

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR  
STRASBOURG**



**INSTITUT NATIONAL DE LA  
RECHERCHE AGRONOMIQUE**



**THÈSE**

présentée à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg  
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie  
Ecole Doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé  
Unité Mixte de Recherche Vigne et Vins d'Alsace INRA-ULP

**GENETIQUE MOLECULAIRE DE LA  
FLORAISON DE LA VIGNE**

par

**Delphine JOLY**

soutenue le 5 septembre 2005

**JURY:**

M. Jean Eugène MASSON, INRA Colmar

Directeur de thèse

M. Jean-Claude FOURNIOUX, Université de Dijon

Rapporteur

M. François PARCY, CEA-CNRS de Grenoble

Rapporteur

M. Pascal GENSCHIK, IBMP-CNRS de Strasbourg

Rapporteur

M. Francis KARST, Université de Strasbourg

Examineur

# Génétique moléculaire de la floraison de la vigne

Introduction générale.....	1
Etude bibliographique.....	3
<b>1 Présentation de la vigne.....</b>	<b>3</b>
1.1. Systématique .....	3
1.2. Domestication de <i>Vitis vinifera silvestris</i> .....	4
1.3. Notion de cépages, clones et cultivars .....	4
1.4. Eléments de morphologie et anatomie de la vigne .....	5
1.4.1. Les racines.....	5
1.4.2. Le tronc.....	5
1.4.3. Les rameaux.....	5
1.4.4. Les feuilles.....	6
1.4.5. Les bourgeons.....	6
Types de bourgeons.....	6
Morphologie des bourgeons axillaires.....	7
Fertilité des bourgeons.....	7
1.4.6. L'inflorescence et la fleur.....	8
L'inflorescence.....	8
Les fleurs.....	9
1.4.7. Les grappes et les baies.....	9
Les grappes.....	9
Les baies.....	10
1.4.8. La vrille.....	10
1.4.9. La graine.....	10
1.5. Eléments de physiologie de la vigne.....	11
1.5.1. Phase juvénile.....	11
1.5.2. Phase adulte.....	11
1.5.2.1. Cycle végétatif.....	12
1.5.2.2. Aoûtement.....	13
1.5.2.3. Cycle reproducteur.....	13
L'initiation florale.....	13
Différenciation des fleurs.....	14
Floraison.....	14
Pollinisation, germination et fécondation.....	14
Coulure et nouaison.....	15
Développement des baies.....	15
<b>2. La viticulture en Alsace.....</b>	<b>16</b>
2.1. Notion de qualité et de quantité de la récolte au cours de la mise en place du vignoble Alsacien.....	16
2.1.1. De la préhistoire au XVIème siècle.....	16
2.1.2. Au XVIème siècle.....	17
2.1.3. Au XVIIème siècle.....	18
2.1.4. Au XVIIIème siècle.....	18
2.1.5. La période Napoléonienne.....	19
2.1.6. L'époque Allemande de 1870 à 1918.....	19
2.1.7. L'entre-deux guerre.....	20
2.1.8. Après 1945.....	20
2.2. Le vignoble Alsacien.....	21
2.2.1. Situation.....	21
2.2.2. Les cépages cultivés en Alsace.....	21

2.3 Le Riesling.....	22
2.3.1 Origines.....	22
2.3.2 Description et caractéristiques.....	23
2.3.3. Importance culturelle.....	23
<b>3 Problématique.....</b>	<b>24</b>
3.1. Relation entre le rendement et la qualité.....	24
3.2. Les composantes du rendement chez la vigne.....	24
3.2.1 Influence du génotype sur le rendement.....	24
3.2.2. Influence des conditions environnementales.....	25
Le sol, l'altitude.....	25
Le climat.....	25
Les pratiques culturales.....	25
3.3. Importance de la fertilité dans l'élaboration du rendement .....	26
<b>4. les gènes de floraison.....</b>	<b>27</b>
4.1. Les gènes de floraison chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
4.1.1. Les gènes impliqués dans la perception et la diffusion des facteurs inducteurs de floraison.....	27
4.1.2. Les gènes intégrateurs.....	28
4.1.3. Les gènes d'identité du méristème.....	28
4.1.4. Les gènes impliqués dans la morphogenèse des organes floraux.....	29
4.2. Les gènes de floraison chez la vigne en 2000.....	29
<b>5. Question de recherche.....</b>	<b>30</b>
Matériel et méthodes.....	31
<b>1. Matériel.....</b>	<b>31</b>
1.1. Les clones de Riesling.....	31
1.2. Boutures fructifères.....	31
1.3. Pépins de vigne.....	31
1.4. Cals de vigne.....	32
1.5. <i>Nicotiana benthamiana</i> et <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	32
<b>2. Techniques de Biologie Moléculaire.....</b>	<b>33</b>
2.1. Extraction d'ADN.....	33
2.2. Extraction d'ARN.....	33
2.2.1. ARN totaux.....	33
2.2.2. ARN messagers.....	34
2.3. Reverse Transcription.....	34
2.4. PCR.....	34
2.5. RACE PCR.....	34
2.6. Clonage de fragment PCR avec le vecteur pPCR- Script AMP SK(+)......	35
2.7. Séquençage et analyse des séquences.....	35
2.8. Southern Blot.....	35
2.8.1. Electrophorèse et transfert.....	36
2.8.2. Hybridation et révélation.....	36
2.9. Hybridation <i>in situ</i> .....	36
2.9.1. Fixation, inclusion et coupes.....	36
2.9.2. Préparation des sondes.....	37
2.9.3. Hybridation et révélation.....	37
2.10. RT PCR Quantitative.....	37
2.10.1. RT PCR.....	37
2.10.2. Quantification relative.....	37

Résultats.....	39
Chapitre 1 : Clonage et étude de l'expression de cinq gènes de floraison chez la vigne.....	41
1. Clonage de l'orthologue de <i>AtLEAFY</i> chez la vigne.....	41
2. Analyse de l'expression des gènes de floraison chez la vigne.....	43
<i>Expression analysis of flowering genes from seedling-stage to vineyard life of grapevine cv. Riesling. Joly et al., 2004, Plant Science 166 (6) 1427-1436.</i> .....	44
Chapitre 2 : Etude de la variabilité génétique de la fertilité chez la vigne.....	54
<i>Evolution of the Grapevine revealed by Riesling clones diverging for fruitfulness and expression of flowering genes. Joly et al., 2005, Submitted.</i> .....	56
Conclusions et perspectives.....	80
<b>1 Les gènes de floraison.....</b>	<b>80</b>
1.1. Les gènes de floraison chez la vigne.....	80
1.1.1. <i>VvLEAFY</i> .....	80
1.1.2. <i>VvAPI</i> .....	82
1.1.3. <i>VvTFL1</i> .....	83
1.1.4. <i>VvAG</i> .....	84
1.1.5. <i>VvSEP3</i> .....	84
1.2. Rôle des gènes de floraison dans l'acquisition de la compétence à fleurir.....	85
1.3. Cas particulier des vrilles.....	86
1.3.1. Expression des gènes de floraison dans les vrilles.....	86
1.3.2. Implication des gibbérellines dans le développement des vrilles.....	87
1.4. Circulation des transcrits de <i>VvLEAFY</i> .....	88
1.5. Circulation de la protéine <i>VvLEAFY</i> .....	89
<b>2. Variabilité inter-clonale de la fertilité.....</b>	<b>91</b>
2.1. Association entre la fertilité, le nombre de baies par grappe et le niveau de transcrits de <i>VvLEAFY</i> et <i>VvTFL1</i> .....	91
2.2. Confirmation de l'association entre le niveau de transcrits de <i>VvLEAFY</i> , le potentiel de fertilité des bourgeons latents et le nombre de baies par grappe.....	91
2.3. Caractérisation de clones par leur niveau de transcrits de <i>VvLEAFY</i> .....	92
2.4. Caractérisation d'autres facteurs agronomiques à partir du niveau de transcrits de gènes candidats.....	93
2.5. Applications.....	93
2.5.1. Prévion de récolte.....	93
2.5.2. Aides à la sélection clonale.....	94
<b>3. Origine de la variabilité du niveau d'expression de <i>VvLEAFY</i>.....</b>	<b>95</b>
3.1. Variabilité des séquences codantes et régulatrices de <i>VvLEAFY</i> pour les deux clones de Riesling 1 et 49.....	95
3.2. Variabilité du niveau de méthylation du gènes <i>VvLEAFY</i> .....	96
3.3. Variabilité du niveau protéique de <i>VvLEAFY</i> .....	97
<b>4. <i>VvLEAFY</i> est-il le meilleur candidat pour étudier la fertilité ?.....</b>	<b>98</b>
Références bibliographiques	99

**Abréviations.....107**  
**Annexes..... 109**

## **Introduction générale**

L'histoire de la vigne est si ancienne qu'elle se confond avec l'histoire de l'homme. La Bible fait remonter la culture de la vigne à Noé, qui « fut le premier agriculteur. Il planta une vigne et il en but le vin » (Ancien testament, genèse, 9, 20/21) (Rowley et Ribaut, 2003).

On ne peut déterminer avec précision où et quand on a commencé à faire du vin. Mais on peut supposer que, même avant la dernière glaciation, l'homme de Cro-Magnon (-35000 ans avant JC) qui vivait dans des forêts où la vigne pousse à l'état sauvage, connaissait déjà le vin (Johnson, 1990).

Les premières traces de ceps de vigne ont été découvertes dans l'actuelle Géorgie et datent de plus de 7000 ans (Rowley et Ribaut, 2003) (Fig. 1). C'est à cette étape du développement de l'humanité, que les sociétés humaines d'Europe et du Proche Orient ont commencé à se sédentariser et à pratiquer l'agriculture. L'art de la viticulture remonterait donc à cette époque (Johnson, 1990). De la Géorgie, la culture de la vigne se serait répandue dans tous les pays tempérés depuis l'Inde jusqu'à l'Occident européen (Enjalbert, 1975).

Les premières représentations des procédés de vinification ont été retrouvées sur des bas-reliefs égyptiens datant de plus de 3000 ans avant JC (Fig. 2). En partie grâce à ses contacts avec l'Égypte, la Grèce adopta la culture de la vigne, la vinification et le commerce du vin (vers -2000 av JC) (Johnson, 1990). Les Grecs, implantèrent la vigne dans tout le bassin méditerranéen vers 1500 avant JC puis les Romains développèrent la culture et l'industrie du vin (Méheut et Griffe, 1997). Ce n'est qu'en 600 avant JC que la vigne apparaît en Gaule celtique où les Gaulois améliorèrent les procédés de vinification. La viticulture s'est épanouie ensuite sous le règne des Mérovingiens et des Carolingiens qui firent grande consommation de vin (Méheut et Griffe, 1997). Au Moyen-Âge, le vignoble et les vins sont entrés dans une phase d'essor à l'instigation du christianisme. L'ancienne France monarchique a définitivement fixé l'entretien des vignobles comme culture traditionnelle (Jacquemont, 1993).

Actuellement, la superficie du vignoble français est en 2<sup>ème</sup> position (à égalité avec l'Italie) derrière l'Espagne. La France est le 1<sup>er</sup> producteur mondial de vin. Avec 60 millions d'hectolitres de vin produit chaque année, la viticulture représente 14 % de la valeur de la production agricole française (au 2<sup>ème</sup> rang des productions nationales après les céréales).

Après 1492, la culture de la vigne et la fabrication de vins se sont développés en Amérique du Nord et du Sud puis ont gagné de nouveaux territoires comme l'Afrique du Sud, l'Australie (Johnson, 1990; Gauthier, 1992). La vigne couvre désormais près de huit millions d'hectares

dans le monde (Fig. 3). Si la part de l'Europe dans la production mondiale reste importante (environ 74%), elle a une tendance à la baisse depuis le milieu des années 90. Cette baisse n'est pas due à une diminution de la production européenne mais à une augmentation de la production de vin des pays dits du Nouveau Monde (Etats-Unis, Argentine, Chili, Australie et Afrique du Sud). Face à cette nouvelle concurrence, l'Europe et notamment la France, pour rester la référence viticole mondiale, doivent adapter leur viticulture en investissant dans la qualité (Cesar, 2002). Une diminution des rendements de la plante pourrait significativement améliorer la qualité du raisin et des vins (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

Nous verrons que le nombre d'inflorescences et de fleurs sont des facteurs importants dans l'élaboration du rendement. Le contrôle de la floraison devrait aboutir à une meilleure maîtrise des rendements des vignes. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail de thèse, l'objectif étant de parvenir à une meilleure compréhension des bases génétiques qui interviennent dans le processus de floraison et par conséquent dans la production des fruits.

## **Etude bibliographique**

# 1. Présentation de la vigne

## 1.1. Systématique

La vigne appartient à la famille des ampélidacées (vitacées). Les vitacées sont, en général, des arbrisseaux souvent sarmenteux, grimpant comme des lianes, s'attachant à des supports variés grâce à des vrilles oppositifoliées, simples ou le plus souvent ramifiées. Cette famille comprend dix-neuf genres (Galet, 2000), un seul de ceux-ci nous intéresse: le genre *Vitis* lui-même divisé en trois groupes de vigne, classée en fonction de leur origine géographique (Fig. 4) (Huglin et Schneider, 1998):

- Les vignes américaines (*V. riparia*, *V. labrusca*, *V. berlandieri*, *V. rupestris*...), introduites en Europe au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, à titre de curiosité dans les jardins botaniques ou chez les amateurs, sont responsables des malheurs de la viticulture : elles apportèrent en Europe successivement l'Oïdium (1845), le Phylloxéra (1868), le Mildiou (1878) et le Black rot (1885).

Ces vignes d'origine américaines sont utilisées aujourd'hui comme porte-greffe pour leur résistance aux maladies venues d'Amérique.

- Les vignes asiatiques : elles ne sont pas résistantes aux maladies d'origine américaine (Oïdium, Mildiou, Black-rot...), mais elles sont parfois utilisées dans les programmes de croisement interspécifique pour leur résistance au froid (*Vitis amurensis*) (Galet, 2000).

- La vigne européenne ne comprend que l'espèce *Vitis vinifera* cultivée (*sativa*) et sauvage (*silvestris*) (Huglin et Schneider, 1998).

## 1.2. Domestication de *Vitis vinifera silvestris*

La vigne sauvage, comme d'autres végétaux tel le saule ou le peuplier, porte des fleurs mâles ou femelles que l'on trouve très rarement réunies sur la même plante. Pour peu qu'une plante

mâle soit assez proche pour fournir le pollen, les plantes femelles donnent des fruits alors que les mâles restent improductifs. Les hermaphrodites, une toute petite minorité donnent deux fois moins de fruits que les plantes femelles (Huglin et Schneider, 1998; Johnson, 1990). Les premiers hommes à cultiver la vigne ont naturellement choisi les plantes femelles et détruit les plantes mâles bien que sans celles-ci, les femelles seraient, elles aussi, improductives. L'expérience leur aura donc appris à sélectionner uniquement les hermaphrodites et donc à développer ce caractère génétique qui, en fin de compte, différencie la vigne cultivée (*sativa*) de la vigne sauvage (*silvestris*) (Johnson, 1990).

### 1.3. Notion de variétés, cépages, clones, cultivars

La vigne cultivée *Vitis vinifera* L. comprend plus de 6000 variétés, que les botanistes modernes appellent *cultivars*, et les vignerons *cépages*.

Un *clone*, ou cultivar, peut être défini comme le descendant par voie végétative, d'une souche mère (Galet, 2000).

Le terme cépage est plus général, car un cépage peut être un clone unique ou, au contraire, provenir de plusieurs clones apparemment très proches entre eux, au point d'être confondus sous un même nom, on parle de cépage-population (Galet, 2000).

Deux hypothèses peuvent expliquer cette hétérogénéité des vieux cépages :

- les cépages peuvent être issus de semis différents mais génétiquement très proches (origine « polyclonale » décrite par Rives en 1961).
- la variabilité phénotypique des cépages serait issue de mutations intervenues cours des cycles de multiplication végétative (Huglin et Schneider, 1998).

### 1.4. Eléments de morphologie et d'anatomie de la vigne adulte

Avant d'aborder la physiologie de la vigne, il est indispensable d'avoir quelques notions de la morphologie et de l'anatomie de cette plante.

### **1.4.1. Les racines**

Les racines d'une souche de vigne sont des racines adventives. Elles ont avant tout un rôle d'ancrage pour la plante. Elles ont pour fonctions principales de puiser dans le sol l'eau et les matières minérales nécessaires à la vigne, mais également de produire des hormones de croissance (gibbérellines et cytokinines). Elles constituent également un organe de réserve en accumulant les grains d'amidon synthétisés au niveau des feuilles (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

### **1.4.2. Le tronc**

A l'origine, la vigne est une liane. Elle développe des tiges sarmenteuses qui s'accrochent à des supports très divers, grâce à ses vrilles, pour étaler son feuillage à la lumière. Les troncs que l'on peut observer dans les vignobles sont le résultat, d'une taille annuelle associée à un palissage variant du plus simple au plus complexe. Ainsi, le tronc des vignes n'est pas un fût droit, comme celui des arbres fruitiers ou forestiers, mais il est toujours flexueux, tordu autour des supports sur lesquels il grimpe. Le tronc se ramifie en plusieurs branches ou bras qui portent les tiges de l'année, appelées rameaux tant qu'elles demeurent herbacées et sarments après l'aoûtement (Fig. 5). En dehors de son rôle de support, le tronc sert au transport de la sève brute et de la sève élaborée par l'intermédiaire des vaisseaux du bois et du liber. Il joue également un rôle de réservoir pour les substances de réserve qui s'accumulent dans les cellules du bois (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

### **1.4.3. Les rameaux**

Chaque année, au printemps, des pousses herbacées se développent à partir des bourgeons, ce sont les rameaux. Chaque rameau est composé d'une succession de nœuds (parties renflées) et de mérithalles (ou entre-nœuds). La longueur des mérithalles, varie en fonction des espèces, et pour une espèce donnée, elle varie de la base au sommet (très courte près du point d'attache, puis de plus en plus longue). Les nœuds portent les différents organes : feuilles, bourgeons et

inflorescences ou vrilles. Les vrilles et inflorescences sont oppositifoliées et disposées de manière rythmique et discontinue sur le rameau : les premiers nœuds ne portent aucun de ces organes, les nœuds suivants portent les inflorescences, puis les vrilles. On trouve deux nœuds successifs (N1 et N2) qui portent ces organes, un nœud qui ne porte rien (N0) et ainsi de suite (Fig. 6). Le rameau reste herbacé devient ligneux eu mois d'août puis s'aoûte (Fig. 7). Le nombre de nœuds portant des inflorescences est variable en fonction des cépages (Huglin et Schneider, 1998; Mullins, *et al.*, 1992; Galet, 2000).

#### **1.4.4. La feuille**

Sur les plantes adultes, les feuilles sont en position alterne et opposée alors que chez les jeunes plantes, issues de semis, les feuilles sont disposées en spire phyllotaxique de 2/5 (Fig. 6). Au niveau morphologique, la feuille adulte possède d'excellents critères pour la détermination et la classification des espèces et des cépages (ampélographie). La taille des feuilles peut varier de 50 à 500 cm<sup>2</sup>, suivant les espèces et les cépages. Le limbe comprend 5 nervures principales qui partent du point pétiolaire ; elles se ramifient en nervures secondaires. Le plus souvent, les feuilles sont entières mais présentent des sinus plus ou moins profonds. La villosité du limbe, la forme et la profondeur des dents, ainsi que la couleur interviennent également dans la description qui permet de classer les cépages (Fig. 8) (Huglin et Schneider, 1998; Mullins, *et al.*, 1992; Galet, 2000).

#### **1.4.5. Les bourgeons**

##### **Types de bourgeons**

On distingue plusieurs types de bourgeons en fonction de leur possibilité de développement :

- Le prompt-bourgeon : comme son nom l'indique, ce bourgeon a la propriété de pouvoir se développer l'année de sa formation. Il donne une petite pousse appelée « entre-cœur ».
- Le bourgeon latent : l'année de sa formation, ce bourgeon va changer uniquement de volume. Il se développera l'année suivante.
- Les bourgeons du vieux bois : les bourgeons latents qui ne se seront pas développés l'année suivant leur formation, surtout ceux de la couronne (Fig 9), donneront les bourgeons du vieux bois. Ils peuvent rester à l'état latent pendant plusieurs années. Certains seront recouverts par

les couches successives de bois et ne se développeront plus. Après une taille très sévère, ou après l'élimination des bourgeons latents, les bourgeons du vieux bois peuvent se développer et donner une pousse appelée « gourmand ».

- Le bourgeon terminal : pendant la croissance du rameau, il existe un bourgeon terminal dont le méristème assure la formation et la croissance des différents organes du rameau (Carolus, 1970; Huglin et Schneider, 1998; Morrison, 1991; Galet, 2000).

### **Morphologie des bourgeons axillaires**

A l'aisselle des feuilles, on trouve le bourgeon latent et le prompt-bourgeon (Fig. 10). Ces bourgeons, ne sont pas identiques, le prompt-bourgeon ne porte qu'une écaille alors que le bourgeon latent en porte deux (Galet, 2000). La thèse de Prillieux (1856) précise que la présence d'une pré-feuille en forme d'écaille à la base du bourgeon latent montre que ce dernier est en réalité un bourgeon axillaire de la pré-feuille basale du prompt-bourgeon (Huglin et Schneider, 1998).

Alors que le prompt-bourgeon n'est formé que d'un seul bourgeon, le bourgeon latent comprend un bourgeon principal (ou primaire) et un ou deux bourgeons secondaires appelés également bourgeons de remplacement (Fig.11).

La coupe longitudinale d'un œil latent juste avant le débourrement montre que le bourgeon principal comprend déjà l'organisation du futur rameau (feuilles, inflorescences, vrilles) (Carolus, 1970; Huglin et Schneider, 1998) (Fig. 12).

### **Fertilité des bourgeons**

La fertilité, chez la vigne, correspond au nombre moyen d'inflorescences des rameaux issus des bourgeons laissés à la taille (Huglin et Schneider, 1998). Les rameaux fertiles portent en moyenne 2 inflorescences, disposées à partir du troisième nœud, mais chez certains hybrides de *V. riparia*, on compte jusqu'à 6 inflorescences (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

Ce caractère peut varier selon plusieurs facteurs :

- 1- Pour un cépage donné, la fertilité varie avec l'emplacement du bourgeon sur le sarment. Certains cépages comme l'Aramon dont les bourgeons de la base sont fertiles, permettent une taille courte. D'autres cépages comme le Poulsard, ont des bourgeons qui sont infertiles à la base du sarment, ce qui nécessite une taille longue

pour avoir une récolte suffisante. La Sultanine ne possède qu'un ou deux bourgeons fertiles, il faut parfois attendre le débourrement de ces bourgeons avant de tailler.

- 2- Sur une même souche, la fertilité des bourgeons est intimement liée à la vigueur individuelle des sarments (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).
  - Les bourgeons latents (bourgeons principaux) ont une fertilité qui croît de la base vers le milieu du sarment, puis qui diminue. La fertilité des bourgeons secondaires est très variable en fonction des cépages ; elle peut varier de 0 à 0,5 inflorescence par rameau.
  - Les prompt-bourgeons peuvent être fertiles et donner des grappillons mais cette fertilité est assez variable en fonction de la position du bourgeon sur le sarment.
  - Les bourgeons de la couronne et les bourgeons du vieux bois sont en général stérile mais peuvent parfois contenir une inflorescence, particularité qui sera utilisée lors de la retaille des vignes gelées ou grêlées.
- 3- La fertilité varie avec les cépages et constitue donc un caractère ampélographique. Le Riesling et le Pinot, par exemple, sont des cépages fertiles qui ont en moyenne deux inflorescences par rameau (Carolus, 1970; Huglin et Schneider, 1998; Galet, 1998 ; 2000; 2001).

#### **1.4.6. L'inflorescence et la fleur**

##### **L'inflorescence**

L'inflorescence de la vigne est une inflorescence à deux bras (Fig. 13). C'est une « grappe composée » qui porte des ramifications plus ou moins nombreuses et plus ou moins longues (de 4 cm chez les espèces sauvages à plus de 40 cm pour le raisin de Palestine). La forme générale de l'inflorescence varie avec l'espèce et le cépage. Le nombre d'inflorescences portées par un rameau est très variable, (voir § fertilité des bourgeons) (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

## Les fleurs

La majorité des espèces cultivées, possèdent des fleurs hermaphrodites ; les espèces américaines et certaines espèces asiatiques sont dioïques. Les fleurs sont très petites variant de 2 à 7 mm. La fleur hermaphrodite est composée de cinq pièces (Fig. 14) :

- Le calice composé de 5 sépales rudimentaires, soudés entre eux. Il est généralement vert mais peut être rosé ou brunâtre. Le calice subsiste après la floraison.
- La corolle constituée de 5 pétales alternant avec les sépales. Les pétales sont soudés, ce qui donne à la fleur de vigne la forme d'un capuchon. Lors de la floraison la corolle s'ouvre par la base, c'est la déhiscence « calyptrée ».
- L'androcée comprenant 5 étamines opposées aux pétales. Leur filet est long et porte une anthère à deux loges.
- Le disque est composé de 5 nectaires de couleur jaune.
- Le gynécée est formé d'un ovaire à deux carpelles renfermant chacun 2 ovules

Le nombre de fleurs par inflorescence varie de 100 à 1000 et constitue une caractéristique variétale. Il varie également en fonction de la position de l'inflorescence sur le rameau. Le Pinot blanc possède en moyenne 200 fleurs par inflorescence mais une étude réalisée en 1960 à l'INRA de Colmar montre que certaines inflorescences peuvent compter jusqu'à 750 fleurs. (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

### 1.4.7. Les grappes et les baies

#### Les grappes

La grappe est composée d'un pédoncule qui la fixe au rameau, d'un rachis, ou rafle, plus ou moins ramifié dont les ultimes ramifications, les pédicelles, portent les baies (Fig. 15, 16). Les grappes peuvent varier de 6 à 24 cm de longueur, et de 100 g à 500 g pour la plupart des cépages. Chez certains cépages (Muscat d'Alexandrie, Aramon, Carignan), les grappes peuvent peser jusqu'à 1 kg (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

#### Les baies

Les baies résultent du développement des tissus de l'ovaire, après la fécondation. La forme et les dimensions de la baie sont assez variables. Les baies sont constituées d'une pellicule entourant la pulpe, de faisceaux vasculaires et de pépins (Fig. 17). La couleur de la pellicule varie du vert au noir en passant par le jaune, le rose, le rouge, le bleu et le violet. C'est dans cette pellicule que sont localisées les substances aromatiques. La pulpe est colorée, uniquement chez les cépages dits « teinturiers » (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

#### **1.4.8. La vrille**

Les vrilles permettent au rameau de s'agripper à différents supports (arbre, fil...). Elles sont disposées du côté opposé au point d'insertion des feuilles sur le rameau. Une vrille se compose de trois parties : le pédoncule basilaire, la branche majeure et la branche mineure (Fig. 18). Les vrilles, d'abord herbacées, deviennent ligneuses à l'automne (Galet, 2000).

#### **1.4.9. La graine**

La graine ou pépin résulte du développement de l'ovule fécondé. Le pépin comprend trois parties : *l'embryon* qui se développera en plantule, *l'albumen* qui contient des réserves pour la survie de l'embryon et son développement, et le *tégument* qui protège l'embryon et son albumen (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000) (Fig. 19). L'embryon dans une graine mûre (pépin), contient déjà l'amorce d'une première racine, et deux feuilles embryonnaires, les cotylédons (Bugnon et Bessis, 1968). Le nombre de pépins est en général de 4 par baie, il peut y en avoir moins si tous les ovules ne sont pas fécondés. Dans certains cas les raisins n'ont pas du tout de pépins et sont dits apyrènes (Sultanine, Corinthe) (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

## 1.5. Eléments de physiologie de la vigne

### 1.5.1. Phase juvénile

Les pépins résultent de la reproduction sexuée de la vigne. Une quinzaine de jours après la germination des pépins, on peut distinguer une racine et les deux cotylédons. Le méristème apical forme six à dix feuilles (suivant les cépages) possédant les caractéristiques dites juvéniles (voir § feuilles). La fin de cette phase juvénile est marquée par un changement d'activité du méristème apical :

- La phyllotaxie et la morphologie des feuilles initiées vont prendre les caractéristiques de la plante adulte.
- De nouveaux organes apparaissent, opposés aux feuilles : les vrilles (Bugnon et Bessis, 1968).

On notera, qu'à l'heure actuelle, la multiplication sexuée de la vigne n'est utilisée que dans les programmes d'amélioration variétale.

### 1.5.2. Phase adulte

La vigne est une plante vivace, qui doit assumer une triple fonction : chaque année, la souche va assurer un développement des parties végétatives (rameaux, feuilles, racines), c'est le *cycle végétatif*, faire des réserves afin de permettre un nouveau départ de la végétation l'année suivante, c'est l'*aoûtement*, et enfin assurer un développement reproducteur, par la formation des fleurs puis des fruits, c'est le *cycle reproducteur* (Fig 20).

La difficulté de la conduite de la vigne réside dans le maintien d'un équilibre entre les réserves destinées à l'appareil végétatif pour assurer la pérennité de la souche, et celles destinées à nourrir les baies et les graines. Chacune des phases (phase végétative, phase reproductrice et aoûtement) dépend donc de celle qui la précède. Ces trois phases sont interdépendantes, chacune influant sur l'autre et sur celles des années suivantes (Galet, 2000).

### 1.5.2.1. Cycle végétatif

Le début d'un cycle végétatif, se fait sous l'influence d'une hausse de la température du sol, après une période de repos hivernal. Elle déclenche une reprise de l'activité végétative qui se manifeste par des *pleurs*, aux niveaux des plaies laissées par la taille. Ces pleurs correspondent à un écoulement de sève brute (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

Le *débourrement* est la première manifestation visible de la reprise de la croissance. Une à trois semaines avant le débourrement, l'activité mitotique reprend d'abord au niveau des ébauches foliaires basales, puis vers l'anneau initial (Carolus, 1970). Un gonflement du bourgeon latent apparaît avant que les premières écailles s'écartent, la bourre ou coton est rejetée, une pointe verte, puis les premières feuilles apparaissent. On peut noter que la date de débourrement est fonction des cépages, de la température, de la latitude mais également de la vigueur du sarment, et du système de taille utilisé (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

Le cycle végétatif se poursuit par une période de *croissance*, caractérisée par l'allongement des rameaux issus des bourgeons latents, l'étalement et l'accroissement des jeunes feuilles puis la naissance de nouvelles feuilles. L'activité métabolique des organes en croissance est caractérisée par la notion de vigueur qui varie en fonction des cépages et des porte-greffe, du climat et du sol, mais aussi des pratiques culturales :

- La vigueur est une caractéristique du cépage, par exemple, en Alsace le Riesling est connu pour être plus vigoureux que le Sylvaner. Les porte-greffe utilisés interviennent dans la notion de vigueur du cépage, on parle de « vigueur conférée ». Le porte-greffe 110R est réputé pour être une variété puissante alors que le 161-49C est une variété à faible vigueur conférée.
- La croissance augmente avec la température de l'air (l'optimum est de 25-30°C). La lumière intervient dans la notion de croissance de diverses façons : elle a un effet positif sur la photosynthèse, mais si elle engendre une contrainte hydrique, elle va diminuer la croissance. La vigne est une plante de jours longs et sa croissance est favorisée en juin-juillet.
- Les éléments minéraux du sol jouent un rôle positif sur la croissance.
- La densité de plantation et l'importance de la charge laissée au moment de la taille influent également sur la croissance.

