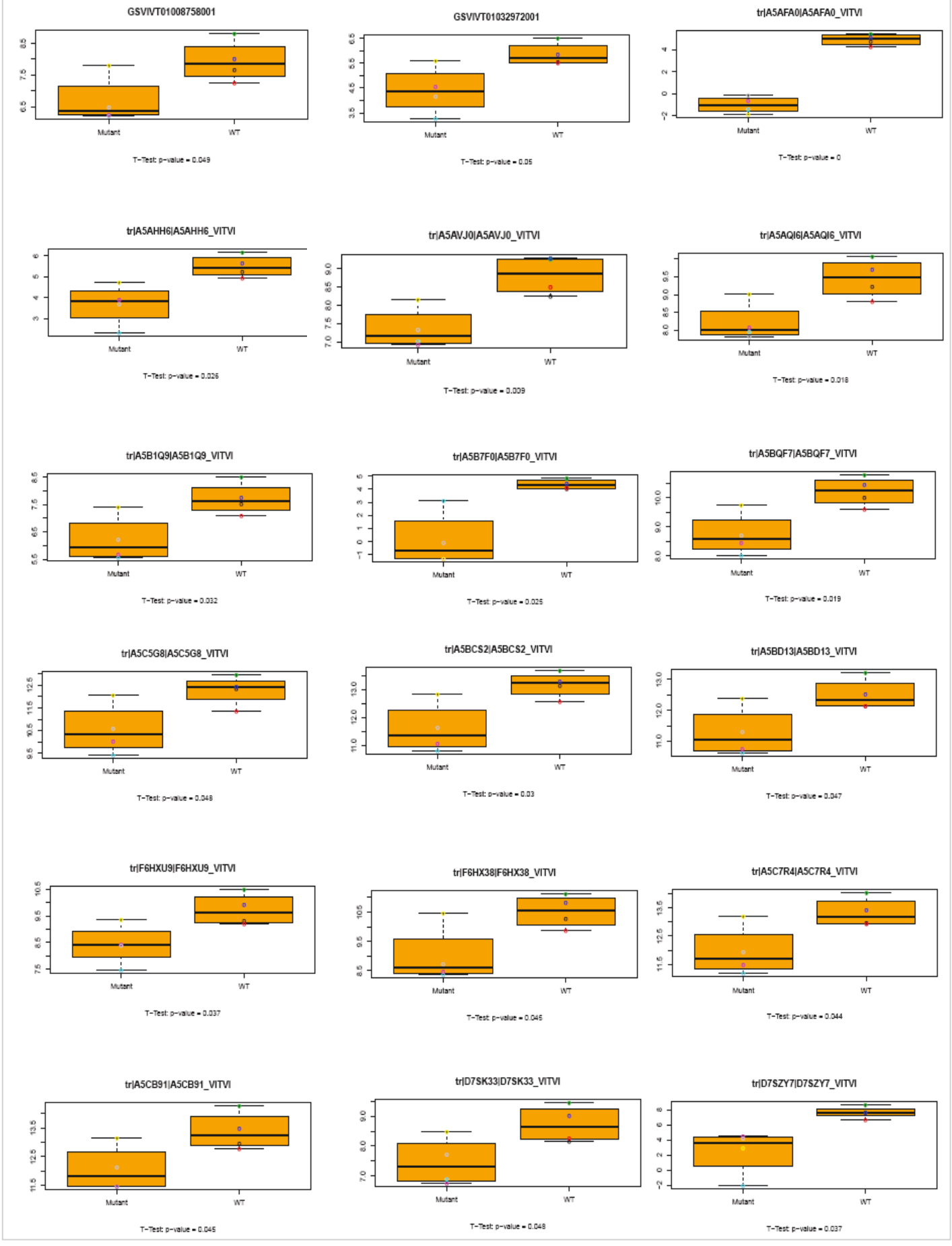
l'annotation des séquences reste assez restreinte. Ceci justifie la comparaison assez large par « Blast », avec les génomes d'autres espèces végétales, voire animales. Notre travail en bio-informatique a abouti à l'annotation de 811 protéines, ce qui signifie qu'à peu près 25 % des séquences identifiées restent non annotées.

La technologie iTRAQ permet l'identification et la quantification des protéines présentes uniquement dans les deux conditions étudiées. Ceci signifie que si une protéine est absente dans une des deux populations cellulaires, elle ne sera pas prise en considération dans l'autre. En effet, un premier résultat significatif de notre analyse réside dans le fait que la protéine VvMSA, l'ASR de la Vigne, n'est pas identifiée malgré sa présence dans les cellules embryogènes sauvages, confirmant de cette manière l'efficacité de sa répression dans les cellules *35S::VvMSA-RNAi*.

Les trois fractions étudiées se sont avérées très riches en protéines, nous confortant dans le choix de l'extraction différentielle des protéines nucléaires. Cependant les deux analyses statistiques n'ont révélé de différences quantitatives significatives que pour la fraction nucléosolique (NaCl) et la fraction chromosomale (Acide). Pour la troisième (SDS), celle des protéines chromosomales plus fortement fixées sur l'ADN, aucune protéine n'est exprimée de manière différentielle et statistiquement valable.

Dans la première fraction (NaCl), réunissant les protéines solubles du nucléoplasme la normalisation par la moyenne a permis de mettre en évidence 31 protéines exprimées de manière différencielle, avec un ratio de 16/15 pour celles réprimées contre celles surexprimées en absence de VvMSA. Par le même test statistique dans la deuxième fraction (Acide), des protéines histones et non histones faiblement associées à l'ADN, 89 séquences indépendantes montrent des différences significatives. Cependant dans cette fraction le ratio de 87/2 est fortement en faveur des protéines réprimées contre les protéines surexprimées en absence de VvMSA.

Parmi les 89 protéines de la fraction acide figurent les quatre histones nucléosomales, H4, H3, H2A et H2B. Après normalisation par la moyenne, ces protéines n'apparaissent pas statistiquement différentiellement exprimées dans les deux types cellulaires. Le niveau de conservation de ces protéines étant trop élevé, les peptides séquencés ne permettent pas d'identifier un seul membre d'une même famille multigénique. Etant donné qu'un filtre impose la condition d'appartenance des peptides à une seule protéine, les histones nucléosomales se retrouvent exclues par ce type de normalisation. Cependant, il faudrait


GSVIVT01008758001
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.049
GSVIVT01032972001
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.05
tr|A5AFA0|A5AFA0_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0
tr|A5AHH6|A5AHH6_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.026
tr|A5AVJ0|A5AVJ0_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.009
tr|A5AQI6|A5AQI6_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.018
tr|A5B1Q9|A5B1Q9_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.032
tr|A5B7F0|A5B7F0_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.025
tr|A5BQF7|A5BQF7_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.019
tr|A5C5G8|A5C5G8_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.048
tr|A5BCS2|A5BCS2_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.03
tr|A5BD13|A5BD13_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.047
tr|F6HXU9|F6HXU9_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.037
tr|F6HX38|F6HX38_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.045
tr|A5C7R4|A5C7R4_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.044
tr|A5CB91|A5CB91_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.045
tr|D7SK33|D7SK33_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.048
tr|D7SZY7|D7SZY7_VITVI
Mutant
WT
T-Test: p-value = 0.037

garder à l'esprit le sens biologique de ces différences marquantes des histones entre les cellules sauvages et les cellules *35S::VvMSA*-RNAi.

Un T-Test a été réalisé sur les données normalisées par rapport à la médiane (Tableau 4). Dans la fraction « NaCl », quatre protéines ont été confirmées comme étant différentiellement exprimées entre les cellules WT et *35S::VvMSA-RNAi*. Dans la fraction « H_2SO_4 », ce test a révélé 29 protéines exprimées de manière différentielle entre les deux types cellulaires. Une protéine apparaît redondante au sein des deux fractions. Parmi ces 32 protéines, seulement deux sont surexprimées dans les cellules *35S::VvMSA-RNAi*, tandis que les trente autres sont réprimées en absence de VvMSA.

1.4.3 Classification en catégories fonctionnelles des protéines exprimées de façon différencielle

L'analyse bio-informatique approfondie a permis d'attribuer des fonctions moléculaires et dans certains cas des fonctions biologiques plus ou moins hypothétiques à ces 32 protéines et de les classer dans six grandes catégories (Tableau 5 et Figure 66). Ces six catégories sont : Architectures et remodelage de la chromatine, Biogenèse des ribosomes, Métabolisme, Réplication et réparation de l'ADN, Réponses aux stress et Transcription. Au premier abord, la répartition des protéines différentiellement exprimées dans les six catégories semble relativement équilibrée. Ainsi, les classes «Biogenèse des ribosomes» et « Transcription » regroupent chacune 25% des séquences et par conséquent apparaissent les plus riches avec huit protéines à leur actif. La catégorie «Architecture/Remodelage de la chromatine» réuni six protéines représentant 18,75% des séquences. Les catégories « Réponses aux stress » et «Métabolisme», contiennent quatre protéines chacune ce qui représente à chaque fois 12,5% du nombre total de protéines. Enfin, la catégorie «Réplication/ Réparation de l'ADN» à 6,25% n'est représentée que par deux séquences protéiques.

Dans la catégorie «Métabolisme» les quatre protéines, identifiées comme exprimées de manière différentielle, présentent des activités enzymatiques et sont annotées comme : une adénine phosphoryltransférase (tr|A5AFA0|A5AFA0_VITVI); une alpha-1,4-glucan phosphorylase (tr|D7SK33|D7SK33_VITVI); une endopeptidase de type aspartate (tr|F6HF17|F6HF17_VITVI) et une endopeptidase de type sérine

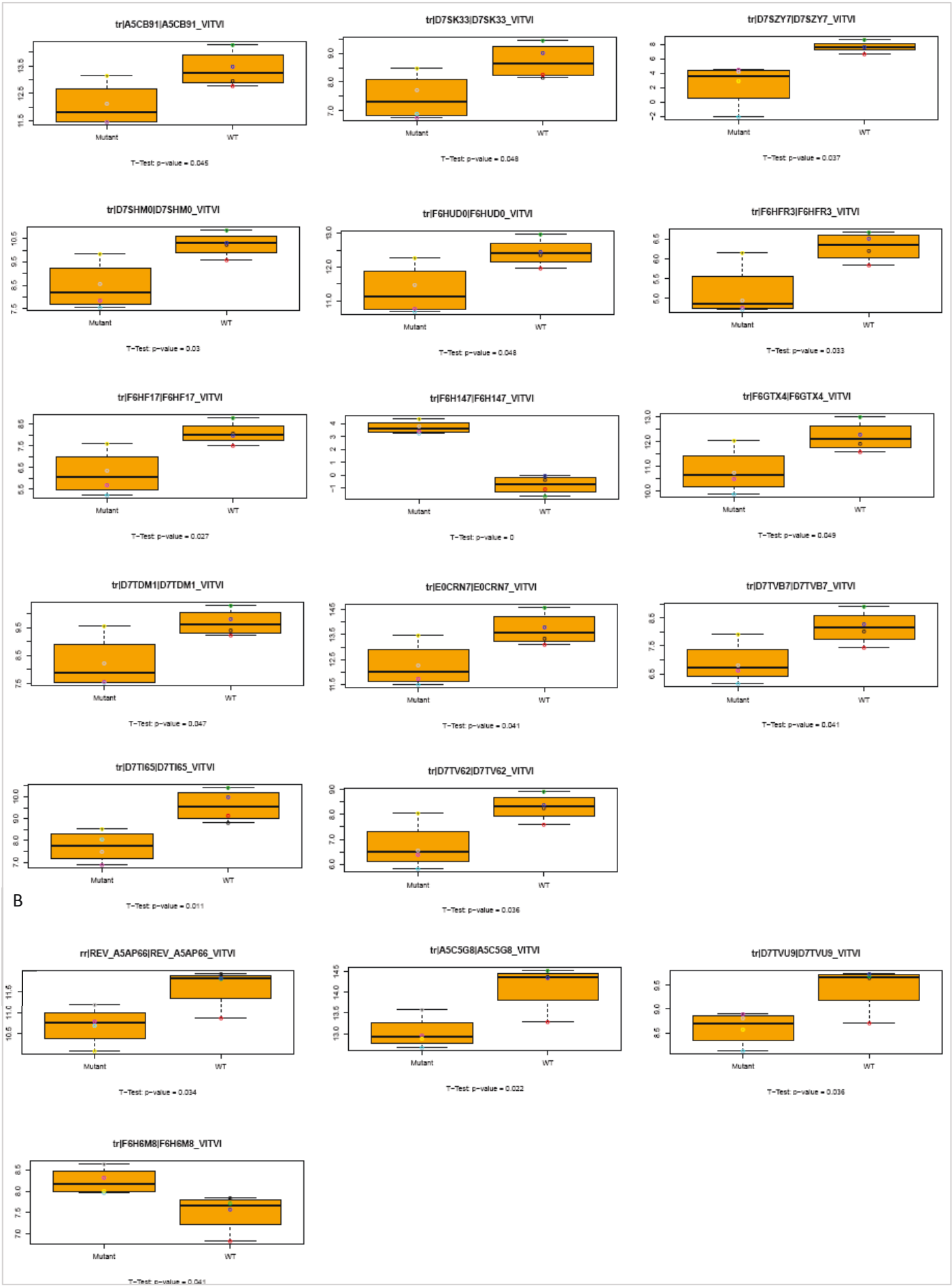


Figure 65 : Diagramme en boîte rendant compte des différences d'expression entre cellules embryogènes 35S ::VvMSA-RNAi (« Mutant ») et sauvage (« WT ») pour l'ensemble des protéines exprimées d'une manière significativement différente. Vingt-neuf protéines de la fraction « H2SO4 » (A) et quatre de la fraction « NaCl » sont différentiellement exprimées. Une protéine est représentée dans les 2 deux fractions (tr|A5C5G8|A5C5G8_VITVI). Les diagrammes représentent les valeurs extrêmes, le 1er et le 3ème quartile ainsi que la médiane pour chaque protéine quantifiée.

(tr|F6H6M8|F6H6M8_VITVI). A l'exception de l'endopeptidase de type sérine, toutes ces enzymes sont inhibées chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi*.

L'adénine phosphoryltransférase est impliquée dans les processus liés au métabolisme des nucleosides et à la récupération de l'adénine pour sa réutilisation. Cette enzyme convertit l'adénine en adénine monophosphate (AMP), ce qui indique un lien entre le métabolisme des purines, la croissance de la plante et l'acclimatation aux stress. A cet égard la lignée mutante *oxt1* de *A. thaliana,* manifestant une tolérance accrue au stress oxydatif et aux températures élevées, semble affectée dans l'expression du gène codant l'isoforme 1 de l'adénine phosphoryltransférase (APT1). L'inhibition de l'expression de *APT1* chez les mutants *oxt1* entraîne une diminution de l'activité enzymatique, un niveau élevé d'adénine directement corrélé à la résistance aux stress abiotiques et une stimulation de la croissance de la plante (Sukrong et al. 2012). Cependant, la perte totale de l'activité APT1 entraîne une forte accumulation des cytokinines bases, suggérant une réponse physiologique régulée par les cytokinines, telle qu'une sénescence retardée, une accumulation d'anthocyanes et de l'expression de certains gènes (Zhang et al. 2013). L'adénine phosphoribosyltransférase est également impliquée dans la restauration saisonnière de la division cellulaire et de la croissance de la plante. Son abondance relative augmente en réponse au froid chez les variétés de blé de printemps (Kosová et al. 2013).

L'alpha-1,4 glucan phosphorylase est une enzyme allostérique jouant un rôle important dans le métabolisme glucidique (biosynthèse des disaccharides, des oligosaccharides et des polysaccharides). Ces principaux domaines fonctionnels suggèrent qu'elle présente une dualité fonctionnelle en tant que phosphorylase et glucosyl-transférase, également capable de fixer le phosphate de pyridoxal. Chez les plantes, cette enzyme est impliquée dans les processus liés au métabolisme des sucres, la réponse à la sécheresse et au cadmium (Rathore et al. 2009).

L'endopeptidase de type aspartique et l'endopeptidase de type sérine appartiennent à de grandes familles d'enzymes protéolytiques, impliquées dans de nombreux aspects de la physiologie et du développement de la plante. Elles sont nécessaires au renouvellement des protéines. La dégradation de protéines endommagées ou mal repliées fournit les acides aminés requis pour la synthèse de nouvelles protéines. De plus, la dégradation sélective de certaines protéines régulatrices par la voie de l'ubiquitine et le protéasome contrôle des aspects clés de la croissance, du développement et des réactions de défense. Les protéases sont également responsables de modifications post-traductionnelles des protéines par une protéolyse limitée à

Tableau.5 Annotation des protéines différentiellement exprimées d'une manière significative entre les cellules embryogènes de vigne WT et 35S::VvMSA-RNAi. Pour chaque protéine sont indiqués : son numéro d'accession (UniProt ou Génoscope), sa fonction putative déterminée sur la base de son homologie de séquence avec des protéines annotées fonctionnellement, sa catégorie fonctionnelle, le rapport (transformé par la fonction log2) entre son expression normalisée par la médiane chez les cellules WT et 35S::VvMSA-RNAi, ainsi que le résultat du test t de student afin d'évaluer la significativité des différences observées. Ont été surlignées en vert, les deux seules protéines présentant une expression plus élevée chez les cellules 35S::VvMSA-RNAi que WT .

