

- Thèse présentée pour obtenir le grade de
- Docteur de l'Université Louis Pasteur
- Strasbourg I
-
-
- Discipline : Sciences du vivant
- Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par

Marilyne Oswald

Déterminisme génétique de la biosynthèse des terpénols aromatiques chez la vigne

Soutenue publiquement le 20 janvier 2006

Membres du Jury

M. Tilman Achstetter	Professeur à l'Université de Bremen	Rapporteur Externe
M. Ziya Günata	Professeur à l'Université de Montpellier II	Rapporteur Externe
M. Thomas Bach	Professeur à l'Université de Strasbourg I	Rapporteur Interne
M. Jean Masson	Chargé de recherche à l'INRA-Colmar	Examineur
M. Francis Karst	Professeur à l'Université de Strasbourg I	Directeur de Thèse

*C'est la pénicilline qui guérit les hommes, mais
c'est le bon vin qui les rend heureux.*

Alexander Fleming

Remerciements

Ce travail de recherche n'aurait pas pu aboutir sans la précieuse collaboration de toutes les personnes qui y ont participé : je tiens ici à les remercier.

En premier lieu, je remercie la Région Alsace ainsi que l'INRA d'avoir financé ce travail.

Je remercie particulièrement le Professeur Francis Karst de m'avoir accueillie dans son équipe et pour sa générosité à partager ses innombrables connaissances sur les stérols de levure. Je le remercie également de m'avoir laissé une grande liberté de manoeuvre quant au déroulement et à l'organisation de mes recherches.

J'adresse mes remerciements aux Professeurs Tomas Bach, Tilman Achstetter et Ziya Günata pour avoir eu l'amabilité d'accepter de juger ce travail.

Je remercie sincèrement le Docteur Jean Masson de m'avoir guidée dans les moments importants, pour son soutien, sa confiance et sa disponibilité.

Un immense merci aux membres de l'équipe CEnologie : Geneviève pour sa précieuse aide de tous les jours, Nicole et Patricia pour les rigoureuses analyses de terpénols, Jean-Luc pour avoir répondu patiemment à toutes mes questions, Anne, Marc et plus particulièrement Sophie pour son aide, son écoute attentive et sa sympathie.

Je remercie vivement les membres de l'équipe BDV pour leur gentillesse et leur générosité, Philippe Hugué pour sa collaboration et ses conseils scientifiques, Anne-Françoise Adam-Blondon pour son accueil au sein du Génopôle et Sylvaine de m'avoir initiée au monde des Western-blots.

Merci à Anne-Marie pour sa fidélité à résoudre tous mes problèmes administratifs mais surtout pour sa joie de vivre et son rire inoubliable.

J'adresse de sincères remerciements à l'ensemble de mes collègues et amis du centre INRA de Colmar que ce soit pour les conseils, les services et plus particulièrement pour l'amitié qu'ils m'ont témoignés.

Merci à la SNCF et aux copines de train pour m'avoir conduite tous les jours au labo dans la bonne humeur et plus particulièrement à Béatrice pour son écoute et ses conseils.

Merci à tous mes proches et mes amis pour leurs encouragements sans faille et plus particulièrement à mes Grands-parents, Anny, Anne-Lise et Alain, sans oublier mon compagnon, Aurélien, pour son écoute et sa patience de tous les jours. Un grand merci aux Incorruptibles, au Zouave et à la Girafe pour leur soutien incomparable.

Je ne saurais terminer ces remerciements sans une pensée émue à ma Maman qui m'a toujours poussée à dépasser mes limites.