La croissance ralentit au moment de la floraison puis s'arrête fin Juillet-début Août (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000). Au cours de la période de croissance, le méristème apical est très actif, puisqu'il initie de nouveaux organes (feuilles, bourgeons). Les « nouveaux »

bourgeons latents évoluent rapidement. Des coupes longitudinales de ces bourgeons montrent que des primordia foliaires sont mis en place dès la formation du bourgeon (Bugnon et Bessis, 1968; Carolus, 1970). Parallèlement à la croissance en longueur assurée par le méristème apical primaire, pour le rameau, et par le méristème racinaire primaire, pour la racine, la croissance en épaisseur est assurée par les méristèmes secondaires (cambia ou assises libéro-ligneuses) (Champagnol, 1984; Galet, 2000).

Le cycle végétatif se termine par la *défeuillaison* et l'entrée en *dormance* des bourgeons.

### **1.5.2.2. L'Aoûtement**

L'aoûtement, comme son nom l'indique, survient au mois d'Août et correspond à la maturation du bois. Il se caractérise par un brunissement de l'écorce des rameaux, des vrilles et des grappes. Ce processus résulte de modifications anatomiques (constitution du périderme par l'assise subéro-phellodermique) et de l'accumulation de réserve en amidon et de lignine ainsi que d'une diminution de la teneur en eau des tissus du bois. Ces réserves proviennent des feuilles qui après l'arrêt de la croissance, se sont progressivement vidées de leur contenu. L'accumulation d'amidon et de lignine augmentera la résistance des tissus au froid et permettra les premières étapes de développement au printemps (Bugnon et Bessis, 1968; Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000; 2001).

### **1.5.2.3. Cycle reproducteur**

#### **L'initiation florale**

L'initiation florale se produit dans les bourgeons latents, l'année de leur formation soit environ un an avant la floraison. Au cours de la formation du bourgeon latent principal, le méristème apical est dans un premier temps uniquement végétatif, il n'initie que des feuilles (3 ou 4). Puis, à partir du mois de Mai, pour les bourgeons situés à la base du rameau, le méristème devient inflorescentiel, tout en continuant à former des feuilles (Galet, 2000). Des primordia indifférenciés (uncommitted primordia ou Anlagen) se forment, à l'opposé de deux primordia foliaires sur trois. Les deux à quatre premiers primordia indifférenciés (suivant les cépages) deviendront des primordia inflorescentiels et les suivants, des primordia de vrille (Srinivasan et Mullins, 1981; Boss et Thomas, 2000). Les primordia inflorescentiels portent des ramifications qui seront à l'origine des différentes parties de l'inflorescence.

Après l'initiation des inflorescences primordiales, le bourgeon latent entre en dormance (Carolus, 1970; Srinivasan et Mullins, 1981 ; Morrison, 1991).

Différents facteurs conditionnent l'initiation florale :

- la fertilité des bourgeons
- la lumière et la température ont un effet positif sur l'initiation florale
- Les pratiques culturales : une réduction de la surface foliaire entraîne une diminution de la fertilité l'année suivante. Le choix du porte-greffe peut également avoir une incidence sur l'initiation florale.

Il faut noter que chez les plants issus de semis, les premières inflorescences n'apparaissent qu'au bout de deux ans s'ils sont vigoureux, ou au bout de 6 à 7 ans, s'ils sont faibles (Galet, 2000).

### **Différenciation des fleurs**

La différenciation des fleurs de l'inflorescence commence au printemps suivant, lorsque le bourgeon latent reprend son activité. Toutes les fleurs d'une inflorescence se différencient en même temps. Les organes de la fleur se développent les uns après les autres. Après l'apparition des sépales, les pétales se dressent, s'incurvent puis s'assemblent en une corolle calyptrée. Les étamines puis les carpelles se mettent en place, environ 3 à 5 semaines après le débourrement (Srinivasan et Mullins, 1981; Galet, 2000).

### **Floraison**

Peu de temps après le débourrement, les inflorescences sortent du bourgeon puis se développent (Fig. 20). La floraison apparente débute lorsque les capuchons des boutons floraux tombent, de la base de l'inflorescence vers le sommet. Elle se produit fin Mai-début Juin, et dure entre 5 et 10 jours, suivant les variétés et le climat (Galet, 2000).

### **Pollinisation, germination et fécondation**

La pollinisation peut se faire de deux manières pour les fleurs hermaphrodites : soit par autogamie (autofécondation), ce qui semble être la règle générale pour Huglin, soit par allogamie (fécondation croisée), théorie privilégiée par Champagnol (Champagnol, 1984; Huglin et Schneider, 1998).

La germination du grain de pollen est influencée par la température. Après la germination du grain de pollen, le tube pollinique s'allonge et l'un des gamètes mâles s'unit à un gamète femelle pour donner un embryon. Dans ce cas l'ovule deviendra le pépin et l'ovaire le fruit. Chez certains cépages, dits apyrènes, comme la Sultanine, la fécondation se passe normalement, mais l'embryon et l'albumen avortent ce qui conduit à la formation de pépins rudimentaires à l'intérieur de la baie. On peut signaler que chez la vigne, comme chez la plupart des espèces végétales, il existe des cas de parthénocarpie, entraînant la formation de petites baies sans pépins comme chez le cépage Corinthe Noir (Huglin et Schneider, 1998).

### **Coulure et nouaison**

Le nombre de baies portées par une grappe est beaucoup plus faible que le nombre de fleurs portées par l'inflorescence. Ceci est en partie dû à la chute des fleurs non fécondées, mais également à la chute de baies en cours de formation. Lorsque la chute des baies est excessive, on parle de *coulure* par opposition à la *nouaison* qui correspond à la transformation de l'ovaire en fruit (Champagnol, 1984; Galet, 2000).

La coulure peut être accidentelle chez certaines variétés puisque ce phénomène est sous la dépendance de la disponibilité en sucres et des paramètres climatiques. Certaines variétés sont plus sensibles à la coulure, c'est le cas du Grenache, du Muscat Ottonel et du Merlot (Champagnol, 1984).

### **Développement des baies (Tableau. 1)**

Le développement de la baie débute par une période de croissance du grain (pendant 25 à 45 jours), au cours de laquelle sa taille va être multipliée par 10 (de 1 à 2 mm au départ, il passe à 10 ou 20 mm). La croissance est ensuite ralentie et le métabolisme des anthocyanes est modifié, ce qui aboutit à un changement de couleur des baies, c'est la véraison. Cette phase est suivie par une étape de maturation, pendant laquelle la baie va accumuler de l'eau, des sucres (glucose, fructose, saccharose), des acides (maliques, tartriques, citriques), des polyphénols (coloration des baies), et des substances aromatiques (terpénols), (Champagnol, 1984; Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

## 2. La viticulture en Alsace

### 2.1. Notion de qualité et de quantité de la récolte au cours de la mise en place du vignoble Alsacien

Les notions de qualité et de quantité sont apparues très tôt au cours de l'histoire de la viticulture, mais l'importance de chacune varie en fonction de l'époque et du lieu. Pour bien comprendre l'évolution de ces deux concepts en Alsace, il faut faire un peu d'Histoire.

#### 2.1.1. De la préhistoire au XVIème siècle

L'histoire du vignoble alsacien remonte à la préhistoire. En ce temps là, la vigne croissait à l'état sauvage. Ce n'est qu'à l'époque des conquêtes romaines que les premières vignes cultivées apparurent en Alsace (entre le Ier et le IIIème siècle). Dès le IIème siècle, le développement des transports de vin sur le Rhin et la Moselle témoigne que la viticulture est entrée dans l'ère de la commercialisation. C'est le premier apogée de la viticulture alsacienne. Au Vème siècle, les invasions germaniques entraînent un déclin passager de la viticulture Alsacienne. Le vignoble connaît ensuite une forte expansion en s'implantant le long des voies romaines ou sur les versants des collines sous-vosgiennes en relation avec les évêchés, les abbayes et les couvents fondés en grand nombre sous le règne des mérovingiens et des carolingiens (Glatre, 2001).

Le vignoble se propagea du nord au sud de l'Alsace au cours des VIIème et VIIIème siècles. En 700, il couvre une centaine de villages. Au cours des siècles suivants, le commerce du vin d'Alsace sera favorisé grâce à la situation géographique de cette région. Elle est le lieu de passage des pèlerins venant des pays nordiques et se rendant à Rome (Jacquemont, 1993).

Les premiers cépages cultivés en Alsace étaient principalement des cépages rouges, importés de Bourgogne. Il apparut rapidement que l'Alsace n'était pas faite pour produire des vins rouges pleinement satisfaisants. Au cours du XIIème siècle, les moines cisterciens, véritables entrepreneurs, savaient que rien n'était plus rentable que du vin de très grande qualité. C'est en testant des cépages blancs sur les pentes les plus abruptes qu'ils découvrirent que la Rhénanie était faite pour le vin blanc (Johnson, 1990). Vers 1300, la culture de la vigne était

florissante et donnait lieu à un commerce actif et bien développé qui apportait des bénéfices importants aux bourgeois de la ville de Colmar. Une partie de la production était consommée sur place mais une grande partie était exportée (Sittler, 1956).

Le Moyen Age ne connaissait pas la grande diversité des vins, ni les différents crus. Le vin d'Alsace « réussissait bien » et était réputé meilleur que celui des pays voisins. On cultivait primitivement des vignes qui donnaient un grand rendement. Au moment des croisades, de « meilleures sortes de vigne », donnant du bon vin, furent introduites (Sittler, 1956).

### **2.1.2. Au XVIème**

L'expansion du vignoble alsacien, se poursuit jusqu'à la fin du XVIème siècle pour atteindre son apogée. Les magnifiques maisons de style Renaissance témoignent encore de la prospérité de cette époque où les vins d'Alsace étaient exportés dans toute l'Europe : c'est l'âge d'or de la viticulture alsacienne (Glatre, 2001). La propriété des vignes se trouve en grande partie dans les mains des seigneurs et des ecclésiastiques qui les faisaient travailler par leurs valets ou les donnaient en location à des vigneron. Les cépages courants à grand rendement (Hünsch, Olber et Burger) ainsi que les cépages nobles étaient plantés indistinctement, de sorte que les vins restaient des mélanges (Sittler, 1956; 1974).

Au XVIème siècle, il y eut de nombreuses années mauvaises pour la viticulture par suite d'hivers rigoureux, de gels printaniers, d'étés humides et froids, d'orages de grêle (1511, 1517-18, 1531, 1533-34...) et d'autres années (1505 par exemple), les vendanges atteignirent une telle ampleur « qu'en beaucoup d'endroits on donna le vin pour rien », et 1539, les vendanges durèrent huit semaines (Sittler, 1974).

Au cours de ce siècle, les cépages nobles (« Noble Rouge », « Noble Blanc », Muscat Rouge et Blanc, Traminer et Riesling) gagnent du terrain sur les cépages à gros rendements (Hünsch, Olber, Burger...). La production des vins de qualité reste toutefois limitée à quelques localités renommées et aux terres seigneuriales (Gyss, 1978). Par exemple, le règlement viticole de Riquewihr de 1575 spécifie que dans la banlieue de cette ville, n'étaient permis que des cépages nobles (Noble Blanc, Noble Rouge, Muscat Blanc et Rouge, Noble Clevner Blanc, Rouge et Gris, le Blanc Lombard) par contre les cépages de sorte commune (Hünsch, Olber, Burger) étaient interdits (Wolff, 1967; Sittler, 1974).

### 2.1.3. Au XVII<sup>e</sup> siècle

La guerre de trente ans (1618-1648) aura des conséquences catastrophiques sur le vignoble alsacien : la moitié fut détruite ou laissée en friche. La reconstruction fut longue et difficile (Gyss, 1978). L'extension des vignobles se fit en faveur de la plaine et au détriment des coteaux (Glatre, 2001). Pour reconstruire tout un vignoble, il fut planté des cépages faciles à cultiver et prolifiques, donnant un vin médiocre. Les capitaux nécessaires au lent développement d'une viticulture de qualité avaient disparu et la pénurie de vin était telle que même les plus mauvais trouvaient preneur. En outre, la dîme ecclésiastique et les taxes seigneuriales n'incitaient pas les roturiers à planter de meilleurs cépages, d'un rendement inévitablement plus faible. Malgré ces circonstances défavorables, les abbayes choisirent de privilégier le Riesling (Johnson, 1990). Les ordonnances sur la qualité mises en place au XVI<sup>e</sup> siècle, sont abandonnées, par la force des choses (Wolff, 1967).

Dans la deuxième moitié du XVII<sup>e</sup> siècle, les ordonnances sur la qualité réapparaissent dans certaines communes (Riquewihr, Ribeauvillé). La liste des cépages recommandés et des cépages condamnés est affichée à l'hôtel de ville (Fig. 21). Les corporations surveillaient étroitement le vignoble et la qualité des vins. En cas de transgression, une amende d'une livre par cep (très élevée pour l'époque) et parfois l'arrachage des pieds, étaient encourus (Wolff, 1967).

### 2.1.4. Au XVIII<sup>e</sup> siècle

Les paysans des plaines se mirent à planter des vignes dans les anciens champs de blé et les pâturages. Ainsi la culture de la vigne s'étendit du simple au triple dans certains bailliages. Le vin de la plaine était médiocre et se vendait à bas prix, entraînant la chute du cours des vins de la montagne. Ces vins de la montagne disposaient toutefois d'un atout non négligeable, la qualité (Muller, 1999). Un édit royal de 1731 tenta bien de mettre fin à cette situation, mais sans grand succès. De plus, les cépages communs réapparaissent. La décadence du vignoble alsacien n'a pas d'autre cause : « la quantité a noyé la qualité » (Wolff, 1967).

Après quelques périodes d'un climat plus rigoureux qui n'améliorait pas la qualité des vins, l'amélioration des conditions climatiques permit l'élaboration des vendanges tardives (Johnson, 1990). Après la révolution de 1789, les terres seigneuriales et ecclésiastiques sont morcelées, et les corporations sont supprimées. Ce qui entraîne une période de libéralisme

durant laquelle, les vignerons pouvaient planter la vigne où ils voulaient et les cépages qu'ils voulaient (Glatre, 2001).

### **2.1.5. La période Napoléonienne**

Durant la période Napoléonienne, l'Alsace se transforme en un vaste camp militaire où le vin coule à flots. Les Alsaciens se tournent délibérément vers des cépages à forts rendements (Gyss, 1978). La demande dépassant l'offre, le vigneron remplace la qualité par la quantité, il cultive le Chasselas, le Burger, le Hünisch et le petit Raeschling (Knipperlé) pour la confection des vins communs. A côté étaient cependant plantés des cépages de choix et de qualité mais ne couvrant qu'une partie restreinte du vignoble. De nouveaux cépages apparaissent comme le Sylvaner. Le Riesling connu depuis le XVII<sup>ème</sup> s'étendit d'avantage (Sittler, 1956; 1974). Grâce au Riesling, l'Alsace commença à revivre et bénéficia, pendant les guerres Napoléoniennes, d'une prospérité qu'elle n'avait pas connue pendant près de 200 ans (Johnson, 1990). Les vignes couvrent alors 24500 ha (Gyss, 1978).

### **2.1.6. L'époque Allemande 1870 à 1918**

Suite à l'annexion de l'Alsace à l'Empire allemand, la viticulture alsacienne se trouve face à une situation nouvelle. Elle n'arrive pas à écouler ses vins dans le reste de l'Allemagne et subit l'introduction des vins allemands (Sittler, 1974). Dans les villes, le goût du public pour la bière multipliait les brasseries (Wolff, 1967). La réglementation allemande favorisait la production de masse. On cultivait avant tout les cépages ordinaires (Burger et Chasselas) et des cépages de meilleure qualité (Knipperlé) mais tout était vendangé ensemble pour faire des vins courants, peu renommés et qui se vendaient difficilement (Sittler, 1956; 1974).

Avant l'annexion à l'Allemagne, l'absence de réglementation, a permis la plantation de nouveaux cépages américains (1865). L'arrivée de ces nouveaux cépages fut accompagnée de celle de nouvelles maladies dues à des champignons (Mildiou, l'Oïdium), et de nouveaux insectes (le phylloxéra, le ver de la grappe) qui s'attaquèrent à la vigne. Le phylloxéra infesta un tiers du vignoble alsacien. La viticulture alsacienne connut alors la crise la plus grave de son histoire. L'administration allemande fit arracher et brûler les vignes malades et n'autorisa une nouvelle plantation que dix ans plus tard. La plupart des vignerons se retrouva ruinée (Sittler, 1974).

Chrétien Oberlin, œnologue alsacien, cherchait à rendre les ceps plus résistants. Dans cette optique, il créa des vignes hybrides, à partir de vignes d'origine américaine (*Vitis riparia*), résistantes aux maladies et insectes, et de vignes alsaciennes (Muller, 1999). Ces hybrides furent plantés en grande quantité pour reconstruire le vignoble; ils donnaient un vin en grande quantité, certes, mais de qualité plutôt médiocre (Sittler, 1974).

### **2.1.7. L'entre-deux guerres**

Après le retour de l'Alsace à la France, il était impossible pour les vins alsaciens de lutter contre les vins rouges français. La seule solution fut de planter des cépages nobles et de produire des vins de qualité. Gustave Burger, suivis par de nombreux viticulteurs, lutta pour que la reconstruction du vignoble alsacien se fasse avec cépages nobles, organisa la lutte contre les maladies et les insectes, en collaboration avec la station de Recherche Oenologique et l'Institut Viticole de la ville de Colmar (Sittler, 1974). En 1927, une loi interdit les cépages hybrides dans les vignobles d'appellation d'origine, les hybrides furent progressivement éliminés. Grâce aux plants greffés, les cépages Chasselas, Sylvaner, Pinot, Tokay, Muscat, Riesling et Gewurztraminer, furent réintroduits en parcelles « mono-cépages ». Les vins gagnaient en qualité et s'imposaient peu à peu à l'attention du public français et international, sous l'appellation « Vins d'Alsace » (Sittler, 1974).

### **2.1.8. Après 1945**

Après la seconde guerre mondiale, le vignoble alsacien se retrouve une nouvelle fois saccagé. Les cépages nobles furent conservés et il fallut quelques années pour que la viticulture alsacienne retrouve sa prospérité (Bischoff, *et al.*, 1978). C'est à cette époque que la notion d'AOC (Appellation d'Origine Contrôlée) apparaît en France. Les viticulteurs alsaciens investissent de plus en plus dans la qualité. Leurs efforts se verront récompensés par l'INAO, en 1962 par la reconnaissance de l'AOC Alsace, en 1975 de l'AOC Alsace Grand Cru puis en 1976 de l'AOC Crémant d'Alsace. Pour améliorer l'organisation de la viticulture, le Conseil Interprofessionnel des Vins d'Alsace (CIVA) est créé en 1962. Des réglementations favorisant la qualité se sont mises en place au fil des années : liste de cépages autorisés pour la production d'AOC Alsace, réglementation de la taille, embouteillage obligatoirement effectué dans l'aire de production. Une limite des rendements est également fixée chaque

année : elle était de 130 hl/ha en 1983 et n'était plus que de 88 hl/ha en 2000 (Fig. 22). En 2005, la limitation des rendements sera encore en baisse de 5 à 10 %.

## 2.2. Le vignoble alsacien

### 2.2.1. Situation :

Large de quelques kilomètres, le vignoble alsacien s'étend sur près de 110 kilomètres de long, des hauteurs de Thann jusqu'au nord de Strasbourg, au pied du versant Est des Vosges (Fig. 23). Il couvre une superficie de 14 600 hectares. Il s'agit essentiellement d'un vignoble de collines (entre 200 et 400 mètres d'altitude). Grâce aux Vosges, qui lui procurent l'une des pluviosités les plus faibles de France (450 à 500 mm d'eau par an), il bénéficie d'un climat semi-continentale ensoleillé, chaud et sec. Ce climat est propice à une maturation lente et prolongée des raisins et favorise l'éclosion d'arômes d'une grande finesse (Thouvenin, 2003). Le vignoble alsacien est né de l'effondrement, il y a plus de cinquante millions d'années, du massif montagneux que formaient les Vosges et la Forêt-Noire. C'est ainsi que la plupart des terroirs alsaciens sont établis sur une multitude de sols (calcaire, granit, argile, sables, grès, ..) qui proviennent de différentes cassures géologiques. Cette mosaïque de roches est à l'origine de la grande variété de terroirs qui caractérise le vignoble Alsacien (Thouvenin, 2003).

### 2.2.2. Les cépages cultivés en Alsace

Les principaux cépages actuels sont :

- le Riesling qui couvre 22,5% de la surface du vignoble
- le Pinot blanc, 21%
- le Gewurztraminer, 18 %
- le Pinot gris, 12,6 %
- le Sylvaner, 11,9 %
- le Pinot noir, 9,1%
- le Muscat, 2,3 %

- les 1,6 % restant comptent aussi le Chardonnay utilisé uniquement pour le crémant, le Chasselas, l'Auxerrois (souvent confondu avec le Pinot blanc), et le Klevener de Heiligenstein.

Les AOC « Alsace » comprennent les sept principaux cépages ; dans la catégorie AOC « Grands Crus », on ne retrouve que les cépages Riesling, Gewurztraminer, Pinot gris et Muscat et dans la catégorie A.O.C. « Crémant d'Alsace » on retrouve principalement le Pinot blanc, mais aussi le Pinot gris, le Pinot noir, et le Riesling ([www.civa.fr](http://www.civa.fr)).

## 2.3. Le Riesling

### 2.3.1. Origines

Il existe plusieurs hypothèses quant à l'origine du Riesling :

- La première prétend que le Riesling serait « l'Argitis minor », ou « l'arceraca » des Romains (Viala et Vermorel, 1901; Johnson, 1990; Stolz, 1994). Il aurait pu être introduit en Alsace au IIIème siècle par les légionnaires romains (Garrier, 1998). Le Riesling, si l'on suit cette hypothèse, serait venu de Grèce, en passant par l'Italie et l'ancienne Gaule (Stolz, 1994). Cette filiation est pourtant douteuse car l'Argitis minor engendrait un vin bon marché, commun et sans longévité (Johnson, 1990).

Une autre hypothèse voudrait que le Riesling soit originaire du Rhingau dans la vallée du Rhin. Au milieu du IXème siècle, des vignes furent plantées dans le Rhingau. Le Riesling proviendrait de semis adventifs, venus de la région d'Orléans, autrefois réputée pour son vignoble (Stolz, 1994).

La culture du Riesling, non interrompue depuis des siècles, fait perdre la trace de son origine (Fig.24). Mais des écrits témoignent que le Riesling était déjà présent dans les régions du Rhin et de la Moselle en 1577. Mais c'est surtout après la guerre de trente ans (XVIIème siècle) que le Riesling connut son heure de gloire. Lors de la reconstruction du vignoble, l'église choisit de replanter une partie de son vignoble en Riesling. Si l'origine de ce cépage est peu certaine, sa qualité avait déjà été reconnue depuis plusieurs siècles (Johnson, 1990).

Depuis cette époque, le Riesling a toujours été cultivé en Allemagne et en Alsace. Aujourd'hui, on le retrouve également en Hongrie, en Croatie, au Canada et aux Etats-Unis (Galet, 2000).

Son nom semble dérivé du mot *riesen* qui signifie « couler », parce que ce cépage venu de région plus chaude, aurait été enclin à la coulure avant d'être acclimaté aux zones septentrionales (Stolz, 1994). On le retrouve également sous les noms de Gentil aromatique, Raisin du Rhin, Edle Gewürztraube en Alsace ou Pétracine en Moselle (Stolz, 1994). Actuellement 65 000 ha de Riesling sont cultivés à travers le monde (Galet, 1990).

### **2.3.2. Description et caractéristiques**

Le Riesling est un cépage à débourrement tardif. Il est souvent planté sur des coteaux bien ensoleillés, en raison de sa maturité tardive dans les régions septentrionales. Il produit de petites grappes cylindriques, les baies sont sphériques, petites, vert clair à jaune doré (Fig. 25).

Les rendements sont très variables et peuvent atteindre un maximum de 100 hl/ha. Pour les vins classés, le rendement ne doit pas dépasser 70 hl/ha (Galet, 1998; 2000; 2001).

En France, un seul clone, le 49, est agréé, mais d'autres sont à l'étude, notamment à l'INRA de Colmar.

### **2.3.3. Importance culturelle**

En France, le Riesling n'est cultivé qu'en Alsace et en Moselle. En Alsace c'est le « cépage roi », il est cultivé sur environ 3000 ha. L'Allemagne est réellement la patrie de ce cépage ; il y est cultivé sur plus de 23000 ha, essentiellement dans les vallées du Rhin et de ses affluents. On retrouve ce cépage dans toute l'Europe : en Suisse, en Autriche, en Ukraine et en Russie. Il est également présent en Australie, en Nouvelle-Zélande, aux Etats-Unis, et au Canada (Galet, 2001).

A travers le monde, on rencontre également de faux Riesling (dont le vin est néanmoins vendu sous le nom de Riesling). Il s'agit surtout du « Riesling Italico » (dans les Balkans et en ex-Yougoslavie), du « Clare Riesling » (en Australie), ou encore du « Grey Riesling » (en Californie).

## **3. Problématique**

### **3.1. Relation entre le rendement et la qualité.**

Les facteurs qui déterminent la qualité du raisin ou du vin sont nombreux mais on peut les regrouper en 4 catégories : les sucres, les acides, les constituants de l'arôme et les composés phénoliques.

D'une manière générale l'augmentation du rendement va diminuer le taux de sucre des raisins et par conséquent la qualité du fruit (Fig.26). Une étude réalisée avec du Pinot Noir a montré que l'augmentation des rendements influait également sur les autres facteurs de la qualité du raisin (tableau 2) (Huglin et Schneider, 1998).

### **3.2. Les composantes du rendement chez la vigne**

Le rendement de la vigne correspond à la quantité de raisin récolté pour une surface donnée. Il est souvent exprimé en kg/ha. Lors des vendanges, le rendement dépend directement du nombre de grappes par souche et du poids moyen des grappes.

La quantité de fruits produits varie en fonction du génotype, mais également des conditions environnementales et des pratiques culturales (Huglin et Schneider, 1998).

#### **3.2.1. Influence du génotype sur le rendement**

Comme nous l'avons vu précédemment, les caractères fertilité (nombre d'inflorescences par rameau) et nombre de fleurs par grappe sont des caractères ampélographiques. Ils sont donc propres à chaque cépage.

Le nombre d'inflorescences portées par un rameau est variable selon les génotypes et de plus, pour un même génotype, la fertilité varie en fonction de la position du bourgeon sur le sarment. La vigueur est également un paramètre qui varie selon les cépages, et qui influe sur la fertilité des bourgeons (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

### **3.2.2. Influence des conditions environnementales**

#### **Le sol, l'altitude**

La nature du sol mais surtout sa composition en éléments minéraux (N, P, K), sa teneur en eau et en éléments organiques influent sur la vigueur des plants de vigne et par conséquent sur la fertilité des bourgeons (§ fertilité des bourgeons) ainsi que sur la croissance des baies. Ainsi un sol riche favorise une récolte abondante. C'est pourquoi les rendements sont en général favorisés en plaine (sol riche), alors que sur les coteaux la qualité est favorisée (Champagnol, 1984; Huglin et Schneider, 1998 ; Galet, 2000).

#### **Le climat**

La vigne est une plante dite héliophile, et son développement sera favorisé sous les climats chauds et bien ensoleillés. L'importance du climat dans la notion de rendement intervient dans la notion de fertilité, de nouaison et de croissance des baies.

La fertilité des cépages est généralement croissante avec l'élévation des températures et de l'éclairement mais la sécheresse, au contraire, la diminuera. La nouaison est également favorisée par des températures élevées et un bon éclairement. Par contre la croissance des baies sera défavorisée par des températures trop élevées et la sécheresse (Champagnol, 1984). D'une manière générale, les climats qui favorisent, le développement de la vigne sont les climats tempérés, méditerranéens et subtropicaux. Sous les climats équatoriaux, la vigne peut même donner deux récoltes annuelles (Galet, 2000).

#### **Les pratiques culturales**

La vigne est cultivée sous des climats très différents et les pratiques culturales ont du s'adapter à des conditions extrêmes. Il est d'ailleurs très difficile d'évaluer les contributions respectives du génotype, du climat et des pratiques culturales sur le rendement puisque ces trois paramètres sont extrêmement liés (Champagnol, 1984; Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000).

### **3.3. Importance de la fertilité dans l'élaboration du rendement**

Différents processus biologiques interviennent dans l'élaboration du rendement : floraison, nouaison, maturation. Ces processus dépendent de caractères génétiques, a priori indépendants les uns des autres : fertilité des bourgeons, nombre de fleurs par inflorescence, nombre de baies par grappe, poids moyen des baies .

Pourtant, des expérimentations réalisées à l'INRA de Colmar entre 1957 et 1971 ont permis de mettre en évidence les relations entre la fertilité des bourgeons, le poids moyen des grappes et le rendement (Fig. 27).

Ces deux composantes sont dépendantes des facteurs climatiques. Dans les régions où les facteurs climatiques sont, en général, favorables au moment de la floraison, la fertilité est le facteur dominant de l'élaboration du rendement. Alors que dans les régions où les conditions climatiques sont souvent défavorables lors de la floraison, le poids moyen des baies est le facteur primordial de l'élaboration du rendement (Huglin et Schneider, 1998).

## 4. Les gènes de floraison

La floraison est une étape importante du développement de la vigne puisqu'elle conditionne la production de fruits. D'un point de vue physiologique, c'est un processus complexe qui se déroule sur deux années. L'identification de gènes de floraison pour la vigne a permis d'acquérir les premières bases moléculaires du développement de cette plante. La caractérisation de l'expression de ces gènes aboutit non seulement à une meilleure compréhension du processus de floraison mais permet également d'utiliser ces gènes pour distinguer des clones d'un même cépage qui diffèrent pour un facteur agronomique très important pour la viticulture: la fertilité.

### 4.1. Les gènes de floraison chez *A. thaliana* (Fig. 28)

Au cours des quinze dernières années, de nombreux gènes impliqués dans le développement floral d'*A. thaliana* ont été identifiés. Ces gènes peuvent être classés en quatre catégories :

- Les gènes impliqués dans la perception et la diffusion des facteurs inducteurs de floraison
- Les gènes intégrateurs de ces facteurs inducteurs
- Les gènes d'identité du méristème
- Les gènes impliqués dans la morphogenèse florale

#### 4.1.1. Les gènes impliqués dans la perception et la diffusion des facteurs inducteurs de floraison

La floraison chez *A. thaliana* peut être induite par des facteurs endogènes (gibbérélines) et par des facteurs de l'environnement (photopériode, température, nutriment).

Chacun de ces facteurs implique l'activation ou la répression d'un grand nombre de gènes :

Les facteurs environnementaux sont perçus par différents organes de la plante et mettent en jeu différentes voies impliquant de nombreux gènes (Fig. 28).

Par exemple, la perception de la photopériode et de la qualité de la lumière, activent via des phytochromes les gènes de l'horloge interne. Ces gènes activent alors le gène *CONSTANS* (*CO*). (Fig.28).

La température (température ambiante + vernalisation) active deux autres voies qui convergent vers l'inhibition du *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), gène répresseur de la floraison (Henderson et Dean, 2004; Bernier et Perilleux, 2005; Chuck et Hake, 2005).

#### 4.1.2. Les gènes intégrateurs

Les différentes voies d'induction de la floraison (lumière, température, hormones) sont intégrées au niveau de trois gènes « intégrateurs » : *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1* (*SOCI*) et *LEAFY*. En effet, tous les signaux inducteurs ou répresseurs de la floraison convergent vers ces trois gènes (Fig. 28) (Henderson et Dean, 2004; Bernier et Perilleux, 2005; Chuck et Hake, 2005).

#### 4.1.3. Les gènes d'identité du méristème

L'identité du méristème (végétative ou florale) est conférée par deux groupes de gènes : Le premier groupe comprend le gène *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*) qui assure le maintien de l'activité végétative du méristème. Le deuxième groupe comprend les gènes d'identité du méristème floral *LEAFY*, *APETALA1* (*API*) et *CAULIFLOWER* (*CAL*).