Numéro d'accession UniProt/Génoscope	Nom/Fonction de la protéine	Catégorie fonctionnelle	Normalisation vis-à-vis de la médiane	
			log2(induction/ répression)	p value
tr|A5AFA0|A5AFA0_VITVI	Adenine phosphoribosyltransferase	Metabolism	#NOMBRE!	0.000
tr|F6H147|F6H147_VITVI	Sequence-specific DNA and zinc ion binding	Transcription	#NOMBRE!	0.000
tr|A5BQF7|A5BQF7_VITVI	Putative DNA-binding protein	Transcription	1,961991522	0.019
tr|A5AVJ0|A5AVJ0_VITVI	Cactin	Transcription	2,067648223	0.009
tr|A5AQI6|A5AQI6_VITVI	DNA/RNA-binding protein Alba-like	Chromatine architecture/remodeling	1,768053131	0.018
tr|A5B1Q9|A5B1Q9_VITVI	ATP binding and helicase activity.	Chromatine architecture/remodeling	1,913110949	0.032
tr|F6HFR3|F6HFR3_VITVI	RNA binding (Pre-mRNA splicing factor PRP21-like protein)	Transcription	1,450820226	0.033
tr|A5BCS2|A5BCS2_VITVI	Thaumatin	Stress responses	1,898464598	0.030
tr|F6HF17|F6HF17_VITVI	Aspartic-type endopeptidase	Metabolism	2,242559699	0.027
tr|D7SHM0|D7SHM0_VITVI	FKBP12-interacting protein of 37 kDa	Transcription	2,123591897	0.030
tr|D7TI65|D7TI65_VITVI	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1-like protein 1 isoform 1	Ribosome biogenesis	2,701963686	0.011
tr|D7TVB7|D7TVB7_VITVI	Proton-transporting ATPase	Stress responses	1,697447523	0.041
tr|D7TV62|D7TV62_VITVI	Heavy-Metal-Associated (HMA) ion binding	Stress responses	1,890287399	0.036
tr|E0CRN7|E0CRN7_VITVI	40S ribosomal protein S6	Ribosome biogenesis	1,859199714	0.041
tr|F6HUD0|F6HUD0_VITVI	DNA binding (AT_hook _DNA-bd_motif)	Transcription	1,408157955	0.048
tr|A5BD13|A5BD13_VITVI	Ribosomal_L32e protein	Ribosome biogenesis	1,545012766	0.047
tr|A5C7R4|A5C7R4_VITVI	Ribosomal_L28e protein	Ribosome biogenesis	1,681113194	0.044
tr|F6HXU9|F6HXU9_VITVI	Ribosomal_S14_2_A protein	Ribosome biogenesis	1,795992041	0.037
tr|A5AHH6|A5AHH6_VITVI	Histone-fold (Transcription factor CBF/NF-Y/archaeal histone	Chromatine architecture/remodeling	2,32460644	0.026
tr|A5CB91|A5CB91_VITVI	Ribosomal_L13e protein	Ribosome biogenesis	1,783939	0.045
tr|F6GTX4|F6GTX4_VITVI	Ribosomal_S12/S23 protein	Ribosome biogenesis	1,729817768	0.049
tr|F6HX38|F6HX38_VITVI	Double-stranded methylated DNA binding.	Chromatine architecture/remodeling	1,739823943	0.045
tr|D7TDM1|D7TDM1_VITVI	Sequence-specific DNA binding transcription factor	Transcription	1,669725034	0.047
GSVIVT01008758001	Protein with a thioredoxin-like fold	Stress responses	1,666877481	0.049
tr|A5C5G8|A5C5G8_VITVI	High mobility group (HMG) box - protein	Chromatine architecture/remodeling	1,972364399	0.048
tr|D7SK33|D7SK33_VITVI	Phosphorylase.	Metabolism	1,663989627	0.048
GSVIVT01032972001	rRNA-processing protein Fcf1/Utp23	Ribosome biogenesis	1,729092632	0.050
tr|A5B7F0|A5B7F0_VITVI	Helicase	DNA repair/replication	4,319323973	0.025
tr|D7SZY7|D7SZY7_VITVI	Arginine and glutamate-rich protein family	Transcription	5,955101824	0.037
tr|F6H6M8|F6H6M8_VITVI	Serine-type endopeptidase	Metabolism	-1,024432329	0.041
tr|D7TVU9|D7TVU9_VITVI	Copper binding	Chromatine architecture/remodeling	1,257247965	0.036
rr|REV_A5AP66_VITVI	Integrase	DNA repair/replication	1,312598259	0.034

certains sites très spécifiques. Cette protéolyse limitée participe à la maturation des enzymes, paraît nécessaire à l'assemblage et à l'adressage des protéines, et contrôle l'activité des enzymes et des protéines/peptides régulatrices/régulateurs. Les protéases sont donc impliquées dans tous les aspects du cycle de vie de la plante, de la mobilisation des réserves protéiques au cours de la germination jusqu'à l'initiation de la mort cellulaire programmée et de la sénescence (Schaller 2004; Antão and Malcata 2005; Van der Hoorn 2008). Les endopeptidases de type aspartique sont plus particulièrement requises dans les processus de sénescence, de mort cellulaire programmée, dans la reproduction et les réponses à différents stress abiotiques (Contour-Ansel et al. 2010; Timotijević et al. 2010; Guo et al. 2013). Leur implication dans la maturation ou la dégradation des protéines dans différentes conditions et à différents stades du développement de la plante suggèrent une certaine spécialisation fonctionnelle (Simões and Faro 2004). Récemment, cinquante gènes de peptidases de types aspartique (VvAP) ont été identifiés dans le génome de la Vigne, parmi lesquels trente codent pour des peptidases contenant un domaine ASP complet (Guo et al. 2013).

Parmi les protéines exprimées de manière différentielle, il existe certaines qui entrent sans équivoque dans la catégorie «Réponses aux stress». Parmi elles la «thaumatin», tr|A5BCS2|A5BCS2_VITVI est une «Pathogenesis-Related» protéines, de la famille des PR5, induites en réponse aux attaques des agents pathogènes. Elles interviennent dans la résistance systémique acquise et les réponses aux stress abiotiques. La protéine (tr|D7TVB7|D7TVB7_VITVI) est identifiée comme une ATP-ase pompe à protons pouvant être impliquée dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques (stress au froid, stress salin) ou encore le développement embryonnaire. Une autre protéine (GSVIVT01008758001), semble appartenir à la superfamille des thiorédoxines, ce qui suggère un rôle antioxydant.

Dans la même catégorie « Réponses aux stress », (tr|D7TV62|D7TV62_VITVI) présente le domaine HMA – «Heavy Metal-associated», qui possède un motif de fixation des métaux Cys-XX-Cys constitué de deux cystéines conservées, dans une structure de type « ferredoxin-like » et appartient à la famille des protéines HMA. Ce domaine HMA peut être présent en une ou plusieurs copies en position N-terminal et semble avoir un rôle catalytique et/ou de régulation. Les protéines HMA sont considérées être des métallochaperonnes et chez les plantes cette grande famille comprend deux types : «heavy metal-associated plant proteins» (HPPs) et «heavy metal-associated isoprenylated plant proteins» (HIPPs). Les HIPPs, à l'exemple de ATX1, peuvent interagir avec les ATP-ases de type P (P-type ATP-ase). Bien que le domaine HMA et le processus d'isoprénylation soient communs à presque

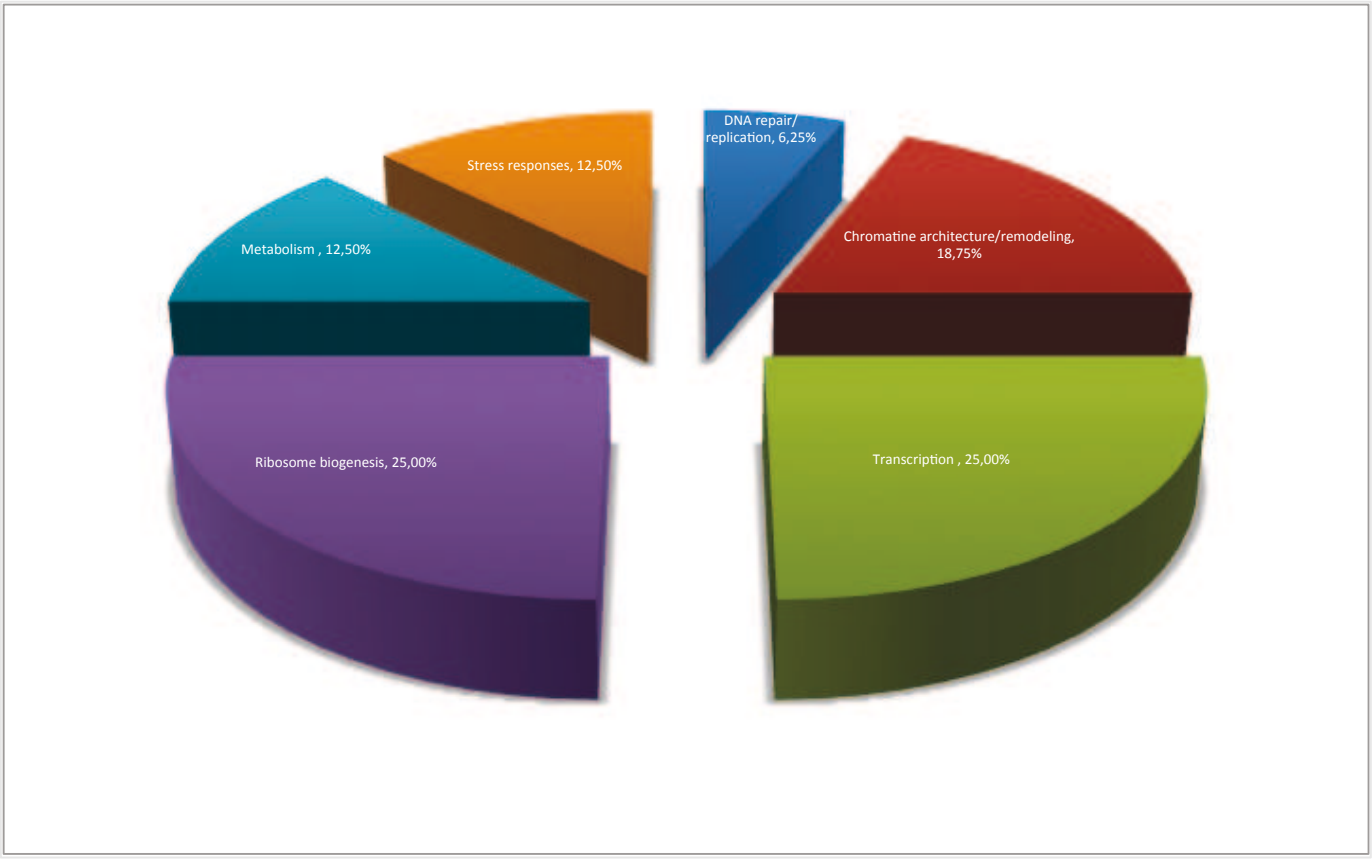


Figure 66 : Répartition des protéines différentiellement exprimées d'une manière significative entre les cellules WT et *35S::VvMSA*-RNAi dans les différentes catégories fonctionnelles.

tous les organismes, des bactéries à l'Homme, c'est uniquement chez les plantes vasculaires que les deux motifs HMA et CaaX se retrouvent réunis dans la même protéine, et de ce fait, regroupés dans la classe des protéines HIPPs (Dykema et al. 1999; Tehseen et al. 2010). Deux rôles sont décrits pour les protéines HIPPs : soit dans l'homéostasie des métaux lourds et les mécanismes de leur détoxication, soit comme des éléments régulateurs au niveau trancriptionnel de la réponse au froid et à la sécheresse (Barth et al. 2009; Abreu-Neto et al. 2013). En effet, chez Arabidopsis la localisation nucléaire de AtHIPP26 et son interaction avec l'homéodomaine à doigts de Zn du facteur de transcription AtHB29, lié à la sécheresse, ont été démontrées (Barth et al, 2009).

Dans la catégorie "Biogenèse des ribosomes" l'approche iTRAQ nous a permis de détecter 8 protéines en lien avec la fonction et la biogenèse des ribosomes : 4 des grandes sous-unités ribosomales (L13, L14, L28, L32), 2 des petites sous unités (S6, S12) et un facteur nécessaire à la maturation des petites sous-unités ribosomiques (Fcf1/Utp23) ; toutes étant plus exprimées chez les cellules sauvages que 35S::VvMSA-RNAi. Malgré l'absence de données expérimentales directes concernant les protéines ribosomales de la Vigne, de nombreuses études portant sur leurs homologues chez d'autres espèces végétales (*A. thaliana* principalement) indiquent qu'elles ne sont pas seulement essentielles à la synthèse protéique et à l'ensemble des processus en découlant (le métabolisme, la division cellulaire et la croissance), mais qu'elles sont également impliquées dans la régulation des processus du développement de la plante et dans la réponse aux stress environnementaux. Dans cet ordre d'idées une étude récente, portant sur l'analyse transcriptomique et protéomique de l'expression globale des protéines ribosomiques au niveau des racines d'Arabidopsis en condition de carence en phosphate et en fer, indique que la composition protéique des ribosomes est modifiée en réponse à ces stress lors du processus d'adaptation à la carence nutritive. Cette modification se traduirait par une prise en charge préférentielle des messagers de certains gènes et par ce biais affecterait l'efficacité de la traduction des protéines (Wang et al. 2013a). D'une manière intéressante, cinq des sept protéines ribosomiques identifiées au cours de notre étude sur la Vigne (S12/S23 tr|F6GTX4|F6GTX4_VITVI, L13 tr|A5CB91|A5CB91_VITVI, S14 tr|F6HXU9|F6HXU9_VITVI, L28 tr|A5C7R4|A5C7R4_VITVI et L32 tr|A5BD13|A5BD13_VITVI), toutes réprimées en absence de VvMSA, sont soit inhibées ou non affectées par le stress abiotique au niveau des racines d'Arabidopsis (Wang et al, 2013). Chez *A. thaliana*, des modifications de la protéines ribosomique S6 (RPS6) ou de ses protéines kinases sont associées aux stress salin et au froid (Mizoguchi et al. 1995), au stress

osmotique (Mahfouz et al, 2006) et lors de l'organogenèse (Morimoto et al. 2002). Les protéines ribosomiques RPS6 et RPL13 sont également impliquées dans la réponse de la plante aux stress biotiques, comme chez le tabac en réponse à l'infection par des potyvirus (Yang et al. 2009). La protéine RPS6 ainsi que l'homologue d'une autre des protéines ribosomiques identifiées au cours de notre étude, RPS28 du tournesol, se sont révélées inhibées en réponse à la sécheresse, au stress salin et à l'ABA (Liu and Baird 2003). On considère que la transduction du signal lié à la kinase S6 (protéine kinase phosphorylant RPS6) est dépendant de la signalisation auxinique (Turck et al. 2004). De plus, une modification de la phosphorylation de la protéine ribosomale RPS6 induit un ajustement rapide de la croissance en réponse à des stimuli environnementaux (Reinbothe et al. 2010). Turkina et collaborateurs ont identifié de nouveaux sites de phosphorylation de la protéine ribosomique RPS6 présentant des fluctuations photopériodiques de leur niveau de phosphorylation (Turkina et al. 2011). La protéine ribosomique RPS6 est également impliquée dans la transduction du signal liée à la protéines kinase TOR (Kim et al. 2014), un réseau de signalisation impliqué dans l'adaptation de la croissance chez tous les eukaryotes en réponse aux stress et aux modifications du statut nutritif et énergétique cellulaire (Xiong and Sheen 2012; Lastdrager et al. 2014), favorisant la croissance des plantes dans des conditions de forte disponibilité en sucres (Deprost et al. 2007). Au cours d'une étude récente, il a été suggéré que RPS6 est impliquée dans le régulation de l'expression des gènes d'ARNr par de possible modifications épigénétiques, *via* son interaction avec l'histone déacétylase 2B (AtHD2B) qui modifie la structure de la chromatine de l'ADNr. Cette observation suggère l'existence d'un lien entre la signalisation dépendante de la TOR kinase et la transcription des ADNr ainsi que la biogenèse des ribosomes (Kim et al. 2014). Un autre niveau de complexité chez les protéines ribosomiques des plantes est lié à l'existence de plusieurs paralogues divergeant en termes de fonctions du fait de modifications post-traductionnelles, telles que l'acétylation et la phosphorylation de RPS6, L12, L13 et L28 (Carroll et al. 2008; Carroll 2013). Cette divergence fonctionnelle pourrait être attribuée à une néofonctionnalisation ou une subfonctionnalisation dépendantes de facteurs génétiques ou épigénétiques, conduisant à une forte spécialisation des différentes protéines ribosomiques paralogues vis-à-vis de la réponse aux contraintes environnementales (Wang et al, 2013).

Le complexe ribonucléoprotéine H/ACA, (tr|D7SHM0|D7SHM0_VITVI), sous-unité 1-like isoforme 1, intervient dans la synthèse de pseudo-uridine et la biogenèse des ribosomes. Avec la méthylation du ribose, la conversion des uridines en pseudo-uridines est une des

modifications les plus fréquentes des bases des ARN ribosomaux. Chez les eucaryotes, les sites de pseudo-uridylation sont reconnus par appariement des bases avec des séquences spécifiques de la cible dans les petits ARNs nucléolaires H/ACA de guidage (small nucleolar RNA – snoRNA). Tous les snoRNAs de guidage connus lors de la pseudo-uridylation fonctionnent sous la forme de petites particules de ribonucléoprotéines (snoRNPs), dans lesquelles les différents snoRNAs site-spécifiques sont associés avec des protéines communes aux H/ACA snoRNPs (Torchet et al. 2005). Parmi elles, les H/ACA snoRNPs contiennent quatre protéines essentielles, conservées dans l'évolution : Cbf5p, Nhp2p, Nop10p, and Gar1p. La protéine identifiée dans cette étude, la H/ACA, sous-unité 1-like isoforme 1 appartient à la superfamille Gar1p de snoRNPs requises pour l'adressage dans le nucléole, la maturation des pré-mRNAs et la pseudo-uridylation, et/ou la séquestration par les H/ACA snoRNPs dans le nucléole à des fins de régulation de la transcription. Cependant ces fonctions présumées méritent d'être confirmées par démonstration expérimentale.

Dans la catégorie « Transcription » sont réunis six facteurs de transcription présumés et deux protéines potentiellement impliquées dans l'assemblage du prépliceosome, une structure d'épissage dynamique. Cinq facteurs de transcription et la protéine appartenant au prépliceosome sont réprimés dans les cellules *35S::VvMSA*/RNAi et une seule protéine régulatrice de l'expression génique est surexprimée en absence de VvMSA.

La protéine tr|F6HFR3|F6HFR3_VITVI semble liée au prépliceosome par conséquent elle serait capable d'interagir soit avec les snRNP (small nuclear Ribonucleoproteins), soit avec les pré-mRNA, dans le processus d'épissage. Eu égard de son rôle dans la régulation immédiatement post-transcriptionnelle, nous l'avons classée de manière arbitraire dans la catégorie « Transcription ».

Dans le même contexte, la protéine FKBP-binding (tr|D7SHM0|D7SHM0_VITVI) correspondrait à la sous-unité de régulation du complexe multiprotéique de la N6-méthyltransférase, responsable de la méthylation de résidus adénosine de certains ARN messagers et, par ce biais, intervenant dans le contrôle de l'efficacité de leur épissage et leur stabilité. Son orthologue chez Arabidopsis, AtFIP37, semble requis dans le développement de l'albumen et dans l'embryogenèse (Vespa et al. 2004).