Résumé

Chez *Vitis vinifera* le potentiel aromatique du raisin est en partie constitué par des monoterpénols comme le linalol et le géraniol qui contribuent au caractère variétal des cépages aromatiques comme le muscat et le gewurztraminer. Le rôle de ces composés dans la qualité et la typicité du vin a stimulé la conduite d'importantes recherches sur leur distribution au niveau des organes de la plante et l'évolution de leur quantité pendant la maturation des baies et la vinification. L'objectif de notre travail était de mettre en évidence les bases moléculaires de la spécificité des cépages aromatiques de vigne. Nous nous sommes basés sur l'hypothèse que la formation des monoterpénols était liée à une forte synthèse de géranyl diphosphate (GPP) et/ou à la métabolisation du GPP par des terpènes synthases (TPS). Ainsi, nous avons cloné les ADNc *vGPPS* et *vFPPS* codant une géranyl diphosphate synthase (*vGPPS*) potentielle et une farnésyl diphosphate synthase (*vFPPS*) de *Vitis vinifera* homologues à 90% et 88% aux séquences protéiques de la *GPPS* et de la *FPPS1* d'*Arabidopsis thaliana* respectivement. L'expression hétérologue des ces ADNc chez *Saccharomyces cerevisiae* nous a permis de montrer l'activité farnésyl diphosphate synthase de la protéine *vFPPS*. Par contre, l'activité enzymatique de *vGPPS* est extrêmement faible. Nous n'avons pas pu confirmer son produit final de réaction. Afin de poursuivre l'étude de l'influence des protéines *vGPPS* et *vFPPS* sur la biosynthèse des monoterpénols, nous avons entrepris de reconstituer chez la levure les dernières étapes de la voie de synthèse. Ainsi, nous avons exprimé conjointement chez la levure les ADNc *vGPPS* et *vFPPS* de vigne avec les gènes codant la géraniol synthase récemment isolée chez le basilic (*Ocimum basilicum*) et la linalol synthase de *Clarkia breweri* toutes deux caractérisées sur le plan biochimique. Nous avons pu observer chez la levure que la formation des monoterpénols est dépendante d'une activité terpène synthase et que le substrat GPP est un facteur limitant.

Les résultats obtenus chez la levure montrent l'intérêt d'une approche fonctionnelle prenant en compte différentes étapes de la biosynthèse des terpènes. Il est maintenant nécessaire de conduire cette approche chez la vigne afin de mettre en évidence les spécificités métaboliques des cépages aromatiques.

Mots clés : *Vitis vinifera*, monoterpénols, géranyl diphosphate synthase, farnésyl diphosphate synthase, géraniol synthase, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

The floral character of aromatic varieties of *Vitis vinifera* is partly linked to the presence in the berry skin of monoterpenic alcohols such as geraniol and linalool found in large amounts. Non aromatic grapevine varieties, in contrast, exhibit much lower terpenoid concentrations. Combining genetic, biochemical and molecular approaches, we tried to decipher the metabolic pathway which leads to monoterpenic alcohols synthesis in aromatic grapevine varieties. It is commonly admitted that monoterpenoids arise from geranyl diphosphate (GPP). So we hypothesized that the high yield of monoterpenoids synthesized in aromatic plants requires either an excess of GPP synthesis and/or a specific metabolization of GPP by terpene synthases (TPS). We isolated *vGPPS* and *vFPPS* cDNAs encoding putative geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase from *Vitis vinifera* gewurztraminer, muscat and savagnin rose varieties. Both *vGPPS* and *vFPPS* from grapevine share 90% and 88% homology with the corresponding enzymes from *Arabidopsis thaliana*. A functional analysis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using adapted mutants strains led us to demonstrate the farnesyl diphosphate activity of *vFPPS*. In contrast, this approach failed to reveal the end product of *vGPPS*. To determine the effect of *vGPPS* and *vFPPS* on the terpenoid biosynthesis pathway, we expressed in yeast these two cDNAs in combination with the *Ocimum basilicum* geraniol synthase and the *Clarkia breweri* linalool synthase. Under these experimental conditions, we showed that GPP amount is an important factor of the pathway together with terpene synthases which are the basic actors.