Lors de l'induction florale, les trois gènes intégrateurs (*LEAFY*, *FT* et *SOCI*) vont activer les trois gènes d'identité du méristème floral (*LEAFY*, *API*, *CAL*). L'activation de ces gènes va réprimer l'expression de *TFL1* (maintien de l'état végétatif) d'une part, et d'autre part activer les gènes impliqués dans la morphogenèse florale (Alvarez, *et al.*, 1992; Liljegren, *et al.*, 1999; Ratcliffe, *et al.*, 1999; Bernier et Perilleux, 2005; Chuck et Hake, 2005) (Fig. 28).

#### 4.1.4. Les gènes impliqués dans la morphogenèse des organes floraux

Les fleurs sont constituées par quatre types d'organes, répartis sur quatre verticilles : de l'extérieur vers l'intérieur, on trouve les sépales, les pétales, les étamines et les carpelles.

La formation de ces organes se fait grâce à l'activation de gènes homéotiques suivant le modèle ABC: Ce modèle prévoit l'activation de trois groupes de gènes homéotiques A, B et C (Coen et Meyerowitz, 1991). Le groupe A comprend les gènes *APETALA1* et *APETALA2*, le groupe B les gènes *APETALA3* et *PISTILLATA*, et le groupe C le gène *AGAMOUS*.

Les gènes A s'expriment dans les verticilles 1 et 2, les gènes B dans les verticilles 2 et 3 et les gènes C dans les verticilles 3 et 4 (Fig. 29).

Dans le 1<sup>er</sup> verticille, l'expression des gènes du groupe A va activer la formation des sépales ; dans le second verticille, l'expression des gènes des groupes A et B conduit à la formation des pétales ; dans le troisième verticille, l'expression des gènes des groupes B et C conduit à la formation des étamines, et dans le quatrième verticille, l'expression des gènes du groupe C conduit à la formation des carpelles (Fig. 29).

Une autre classe de gènes est nécessaire au fonctionnement de ce modèle : les gènes *SEPALLATA1*, 2 et 3. *SEPI* et 2 sont exprimés dans les quatre verticilles, *SEP3* dans les verticilles 2, 3 et 4 (Pelaz *et al.*, 2000; Jack, 2001) (Fig. 29).

## 4.2. Les gènes de floraison chez la vigne en 2000

Lorsque nous avons débuté ce travail en 2000, aucun gène clé du développement de la vigne n'était connu.

## 5. Question de recherche

L'objectif de cette thèse est l'identification de gènes impliqués dans le développement de la vigne, plus particulièrement dans l'étape de floraison.

La vigne est une espèce d'intérêt agronomique pour laquelle peu de recherches au niveau moléculaire, ont été entreprises jusqu'à présent. Ce travail apportera les premières bases moléculaires du développement de la vigne, espèce pour laquelle peu de recherches malgré l'intérêt agronomique

La caractérisation de l'expression des gènes impliqués dans la floraison de la vigne devrait permettre d'entreprendre une étude plus globale des composantes du rendement comme la fertilité ou le nombre de baies par grappe. Les résultats permettront une meilleure compréhension du déterminisme du rendement de la vigne et ainsi permettre un meilleur contrôle de la production de fruits.

## **Matériel et méthodes**

# 1. Matériel végétal

## 1.1. Les clones de Riesling

Les différents clones de Riesling, greffés sur des porte-greffe 161-49C, ont été plantés en parcelle en 1995.

## 1.2. Boutures fructifères

Cette technique permet de produire des inflorescences à différents stades de développement à partir de rameaux aoûtés prélevés au vignoble sur des vignes adultes. Début janvier, les rameaux prélevés sont débités en boutures comprenant 3 nœuds selon le rythme ternaire N0-N1-N2: c'est à dire un nœud sans vrille suivi de deux nœuds avec vrilles (N0 présente une meilleure aptitude à la rhizogénèse). Après 2 heures de traitement dans un bain de cryptonol à 2,5% (fongicide), les boutures égouttées sont conservées à 4°C pendant au moins 6 semaines. Au moment de la mise en route des boutures fructifères, les bourgeons situés en position N0 et N1 sont éborgnés. L'extrémité du bois comprenant le nœud N2 est plongée dans de la cire chauffée à 70°C puis dans de l'eau froide (le bourgeon N2 est ainsi protégé de la dessiccation). L'extrémité N0 des bois est trempée dans une solution hormonale d'IBA à 1g/l puis placée dans des pots contenant un mélange sable/perlite (50:50). Les boutures sont ensuite placées en chambre de culture sur une nappe chauffante (27°C), avec 16 heures de lumière 250  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , 22°C, puis 8 heures sans lumière à 20°C. L'humidité relative est de 60% (Ollat, *et al.*, 1998).

## 1.3. Pépins de vigne

Les semis de vigne sont récupérés à partir des baies au moment des vendanges, lavés puis conservés dans de la sciure de bois humide, à 4°C. Au bout de trois mois, les semis sont lavés, séchés, puis placés sur du papier humide dans des boîtes de Pétri. Un fongicide (benomyl, 1%) est vaporisé avant la fermeture des boîtes. Les boîtes sont placées en chambre de culture, à 30°C pendant 3 heures, à 22°C pendant 21 heures puis à 25°C jusqu'à l'apparition des cotylédons (après 15 jours). Les plantules sont transférées dans de la terre puis remises en

chambre de culture dans les conditions suivantes : 16 heures de lumière 250  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , 28°C, puis 8 heures sans lumière à 20°C. L'humidité relative est de 50%.

#### **1.4. Cals de Vigne**

Nous avons utilisé des cals embryogènes de vigne des cépages et porte-greffe suivants : Riesling, Gewurztraminer, Muscat Ottonel, 3309 Couderc et 110 Richter. Ces cals embryogènes de vigne ont été initiés à partir de tissus somatiques du filet d'anthers (Bouquet, *et al.*, 1982) et cultivés sur milieu MPM1 (Perrin, *et al.*, 2001 ; Perrin, *et al.*, 2004) en chambre de culture à 28°C, à l'obscurité avec 50% d'humidité.

#### **1.5. *Nicotiana benthamiana* et *Arabidopsis thaliana***

Des plantules de *Nicotiana benthamiana* et d'*Arabidopsis thaliana* (Columbia) ont été produites dans les conditions suivantes: des semis sont effectués dans des cagettes (25X15 cm) contenant du terreau (Stendert Base II). Après une nuit à 4°C, les cagettes sont placées en chambre de culture avec 80% d'humidité relative, une photopériode de 16 heures (250  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ), 22°C le jour, et 16°C la nuit.

## 2. Techniques de Biologie Moléculaire

### 2.1. Extraction d'ADN

Les cals embryogènes de vigne ou les tissus végétaux sont broyés dans un mortier avec de l'azote liquide puis homogénéisés avec 1 vol. (pour 100 mg de tissus, 1 vol. = 800 µl) de tampon d'extraction (Tris HCl 10 mM, pH 7,5 ; EDTA 10 mM ; NaCl 50 mM, Sarkosyl 1%, PVP 1%). Après mélange avec 1 vol. de phénol saturé avec du TE (Tris HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM), la phase aqueuse est extraite avec 1 vol. de chloroforme / alcool isoamylique (24:1). L'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité avec 0,2 vol. d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 et 0,6 vol. d'isopropanol. Après centrifugation (10 000 g, 30 min, 4°C), le culot est lavé à l'éthanol 70% puis remis en suspension dans 50 µl de TE contenant de la RNase A (10 µg/ml) puis incubé 15 min à 37°C. L'ADN obtenu est analysé sur gel d'agarose 1% et la quantité d'ADN est évaluée par mesure de la DO à 260 nm (1 de DO à 260 nm correspond à 50 µg/ml).

### 2.2. Extraction d'ARN

#### 2.2.1. ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du Kit QIAGEN RNeasy™ à partir d'environ 100 mg de matériel végétal frais, en utilisant le tampon RLC et selon le protocole préconisé par le fournisseur. Deux modifications ont été apportées à ce protocole: le volume de tampon d'extraction a été doublé et supplémenté avec un détergent, le PVP 40, à raison de 10 mg/ml. L'extraction à partir de tissus « verts » (feuilles, inflorescences) a été réalisée avec le tampon RLC ; le tampon RLT a été utilisé pour les autres tissus (Racines, bourgeons latents aoûtés). Les ARN totaux sont quantifiés par mesure de la DO à 260 nm (1 de DO à 260 nm correspond à 40 µg/ml) et analysés en gel d'agarose 1% .

### **2.2.2. ARN messagers**

Les ARN messagers ont été purifiés avec un kit Qiagen (Oligotex™) selon les conditions préconisées par le fournisseur à partir d'environ 200 µg d'ARN total.

### **2.3. Reverse transcription**

La reverse transcriptase (ADN polymérase ARN dépendante) permet la synthèse d'un ADNc à partir d'une amorce spécifique, en utilisant un ARN comme matrice. Les expériences de RT ont été effectuées avec la transcriptase reverse Superscript de Life Technologies selon les recommandations du fournisseur.

### **2.4. PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Toutes les réactions PCR ont été réalisées avec la Taq polymérase (Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur dans un thermocycler (Robocycler® Stratagene) en utilisant des tubes de 0,2 ml (Stratagene).

### **2.5. RACE PCR (Rapid Amplification of cDNA End)**

Cette technique permet d'amplifier les extrémités 5' et 3' d'un ADNc à partir d'une séquence interne connue. Elle est basée sur la succession de réactions de "reverse transcription" et de PCR. La synthèse des 2 extrémités se déroule en 2 étapes: RACE PCR 3' (amplification de l'extrémité 3' de l'ADNc) et RACE PCR 5' (amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc).

Ces deux étapes ont été réalisées à l'aide du kit 5' / 3' Race™ (Boehringer) selon les recommandations du fournisseur.

## **2.6. Clonage de fragment PCR avec le vecteur pPCR-Script AMP SK (+) (Stratagene)**

Cette méthode permet un clonage efficace de fragments PCR. Nous l'avons utilisée pour cloner les produits issus des RACE PCR selon le protocole décrit par Stratagene.

Brièvement, après élimination des amorces et des dNTPs non incorporés, les extrémités des produits PCR obtenus sont remplies à l'aide de la Pfu DNA polymerase en présence de dNTPs. Les produits PCR sont ensuite incubés en présence de plasmide pPCR-Script AMP SK (+) prédigéré par Srf I, la T4 DNA ligase et l'enzyme de restriction Srf I. La présence de l'enzyme Srf I dans le milieu de ligation permet de maintenir le vecteur à l'état linéarisé et favorise l'insertion des fragments PCR. Après inactivation des enzymes présentes dans le milieu de ligation, les bactéries XL10-Gold ultracompétentes (Stratagene) sont transformées par choc thermique avec une aliquote du milieu de ligation. Les bactéries transformées sont reprises dans du milieu de culture NZY+ et incubées 1h à 37°C. Elles sont ensuite étalées sur du milieu LB solide contenant de l'ampicilline (100 µg/ml), de l'IPTG (200µM) et du X-Gal (80 µg/ml). Les boîtes sont incubées toute une nuit à 37°C.

## **2.7. Séquençage et analyse des séquences**

La séquence des plasmides recombinants a été déterminée à l'aide d'un séquenceur ABIprisme 373 par le service de séquençage de l'IBMP-CNRS de Strasbourg.

Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide des logiciels Vector NTI (Infomatrix) et de la banque de données [www.ncbi.nlm.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.gov/blast/).

## **2.8. Southern Blot (DIG luminescent Detection Kit™ Boehringer) :**

Cette technique permet la détection d'ADN par hybridation moléculaire à l'aide de sondes spécifiques synthétisées par PCR en présence de dNTPs marqués à la digoxigénine (DIG). Ces sondes sont ensuite détectées par un anticorps anti-digoxigénine conjugué à une phosphatase alcaline. Cette enzyme va déphosphoryler un substrat CDP-*Star*<sup>TM</sup> (Boehringer), produisant ainsi une émission photo lumineuse (447 nm) pouvant être enregistrée sur des films sensibles aux rayons X.

### **2.8.1. Electrophorèse et transfert**

Les ADN de vigne (20 µg), de *N. benthamiana* (15 µg) et d'*A. thaliana* (5 µg) sont digérés dans un volume final de 100 µl par l'enzyme HindIII (toute une nuit à 37°C). La réaction enzymatique est stoppée par extraction avec 1 vol. de phénol chloroforme alcool isoamylique (25:24:1) puis l'ADN est précipité avec 2 vol. d'éthanol 96% et 0,1 vol. d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2. Après centrifugation (10 000 g pendant 30 min à 4°C), le culot est lavé à l'éthanol 70% puis remis en suspension dans 15 µl d'eau. Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 %, puis transférés sur une membrane de nylon chargée positivement (Boehringer) par capillarité dans un tampon SSC 20X (NaCl 3 M, citrate de sodium 300 mM) pendant une nuit (Sambrook, *et al.*, 1989). Les ADN sont fixés à la membrane par irradiation aux UV (254 nm) de 1200 Joules pendant 30 secondes.

### **2.8.2. Hybridation et révélation**

L'hybridation et la révélation sont réalisées conformément au protocole du fournisseur: la membrane de nylon est préhybridée pendant 2 heures dans une solution de DIG Easy Hyb<sup>TM</sup>, puis incubée avec les sondes diluées dans la solution de DIG Easy Hyb<sup>TM</sup> (5 à 25 ng/ml) à 42°C toute une nuit. Après 2 lavages de 15 min à 68°C, avec des solutions de SSC (2X et 0,5X) contenant 0,1% de SDS, la membrane est hybridée 30 min avec l'anticorps anti-DIG (dilué 1:20 000). La membrane est ensuite incubée en présence d'un substrat CDP-*Star*<sup>TM</sup> (Boehringer) 5 min dans le noir puis exposée de 5 à 30 min au film sensible aux rayons X.

## **2.9. Hybridation *in situ***

### **2.9.1. Fixation, inclusion et coupes**

Les tissus végétaux sont fixés dans une solution de PBS contenant 4% de formaldéhyde (fraîchement préparée) et 0,1% de Triton, sous vide pendant 2 fois 20 minutes puis à 4°C pendant toute une nuit. Les échantillons sont ensuite lavés puis déshydratés par incubations successives dans des dilutions d'éthanol décroissantes. L'inclusion dans la paraffine est réalisée selon le protocole décrit par D. Jackson (Jackson, 1991). Des coupes de 10 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome, puis déposées sur des lames prétraitées (Dako).

### **2.9.2. Préparation des sondes**

A partir d'un plasmide contenant le cDNA du gène, un ARNm « antisens » est synthétisé par transcription *in vitro* avec incorporation de Dig-UTP (Roche). Cette transcription est réalisée suivant le protocole suggéré par le fabricant (Roche).

### **2.9.3. Hybridation et révélation**

Après un pré-traitement des lames (élimination de la paraffine, réhydratation, élimination des protéines, puis déshydratation), la sonde est hybridée sur les coupes. Après différentes étapes de lavage, les lames sont incubées avec un anticorps permettant de détecter les hybrides ARN-ARN marqués à la Digoxigénine. Cet anticorps est couplé à une phosphatase alcaline qui permet de visualiser les hybrides ARN-ARN, par une réaction d'oxydo-réduction qui donne un précipité bleu.

L'hybridation ainsi que l'immuno-détection des sondes marquées à la Digoxigénine sont réalisées conformément au protocole du fournisseur (Roche).

## **2.10. RT PCR Quantitative**

### **2.10.1. RT PCR**

Les RT PCR quantitatives ont été réalisées à partir de 25 ou 50 ng d'ARN totaux à l'aide du kit QuantiTec<sup>TM</sup>SYBR<sup>®</sup>Green RT PCR (Qiagen), selon le protocole suggéré par le fabricant, dans un thermocycler BioRad iCycler iQ. L'expression du gène *VvACTINE 2* (GenBankAF369525) a été utilisé comme référence.

### 2.10.2. Quantification relative

La quantification relative a été réalisée suivant la méthode mathématique décrite par Pfaffl (Pfaffl, 2001).

On utilise ensuite les CT (Cycle Threshold), correspondant au nombre de cycles de PCR nécessaire pour franchir le « seuil » (Fig. 30).

L'efficacité de PCR est calculée grâce à une gamme ; Elle est égale à  $10^{(-1/\text{pente})}$  et pente correspond à la pente de la gamme

On obtient alors un ration entre le niveau de transcrit du gène cible entre deux échantillons.

Afin de comprendre les étapes fondamentales de la floraison de la vigne, nous avons développé une approche moléculaire basée sur ce qui était connu chez d'autres espèces notamment les espèces modèles comme *Arabidopsis thaliana* et *Antirrhinum majus*. Chez ces deux espèces, il avait été démontré qu'il existait un gène *LEAFY* (chez *A. thaliana*) et *FLORICAULA* (chez *A. majus*) qui permettaient la transition d'un méristème végétatif en méristème inflorescentiel (Coen, *et al.*, 1990; Weigel, *et al.*, 1992). Les séquences nucléotidiques de ces deux gènes étant relativement conservées, des orthologues de *LEAFY/FLORICAULA* ont pu être identifiés chez des espèces aussi différentes que la tomate, le pin, le tabac, l'eucalyptus... (Kelly, *et al.*, 1995; Mellerowicz, *et al.*, 1998; Mouradov, *et al.*, 1998; Southerton, *et al.*, 1998; Molinero-Rosales, *et al.*, 1999).

En se basant sur la conservation de séquence nucléotidique de différents orthologues de *LEAFY/FLORICAULA*, nous avons recherché par PCR à l'aide d'amorces dégénérées la présence d'un orthologue de ce gène chez la vigne. A partir de la courte séquence obtenue, nous avons pu cloner la totalité de la séquence codante par RACE PCR et la totalité de la séquence génomique par PCR, de l'orthologue de *LEAFY/FLORICAULA* pour la vigne (*VvLEAFY*). Nous avons ensuite réalisé une étude complète de l'expression de ce gène au cours du développement de la vigne. Cette étude a été réalisée par RT PCR et hybridation *in situ* afin de savoir où et à quel stade de développement le gène *VvLEAFY* était transcrit.

Les premiers résultats ont montré que le gène *VvLEAFY* du Riesling n'est présent qu'en une seule copie par génome. La structure du gène et la séquence protéique sont relativement bien conservées par rapport aux orthologues de *AtLEAFY* déjà identifiés (Mellerowicz, *et al.*, 1998; Mouradov, *et al.*, 1998; Southerton, *et al.*, 1998; Wada, *et al.*, 2002). L'analyse de l'expression de *VvLEAFY*, par RT PCR et hybridation *in situ* a montré que des transcrits sont retrouvés de manière spécifique dans les bourgeons latents et les inflorescences. Cette expression spécifique aux tissus inflorescentiels semble conservée pour l'ensemble des orthologues déjà décrits. Par contre, le gène de la vigne est transcrit de façon continue sur deux années : de la mise en place du bourgeon latent jusqu'à la pleine floraison, au printemps suivant, ceci remettant en question la dormance des bourgeons latents. De plus, une étude de l'expression de ce gène sur des plantes issues de semis montre que le gène est déjà transcrit dans les bourgeons apicaux et latents, au cours de la phase juvénile, bien avant que la plante acquière la compétence à fleurir.

Le gène *VvLEAFY* ne constituant pas un marqueur de la transition phase juvénile – phase adulte, nous avons donc cloné et étudié l'expression d'autres gènes orthologues d'*Arabidopsis* impliqués dans la floraison comme *TFL1*, *API*, *SEP3* et *AG* (Coen et Meyerowitz, 1991). L'analyse par RT PCR et hybridation *in situ* a révélé que l'expression de *VvTFL1* et *VvLEAFY* commençait peu après la germination dans le méristème apical puis continuait dans les bourgeons latents. Au moment de la transition d'un méristème végétatif en méristème inflorescentiel, l'expression de *VvTFL1* décroît alors que celle de *VvLEAFY* augmente. L'analyse de l'expression des gènes *VvAPI*, *VvSEP3* et *VvAG* est corrélée à la morphogenèse des organes floraux (comme chez *Arabidopsis*).

## **Résultats**

# 1. Clonage de l'orthologue de *AtLEAFY* chez la vigne

En se basant sur les homologues de séquences nucléotidique et protéique existant entre les différents orthologues de *AtLEAFY*, Southerton *et al.* ont choisi une zone très conservée de la séquence 3' des ADNc, à partir de laquelle ils ont déterminé une paire d'amorces dégénérées encadrant une région d'une centaine de nucléotides (Southerton, *et al.*, 1998). Ces amorces leur ont permis d'amplifier par PCR, à partir d'ADN génomique d'Eucalyptus, un fragment de 141 pb du gène *ELF*, orthologue de *AtLEAFY* chez l'Eucalyptus. Une paire d'amorces ODR et ODS identique à celle décrite par Southerton (Southerton, *et al.*, 1998) a été synthétisée et utilisée pour amplifier par PCR à partir du génome de la vigne un fragment pouvant correspondre à l'orthologue de *AtLEAFY* chez la vigne.

Ces 2 amorces ont permis d'amplifier à partir d'ADN génomique extrait de cals de 110R, Gewurztraminer et Muscat, un fragment d'environ 126 pb.

Les différentes séquences déterminées pour les 3 génotypes ont été alignées puis comparées entre elles. La séquence encadrée par les amorces dégénérées ODS et ODR est 100% identique pour un cépage donné et entre les cépages comparés (résultats non montrés). La comparaison de cette séquence issue de la vigne avec les fragments correspondants du gène *AtLEAFY* et de ses orthologues montre 87% d'identité avec le gène du tabac, 86% avec celui du pétunia, 84% avec celui de la tomate, 83 % avec celui du kiwi, 82% avec celui du peuplier, 79 % avec celui du pois, 75% avec celui de l'Eucalyptus et 70% avec *AtLEAFY*.

Ce fragment de 126 pb présentant de fortes homologues avec de nombreux orthologues, nous avons voulu vérifier qu'il était bien spécifique de la vigne et qu'il n'était pas issu de contaminations, notamment par de l'ADN de *N. benthamiana* ou d'*A. thaliana*, espèces couramment utilisées dans le laboratoire.

La spécificité de ce fragment de 126 pb a été vérifiée par Southern Blot (Fig. 31). L'ADN génomique de 5 génotypes de vigne (110R, 3309C, Gewurztraminer, Muscat et Riesling), de *N. benthamiana* et d'*A. thaliana* a été digéré puis transféré sur membrane de nylon. La membrane a ensuite été hybridée avec une sonde correspondant au fragment de 126 pb ou avec une sonde correspondant au gène de l'hexose transporteur.

La sonde correspondant au fragment de 126 pb s'hybride avec un fragment de 6,5 kb pour les 5 génotypes de vigne. Aucun signal n'est observé pour les ADN d' *A. thaliana* et de *N. benthamiana* (Fig. 30).

Un signal de plus faible intensité a été obtenu avec l'ADN de 110R bien que l'hybridation avec la sonde de l'hexose transporteur *VvTH* (Fillion, *et al.*, 1999) montre qu'une quantité équivalente d'ADN ait été déposée pour tous les ADN génomique de vigne. La sonde *VvTH* montre également que l'absence de signal dans les pistes de *N. benthamiana* et d'*A. thaliana* avec la sonde correspondant au fragment de 126 pb, n'est pas liée à une absence d'ADN dans les pistes (Fig. 31).

Ces résultats nous indiquent que le fragment de 126 pb obtenu est bien spécifique de la vigne et correspond potentiellement à un fragment de l'orthologue de *AtLEAFY* chez la vigne.

A partir du fragment de 126 pb identifié précédemment, nous avons pu envisager le clonage de la séquence complète de l'ADNc correspondant au gène de la vigne en utilisant la technique de RACE PCR.

Cette technique nécessite de connaître les stades de développement pendant lesquels le gène est transcrit. Les données bibliographiques, concernant l'expression des différents orthologues de *AtLEAFY*, ont montré que, chez le pin, l'expression du gène est prolongée au cours du développement floral (Mellerowicz, *et al.*, 1998). Nous avons donc fait l'hypothèse que l'orthologue de *AtLEAFY* chez la vigne pouvait être transcrit au cours des premiers stades de développement floral, bien que les inflorescences se mettent en place dans bourgeons latents l'année précédant la floraison. Des expériences préliminaires de transcription reverse, en utilisant un couple d'amorces spécifiques VVLFY1R et VVLFY1S encadrant le fragment de 126 pb, ont été réalisées à partir des ARN totaux extraits de bourgeons au stade de développement C. Un fragment spécifique de taille attendue (environ 140 pb) a été obtenu (résultat non montré). Pour les expériences de RACE PCR, nous avons donc choisi d'extraire les ARN messagers à partir de bourgeons prélevés sur des boutures fructifères au stade de développement C (Baggiolini, 1952).

Plusieurs cycles de RACE PCR auront été nécessaires pour connaître la totalité de la séquence codante de l'orthologue de *AtLEAFY* chez la vigne.

La séquence génomique de ce gène a pu être clonée par PCR à partir d'ADN génomique extrait de cals de Riesling (Clone 49) et d'amorces déterminées d'après la séquence de l'ADNc. Nous avons baptisé ce gène, *VvLEAFY* (pour *Vitis vinifera LEAFY*). *VvLEAFY* présente une séquence protéique très conservée par rapport à celles des orthologues de *AtLEAFY* (Fig. 32).

## 2. Analyse de l'expression des gènes de Floraison chez la vigne

**“ Expression analysis of flowering genes from seedling-stage to vineyard life of grapevine cv. Riesling”**, JOLY Delphine, PERRIN Mireille, GERTZ Claude, KRONENBERGER Jocelyne, DEMANGEAT Gérard and MASSON Jean Eugène. *Plant Science* 166 (6), (2004), 1427-1436.

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Delphine Joly**, Mireille Perrin, Claude Gertz, Jocelyne Kronenberger, Gérard Demangeat, Jean Eugène Masson.

**Expression analysis of flowering genes from seedling-stage to vineyard life of grapevine cv. Riesling.**

Plant Science 166, 1427-1436 (2004)

Pages 1427-1436 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur /

<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.12.041>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

Depuis des millénaires, l'homme propage la vigne de manière végétative (bouturage), exerçant ainsi une forte pression de sélection en ne multipliant que les formes présentant des caractéristiques qu'il juge intéressantes pour la production de fruits. Cette sélection, ainsi que la crise phylloxérique du XIX<sup>ème</sup> siècle ont contribué à la disparition d'un grand nombre de génotypes (phénomène «d'érosion génétique ») (Huglin et Schneider, 1998).

Dans le but de conserver les ressources génétiques constituées par les cépages-populations, un conservatoire national (ENTAV), ainsi que des conservatoires régionaux ont été créés. Ces conservatoires permettent de sauvegarder le patrimoine génétique de ces cépages-populations et constituent également des ressources pour d'éventuelles sélections clonales.

Dans les années 80, Huglin et Balthazard ont entrepris une prospection à travers le vignoble alsacien pour rassembler un grand nombre de clones des cépages Riesling, Gewurztraminer, Sylvaner, Pinots Blanc et Gris, représentant au mieux la variabilité actuelle de ces cépages-populations (Huglin et Schneider, 1998). Cette collection de clones est conservée à l'INRA de Colmar (Tableau. 3).

Parmi les 182 clones de Riesling de cette collection, 18 ont été placés, en 1996, en parcelles expérimentales pour une sélection clonale. Une évaluation sanitaire puis une évaluation agronomique des clones ont ainsi pu être réalisées (Fig. 33).

Parmi les caractères agronomiques mesurés, nous nous sommes intéressés aux caractères « fertilité » et « nombre de baies par grappes » qui conditionnent le rendement.

Les résultats ont montré que ces caractères pouvaient varier d'un clone à un autre. Par exemple, la fertilité de ces clones varie entre 1,6 et 2,2 inflorescences par rameaux. Cette étude, réalisée sur une même parcelle, dans les mêmes conditions de culture et sur 5 ans, montre que ces variabilités inter-clonales (fertilité et nombre de baies par grappe) sont maintenues au cours du temps et ne sont pas liées à des différences environnementales ou à des différences de pratiques culturales. Cette variabilité phénotypique résulte donc bien d'une variabilité génétique inter-clonale.

La fertilité correspond au nombre d'inflorescences par rameau, et le nombre de baies par grappe est un caractère directement lié au nombre de fleurs par inflorescence, la floraison apparaît donc comme une étape importante dans le déterminisme de ces caractères

agronomiques. Pour étudier au niveau moléculaire, la variabilité de la fertilité et du nombre de baies par grappe, nous avons choisi de regarder si cette variabilité pouvait être perçue au niveau des gènes de floraison.

Nous avons mesuré le niveau de transcrits des gènes de floraison *VvLEAFY* et *VvTFL1* pour deux clones de Riesling dont l'un présentait une fertilité faible et un nombre élevé de baies par grappe, l'autre présentait les caractéristiques inverses. L'analyse par RT PCR quantitative a montré que les niveaux de transcrits de ces deux gènes différaient entre les deux clones. L'ensemble de nos résultats suggère que le niveau de transcrits de *VvLEAFY* et *VvTFL1*, et le nombre d'inflorescences (fertilité) et de fleurs (donc de baies) soient associés.

**Evolution of the Grapevine revealed by Riesling clones diverging for fruitfulness and expression of flowering genes.** *Joly et al., 2005, Submitted.*

# **Evolution of the Grapevine revealed by Riesling clones diverging for fruitfulness and expression of flowering genes**

Delphine Joly\*, Christophe Schneider\*, and Jean E. Masson

UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin - INRA / Université Louis Pasteur Strasbourg,  
Colmar , France.

\* both authors contributed equally to the work

## Running head

Vine flowering genetic evolution

## Key words

Grapevine, evolution, fruitfulness, *VvTFL1* and *VvLEAFY*

## Corresponding author

Jean E. Masson

[masson@colmar.inra.fr](mailto:masson@colmar.inra.fr)

phone (33) 3 89224960

fax (33) 3 89224951

INRA

28 route de Herrlisheim

F68000 Colmar

France

## Abstract

The quality of the wine all over the world is directly linked to grapevine genotypes. In order to preserve the genetic identity of these precious vine varieties, their spread has been done exclusively by vegetative propagation for centuries. However, new types – the clones - diverged from these varieties and their use have contributed to improve the quality and diversity of wines in a significant way. Though recent molecular profiling with DNA markers suggested a genome evolution in the diverging clones, the diversity remains underscored and we lack insights into the analysis of gene expression for further description of these new evolved vines. Two Riesling clones with poor and high fruitfulness were identified in a collection of clones after five years study on an agronomic level. The differences in fruitfulness were found to be associated with variations in transcript levels of the flowering genes *VvLEAFY* and *VvTFL1*. The molecular analysis reveals also changes that occur over the two years it takes for a bud to come to flowering and emphasizes the differences between the two clones. Thus, we provide the first evidence that the evolution of grapevine upon vegetative propagation results in changes in the gene expression level.

## Introduction

The quality of the wine all over the world has a direct link with the grapevine genotypes. The genetic identity of these precious varieties has been preserved by vegetative propagation, for centuries. However a careful examination of grape literature and worldwide extensive explorations of vineyards suggest that a lot of diverging forms of varieties have arisen. With the aim of improving the quality of the wine, all varieties are subjected to intense search for new clones whose traits can be maintained by vegetative propagation. The variability among these new clones is largely underscored since the Ampelography is unable to ascertain all the genotypic differences. However, with the development of molecular markers and more recently, a better knowledge of the grapevine genome, we were able to refine genotypic differences within a variety.

In the Pinot family for example, clones with berries that differ in size or colour and whose clusters are tight or loose are cultivated. This population of clones has been tentatively structured by AFLP-PCR methods, and consequently over 60 haplotypes could be designed (FORNECK *et al.* 2003). The demonstration that Pinot Meunier was a chimaera was a big step forward in understanding the evolution of the grapevine (BOSS and THOMAS 2002; FRANKS *et al.* 2002). The importance of chimaerism in grapevine was furthermore confirmed in studies on Chardonnay and Pinot (BERTSCH *et al.* 2003; HOCQUIGNY *et al.* 2004). Therefore all genetic analyses, performed with DNA markers, made it possible to differentiate clones and varieties, thus confirming the association of clonal divergence and genome evolution which was most likely the result of somatic mutations. However, the phenotypic differences between clones of a variety have never been studied in parallel to gene expression analysis so far.