Une protéine riche en arginine et en glutamate tr|D7SZY7|D7SZY7_VITVI semble par homologie de séquence intervenir dans la régulation de l'expression génique en réponse

aux phéromones chez les procaryotes et les hormones chez les eucaryotes, et cela en coopération avec la sous-unité Med1 du complexe Mediator. Les récepteurs nucléaires activés par des ligands sont impliqués dans le recrutement du complexe à plusieurs sous-unités Mediator, requis pour la transcription dépendante de l'ARN polymérase II. Med1 jouerait un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique au travers des récepteurs nucléaires et, par conséquent, dans le contrôle des processus biologiques cruciaux comme le développement et la différentiation, la régénération cellulaire et la conversion néoplastique du foie (Jia et al. 2014). A l'heure actuelle, aucun homologue n'a été identifié chez les plantes.

La protéine (tr|D7TDM1|D7TDM1_VITVI) porte deux domaines, Kbox et MADSbox, souvent retrouvés associés dans les facteurs de transcription de type MADS. Le groupe MIKC des facteurs de transcription à MADSbox est spécifique des plantes.Ces protéines sont largement impliquées dans la régulation de la floraison et la spécification de l'identité des organes reproducteurs (Díaz-Riquelme et al. 2009), processus connus pour requérir une régulation épigénétique.

Parmi les facteurs de transcription émerge une protéine (tr|F6H147|F6H147_VITVI) dotée du domaine CCT (CONSTANS, CO-like, and TOC1), hautement conservé, situé en C-terminal et sensé intervenir dans la localisation nucléaire. Ce domaine se retrouve associé à d'autres motifs spécifiques des facteurs de transcription de type B-box à doigts de zinc, GATA-type à doigts de zinc, motif ZIM, et pourrait être impliqué dans la voie de transduction du signal lumière. Dans ce contexte, chez Arabidopsis et le riz, l'expression des facteurs de transcription de type GATA est contrôlée par plusieurs régulateurs de la croissance, la lumière et différentes phytohormones (auxines, cytokinines, gibbérellines) et ils sont subdivisés en quatre classes (Behringer et al. 2014).

La Cactine (tr|A5AVJ0|A5AVJ0_VITVI) est réprimée dans 35S ::*VvMSA*-RNAi. Elle a été découverte chez la drosophile puis également identifiée chez l'Homme et intéragit avec CACTUS, une composante du complexe NF-kB de la cascade de signalisation transcriptionnelle impliquée dans le contrôle de la polarité cellulaire au cours du développement embryonnaire et la réaction d'inflammation. Ces données confortent sa classification dans la catégorie «Réponses aux stress». Cependant les travaux plus récentes, y compris chez Arabidopsis, révèlent sa localisation nucléaire dans les «speckles» et plus précisément sa co-localisation avec des protéines de la machinerie d'épissage dans ces clusters de stockage de spliceosomes inactifs (Baldwin et al. 2013). Ces dernières données, confirmées

chez les plantes, les animaux et la levure, suggèrent l'interaction entre la Cactine et le spliceosome et, au travers de cette probable interaction, suggèrent également le rôle de la Cactine dans le contrôle de la transcription.Concernant la protéine (tr|F6HUD0|F6HUD0_VITVI) et la protéine non caractérisée (tr|A5BQF7|A5BQF7_VITVI) les résultats du BLASTp suggèrent que leurs séquences respectives partagent un haut pourcentage d'identité avec les séquences protéiques de la famille des facteurs de transcription à motif AT-hook. Des facteurs de transcription à motif AT-hook font partie des protéines HMG (High Mobility Group), souvent associées à la chromatine. Ce sont des protéines se liant à l'ADN chez les plantes et faisant partiedes complexes SWI/SNF de remodelage de la chromatine, dont l'activité dépend de l'ATP. Chez les plantes les sous-unités de ces complexes d'assemblage combinatoire sont identifiées par homologie de séquence, mais aucun complexe endogène n'est isolé (Reyes 2013). Chez Arabidopsis la surexpression de la protéine AHL22 (AT-hook motif nuclear localization 22) a pour effet le retardement de la floraison. La transcription du gène FT (Flowering Locus T) a été fortement inhibée chez le mutant surexpresseur (Yun et al. 2012). En parallèle, les auteurs ont démontré que l'acétylation de l'histone H3 était réduite en faveur d'une augmentation de la méthylation de H3K9met2, leur permettant de proposer AHL22 comme acteur du remodelage de la FT chromatine en agissant sur ces deux modifications du code épigénétique de H3.

La catégorie «Réplication et Réparation de l'ADN» réunit deux protéines. La protéine (tr|A5B7F0|A5B7F0_VITVI), présente les domaines typiques des hélicases «DEAD/DEAH box», requis pour leur fonction dans la diminution du coefficient d'enlacement des acides nucléiques. Elle porte dans sa séquence les motifs classiques d'interaction avec des NTP, Walker A (boucle de fixation du phosphate) et Walker B (résidu d'acide aspartique de fixation de Mg^{2+}). L'homologie de séquence suggère fortement son interaction directe avec l'ATP, grâce au motif S-A-T en N-terminal. Ainsi, la protéine (tr|A5B7F0|A5B7F0_VITVI)participerait au couplage des activités ATPase et hélicase. Les fonctions biologiques potentielles seraient liées avec le métabolisme des ARN, la transcription, l'épissage des pre-mRNAs, la biogenèse des ribosomes, etc.

L'homologie de séquence identifie la deuxième protéine de cette catégorie (rr|REV_A5AP66_VITVI) comme impliquée dans l'intégration de l'ADN, proche des intégrases des retrovirus et des transposases. Parmi les domaines retrouvés à part celui typique des intégrases, il y a aussi un RNaseH-like, spécifique des ribonucléases de classe H, des

transcriptases inverses et des transposons du type «*Copia*» (Yamada et al. 2014).). Chez les plantes, les copies génomiques des rétrotransposons sont associées avec les modifications de la chromatine imposant la répression de l'expression génique. De plus, certains transposons de type «*Copia*» à LTR (Long Terminal Repeat) comme ONSEN, ont acquis la capacité de profiter de la réponse de la plante à la température élevée afin de se réactiver, en échappant au mécanisme de «silencing» *via* des siRNA (Cavrak et al. 2014).

Concernant la catégorie «Architecture/Remodelage de la chromatine », elle est représentée par six membres, dont les fonctions présumées semblent directement liées à la structure dynamique de la chromatine.

La protéine tr|A5AQI6|A5AQI6_VITVI est identifiée par homologie de séquence comme une Alba-like (Acetylation Lowers Binding Activity), une famille de protéines capables d'interagir avec l'ADN et l'ARN de manière séquence non spécifique. Ces protéines sont décrites en tant que « liant » de l'ADN, capables d'engendrer des ponts entre deux duplex d'ADN et, de cette manière, la formation de boucles impliquées dans l'organisation fonctionnelle du génome (Črnigoj et al. 2013). Chez *Plasmodium falciparum* la découverte de quatre paralogues ALBA-like, associées aux éléments répétés des régions subtélomériques, a permis de mettre en évidence la régulation de leur interaction avec les acides nucléiques au travers de leur niveau d'acétylation contrôlé par la déacétylase Sir2 (Chêne et al. 2012). Le rôle suggéré de ces protéines chez les eucaryotes concerne l'établissement ou la maintenance de l'architecture de la chromatine et, par ce biais, la répression de la transcription.

La protéine tr|A5AHH6|A5AHH6_VITVI montre des homologies avec les facteurs de transcription reconnaissant le motif CCAAT et les histones archaïques. Chez la levure un seul complexe de trois protéines se fixant sur ce motif a été caractérisé. Il estconstitué de HAP2, HAP3 et HAP5. Chez les mammifères, les membres d'un complexe équivalent, connu comme NF-Y ou CBF, ou encore CP1, sont aussi codés par des gènes isolés. L'identification des orthologues de ces gènes chez Arabidopsis et le profilage de leur expression suggère un rôle complexe dans la régulation développementale et environnementale de l'expression génique (Edwards et al. 1998). Bien que chez la levure l'expression de HAP2 soit réprimée par le glucose, *AtHAP3b* semble plutôt régulé en réponse au stress osmotique. Chez la tomate l'expression élevée de THAP5a pendant les jours chauds et longs peut réduire le temps de floraison (Ben-Naim et al. 2006). Dans le même ordre d'idées, en comparaison avec l'écotype sauvage les mutants *hap3b-1* and *hap3b-2* manifestent un retard du temps de floraison en

condition de photopériode longue (Chen et al. 2007). Les données de la littérature confortent le rôle de ces facteurs de transcription dans la floraison, un processus développemental sous contrôle épigénétique.

Un autre représentant de la même catégorie est la protéine tr|F6HX38|F6HX38_VITVI, capable de se fixer à l'ADN méthylé, et par conséquent potentiellement impliquée dans la méthylation de l'ADN. Elle présente un domaine BRCT (Breast Cancer Susceptibility Protein) trouvé dans les protéines requises pour la réparation de l'ADN endommagé, des cassures dues à des rayonnements ou produites lors des échanges du matériel génétique entre les chromosomes pendant la méïose. Pour les organismes eucaryotes, y compris les plantes, qui évoluent dans un environnement complexe, le système de réparation de l'ADN apparaît essentiel (Sheng et al. 2011). Dans ce contexte, les domaines BRCT guident les enzymes vers les sites de réparation de l'ADN et assurent la signalisation entre les processus cellulaires (point de contrôle du cycle cellulaire, réplication de l'ADN, transcription de l'ADN, apoptose). Ces rôles rendent les protéines à domaine BRCT1 acteurs de la stabilité du génome humain.

Le membre de la famille des HMG (High Mobility Group), protéines associées à la chromatine, tr|A5C5G8|A5C5G8_VITVI, trouve logiquement sa place dans la catégorie «Architecture/Remodelage de la chromatine ». Les HMG sont des protéines chromosomales non histones, âptes à se fixer à l'ADN de manière séquence non spécifique. Certaines se comportent comme des protéines de type architectural mais leurs rôles biologiques restent encore à établir (Thomas 2001).

Ce dernier groupe est complété par un facteur de transcription à doigts de zinc, tr|D7TVU9|D7TVU9_VITVI, protéines connues à présent pour leurs multiples rôles dans la transcription, le « trafficking » des ARN messagers, la traduction, le remodelage de la chromatine.

Par homologie de séquence la protéine (A5B1Q9|A5B1Q9_VITVI) semblerait dotée de la capacité de fixer l'ATP et d'avoir une activité hélicase. Eut égard de ses domaines conservés, «Bromodomain» et «Glutamine-Leucine-Glutamine (QLQ) domain», elle serait capable de se fixer à l'ADN, intervenir dans des interactions «protéine-protéine» et interagir avec les lysines acétylées. A l'image des données obtenues chez Arabidopsis, elle pourrait faire partie d'un complexe de régulation transcriptionnelle à plusieurs sous-unités de type

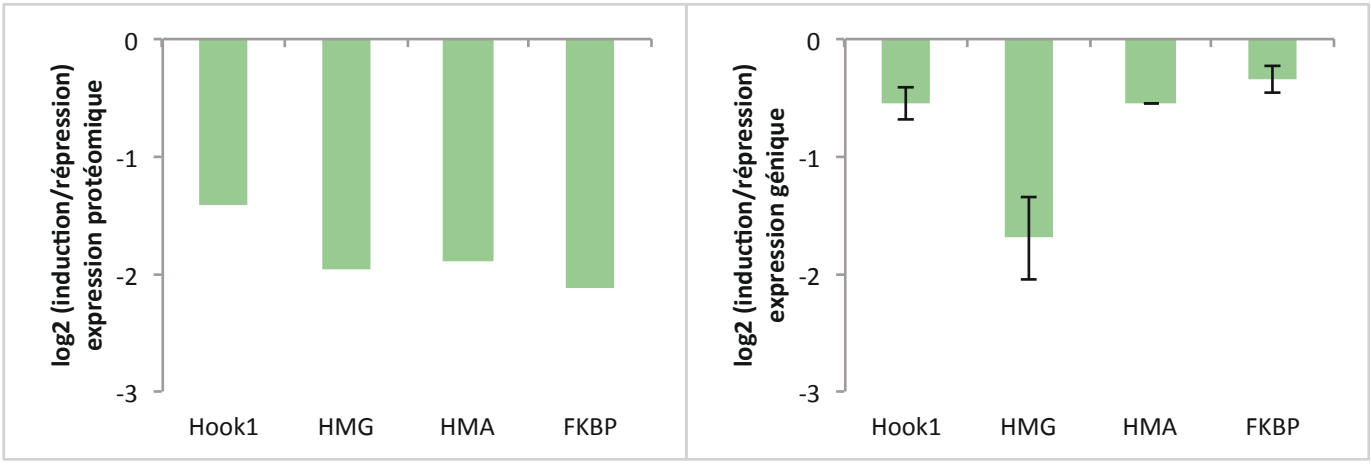


Figure 67 : Profil d'induction/répression des protéines (A) et des gènes (B) chez les cellules embryogènes 35S ::VvMSA-RNAi par rapport aux cellules WT. L'analyse de l'expression génique a été réalisée par RT-qPCR sur une selection de gène dont les protéines sont significativement différentiellement exprimées entre les cellules WT et 35S::VvMSA-RNAi. L'induction/répression de l'expression génique a été calculé suivant la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en normalisant l'expression vis-à-vis du gène de ménage VvActine et en rapportant à l'expression du WT. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de 4 réplicats biologiques (expression protéique) ou 3 répétitions biologiques (expression génique) sauf pour l'expression génique de HMA (une seule répétition biologique). Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard.

SWI/SNF (switch/sucrose non-fermentable) impliqué dans le développement, la réponse aux phytohormones et le remodelage de la chromatine dépendent de l'ATP (Reyes JC. 2013). La suggestion demeure plausible, bien que les complexes SWI/SNF endogènes ne semblent pas encore être purifiés chez les plantes mais uniquement identifiés par le biais de la conservation de leur séquence.

L'idée d'interconnexion entre les différentes catégories des protéines nucléaires semble tout à fait légitime, d'autant plus qu'elles sont identifiées dans leur grande majorité (29/32) dans la fraction acide, ce qui suppose leur intégration dans des complexes/structures formés à la bases d'interactions protéine/protéine et/ou protéines/acides nucléiques. Nos résultats montrent que la classification de certains facteurs de transcription dans la catégorie « Transcription » est autant valable que leur regroupement sous la rubrique «Architecture/Remodelage de la chromatine », les deux classes de protéines étant dans une certaine mesure complémentaires et interdépendantes. En guise de conclusion, il est nécessaire de mettre l'accent sur les études récentes qui révèlent que plusieurs facteurs de transcription séquence-spécifiques interviennent dans l'adressage des protéines de remodelage de la chromatine (Smaczniak et al. 2012 ; Wu et al. 2012 ; Gentrya and LarsHennig. 2014).

1.1.1.1 Recherche de corrélation entre l'expression génique et protéique

Afin de vérifier si la répression de VvMSA dans les cellules *35S::VvMSA-RNAi* affecte non seulement l'expression au niveau protéique mais aussi à niveau génique, nous avons élaboré des amorces spécifiques des gènes codant certaines des protéines manifestant des différences quantitatives significatives entre les deux types cellulaires (Figure 67). L'analyse de quatre gènes par RT-qPCR a révélé que *HMG* est le seul gène dont l'expression est significativement inhibée et ceci en corrélation directe avec la répression de la protéine elle-même (Figure 67). Ce résultat montre bien que les effets du «silencing» de *VvMSA* mis en évidence par l'approche protéomique pourraient se manifester à différents niveaux de régulation : transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel. Cependant, l'impact de l'absence de VvMSA sur plusieurs protéines liées à la structure et/ou au remodelage de la chromatine ouvre aussi des perspectives d'exploration au niveau épigénétique. L'analyse de ce dernier niveau de régulation pourrait nous aider à appréhender la dualité fonctionnelle des ASR en reliant leur rôle de protection directe des macromolécules en condition de stress avec le remodelage de la chromatine et son impact sur le contrôle transcriptionnel de l'expression génique.

Conclusions et perspectives

Mon travail de thèse a été initié dans le but d'appréhender les relations complexes entre le glucose et son transporteur VvHT1 chez la Vigne. Le glucose représente le substrat privilégié de ce transporteur de monosaccharides et en parallèle la molécule-signal impliquée dans le contrôle de sa propre expression génique. Dans ce contexte, l'objectif premier concernait le positionnement de la protéine régulatrice VvMSA, identifiée en tant que facteur de transcription régulant l'expression du gène *VvHT1*, dans les voies de signalisation du glucose.

A mon arrivée dans l'équipe, le lien fonctionnel entre ces deux partenaires venait d'être confirmé de manière incontestable par l'inhibition marquée de l'expression de *VvHT1* en réponse à la répression de VvMSA dans les cellules embryogènes 41B *35S::VvMSA-RNAi* (Medici, 2010). Par conséquent, le modèle de culture embryogène avec ces trois déclinaisons, cellules sauvages, cellules surexprimant VvMSA et cellules silencieuses pour cette protéine, paraît bien adapté pour cette étude.

Les cellules embryogènes manifestent des spécificités les rendant aptes à faire la transition rapide, dès la levée de la pression des auxines, vers la différentiation cellulaire et la formation d'embryons somatiques. Cette particularité repose en partie sur leurs sources carbonées, le maltose et le glycerol. Le maltose est hydrolysé lentement par les cellules embryogènes, ces cellules sont donc habituées à un niveau faible de glucose. Ceci nous a incité à mettre en place une deuxième culture cellulaire, cette fois-ci non embryogène, cultivée sur du saccharose, un disaccharide très rapidement transformé par les invertases et fournissant du glucose à un niveau élevé. La création des cellules non embryogènes issues du même fond génétique que les cellules embryogènes à partir des plants de Vigne régénérés *in vitro*, représente le premier succès du mon travail. De cette manière nous avons non seulement doublé le nombre des suspensions cellulaires les emmenant au total à six, mais surtout nous avons enrichi le modèle expérimental en le basant sur deux types cellulaires avec deux sources de carbone induisant des différences marquées en termes de métabolisme glucidique et énergétique.

L'analyse de l'expression par RT-qPCR de deux gènes de cyclines a dévoilé un niveau nettement plus élevé chez les cellules embryogènes que chez les cellules non embryogènes (Figure 25). Cette observation est surprenante compte tenu de leur prolifération cellulaire lente et progressive mise en évidence par la mesure des masses fraîches et sèches des cellules. Cependant, ce résultat pourrait être expliqué par un certain niveau de synchronisation des

phases du cycle mitotique couramment observé chez les cellules embryogènes (Blanc et al. 2002), contrairement à la multiplication plus rapide mais anarchique des cellules non embryogènes.