Altogether, our data suggest that the functional analysis approach in yeast was an adequate system to help us for deciphering the first basic steps of the grapevine terpenoid biosynthesis pathway. This approach must now be conducted in grape to clarify differences between aromatic and non aromatic grapevine genotypes.

Keywords: *Vitis vinifera*, monoterpenoid, geranyl diphosphate synthase, farnesyl diphosphate synthase, geraniol synthase, *Saccharomyces cerevisiae*

Abréviations

5-FO	Acide 5-Fluoro-orotique
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
BAC	Bacterial artificial chromosome
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Bovin serum albumin
Da	Dalton
DMAPP	Diméthylallyl diphosphate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxynucléoside triphosphate
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EST	Expressed sequence tags
FARM	First aspartate rich motif
FPP	Farnésyl diphosphate
FPPS	Farnésyl diphosphate synthase
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse
GES	Géranol synthase
GFP	Green fluorescent protein
GGPP	Géranylgéranyl diphosphate
GGPPS	Géranylgéranyl diphosphate synthase
GPP	Géranyl diphosphate
GPPS	Géranyl diphosphate synthase
GPPS-LSU	Grande sous-unité de la GPPS de menthe
GPPS-SSU	Petite sous-unité de la GPPS de menthe
HMG-CoA	3-hydroxyméthyl-glutaryl-CoA
IPP	Isopentényl diphosphate
IPTG	Isopropyl b D-thiogalactoside
kb	Kilo paire de bases
kDa	Kilo Dalton
LIS	Linalol synthase
MEP	2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate

min	Minute
MT	Marqueur de taille
MVA	Mévalonate
nd	Non détecté
pb	Paires de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyéthylène glycol
PMA1	Plasma membrane ATPase
PS	Poids sec
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SARM	Second aspartate rich motif
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Gel de polyacrylamide dénaturant
SNP	Single nucleotide polymorphism
TAE	Tris acétate EDTA
TIGR	The Institut for Genomic Research
TPS	Terpène synthase
TRP1	Marqueur de transformation de la levure codant pour une enzyme de la voie de synthèse du tryptophane
URA3	Marqueur de transformation de la levure codant pour une enzyme de la voie de synthèse de l'uracile
UV	Ultraviolet
vFPPS	Farnésyl diphosphate synthase de <i>Vitis vinifera</i>
vFPPS-C	Nom de la protéine codée par l'ADNc <i>vFPPS1-2</i>
vFPPS-F	Nom de la protéine codée par l'ADNc <i>vFPPS1-1</i>
vGPPS	Géranyl diphosphate synthase de <i>Vitis vinifera</i>
vLIS	Linalol synthase potentielle de <i>Vitis vinifera</i>
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside

Les noms des gènes ou des ADNc sont en italique.

Les noms des protéines sont en majuscules et écriture droite.

Sommaire

Introduction	1
1 La vigne, le vin et ses arômes	1
1.1 La vigne	1
1.1.1 Un peu d'histoire	1
1.1.2 Famille des vitacées	2
1.1.3 Notion de cépage	3
1.2 Le vin naît du raisin	5
1.2.1 Le vin	5
1.2.2 Le raisin	6
1.3 Le potentiel aromatique du raisin	9
1.3.1 Notions générales sur l'arôme variétal	9
1.3.2 Les composés terpéniques et leur rôle dans l'arôme muscaté	10
2 Présentation du travail	12
3 Biosynthèse des terpènes chez les plantes	15
3.1 Classification des composés terpéniques	15
3.1.1 Les monoterpènes	16
3.1.2 Les sesquiterpènes	17
3.1.3 Les diterpènes	17
3.2 Biosynthèse de l'isopentényl diphosphate	18
3.2.1 La voie du mévalonate	18
3.2.2 La voie du MEP	19
3.2.3 La compartimentation de la synthèse des isoprénoïdes	21
3.3 De l'IPP aux molécules terpéniques	22
3.3.1 Les prényltransférases	43
3.3.1.1 <i>La géranyl diphosphate synthase</i>	22
3.3.1.2 <i>La farnésyl diphosphate synthase</i>	24
3.3.1.3 <i>La géranylgéranyl diphosphate synthase</i>	25