We have to go back more than 500 years to find the first mention of White Riesling in the Rhein Valley, where it most likely finds its origins (STOLZ 1994), even though accounts already mentioned this variety as early as in the Roman period (VIALA and VERMOREL 1901). Riesling can be found all over the world in as many as 20 countries in Europe, 7 States in the United States and even in South America, reaching more than 65 000 ha, worldwide (GALET 1990). This variety has at least 20 synonymous designations, like Klingelberger in Germany, Rheinriesling in Austria, Rizling Rajinsky in ex-Yugoslavia or even Gentil Aromatique in France during the Middle Age (GALET 1990; STOLZ 1994). What used to be thought of having a link to traditions of wine areas is challenged by official description, according to Ampelography. However, emerging molecular analysis using DNA markers suggest that these diverging phenotypes result from genome evolution. For example, the author Regner differentiates 10 clones in Riesling (REGNER *et al.* 2000).

Relying on the numerous descriptions of various types of Riesling (STOLZ 1994; VIALA and VERMOREL 1901) an extensive research in Northern Europe (Germany, Austria, France) has allowed the collection of a wide range of Riesling accessions. They are preserved in repositories from which the most cultivated clone in France has been chosen (clone 49). In Germany, for example, as many as 80 different clones have been selected from these collections and are being cultivated today (REGNER *et al.* 2000).

Focusing our research on yield variability, we were able to sort out of a 400-types-Riesling-collection clones showing different bud fertility (number of inflorescences per shoot) (RIVES 2000) ranging from  $\approx 1.6$  to 2.2 inflorescences/shoot. Aiming to analyse such phenotypic differences at the molecular level, flowering genes appeared to be good candidates.

The flowering genes *VvLEAFY* (or *VFL*), *VvTFL1*, *VvAPI* (or *VAPI*) and MADS-box genes were recently characterised in grapevine and their expression analysis showed intimate link with the flowering process (BOSS *et al.* 2002; BOSS *et al.* 2001; CALONJE *et al.* 2004; CARMONA *et al.* 2002; JOLY *et al.* 2004).

After an agronomic evaluation of five years on virus-free plants, we came to the conclusion that poor/high yield is a stable feature maintained by vegetative propagation. Our data suggest that the fruitfulness (bud fertility and number of berries per bunch) is a key factor in the contribution of the volume of the vintage. We also found out that the differences in bud fertility and in number of berries per bunch are associated with variations in transcript levels of the flowering genes *VvLEAFY* and *VvTFL1*, thus providing the first molecular proof of phenotype divergence within a variety using functional markers.

## **Materials and methods**

### **Plant material**

A series of 17 clones showing different fruitfulness were grafted on root-stock 161-49C, planted as five randomly placed blocks of 10 plants per clone in a vineyard of a total acreage of 2,500 m<sup>2</sup> (in 1995). The first measurements were performed in 1999 and the data was collected every season for the four following years. Weather data was collected for each period (JOLY *et al.* 2004).

### **Fertility, number of berries per bunch and yield measurements**

In this paper, the term fertility refers to the mean number of flower-clusters (inflorescences) found per primary shoot, developed from the principal latent bud. Enumeration was done approximately two weeks before flowering on the 10 plants of each elementary block. The number of berries per bunch was calculated by using yield (g/plant), number of inflorescences (average by plant) and the average weight of a berry (g). The average weight of a berry was measured from a sample of approximately 200 berries collected on 10 plants for each elementary block. Sampling corresponds to small fractions of bunches (3 to 10 berries) randomly harvested just before vintage (the weight of the rachis was neglected). The final yield corresponds to the fresh grape weight upon harvest, by gathering the production of 10 vines within elementary plot and measuring with a dynamometer (TESTUT). All data were compared with a Student test at  $P \leq 0,05$ .

### Sampling and transcript level analysis

The initiating latent buds (Fig. 1A) were harvested in May from the third and fourth nodes (N1-1, N2-1, Fig. 1C) of 20 shoots randomly picked on 6 plants in two blocks out of five. The latent buds from the first N1 node (N1-1, Fig. 1C and Fig. 1B) were harvested in December from three randomly chosen plants in the two blocks. The inflorescences at the developmental stage F/G (Fig.1B) (BAGGIOLINI 1952) were harvested on plants randomly chosen in blocks. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen after harvest. Total RNA was extracted following the Qiagen RNeasy™ procedure, but with doubled extraction buffer volume supplemented with PVP 40 (10 mg/ml). We used buffer RLT for latent bud harvested in winter and buffer RLC for other tissues. Remaining traces of DNA was eliminated by DNase digestion of the RNA samples.

Quantitative RT-PCR were performed with 25 or 50 ng total RNA using the Qiagen QuantiTect™SYBR®Green RT-PCR kit according to the protocol suggested by the manufacturer with the following primers: LFYR (5'- GCA TCT TGG GTT TGT TGA TGT AGC T - 3') and LFYS (5' - GAG CAA TGC CGT GAT TTC TTG ATC - 3') with Tm= 68°C for *VvLEAFY* (GenBank AY126446); TFL1R (5' - ATA TTT GGC CTT GGC ATT TC- 3') and TFL1S (5' - TRT KRT TGG TAG AGT GAT TGG -3') with Tm= 58°C for *VvTFL1* (GenBank AY260166); ACTR (5' - CCA GCA AGG TCA AGA CGA AGG ATA GC - 3') and ACTS (5' - TGT TGC CAT TCA GGC TGT TCT TTC TC - 3') with Tm= 68°C for *VvACTINE 2* (GenBank AF369525). Quantitative RT-PCR assays were carried out in the BioRad iCycler iQ.

## Results

### Interclonal variation for the fertility in Riesling

Focusing on the yield, we chose a series of clones showing different fertility levels. On a single primary shoot of Riesling, the fertility varies between 0 and 4 (HUGLIN 1986) (Fig. 1C). The first measurements were performed in 1999 and the data have been collected every season for the four following years. Here we focused on the differences between the Riesling clones 49 and I1 which showed high and low fertility, respectively.

For all five years, the fertility of clone I1 was lower than the fertility of clone 49 and the differences were significant for 2000, 2002 and 2003 (Table 1). Also, the mean value for this time period was significantly lower for the clone I1 with a fertility of 1,90 instead of 2,17 for the clone 49 .

### Relative transcript levels of *VvLEAFY* and *VvTFL1*

The transcript levels of *VvACTINE*, as a house-keeping gene, were evaluated by quantitative RT-PCR. The variations of Ct (cycle threshold) values between internal replicates did not exceed 5-6%. When comparing the transcripts levels in initiating latent buds and inflorescences, the average values of Ct ranged at  $25,61 \pm 2,64$ . According to this data, the transcript level of this particular gene was chosen as the reference for all other experiments. We examined *VvLEAFY* and *VvTFL1* transcripts at the mRNA level by quantitative RT PCR using primers flanking introns in order to amplify *VvLEAFY* and *VvTFL1* transcripts. Moreover the accuracy of the quantitative RT-PCR was checked further on (i) by ruling out experiments with Ct higher than 60 (ii), also by controlling the melting curve of the

amplification products and (iii) finally by performing an electrophoresis on acrylamid gel. The Ct, thus obtained, led us to calculate relative quantifications (clone I1 vs clone 49 ) based on the mathematical model described by Pfaffl (PFAFFL 2001). They are represented on semi-logarithm scales (Fig. 2), where bars count for independent experiments each including three individual replicates.

We studied the three main stages of the latent bud: the initiating latent bud, the dormant latent bud in winter and the inflorescence (Fig. 1 A to C respectively). The results are drawn from two independent experiments with inflorescence and two others with initiating latent buds, each including three individual replicates. The variation in Ct (cycle threshold) between internal repetitions did not exceed 13% for the initiating latent buds and 5% for the inflorescences. In the case of initiating latent buds harvested in May, the ratio of relative transcript levels of *VvLEAFY* between Riesling clone I1 and Riesling clone 49 was 0.05 for the first experiment and 0.003 for the second one (Fig. 2A). As for the *VvTFLI*, the ratio was 0.73 (Fig. 2C). In the case of latent buds harvested in December (Fig.1B) *VvLEAFY* transcripts had already been found during a previous study (JOLY *et al.* 2004). However since *VvLEAFY* transcripts were detected only after about 65 cycles (data not shown) we decided not to go on with the analysis. In inflorescences, the ratio of relative transcript levels of *VvLEAFY* between Riesling clone I1 and Riesling clone 49 was 11.3 for the first experiment and 11.7 for the second one (Fig. 2 B), while for *VvTFLI* the ratio was 1.83 (Fig 2D). Even though the data obtained on initiating latent buds may suggest a correlation between the poor fertility of clone I1 and significantly lower transcript levels of *VvLEAFY* when compared to clone 49, the data was surprisingly inversed for inflorescences.

**Interclonal variability for the yield**

While collecting data for fertility (Table 1), we also measured the number of berries per bunch at harvest and weighed the final yields in kg/plant for all five years, to get a more accurate comparison between clone 49 and clone I1 (Table 2).

The number of berries per bunch was higher in clone I1 than in clone 49 over the five years. There were significant differences for the 2000, (2001) and 2002 harvests. The mean of 5 years confirms these differences with values of 95 berries per bunch for clone 49 and 116 berries per bunch for clone I1 (Table 2). The yields obtained in clone I1 were always lower than in clone 49 during grape harvest. The average yield (for five years) was 3.38 kg/plant for clone I1 and 3.76 kg/plant for clone 49, showing a substantial difference statistically.

We can draw the conclusion that even though more berries were produced by clone I1, it still led to a  $\approx 10\%$  lower yield than the most widely grown clone, in this case clone 49.

## Discussion

As grapevine cultivars were exclusively multiplied by vegetative propagation for centuries, numerous clonal differences resulted (or were thought to be linked to) from virus accumulation. However, differences in the colour and the size of berries, that represent traits of interest in viticulture, remained in clones free from any viruses (MANNINI *et al.* 1999). We conducted a careful analysis on these Riesling clones and were unable to reveal any of the main viruses (GFLV, GLRaV, GVA, GFKV, etc ...) known to affect the phenotypic differences reported in this study (data not shown). Therefore, disease origin does not account for the phenotypic differences reported in this study.

Grapevine interclonal variability has already been observed at the phenotypic level for many grapevine cultivars (BOTTA *et al.* 2000; DAULTA *et al.* 1972). We showed that important features like fertility and the number of berries per bunch can vary between two Riesling clones. These phenotypes are stably maintained by vegetative propagation. Since clones are an important factor in influencing yield variability, there are obvious economic consequences as well as consequences in the quality of the produced grapes. It is also relevant that a yield reduction can improve the quality of a vintage drastically. Since the average vintage for Riesling easily reaches 90hl/ha, replacing standard accessions by low fertility clones might reduce worldwide vintage by approximately 0.6 M hl. If applied on a world scale to the main varieties, this kind of choice might help solving the overproduction crisis, that the viticulture world has been facing for about four years.

More importantly, our thorough analysis over five years suggests that poor yield producing clones may lead to wines of significantly better quality (blind official tasting, conducted by the CIVV, France, data not shown). This is actually the main goal of clonal

selection (ongoing assays with other varieties tend to confirm our data). When comparing Riesling clone I1 and Riesling clone 49 in initiating latent buds, we observed an association between high *VvLEAFY* transcript levels and high fertility levels, as well as low *VvLEAFY* transcript levels and low fertility levels. Some further consistence in these data was supported by parallel alteration in *VvTFL1* transcripts levels. Although higher levels of *VvLEAFY* were found in the inflorescences of the low fertility clone I1, *VvTFL1* levels followed the same evolution. Thus during the flowering year, clone I1 had more berries per inflorescence and showed a higher level of *VvLEAFY* transcripts. Data obtained in maize with *ZFL1* and *ZFL2*, the duplicate maize *AtLEAFY* homologs, suggested that *LFY* transcripts levels may play a role in promoting higher orders of inflorescence phyllotaxy in maize (BOMBLIES *et al.* 2003). Even if we are unable to provide evidence for a quantitative link, the association of such variations in both phenotypic and molecular levels may be relevant in Riesling too. Altogether, the differences in fruitfulness in these two clones were associated to variations in transcript levels of the flowering genes *VvLEAFY* and *VvTFL1*. Keeping in mind that the *VvLEAFY* transcript were constantly present during the 2 years of bud flowering (JOLY *et al.* 2004), they seemed tuned in a different way according to whether it was the year of latent bud initiation or the year of flowering.

Intimate interactions between *LEAFY*, *TFL1* and *API* control flowering onset in *Arabidopsis thaliana* and the *LFY/TFL1* ratio seems to determine the fate of meristem (PARCY *et al.* 2002; RATCLIFFE *et al.* 1999). Similar observations were recently described in Citrus (PILLITTERI *et al.* 2004). In grapevine, expression analysis in latent buds and inflorescences showed that *VvLEAFY* and *VvTFL1* transcripts could be detected throughout developmental stages of flowering buds, therefore suggesting that the role of these genes in flowering onset described in *Arabidopsis thaliana* may be conserved in grapevine (CARMONA *et al.* 2002; JOLY

*et al.* 2004). The conservation of this characteristics in diverging clones of Riesling reinforces the likelihood of an association between flowering, fruitfulness and molecular observations.

Within the collection of Riesling clones tested, we discovered other clones with contrasting phenotypes which combine a poor fertility and a small number of berries per bunch, suggesting further interclonal variability for fruitfulness in Riesling (data not shown). The quantitative expression analysis performed on both clones 49 and I1 showed that transcript levels of flowering genes are more thinly tuned. This means that parallel gene expression analysis and agronomic evaluation in the collection of clones may reveal further refinements into genetic diversity in yield. It may be worthwhile to apply this approach to other varieties and for traits with relevant role in viticulture such as sugar and aromatic compounds content or colour of the berries.

With the combination of phenotypic description of clones, molecular analysis with DNA markers, cell layer separation by somatic embryogenesis and gene expression analysis, the 21<sup>st</sup> century invites us into the intimate subtle but valuable genome evolutions of the 10,000 years-old Grapevine.

## **Acknowledgments**

We acknowledge Christine Onimus, Guillaume Arnold, Mireille Perrin, Carine Schmitt, Claude Gertz for technical help and Bharathy Paramata for editing. We thank all colleagues from the Experimental Unit of Viticulture of Colmar who took care of the vineyards for 10 years.

The research described in this report was granted by the Institut National de la Recherche Agronomique, the Conseil Régional d'Alsace (PhD grant of D. Joly) and by the Conseil Interprofessionnel des Vins d'Alsace (stipend of G. Arnold and agronomic evaluation of the Riesling clones).

## References

- BAGGIOLINI, M., 1952 *Les stades repères dans le développement de la vigne et leur utilisation pratique*. Station Féd. Essais Agric., Lausanne.
- BERTSCH, C., F. KIEFFER, C. TRIOULEYRE, G. BUTTERLIN, D. MERDINOGLU *et al.*, 2003 Molecular profiling of *Vitis vinifera* Chardonnay obtained by somatic embryogenesis. *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin* **37**: 223-227.
- BOMBLIES, K., R. L. WANG, B. A. AMBROSE, R. J. SCHMIDT, R. B. MEELEY *et al.*, 2003 Duplicate FLORICAULA/LEAFY homologs *zfl1* and *zfl2* control inflorescence architecture and flower patterning in maize. *Development* **130**: 2385-2395.
- BOSS, P. K., E. SENSI, C. HUA, C. DAVIES and M. R. THOMAS, 2002 Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Science* **162**: 887-895.
- BOSS, P. K., and M. R. THOMAS, 2002 Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* **416**: 847-850.
- BOSS, P. K., M. VIVIER, S. MATSUMOTO, I. B. DRY and M. R. THOMAS, 2001 A cDNA from grapevine (*Vitis vinifera* L.), which shows homology to AGAMOUS and SHATTERPROOF, is not only expressed in flowers but also throughout berry development. *Plant Molecular Biology* **45**: 541-553.
- BOTTA, R., A. SCHNEIDER, A. AKKAK, N. S. SCOTT and M. R. THOMAS, 2000 Within cultivar grapevine variability studied by morphometrical and molecular marker based techniques. *Acta Horticulturae*.

- CALONJE, M., P. CUBAS, J. M. MARTINEZ-ZAPATER and M. J. CARMONA, 2004 Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant Physiology* **135**: 1491-1501.
- CARMONA, M. J., P. CUBAS and J. M. MARTINEZ-ZAPATER, 2002 VFL, the grapevine FLORICAULA/LEAFY ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. *Plant Physiology* **130**: 68-77.
- DAULTA, B. S., J. C. BAKSHI and S. CHANDRA, 1972 Evaluation of vinifera varieties for genotypic and phenotypic variability. *Indian Journal of Horticulture* **29**.
- FORNECK, A., J. KONRADI and R. BLAICH, 2003 A genetic variation analysis of *V. vinifera* cv. Pinot noir. *Acta Horticulturae*.
- FRANKS, T., R. BOTTA and M. R. THOMAS, 2002 Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 192-199.
- GALET, P., 1990 *Cépages et vignobles de France - tome II*. Imprimerie Dehan, Montpellier.
- HOCQUIGNY, S., F. PELSUY, V. DUMAS, S. KINDT, M. C. HELOIR *et al.*, 2004 Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome* **47**.
- HUGLIN, P., 1986 *Biologie et écologie de la vigne*. Payot, Lausanne.
- JOLY, D., M. PERRIN, C. GERTZ, J. KRONENBERGER, G. DEMANGEAT *et al.*, 2004 Expression analysis of flowering genes from seedling-stage to vineyard life of grapevine cv. Riesling. *Plant Science* **166**: 1427-1436.
- MANNINI, F., N. ARGAMANTE and R. CREDI, 1999 Contribution of virus infections to clonal variability of some *Vitis vinifera* L. cultivars. *Bulletin de l'OIV* **72**.
- PARCY, F., K. BOMBLIES and D. WEIGEL, 2002 Interaction of LEAFY, AGAMOUS and TERMINAL FLOWER1 in maintaining floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Development* **129**: 2519-2527.

- PFÄFFL, M. W., 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**: 2001-2007.
- PILLITTERI, L. J., C. J. LOVATT and L. L. WALLING, 2004 Isolation and characterization of a TERMINAL FLOWER homolog and its correlation with juvenility in citrus. *Plant Physiology* **135**: 1540-1551.
- RATCLIFFE, O. J., D. J. BRADLEY and E. S. COEN, 1999 Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development* **126**: 1109-1120.
- REGNER, F., E. WIEDECK and A. STADLBAUER, 2000 Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers. *Vitis* **39**: 103-107.
- RIVES, M., 2000 Vigour, pruning, cropping in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). I. A literature review. *Agronomie* **20**.
- STOLZ, J. L., 1994 *L'ampélographie des vins d'Alsace*. Coprur, Strasbourg.
- VIALA, P., and V. VERMOREL, 1901 *Ampélographie*. Masson, Paris.

## Tables and Figure Legends

### Figure 1: Developmental stages of the flowering bud

The new latent bud (l.b) initiates in May at the internode where the lateral shoot sprouts (s.sh) and the leaf axis (l.a) and the tendril (t) are fixed (**A**). In winter, the latent bud (l.b) is covered by scales and is dormant (**B**). The following Spring, the latent bud develops into a shoot carrying inflorescences as i1 to i3. At the internodes positions, new latent buds are set (circle, for example) (**C**). Bars represent 1 cm.

### Figure 2: Relative transcript levels of *VvLEAFY* and *VvTFL1* in initiating latent buds and inflorescences of the Riesling clones 49 and I1.

The *VvLEAFY* and *VvTFL1* transcript levels were analyzed by quantitative RT-PCR. Data are shown on semi logarithm scales as ratios from levels in clone I1 to clone 49 in latent bud (2A) and inflorescence (2B) for *VvLEAFY* and in latent bud (2C) and inflorescence (2D) for *VvTFL1*. The bars represent independent experiments with three internal replicates each (SD  $\leq$  13% in Fig. 2 A/C and  $\leq$  5% in Fig. 2 B/D).

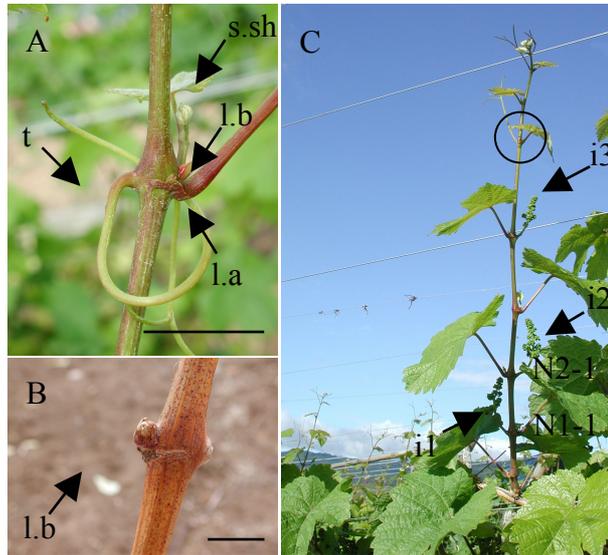
**Table 1: Comparison of the fertility - mean number of inflorescences per shoot – in the Riesling clones 49 and I1.**

**Table 2: Comparison of the harvests in the Riesling clones 49 and I1.**

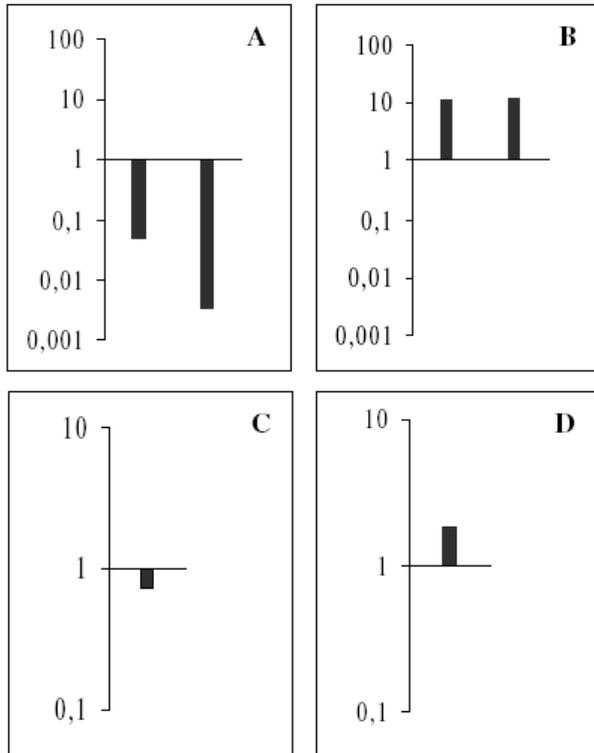
Legend of Tables 1 and 2

The fertility is the mean number of inflorescences carried by a shoot (see i1 to i3, Fig 1C) (RIVES 2000). The harvest is presented as the number of berries/bunch and the final yield in kg/plant upon harvest. The plants were 5 years-old when the first data were collected. The average values of the clones were compared each year during five following seasons. The differences between clones 49 and I1 are significant at  $P \leq 0,05$  (Student test: a, b), at  $P \leq 0,10$  (Student test: (a), (b)) or not, ns.

**Figure 1: Developmental stages of the flowering bud**



**Figure 2: Relative transcript levels of *VvLEAFY* and *VvTFL1* in initiating latent buds and inflorescences of the Riesling clones 49 and I1.**



**Table 1: Comparison of the fertility - Mean number of inflorescences per shoot – in the Riesling clones 49 and I1.**

Genotype	year	1999	2000	2001	2002	2003	Mean
Riesling clone 49		2,40 ns	2,17 a	2,07 ns	2,10 a	2,13 a	2,17 a
Riesling clone I1		2,07 ns	1,97 b	1,89 ns	1,75 b	1,89 b	1,91 b

**Table 2: Comparison of the harvests in the Riesling clones 49 and I1.**

	Genotype	Year	1999	2000	2001	2002	2003	Mean
Berries/bunch	Riesling clone 49		101 ns	100 b	113 (b)	100 b	60 ns	95 b
	Riesling clone I1		138 ns	123 a	128 (a)	126 a	63 ns	116 a
Yield in kg/plant	Riesling clone 49		4,11 ns	3,64 a	4,59 ns	4,19 ns	2,26 ns	3,76 (a)
	Riesling clone I1		3,86 ns	3,21 b	4,10 ns	3,75 ns	1,97 ns	3,38 (b)

## **Conclusions et perspectives**

# 1. Les gènes de floraison

L'initiation de la floraison est marquée par la transition des méristèmes végétatifs en méristèmes inflorescentiels puis en méristèmes floraux. Les études moléculaires réalisées chez *Antirrhinum majus* puis *Arabidopsis thaliana* ont mis en évidence le rôle majeur du gène *FLORICAULA* (chez *A. majus*) et de son orthologue *LEAFY* (chez *A. thaliana*), dans l'étape de transition des méristèmes inflorescentiels en méristèmes floraux (Coen, *et al.*, 1990; Weigel, *et al.*, 1992). D'autres gènes ont également été identifiés chez ces deux espèces : le gène *TFL1* (*A. thaliana*) ou *CEN* (*A. majus*), impliqué dans le maintien de l'identité du méristème inflorescentiel (Ratcliffe, *et al.*, 1999), ou les gènes *API*, *AG*, *SEP3* (*A. thaliana*) (Liljegren, *et al.*, 1999; Parcy, *et al.*, 2002), *SQUA*, *PLE* (*A. majus*), impliqués dans la morphogenèse florale (Coen et Meyerowitz, 1991).

## 1.1. Les gènes de floraison chez la vigne

### 1.1.1. *VvLEAFY*

Grâce aux connaissances acquises sur la floraison chez *Arabidopsis thaliana* et chez d'autres espèces aussi variées que le pois, le tabac, le pin, l'eucalyptus ou encore le peuplier, nous avons pu cloner l'orthologue de *LEAFY* chez la vigne (Weigel, *et al.*, 1992; Kelly, *et al.*, 1995; Hofer, *et al.*, 1997; Mellerowicz, *et al.*, 1998; Mouradov, *et al.*, 1998; Southerton, *et al.*, 1998; Rottmann, *et al.*, 2000).

L'analyse des séquences nucléotidique et protéique du gène *VvLEAFY* de la vigne a montré que ce gène est relativement comparable à ces ceux des espèces pour lesquels il a déjà été cloné par exemple l'Arabette, le tabac, le pois, l'eucalyptus, le pétunia, le peuplier, le platane et le pin (Accession M91208, U16172, AF010190, AF034806, AF030171, U93196, AF106842 et U92008 respectivement). Le gène de la vigne possède deux introns comme chez les autres espèces et la protéine de vigne présente 84% d'identité celles du tabac, 82% avec celles du platane, du peuplier et du pois, 72% avec celle d'*Arabidopsis*.

En même temps, que nous clonions l'orthologue du gène *AtLEAFY* pour le Riesling, une équipe australienne le clonait pour la Syrah et une équipe espagnole pour le Tempranillo (GeneBank accessions AY126446, AF378126 et AF450278, respectivement) (Carmona, *et al.*, 2002; Joly, *et al.*, 2004). Ces trois protéines de vigne ne diffèrent que par un seul acide aminé (chez la Syrah).

Contrairement au tabac, au maïs, au pommier et au pin qui possèdent deux copies, la plupart des espèces ne possèdent qu'une copie du gène orthologue de *LEAFY* (Weigel, *et al.*, 1992; Kelly, *et al.*, 1995; Mellerowicz, *et al.*, 1998; Rottmann, *et al.*, 2000; Carmona, *et al.*, 2002; Wada, *et al.*, 2002; Bomblies, *et al.*, 2003). Un Southern Blot réalisé à partir d'ADN extrait des cépages Riesling, Gewurztraminer, Muscat, et des porte-greffe 110R et 3309C, ainsi que l'identification d'une seule population d'ADNc, indiquent que le gène *VvLEAFY* n'est présent qu'en une seule copie dans le génome de la vigne (Fig. 31). Cette information a été également confirmée pour le Tempranillo (Carmona, *et al.*, 2002).

Globalement, le profil d'expression de *VvLEAFY* au cours du développement de la vigne suit les mêmes caractéristiques que la plupart des autres orthologues, mais quelques particularités semblent être propres à la vigne.

*LEAFY* et ses orthologues sont exprimés dans les tissus reproducteurs (Coen, *et al.*, 1990; Schultz et Haughn, 1991; Weigel, *et al.*, 1992; Kelly, *et al.*, 1995; Mellerowicz, *et al.*, 1998; Mouradov, *et al.*, 1998; Molinero-Rosales, *et al.*, 1999; Rottmann, *et al.*, 2000; Walton, *et al.*, 2001; Wada, *et al.*, 2002; Montieri, *et al.*, 2004; Veit, *et al.*, 2004). Mais chez le tabac, l'eucalyptus, le peuplier et le kiwi on retrouve des ARN messagers du gène dans les feuilles (Kelly, *et al.*, 1995; Southerton, *et al.*, 1998; Rottmann, *et al.*, 2000; Walton, *et al.*, 2001), et chez le pommier des ARN messagers d'une des copies de l'orthologue, sont retrouvés dans l'apex des tiges ainsi que dans les racines (Wada, *et al.*, 2002).

Chez le Riesling, aucun transcrite de *VvLEAFY* n'a été retrouvé dans les racines, et les feuilles, bien que pour le Tempranillo, des transcrits de *VFL* soient détectés dans les primordia de feuilles.

Les transcrits de *VvLEAFY* sont retrouvés de manière spécifique dans les bourgeons latents, l'année de leur formation (au moment de l'initiation des inflorescences) et l'année de la floraison (Carmona, *et al.*, 2002; Joly, *et al.*, 2004). L'expression dans les bourgeons avait déjà été décrite pour une autre plante pérenne, le kiwi. Chez cette espèce, l'expression de *ALF* (orthologue de *LEAFY*) est bimodale, elle débute l'année de formation du bourgeon, cesse pendant l'hiver puis reprend au printemps (Walton, *et al.*, 2001). L'expression continue de

*VvLEAFY* sur deux années, remet en question la dormance des bourgeons latents de la vigne pendant l'hiver, et semble être une caractéristique propre à la vigne.

### 1.1.2. *VvAPI*

Le gène *APETALA1* (*API*) d'*Arabidopsis thaliana* est également décrit comme un gène d'identité du méristème (Mandel, *et al.*, 1992 ; Simon, *et al.*, 1996; Ratcliffe, *et al.*, 1998). Comme *LEAFY*, il confère au méristème son identité de méristème floral (Mandel, *et al.*, 1992; Weigel, *et al.*, 1992). Des ARN messagers de ce gène sont retrouvés dans les primordia floraux (Mandel, *et al.*, 1992). Cette fonction est conservée chez d'autres espèces comme le citrus, l'eucalyptus et la tomate. En outre, la sur-expression du gène est capable de réduire la durée de la phase juvénile (Kyojuka, *et al.*, 1997; Pena, *et al.*, 2001; Ellul, *et al.*, 2004).

La fonction de gène d'identité de méristème floral est conservée chez la vigne, puisque des ARNm de *VvAPI* sont retrouvés très tôt au cours du développement floral de la vigne, dans les bourgeons latents (stade de développement B/C (Baggiolini, 1952), soit juste après le débourrement du bourgeon latent) (Joly, *et al.*, 2004). De plus, Calonje *et al.* ont trouvé des ARNm de *VAPI* dans les bourgeons latents dès leur mise en place (Calonje, *et al.*, 2004).