La caractérisation métabolique par RNM du proton de ces deux cultures cellulaires nous a permis de mettre en évidence des différences marquées. Cette analyse du métabolome met en exergue certaines spécificités métaboliques remarquables des cellules embryogènes. Malgré des teneurs en glucose et en saccharose très faibles, ces cellules ont tendance à stocker plus d'amidon et à synthétiser beaucoup d'acides aminés (la proline et l'alanine en particulier), de choline (un alcool aminé) et de protéines comparées aux cellules non embryogènes. La faible concentration en acides organiques et, en particulier, en intermédiaires du cycle de Krebs, suggère que ces cellules ont un métabolisme énergétique assez peu actif. Les cellules non embryogènes sont caractérisées par des teneurs élevées en glucose et en saccharose, ainsi qu'en intermédiaires du cycle de Krebs. Les cellules non embryogènes devraient présenter un flux plus important au niveau de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire et donc un métabolisme énergétique beaucoup plus actif que les cellules embryogènes. Ces caractéristiques ont déjà été observées chez d'autres cellules embryogènes en culture (Blanc et al. 2002), mais l'approche d'analyse métabolomique globale est appliquée pour la première fois de manière comparative entre cellules embryogènes et non embryogènes.

La comparaison des profils des activités des enzymes de la glycolyse entre cellules embryogènes et non embryogènes constitue également une approche novatrice. Cette étude montre que les deux types de cellules présentent des profils spécifiques en termes d'activités enzymatiques. Les cellules non embryogènes sont caractérisées par des activités importantes des enzymes favorisant l'entrée irréversible des sucres dans la glycolyse (GluK, FruK, PFK). Les cellules embryogènes sont au contraire caractérisées par des activités élevées des enzymes catalysant des étapes réversibles de la partie supérieure de la glycolyse (PGI, Aldolase, TPI) et des deux enzymes prenant en charge le PEP (PEPc et PK). Ces résultats couplés à ceux de l'étude de métabolomique confirment que les cellules non embryogènes présentent un flux important au niveau de la glycolyse. La faible activité d'hydrolyse du maltose chez les cellules embryogènes est en faveur d'un flux entrant réduit dans la glycolyse.

Le glycérol, également métabolisé par les cellules embryogènes, entre dans la glycolyse au milieu de la voie par le biais de la DHAP. Etant donné l'activité élevée de l'aldolase et de la PGI, enzymes impliquées aussi bien dans la glycolyse que la

néoglucogenèse, il paraît plausible que ces cellules redirigent une partie du glycérol métabolisé vers la néoglucogenèse. Plusieurs études rapportent par ailleurs que le glycérol permet d'initier la synthèse d'hexose et surtout d'amidon chez des cellules en culture (Vu et al. 1993; Bellettre et al. 1999). Ce mécanisme pourrait contribuer à établir les teneurs relativement élevées en amidon observées chez les cellules embryogènes.

Une autre caractéristique remarquable des cellules embryogènes réside dans la forte activité de la PEPc catalysant la réaction anaplérotique permettant probablement de maintenir leur forte production d'acides aminés. La forte activité de la PK plaide en faveur de leur capacité à diriger le flux des intermédiaires/produits de la glycolyse vers le cycle de Krebs et la respiration. La concentration élevée en acides aminés chez les cellules embryogènes pourrait alors provenir de leur assimilation depuis le milieu de culture contenant de l'hydrolysat acide de caséine (une source d'acides aminés). L'analyse du métabolome montre que les cellules embryogènes absorbent peu d'acides aminés depuis le milieu de culture, ce qui suggère qu'elles dédient effectivement une part importante du flux glycolytique à la synthèse d'acides aminés.

Nous avons mis à profit les différences métaboliques des deux types cellulaires dans le cadre de l'étude de la signalisation glucidique, afin de dissocier les effets liés au « signal glucose » de ceux liés aux intermédiaires issus de sa métabolisation. Les cellules embryogènes qui présentent des concentrations très faibles en glucose sont donc très sensibles au « signal glucose ». Les cellules non embryogènes, caractérisées par un flux important au niveau de la glycolyse sont, quant à elles, particulièrement sensibles à l'utilisation d'inhibiteurs du métabolisme.

Afin d'appréhender la complexité de la signalisation glucidique, nous avons mis en place une approche de type pharmacologique basée sur l'utilisation de ces deux types cellulaires. Il nous a fallu, dans un premier temps, tester l'aptitude des deux modèles à répondre au signal glucose en se basant sur son effet d'inhibition de l'expression du gène *VvHT1*. L'absence de réponse ou bien son caractère très aléatoire nous a obligé à trouver des conditions favorisant la sensibilité des cellules à l'égard du glucose et de ses analogues. Ce défi a abouti à la mise au point d'une période de 24h de carence en sucre et en nitrate vers la fin de la phase exponentielle de la prolifération cellulaire (J8). Cette privation oblige les cellules à consommer leurs sucres solubles intracellulaires et, par conséquent, nous permet d'utiliser des concentrations suffisamment faibles (10 mM) pour rester en conditions

physiologiques et en même temps suffisamment élevées pour observer un effet sur l'expression de VvHT1.

Le premier effecteur administré dans ces conditions optimales à la réponse cellulaire a été le mannoheptulose, l'inhibiteur compétitif spécifique du senseur cytoplasmique, HXK1, associé à la membrane externe de la mitochondrie. L'utilisation du glucose et du mannoheptulose à concentrations équimolaires (10 mM) dans les trois cultures embryogènes et les trois cultures non embryogènes n'a pas permis à l'inhibiteur de lever la répression de l'expression de *VvHT1* imposée par le glucose. Ces résultats remettent en question les effets observés du mannoheptulose à 10 mM contre le glucose ou le saccharose à 150 mM (Vitrac et al. 2000; Conde et al. 2006).

L'utilisation de gènes décrits comme des marqueurs des différentes voies de signalisation chez différentes espèces nous a permis de préciser l'effet des effecteurs glucidiques sur les deux types cellulaires. Un premier résultat notable concerne le fait que le mannose induit systématiquement les mêmes effets que le glucose. Cela semble confirmer la métabolisation du mannose par les cellules de Vigne en culture, une particularité déjà observée par Vitrac et collaborateurs (Vitrac et al. 2000).

Un autre résultat marquant de cette approche réside dans la forte induction du gène *VvPAL1* par le traitement 2DOG chez les cellules non embryogènes, effet non observé chez les cellules embryogènes. Le 2DOG constitue un inhibiteur du métabolisme glucidique. Il a été démontré chez les cellules animales qu'il induisait une forte inhibition de l'isomérisation du G6P en F6P (Wick et al. 1957). Etant donné que les cellules embryogènes semblent caractérisées par un faible flux au niveau de la partie supérieure de la glycolyse, cet analogue n'a probablement que très peu d'effet sur leur métabolisme, contrairement aux cellules non embryogènes. Notre étude met en évidence la différence de sensibilité des deux modèles utilisés à l'inhibition du métabolisme par le 2DOG. Dans notre étude, aucun des gènes marqueurs ne s'est révélé affecté par le traitement au 3OMG, ce qui suggère que leur régulation par la signalisation glucidique nécessite au moins la phosphorylation du glucose. La confrontation de nos résultats avec l'analyse critique de la littérature confirme cette supposition, et nous amène à redéfinir les voies de signalisation impliquées dans la régulation de certains des gènes marqueurs (Figure 51).

L'étude de la régulation de l'expression de *VvHT1* et *VvHT5* par les effecteurs glucidiques nous a permis de préciser les voies de signalisation du glucose impliquées dans la régulation de l'expression des gènes de ses deux transporteurs. *VvHT1* et *VvHT5* sont tous deux régulés par la voie de signalisation dépendante du « signal glucose » probablement perçu par HXK1, malgré l'absence d'effet de l'inhibiteur spécifique, le mannoheptulose. A cette régulation par le « signal glucose » se superpose une régulation par une voie dépendante du métabolisme du glucose. En effet, la perturbation du métabolisme du glucose par le 2DOG impose une inhibition de l'expression de *VvHT1* et une induction de l'expression de *VvHT5*. La régulation de l'expression de *VvHT1* par cette voie nécessite l'expression de VvMSA, contrairement à l'induction de *VvHT5* qui s'avère indépendante de cette protéine régulatrice. En d'autres termes, nous avons réussi à positionner l'interaction VvMSA/*VvHT1* dans la voie de la signalisation glucidique liée au métabolisme.

Il est à noter que la répression de VvMSA semble affecter les cellules en culture hétérotrophe. En effet, nous avons démontré que les cellules non embryogènes présentaient un niveau d'expression de *VvHT1* plus important chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* que chez les sauvages, après 30h sur le milieu minimum (24h de prétraitement pour induire la carence + 6h de traitement). La différence au niveau de l'expression de *VvHT1* entre cellules sauvages et *35S::VvMSA-RNAi* s'estompe après après 48h (24h de traitement, à la suite de 24h carence sur le milieu minimum). Cet effet transitoire suggère qu'il pourrait être lié à un stress généré par le transfert des cellules sur le milieu minimum. Dans le même ordre d'idées, les cellules embryogènes *35S::VvMSA-RNAi* perdent leur capacité de réponse au glucose et au 2DOG par l'inhibition de l'expression de *VvHT1* pour le temps de traitement 24h à la suite de 24h de carence. Nos résultats suggèrent que la répression de VvMSA induit une sensibilité accrue aux stress liés au changement de milieu dans le cas des cellules non embryogènes ou à la carence en éléments nutritifs (sucres et nitrates) prolongée dans le cas des cellules embryogènes.

L'étude du transport du glucose montre clairement que la régulation de l'expression des gènes des transporteurs *VvHT1* et *VvHT5* est découplée de la régulation du transport du glucose. Le transport est principalement affecté par le traitement 2DOG, ce qui suggère que celui-ci est régulé préférentiellement en réponse à une modification du métabolisme énergétique des cellules. Le traitement par le glucose qui inhibe fortement l'expression des gènes *VvHT1* et *VvHT5* ne semble pas affecter le transport du glucose d'une manière significative.

Cependant, le transport du glucose est plus élevé chez les cellules non embryogènes *35S::VvMSA-RNAi* que chez les « sauvages » après 30h sur le milieu minimum (24h de prétraitement pour induire la carence + 6h de traitement). Cette différence s'estompe après 48h (24h de prétraitement pour induire la carence + 24h de traitement) sur ce même milieu. Ce résultat en fait écho à celui observé au niveau de la régulation de *VvHT1* et semble confirmer l'idée selon laquelle la répression de VvMSA pourrait exacerber l'effet de stress lié au transfert des cellules non embryogènes sur le milieu minimum. De plus, le transport du glucose des cellules embryogènes *35S::VvMSA-RNAi* est fortement inhibé au temps 24h des traitements (24h prétraitement pour induire la carence + 24h de traitement). Or, cet effet n'est pas observé chez les cellules sauvages. Etant donné que le transport du glucose semble dépendant du statut énergétique de la cellule, ce résultat suggère que les cellules embryogènes *35S::VvMSA-RNAi* sont plus sensibles à la carence prolongée en sucres et en nitrates que les cellules sauvages. L'ensemble des résultats nous permet de conclure que la répression de VvMSA semble affecter l'adaptation du métabolisme des cellules à une modification de leur statut nutritionnel.

Une autre question importante était de savoir si la répression de VvMSA affectait d'une manière profonde les activités des enzymes de la glycolyse en réponse aux traitements testés au cours de l'approche de type pharmacologique. Notre analyse indique que l'activité de deux enzymes, la GluK et la PFK est significativement plus élevée chez les cellules *35S::VvMSA-RNAi* que chez les cellules sauvages, 30h après leur transfert sur le milieu complet (Gb ABA/BAP). La différence s'estompe 48h après leur transfert sur ce milieu. Ce résultat semble confirmer l'hypothèse, selon laquelle la répression de VvMSA perturbe l'adaptation du métabolisme des cellules à une modification du milieu nutritif (sucres, nitrates). L'étude conforte également nos hypothèses concernant les différences d'effets des effecteurs entre les deux types cellulaires. L'activité des enzymes chez les cellules embryogènes est majoritairement affectée par le traitement au glucose (inhibition) mais pas par le 2DOG. Ceci montre que chez ces cellules, habituées à des teneurs en glucose faibles et présentant probablement un flux faible au niveau de la partie supérieure de la voie, l'apport de glucose à 10mM induit une modification importante du métabolisme des cellules se traduisant par une reprogrammation des enzymes de la glycolyse. Chez les cellules non embryogènes, l'activité des enzymes de la glycolyse est relativement similaire dans les conditions « carence » et « glucose » mais significativement différente dans la condition 2DOG. Cela indique que le traitement par le glucose à 10mM ne semble pas influencer significativement le

métabolisme de ces cellules habituées à de fortes concentrations en glucose. Le traitement par le 2DOG induit une reprogrammation des enzymes de la glycolyse, reflétant probablement une perturbation du flux au niveau de la glycolyse.

En tenant compte des différences tranchées entre les cellules embryogènes sauvages et réprimées pour VvMSA, l'analyse protéomique quantitative et comparative est appliquée à ces deux types cellulaires. L'approche iTRAQ a été ciblée sur leur protéome nucléaire. Notre équipe a déjà démontré que VvMSA appartient à la fraction acide des protéines nucléaires, dont les histones sont les marqueurs par excellence (Saumonneau et al, 2008). En effet, c'est dans cette fraction que sont réunies la presque totalité des protéines (29/32) exprimées de manière différentielle en présence ou en absence de VvMSA. Les protéines significativement affectées par la répression de l'ASR semblent partager une caractéristique marquante, elles font partie de structures nucléaires multimériques et se retrouvent dans des complexes protéine/ADN à l'exemple des histones nucléosomales ou des facteurs de transcription. Ces protéines évoluent dans des complexes protéines/ARN, comme ceux impliqués dans la transcription des ADNr et la maturation des ARNr (nucléole) ou l'épissage des ARNm (présplicéosome), ou encore à l'instar de ceux qui servent de guides aux enzymes de remodelage de la chromatine. Enfin, elles forment des complexes protéine/protéine lors de la biogenèse des ribosomes. Dans ce contexte, quel pourrait être la fonction de l'ASR dans le noyau ?

Les ASR, à l'exemple de l'ASR1 de la tomate et de VvMSA, sont capables d'interagir avec l'ADN (Gilad et al. 1997; Çakir et al. 2003). Elles peuvent former des homodimères comme l'ASR1 de la tomate (Goldgur et al. 2007) ou encore des hétérodimères comme VvMSA avec VvDREB (Drought Responsive Element Binding), afin de recruter des facteurs de transcription dans des complexes de contrôle transcriptionnel (Saumonneau et al. 2008). Des protéines intrinsèquement non structurés en état physiologique normal, elles peuvent passer en état structuré lors des interactions avec des ions de Zn, de l'ADN ou des protéines (Rom et al. 2006; Goldgur et al. 2007; Saumonneau et al. 2008). Leur caractère hydrophile très prononcé devrait favoriser leur fonction de stabilisation des enzymes et de maintien des activités catalytiques en condition de déshydratation (Hsu et al. 2011).

En s'appuyant sur les trois catégories majeures ressorties de l'analyse protéomique «Biogenèse des ribosomes», «Transcription» et « Structure/Remodelage de la chromatine » et en discutant nos résultats dans la lumière des données bibliographiques, nous pouvons

suggérer un rôle pour VvMSA. Notre hypothèse de travail préconise une fonction de VvMSA au cœur des structures protéiques et nucléoprotéiques nucléaires, dont la stabilité et la versatilité devrait dépendre des conditions physico-chimiques réunies dans les sous-domaines concernés du noyau, en réponse aux signaux développementaux et environnementaux. L'ASR pourrait contribuer à la mise en place des domaines subnucléaires favorisant la structuration et le fonctionnement de ces complexes multimériques.

L'objectif premier de ce travail de thèse, le positionnement de la protéine régulatrice VvMSA dans les voies de la signalisation glucidique, nous a amené vers la question essentielle de ses rôles biologiques. Le but final de se projeter au delà des fonctions moléculaires des ASR et la mise en œuvre des approches globales d'analyse du métabolome, du métabolisme énergétique et du protéome nucléaire, couplées au profilage d'expression des gènes cibles, nous ont permis de dresser une vision beaucoup plus large et complète de leur fonctionnement physiologique. Nous avons mis en évidence l'impact de la répression de VvMSA sur la sensibilité accrue des cellules à la carence en sucres et en nitrates, sur le transport du glucose et ses flux métaboliques, et enfin, sur l'expression de protéines nucléaires impliquées dans des complexes multimériques. Ces résultats représentent une ouverture vers les interactions entre le métabolisme glucidique et le contrôle transcriptionnel de l'expression génique au travers de la stabilité des structures subnucléaires et du remodelage de la chromatine.