3.3.2	Les terpènes synthases	27
3.3.3	La géraniol synthase (GES)	30
3.3.4	La linalol synthase (LIS)	31
Matériels & Méthodes		34
1	Matériels	34
1.1	Matériel végétal	34
1.1.1	Prélèvement de feuilles et de baies au vignoble	34
1.1.2	Prélèvement de racines sur bouture fructifère	34
1.2	Souches bactériennes d'<i>Escherichia coli</i>	35
1.3	Levures	36
1.4	Plasmides et vecteurs d'expression	38
1.4.1	Vecteur de réplication chez <i>E. coli</i> : pGEM®-T Easy (Promega)	38
1.4.2	Vecteur d'expression chez <i>E. coli</i> : pQE-30 (Qiagen)	38
1.4.3	Vecteurs d'expression chez la levure	39
1.4.4	Plasmides construits au cours de ce travail	43
2	Méthodes	44
2.1	Méthodes de biologie moléculaire	44
2.1.1	Extraction d'acides nucléiques	44
2.1.1.1	<i>Extraction d'ADN génomique de vigne</i>	44
2.1.1.2	<i>Extraction d'ADN plasmidique bactérien</i>	44
2.1.1.3	<i>Extraction d'ADN plasmidique de levure</i>	44
2.1.1.4	<i>Extraction des ARN totaux de tissus végétaux</i>	45
2.1.1.5	<i>Extraction des ARN totaux de baies de raisin</i>	45
2.1.2	PCR et méthodes dérivées	47
2.1.2.1	<i>PCR classique</i>	47
2.1.2.2	<i>Transcription reverse d'ARN en ADNc</i>	47
2.1.2.3	<i>Sélection de clones recombinants par PCR</i>	48
2.1.2.4	<i>Elaboration de la RT-PCR semi-quantitative</i>	48
2.1.3	Purification de fragments d'ADN	49
2.1.3.1	<i>Purification d'ADN à partir d'un gel d'agarose</i>	49
2.1.3.2	<i>Purification de fragments d'ADN obtenu par PCR</i>	49

2.1.3.3	<i>Méthode générale de purification de fragments d'ADN</i>	49
2.1.4	Analyse d'acides nucléiques	50
2.1.4.1	<i>Digestion par des endonucléases de restriction</i>	50
2.1.4.2	<i>Analyse des acides nucléiques par électrophorèse</i>	50
2.1.4.3	<i>Séquençage et analyse des séquences</i>	50
2.1.5	Clonage d'ADNc amplifiés	51
2.1.5.1	<i>Clonage dans le vecteur pGEM-T easy</i>	51
2.1.5.2	<i>Clonage par digestion / ligature</i>	51
2.1.5.3	<i>Recombinaison homologue chez la levure</i>	52
2.2	Méthodes microbiologiques	53
2.2.1	Conditions de culture	53
2.2.1.1	<i>Levures</i>	53
2.2.1.2	<i>Bactéries</i>	54
2.2.2	Mesure de la croissance cellulaire	55
2.2.2.1	<i>En milieu liquide</i>	55
2.2.2.2	<i>En milieu solide</i>	55
2.2.3	Analyse génétique chez la levure	55
2.2.3.1	<i>Détermination du signe sexuel</i>	55
2.2.3.2	<i>Isolement de souches diploïdes</i>	56
2.2.3.3	<i>Isolement de souches haploïdes</i>	56
2.2.3.4	<i>Analyse en masse de spores</i>	56
2.2.4	Techniques de transformation	57
2.2.4.1	<i>Transformation d'Escherichia coli par choc thermique</i>	57
2.2.4.2	<i>Transformation de Saccharomyces cerevisiae à l'acétate de lithium</i>	58
2.3	Méthodes biochimiques	59
2.3.1	Analyse des terpénols synthétisés par <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
2.3.1.1	<i>Cultures des levures</i>	59
2.3.1.2	<i>Extraction des terpénols du milieu de culture</i>	59
2.3.1.3	<i>Identification et quantification des terpénols par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)</i>	60
2.3.1.4	<i>Evaluation de la répétabilité et du rendement d'extraction de la méthode d'analyse</i>	60
2.3.2	Analyse des stérols chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
2.3.2.1	<i>Préparation des cellules</i>	61
2.3.2.2	<i>Extraction des stérols</i>	61
2.3.2.3	<i>Analyse par spectrométrie</i>	61
2.3.2.4	<i>Analyse par chromatographie en phase gazeuse</i>	62