Chez la vigne aucun transcrite de *VvAPI* ou *VAPI* n'a été retrouvé dans les 2 verticilles correspondant aux sépales et aux pétales (Calonje, *et al.*, 2004; Joly, *et al.*, 2004). Chez *A. thaliana*, *API* a également un rôle dans la morphogenèse florale. Il fait partie des gènes homéotiques de la classe A (modèle ABC) et est donc impliqué dans la morphogenèse des sépales et des pétales (Irish et Sussex, 1990; Coen et Meyerowitz, 1991). Cette fonction est conservée chez *l'impatiens* et chez *lolium temulentum*, le gène est transcrite dans les verticilles des sépales et des pétales mais pas dans ceux des étamines et des carpelles (Pouteau, *et al.*, 1997 ; Gocal, *et al.*, 2001). Chez la vigne, puisqu'il n'y a pas de transcrits de *VvAPI* dans les deux premiers verticilles, la fonction A ne serait pas conservée, tout comme chez le crocus où le gène est, par contre, fortement transcrite dans les étamines et les carpelles et faiblement dans les sépales et les étamines (Tsaftaris, *et al.*, 2004).

### 1.1.3. *VvTFL1*

Des transcrits de *TFL1* et de ses orthologues sont retrouvés dans la plupart des tissus des plantes (racines, feuilles), chez *A. thaliana*, chez le pois ou chez le ray grass (Bradley, *et al.*, 1997; Jensen, *et al.*, 2001; Foucher, *et al.*, 2003).

Chez la vigne des transcrits de *VvTFL1* sont également retrouvés dans les parties végétatives de la plante (racines et feuilles), ainsi que dans les bourgeons latents l'année de leur formation, puis au cours des premiers stades de leur développement (Joly, *et al.*, 2004).

Il existe deux types d'inflorescences : les inflorescences déterminées dont le méristème apical donnera un méristème floral (marquant la fin de l'activité du méristème) et les inflorescences indéterminées dont le méristème croît indéfiniment et les méristèmes floraux sont initiés à sa périphérie. *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* est un gène d'identité du méristème, mais contrairement à *LEAFY* ou *API* qui confèrent au méristème l'identité de méristème floral, *TFL1* maintient le méristème dans un état « indéterminé » (Alvarez, *et al.*, 1992; Liljegren, *et al.*, 1999).

Chez les espèces présentant des inflorescences indéterminées (*A. thaliana*, *A. majus*...), *TFL1* ou ses orthologues, sont exprimés dans tout le méristème inflorescentiel avant l'induction florale (Bradley, *et al.*, 1996; Ratcliffe, *et al.*, 1999), alors que chez les espèces ayant des inflorescences déterminées (tabac), *CET* (l'orthologue de *TFL1* pour le tabac), n'est pas exprimé dans le méristème principal (Amaya, *et al.*, 1999).

La vigne est une espèce présentant des inflorescences indéterminées, on retrouve l'expression de *VvTFL1* dans tout le méristème apical jusqu'au stade de développement F (Baggiolini, 1952) correspondant à la transition florale (Joly, *et al.*, 2004).

Chez *A. thaliana*, *LEAFY* et *TFL1* sont des gènes antagonistes, l'expression de l'un inhibe l'expression de l'autre (Weigel et Nilsson, 1995; Ratcliffe, *et al.*, 1999). Nous avons observé, chez la vigne, une diminution des transcrits de *VvTFL1* associée à une augmentation des transcrits de *VvLEAFY*, ce qui pourrait confirmer le rôle antagoniste de ces deux gènes.

La protéine CEN (orthologue de *TFL1* chez *A. majus*) présente des homologies de séquence avec les PEBP protéines des mammifères. Elle semble agir en régulant les MAP-kinases impliquées dans la différenciation cellulaire (Amaya, *et al.*, 1999; Banfield et Brady, 2000).

Les séquences protéique et nucléotidique sont conservées chez le ray grass et le tabac (Amaya, *et al.*, 1999; Jensen, *et al.*, 2001).

Les séquences nucléotidiques de *VvTFL1* pour le Riesling et la Syrah, sont conservées par rapport à (*TFL1* et *CEN*), on peut donc supposer que le mode d'action des protéines de vigne est également conservé. *VvTFL1*, comme *CEN* ou *TFL1*, agirait en inhibant des MAP-kinases impliquées dans la différenciation cellulaire (Amaya, *et al.*, 1999; Banfield et Brady, 2000).

#### 1.1.4. *VvAG*

*AGAMOUS (AG)* est un gène homéotique (MADS-box gene) impliqué dans la morphogénèse florale, et plus particulièrement dans la formation des carpelles et des étamines. Il est exprimé très tôt au cours du développement floral d'*A. thaliana*, et son expression se limite aux deux verticilles internes qui donneront les étamines et les carpelles (Yanofsky, *et al.*, 1990; Bowman, *et al.*, 1991). Des orthologues de ce gène ont été trouvés chez *Gerbera hybrida* (Asteraceae), chez le peuplier et *Ginkgo biloba*, leurs fonctions semblent conservées (Yu, *et al.*, 1999; Brunner, *et al.*, 2000; Jager, *et al.*, 2003).

Chez la vigne, le gène *VvMADSI* (ou *VvAG*) cloné chez la Syrah présente la même structure que le gène *AGAMOUS*, c'est à dire qu'il possède les domaines MADS et K, propres aux *MADS-box genes*. L'expression du gène est limitée aux fleurs (Boss, *et al.*, 2001).

L'analyse de l'expression de ce gène (*VvAG* ou *VvMADSI*) chez le Riesling montre la présence de transcrits dans les étamines et les carpelles au moment de la transition florale (Joly, *et al.*, 2004), ce qui laisse supposer que la fonction du gène est également conservée chez la vigne.

#### 1.1.5. *VvSEP3*

En 1991, Coen et Meyerowitz proposaient un modèle comprenant trois classes de gènes (A, B et C) pour expliquer la morphogénèse florale (Coen et Meyerowitz, 1991). Ce modèle a été complété en 2000 par Pelaz, montrant la nécessité d'une quatrième classe de gènes (D) pour la formation des différents organes de la fleur (Pelaz *et al.*, 2000; Jack, 2001). Cette classe D comprend le MADS-box gène *SEPALATA 3 (SEP3)*, exprimé dans les verticilles 2, 3 et 4 de la fleur (correspondant aux pétales, étamines et carpelles) (Fig. 29).

L'orthologue de *SEP3* pour la vigne a été cloné en 2002 pour la Syrah (*VvMADS4* ou *VvSEP3*). Ce gène s'exprime faiblement au cours des premiers stades de développement des inflorescences, puis fortement dans les fleurs (Boss, *et al.*, 2002). L'analyse de son expression chez le Riesling montre la présence de transcrits dans les verticilles 2, 3 et 4 de la fleur, ce qui laisse supposer que la fonction de ce gène est également conservée chez la vigne (Joly, *et al.*, 2004).

## 1.2. Rôle des gènes de floraison dans l'acquisition de la compétence à fleurir

Chez *A. thaliana*, l'expression constitutive du gène *LEAFY*, entraîne une floraison précoce (Weigel, *et al.*, 1992; Pidkowich, *et al.*, 1999).

Des expériences similaires ont été réalisées chez le tremble et ont permis d'accélérer la première floraison (Weigel et Nilsson, 1995). De même chez le citrus, l'expression constitutive de *LEAFY* a permis d'obtenir une première floraison au bout d'une année, alors que normalement la plante requiert entre 6 et 20 ans de vie végétative stricte avant la première floraison (Pena, *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que *LEAFY* soit impliqué dans la transition de la phase juvénile à la phase adulte. Pourtant, chez le peuplier, la sur-expression de *LEAFY* n'a pas permis de floraison plus rapide (Rottmann, *et al.*, 2000).

Chez la vigne, au cours de la phase juvénile et pendant les 3 ou 4 premières années de développement, la plante n'a pas encore acquis la compétence à fleurir.

L'expression constitutive de *VvLEAFY* chez la vigne, pourrait-elle permettre d'obtenir des fleurs avant les 3 ou 4 années requises chez la plante « normale » ?

Des transcrits de *VvLEAFY* sont déjà retrouvés au niveau de l'apex et des bourgeons latents de jeunes plantes. De plus, sous certaines conditions de culture (en chambre climatique et en taillant l'apex de la plante quand elle atteint 25 entre-nœuds), il est possible d'obtenir des inflorescences chez des plantes d'environ trois mois (non montré).

*VvLEAFY* ne serait donc pas le seul gène clé dans l'acquisition de la compétence à fleurir. La quantité de transcrits de *VvLEAFY* retrouvée dans les plantules est toutefois plus faible que celle retrouvée dans les plantes capables de fleurir. Il existe peut être un seuil de transcription du gène qui permet à la plante d'acquérir la compétence à fleurir.

Qu'en est-il des autres gènes de floraison ? L'expression constitutive de *API* est également capable d'accélérer la floraison chez *A. thaliana*, et de faire fleurir le citrus lors de sa première année (Mandel, *et al.*, 1992; Pena, *et al.*, 2001). L'expression constitutive de *TFL1*, retarde la floraison chez *A. thaliana*, alors que chez le mutant *tfl1*, la floraison est accélérée (Alvarez, *et al.*, 1992; Pidkowich, *et al.*, 1999).

Chez le citrus, CsTFL1 joue un rôle important dans le maintien de la phase végétative (Pillitteri, *et al.*, 2004). Chez *A. thaliana*, comme chez le citrus, c'est le ratio LFY/TFL1 qui semble déterminer le devenir du méristème, donc maintenir ou non la phase juvénile (Ratcliffe, *et al.*, 1999; Pillitteri, *et al.*, 2004).

### 1.3. Cas particulier des vrilles

#### 1.3.1. Expression des gènes de floraison dans les vrilles

Des transcrits de *VvLEAFY* (ou *VFL*) sont retrouvés dans les vrilles et dans les primordia de vrille (Carmona, *et al.*, 2002; Joly, *et al.*, 2004). D'autres gènes impliqués dans le processus de floraison comme *VAPI* et *VFUL*, sont exprimés au niveau des primordia indéterminés (à l'origine des inflorescences et des vrilles) et tout au long du développement des vrilles (Calonje, *et al.*, 2004). Depuis longtemps les vrilles de la vigne et les inflorescences sont décrites comme étant des organes de même origine (Srinivasan et Mullins, 1979; Huglin et Schneider, 1998), alors que chez d'autres espèces, le pois par exemple, les vrilles dérivent des feuilles (Luttge, *et al.*, 1992; Raven, *et al.*, 2000). L'expression de ces trois gènes de floraison (*VvLEAFY*, *VvAG*, *VvSEP3*, *VAPI* et *VFUL-L*) apporte la première preuve moléculaire de la nature identique de ces deux types d'organes.

La forte expression de *VFUL-L* et de *VAPI* dans les vrilles, en l'absence de transition florale, laisse suggérer que ces gènes puissent avoir un rôle important dans le développement des vrilles (Calonje, *et al.*, 2004).

Pour comprendre le déterminisme de l'évolution des primordia indéterminés en vrilles ou en inflorescences, l'expression des gènes de floraison *VvLEAFY*, *VvAPI*, *VvAG*, *VvSEP3* et *VvTFL1* a été analysée par RT PCR et hybridation *in situ* sur des vrilles.

L'analyse par RT PCR a montré que des transcrits de *VvLEAFY*, *VvAPI*, *VvAG*, *VvSEP3* étaient retrouvés dans les vrilles, bien que les signaux obtenus soient beaucoup plus faibles

que dans les inflorescences. Seuls les transcrits de *VvTFL1* n'ont pas été détectés dans les vrilles (Fig. 34).

L'étude de l'expression de ces gènes de floraison par hybridation *in situ* a confirmé les résultats obtenus par RT PCR. De plus, les coupes histologiques ont montré que l'extrémité des vrilles portait une fleur unique (Fig. 35 et 36). Cette fleur unique corrobore à la fois la présence et le niveau des transcrits des gènes de floraison.

Chez *A. thaliana*, *AtLEAFY* est impliqué dans la transition des méristèmes inflorescentiels en méristèmes floraux (Weigel, *et al.*, 1992), mais chez les espèces ne passant pas par l'étape méristème inflorescentiel, il convertit directement le méristème végétatif en méristème floral. Il semblerait que dans les vrilles de la vigne, *VvLEAFY* convertisse directement le méristème qui assure le développement de la vrille en méristème floral. Dans ce cas, la vrille devient un organe qui porte une fleur unique. C'est le passage par le méristème inflorescentiel qui conditionnerait le devenir d'un primordium indéterminé en inflorescence ou en vrille (fleur unique).

### 1.3.2. Implication des gibbérellines dans le développement des vrilles

Chez *Arabidopsis thaliana*, les gibbérellines peuvent induire la floraison en activant le gène *LEAFY* (Blazquez, *et al.*, 1998). Ce rôle ne semble pas conservé chez la vigne. En effet, l'application de gibbérellines sur des primordia indéterminés, provoque leur conversion en vrilles (Srinivasan et Mullins, 1981). Ce rôle est confirmé par la découverte d'un mutant *vvgai1* dont toutes les vrilles sont converties en inflorescences. Chez ce mutant qui n'exprime pas le gène *VvGAI1*, codant pour une protéine impliquée dans le métabolisme des gibbérellines, toutes les vrilles sont remplacées par des inflorescences (Boss et Thomas, 2002) (Fig. 37).

L'analyse de l'expression de *VvGAI1* par hybridation *in situ* dans des vrilles, montre que ce gène est fortement exprimé au niveau de la fleur portée par la vrille. Le signal est beaucoup plus fort que celui obtenu dans les fleurs portées par des inflorescences (Fig. 36). Les gibbérellines pourraient donc inhiber la formation d'inflorescences sur les vrilles.

## 1.4. Circulation des transcrits de *VvLEAFY* ?

La transition florale se produit sous l'effet de facteurs endogènes et extérieurs comme (la lumière, la température...) voir §1.1. Tous ces facteurs sont perçus par différentes parties de la plante, ce qui implique que ces différentes parties interagissent entre elles pour déterminer le devenir du méristème apical (maintien de l'état végétatif ou transition florale). Des expériences de greffage ont permis de montrer qu'un signal capable d'induire la floraison circulait via le phloème, des feuilles jusqu'au méristème apical. La recherche de ce signal capable d'induire la floraison (florigène) est restée vaine, et la notion de florigène proposée par Lang en 1984, est devenue très controversée ; pour revue (Bernier, *et al.*, 1993; Aukerman et Amasino, 1998; Colasanti et Sundaresan, 2000 ; Yu et Ma, 2001 ; Bernier et Perilleux, 2005).

La caractérisation des gènes de floraison chez les plantes modèles a relancé le débat (Weller, *et al.*, 1997; Colasanti et Sundaresan, 2000 ). En 1998, Colasanti *et al.* ont identifié chez le maïs un gène, *INDETERMINATE1 (ID1)*, qui pourrait réguler la synthèse ou le transport d'un signal transmissible des feuilles jusqu'au méristème et capable d'induire la floraison (Colasanti, *et al.*, 1998).

La circulation dans le phloème, de messagers de gènes impliqués dans le développement de la tomate a déjà été mise en évidence (Kim, *et al.*, 2001) et récemment, deux laboratoires ont montré que des transcrits du gène *CONSTANS*, d'*A. thaliana*, étaient présents dans le phloème, des feuilles jusqu'au méristème (An, *et al.*, 2004; Ayre et Turgeon, 2004). Ils proposent que ce gène intervienne dans la régulation ou le transport d'un signal induisant la floraison (An, *et al.*, 2004; Ayre et Turgeon, 2004).

*VvLEAFY* pourrait-il avoir un rôle identique à celui de *CONSTANS* ? Des expériences à l'aide d'un gène de fusion *VvLEAFY: GUS* pourraient nous aider à suivre la circulation des transcrits de *VvLEAFY* dans le phloème et la moelle des sarments. On peut également se demander si des transcrits d'autres gènes de floraison peuvent être retrouvés dans les bois de vigne.

Nous avons recherché la présence de transcrits de *VvLEAFY* par hybridation *in situ* sur des bois de vigne à deux stades de développement : sarments stockés à 4°C (correspondant au sarment en hiver) et sarment au moment de la floraison. Des transcrits de *VvLEAFY* ont été retrouvés dans la moelle des bois « d'hiver » et dans le phloème au moment de la floraison (Fig. 38).

Pour confirmer la présence d'ARNmessagers de *VvLEAFY* dans le phloème, nous avons essayé d'extraire les ARN totaux de la sève contenue dans les sarments au moment de la floraison. Mais les RT PCR préliminaires, réalisées sur ces extractions ne nous ont pas permis d'amplifier des transcrits de *VvLEAFY* (non montré).

Ces résultats suggèrent que des transcrits de *VvLEAFY* pourraient circuler dans la moelle des sarments pendant l'hiver, et dans le phloème au printemps.

La fertilité des bourgeons de vigne peut varier en fonction de la position des bourgeons sur le sarment (§ fertilité des bourgeons latents). Notre analyse a été réalisée à partir du Riesling, cépage dont la fertilité des bourgeons est assez constante d'un bout à l'autre du sarment. Des transcrits de *VvLEAFY* ont d'ailleurs été retrouvés dans tous les bourgeons, quel que soit leur position sur le sarment (Joly, *et al.*, 2004). On peut se demander si chez un cépage comme la Sultanine, qui ne possède qu'un ou deux bourgeons fertiles, des transcrits seraient retrouvés dans tous les bourgeons. La présence de transcrits de *VvLEAFY* dans les bois, serait-elle identique à celle du Riesling, ou varierait-elle en fonction de la position sur le sarment ?

## 1.5. Circulation de la protéine LEAFY

Chez la plupart des végétaux, la méristème comprend 3 types de couches cellulaires. Ces trois couches se différencient par leur mode de division (Fig. 39). La couche cellulaire L1, à l'origine des tissus épidermiques, la couche cellulaire L2, à l'origine des tissus reproducteurs et la couche L3, à l'origine des tissus conducteurs (Raven, *et al.*, 2000) (Fig. 39).

Chez *A. thaliana*, des mutants *lfy* ont été transformés avec une construction *ML1::LFY*, ML1 étant un promoteur spécifique de la couche cellulaire L1. La majorité des plantes transformées présentaient un phénotype floral normal. Les transcrits de *LEAFY* n'ont été retrouvés que dans la couche L1, alors que la protéine LEAFY a été retrouvée dans les trois couches cellulaires. La protéine est donc capable de migrer d'une couche cellulaire à une autre et ainsi restaurer la fonction du gène dans les couches où il n'est pas exprimé (Sessions, *et al.*, 2000; Hake, 2001). Chez *A. majus*, des mutations du gène *FLORICAULA (FLO)* dans les couches cellulaires L2

ou L3 entraînent un développement anormal des fleurs, alors que ce même gène muté dans la couche L1 n'entraîne pas de modifications du développement floral (Hantke, *et al.*, 1995). L'expression du gène *FLO* ne semble pas nécessaire dans la couche cellulaire L1. Dans les mutants L2 ou L3, les gènes homéotiques impliqués dans le développement floral et activés par *FLO*, sont exprimés mais pas suffisamment pour un développement normal des fleurs. L'ensemble de ces résultats montre que les différentes couches cellulaires interagissent au moment de la transition florale (Hantke, *et al.*, 1995; Vincent, *et al.*, 2003), pour revue (Szymkowiak, 1996).

Chez la vigne le méristème ne comprend que deux types de couches cellulaires ; les couches L2 et L3 sont confondues (Huglin et Schneider, 1998). Des analyses moléculaires du génome de la vigne, à l'aide de microsatellites, ont révélé que les cépages Pinot et Chardonnay étaient des chimères (Boss et Thomas, 2002; Franks, *et al.*, 2002; Bertsch, *et al.*, 2003; Hocquigny, *et al.*, 2004). L'induction de cals embryogènes à partir des cellules du filet des anthères permet d'obtenir des cals issus de cellules provenant soit de la couche cellulaire L1, soit de la couche cellulaire L2. Les plantes régénérées à partir d'embryons somatiques de Pinot Meunier, donnent deux types de plantes : l'une ressemble au Pinot Noir, et est issue de la couche cellulaire L2 ; l'autre, issue de la couche L1, présente des entre-nœuds raccourcis. Le Pinot Meunier dériverait donc du Pinot Noir, suite à la mutation d'un gène des cellules de la couche cellulaire L1 (Franks, *et al.*, 2002) (Fig. 37 et 40).

On peut s'interroger sur l'importance du chimérisme chez la vigne dans un processus physiologique aussi complexe que la floraison, notamment si l'on prend en compte la diffusion de facteurs de transcription comme *AtLEAFY*. Les séquences de *VvLEAFY* sont-elles les mêmes dans les deux couches cellulaires ? Une mutation du gène *VvLEAFY* (ou d'un autre gène de floraison) dans l'une des deux couches pourrait-elle perturber la mise en place des organes floraux ? La couche « normale » peut-elle restaurer les gènes mutés dans une des couches cellulaires ? Si les 2 couches cellulaires L1 et L2 possèdent des allèles différents pour *VvLEAFY*, comment interagissent ces deux allèles et quels sont les conséquences sur la régulation de la floraison ? Ce chimérisme pourrait-il avoir des conséquences sur le déterminisme de la fertilité ?

## **2. Variabilité inter-clonale de la fertilité**

### **2.1. Association entre la fertilité, le nombre de baies par grappe et le niveau de transcrits de *VvLEAFY* et *VvTFL1***

Nous avons mesuré par RT PCR quantitative, le niveau de transcrits de *VvLEAFY* et *VvTFL1* pour deux clones de Riesling (49 et 1) présentant une différence de fertilité et de nombre de baies par grappe. Le niveau de transcrits de *VvLEAFY*, dans les bourgeons latents, était plus élevé dans le clone 49 (présentant la fertilité la plus élevée). Dans les inflorescences, le niveau de transcrits de *VvLEAFY* était plus élevé dans le clone 1 (présentant un nombre de baies par grappe plus élevé). Ces résultats suggèrent que le niveau de transcrits de *VvLEAFY* dans les bourgeons latents (un an avant la floraison) soit associé au nombre d'inflorescences que portera le rameau issu du bourgeon et que le niveau de transcrits mesuré dans les inflorescences est associé au nombre de fleurs donc au nombre de baies que portera la grappe. Bien que les différences soient moins marquées pour le niveau de transcrits de *VvTFL1*, il varie en fonction des clones de Riesling et pour un même clone, il varie en fonction du stade de développement.

Les différences phénotypiques observées entre des clones de Riesling (génétiquement très proches) seraient donc associées à des variations du niveau de transcrits de certains gènes impliqués dans le développement.

### **2.2. Confirmation de l'association entre le niveau de transcrits de *VvLEAFY*, le potentiel de fertilité des bourgeons latents et le nombre de baies par grappe.**

L'étude du niveau de transcrits de *VvLEAFY* a été réalisée à partir de deux clones présentant des caractéristiques très différentes pour la fertilité et le nombre de baies par grappe.

Une étude similaire mais étendue à un plus grand nombre de clones, présentant toute la gamme de fertilité observée chez le Riesling, devrait permettre de vérifier et confirmer les résultats obtenus pour les clones de Riesling 1 et 49. Cette étude permettrait également de voir si le niveau de transcrits de *VvLEAFY* permet la caractérisation de différences de fertilité moins marquées que celle observées pour les clones 1 et 49 (respectivement 1,8 et 2,2 inflorescences par rameau, qui sont les fertilités extrêmes observées chez les clones de Riesling étudiés). Ce type d'analyses pourra également être étendu à d'autres cépages.

### **2.3. Caractérisation de clones par leur niveau de transcrits de *VvLEAFY***

Au cours des dix dernières années, différentes techniques de biologie moléculaire (microsatellites, RAPD, AFLP) ont été développées afin de caractériser les différents clones des cépage-populations. Ces techniques basées sur l'utilisation de marqueurs moléculaires anonymes permettent de caractériser les génotypes, de classer les clones et éventuellement d'établir les liens de parenté entre les différents clones ou cépages (Regner, *et al.*, 2000; Fanizza, *et al.*, 2003). Par contre, ces marqueurs moléculaires ne permettent pas de caractériser les phénotypes des plantes et notamment ceux en relation avec des propriétés agronomiques.

L'analyse du niveau de transcrits de *VvLEAFY* nous a permis de différencier les deux clones de Riesling étudiés. De plus, cette différence du niveau de transcrits de *VvLEAFY* semble associée à une différence de phénotype pour la fertilité et le nombre de baies par grappe.

Cette analyse du niveau de transcrits de gènes permet non seulement de compléter les analyses moléculaires de types microsatellites, mais surtout d'apporter des informations sur le phénotype des clones pour des caractères agronomiques importants comme la fertilité ou le nombre de baies par grappe.

## 2.4. Caractérisation d'autres facteurs agronomiques à partir du niveau de transcrits de gènes candidats.

S'il est possible de caractériser le potentiel de fertilité des bourgeons latents à partir du niveau de transcrits du gène *VvLEAFY*, il devrait être possible d'étendre ce type d'analyses à d'autres caractères agronomiques importants pour la viticulture. Par exemple, la qualité peut être évaluée à partir du taux de sucre, des composés aromatiques (terpènes) présents dans les baies. Suivant les clones et les cépages, la quantité ou la nature des composés aromatiques va être différente. Par exemple le Gewurztraminer et le Traminer Rose sont deux cépages pratiquement identiques du point de vue ampélographique, mais qui présentent des aromogrammes différents. Les différences aromatiques de ces cépages sont vraisemblablement dues à leurs teneurs respectives en citronellol, nérol et géraniol (Huglin et Schneider, 1998). Il est probable que le niveau de transcrits des gènes impliqués dans la biosynthèse des ces composés aromatiques, sera variable d'un cépage à un autre, d'un clone à un autre. Il serait donc intéressant de quantifier les enzymes impliquées dans la biosynthèse des terpènes et de voir si les profils d'expression de ces gènes permettent de refléter la composition aromatique des cépages et des clones. Ceci constituerait un outil remarquable pour caractériser le potentiel aromatique des clones et des cépages.

## 2.5. Applications

### 2.5.1. Prévision de récolte

La productivité de la vigne est un paramètre agronomique important puisqu'elle conditionne la récolte d'un point de vue qualitatif et quantitatif. Même si aucune étude scientifique n'a été publiée, il est connu depuis fort longtemps que les vignes peu productives, produisent un raisin de meilleure qualité. A l'heure de la surproduction mondiale de vin, la maîtrise des rendements devient cruciale, d'autant qu'elle favoriserait la qualité de la vendange. Connaître le potentiel de production que renferme un bourgeon latent un an avant la récolte permettrait d'adapter la taille annuelle de plante en fonction de la récolte désirée (du point de vue quantitatif et par conséquent du point de vue qualitatif). La mesure du niveau de transcrits *VvLEAFY* ou la quantité de protéine dans les bourgeons latents pourrait servir d'indicateur du

potentiel de fertilité des bourgeons et ainsi donner une tendance pour la récolte à venir ; le viticulteur pourrait ainsi adapter ses pratiques culturales (surtout la taille) en fonction du potentiel de fertilité de ses bourgeons latents.

### **2.5.2. Aide à la sélection clonale**

Dans le but de faire agréer de nouveaux clones, des sélections clonales peuvent être effectuées à partir des collections de clones existantes. Après une première étape de sélection sanitaire de trois ans pendant laquelle des tests sanitaires sont réalisés sur la population de clones étudiés, les clones subissent une évaluation agronomique. Pendant un minimum de cinq années, les caractères agronomiques sur lesquels porte la sélection, sont évalués à partir de parcelles expérimentales comprenant dix souches de chaque clone étudié (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000). Cette méthode de sélection nécessite donc un protocole expérimental assez lourd.

Nous avons vu qu'il est possible d'avoir une quantification de la fertilité et du nombre de baies par grappe de clones de Riesling, en mesurant le niveau de transcrits du gène *VvLEAFY*. Si les différences phénotypiques pour des facteurs d'intérêts agronomiques peuvent être caractérisées par des différences de niveau d'expression de gènes, cette technique d'évaluation pourrait être étendue à tous les caractères agronomiques mesurés lors des sélections clonales.

Elle permettrait non seulement de confirmer les évaluations agronomiques mais également de réduire la durée de l'expérimentation. De plus, en diminuant la période d'expérimentation, et la taille des parcelles d'expérimentation, on peut imaginer qu'un plus grand nombre de clones pourrait être testés. Le processus de sélection clonale serait moins lourd et beaucoup plus rapide.

### 3. Origine de la variabilité du niveau d'expression de *VvLEAFY*.

Le niveau de transcrits de *VvLEAFY* est significativement différent pour les deux clones de Riesling étudiés : un ratio de 20 a été obtenu pour les bourgeons latents et un ratio de 11 dans les inflorescences. On peut donc s'interroger sur l'origine d'une telle variabilité du niveau de transcrits du gène. Différentes hypothèses seront discutées en lien avec ce qui est connu chez d'autres espèces, comme la divergence des séquences du gène *LEAFY*, le niveau de méthylation des gènes.

#### 3.1. Variabilité des séquences codantes et régulatrices de *VvLEAFY* pour les deux clones de Riesling 1 et 49.

Chez *A. thaliana*, l'analyse du phénotype de mutants *lfy*, présentant des développements floraux plus ou moins complets a permis de classer les allèles de *LEAFY* en trois catégories : forts, intermédiaires et faibles (Weigel, *et al.*, 1992).

Différents allèles de *LEAFY* et *TFL1* ont pu être clonés à partir d'une collection d'écotypes d'*A. thaliana*. Pour *LEAFY*, il existe du polymorphisme assez faible entre les allèles, aussi bien dans les séquences codantes que dans les séquences régulatrices. Par contre pour *TFL1*, le polymorphisme des allèles est beaucoup plus important au niveau des séquences régulatrices qu'au niveau des séquences codantes, ce qui laisse penser que son évolution est récente (Olsen, *et al.*, 2002).

*LEAFY* est un facteur de transcription dont le domaine de fixation à l'ADN est très conservé entre les espèces. Pourtant l'analyse de la séquence nucléotidique codant pour ce domaine permet d'établir les relations phylogénétiques entre différentes espèces (*A. thaliana*, pois, pin pétunia) (Maizel, *et al.*, 2005).

L'analyse de l'organisation des différents motifs d'un promoteur représente une empreinte des mécanismes de régulation transcriptionnelle d'un gène (Werner, *et al.*, 2003) et de son évolution. Par exemple, chez *A. thaliana*, le promoteur du gène *LEAFY*, possède des sites de régulation de l'expression du gène par les gibbérellines (Blazquez, *et al.*, 1998).

Il semble improbable de trouver un site d'activation par les gibbérellines dans le promoteur de *VvLEAFY*, puisque les gibbérellines inhibent la floraison chez la vigne (Srinivasan et Mullins, 1981). Le clonage du promoteur de *VvLEAFY* pour les deux clones de Riesling 1 et 49, permettrait d'apporter des informations quant à la régulation de ce gène chez la vigne, mais également de vérifier si ce promoteur est identique ou différent pour les deux clones de Riesling étudiés ; ce qui pourrait expliquer la différence du niveau d'expression du gène entre les deux clones.

Le clonage des séquences codantes de *VvLEAFY* pour les deux clones devrait permettre de vérifier s'il existe différents allèles de *VvLEAFY*, et si ces allèles peuvent expliquer la différence de fertilité observée pour les clones de Riesling 1 et 49. Des modifications de la séquence codante du gène pourraient entraîner des différences d'activité de la protéine *VvLEAFY* entre les deux clones.

### **3.2. Variabilité du niveau de méthylation du gène *VvLEAFY***

Au cours du développement des végétaux, l'expression de nombreux gènes est régulée par des phénomènes épigénétiques tels que le « transcriptional gene silencing » (TGS) associé à des méthylations de l'ADN et/ou à des modifications de la chromatine, et le « post transcriptional gene silencing » (PTGS) par dégradation des ARNs ou inhibition de la traduction des ARNm en protéines; pour revue (Finnegan, *et al.*, 1998; Steimer, *et al.*, 2004).