Références bibliographiques

Abreu-Neto JB, Turchetto-Zolet AC, Oliveira LFV, Bodanese Zanettini MH, Margis-Pinheiro M (2013) Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants. FEBS Journal 280 (7):1604-1616

Afoufa-Bastien D (2010) 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. Thèse

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 macroarray expression profiling. BMC plant biology 10 (1):245

Agasse A (2004) Signalisation glucidique et transport des sucres dans la baie de raisin (Vitis vinifera L.) au cours de la maturation. Poitiers,

Aki T, Konishi M, Kikuchi T, Fujimori T, Yoneyama T, Yanagisawa S (2007) Distinct modulations of the hexokinase1-mediated glucose response and hexokinase1-independent processes by HYS1/CPR5 in Arabidopsis. Journal of experimental botany 58 (12):3239-3248

Alderson A, Sabelli PA, Dickinson JR, Cole D, Richardson M, Kreis M, Shewry PR, Halford NG (1991) Complementation of snf1, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. Proceedings of the National Academy of Sciences 88 (19):8602-8605

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 (7):2537-2542

Amitai-Zeigerson H, Scolnik PA, Bar-Zvi D (1995) Tomato< i> Asr1</i> mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. Plant Science 110 (2):205-213

Antão CM, Malcata FX (2005) Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. Plant Physiology and Biochemistry 43 (7):637-650

Aoki N, Hirose T, Takahashi S, Ono K, Ishimaru K, Ohsugi R (1999) Molecular cloning and expression analysis of a gene for a sucrose transporter in maize (Zea mays L.). Plant and Cell Physiology 40 (10):1072-1078

Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, León P (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. Genes Development 14 (16):2085-2096

Arenhart R, Margis R, Margis-Pinheiro M (2012a) The rice ASR5 protein: A putative role in the response to aluminium photosynthesis disturbance. Plant signaling behavior 7 (10):0--1

Arenhart RA, Bai Y, de Oliveira LFW, Neto LB, Schunemann M, dos Santos Maraschin F, Mariath J, Silverio A, Sachetto-Martins G, Margis R (2013) New insights into aluminum tolerance in rice: ASR5 protein binds in the STAR1 promoter and other aluminum responsive genes. Molecular plant:sst160

Arenhart RA, DE L, CÉSAR J, PEDRON M, CARVALHO FE, DA SILVEIRA JAG, ROSA SB, CAVERZAN A, ANDRADE C, SCHÜNEMANN M (2012b) Involvement of ASR genes in aluminium tolerance mechanisms in rice. Plant, Cell Environment

Arroyo A, Bossi F, Finkelstein RR, León P (2003) Three genes that affect sugar sensing (abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in Arabidopsis. Plant physiology 133 (1):231-242

Ashcroft S, Randle P (1970) Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets. Biochem J 119:5-15

Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thévenot P, Delrot S (2003) Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. Plant physiology 131 (1):326-334

Aubert S, Gout E, Bligny R, Douce R (1994) Multiple effects of glycerol on plant cell metabolism. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. Journal of Biological Chemistry 269 (34):21420-21427

Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. Nature 448 (7156):938-U910. doi:10.1038/nature06069

Baldwin KL, Dinh EM, Hart BM, Masson PH (2013) CACTIN is an essential nuclear protein in Arabidopsis and may be associated with the eukaryotic spliceosome. FEBS letters 587 (7):873-879

Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. The Plant Cell Online 12 (7):1153-1164

Bartel J, Krumsiek J, Theis FJ (2013) Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. Computational and structural biotechnology journal 4

Barth O, Vogt S, Uhlemann R, Zschiesche W, Humbeck K (2009) Stress induced and nuclear localized HIPP26 from Arabidopsis thaliana interacts via its heavy metal associated domain with the drought stress related zinc finger transcription factor ATHB29. Plant molecular biology 69 (1-2):213-226

Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garciarrubio A, Campos F, Covarrubias AA (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. Plant physiology 148 (1):6-24

Bearden JC (1978) Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure 533 (2):525-529

Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J (2000) Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. The Plant Cell Online 12 (7):1103-1115

Beauvoit BP, Colombié S, Monier A, Andrieu M-H, Biais B, Bénard C, Chéniclet C, Dieuaide-Noubhani M, Nazaret C, Mazat J-P (2014) Model-assisted analysis of sugar metabolism throughout tomato fruit development reveals enzyme and carrier properties in relation to vacuole expansion. The Plant Cell Online 26 (8):3224-3242

Behringer C, Bastakis E, Ranftl QL, Mayer KFX, Schwechheimer C (2014) Functional Diversification within the Family of B-GATA Transcription Factors through the Leucine-Leucine-Methionine Domain. Plant physiology 166 (1):293-305

Bellettre A, Couillerot J-P, Vasseur J (1999) Effects of glycerol on somatic embryogenesis in Cichorium leaves. Plant Cell Reports 19 (1):26-31

Ben-Naim O, Eshed R, Parnis A, Teper-Bamnolker P, Shalit A, Coupland G, Samach A, Lifschitz E (2006) The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. The Plant Journal 46 (3):462-476

Bernier G, Havelange Ae, Houssa C, Petitjean A, Lejeune P (1993) Physiological signals that induce flowering. The Plant Cell 5 (10):1147

Biais B, Bénard C, Beauvoit B, Colombié S, Prodhomme D, Ménard G, Bernillon S, Gehl B, Gautier H, Ballias P (2014) Remarkable reproducibility of enzyme activity profiles in tomato fruits grown under contrasting environments provides a roadmap for studies of fruit metabolism. Plant physiology 164 (3):1204-1221

Blanc G, Lardet L, Martin A, Jacob J, Carron M (2002) Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of Hevea brasiliensis (Müll. Arg.). Journal of experimental botany 53 (373):1453-1462

Bodson M, Outlaw WH (1985) Elevation in the sucrose content of the shoot apical meristem of Sinapis alba at floral evocation. Plant Physiology 79 (2):420-424

Braun DM, Slewinski TL (2009) Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. Plant Physiology 149 (1):71-81

Brouquisse R, Gaudillère J-P, Raymond P (1998) Induction of a carbon-starvation-related proteolysis in whole maize plants submitted to light/dark cycles and to extended darkness. Plant Physiology 117 (4):1281-1291
Brouquisse R, James F, Pradet A, Raymond P (1992) Asparagine metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips. Planta 188 (3):384-395
Büttner M (2010) The Arabidopsis sugar transporter (AtSTP) family: an update. Plant Biology 12 (s1):35-41
Büttner M, Sauer N (2000) Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1465 (1-2):263-274
Çakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. The Plant Cell Online 15 (9):2165-2180
Caldana C, Li Y, Leisse A, Zhang Y, Bartholomaeus L, Fernie AR, Willmitzer L, Giavalisco P (2013) Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 73 (6):897-909
Canel C, Bailey-Serres JN, Roose ML (1995) Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. Plant physiology 108 (3):1323
Carmona MaJ, Cubas P, Martínez-Zapater JM (2002) VFL, the grapevine FLORICAULA/LEAFYortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. Plant Physiology 130 (1):68-77
Carroll AJ (2013) The Arabidopsis cytosolic ribosomal proteome: from form to function. Frontiers in plant science 4
Carroll AJ, Heazlewood JL, Ito J, Millar AH (2008) Analysis of the Arabidopsis cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. Molecular cellular proteomics 7 (2):347-369
Cavrak VV, Lettner N, Jamge S, Kosarewicz A, Bayer LM, Scheid OM (2014) How a retrotransposon exploits the plant's heat stress response for its activation. PLoS genetics 10 (1):e1004115
Chang S, Puryear JD, Dias M, Funkhouser EA, Newton RJ, Cairney J (1996) Gene expression under water deficit in loblolly pine (Pinus taeda): isolation and characterization of cDNA clones. Physiologia plantarum 97 (1):139-148
Charbit E, Legavre T, Lardet L, Bourgeois E, Ferriere N, Carron MP (2004) Identification of differentially expressed cDNA sequences and histological characteristics of Hevea brasiliensis calli in relation to their embryogenic and regenerative capacities. Plant cell reports 22 (8):539-548
Chen J-G, Jones AM (2004) AtRGS1 Function in< i> Arabidopsis thaliana</i>. Methods in enzymology 389:338-350
Chen J-G, Willard FS, Huang J, Liang J, Chasse SA, Jones AM, Siderovski DP (2003) A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. Science 301 (5640):1728-1731
Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. Nature 468 (7323):527-532
Chen L-Q, Qu X-Q, Hou B-H, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. Science 335 (6065):207-211
Chen N-Z, Zhang X-Q, Wei P-C, Chen Q-J, Ren F, Chen J, Wang X-C (2007) AtHAP3b plays a crucial role in the regulation of flowering time in Arabidopsis during osmotic stress. BMB Reports 40 (6):1083-1089
Chen Y, Ji F, Xie H, Liang J, Zhang J (2006) The regulator of G-protein signaling proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in Arabidopsis seed germination. Plant Physiology 140 (1):302-310
Chêne A, Vembar SS, Rivière L, Lopez-Rubio JJ, Claes A, Siegel TN, Sakamoto H, Scheidig-Benatar C, Hernandez-Rivas R, Scherf A (2012) PfAlbas constitute a new eukaryotic DNA/RNA-binding protein family in malaria parasites. Nucleic acids research 40 (7):3066-3077

Cheng C-l, Acedo GN, Cristinsin M, Conkling MA (1992) Sucrose mimics the light induction of Arabidopsis nitrate reductase gene transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences 89 (5):1861-1864
Cheng W-H, Taliercio EW, Chourey PS (1999) Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (Incw1) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize. Proceedings of the National Academy of Sciences 96 (18):10512-10517
Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. Science Signalling 14 (11):2723
Chincinska IA, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C (2008) Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. Plant Physiology 146 (2):515-528
Chiou T-J, Bush DR (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. Proceedings of the National Academy of Sciences 95 (8):4784-4788
Chivasa S, Tomé DF, Slabas AR (2013) UDP-glucose pyrophosphorylase is a novel plant cell death regulator. Journal of proteome research 12 (4):1743-1753
Cho MH, Lim H, Shin DH, Jeon JS, Bhoo SH, Park YI, Hahn TR (2011) Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in Arabidopsis thaliana. New Phytologist 190 (1):101-112
Cho Y-H, Sheen J, Yoo S-D (2010) Low glucose uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from stress and defense hormone abscisic acid and C2H4 responses in Arabidopsis. Plant physiology 152 (3):1180-1182
Cho YH, Yoo SD, Sheen J (2006) Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. Cell 127 (3):579-589
Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski LA (2001) Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in Arabidopsis. Biochemical Journal 354 (Pt 1):67
Conde C, Agasse A, Glissant D, Tavares R, Gerós H, Delrot S (2006) Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. Plant physiology 141 (4):1563-1577
Confraria A, Martinho C, Elias A, Rubio-Somoza I, Baena-González E (2013) miRNAs mediate SnRK1-dependent energy signaling in Arabidopsis. Frontiers in plant science 4
Contour-Ansel D, Torres-Franklin ML, Zuily-Fodil Y, De Carvalho MHC (2010) An aspartic acid protease from common bean is expressed 'on call'during water stress and early recovery. Journal of plant physiology 167 (18):1606-1612
Coore H, Randle P (1964) Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro. Biochemical Journal 93 (1):66
Corbesier L, Lejeune P, Bernier G (1998) The role of carbohydrates in the induction of flowering in Arabidopsis thaliana: comparison between the wild type and a starchless mutant. Planta 206 (1):131-137
Cordoba E, Aceves-Zamudio DL, Hernandez-Bernal AF, Ramos-Vega M, Leon P (2014) Sugar regulation of SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1 (STP1) expression in Arabidopsis thaliana. J Exp Bot. doi:10.1093/jxb/eru394
Cortès S, Gromova M, Evrard A, Roby C, Heyraud A, Rolin DB, Raymond P, Brouquisse RM (2003) In plants, 3-O-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. Plant physiology 131 (2):824-837
Cottage A, Mott EK, Kempster JA, Gray JC (2010) The Arabidopsis plastid-signalling mutant gun1 (genomes uncoupled1) shows altered sensitivity to sucrose and abscisic acid and alterations in early seedling development. Journal of experimental botany:erq186
Črnigoj M, Podlesek Z, Zorko M, Jerala R, Anderluh G, Ulrih NP (2013) Interactions of archaeal chromatin proteins Alba1 and Alba2 with nucleic acids. PloS one 8 (2):e58237

da-Silva WS, Rezende GL, Galina A (2001) Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. Journal of experimental botany 52 (359):1191-1201
Dai JR, Liu B, Feng DR, Liu H, He Y, Qi K, Wang HB, Wang JF (2011) MpAsr encodes an intrinsically unstructured protein and enhances osmotic tolerance in transgenic Arabidopsis. Plant cell reports 30 (7):1219-1230
Damari-Weissler H, Ginzburg A, Gidoni D, Mett A, Krassovskaya I, Weber AP, Belausov E, Granot D (2007) Spinach SoHXK1 is a mitochondria-associated hexokinase. Planta 226 (4):1053-1058
De Veylder L, de Almeida Engler J, Burssens S, Manevski A, Lescure B, Van Montagu M, Engler G, Inzé D (1999) A new D-type cyclin of Arabidopsis thaliana expressed during lateral root primordia formation. Planta 208 (4):453-462
de Vienne D, Leonardi A, Damerval C, Zivy M (1999) Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress responses in maize. Journal of experimental botany 50 (332):303-309
Debast S, Nunes-Nesi A, Hajirezaei MR, Hofmann J, Sonnewald U, Fernie AR, Börnke F (2011) Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters responsiveness to hormones during sprouting. Plant physiology 156 (4):1754-1771
Dekkers BJ, Schuurmans JA, Smeekens SC (2004) Glucose delays seed germination in Arabidopsis thaliana. Planta 218 (4):579-588
Dekkers BJW, Schuurmans JAMJ, Smeekens SCM (2008) Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in Arabidopsis. Plant molecular biology 67 (1):151-167
Delatte TL, Sedijani P, Kondou Y, Matsui M, de Jong GJ, Somsen GW, Wiese-Klinkenberg A, Primavesi LF, Paul MJ, Schluepmann H (2011) Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. Plant physiology 157 (1):160-174
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 (1):429
Denison FC, Paul A-L, Zupanska AK, Ferl RJ 14-3-3 proteins in plant physiology. In: Seminars in cell developmental biology, 2011. vol 7. Elsevier, pp 720-727
Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolaï M, Bedu M, Robaglia C, Meyer C (2007) The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. EMBO reports 8 (9):864-870
Díaz-Riquelme J, Lijavetzky D, Martínez-Zapater JM, Carmona MJ (2009) Genome-wide analysis of MIKCC-type MADS box genes in grapevine. Plant Physiology 149 (1):354-369
Dobrenel T, Marchive C, Azzopardi M, Clément G, Moreau M, Sormani R, Robaglia C, Meyer C (2013) Sugar metabolism and the plant target of rapamycin kinase: a sweet operaTOR? Frontiers in plant science 4
Dobrenel T, Marchive C, Sormani R, Moreau M, Mozzo M, Montané M-H, Menand B, Robaglia C, Meyer C (2011) Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase. Biochemical Society Transactions 39 (2):477-481
Dóczi R, Kondrák M, Kovács G, Beczner F, Bánfalvi Z (2005) Conservation of the drought-inducible< i> DS2</i> genes and divergences from their< i> ASR</i> paralogues in solanaceous species. Plant Physiology and Biochemistry 43 (3):269-276
Doidy J, Grace E, Kühn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D (2012) Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. Trends in plant science 17 (7):413-422
Dominguez PG, Frankel N, Mazuch J, Balbo I, Iusem ND, Fernie AR, Carrari F (2013) ASR1 MEDIATES GLUCOSE-HORMONE CROSSTALK BY AFFECTING SUGAR TRAFFICKING IN TOBACCO PLANTS. Plant physiology

Dykema PE, Sipes PR, Marie A, Biermann BJ, Crowell DN, Randall SK (1999) A new class of proteins capable of binding transition metals. Plant molecular biology 41 (1):139-150
Eckardt NA (2003) The function of SUT2/SUC3 sucrose transporters: the debate continues. The Plant Cell Online 15 (6):1259-1262
Edwards D, Murray JAH, Smith AG (1998) Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in Arabidopsis. Plant physiology 117 (3):1015-1022
Ehness R, Ecker M, Godt DE, Roitsch T (1997) Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. The Plant Cell Online 9 (10):1825-1841
Elias Pereira G (2005) Contribution de la chimiométrie à la caractérisation des fruits: application des profils métaboliques du raisin à l'étude des effets du climat, du sol et du cépage. Bordeaux 2,
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 Physiology 141 (1):196-207
Eom J-S, Cho J-I, Reinders A, Lee S-W, Yoo Y, Tuan PQ, Choi S-B, Bang G, Park Y-I, Cho M-H (2011) Impaired function of the tonoplast-localized sucrose transporter in rice, OsSUT2, limits the transport of vacuolar reserve sucrose and affects plant growth. Plant physiology 157 (1):109-119
Eveland AL, Jackson DP (2011) Sugars, signalling, and plant development. Journal of Experimental Botany:err379
Fernie AR, Roessner U, Geigenberger P (2001) The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. Plant Physiology 125 (4):1967-1977
Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S (1999) Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. Plant Physiology 120 (4):1083-1094
Fischer K, Weber A (2002) Transport of carbon in non-green plastids. Trends in plant science 7 (8):345-351
Fischer L, Lipavska H, Hausman J-F, Opatrny Z (2008) Morphological and molecular characterization of a spontaneously tuberizing potato mutant: an insight into the regulatory mechanisms of tuber induction. BMC plant biology 8 (1):117
Frankel N, Hasson E, Iusem ND, Rossi MS (2003) Adaptive evolution of the water stress-induced gene Asr2 in Lycopersicon species dwelling in arid habitats. Molecular biology and evolution 20 (12):1955-1962
Frankel N, Nunes-Nesi A, Balbo I, Mazuch J, Centeno D, Iusem ND, Fernie AR, Carrari F (2007) ci21A/Asr1 expression influences glucose accumulation in potato tubers. Plant molecular biology 63 (5):719-730
Frost CJ, Nyamdari B, Tsai C-J, Harding SA (2012) The tonoplast-localized sucrose transporter in Populus (PtaSUT4) regulates whole-plant water relations, responses to water stress, and photosynthesis. PloS one 7 (8):e44467
Fujiki Y, Ito M, Nishida I, Watanabe A (2000) Multiple signaling pathways in gene expression during sugar starvation. Pharmacological analysis of din gene expression in suspension-cultured cells of Arabidopsis. Plant physiology 124 (3):1139-1148
Galina A, da Silva WS (2000) Hexokinase activity alters sugar-nucleotide formation in maize root homogenates. Phytochemistry 53 (1):29-37
Gamborg OLc, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental cell research 50 (1):151-158
Genix P, Bligny R, Martin J-B, Douce R (1990) Transient accumulation of asparagine in sycamore cells after a long period of sucrose starvation. Plant physiology 94 (2):717-722
Gentry M, Hennig L (2014) Remodelling chromatin to shape development of plants. Experimental cell

research 321 (1):40-46

Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in arabidopsis. Plant Cell 12 (7):1117-1126. doi:10.2307/3871259

Gibson SI, Laby RJ, Kim D (2001) The sugar-insensitive1(sis1) mutant of Arabidopsis is allelic to ctr1. Biochemical and biophysical research communications 280 (1):196-203

Gilad A, Amitai-Zeigerson H, Bar-Zvi D, Scolnik PA (1997) Asr1, a tomato water-stress regulated gene: genomic organization, developmental regulation and DNA-binding activity. Acta Horticulturae:447-454

Givan CV (1979) Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. Phytochemistry 18 (3):375-382

Glissant D (2005) Approches transcriptomique et fonctionnelle du développement et du transport des sucres dans la baie de raisin (Vitis vinifera L.). Poitiers,

Godt DE, Riegel A, Roitsch T (1995) Regulation of Sucrose Synthase Expression in< i> Chenopodium rubrum</i>: Characterization of Sugar Induced Expression in Photoautotrophic Suspension Cultures and Sink Tissue Specific Expression in Plants. Journal of plant physiology 146 (3):231-238