2.3.3	Analyse de protéines _____	63
2.3.3.1	Extraction des protéines de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> _____	63
2.3.3.2	Dosage des protéines (méthode de Bradford, 1976) _____	63
2.3.3.3	Séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes _____	63
2.3.3.4	Coloration au bleu de Coomassie _____	64
2.3.3.5	Western Blot : immunodétection _____	64
2.3.4	Mesure des activités GPPS et FPPS in vitro _____	65
2.4	Observation de colonies de levures fluorescentes sous éclairage UV _____	66
2.5	Localisation subcellulaire dans la levure de protéines fusionnées à la GFP par microscopie confocale _____	66
Partie I _____		67
Isolement et caractérisation de gènes impliqués dans la biosynthèse des monoterpénols chez <i>Vitis vinifera</i> _____		67
1 Etude d'un gène codant une potentielle géranyl diphosphate synthase de <i>V. vinifera</i> _____		68
1.1	Isolement de l'ADNc d'une GPPS <i>Arabidopsis thaliana</i> -like _____	68
1.1.1	Analyse des séquences existantes et détermination d'amorces dégénérées _____	68
1.1.2	Clonage d'un fragment de 603 nucléotides à partir d'ADN génomique de gewurztraminer _____	73
1.1.3	Clonage d'un ADNc complet _____	73
1.2	Comparaison des séquences de plusieurs cépages _____	76
1.3	Criblage d'une banque BAC d'ADN génomique de cabernet sauvignon _____	77
1.4	Etude de l'expression du gène chez la plante _____	79
2 Etude d'un gène codant une farnésyl diphosphate synthase de <i>V. vinifera</i> _____		80
2.1	Clonage des ADNc codant une farnésyl diphosphate synthase de différents cépages de <i>V. vinifera</i> _____	80
2.2	Deux copies du gène <i>vFPPS</i> _____	82

2.3	Une expression spatiale homogène du gène <i>vFPPS</i>	82
3	Recherche d'un gène codant une terpène synthase chez <i>V. vinifera</i>	84
3.1	Aucune amplification de la <i>S</i> -linalol synthase de muscat de Frontignan	84
3.2	Essai de clonage d'une monoterpène synthase par criblage de la banque BAC d'ADN génomique.	86
3.2.1	Analyse des EST de <i>V. vinifera</i> de la base de données de l'Institut for Genomic Research (TIGR)	86
3.2.2	Criblage de la banque BAC	88
4	Expression des protéines recombinantes <i>vGPPS</i> et <i>vFPPS</i> chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	89
4.1	Construction de souches exprimant <i>vGPPS</i> et <i>vFPPS</i> en fusion avec la GFP	89
4.2	Recherche de phénotypes liés à l'expression de <i>vGPPS</i>	91
4.2.1	Détection de la protéine <i>vGPPS</i> dans les souches transformées	91
4.2.2	Dosage des Δ -5,7stérols dans les souches transformées ainsi que des monoterpénols excrétés	92
4.2.3	Test de la complémentation fonctionnelle de l'activité farnésyl diphosphate synthase par <i>vGPPS</i>	93
4.3	Confirmation <i>in vivo</i> de l'activité farnésyl diphosphate synthase de <i>vFPPS</i>	94
4.3.1	Complémentation fonctionnelle chez la levure de l'activité farnésyl diphosphate synthase par <i>vFPPS</i>	94
4.3.2	Teneur en Δ -5,7stérols et en terpénols de souches complémentées par <i>vFPPS</i> -F et <i>vFPPS</i> -C	95
4.4	Activité enzymatique <i>in vitro</i> de <i>vGPPS</i> et <i>vFPPS</i>	96
4.4.1	Une activité spécifique très faible pour <i>vGPPS</i>	97
4.4.2	Des activités spécifiques différentes entre <i>vFPPS</i> -F et <i>vFPPS</i> -C	98
5	Discussion	99