En effet, le niveau de méthylation du génome de la tomate et d'*A. thaliana* est beaucoup plus élevé dans les graines que dans les feuilles adultes. Ceci montre que le niveau de méthylation du génome varie au cours du développement. Il a aussi été montré que la vernalisation intervient dans l'initiation florale via la déméthylation des promoteurs de gènes impliqués dans la transition florale (Finnegan, *et al.*, 1998).

Le gène *FLC*, également impliqué dans la voie autonome d'induction florale semble être régulé par « RNA processing ». En effet, des protéines comme *FCA* ou *FY*, sont capables de fixer les ARNm de *FLC*, et ainsi inactivent son expression (Simpson, 2004).

Une analyse du niveau de méthylation des séquences du gène *VvLEAFY* pour les deux clones de Riesling étudiés, pourrait facilement être réalisée à l'aide d'enzymes de restriction isoschyzomères sensibles et non sensibles à la méthylation. Si le niveau de méthylation de *VvLEAFY* est différent entre les deux clones de Riesling, il pourrait expliquer la différence de niveau de transcrits de *VvLEAFY* entre ces clones (TGS).

### **3.3. Variabilité du niveau protéique de VvLEAFY**

Nous avons vu précédemment que l'expression des gènes de développement pouvait être soumise à des régulations épigénétiques de types TGS et PTGS. Dans le cas de PTGS, le niveau de transcrits d'un gène ne reflète pas le niveau d'expression du gène, puisque la régulation ce fait au niveau post-transcriptionnel (Finnegan, *et al.*, 1998; Steimer, *et al.*, 2004).

Il serait donc intéressant de quantifier la protéine VvLEAFY pour les deux clones de Riesling étudiés afin de vérifier si la variabilité observée au niveau des transcrits dans les bourgeons latents et les inflorescences, est conservée au niveau protéique. Si le niveau protéique de VvLEAFY suit la même variabilité que les transcrits, l'association entre le niveau d'expression du gène et la fertilité serait confirmée et renforcée.

## 4. *VvLEAFY* est-il le meilleur candidat pour étudier la fertilité ?

Lorsque nous avons débuté ce travail le gène *LEAFY* d'*A. thaliana*, apparaissait comme un bon candidat pour caractériser la transition florale. Chez *A. thaliana* ce gène était le plus documenté et il occupait une place centrale dans l'induction de la floraison de cette espèce. En effet toutes les voies d'induction florale (photopériode, température, hormone, nutriment) convergent vers l'activation de ce gène, qui à son tour intervient dans l'activation des gènes impliqués dans la morphogenèse florale. Le rôle central de ce gène laissait donc supposer qu'il pouvait intervenir dans la caractérisation de la fertilité de la vigne (nombre d'inflorescences par rameau).

De nombreux autres gènes impliqués dans le développement floral ont été identifiés et caractérisés chez *A. thaliana* au cours des dernières années ; pour revue, (Bernier et Perilleux, 2005). Parmi ces gènes, deux semblent avoir un rôle primordial dans la transition florale. Les gènes *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) et *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*), qui comme *LEAFY*, intègrent les différentes voies d'induction florale (lumière, température,...). Ils occupent une position centrale dans la transition florale d'*A. thaliana*. A ce titre, ces deux gènes pourraient être de bons candidats pour l'étude du déterminisme de la fertilité chez la vigne.

Toutefois, une étude réalisée chez le maïs a montré que le nombre de copies des gènes *ZFL1* et *ZFL2*, les orthologues de *LEAFY*, contrôlait le nombre de ramification des inflorescences, donc leur taille (Bomblies, *et al.*, 2003). *LEAFY* et ses orthologues sont, aujourd'hui, les seuls gènes pour lesquels un rôle quantitatif dans la transition florale a pu être établi.

## **Références bibliographiques**

- ALVAREZ J., GULI C. L., YU X.-H. and SMYTH D. R.**, *terminal flower*: a gene affecting development in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 2 (1), 103-116, **1992**
- AMAYA I., RATCLIFFE O. J. and BRADLEY D. J.**, Expression of CENTRORADIALIS (CEN) and CEN-like genes in tobacco reveals a conserved mechanism controlling phase change in diverse species, *Plant Cell*, 11 1405-1417, **1999**
- AN H., ROUSSOT C., SUAREZ-LOPEZ P., CORBESIER L., VINCENT C., PINEIRO M., HEPWORTH S., MOURADOV A., JUSTIN S., TURNBULL C. and COUPLAND G.**, CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*, *Development (Cambridge)*, 131 (15), **2004**
- AUKERMAN M. J. and AMASINO R. M.**, Floral induction and florigen, *Cell*, 93 (4), 491-494, **1998**
- AYRE B. G. and TURGEON R.**, Graft transmission of a floral stimulant derived from CONSTANS, *Plant Physiology*, 135 (4), **2004**
- BAGGIOLINI M.**, Les stades repères dans le développement de la vigne et leur utilisation pratique, Lausanne, **1952**
- BANFIELD M. J. and BRADY R. L.**, The structure of Antirrhinum Centroradialis protein (CEN) suggest a role as a kinase regulator, *Journal of molecular biology*, 297 1159-1170, **2000**
- BERNIER G., HAVELANGE A., HOUSSA C., PETITJEAN A. and LEJEUNE P.**, Physiological Signals That Induce Flowering, *the Plant Cell*, 5 1147-1155, **1993**
- BERNIER G. and PERILLEUX C.**, A physiological overview of the genetics of flowering time control, *Plant Biotechnology Journal*, 3 (1), 3-16, **2005**
- BERTSCH C., KIEFFER F., TRIOULEYRE C., BUTTERLIN G., MERDINOGLU D. and WALTER B.**, Molecular profiling of *Vitis vinifera* Chardonnay obtained by somatic embryogenesis, *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin*, 37 (4), 223-227, **2003**
- BISCHOFF G., BOEHLER J.-M., DIETRICH J.-V., DOPFF G., DREYER J., DUMAY R., GOFFARD R., HUGLIN P., LUCKEL F. and SITTLER L.**, *Le vin d'Alsace*, Paris, **1978**
- BLAZQUEZ M. A., GREEN R., NILSSON O., SUSSMAN M. R. and WEIGEL D.**, Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter, *Plant Cell*, 10 (5), 791-800, **1998**
- BOMBLIES K., WANG R. L., AMBROSE B. A., SCHMIDT R. J., MEELEY R. B. and DOEBLEY J.**, Duplicate FLORICAULA/LEAFY homologs *zfl1* and *zfl2* control inflorescence architecture and flower patterning in maize, *Development*, 130 (11), 2385-2395, **2003**
- BOSS P. K., SENSI E., HUA C., DAVIES C. and THOMAS M. R.**, Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development, *Plant Science*, 162 (6), 887-895, **2002**

- BOSS P. K. and THOMAS M. R.**, Tendrils, inflorescences and fruitfulness: a molecular perspective, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6 (2), **2000**
- BOSS P. K. and THOMAS M. R.**, Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation, *Nature*, 416 (6883), 847-850, **2002**
- BOSS P. K., VIVIER M., MATSUMOTO S., DRY I. B. and THOMAS M. R.**, A cDNA from grapevine (*Vitis vinifera* L.), which shows homology to AGAMOUS and SHATTERPROOF, is not only expressed in flowers but also throughout berry development, *Plant Molecular Biology*, 45 (5), 541-553, **2001**
- BOUQUET A., PIGANEAU B. and LAMAISON A. M.**, Genotypic effect on in vitro production of callus, embryoids and plantlets from cultured anthers in vitis, C. R. A. Sc., Paris, **1982**
- BOWMAN J. L., DREWS G. N. and MEYEROWITZ E. M.**, Expression of the Floral Homeotic Gene *AGAMOUS* Is restricted to specific Cell Types Lates in Flower Development, *Plant Cell*, 3 749-758, **1991**
- BRADLEY D. J., CARPENTER R., COPSEY L., VINCENT C., ROTHSTEIN S. and COEN E.**, Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*, *Nature*, 379 791-797, **1996**
- BRADLEY D. J., RATCLIFFE O. J., VINCENT C., CARPENTER R. and COEN E.**, Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*, *Science*, 275 80-83, **1997**
- BUGNON F. and BESSIS R.**, Biologie de la vigne. Acquisitions récentes et problèmes actuels, Masson & Cie, **1968**
- CALONJE M., CUBAS P., MARTINEZ-ZAPATER J. M. and CARMONA M. J.**, Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine, *Plant Physiology*, 135 (3), 1491-1501, **2004**
- CARMONA M. J., CUBAS P. and MARTINEZ-ZAPATER J. M.**, VFL, the grapevine FLORICAULA/LEAFY ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate, *Plant Physiology*, 130 (1), 68-77, **2002**
- CAROLUS M.**, Recherche sur l'organogenèse et l'évolution morphologique du bourgeon latent de la vigne (*Vitis vinifera* L. var Merlot), Bordeaux, **1970**
- CHAMPAGNOL F.**, Eléments de physiologie de la vigne et de viticulture générale, Champagnol, **1984**
- CHUCK G. and HAKE S.**, Regulation of developmental transitions, *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (1), 67-70, **2005**
- COEN E. S. and MEYEROWITZ E. M.**, The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development, *Nature (London)*, 353 (6339), 31-37, **1991**
- COEN E. S., ROMERO J. M., DOYLE S., ELLIOTT R., MURPHY G. and CARPENTER R.**, floricaula: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*, *Cell (Cambridge)*, 63 (6), **1990**

**COLASANTI J. and SUNDARESAN V.**, 'Florigen' enters the molecular age: long-distance signals that cause plants to flower, *Trends in Biochemical Sciences*, 25 (5), 236-240, **2000**

**COLASANTI J., YUAN Z. and SUNDARESAN V.**, The *indeterminate* Gene encodes a Zinc Finger Protein and Regulates a Leaf-Generated Signal Required for the Transition to Flowering in Maize, *Cell*, 93 593-603, **1998**

**ELLUL P., ANGOSTO T., GARCIA-SOGO B., GARCIA-HURTADO N., MARTIN-TRILLO M., SALINAS M., MORENO V., LOZANO R. and MARTINEZ-ZAPATER M.**, Expression of Arabidopsis APETALA1 in tomato reduces its vegetative cycle without affecting plant production, *Molecular Breeding*, 13 (2), 155-163, **2004**

**ENJALBERT H.**, Histoire de la vigne et du vin, l'avènement de la qualité, Bordas, **1975**

**FANIZZA G., CHAABANE R., LAMAJ F., RICCIARDI L. and RESTA P.**, AFLP analysis of genetic relationships among aromatic grapevines (*Vitis vinifera*), *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (6), **2003**

**FILLION L., AGEORGES A., PICAUD S., COUTOS-THEVENOT P., LEMOINE R., ROMIEU C. and DELROT S.**, Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry, *Plant Physiology*, 120 (4), **1999**

**FINNEGAN E. J., GENDER R. K., PEACOCK W. J. and DENNIS E. S.**, DNA methylation in plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49 223-247, **1998**

**FOUCHER F., MORIN J., COURTIADÉ J., CADIOUX S., ELLIS N., BANFIELD M. J. and RAMEAU C.**, DETERMINATE and LATE FLOWERING are two TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS homologs that control two distinct phases of flowering initiation and development in pea, *Plant Cell*, 15 (11), 2742-2754, **2003**

**FRANKS T., BOTTA R. and THOMAS M. R.**, Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement, *Theoretical and Applied Genetics*, 104 (2-3), 192-199, **2002**

**GALET P.**, Cépages et vignobles de France - tome II, Montpellier, **1990**

**GALET P.**, Précis d'ampélographie pratique, Imprimerie JF impression, Saint Jean de Vedas, **1998**

**GALET P.**, Dictionnaire encyclopédique des cépages, Hachette, **2000**

**GALET P.**, Précis de viticulture, JF impression, Saint Jean de Vedas, **2000**

**GALET P.**, Grands Cépages, Hachette, **2001**

**GARRIER G.**, Histoire sociale et culturelle du vin, Larousse-Bordas, **1998**

**GAUTHIER J. F.**, Histoire du vin, c. Q. s.-j. n°2676, Paris, **1992**

**GLATRE E.**, Le Riesling, Flammarion, Paris, **2001**

**GOCAL G. F. W., KING R. W., BLUNDELL C. A., SCHWARTZ O. M., ANDERSEN C. H. and WEIGEL D.**, Evolution of floral meristem identity genes. Analysis of *Lolium temulentum* genes related to APETALA1 and LEAFY of *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 125 (4), **2001**

**GYSS J.-L.**, Le vin et l'Alsace, Berger-Levrault/Jean-Pierre Gyss, **1978**

**HAKE S.**, Transcription factors on the move, *Trends in Genetics*, 17 2-3, **2001**

**HANTKE S. S., CARPENTER R. and COEN E. S.**, Expression of *floricaula* in single cell layer of periclinal chimeras activates downstream homeotigenes in all layer of floral meristems, *Development*, 121 27-35, **1995**

**HENDERSON I. R. and DEAN C.**, Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom, *Development*, 131 (16), 3829-3838, **2004**

**HOCQUIGNY S., PELS Y. F., DUMAS V., KINDT S., HELOIR M. C. and MERDINOGLU D.**, Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states, *Genome*, 47 (3), 579-589, **2004**

**HOFER J., TURNER L., HELLENS R., AMBROSE M., MATTHEWS P., MICHAEL A. and ELLIS N.**, Unifoliata regulates leaf and flower morphogenesis in pea, *Current Biology*, 7 (8), **1997**

**HUGLIN P. et SCHNEIDER C.**, Biologie et écologie de la vigne, Tec & doc, Paris, **1998**

**IRISH V. F. and SUSSEX I. M.**, Function of the *apetala-1* Gene during *Arabidopsis* Floral Development, *Plant Cell*, 2 741-753, **1990**

**JACK T.**, Relearning our ABCs: new twist on an old model, *Trends in Plant Science*, 6 310-316, **2001**

**JACKSON D.**, In situ hybridisation in plants, Molecular Plant Pathology, A practical approach, D. Bowles, S. Gurr and M. Mc Pherson, Oxford, **1991**

**JACQUEMONT G.**, Le grand livre des vins d'Alsace, Chêne, **1993**

**JENSEN C. S., SALCHERT K. and NIELSEN K. K.**, A TERMINAL FLOWER1-Like Gene from Perennial Ryegrass Involved in Floral Transition and Axillary Meristem Identity, *Plant Physiology*, 125 1517-1528, **2001**

**JOHNSON H.**, Une histoire mondiale du vin de l'antiquité à nos jours, Hachette, **1990**

**JOLY D., PERRIN M., GERTZ C., KRONENBERGER J., DEMANGEAT G. and MASSON J. E.**, Expression analysis of flowering genes from seedling-stage to vineyard life of grapevine cv. Riesling, *Plant Science*, 166 (6), 1427-1436, **2004**

**KELLY A. J., BONNLANDER M. B. and MEEKS-WAGNER D. R.**, NFL, the tobacco homolog of FLORICAULA and LEAFY, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems, *Plant Cell*, 7 (2), 225-234, **1995**

**KIM M., CANIO W., KESSLER S. and SINHA N.**, Developmental change Due to Long Distance movement of a Homeobox Fusion Transcrit in Tomato, *Science*, 293 287-289, **2001**

**KYOZUKA J., HARCOURT R. L., PEACOCK W. J. and DENNIS E. S.**, *Eucalyptus* has functional equivalents of the *Arabidopsis AP1* gene, *Plant Molecular Biology*, 35 573-584, **1997**

**LILJEGREN S. J., GUSTAFSON-BROWN C., PINYOPICH A., DITTA G. S. and YANOFSKY M. F.**, Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate, *Plant Cell*, 11 (6), **1999**

**MAIZEL A., BUSCH M. A., TANAHASHI T., PERKOVIC J., KATO M., HASEBE M. and WEIGEL D.**, The Floral regulaor LEAFY Evolves by Substitutions in the DNA binding domain, *Science*, 308 260-263, **2005**

**MANDEL M. A., GUSTAFSON-BROWN C., SAVIDGE B. and YANOFSKY M. F.**, Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1., *Nature*, 360 273-277, **1992**

**MÉHEUT J. P. and GRIFFE M.**, Le vin 50 siècles de passion, C. L. c. d. M. Griffé, TSH, Le Cannel, **1997**

**MELLEROWICZ E. J., HORGAN K., WALDEN A., COKER A. and WALTER C.**, PRFLL - a *Pinus radiata* homologue of FLORICAULA and LEAFY is expressed in buds containing vegetative shoot and undifferentiated male cone primordia, *Planta*, 206 (4), 619-629, **1998**

**MOLINERO-ROSALES N., JAMILENA M., ZURITA S., GOMEZ P., CAPEL J. and LOZANO R.**, FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity, *Plant Journal*, 20 (6), **1999**

**MONTIERI S., GAUDIO L. and ACETO S.**, Isolation of the LFY/FLO homologue in *Orchis italica* and evolutionary analysis in some European orchids, *Gene*, 333 101-109, **2004**

**MORRISON J. C.**, Bud development in *Vitis vinifera* L., *Botanical Gazette (Chicago)*, 152 (3), **1991**

**MOURADOV A., GLASSICK T., HAMDORF B., MURPHY L., FOWLER B., MARIA S. and TEASDALE R. D.**, NEEDLY, a *Pinus radiata* ortholog of FLORICAULA/LEAFY genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (11), 6537-6542, **1998**

**MULLER C.**, Les vins d'Alsaces. Histoire d'un vignoble, Coprur, **1999**

**MULLINS M. G., BOUQUET A. and WILLIAMS L. E.**, Biology of grapevine, Cambridge, **1992**

**OLLAT N., GENY L. and SOYER J. P.**, Grapevine fruiting cuttings: validation of a model to study grapevine physiology. I. Main characteristics of the vegetative parts, *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 32 (1), 1-9, **1998**

- OLSEN K. M., WOMACK A., GARRETT A. R., SUDDITH J. I. and PURUGGANAN M. D.**, Contrasting evolutionary forces in the *Arabidopsis thaliana* floral developmental pathway, *Genetics*, 160 (4), 1641-1650, **2002**
- PARCY F., BOMBLIES K. and WEIGEL D.**, Interaction of LEAFY, AGAMOUS and TERMINAL FLOWER1 in maintaining floral meristem identity in *Arabidopsis*, *Development*, 129 (10), 2519-2527, **2002**
- PELLAZ S., DITTA G.S., BAUMANN E., WISMAN E. and YANOFSKY M.F.**, B and C organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes, *Nature*, 405, 200-203, **2000**
- PENA L., MARTIN-TRILLO M., JUAREZ J., PINA J. A., NAVARRO L. and MARTINEZ-ZAPATER J. M.**, Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time, *Nature Biotechnology*, 19 (3), 263-267, **2001**
- PERRIN M., GERTZ C. and MASSON J. E.**, High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotypes grown worldwide, *Plant Science*, 167 (6), **2004**
- PERRIN M., MARTIN D., JOLY D., DEMANGEAT G., THIS P. and MASSON J. E.**, Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells, *Plant Science*, 161 (1), 107-116, **2001**
- PFÄFFL M. W.**, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Research*, 29 (9), 2001-2007, **2001**
- PIDKOWICH M. S., KLENZ J. E. and HAUGHN G. W.**, The making of a flower: control of floral meristem identity in *Arabidopsis*, *Trends in Plant Science*, 4 (2), 64-70, **1999**
- PILLITTERI L. J., LOVATT C. J. and WALLING L. L.**, Isolation and characterization of a TERMINAL FLOWER homolog and its correlation with juvenility in citrus, *Plant Physiology*, 135 (3), 1540-1551, **2004**
- POUTEAU S., NICHOLLS D., TOOKE F., COEN E. and BATTEY N.**, The induction and maintenance of flowering in *Impatiens*, *Development*, 124 3343-3351, **1997**
- RATCLIFFE O. J., AMAYA I., VINCENT C. A., ROTHSTEIN S., CARPENTER R., COEN E. S. and BRADLEY D. J.**, A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants, *Development*, 125 (9), 1609-1615, **1998**
- RATCLIFFE O. J., BRADLEY D. J. and COEN E. S.**, Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*, *Development*, 126 (6), 1109-1120, **1999**
- RAVEN P. H., EVERT R. F. and EICHHORN S. E.**, Biologie végétale, De Boeck Université S.A., **2000**
- REGNER F., WIEDECK E. and STADLBAUER A.**, Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers, *Vitis*, 39 (3), 103-107, **2000**

- ROTTMANN W. H., MEILAN R., SHEPPARD L. A., BRUNNER A. M., SKINNER J. S., MA C. P., CHENG S. P., JOUANIN L., PILATE G. and STRAUSS S. H.**, Diverse effects of overexpression of LEAFY and PTLF, a poplar (*Populus*) homolog of LEAFY/FLORICAULA, in transgenic poplar and *Arabidopsis*, *Plant Journal*, 22 (3), 235-245, **2000**
- ROWLEY A. and RIBAUT J.**, *Le vin. Une histoire de goût*, Gallimard, **2003**
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F. and MANIATIS T.**, *Molecular cloning: a laboratory manual*, C. S. H. L. Press, New York, **1989**
- SCHULTZ E. A. and HAUGHN G. W.**, LEAFY, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 3 (8), **1991**
- SESSIONS A., YANOFSKY M. F. and WEIGEL D.**, Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1, *Science*, 289 (5480), 779-781, **2000**
- SIMON R., IGENO M. I. and COUPLAND G.**, Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*, *Nature*, 384 59-62, **1996**
- SIMPSON G. G.**, The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of *Arabidopsis* flowering time, *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (5), 570-574, **2004**
- SITTLER L.**, *La viticulture et le vin de Colmar a travers les siècles*, Alsatia, **1956**
- SITTLER L.**, *L'agriculture et la viticulture en Alsace*, SAEP Colmar-Ingersheim, **1974**
- SOUTHERTON S. G., STRAUSS S. H., OLIVE M. R., HARCOURT R. L., DECROOCQ V., ZHU X. M., LLEWELLYN D. J., PEACOCK W. J. and DENNIS E. S.**, Eucalyptus has a functional equivalent of the *Arabidopsis* floral meristem identity gene LEAFY, *Plant Molecular Biology*, 37 (6), 897-910, **1998**
- SRINIVASAN C. and MULLINS M. G.**, Flowering in *Vitis*: conversion of tendrils into inflorescences and bunches of grapes, *Planta*, 145 (2), 187-192, **1979**
- SRINIVASAN C. and MULLINS M. G.**, Physiology of flowering in the grapevine - a review, *American Journal of Enology and Viticulture*, 32 (1), 47-63, **1981**
- STEIMER A., SCHÖB H. and GROSSNIKLAUS U.**, Epigenetic control of plant development: new layers of complexity, *Current Opinion in Plant Biology*, 7 11-19, **2004**
- STOLZ J. L.**, *L'ampélographie des vins d'Alsace*, Coprur, Strasbourg, **1994**
- SZYMKOWIAK E. J.**, What chimeras can tell us about plant development, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47 351-376, **1996**
- THOUVENIN C.**, *Vignes d'Alsace*, Editions "Journal des Ménagères", Mulhouse, **2003**

**TSAFTARIS A. S., PASENTSIS K., ILIOPOULOS I. and POLIDOROS A. N.**, Isolation of three homologous AP1-like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.) and characterization of their expression, *Plant Science*, 166 (5), 1235-1243, **2004**

**VEIT J., WAGNER E. and ALBRECHTOVA J. T. P.**, Isolation of a FLORICAULA/LEAFY putative orthologue from *Chenopodium rubrum* and its expression during photoperiodic flower induction, *Plant Physiology and Biochemistry*, 42 (7-8), 573-578, **2004**

**VIALA P. and VERMOREL V.**, Ampélographie, Masson, Paris, **1901**

**VINCENT C. A., CARPENTER R. and COEN E. S.**, Interactions between gene activity and cell layers during floral development, *Plant Journal*, 33 (4), 765-774, **2003**

**WADA M., CAO Q. F., KOTODA N., SOEJIMA J. and MASUDA T.**, Apple has two orthologues of FLORICAULA/LEAFY involved in flowering, *Plant Molecular Biology*, 49 (6), 567-577, **2002**

**WALTON E. F., PODIVINSKY E. and WU R. M.**, Bimodal patterns of floral gene expression over the two seasons that kiwifruit flowers develop, *Physiologia Plantarum*, 111 (3), 396-404, **2001**

**WEIGEL D., ALVAREZ J., SMYTH D. R., YANOFSKY M. F. and MEYEROWITZ E. M.**, Leafy controls floral meristem identity in *Arabidopsis*, *Cell (Cambridge)*, 69 (5), 843-869, **1992**

**WEIGEL D. and NILSSON O.**, A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants, *Nature (London)*, 377 (6549), 495-500, **1995**

**WELLER J. L., REID J. B., TAYLOR S. A. and MURFET I. C.**, The genetic control of flowering in pea, *Trends in Plant Science*, 2 (11), **1997**

**WERNER T., FESSELE S., MAIER H. and NELSON P. J.**, Computer modeling of promoter organization as a tool to study transcriptional coregulation, *FASEB Journal*, 17 (10), **2003**

**WOLFF C.**, Riquewihr, son vignoble et ses vins à travers les ages, SAEP Colmar-Ingersheim, **1967**

**YANOFSKY M. F., MA H. M., BOWMAN J. L., DREWS G. N., FELDMAN K. A. and MEYEROWITZ E. M.**, The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors, *Nature*, 346 35-39, **1990**

**YU Q. L. and MA H.**, The flowering transition and florigen, *Current Biology*, 11 (20), R815-R815, **2001**

## **Annexes**

°C	Degré Celsius
<i>A. majus</i>	<i>Antirrhinum majus</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ADN	Acide desoxyribonucléique
ADNc	Acide desoxyribonucléique complémentaire
<i>AG</i>	<i>AGAMOUS</i>
AOC	Appellation d'Origine Controlée
<i>API</i>	<i>APETALA 1</i>
ARN	Acide ribonucléique
av	Avant
<i>CEN</i>	<i>CENTRORADIALIS</i>
CIVA	Conseil Interprofessionnel des Vins d'Alsace
cm	Centimètre
Dig-UTP	Digoxigenine desoxyuredine-triphosphate
dNTP	Desoxynucleoside triphosphate
DO	Densité Optique
EDTA	Acide éthylène diamine tetra-acétique
ENTAV	Etablissement National Technique pour l'Amélioration de la Viticulture
Fig	Figure
<i>FLO</i>	<i>FLORICAULA</i>
g	Gramme
ha	Hectare
hl	Hectolitre
IBA	Acide Indole butyrique
INAO	Institut National des Appellations d'Origine
IPTG	Isopropylthio-b-D galactoside
JC	Jesus Christ
kb	Kilobase
kg	Kilogramme
<i>LFY</i>	<i>LEAFY</i>
M	Molaire
m	Mètre
MADS	MCM1-AG-DEFA-SRF

min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NaCl	Chlorure de sodium
nm	Nanomètre
ONIVINS	Office national interprofessionnel des vins
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate Buffer Sodium
PCR	Polymérase chain reaction
PEPB	Phosphatidylethanolamine-binding proteins
pH	Potentiel hydrogène
<i>PLE</i>	<i>PLENA</i>
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
qsp	Quantité suffisante pour
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RT	Reverse transcription
s	seconde
SDS	Sodium dodécylsulfate
<i>SEP</i>	<i>SEPALLATA</i>
<i>SQUA</i>	<i>SQUAMOSA</i>
SSC	Standard Sodium Citrate
TE	Tris-EDTA
<i>TFL1</i>	<i>TERMINAL FLOWER 1</i>
TrisHCl	Hydroxyméthyl aminométhane
UV	Ultra Violet
<i>VFL</i>	<i>Vitis FLORICAULA/LEAFY</i>
vol	Volume
<i>VvTH</i>	<i>Vitis vinifera</i> Transporteur d'hexose
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside
μE	MicroEinstein
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μm	Micromètre

## Annexe I

## Liste des amorces

Nom	Séquence (5'- 3')	Remarque
<b>ODR</b>	CGG GAT CCG GYT TRT ARC AIG CYT GIC YCC A	Amorce dégénérée
<b>ODS</b>	CGG AAT TCA TGM GIC AYT AYG TIC AYT GYT AWG C	Amorce dégénérée
<b>VVLFY1R</b>	CGG CTT ATA GCA GGC CTG GCC	RACE PCR: spécifique 3
<b>VVLFY1S</b>	ATG AGG CAT TAC GTG CAT TG	RACE PCR: spécifique 1
<b>VVLFY2R</b>	CTC TCC TCT CTC CTT GAA AGC TCT CCT TAA	RACE PCR: spécifique 4
<b>VVLFY2S</b>	CAT TGT CTT GAT GAG GAG GCT TCC AAT GCC	RACE PCR: spécifique 2
<b>VVLFY3R</b>	GGG AAT ACT ACG TGC CAT TTA AC	RT
<b>VVLFY3S</b>	GCC AAA GAG CGC GGT GAG AAG TGC	RT
<b>VVLFY6R</b>	CAC CTG GTT CGT CAC CTT AGT AGG	RACE PCR: spécifique 3'
<b>VVLFY7R</b>	GCA CTT CTC ACC GCG CTC TTT GGC	RACE PCR: spécifique 4'
<b>VVLFY8R</b>	CCC CAT TCT GGT CTT CCC	RACE PCR: spécifique 5'
<b>VVLFY19S</b>	TGA CAG TGG TGT CAT CAT CTC TGT ATC ACT CC	Amorce sens utilisée pour le clonage de la séquence génomique de VvLEAFY
<b>VVLFY5R</b>	GCT TGC TCC CGC CTT CTT CGC	Amorce reverse utilisée lors de la synthèse de la sonde VvLEAFY pour l'hybridation <i>in situ</i>
<b>VVLFY 11S</b>	GAG AGG CAG AGG GAG CAT CCA TTC	Amorce sens utilisée lors de la synthèse de la sonde VvLEAFY pour l'hybridation <i>in situ</i>
<b>VVGAI1S</b>	TAT CAT CAT CCT CAT CAC CC	Amorce sens utilisée lors de la synthèse de la sonde VvGAI1 pour l'hybridation <i>in situ</i>
<b>VVGAI1R</b>	ATT TCC AAC CCA CTT CAT GC	Amorce reverse utilisée lors de la synthèse de la sonde VvGAI1 pour l'hybridation <i>in situ</i>
<b>VVTFL1-1S</b>	TRT KRT TGG TAG AGT GAT TGG	Amorce sens utilisée lors de la synthèse de la sonde VvTFL1 pour l'hybridation <i>in situ</i> et pour la RT PCR Quantitative (Amplification des transcrits de VvTFL1)
<b>VVTFL1-1R</b>	ATA TTT GGC CTT GGC ATT TC	Amorce reverse utilisée lors de la synthèse de la sonde VvTFL1 pour l'hybridation <i>in situ</i> et pour la RT PCR Quantitative (Amplification des transcrits de VvTFL1)
<b>VVAP1-1S</b>	AAG MGG ATM GAG AAC AAG	Amorce dégénérée sens utilisée lors de la synthèse de la sonde VvAP1 pour l'hybridation <i>in situ</i>
<b>VVAP1-2R</b>	RBT KTC MAG CTG MTG CTC	Amorce dégénérée reverse utilisée lors de la synthèse de la sonde VvAP1 pour l'hybridation <i>in situ</i>
<b>VVAG1S</b>	TGA TTC CTC CAA TAC CGG ATC	Amorce sens utilisée lors de la synthèse de la sonde VvAG pour l'hybridation <i>in situ</i>
<b>VVAG1R</b>	GGG AGC AAG TTT TGA GAG TC	Amorce reverse utilisée lors de la synthèse de la sonde VvAG pour l'hybridation <i>in situ</i>
<b>VVSEP3-1S</b>	GTA TCC ACA AGG GAG GCC CTG	Amorce sens utilisée lors de la synthèse de la sonde VvSEP3 pour l'hybridation <i>in situ</i>