Golan I, Dominguez PG, Konrad Z, Shkolnik-Inbar D, Carrari F, Bar-Zvi D (2014) Tomato ABSCISIC ACID STRESS RIPENING (ASR) Gene Family Revisited. PloS one 9 (10):e107117

Goldgur Y, Rom S, Ghirlando R, Shkolnik D, Shadrin N, Konrad Z, Bar-Zvi D (2007) Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress-and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state. Plant physiology 143 (2):617-628

Gómez LD, Baud S, Gilday A, Li Y, Graham IA (2006) Delayed embryo development in the ARABIDOPSIS TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. The Plant Journal 46 (1):69-84

Gómez LD, Gilday A, Feil R, Lunn JE, Graham IA (2010) AtTPS1-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. The Plant Journal 64 (1):1-13

Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ (1994) Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. The Plant Cell Online 6 (5):761-772

Guérinier T, Millan L, Crozet P, Oury C, Rey F, Valot B, Mathieu C, Vidal J, Hodges M, Thomas M (2013) Phosphorylation of p27KIP1 homologs KRP6 and 7 by SNF1-related protein kinase–1 links plant energy homeostasis and cell proliferation. The Plant Journal 75 (3):515-525

Guo P, Bai G, Carver B, Li R, Bernardo A, Baum M (2007) Transcriptional analysis between two wheat near-isogenic lines contrasting in aluminum tolerance under aluminum stress. Molecular Genetics and Genomics 277 (1):1-12

Guo R, Xu X, Carole B, Li X, Gao M, Zheng Y, Wang X (2013) Genome-wide identification, evolutionary and expression analysis of the aspartic protease gene superfamily in grape. BMC genomics 14 (1):554

Gutzat R, Borghi L, Fütterer J, Bischof S, Laizet Yh, Hennig L, Feil R, Lunn J, Gruissem W (2011) RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN controls the transition to autotrophic plant development. Development 138 (14):2977-2986

Hao L, Wang H, Sunter G, Bisaro DM (2003) Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. The Plant Cell Online 15 (4):1034-1048

Hara M, Kumagai K, Kuboi T (2002) Characterization and Expression of a Water Stress Responsive Gene from a Seashore Plant Calystegia soldanella. Plant Biotechnology 19 (4):277-281

Hardie DG (2005) New roles for the LKB1→ AMPK pathway. Current opinion in cell biology 17 (2):167-173

Hardie DG (2011) AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function. Genes Development 25 (18):1895-1908
Harn CH, Bae JM, Lee SS, Min SR, Liu JR (2000) Presence of multiple cDNAs encoding an isoform of ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit from sweet potato and characterization of expression levels. Plant and Cell Physiology 41 (11):1235-1242
Harter K, Talke-Messerer C, Barz W, Schäfer E (1993) Light-and sucrose-dependent gene expression in photomixotrophic cell suspension cultures and protoplasts of rape (Brassica napus L.). The Plant Journal 4 (3):507-516
Harthill JE, Meek SEM, Morrice N, Peggie MW, Borch J, Wong BHC, MacKintosh C (2006) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. The Plant Journal 47 (2):211-223
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. Journal of experimental botany 58 (8):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 physiology 153 (1):211-221
Hellmann H, Funck D, Rentsch D, Frommer WB (2000) Hypersensitivity of an Arabidopsis sugar signaling mutant toward exogenous proline application. Plant Physiology 122 (2):357-368
Hendriks JH, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M, Geigenberger P (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. Plant Physiology 133 (2):838-849
Henriques R, Magyar Z, Monardes A, Khan S, Zalejski C, Orellana J, Szabados L, de la Torre C, Koncz C, Bögre L (2010) Arabidopsis S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1–E2F pathway activity. The EMBO journal 29 (17):2979-2993
Herold A, Lewis D (1977) Mannose and green plants: occurrence, physiology and metabolism, and use as a tool to study the role of orthophosphate. New Phytologist:1-40
Ho S-L, Chao Y-C, Tong W-F, Yu S-M (2001) Sugar coordinately and differentially regulates growth-and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. Plant Physiology 125 (2):877-890
Hofmann J, Hess PH, Szakasits D, Blöchl A, Wieczorek K, Daxböck-Horvath S, Bohlmann H, van Bel AJ, Grundler FM (2009) Diversity and activity of sugar transporters in nematode-induced root syncytia. Journal of experimental botany 60 (11):3085-3095
Hong SH, Kim IJ, Yang DC, Chung WI (2002) Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from Cucumis melo. Journal of experimental botany 53 (378):2271-2272
Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) NewAgrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic research 2 (4):208-218
Hsu YF, Yu SC, Yang CY, Wang CS (2011) Lily ASR protein-conferred cold and freezing resistance in Arabidopsis. Plant Physiology and Biochemistry 49 (9):937-945
Hu W, Huang C, Deng X, Zhou S, Chen L, Li Y, Wang C, Ma Z, Yuan Q, Wang Y (2013) TaASR1, a transcription factor gene in wheat, confers drought stress tolerance in transgenic tobacco. Plant, Cell Environment
Huang J, Taylor JP, Chen J-G, Uhrig JF, Schnell DJ, Nakagawa T, Korth KL, Jones AM (2006) The plastid protein THYLAKOID FORMATION1 and the plasma membrane G-protein GPA1 interact in a novel sugar-signaling mechanism in Arabidopsis. The Plant Cell Online 18 (5):1226-1238
Hwang I, Sheen J (2001) Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. Nature 413 (6854):383-389
Iadevaia V, Huo Y, Zhang Z, Foster L, Proud C (2012) Roles of the mammalian target of rapamycin, mTOR, in controlling ribosome biogenesis and protein synthesis. Biochemical Society Transactions 40 (1):168

Ichimura K, Kohata K, Goto R (2000) Soluble carbohydrates in Delphinium and their influence on sepal abscission in cut flowers. Physiologia Plantarum 108 (3):307-313
Ishimaru K, Hirose T, Aoki N, Takahashi S, Ono K, Yamamoto S, Wu J, Saji S, Baba T, Ugaki M (2001) Antisense expression of a rice sucrose transporter OsSUT1 in rice (Oryza sativa L.). Plant and cell physiology 42 (10):1181-1185
Iusem ND, Bartholomew DM, Hitz WD, Scolnik PA (1993) Tomato (Lycopersicon esculentum) transcript induced by water deficit and ripening. Plant physiology 102 (4):1353
Jang J-C, León P, Zhou L, Sheen J (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. The Plant Cell Online 9 (1):5-19
Jang JC, Sheen J (1994) Sugar sensing in higher plants. The Plant Cell Online 6 (11):1665-1679
Jeanneau M, Gerentes D, Foueillassar X, Zivy M, Vidal J, Toppan A, Perez P (2002) Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the Zm-Asr1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4–PEPC. Biochimie 84 (11):1127-1135
Jia Y, Viswakarma N, Reddy JK (2014) Med1 Subunit of the Mediator Complex in Nuclear Receptor-Regulated Energy Metabolism, Liver Regeneration, and Hepatocarcinogenesis. Gene expression 16 (2):63
Joo J, Lee YH, Kim Y-K, Nahm BH, Song SI (2013) Abiotic stress responsive rice ASR1 and ASR3 exhibit different tissue-dependent sugar and hormone-sensitivities. Molecules and cells:1-15
Jossier M, Bouly JP, Meimoun P, Arjmand A, Lessard P, Hawley S, Grahame Hardie D, Thomas M (2009) SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 59 (2):316-328
Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, Zaccai M, Scolnik PA, Bar-Zvi D (2004) The water-and salt-stress-regulated Asr1 (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. Biochemical Journal 381 (Pt 2):373
Kang B-H, Xiong Y, Williams DS, Pozueta-Romero D, Chourey PS (2009) Miniature1-encoded cell wall invertase is essential for assembly and function of wall-in-growth in the maize endosperm transfer cell. Plant physiology 151 (3):1366-1376
Karve A, Rauh BL, Xia X, Kandasamy M, Meagher RB, Sheen J, d Moore B (2008) Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in Arabidopsis. Planta 228 (3):411-425
Keller E (1993) Sucrose, cytokinin, and ethylene influence formation of in vitro bulblets in onion and leek. Genetic Resources and Crop Evolution 40 (2):113-120
Kim M, Lim J-H, Ahn CS, Park K, Kim GT, Kim WT, Pai H-S (2006) Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in Nicotiana benthamiana. The Plant Cell 18 (9):2341-2355
Kim Y-K, Kim S, Shin Y-j, Hur Y-S, Kim W-Y, Lee M-S, Cheon C-I, Verma DPS (2014) Ribosomal protein S6, a target of rapamycin, is involved in the regulation of rRNA genes by possible epigenetic changes in Arabidopsis. Journal of Biological Chemistry 289 (7):3901-3912
Kiyosue T, Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of< i> Arabidopsis</i>, encodes a putative sugar transporter. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1370 (2):187-191
Klein D, Stitt M (1998) Effects of 2-deoxyglucose on the expression of rbcS and the metabolism of Chenopodium rubrum cell-suspension cultures. Planta 205 (2):223-234
Klepek Y-S, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R, Sauer N (2005) Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H+-symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. The Plant Cell Online 17 (1):204-218
Klepek Y-S, Volke M, Konrad KR, Wippel K, Hoth S, Hedrich R, Sauer N (2009) Arabidopsis thaliana POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H+ symporters in pollen and young xylem cells. Journal of experimental botany:erp322
Kojima H, Suzuki T, Kato T, Enomoto Ki, Sato S, Kato T, Tabata S, Sáez-Vasquez J, Echeverría M, Nakagawa T (2007) Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of Arabidopsis thaliana

and its role in ribosome synthesis, growth and development. The Plant Journal 49 (6):1053-1063
Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (31):11118-11123
Konrad Z, Bar-Zvi D (2008) Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated ASR1 protein and the osmolyte glycine-betaine. Planta 227 (6):1213-1219
Kosová Kr, Vítámvás P, Planchon Sb, Renaut J, Vanková R, Prášil IT (2013) Proteome analysis of cold response in spring and winter wheat (Triticum aestivum) crowns reveals similarities in stress adaptation and differences in regulatory processes between the growth habits. Journal of proteome research 12 (11):4830-4845
Krishnan P, Kruger N, Ratcliffe R (2005) Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. Journal of experimental botany 56 (410):255-265
Krügel U, He H-X, Gier K, Reins J, Chincinska I, Grimm B, Schulze WX, Kühn C (2012) The potato sucrose transporter StSUT1 interacts with a DRM-associated protein disulfide isomerase. Molecular plant 5 (1):43-62
Krügel U, Kühn C (2013) Post-translational regulation of sucrose transporters by direct protein–protein interactions. Frontiers in plant science 4
Kühn C, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R, Frommer WB (1997) Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. Science 275 (5304):1298-1300
Kühn C, Grof CP (2010) Sucrose transporters of higher plants. Current Opinion in Plant Biology 13 (3):287-297
KUSHWAH S, LAXMI A (2013) The interaction between glucose and cytokinin signal transduction pathway in Arabidopsis thaliana. Plant, cell environment
Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. Cell 149 (2):274-293
Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. Journal of experimental botany 65 (3):799-807
Lebrun L, Blanchard M (1987) Efficient somatic embryogenesis in Vitis sp. from plant to plant. Cell culture techniques applied to plant production and plant breeding. E.N.I.T.H.P.,
LeClere S, Schmelz EA, Chourey PS (2010) Sugar levels regulate tryptophan-dependent auxin biosynthesis in developing maize kernels. Plant physiology 153 (1):306-318
Lecourieux F, Kappel C, Lecourieux D, Serrano A, Torres E, Arce-Johnson P, Delrot S (2013) An update on sugar transport and signalling in grapevine. Journal of experimental botany:ert394
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 physiology 152 (2):1096-1106
Lee K-W, Chen P-W, Lu C-A, Chen S, Ho T-HD, Yu S-M (2009) Coordinated responses to oxygen and sugar deficiency allow rice seedlings to tolerate flooding. Science Signaling 2 (91):ra61
Lemonnier P, Gaillard C, Veillet F, Verbeke J, Lemoine R, Coutos-Thévenot P, La Camera S (2014) Expression of Arabidopsis sugar transport protein STP13 differentially affects glucose transport activity and basal resistance to Botrytis cinerea. Plant molecular biology:1-12
Lenhard M, Jürgens G, Laux T (2002) The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. Development 129 (13):3195-3206
León P, Sheen J (2003) Sugar and hormone connections. Trends in plant science 8 (3):110-116
Li Y, Lee KK, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G, Bevan MW (2006) Establishing glucose-and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. Genome research 16 (3):414-427

Lilley JLS, Gee CW, Sairanen I, Ljung K, Nemhauser JL (2012) An endogenous carbon-sensing pathway triggers increased auxin flux and hypocotyl elongation. Plant physiology 160 (4):2261-2270
Lin PC, Hwang SG, Endo A, Okamoto M, Koshiba T, Cheng WH (2007) Ectopic expression of ABSCISIC ACID 2/GLUCOSE INSENSITIVE 1 in Arabidopsis promotes seed dormancy and stress tolerance. Plant physiology 143 (2):745-758
Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK (2006) Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research development. Pharmaceutical research 23 (6):1075-1088
Liu HY, Dai JR, Feng DR, Liu B, Wang HB, Wang JF (2010) Characterization of a novel plantain Asr gene, MpAsr, that is regulated in response to infection of Fusarium oxysporum f. sp. cubense and abiotic stresses. Journal of integrative plant biology 52 (3):315-323
Liu X, Baird WV (2003) The ribosomal small-subunit protein S28 gene from Helianthus annuus (Asteraceae) is down-regulated in response to drought, high salinity, and abscisic acid. American journal of botany 90 (4):526-531
Liu Y, Bassham DC (2010) TOR is a negative regulator of autophagy in Arabidopsis thaliana. PLoS One 5 (7):e11883
Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2< sup>− ΔΔCT</sup> Method. methods 25 (4):402-408
Lloyd G, McCown B Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture. In: Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society, 1980. pp 421-427
Loewus FA, Murthy PP (2000) < i> myo</i>-Inositol metabolism in plants. Plant Science 150 (1):1-19
Loreti E AA, Perata P. (2000) Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos. Plant physiology
Loreti E, De Bellis L, Alpi A, Perata P (2001) Why and how do plant cells sense sugars? Annals of Botany 88 (5):803-812
Lovas A, Bimbo A, Szabó L, Bánfalvi Z (2003) Antisense repression of StubGAL83 affects root and tuber development in potato. The Plant Journal 33 (1):139-147
Lunn JE, Feil R, Hendriks JHM, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible WR, Carillo P, Hajirezaei MR, Stitt M (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in Arabidopsis thaliana. Biochemical Journal 397 (Pt 1):139
M'Batchi B, Delrot S (1988) Stimulation of sugar exit from leaf tissues ofVicia faba L. Planta 174 (3):340-348
M'Batchi B, Pichelin D, Delrot S (1985) The effect of sugars on the binding of [203Hg]-p-chloromercuribenzenesulfonic acid to leaf tissues. Plant physiology 79 (2):537-542
Mahfouz MM, Kim S, Delauney AJ, Verma DPS (2006) Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. The Plant Cell Online 18 (2):477-490
Martin T, Hellmann H, Schmidt R, Willmitzer L, Frommer WB (1997) Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. The Plant Journal 11 (1):53-62
Martin T, Oswald O, Graham IA (2002) Arabidopsis seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon: nitrogen availability. Plant physiology 128 (2):472-481
Martínez-Barajas E, Delatte T, Schluepmann H, De Jong GJ, Somsen GW, Nunes C, Primavesi LF, Coello P, Mitchell RA, Paul MJ (2011) Wheat grain development is characterized by remarkable trehalose 6-phosphate accumulation pregrain filling: tissue distribution and relationship to SNF1-related protein kinase1 activity. Plant physiology 156 (1):373-381
Maskin L, Maldonado S, Iusem ND (2008) Tomato leaf spatial expression of stress-induced Asr genes. Molecular biology reports 35 (4):501-505

Matsukura C-a, Saitoh T, Hirose T, Ohsugi R, Perata P, Yamaguchi J (2000) Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. Plant Physiology 124 (1):85-94

Maurel K, Sakr S, Gerbe F, Guilliot A, Bonhomme M, Rageau R, Pétel G (2004) Sorbitol uptake is regulated by glucose through the hexokinase pathway in vegetative peach-tree buds. Journal of experimental botany 55 (398):879-888

Medici A (2010) Les gènes de transporteurs de sucres dans la réponse au déficit hydrique et le rôle des protéines ASR dans la régulation de l'expression du gène du transporteur d'hexoses VvHT1 chez la Vigne (Vitis vinifera). PhD thesis

Medici A, Laloi M, Atanassova R (2014) Profiling of Sugar Transporter Genes in Grapevine Coping with Water Deficit. FEBS letters

Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C, Robaglia C (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. Proceedings of the National Academy of Sciences 99 (9):6422-6427

Mironov V, De Veylder L, Van Montagu M, Inzé D (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants—the nexus. The Plant Cell Online 11 (4):509-521

Mishra BS, Singh M, Aggrawal P, Laxmi A (2009) Glucose and auxin signaling interaction in controlling Arabidopsis thaliana seedlings root growth and development. PLoS One 4 (2):e4502

Mizoguchi T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Kamada H, Shinozaki K (1995) Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in Arabidopsis thaliana. Febs Letters 358 (2):199-204

Montaldi E (1969) Gibberellin-sugar interaction regulating the growth habit of bermudagrass (Cynodon dactylon (L) Pers). Cellular and Molecular Life Sciences 25 (1):91-92

Montané M-H, Menand B (2013) ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. Journal of experimental botany 64 (14):4361-4374

Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. Science Signalling 300 (5617):332

Morcuende R, Krapp A, Hurry V, Stitt M (1998) Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α-oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. Planta 206 (3):394-409

Moretti MB, Maskin L, Gudesblat G, García SC, Iusem ND (2006) ASR1, a stress induced tomato protein, protects yeast from osmotic stress. Physiologia plantarum 127 (1):111-118

Morimoto T, Suzuki Y, Yamaguchi I (2002) Effects of partial suppression of ribosomal protein S6 on organ formation in Arabidopsis thaliana. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 66 (11):2437-2443

Morkunas I, Borek S, Formela M, Ratajczak L (2012) Plant responses to sugar starvation. Carbohydrates–comprehensive studies on glycobiology and glycotechnology New York NY: InTech:409-438

Muller A, Philipps G, Gigot C (1980) Properties of condensed chromatin in barley nuclei. Planta 149 (1):69-77

Müller R, Nilsson L, Nielsen LK, Hamborg Nielsen T (2005) Interaction between phosphate starvation signalling and hexokinase-independent sugar sensing in Arabidopsis leaves. Physiologia Plantarum 124 (1):81-90