Partie II	102
Etude de la synthèse des monoterpénols : utilisation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comme modèle	102
1 Analyse des phénotypes liés à l'expression de la LIS de <i>Clarkia breweri</i> et de la GES d'<i>Ocimum basilicum</i> chez des souches sauvages de levure	103
1.1 Construction des souches et mise en évidence des protéines	103
1.2 Dosage des monoterpénols excrétés par les souches transformées	105
1.3 Effet de la GES sur la voie de biosynthèse des stérols	107
2 Expression de la GES chez des levures affectées dans la farnésyl diphosphate synthase	109
3 Etude de <i>vGPPS</i> et <i>vFPPS</i> par leur expression combinée à celle de la GES chez la levure	111
3.1 Construction des souches et mise en évidence des protéines	111
3.2 Effet de l'expression combinée des ADNc <i>vGPPS</i> et <i>GES</i> sur la souche 5247	112
3.3 Analyse de la synthèse de géraniol par les souches coexprimant les ADNc <i>vFPPS</i> et <i>GES</i>	112
4 Discussion	114
Conclusion et perspectives	117
Bibliographie	119

Introduction

Depuis l'origine, la vigne et le vin ont marqué de leur empreinte la géographie et l'économie, l'archéologie et l'histoire, les mythologies et les religions, les arts et les traditions, le droit et la médecine, les paysages et les architectures, mais aussi les habitudes alimentaires et le commerce, la sociologie et la psychologie, contribuant, au fil du temps, à élaborer un type de société et un art de vivre.

1 La vigne, le vin et ses arômes

1.1 La vigne

1.1.1 Un peu d'histoire

La transformation graduelle de la vigne sauvage en vigne cultivée s'est probablement réalisée à partir du septième millénaire avant l'ère chrétienne. Domestiquée par les peuples d'Asie occidentale, la culture de la vigne s'épanouit pleinement sur les rives de la mer Méditerranée. Au début du III^e millénaire avant Jésus-Christ, les Egyptiens cultivaient la vigne et les Chinois connaissaient l'art de faire du vin. Les Grecs, environ un millénaire avant le début de notre ère, furent les premiers viticulteurs européens. Ils acquirent la connaissance du vin de l'Orient et d'Égypte.

Les Romains, quelques siècles plus tard, contribuèrent également à l'expansion de la viticulture. La culture de la vigne suivait en effet les légionnaires au cours de leurs conquêtes guerrières. C'est ainsi que la culture de la vigne connut une extension systématique à travers la Gaule. La Gaule romaine allait se couvrir de vignobles du Nord au Sud, de l'Est à l'Ouest, faisant de la carte des vins, notre carte nationale d'identité. La vigne se répand au I^{er} siècle dans la vallée du Rhône, apparaît au II^e siècle en Bourgogne et dans le Bordelais, pour atteindre la Vallée de la Loire au III^e siècle, la Champagne et la vallée de la Moselle au IV^e

siècle, puis, Rome se christianisant, la vigne s'implantera jusqu'aux frontières septentrionales de l'empire (les limes). Le christianisme a été le propagateur de la vigne et le propagandiste du vin en France. Jusqu'à la fin du Moyen Age, la viticulture ecclésiastique nourrira la puissance et la gloire de l'Église romaine.