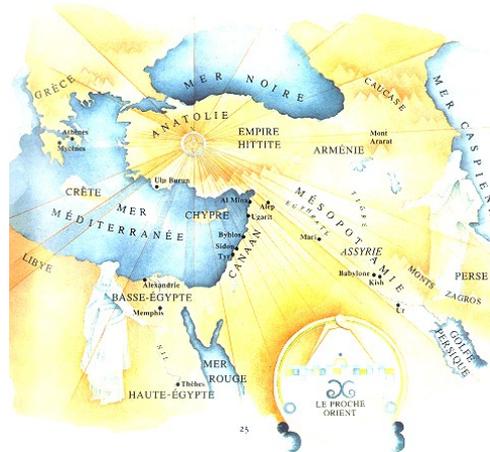
Nom	Séquence (5'- 3')	Remarque
<b>VVLFY-Q1S</b>	GAG CAA TGC CGT GAT TTC TTG ATC	Amorces sens utilisée pour la RT PCR Quantitative. Amplification des transcrits de <i>VvLEAFY</i>
<b>VVLFY-Q1R</b>	GCA TCT TGG GTT TGT TGA TGT AGC T	Amorces reverse utilisée pour la RT PCR Quantitative. Amplification des transcrits de <i>VvLEAFY</i>
<b>VVACT-Q1S</b>	TGT TGC CAT TCA GGC TGT TCT TTC TC	Amorces sens utilisée pour la RT PCR Quantitative. Amplification des transcrits de <i>VvACTINE</i>
<b>VvACT-Q1R</b>	CCA GCA AGG TCA AGA CGA AGG ATA GC	Amorces reverse utilisée pour la RT PCR Quantitative. Amplification des transcrits de <i>VvACTINE</i>
<b>Anchor</b>	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C	RACE PCR (Kit Boehringer)
<b>dTAnchor</b>	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTV	RACE PCR (Kit Boehringer)
<b>VvTHR</b>	CAT ATG AGC ATT TGA GTG CC	Hexose transporteur de vigne
<b>VvTHS</b>	CTG TGC CGC TCT ACC TCT CTG	Hexose transporteur de vigne
<b>N-18H</b>	GCT GAA ACT TAA AGG AAT TGA CGG AAG GGC	Spécifique des RNAr
<b>C-18J</b>	TCT AAG GGC ATC ACA GAC CTG TTA TTG	Spécifique des RNAr

(A= adénosine ; C= cytidine ; G= guanosine ; T= thymidine ; Y=C ou T ; R= A ou G ; M= A ou C ; W= A ou T ; V= A, C ou G ; I= A, C, G ou T)

## Annexe II

## Abréviations des noms de gènes présenté dans la figure 34

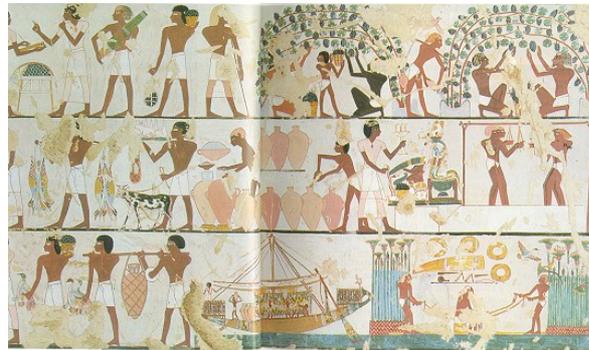
<i>ABI4</i>	<i>ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4</i>
<i>AGL24</i>	<i>AGAMOUS-LIKE 24</i>
<i>AMP1</i>	<i>ALTERED MERISTEM PROGRAM 1</i>
<i>AP1</i>	<i>APETALA 1</i>
<i>CO</i>	<i>CONSTANS</i>
<i>CRY2</i>	<i>CRYPTOCHROME2</i>
<i>EBS</i>	<i>EARLY BOLTING IN SHORT DAYS</i>
<i>FKF1</i>	<i>FLAVIN BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX1</i>
<i>FLC</i>	<i>FLOWERING LOCUS C</i>
<i>FPF1</i>	<i>FLOWERING PROMOTING FACTOR 1</i>
<i>FRI</i>	<i>FRIGIDA</i>
<i>FT</i>	<i>FLOWERING LOCUS T</i>
<i>GAI</i>	<i>GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE</i>
<i>GI</i>	<i>GIGANTEA</i>
<i>IPT3</i>	<i>ISOPENTENYLTRANSFERASE 3</i>
<i>LD</i>	<i>LUMINIDEPENDENS</i>
<i>LFY</i>	<i>LEAFY</i>
<i>LKP2</i>	<i>LOV KELCH PROTEIN2</i>
<i>MAF1, 2</i>	<i>MADS AFFECTING FLOWERING 1, 2</i>
<i>PGM</i>	<i>PHOSPHOGLUCOMUTASE</i>
<i>PHY A, B, E</i>	<i>PHYTOCHROME A, B, E</i>
<i>PIE1</i>	<i>PHOTOPERIOD-INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1</i>
<i>PFT1</i>	<i>PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1</i>
<i>RGA</i>	<i>REPRESSOR OF GA1-3</i>
<i>SOC1</i>	<i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1</i>
<i>SPY</i>	<i>SPINDLY</i>
<i>SVP</i>	<i>SHORT VEGETATIVE PHASE</i>
<i>TFL1, 2</i>	<i>TERMINAL FLOWER 1, 2</i>
<i>VIN3</i>	<i>VERNALIZATION-INSENSITIVE 3</i>
<i>VRN1, 2</i>	<i>VERNALIZATION 1, 2</i>
<i>ZTL</i>	<i>ZEITLUPE</i>



**Figure 1: Carte représentant le berceau de la vigne**

Les premiers ceps de vigne ont été retrouvés dans le Caucase. La culture de la vigne s’est ensuite propagée vers l’Égypte et la Grèce.

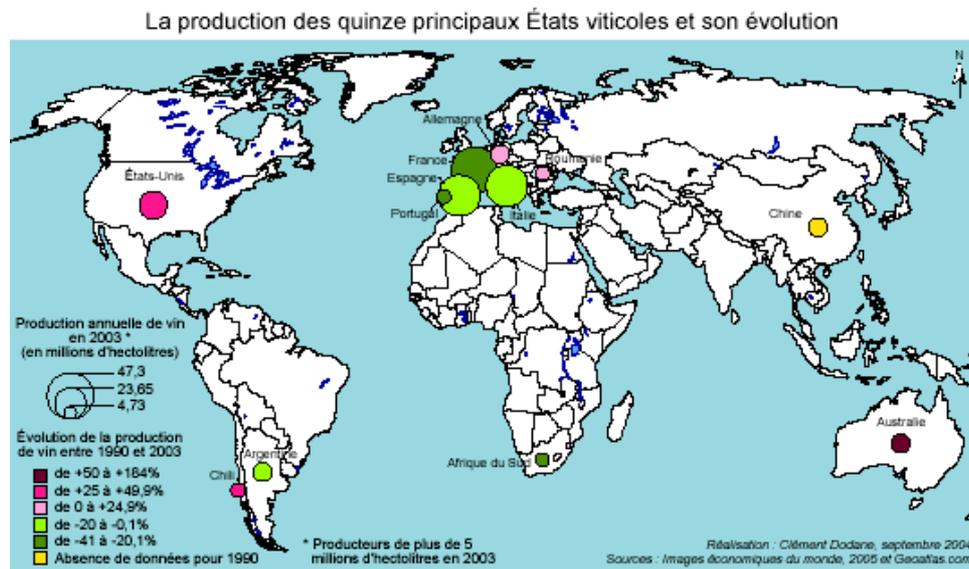
(source Johnson, 1990)



**Figure 2: Fresque Égyptienne.**

Fresque des tombeaux de la Thèbes Antique représentant l’ensemble du travail de la vigne. De droite à gauche partant du haut, on voit la vigne cultivée sur des treilles dans des bacs surélevés ; le raisin cueilli, un échantillon de la récolte est prélevé ; puis le raisin est foulé et un prêtre, qui remplit là la fonction de nos œnologues actuels, soumet le jus au dieu. Le moût est logé dans des jarres cananéennes où il fermentera. Enfin, en bas, le vin est transporté par bateau sur le Nil.

(source Johnson, 1990)



**Figure 3: Évolution de la production viticole à travers le monde**

Cette carte représente l'évolution de la production viticole annuelle à travers le monde, entre 1990 et 2003.

(source [www.geoatlas.com](http://www.geoatlas.com))

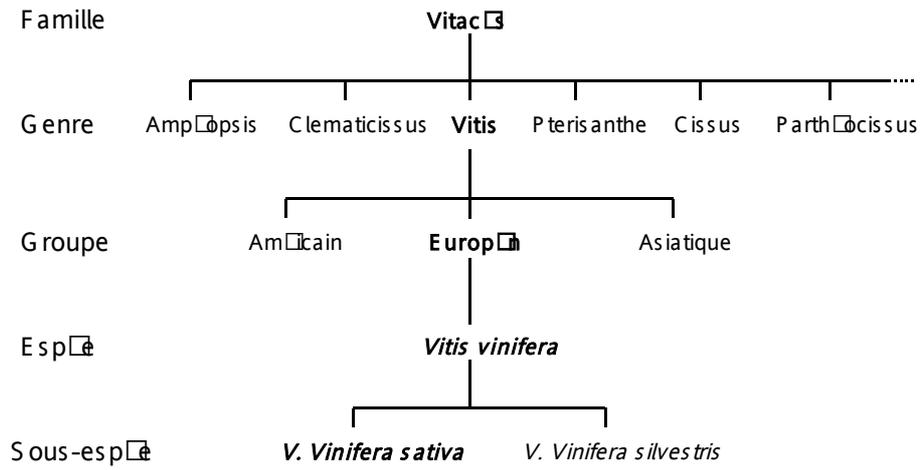
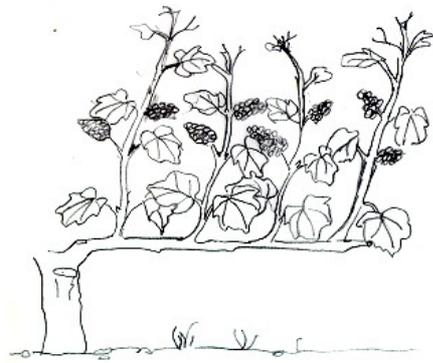


Figure 4 : Élément de systématique des Vitacées

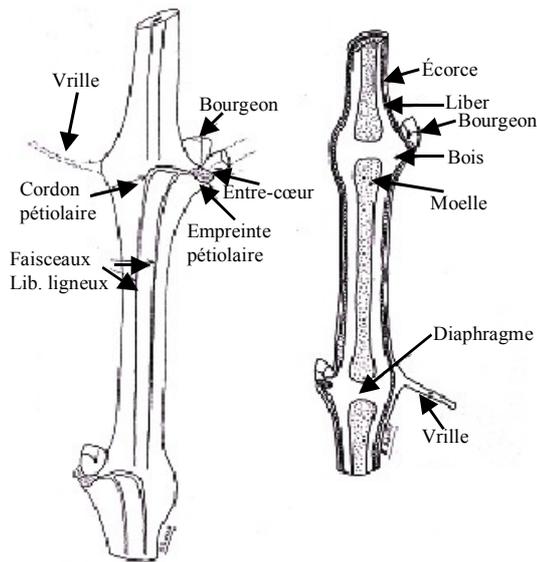
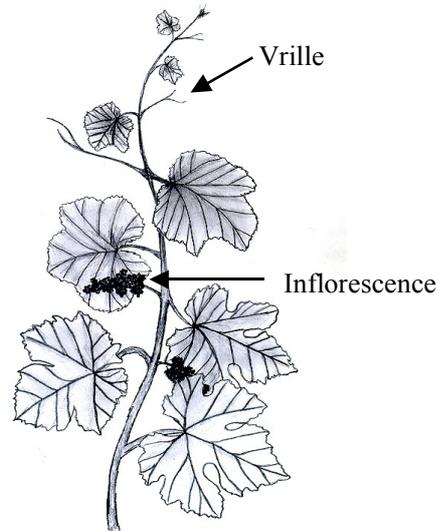


**Figure 5: Architecture d'un pied de vigne cultivé**

Ce schéma représente l'organisation d'un pied de vigne cultivé au cours de la période de croissance

**Figure 6: Organisation d'un rameau**

Ce schéma représente l'organisation d'un rameau au cours de la période de floraison. On peut observer la rythmicité des inflorescences et vrilles, organisées en triplet: un nœud sans organes, suivi de deux nœuds portant soit des inflorescences soit des vrilles.



**Figure 7: Organisation interne d'un rameau**

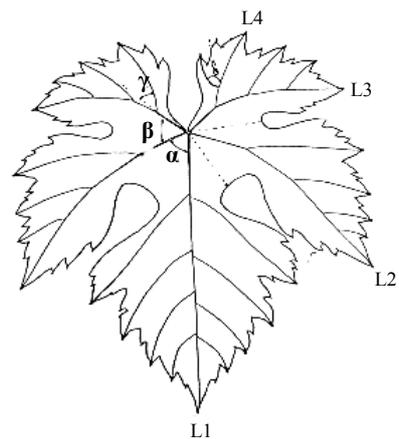
A: avant l'aoûtement  
B: Après l'aoûtement

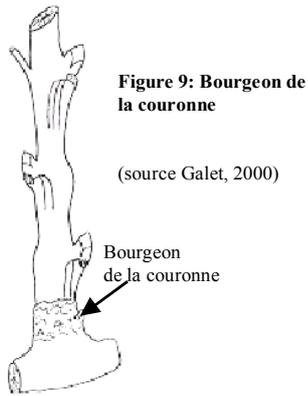
(source Galet, 2000)

**Figure 8: Organisation d'une feuille de vigne**

L1, L2, L3 et L4 représentent les distances pétiolaire  
 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  représentent les angles  
OS  
OL  
Les mesures de ces différents paramètres permettent  
La classification des espèces et des cépages

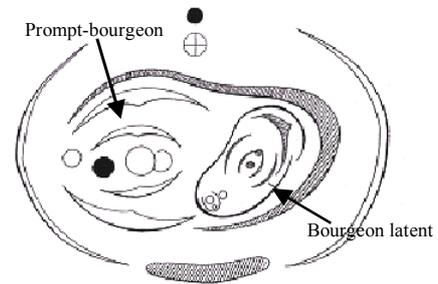
(source Galet, 1998)





**Figure 9: Bourgeon de la couronne**

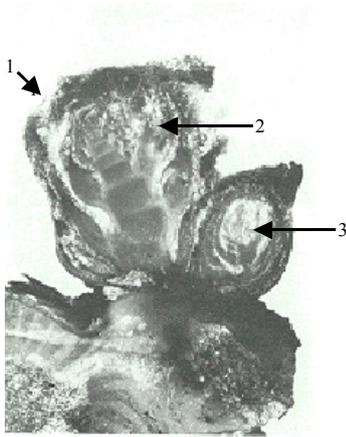
(source Galet, 2000)



**Figure 10: Diagramme d'Eichler**

Ce diagramme représente l'organisation du complexe gemmaire de la vigne

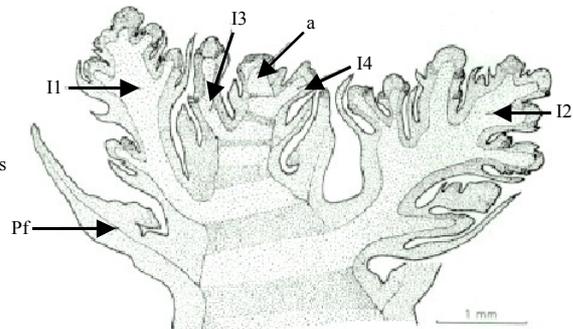
(source Huglin, 1998)



**Figure 11: structure d'un œil latent à la veille du débourrement**

- 1: Bourgeon principal avec ses mérithalles préformés
- 2: Inflorescence primordiale
- 3: Bourgeon secondaire

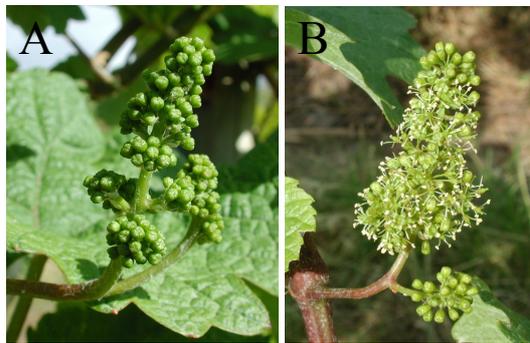
(source Huglin, 1998)



**Figure 12: Schéma d'un bourgeon primaire avant l'entrée en dormance**

I1 et I2: Inflorescences primordiales certaines. I3: incertaine.  
I4: primordium de vrille. A: apex. Pf: feuille primordiale

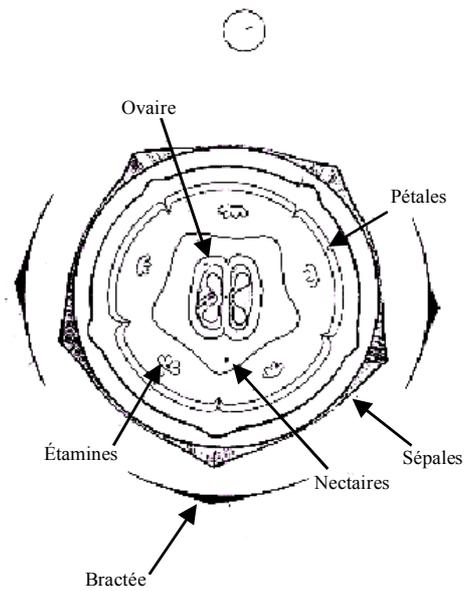
(source Carolus, 1970)



**Figure 13: Inflorescences de Riesling**

A: avant la floraison (Mai)  
B: pendant la floraison (Juin)

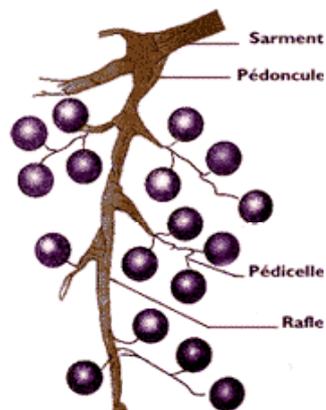
(Photos: Mireille Perrin)



**Figure 14: Diagramme de la fleur hermaphrodite**  
(source Galet, 2000)



**Figure 15: grappe de Riesling**  
Grappe de Riesling au mois d'octobre  
(photo: Mireille Perrin)



**Figure 16: Schéma d'une grappe de Raisin**  
Schéma représentant l'organisation d'une grappe de raisin.  
(source [www.onivins.fr](http://www.onivins.fr))

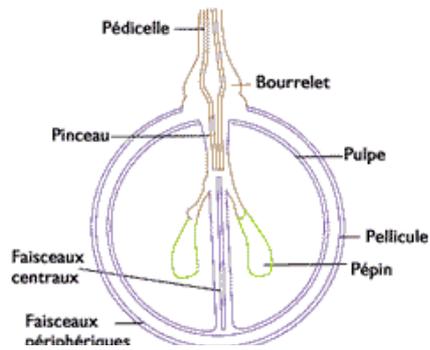


Figure 17: Organisation d'une baie de raisin

(source www.onivins.fr)

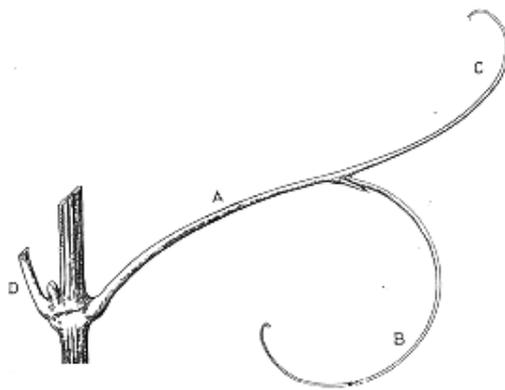


Figure 18: Schéma d'une vrille

A: pédoncule de la vrille  
B: branche majeure avec bractée à sa base  
C: Branche mineure  
D: pétiole de la feuille

(source Galet, 2000)

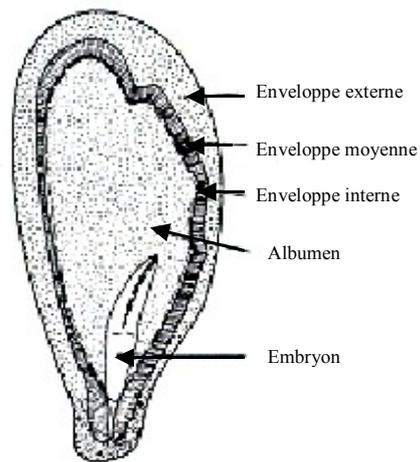


Figure 19: Organisation d'un pépin de raisin

(source Huglin, 1998)

## Stades repères de la vigne

*Dessins de M. Baggiolini*

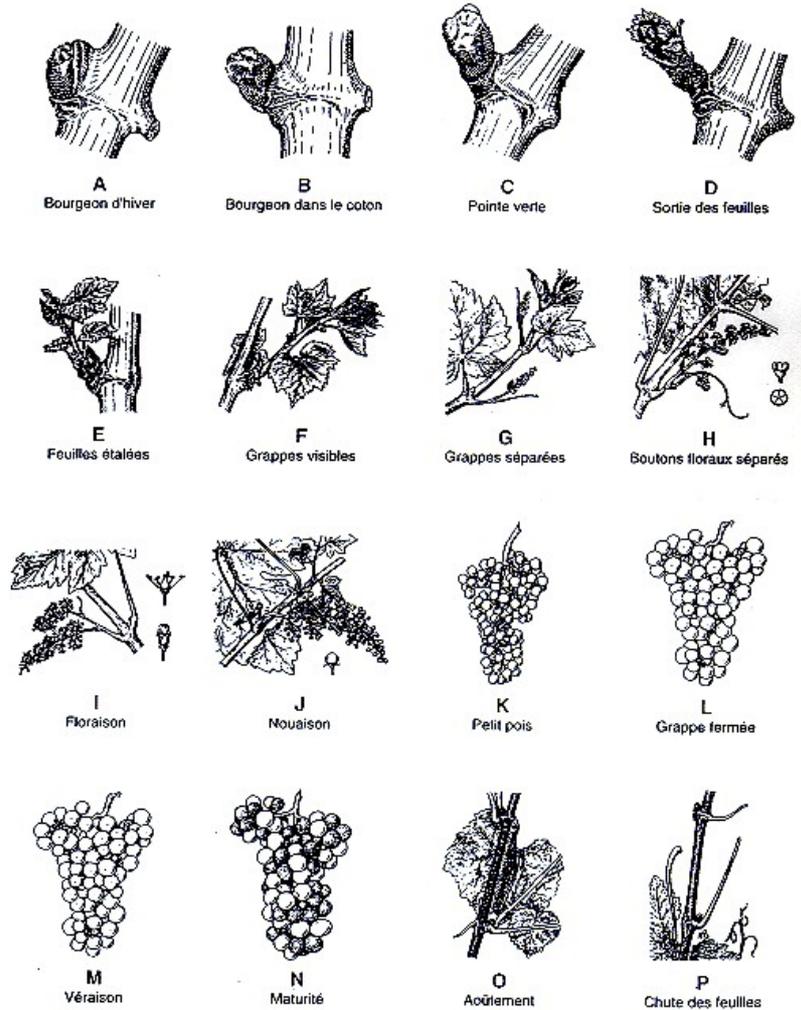


Figure 20: Stades repères de la vigne

(source Galet, 2000)

	Pulpe	Pellicule	Pépin	Rafle
Eau	+++			
Sucres	+++			
<u>Acides organiques :</u>	+++			
- tartrique				
- malique				
- citrique				
Matières minérales (K)	++			+++
<u>Composés phénoliques</u>				
- tanin		+++	+	+++
- matières colorantes		+++		
Cellulose - pectine	+	++		
Substances huileuses			++	

+ : présence faible  
 ++ : présence importante  
 +++ : présence très importante

**Tableau 1: Composition chimique de la grappe de raisin**

Tableau des principaux constituants chimiques de la grappe en fonction des différents éléments de la grappe

(source [www.onivins.fr](http://www.onivins.fr))

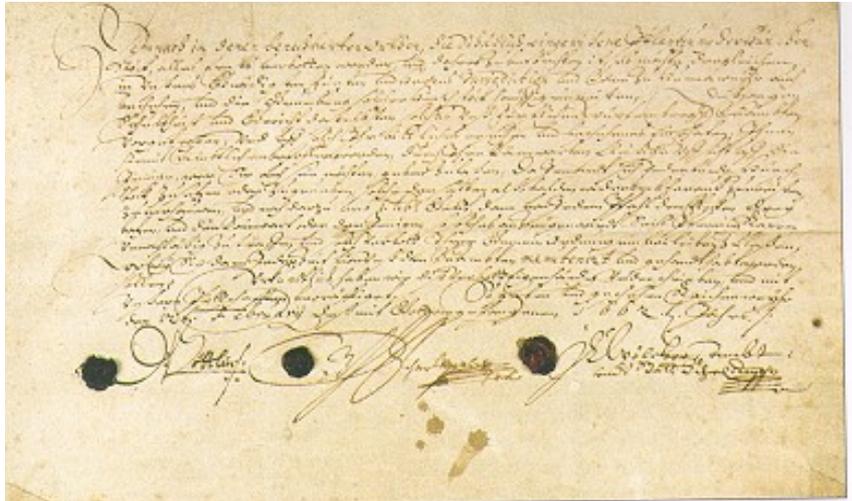
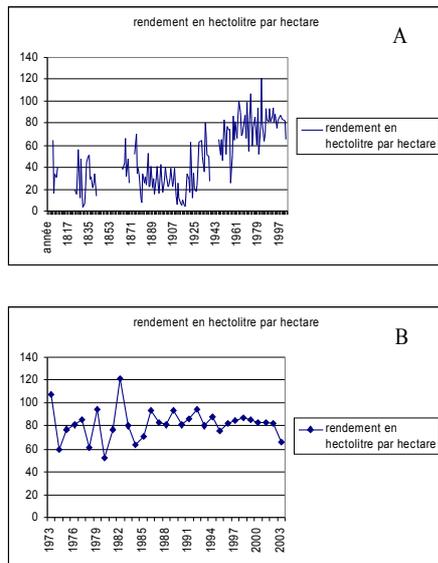


Figure 21: Interdiction du cépage Hünsch en 1662

Interdiction en 1662, de planter dans la seigneurie de Riquewihr, surtout à Hunawihr d'après ce texte, le cépage Hünsch, peu considéré à cette époque car trop productif.

(source Muller, 1999)

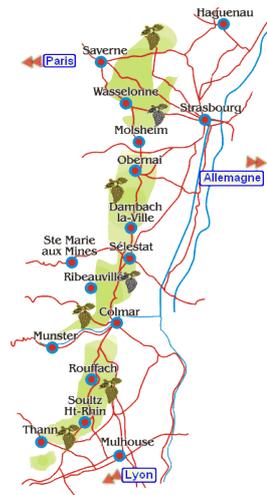


**Figure 22: Évolution des rendements de la vigne en Alsace**

A: Depuis 1817  
B: Depuis 1973

En ce qui concerne l'évolution des rendements au cours des cinquante dernières années, on note une stabilisation (comparée aux fluctuations de rendements au cours des deux derniers siècles). Cette stabilisation des rendements à environ 80 hl/ha s'explique en partie par la production de vin AOC qui limite les rendements et l'utilisation de clones moins productifs ([www.onivins.fr](http://www.onivins.fr))

(source Muller, 1999 et [www.onivins.fr](http://www.onivins.fr))



**Figure 23: Répartition du vignoble en Alsace**

Le vignoble est représenté en vert sur cette carte d'Alsace

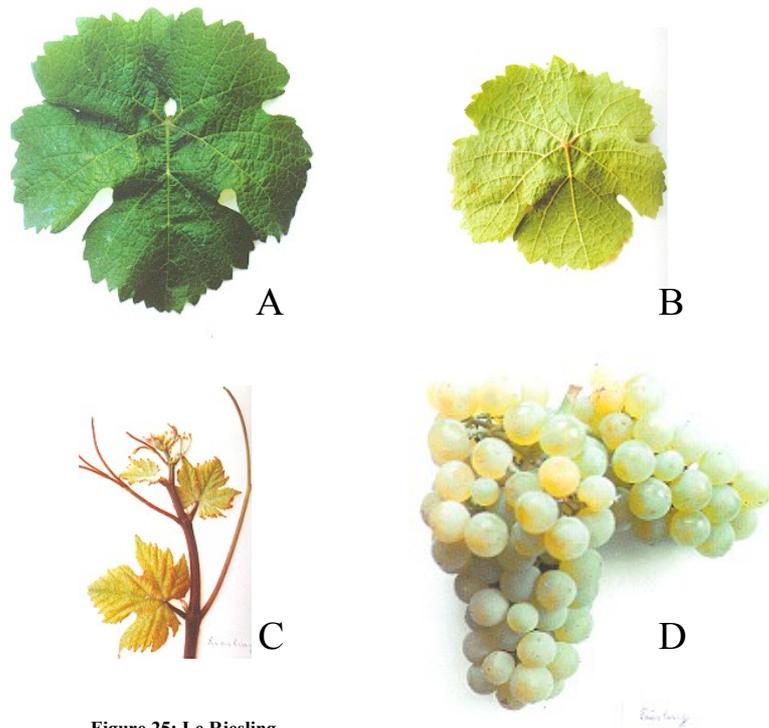
(source Thouvenin, 2003)



**Figure 24: Étiquettes de Riesling**

Ces étiquettes attestent de la production de Riesling dès 1857

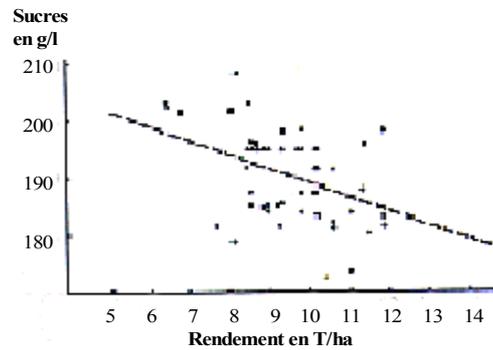
(source Jacquemont, 1993)



**Figure 25: Le Riesling**

A: dessus du limbe d'une feuille    C: rameau  
B: dessous du limbe d'une feuille    D: grappe mûre

(source Galet, 2001)



**Figure 26: Taux de sucre en fonction du rendement**

Étude réalisée à Colmar sur le Riesling en 1967. Le rendement est exprimé en tonne par hectare et les taux de sucres en gramme par litre

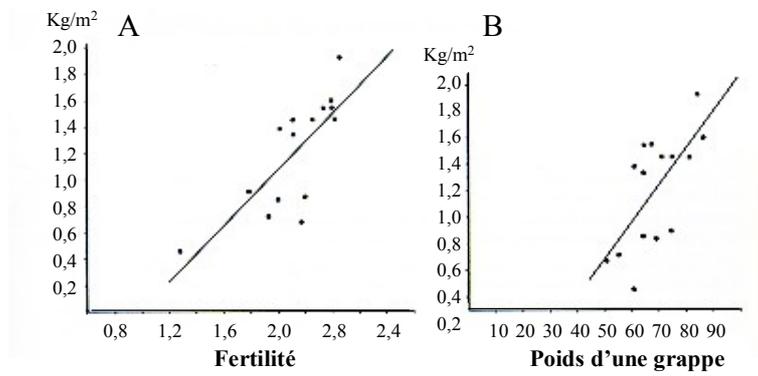
(source Huglin, 1998)

Analyses	Rendements Kg/m <sup>2</sup>				
	< 0,8	0,8-1,1	1,1-1,5	1,5-2,0	>2,0
<b>Analyse des moûts</b>					
Taux de sucre en g/l	240	229	214	201	188
Acidité (milliéquivalents/l)	147	151	149	137	143
pH	3,35	3,40	3,32	3,38	3,30
<b>Analyse des vins</b>					
Alcool	13°5	13°0	12°5	12°3	11°9
Extrait sec	40,1	36,0	33,3	28,8	28,2
Indice de polyphénol totaux	40,3	38,2	35,2	33,3	30,1
Intensité colorante	0,711	0,700	0,611	0,561	0,461
<b>Examen organoleptique des vins jeunes</b>					
<b>Note sur 10</b>					
Visuelle	7,57	6,43	4,85	4,84	2,71
Olfactive	6,00	5,57	4,85	5,53	3,71
Gustative	6,57	6,00	5,43	4,86	3,57

**Tableau 2: Influence du rendement sur les constituants qualitatifs de la vendange et des vins, ainsi que leur appréciation sensorielle**

Étude Réalisée en 1983, sur du Pinot noir. Des suppressions de grappes après la nouaison ont permis d'obtenir des lots de raisins correspondant à 5 classes de rendements

(source Huglin, 1998)



**Figure 27: Relation entre le rendement et la fertilité des bourgeons (A) et le poids moyen des grappes (B) pour le Riesling**

Cette étude a été réalisée à l'INRA de Colmar entre 1957 et 1971 sur le Riesling  
Le rendement est exprimé en Kg/m<sup>2</sup>.