Munnik T, Testerink C (2009) Plant phospholipid signaling:“in a nutshell”. Journal of lipid research 50 (Supplement):S260-S265

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum 15 (3):473-497

Murray MG, Key JL (1978) 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid-enhanced phosphorylation of soybean nuclear proteins. Plant physiology 61 (2):190-198

Na H, Kim KW, Kwack Y, Kim SK, Chun C (2007) Comparative anatomy of embryogenic and non-embryogenic calli frompimpinella brachycarpa. Journal of Plant Biology 50 (3):344-350
Nagaraj VJ, Riedl R, Boller T, Wiemken A, Meyer AD (2001) Light and sugar regulation of the barley sucrose: fructan 6-fructosyltransferase promoter. Journal of plant physiology 158 (12):1601-1607
Nagata T, Hara H, Saitou K, Kobashi A, Kojima K, Yuasa T, Ueno O (2012) Activation of ADP-Glucose Pyrophosphorylase Gene Promoters by a WRKY Transcription Factor, AtWRKY20, in Arabidopsis thaliana L. and Sweet Potato (Ipomoea batatas Lam.). Plant Production Science 15 (1):10-18
Nakamura K, Ohto M-a, Yoshida N, Nakamura K (1991) Sucrose-induced accumulation of β-amylase occurs concomitant with the accumulation of starch and sporamin in leaf-petiole cuttings of sweet potato. Plant Physiology 96 (3):902-909
Nelissen B, Wachter R, Goffeau A (1997) Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of Saccharomyces cerevisiae. FEMS microbiology reviews 21 (2):113-134
Neuhaus HE (2007) Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. FEBS letters 581 (12):2223-2226
Niittylä T, Fuglsang AT, Palmgren MG, Frommer WB, Schulze WX (2007) Temporal analysis of sucrose-induced phosphorylation changes in plasma membrane proteins of Arabidopsis. Molecular Cellular Proteomics 6 (10):1711-1726
Noël G, Tognetti JA, Pontis HG (2001) Protein kinase and phosphatase activities are involved in fructan synthesis initiation mediated by sugars. Planta 213 (4):640-646
Noiraud N, Delrot S, Lemoine R (2000) The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. Plant Physiology 122 (4):1447-1456
Nørholm MH, Nour-Eldin HH, Brodersen P, Mundy J, Halkier BA (2006) Expression of the< i> Arabidopsis</i> high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death. FEBS letters 580 (9):2381-2387
Nowacki J, Bandurski RS (1980) Myo-inositol esters of indole-3-acetic acid as seed auxin precursors of Zea mays L. Plant physiology 65 (3):422-427
Nühse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC (2004) Phosphoproteomics of the Arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database. The Plant Cell Online 16 (9):2394-2405
Nunes C, O'Hara LE, Primavesi LF, Delatte TL, Schluepmann H, Somsen GW, Silva AB, Fevereiro PS, Wingler A, Paul MJ (2013) The trehalose 6-phosphate/SnRK1 signaling pathway primes growth recovery following relief of sink limitation. Plant physiology 162 (3):1720-1732
Nunes C, Primavesi LF, Patel MK, Martinez-Barajas E, Powers SJ, Sagar R, Fevereiro PS, Davis BG, Paul MJ (2012) Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. Plant Physiology and Biochemistry
Oliveira J, Tavares RM, Gerós H (2002) Utilization and transport of glucose in Olea europaea cell suspensions. Plant and cell physiology 43 (12):1510-1517
Oosten JJM, Gerbaud A, Huijser C, Dijkwel PP, Chua NH, Smeekens S (1997) An Arabidopsis mutant showing reduced feedback inhibition of photosynthesis. The Plant Journal 12 (5):1011-1020
Padmanabhan V, Dias DM, Newton RJ (1997) Expression analysis of a gene family in loblolly pine (Pinus taeda L.) induced by water deficit stress. Plant molecular biology 35 (6):801-807
Pan X, Yang X, Lin G, Zou R, Chen H, Šamaj J, Xu C (2011) Ultrastructural changes and the distribution of arabinogalactan proteins during somatic embryogenesis of banana (Musa spp. AAA cv.'Yueyoukang 1'). Physiologia plantarum 142 (4):372-389
Paul M (2008) Trehalose 6-phosphate: a signal of sucrose status. Biochem J 412:e1-e2
Pavoković D, Šola I, Hagège D, Krsnik-Rasol M (2007) Sugar-induced changes in cellular and extracellular protein and glycoprotein patterns of sugarbeet cell lines. Acta Botanica Croatica 66 (2):127-134

Pego JV, Weisbeek PJ, Smeekens SCM (1999) Mannose inhibits Arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. Plant physiology 119 (3):1017-1024
Peña L, Martín-Trillo M, Juárez J, Pina JA, Navarro L, Martínez-Zapater JM (2001) Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. Nature biotechnology 19 (3):263-267
Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. Journal of lipid research 47 (7):1597-1598
Polge C, Thomas M (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? Trends in plant science 12 (1):20-28
Pollock C (1990) The response of plants to temperature change. The Journal of Agricultural Science 115 (01):1-5
Pollock C, Cairns A (1991) Fructan metabolism in grasses and cereals. Annual review of plant biology 42 (1):77-101
Poschet G, Hannich B, Büttner M (2010) Identification and characterization of AtSTP14, a novel galactose transporter from Arabidopsis. Plant and cell physiology 51 (9):1571-1580
Poschet G, Hannich B, Raab S, Jungkunz I, Klemens PAW, Krueger S, Wic S, Neuhaus HE, Büttner M (2011) A novel Arabidopsis vacuolar glucose exporter is involved in cellular sugar homeostasis and affects the composition of seed storage compounds. Plant physiology 157 (4):1664-1676
Price J, Laxmi A, Martin SKS, Jang J-C (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. The Plant Cell Online 16 (8):2128-2150
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 (4):447-457
Radchuk R, Radchuk V, Weschke W, Borisjuk L, Weber H (2006) Repressing the expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. Plant Physiology 140 (1):263-278
Ramon M, De Smet I, Vandesteene L, Naudts M, Leyman B, Van Dijck P, Rolland F, Beeckman T, Thevelein JM (2009) Extensive expression regulation and lack of heterologous enzymatic activity of the Class II trehalose metabolism proteins from Arabidopsis thaliana. Plant, Cell Environment 32 (8):1015-1032
Ramon M, Rolland F, Sheen J (2008) Sugar sensing and signaling. The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists 6
Ransom-Hodgkins WD, Vaughn MW, Bush DR (2003) Protein phosphorylation plays a key role in sucrose-mediated transcriptional regulation of a phloem-specific proton–sucrose symporter. Planta 217 (3):483-489
Rathore RS, Garg N, Garg S, Kumar A (2009) Starch phosphorylase: role in starch metabolism and biotechnological applications. Critical reviews in biotechnology 29 (3):214-224
Reda M (2013) Regulation of nitrate reduction in Arabidopsis WT and hxk1 mutant under C and N metabolites. Physiologia plantarum 149 (2):260-272
Reinbothe C, Pollmann S, Reinbothe S (2010) Singlet oxygen signaling links photosynthesis to translation and plant growth. Trends in plant science 15 (9):499-506
Reinders A, Panshyshyn JA, Ward JM (2005) Analysis of transport activity of Arabidopsis sugar alcohol permease homolog AtPLT5. Journal of Biological Chemistry 280 (2):1594-1602
Reinders A, Schulze W, Kühn C, Barker L, Schulz A, Ward JM, Frommer WB (2002) Protein–protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element. The Plant Cell Online 14 (7):1567-1577
Reinders A, Sivitz AB, Starker CG, Gantt JS, Ward JM (2008) Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from Lotus japonicus. Plant molecular biology 68 (3):289-299
Reinders A, Sivitz AB, Ward JM (2012) Evolution of plant sucrose uptake transporters. Frontiers in plant science 3

Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S (2012) Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis. The Plant Cell Online 24 (12):4850-4874
Renaudin J-P, Doonan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inzé D, Jacobs T, Kouchi H, Rouzé P, Sauter M (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B-and D-type cyclins based on sequence organization. Plant molecular biology 32 (6):1003-1018
Reyes JC (2013) The many faces of plant SWI/SNF complex. Molecular plant:sst147
Ricardi MM, Guaimas FF, González RM, Burrieza HP, López-Fernández MP, Jares-Erijman EA, Estévez JM, Iusem ND (2012) Nuclear Import and Dimerization of Tomato ASR1, a Water Stress-Inducible Protein Exclusive to Plants. PLoS One 7 (8):e41008
Riccardi F, Gazeau P, De Vienne D, Zivy M (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize quantitative variation and polypeptide identification. Plant physiology 117 (4):1253-1263
Riesmeier JW, Hirner B, Frommer WB (1993) Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. The Plant Cell Online 5 (11):1591-1598
Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB (1994) Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. The EMBO Journal 13 (1):1
Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JS, Murray JA (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. Molecular and Cellular Biology 20 (13):4513-4521
Robaglia C, Thomas M, Meyer C (2012) Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. Current opinion in plant biology 15 (3):301-307
Roblin G, Sakr S, Bonmort J, Delrot S (1998) Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. FEBS letters 424 (3):165-168
Rodrigues A, Adamo M, Crozet P, Margalha L, Confraria A, Martinho C, Elias A, Rabissi A, Lumbreras V, González-Guzmán M (2013) ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. The Plant Cell Online 25 (10):3871-3884
Roitsch T, Bittner M, Godt DE (1995) Induction of apoplastic invertase of Chenopodium rubrum by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. Plant physiology 108 (1):285-294
Rolin D (2012) Metabolomics coming of age with its technological diversity, vol 67. Academic Press,
Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annu Rev Plant Biol 57:675-709
Rolland N, Ferro M, Seigneurin-Berny D, Garin J, Douce R, Joyard J (2003) Proteomics of chloroplast envelope membranes. Photosynthesis research 78 (3):205-230
Rom S, Gilad A, Kalifa Y, Konrad Z, Karpasas MM, Goldgur Y, Bar-Zvi D (2006) Mapping the DNA-and zinc-binding domains of ASR1 (abscisic acid stress ripening), an abiotic-stress regulated plant specific protein. Biochimie 88 (6):621-628
Rook F, Bevan MW (2003) Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. Journal of Experimental Botany 54 (382):495-501
Rossi M, Iusem ND (1994) Tomato (Lycopersicon esculentum) genomic clone homologous to a gene encoding an abscisic acid-induced protein. Plant physiology 104 (3):1073
Roth G, Hayek M, Massimino S, Davenport G, Arking R, Bartke A, Bonkowski M, Ingram D (2009) Mannoheptulose: glycolytic inhibitor and novel caloric restriction mimetic. FASEB J April 23
Saier MH (2000) Families of transmembrane sugar transport proteins. Molecular microbiology 35 (4):699-710
Sairanen I, Novák O, Pěnčík A, Ikeda Y, Jones B, Sandberg G, Ljung K (2012) Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in Arabidopsis. The Plant Cell Online 24 (12):4907-4916
Sauer N (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. FEBS letters 581 (12):2309-2317

Saumonneau A, Agasse A, Bidoyen MT, Lallemand M, Cantereau A, Medici A, Laloi M, Atanassova R (2008) Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus. FEBS letters 582 (23):3281-3287
Saumonneau A, Laloi M, Lallemand M, Rabot A, Atanassova R (2012) Dissection of the transcriptional regulation of grape ASR and response to glucose and abscisic acid. Journal of experimental botany 63 (3):1495-1510
Schaller A (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. Planta 220 (2):183-197
Schluepmann H, Berke L, Sanchez-Perez GF (2012) Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants. Journal of experimental botany 63 (9):3379-3390
Schluepmann H, Pellny T, van Dijken A, Smeekens S, Paul M (2003) Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences 100 (11):6849-6854
Schluepmann H, Van Dijken A, Aghdasi M, Wobbes B, Paul M, Smeekens S (2004) Trehalose mediated growth inhibition of Arabidopsis seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. Plant physiology 135 (2):879-890
Schneider A, Salamini F, Gebhardt C (1997) Expression patterns and promoter activity of the cold-regulated gene ci21A of potato. Plant physiology 113 (2):335-345
Schneider S, Beyhl D, Hedrich R, Sauer N (2008) Functional and physiological characterization of Arabidopsis INOSITOL TRANSPORTER1, a novel tonoplast-localized transporter for myo-inositol. The Plant Cell Online 20 (4):1073-1087
Schneider S, Schneidereit A, Konrad KR, Hajirezaei M-R, Gramann M, Hedrich R, Sauer N (2006) Arabidopsis INOSITOL TRANSPORTER4 mediates high-affinity H+ symport of myoinositol across the plasma membrane. Plant physiology 141 (2):565-577
Schneider S, Schneidereit A, Udvardi P, Hammes U, Gramann M, Dietrich P, Sauer N (2007) Arabidopsis INOSITOL TRANSPORTER2 mediates H+ symport of different inositol epimers and derivatives across the plasma membrane. Plant physiology 145 (4):1395-1407
Schneidereit A, Scholz-Starke J, Büttner M (2003) Functional characterization and expression analyses of the glucose-specific AtSTP9 monosaccharide transporter in pollen of Arabidopsis. Plant Physiology 133 (1):182-190
Schneidereit A, Scholz-Starke J, Sauer N, Büttner M (2005) AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in Arabidopsis. Planta 221 (1):48-55
Scholz-Starke J, Büttner M, Sauer N (2003) AtSTP6, a new pollen-specific H+-monosaccharide symporter from Arabidopsis. Plant Physiology 131 (1):70-77
Schulz A, Beyhl D, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, Poschet G, Büttner M, Schneider S, Sauer N, Hedrich R (2011) Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. The Plant Journal 68 (1):129-136
Schulze WX, Reinders A, Ward J, Lalonde S, Frommer WB (2003) Interactions between co-expressed Arabidopsis sucrose transporters in the split-ubiquitin system. BMC biochemistry 4 (1):3
Schwachtje J, Minchin PE, Jahnke S, van Dongen JT, Schittko U, Baldwin IT (2006) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. Proceedings of the National Academy of Sciences 103 (34):12935-12940
Shang HH, Liu CL, Zhang CJ, Li FL, Hong WD, Li FG (2009) Histological and Ultrastructural Observation Reveals Significant Cellular Differences between Agrobacterium Transformed Embryogenic and Non-embryogenic Calli of Cotton. Journal of Integrative Plant Biology 51 (5):456-465
Sheen J (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. The Plant Cell Online 2 (10):1027-1038
Sheen J, Zhou L, Jang J-C (1999) Sugars as signaling molecules. Current opinion in plant biology 2 (5):410-418

Shen G, Pang Y, Wu W, Deng Z, Liu X, Lin J, Zhao L, Sun X, Tang K (2005) Molecular cloning, characterization and expression of a novel< i> Asr</i> gene from< i> Ginkgo biloba</i>. Plant Physiology and Biochemistry 43 (9):836-843

Sheng, Zi-Zhang, Zhao, Yu-Qi, Huang, Jing-Fei (2011) Functional evolution of BRcT Domains from Binding DnA to protein Evolutionary bioinformatics online 7 : 87

Shin R, Jez JM, Basra A, Zhang B, Schachtman DP (2011) 14-3-3 Proteins fine-tune plant nutrient metabolism. FEBS letters 585 (1):143-147

Shkolnik D, Bar-Zvi D (2008) Tomato ASR1 abrogates the response to abscisic acid and glucose in Arabidopsis by competing with ABI4 for DNA binding. Plant biotechnology journal 6 (4):368-378

Shlens J (2014) A tutorial on principal component analysis. arXiv preprint arXiv:14041100

Silhavy D, Hutvágner G, Barta E, Bánfalvi Z (1995) Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from Solanum chacoense. Plant molecular biology 27 (3):587-595

Simões I, Faro C (2004) Structure and function of plant aspartic proteinases. European journal of biochemistry 271 (11):2067-2075

Sinha AK, Hofmann MG, Römer U, Köckenberger W, Elling L, Roitsch T (2002) Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. Plant physiology 128 (4):1480-1489

Slewinski TL (2011) Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: a physiological perspective. Molecular plant 4 (4):641-662

Slewinski TL, Meeley R, Braun DM (2009) Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves. Journal of Experimental Botany 60 (3):881-892

Smaczniak C, Immink RGH, Muiño JM, Blanvillain R, Busscher M, Busscher-Lange J, Dinh QDP, Liu S, Westphal AH, Boeren, S (2012) Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development. Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (5):1560-1565

Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P (2006) Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis. Plant physiology 140 (2):637-646

Srivastava AC, Dasgupta K, Ajieren E, Costilla G, McGarry RC, Ayre BG (2009) Arabidopsis plants harbouring a mutation in AtSUC2, encoding the predominant sucrose/proton symporter necessary for efficient phloem transport, are able to complete their life cycle and produce viable seed. Annals of botany:mcp215

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. The Plant Cell Online 7 (10):1545-1554

Stadler R, Sauer N (1996) The Arabidopsis thaliana AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. Botanica Acta 109 (4):299-306

Stitt M (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. Current opinion in plant biology 2 (3):178-186

Stitt M, Krapp A (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. Plant, Cell Environment 22 (6):583-621

Sugden C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie DG (1999) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. Plant physiology 120 (1):257-274

Sugiharto B, Ermawati N, Mori H, Aoki K, Yonekura-Sakakibara K, Yamaya T, Sugiyama T, Sakakibara H (2002) Identification and characterization of a gene encoding drought-inducible protein localizing in the bundle sheath cell of sugarcane. Plant and cell physiology 43 (3):350-354

Sukrong S, Yun K-Y, Stadler P, Kumar C, Facciuolo T, Moffatt BA, Falcone DL (2012) Improved growth and stress tolerance in the Arabidopsis oxt1 mutant triggered by altered adenine metabolism. Molecular plant 5 (6):1310-1332