(source Huglin, 1998)

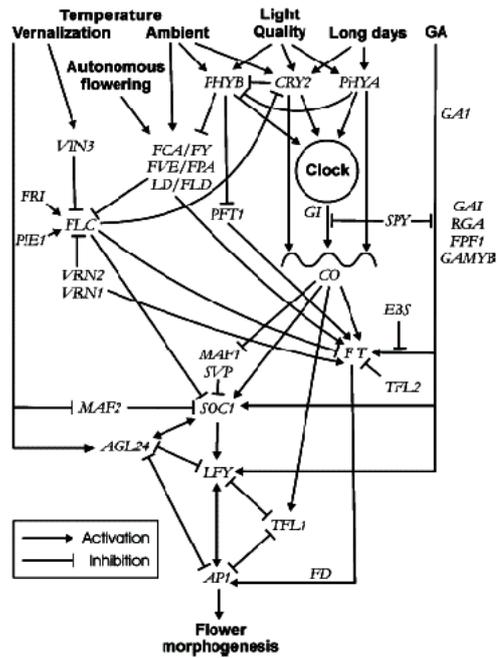
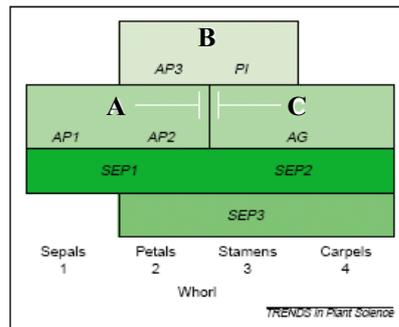


Figure 28: Les différentes voies de régulation de l'induction florale chez *A. thaliana*

Noms complets des gènes voir annexe II

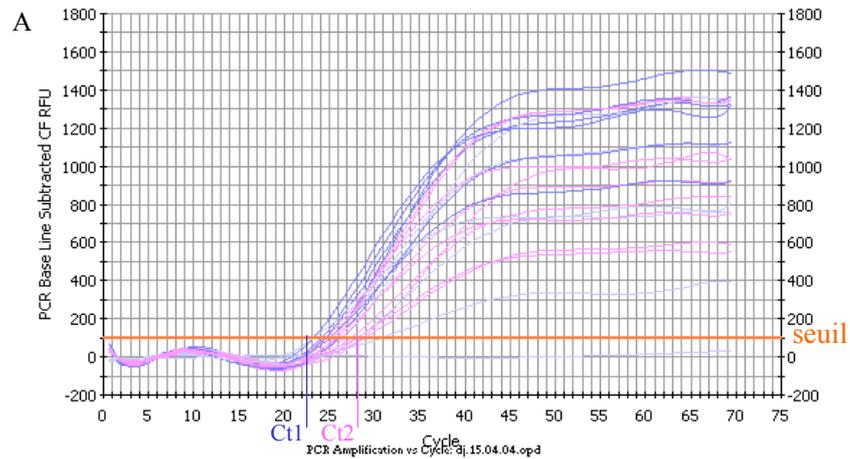
(source Bernier, 2005)



**Figure 29: Modèle ABC**

Ce schéma représente l'expression des différents gènes homéotiques impliqués dans la morphogénèse florale, dans les différents verticilles de la fleur.

(source Thomas, 2001)



B

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{cible}})^{\Delta\text{CTcible}} (\text{échantillon 2} - \text{échantillon 1})}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CTref}} (\text{échantillon 2} - \text{échantillon 1})}$$

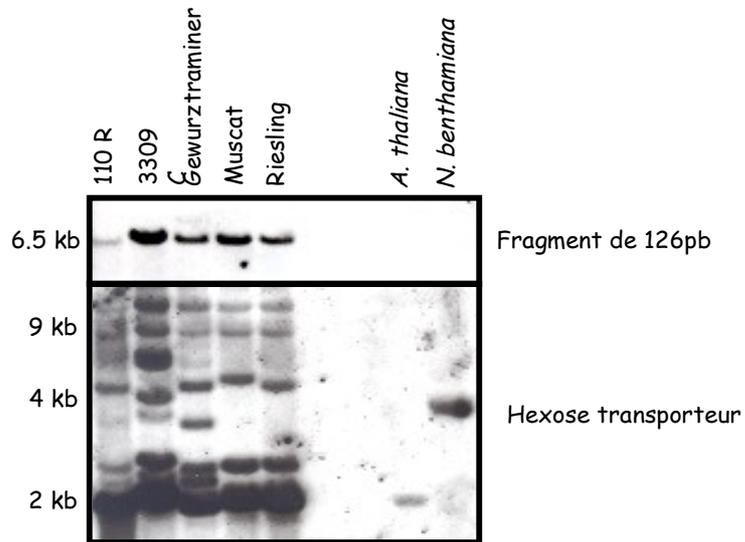
**Figure 30 : RT PCR quantitative**

A: Résultats bruts de la RT PCR

B: modèle mathématique de Pfäffl

avec E=efficacité de la PCR,  $\Delta\text{CT}$ =différence de Ct entre les deux échantillons pour un gène cible (*VvLEAFY*) et un gène de référence (*VvACTINE*).

(source Pfäffl, 2001)



**Figure 31: Nombre de locus pour *VvLEAFY***

Analyse par Southern blot des ADN génomiques de 110R (1), 3309 (2), Gewurztraminer (3), Muscat (4), Riesling (5), *A.thaliana* (6) et *N.benthamiana* (7). Les ADN ont été digérés par HindIII, séparés et transférés sur membrane de nylon. La membrane a été hybridée avec (A) une sonde correspondant au fragment de 126 pb (produit par PCR à partir d'un plasmide contenant le fragment de 126 pb) ou avec (B) une sonde correspondant au gène de l'hexose transporteur (produit par PCR sur de l'ADN de 110R à l'aide des amorces VvTHR et VvTHS).

		1		75
Tabac	(1)	MDPEAFSASLFKWDPRGAMPPT---RLEAAVAPPPPPALPPQPLSAAYSIKTRELGGLEELFQAYGIRYY		
Pois	(1)	MDPDAFTASLFKWDPRTVLSTAPSPRPQLLDYAVPTTAP-----MTYHPARLPRELGGLEELFQAYGIRYY		
Eucalyptus	(1)	-----MDPEAF-----AV--VGLRMTGGLEELFQAYGIRYL		
Arabidopsis	(1)	MDPEGFTSGLFRWNPTRALVQAP-----PPVPPPLQQQ-----PVTPTAAFGMRLLGLELFGPYGIRFY		
Pétunia	(1)	MDPEAFSASLFKWDPRGAMPPTN---RLEAVAPPPPPPLPPQPLFPAYSIRTELGGLEEMFQAYGIRYY		
Peuplier	(1)	MDPEAFTASLFKWDTRAMVPHPN---RLEEMVPPPPQ-----PP--AAFAVRPRELGGLEELFQAYGIRYY		
Platane	(1)	MDPDVFAANLFKWDPRGAAPFN---RLEAVAPP-----TYAIRPRELGGLEDFQAYGIRYY		
Vigne	(1)	MDPDAFTASLFKWDPRGAVAPPN---RLEAVAPPPGA---AAPAVAAAYAIRPRELGGLEDFQAYGIRYY		
		76		150
Tabac	(72)	TAAKIAELGFTVNTLLDMKDEELDDMMNSLSQIFRWELLVGERYGIKAAIRAERRRLEEEE---LRRRHLLSD		
Pois	(68)	TAAKIAELGFTVSTLVDMKDEELDDMMNSLSQIFRWDLVGERYGIKAAIRAERRRLEEEE---IKRRGLSD		
Eucalyptus	(30)	TASRIAEMGFTANTLLDMKDEELDDMMNSLSHIFRWDLVGERYGIKAAIRAERRRLEAD---DRRHLLSTD		
Arabidopsis	(62)	TAAKIAELGFTASTLVGMKDEELEEMNSLSHIFRWELLVGERYGIKAAVRAERRRLEEEEESRRRHLLSA		
Pétunia	(72)	TAAKITELGFTVNTLLDMKDEELDDMMNSLSQIFRWELLVGERYGIKAAIRAERRRLEEEE---GRRRHLLSDG		
Peuplier	(63)	TAAKIAELGFTVNTLLDMKDEELDDMMNSLSQIFRWDLVGERYGIKAAVRAERRRLEED---PRRQLSD		
Platane	(58)	TAAARMELGFTVNTLLDMKDEELDDMMNSLSQIFRWDLVGERYGIKAAVRAERRRLEEEE---SRRRHLLMAD		
Vigne	(69)	TAAKIAELGFTVSTLLDMKDEELDDMMNSLQIFRWDLVGERYGIKAAVRAERRRLEEEE---SRRRHLLSAD		
		151		225
Tabac	(143)	GGT---NALDALSQE---GLSEEPVQQQ-EREAVSGGG--GTTWEVVAAGGGRMKQRRRKK---VVAAGR		
Pois	(139)	T-T---NALDALSQE---GLSEEPVQR-EKEAMSGGG--GSTWEVAVVEERRRQIRRR---MKMKGND		
Eucalyptus	(101)	H-----ALLDALSHQ---GLSEEQVQVHSEKQDLGRAGS--GDTAGTSWGAQQQKKRHRHH---ITAMK		
Arabidopsis	(137)	AGDSGTHHALDALSQEDDWTGLSEEPVQQQDQDAAGNNGGGSGYWDAGQGMKQKQQRRRKK---PMLTSVE		
Pétunia	(143)	G-T---NVLDALSQE---GLSEEPVQQQ-EEAAGSGGG--GTAVVAVPFGG-GRMRQRKK---VVVG		
Peuplier	(134)	NNT---NTLDALSQE---GFSEEPVQQQ-DKEAAGSGG--RGTWEAVAAG--ERKKQSGRK-----		
Platane	(129)	A-T---NALDALSQE---GLSEEPVQQQ-EKEAAGSG--GGMWEVAAG--ERKKQRRK-----TP		
Vigne	(140)	T---A-NAIDALSQE---GLSEEPVQQQ-EKEAAGSGG--VGTWEVVVAG--ERKKQRRKKGKTRMSADD		
		226		300
Tabac	(203)	EKRGGASAEDEETEEDDWNIND---ASGGISERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQCRDFLIQ		
Pois	(198)	HGENEEGEBEEDNISGG-----GVGGGERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQCREFLIQ		
Eucalyptus	(159)	GAATEEDEDEEEVEEMR-----RQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYDQCRDFLLQ		
Arabidopsis	(209)	TDEDVNEGEDDDGMDNGNG-----GSLGTERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQCRDFLLQ		
Pétunia	(199)	RERRGSSMEDEDETEEDNEDYINNEGGGISERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQCRDFLIQ		
Peuplier	(183)	-KGRQVVLDLGDDEHG-----GAICERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQCRDFLIQ		
Platane	(177)	TKSADDDDEADDEK-----GE-GGERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQCRDFLIQ		
Vigne	(199)	NMNEDDNEGDEDDDKGS-----GERGSEERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQCRDFLIQ		
		301		375
Tabac	(275)	VQNIAKERGEKCPKVTNQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEEASNALRRAFKERGENVGAWRQAC		
Pois	(261)	VQAIAKERGEKCPKVTNQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEEVSNELRGFKERGENVGAWRQAC		
Eucalyptus	(216)	VQSLAKERGEKCPKVTNQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEHASNALRKSFKERGENVGAWRQAC		
Arabidopsis	(274)	VQTI AKDRGEKCPKVTNQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEEASNALRRAFKERGENVGSWRQAC		
Pétunia	(274)	VQNIAKERGEKCPKVTNQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEASNALRRAFKERGENVGAWRQAC		
Peuplier	(243)	VQSI AKERGEKCPKVTNQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEASNALRRAFKERGENVGAWRQAC		
Platane	(238)	VQNIAREGEKCPKVTNQVFRYAKRAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEASNALRRAFKERGENVGAWRQAC		
Vigne	(262)	VQNIAKERGEKCPKVTNQVFRYAKKAGASYINKPKMRHYVHCYALHCLDEEASNALRRAFKERGENVGAWRQAC		
		376		450
Tabac	(350)	YKPLVAIAAR-QGWDIDTFNAHPRLAIWVPTKLRQLCHSERSNAAAAAASSVSGGGGDHLPF-----		
Pois	(336)	YKPLVAIAAR-QGWDIDAFNAHPRLSIWVPTKLRQLCHAERN-----AAASSVSGVTTLHPF-----		
Eucalyptus	(291)	YHPLVTIAGRAGWDIDAFNAHPRLCIWVPTKLRQLCHARRHSASASSASTSAPTAAHLELPY-----		
Arabidopsis	(349)	YKPLVNIACR-HGWDIDAVFNAHPRLSIWVPTKLRQLCHLERNAVAANAALVGGISCTGSSTSRGGGGGDDL		
Pétunia	(349)	YKPLVAIAAR-QGWDIDAFNGHPRLSIWVPTKLRQLCHSERSN---AAAAASTSVSGGVDHLPF-----		
Peuplier	(318)	YKPLVAIASR-QGWDIDSI FNAHPRLAIWVPTKLRQLCYAERN-----ATSSSSVSGTGHLPF-----		
Platane	(313)	YKPLVAMAAAR-QGWDIDAFNAHRLAIWVPTKLRQLCHAERN---N--AGASSSTSGGAIITGFSF-----		
Vigne	(337)	YKPLVALAAR-QGWDIDAFNAHPRLAIWVPTKLRQLCHSERSNAAAAAASSCSISGGADHLPF-----		

Figure 32: Alignement des séquences protéiques de LEAFY et de ses orthologues

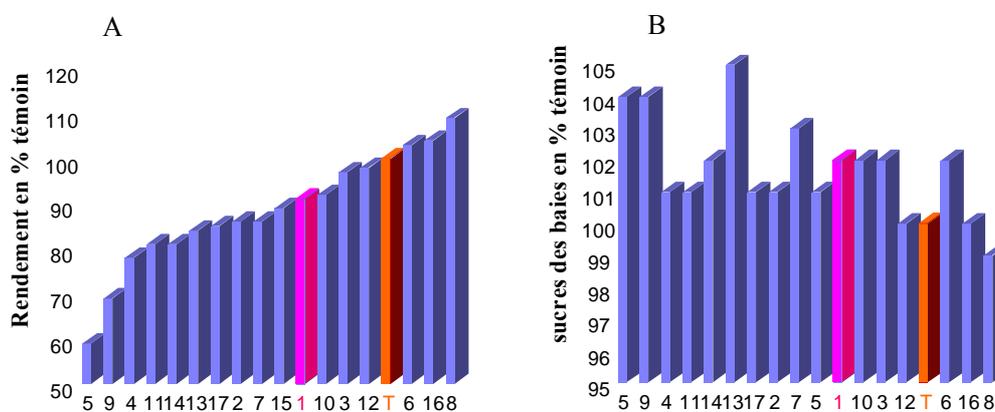
Alignement des séquences protéiques des orthologues de LEAFY chez le tabac, le pois, l'eucalyptus, Arabidopsis, le pétunia, le peuplier, le platane et la vigne

Les a. aminés identiques pour tous les orthologues sont écrits en rouge, les a. aminés identiques pour au moins 3 séquences en bleu, les a.aminés de même nature en vert et les a. aminés différents en noir.

Cépages et années de plantation	Nombre de clones	Site d'implantation des parcelles
Gewurztraminer Rs - 1998	136	Bergheim (68)
Meunier N - 1984	28	Bergheim (68)
Pinot blanc B - 1984	188	Bergheim (68)
Pinot gris G - 1984	194	Bergheim (68)
Pinot noir N - 1984 et 1995	99	Bergheim (68)
Riesling B - 1997	182	Bergheim (68)
Savagnin blanc B - 1998	53	Bergheim (68)
Savagnin rose Rs - 1998	15	Bergheim (68)
Sylvaner blanc B - 1990	292	Bergheim (68)

**Tableau 3: Conservatoire de clones de l'INRA de Colmar**

(source www.entav.fr)



**Figure 33: Évaluation agronomique de 18 clones de Riesling**

A: évaluation du rendement de 18 clones de Riesling.

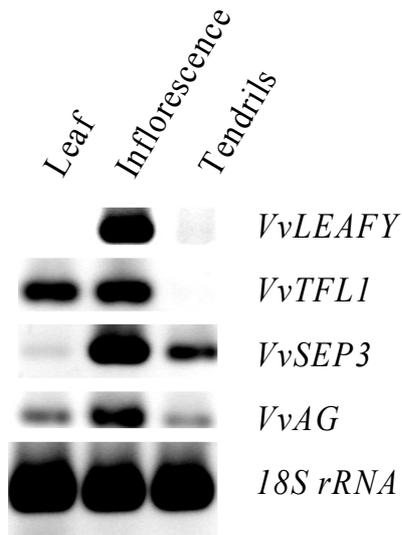
B: évaluation du taux de sucre dans les baies pour les 17 clones de Riesling.

T=témoin Riesling clone 49

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (Riesling clones 49).

Les clones 1 et 49 (T) sont les clones étudiés dans ce chapitre.

(source C. Schneider, INRA Colmar)

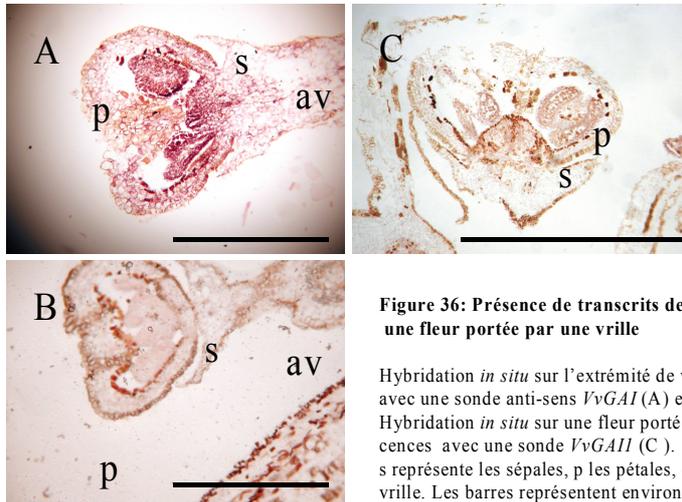
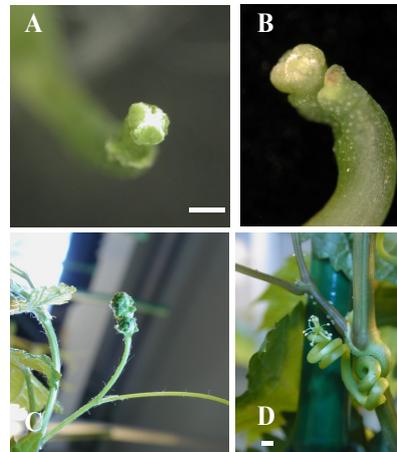


**Figure 34: Analyse de l'expression des gènes de floraison dans les feuilles, les inflorescences et les vrilles par RT PCR**

Les RT PCR ont été réalisées à partir d'ARN totaux extraits de feuilles, et d'inflorescences (stade de développement G/H) et de vrilles. Des transcrits de *VvLEAFY* sont détectés dans les inflorescences et faiblement dans les vrilles. Des transcrits de *VvTFL1* sont détectés dans les feuilles et les inflorescences. Des transcrits de *VvSEP3* et *VvAG* sont amplifiés dans les trois types d'organes. La présence d'ARN total pour chaque échantillon a été vérifiée par amplification des ARN ribosomiques 18S.

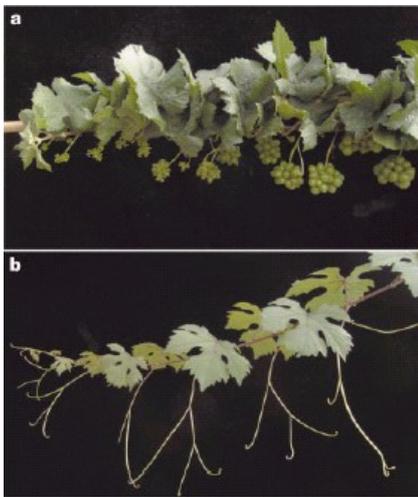
**Figure 35: Photographies de vrille**

Fleur unique portée par l'extrémité des vrilles (A et B). Inflorescences portées par des vrilles (C et D). Les barres représentent 1mm.



**Figure 36: Présence de transcrits de *VvGAI* dans une fleur portée par une vrille**

Hybridation *in situ* sur l'extrémité de vrille de Riesling avec une sonde anti-sens *VvGAI* (A) et sans sonde (B). Hybridation *in situ* sur une fleur portée par une inflorescence avec une sonde *VvGAI* (C). s représente les sépales, p les pétales, et av l'axe de la vrille. Les barres représentent environ 1 mm.

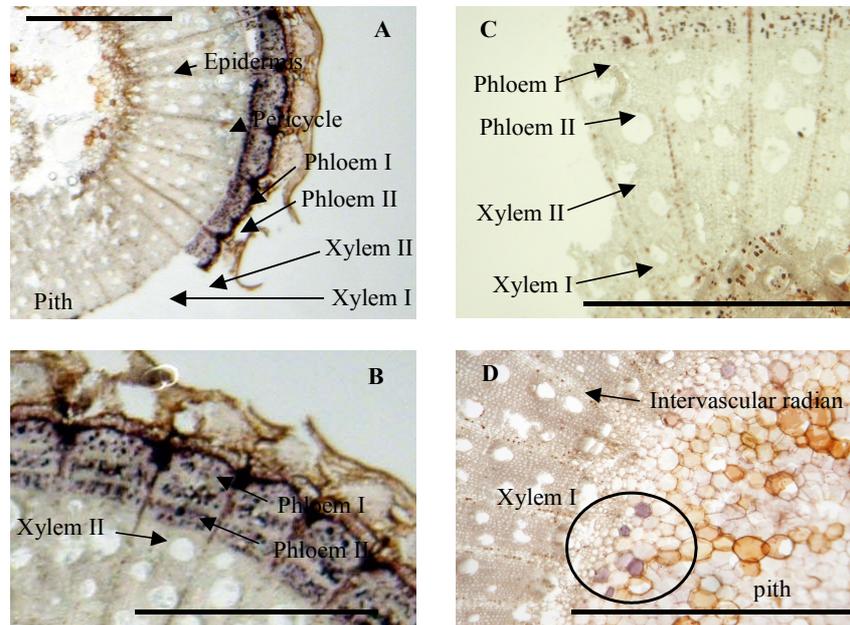


**Figure 37: Mutant *VvGAI1***

a: Plante régénérée à partir de de cellules de la couche cellulaire L1 du Pinot Meunier. Le génome des cellules de la couche cellulaire L1 présente une mutation dans la séquence du gène *VvGAI1*. Toutes les vrilles sont remplacées par des inflorescences

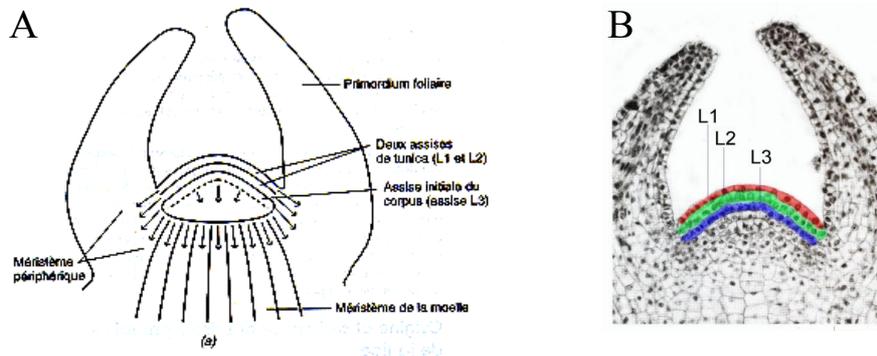
b: Plante régénérée à partir de cellules de la couche cellulaire L2 du Pinot Meunier. La plante présente un phénotype ressemblant au Pinot Noir.

(source Boss and Thomas, 2002)



**Figure 38: Expression de *VvLEAFY* dans les bois de vigne**

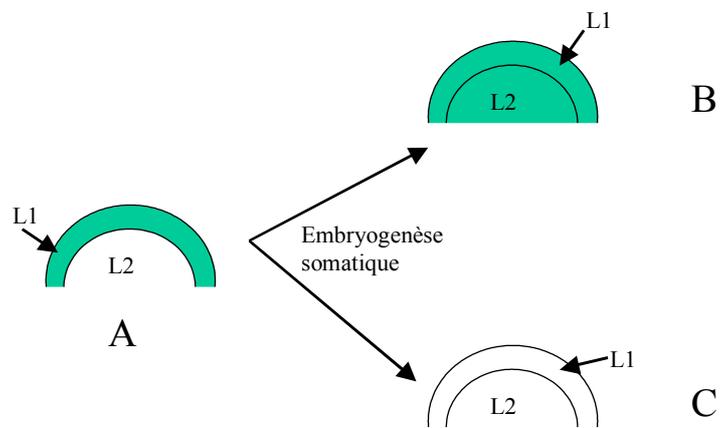
Hybridation *in situ* sur des bois de vigne au moment de la floraison (A, B et C) et en hiver (D), avec une sonde anti-sens *VvLEAFY* (A, B et D) et sans sonde (C). Des transcrits *VvLEAFY* (coloration violette) sont retrouvés dans le phloème au moment de la floraison (A et B) et dans certaines cellules de la moelle dans les bois d'hiver (D). Les barres représentent environ 5 mm.



**Figure 39: Organisation du méristème**

A: schéma représentant l'organisation des couches cellulaires L1, L2 et L3 d'un méristème.  
B: Visualisation des couches cellulaires L1, L2 et L3 sur une photo de méristème

(source Raven, 2000)



**Figure 40: Embryogenèse somatique chez le Pinot Meunier**

A: représentation du méristème chimérique Pinot Meunier

B et C: méristèmes des plantes régénérées par embryogenèse somatique à partir de Pinot Meunier. Plante obtenue à partir de la couche L1 (B) et L2 (C) du Pinot Meunier. Les plantes C présente un phénotype ressemblant au Pinot Noir (dont dérive le Pinot Meunier) et les plantes B le phénotype *Vvga1* (voir Fig. 37).

# Génétique moléculaire de la floraison de la vigne

## Résumé

La maîtrise des rendements de la vigne est un élément important pour la viticulture. Une diminution du rendement permettrait de faire face à la surproduction mondiale de vin, tout en augmentant la qualité de la vendange et des vins.

L'élaboration du rendement de la vigne se fonde avant tout sur le nombre d'inflorescences (fertilité) et le nombre de fleurs produits par la plante. L'ensemble des étapes conduisant à la floraison a fait l'objet de nombreuses recherches depuis plus d'un siècle, mais les « clés » moléculaires de la floraison de la vigne étaient encore inconnues en 2001. Par contre, nombre de gènes impliqués dans le développement floral d'*Arabidopsis thaliana*, notamment le gène *AtLEAFY*, acteur majeur, ont été caractérisés au cours des quinze dernières années, ouvrant ainsi un champ de recherche nouveau sur la biologie du développement des plantes, et notamment sur l'initiation florale.

En s'appuyant sur ces connaissances, nous avons pu cloner le gène *VvLEAFY*. L'analyse de l'expression de *VvLEAFY*, ainsi que celle d'autres gènes de floraison *VvTFL1*, *VvAPI*, *VvSEP3* et *VvAG* nous a permis d'obtenir les premiers éléments moléculaires du développement floral de la vigne.

A partir d'une collection de clones de Riesling de fertilité différente, une étude a été réalisée pour permettre d'établir si le caractère « fertilité » pouvait être exprimé par le niveau d'expression des gènes *VvLEAFY* ou *VvTFL1*. Un clone de fertilité forte et un de fertilité faible ont été étudiés. L'analyse par RT PCR quantitative a montré que les taux de transcrits de *VvTFL1* et *VvLEAFY* étaient différents entre les deux clones. L'ensemble de nos résultats suggère que le niveau de transcrits de *VvLEAFY* et *VvTFL1*, et le nombre d'inflorescences et de fleurs sont associés.

Nos travaux montrent qu'une analyse d'expression de gènes permet d'expliquer les différences de phénotype, pour la fertilité. L'ensemble de ces approches suggère que la variabilité inter-clonale, apparue à l'issue de la multiplication végétative, est le résultat d'évolutions génétiques. Une des perspectives de poursuite de ce travail serait de trouver les causes de cette variation d'expression. Par ailleurs, une application technique de ces résultats pourrait être de développer un outil de caractérisation du rendement des clones (fertilité et nombre de baies par grappe) au niveau moléculaire, ce qui faciliterait la sélection clonale pour le rendement chez d'autres cépages.

**Mots clés :** Vigne, fertilité, gènes de floraison, variabilité inter-clonale

# Molecular genetics of grapevine flowering

## Abstract

The control of grapevine yield is a major element for viticulture. A decrease of yield would resolve the world wine overproduction, while increasing the quality of the harvest and the wines.

The making of grapevine yield is primarily based on the number of inflorescences (bud fertility) and on the flower number produced by the vine. The whole stages leading to flowering was the subject of many researches since more than one century, but the molecular "keys" of grapevine flowering remained unknown until 2001. Many genes involved in the floral development of *Arabidopsis thaliana*, in particular the *AtLEAFY* gene, major actor, were characterized during last fifteen years, thus opening a new field of research on the developmental biology of the plants, and in particular on floral initiation.

Based on this knowledge, we could clone *VvLEAFY* gene. The expression analysis of *VvLEAFY*, and other flowering genes *VvTFL1*, *VvAPI*, *VvSEP3* and *VvAG* gave us the first molecular elements of the floral development in grapevine.

From a Riesling clones collection showing a different fertility, a study was carried out to verify if the character "fertility" could be expressed by the transcripts level of *VvLEAFY* or *VvTFL1* genes. A clone with strong fertility and one with weak fertility were studied. The analysis by quantitative RT PCR showed that the ratio of *VvTFL1* and *VvLEAFY* transcripts were different between the two clones. Our results suggest that the transcripts level of *VvLEAFY* and *VvTFL1* are associated to the numbers of inflorescences and flowers.

Our work shows that a gene expression analysis could explain the phenotype differences in for the fertility. These approaches suggest that inter-clonale variability, appeared during the vegetative multiplication as a result of genetic evolutions.

This work could be continued by the search of the origins of this expression variation. In addition, an application of these results could be to develop a tool for characterization of the clone yield (bud fertility and a number of berries per bunch) at the molecular level, which would facilitate the clonale selection for the yield.

**Keywords:** Grapevine, bud fertility, flowering genes, inter-clonale variability