Tehseen M, Cairns N, Sherson S, Cobbett CS (2010) Metallochaperone-like genes in Arabidopsis thaliana. Metallomics 2 (8):556-564
Teusink B, Walsh MC, van Dam K, Westerhoff HV (1998) The danger of metabolic pathways with turbo design. Trends in biochemical sciences 23 (5):162-169
Thomas, J. O. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins (2001) Biochemical Society Transactions 29 (4):395-401
Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG, Geigenberger P (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. The Plant Journal 35 (4):490-500
Timotijević GS, Milisavljević MD, Radović SR, Konstantinović MM, Maksimović VR (2010) Ubiquitous aspartic proteinase as an actor in the stress response in buckwheat. Journal of plant physiology 167 (1):61-68
Tognetti JA, Pontis HG, Martínez-Noël GM (2013) Sucrose signaling in plants. Plant signaling behavior 23316:1
Torchet C, Badis G, Devaux F, Costanzo G, Werner M, Jacquier A (2005) The complete set of H/ACA snoRNAs that guide rRNA pseudouridylations in Saccharomyces cerevisiae. Rna 11 (6):928-938
Toroser D, Plaut Z, Huber SC (2000) Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. Plant Physiology 123 (1):403-412
Truernit E, Sauer N (1995) The promoter of the Arabidopsis thaliana SUC2 sucrose-H+ symporter gene directs expression of β-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. Planta 196 (3):564-570
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. The Plant Cell Online 8 (12):2169-2182
Truernit E, Stadler R, Baier K, Sauer N (1999) A male gametophyte-specific monosaccharide transporter inArabidopsis. The Plant Journal 17 (2):191-201
Tsukaya H, Ohshima T, Naito S, Chino M, Komeda Y (1991) Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic Arabidopsis. Plant Physiology 97 (4):1414-1421
Turck F, Zilbermann F, Kozma SC, Thomas G, Nagy F (2004) Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in Arabidopsis. Plant physiology 134 (4):1527-1535
Turkina MV, Årstrand HK, Vener AV (2011) Differential phosphorylation of ribosomal proteins in Arabidopsis thaliana plants during day and night. PLoS One 6 (12):e29307
Umemura T-a, Perata P, Futsuhara Y, Yamaguchi J (1998) Sugar sensing and α-amylase gene repression in rice embryos. Planta 204 (4):420-428
Vaidyanathan R, Kuruvilla S, Thomas G (1999) Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. Plant Science 140 (1):21-30
Van der Hoorn RAL (2008) Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. Annu Rev Plant Biol 59:191-223
van Dijken AJ, Schluepmann H, Smeekens SC (2004) Arabidopsis trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. Plant physiology 135 (2):969-977
Vandesteene L, Ramon M, Le Roy K, Van Dijck P, Rolland F (2010) A single active trehalose-6-P synthase (TPS) and a family of putative regulatory TPS-like proteins in Arabidopsis. Molecular plant 3 (2):406-419
Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR (2002) Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. Proceedings of the National Academy of Sciences 99 (16):10876-10880

Vespa L, Vachon G, Berger F, Perazza D, Faure J-D, Herzog M (2004) The immunophilin-interacting protein AtFIP37 from Arabidopsis is essential for plant development and is involved in trichome endoreduplication. Plant physiology 134 (4):1283-1292
Vignault C, Vachaud M, Cakir B, Glissant D, Dédaldéchamp F, Büttner 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. Journal of experimental botany 56 (415):1409-1418
Villadsen D, Smith S (2004) Identification of more than 200 glucose-responsive Arabidopsis genes none of which responds to 3-O-methylglucose or 6-deoxyglucose. Plant molecular biology 55 (4):467-477
Virlouvet L, Jacquemot MP, Gerentes D, Corti H, Bouton S, Gilard F, Valot B, Trouverie J, Tcherkez G, Falque M (2011) The ZmASR1 protein influences branched-chain amino acid biosynthesis and maintains kernel yield in maize under water-limited conditions. Plant physiology 157 (2):917-936
Vitrac X, Larronde F, Krisa S, Decendit A, Deffieux G, Mérillon J-M (2000) Sugar sensing and Ca< sup> 2+</sup>–calmodulin requirement in< i> Vitis vinifera</i> cells producing anthocyanins. Phytochemistry 53 (6):659-665
Voitsekhovskaja OV, Koroleva OA, Batashev DR, Knop C, Tomos AD, Gamalei YV, Heldt H-W, Lohaus G (2006) Phloem loading in two Scrophulariaceae species. What can drive symplastic flow via plasmodesmata? Plant physiology 140 (1):383-395
Voll LM, Hajirezaei MR, Czogalla-Peter C, Lein W, Stitt M, Sonnewald U, Börnke F (2009) Antisense inhibition of enolase strongly limits the metabolism of aromatic amino acids, but has only minor effects on respiration in leaves of transgenic tobacco plants. New Phytologist 184 (3):607-618
Vu JC, Niedz RP, Yelenosky G (1993) Glycerol stimulation of chlorophyll synthesis, embryogenesis, and carboxylation and sucrose metabolism enzymes in nucellar callus of 'Hamlin'sweet orange. Plant cell, tissue and organ culture 33 (1):75-80
Wahl V, Brand LH, Guo Y-L, Schmid M (2010) The FANTASTIC FOUR proteins influence shoot meristem size in Arabidopsis thaliana. BMC plant biology 10 (1):285
Wang CS, Liau YE, Huang JC, Wu TD, Su CC, Lin CH (1998) Characterization of a desiccation-related protein in lily pollen during development and stress. Plant and cell physiology 39 (12):1307-1314
Wang H-L, Lee P-D, Liu L-F, Su J-C (1999) Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures. Botanical Bulletin of Academia Sinica 40
Wang HJ, Hsu CM, Jauh GY, Wang CS (2005) A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. Physiologia plantarum 123 (3):314-320
Wang J, Lan P, Gao H, Zheng L, Li W, Schmidt W (2013a) Expression changes of ribosomal proteins in phosphate-and iron-deficient Arabidopsis roots predict stress-specific alterations in ribosome composition. BMC genomics 14 (1):783
Wang JT, Gould JH, Padmanabhan V, Newton RJ (2002) Analysis and localization of the water-deficit stress-induced gene (lp3). Journal of plant growth regulation 21 (4):469-478
Wang S-J, Yeh K-W, Tsai C-Y (2001) Regulation of starch granule-bound starch synthase I gene expression by circadian clock and sucrose in the source tissue of sweet potato. Plant Science 161 (4):635-644
Wang X, Shi L, Lin G, Pan X, Chen H, Wu X, Takáč T, Šamaj J, Xu C (2013b) A systematic comparison of embryogenic and non-embryogenic cells of banana (< i> Musa</i> spp. AAA): Ultrastructural, biochemical and cell wall component analyses. Scientia Horticulturae 159:178-185
Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Gröner F, Hebbeker U, Flügge U-I (2000) Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. The Plant Cell Online 12 (5):787-801

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. The Plant Cell Online 9 (6):895-908
Weigel D, Nilsson O (1995) A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. Nature 377 (6549):495-500
Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM (2000) A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. The Plant Cell Online 12 (8):1345-1355
Wick AN, Drury DR, Nakada HI, Wolfe JB, Britton B, Grabowski R (1957) Localization of the primary metabolic block produced by 2-Deoxyglucose. The Journal of biological chemistry 224 (2):963-969
Williams LE, Lemoine R, Sauer N (2000) Sugar transporters in higher plants–a diversity of roles and complex regulation. Trends in plant science 5 (7):283-290
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. The Plant Cell Online 18 (12):3476-3490
Wu X, Dabi T, Weigel D (2005) Requirement of Homeobox Gene< i> STIMPY</i>/< i> WOX9</i> for< i> Arabidopsis</i> Meristem Growth and Maintenance. Current Biology 15 (5):436-440
Wu MF, Sang Y, Bezhani S, Yamaguchi N, Han SK, Li Z, Su Y, Slewinski TL, Wagner, D (2012) Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (9):3576-3581
Xiao W, Sheen J, Jang JC (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. Plant molecular biology 44 (4):451-461
Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen J (2013) Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. Nature 496 (7444):181-186
Xiong Y, Sheen J (2012) Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. Journal of Biological Chemistry 287 (4):2836-2842
Xiong Y, Sheen J (2014) The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. Plant physiology 164 (2):499-512
Yamada K, Osakabe Y, Mizoi J, Nakashima K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Functional analysis of an Arabidopsis thaliana abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. Journal of Biological Chemistry 285 (2):1138-1146
Yamada M, Yamagishi Y, Akaoka M, Ito H, Kato A (2014) Genomic localization of AtRE1 and AtRE2, copia-type retrotransposons, in natural variants of Arabidopsis thaliana. Molecular Genetics and Genomics 289 (5):821-835
Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J (2003) Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. Nature 425 (6957):521-525
Yang C, Zhang C, Dittman JD, Whitham SA (2009) Differential requirement of ribosomal protein S6 by plant RNA viruses with different translation initiation strategies. Virology 390 (2):163-173
Yang CY, Chen YC, Jauh GY, Wang CS (2005) A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis. Plant physiology 139 (2):836-846
Yang Y, Yao A, Wang J, Hu J (2011) The effect of sucrose on the expression of the< i> VvTFL1</i> and< i> VFL</i> genes during flower development in the “Xiangfei” grapevine. Scientia Horticulturae 129 (2):299-305
Yeung EC (1995) Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: In vitro embryogenesis in plants. Springer, pp 205-247
Yim H-k, Lim M-n, Lee S-e, Lim J, Lee Y, Hwang Y-s (2012) Hexokinase-mediated sugar signaling controls expression of the< i> calcineurin B-like interacting protein kinase 15</i> gene and is perturbed by oxidative phosphorylation inhibition. Journal of plant physiology 169 (15):1551-1558

Ylstra B, Garrido D, Busscher J, van Tunen AJ (1998) Hexose transport in growing petunia pollen tubes and characterization of a pollen-specific, putative monosaccharide transporter. Plant Physiology 118 (1):297-304

Yu S-M, Kuo Y, Sheu G, Sheu Y-J, Liu L (1991) Metabolic derepression of alpha-amylase gene expression in suspension-cultured cells of rice. Journal of Biological Chemistry 266 (31):21131-21137

Yun J, Kim Y-S, Jung J-H, Seo PJ, Park C-M (2012) The AT-hook motif-containing protein AHL22 regulates flowering initiation by modifying FLOWERING LOCUS T chromatin in Arabidopsis. Journal of Biological Chemistry 287 (19):15307-15316

Zemek J, Hricová D, Strmeň J, Bauer Š (1975) Effect of 2-Deoxy-D-glucose on Tissue Culture of< i> Nicotiana tabacum</i> L.(cv.< i> Virginia Bright Italia</i>). Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 76 (2):114-119

Zemek J, Stremeň J, Hricová D (1976) Metabolism of 2-Deoxy-D-Glucose in the Yellow and the Green Spruce Culture (< i> Picea excelsa</i> Link). Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 77 (2):95-98

Zeng L, Wang Z, Vainstein A, Chen S, Ma H (2011) Cloning, Localization, and Expression Analysis of a New Tonoplast Monosaccharide Transporter from Vitis vinifera L. Journal of Plant Growth Regulation 30 (2):199-212

Zhang L, Hu W, Wang Y, Feng R, Zhang Y, Liu J, Jia C, Miao H, Zhang J, Xu B (2015) The MaASR gene as a crucial component in multiple drought stress response pathways in Arabidopsis. Functional integrative genomics 15 (2):247-260

Zhang X, Chen Y, Lin X, Hong X, Zhu Y, Li W, He W, An F, Guo H (2013) Adenine phosphoribosyl transferase 1 is a key enzyme catalyzing cytokinin conversion from nucleobases to nucleotides in Arabidopsis. Molecular plant 6 (5):1661-1672

Zhang Y, Primavesi LF, Jhurreea D, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Powers SJ, Schluepmann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ (2009) Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. Plant physiology 149 (4):1860-1871

Zhou L, Jang J, Jones TL, Sheen J (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. Proceedings of the National Academy of Sciences 95 (17):10294-10299

Zhou Y, Qu H, Dibley KE, Offler CE, Patrick JW (2007) A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators. The Plant Journal 49 (4):750-764

Annexes

1.1 Annexe 1 : Composition du milieu de culture GM+ (cellules embryogènes)

Micro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CoCl_2$	0,025
$CuSO_4$	0,025
FeNaEDTA	36,7
H_3BO_3	6,2
Kl	0,83
$MnSO_4$	16,9
Na_2MoO_4	0,25
$ZnSO_4$	8,6

Macro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CaCl_2$	166
KH_2PO_4	85
KNO_3	950
$MgSO_4$	87,86
NH_4NO_3	825

Vitamines ($mg.L^{-1}$)

Glycine	2
Myo-inositol	100
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1

Hormones ($mg.L^{-1}$)

Acide naphtoxy acétique	1

Autres éléments ($g.L^{-1}$)

Hydrolysat acide de caséine	1
Maltose	18
Glycerol	4,6

pH 5,8

1.2 Annexe 2 : Composition du milieu de culture M14

Micro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CoCl_2$	0,025
$CuSO_4$	0,025
FeNaEDTA	36,7
H_3BO_3	6,2
Kl	0,83
$MnSO_4$	16,9
Na_2MoO_4	0,25
$ZnSO_4$	8,6

Macro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CaCl_2$	332
KH_2PO_4	170
KNO_3	1900
$MgSO_4$	180,54
NH_4NO_3	1650

Vitamines ($mg.L^{-1}$)

Glycine	2
Myo-inositol	100
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1

Hormones ($mg.L^{-1}$)

Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique	1
Kinétine	0,5

Autres éléments ($g.L^{-1}$)

Saccharose	30

pH 5,8

1.3 Annexe 3: Composition du milieu Gamborg ANA/BAP

Micro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CoCl_2$	0,025
$CuSO_4$	0,025
FeNaEDTA	36,7
H_3BO_3	3
Kl	0,75
$MnSO_4$	10
Na_2MoO_4	0,25
$ZnSO_4$	2

Macro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CaCl_2$	113,23
KNO_3	2500
$MgSO_4$	121,56
$NaH2PO_4$	130,44
$(NH_4)_2SO_4$	134

Vitamines ($mg.L^{-1}$)

Myo-inositol	100
Acide nitinique	1
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10

Hormones ($mg.L^{-1}$)

ANA	0,18
BAP	1

Autres éléments ($g.L^{-1}$)

Saccharose	20

pH 5,8

1.4 Annexe 4: Composition du milieu Mc Cown ANA

Micro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CuSO_4$	0,25
FeNaEDTA	36,7
H_3BO_3	6,20
$MnSO_4$	22,30
Na_2MoO_4	0,25
$ZnSO_4$	8,60

Macro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CaCl_2$	72,50
$Ca(NO_3)_2$	471,26
KH_2PO_4	170,00
K_2SO_4	990,00
$MgSO_4$	180,54
NH_4NO3	400,00

Vitamines ($mg.L^{-1}$)

Glycine	2
Myo-inositol	100
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1

Hormones ($mg.L^{-1}$)

ANA	0,2

Autres éléments ($g.L^{-1}$)

Saccharose	30

pH 5,8

1.5 Annexe 5 : Composition du milieu YEB (Yeast Extract Broth)

Extrait de bœuf	5 $g.L^{-1}$
Extrait de levure	1 $g.L^{-1}$
Peptone	5 $g.L^{-1}$
Saccharose	5 $g.L^{-1}$
$MgSO_4$	5mM

pH 7,2

1.6 Annexe 6 : Milieu GM° minimum

Micro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CoCl_2$	0,025
$CuSO_4$	0,025
FeNaEDTA	36,7
H_3BO_3	6,2
Kl	0,83
$MnSO_4$	16,9
Na_2MoO_4	0,25
$ZnSO_4$	8,6

Macro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CaCl_2$	166
KH_2PO_4	170
$MgSO_4$	87,86

Vitamines ($mg.L^{-1}$)

Glycine	2
Myo-inositol	100
Acide nicitinique	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1

Autres éléments ($g.L^{-1}$)

Hydrolysat acide de caséine	20

pH 5,8

1.7 Annexe 7 : Composition du milieu Gamborg ANA/BAP minimum

Micro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CoCl_2$	0,025
$CuSO_4$	0,025
FeNaEDTA	36,7
H_3BO_3	3
Kl	0,75
$MnSO_4$	10
Na_2MoO_4	0,25
$ZnSO_4$	2

Macro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CaCl_2$	113,23
$MgSO_4$	121,56
$NaH2PO_4$	130,44
$(NH_4)_2SO_4$	134

Vitamines ($mg.L^{-1}$)

Myo-inositol	100
Acide nitinique	1
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10

Hormones ($mg.L^{-1}$)

ANA	0,18
BAP	1

pH 5,8

1.8 Annexe 8 : Composition du tampon GEB

$NaPO_4$	50mM
DTT	10mM
Na_2EDTA	1mM
Sodium Lauryl Sarconsine	0,1%
Triton X-100	0,1%

1.9 Annexe 9 : Composition du tampon TE utilisé pour tous les tampons de l'extraction des noyaux

MES	5 mM
Acétate de Mg	4 mM
β-mercaptoéthanol	5 mM

pH = 6,1 à corriger avec KOH 1N

1.10 Annexe 10 : Composition des tampons pour l'isolement des noyaux

Composition du tampon A (pour 100mL) (préparer extemporanément)

Saccharose 0,25 M	8,557 g
Gomme arabique	4 g
TritonX100 0,5%	0,5 mL
Qsp 100mL TE	

Composition du tampon B (pour 100mL)

Saccharose 1,2 mM	41,04 g
Qsp 100mL TE	

Composition du tampon C (pour 100mL)

Saccharose 0,25 M	8,557 g
TritonX100 0,5%	0,5 mL
Qsp 100mL TE	

Composition du tampon D (pour 100mL)

Saccharose 0,25 M	8,557 g
Qsp 100mL TE	

1.11 Annexe 11 : Composition du milieu de culture Gamborg ANA/BAP –sucres

Micro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CoCl_2$	0,025
$CuSO_4$	0,025
FeNaEDTA	36,7
H_3BO_3	3
Kl	0,75
$MnSO_4$	10
Na_2MoO_4	0,25
$ZnSO_4$	2

Macro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CaCl_2$	113,23
KNO_3	2500
$MgSO_4$	121,56
$NaH2PO_4$	130,44
$(NH_4)_2SO_4$	134

Vitamines ($mg.L^{-1}$)

Myo-inositol	100
Acide nitinique	1
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10

Hormones ($mg.L^{-1}$)

ANA	0,18
BAP	1

pH 5,8

1.12 Annexe 12 : Composition du milieu de culture Gamborg ANA/BAP minimum

Micro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CoCl_2$	0,025
$CuSO_4$	0,025
FeNaEDTA	36,7
H_3BO_3	3
Kl	0,75
$MnSO_4$	10
Na_2MoO_4	0,25
$ZnSO_4$	2

Macro éléments ($mg.L^{-1}$)

$CaCl_2$	113,23
$MgSO_4$	121,56
$NaH2PO_4$	130,44

Vitamines ($mg.L^{-1}$)

Myo-inositol	100
Acide nitinique	1
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10

Hormones ($mg.L^{-1}$)

ANA	0,18
BAP	1

pH 5,8