Après la découverte officielle de l'Amérique le 12 octobre 1492 par le célèbre navigateur d'origine italienne Christophe Colomb, la civilisation européenne du vin part à la conquête d'un monde nouveau. Produits et appréciés en Amérique du Nord et du Sud, la vigne et le vin gagnent progressivement de nouveaux territoires : Afrique du Sud, Australie, Nouvelle-Zélande, bordure nord-ouest du Pacifique...(Johnson 2002, Christin & Junod 2004).

La vigne couvre désormais près de huit millions d'hectares dans le monde. Actuellement, la superficie du vignoble français est en deuxième position (à égalité avec l'Italie) derrière l'Espagne. La France est, avec l'Italie, le plus gros producteur de vin du monde (Onivins).

1.1.2 Famille des vitacées

La vigne appartient à la famille des Vitacées, également appelée Ampélidacées, qui comprend un millier d'espèces. Les plantes de cette famille sont des lianes et des arbustes à tiges herbacées ou sarmenteuses possédant des vrilles opposées aux feuilles.

Cette famille comprend quatorze genres, dont le genre *Parthenocissus* auquel appartiennent les vignes vierges originaires d'Asie et d'Amérique du Nord et le genre *Vitis* originaire des zones tempérées de l'hémisphère nord. Quoique d'autres genres, tel l'*Ampelocissus*, soient capables de produire des raisins, toutes les vignes à raisins de table ou de cuve appartiennent au genre *Vitis*. Environ 40 espèces sont dénombrées dans ce genre dont seules quelques espèces s'avèrent capables de produire un jus agréable et une seule -*Vitis vinifera*- donne tous les meilleurs vins du monde. Cependant, il faut signaler que :

- *Vitis labrusca* est cultivée pour le raisin de cuve en Amérique du nord mais le vin qui en résulte possède un caractère organoleptique très particulier, appelé « foxé », et peu apprécié.
- quelques espèces asiatiques cultivées en Chine, en Corée et au Japon, sont capables de produire un vin buvable. Lorsque le bon vin manqua au plus fort de la crise phylloxérique, le Japon exporta du vin issu de *Vitis coignetiae*.
- *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, et *Vitis berlandieri*, toutes trois d'origine américaine, sont très importantes pour la viticulture car elles s'avèrent les plus résistantes au phylloxéra et pour cette raison servent de porte-greffe au *Vitis vinifera*. De même, des hybrides issus du *Vitis candicans* -originaire des marais du Mississippi- sont parfois choisis comme porte-greffe en raison de leur résistance dans les sols à teneur saline excessive.

A l'intérieur de chaque espèce, il existe des variétés différentes ou cépages. Chaque variété de vigne possède ses propres caractéristiques qui contribuent à la typicité du vin (Reynier 1991, Huglin & Schneider 1998).

1.1.3 Notion de cépage

Comme pour de nombreux végétaux, il n'existe pas qu'une seule variété de vigne mais des milliers. Depuis le début de la civilisation, l'effort numéro un des viticulteurs consiste à maîtriser ou à favoriser les croisements, en cherchant à obtenir des variétés présentant un certain nombre de propriétés considérées comme souhaitables. De nos jours, la recherche de nouvelles variétés, tâche complexe, est effectuée par des laboratoires spécialisés. La reproduction des variétés sélectionnées est prise en charge par des pépiniéristes. Le monde viticole emploie préférentiellement le terme de cépage à celui de variété. Le cépage correspond également à la notion de cultivar. C'est en effet l'ensemble des individus qui ont en commun des caractères morphologiques et technologiques amenant les viticulteurs à les désigner sous le même nom. Afin d'obtenir des cépages identiques à eux-mêmes, la seule voie de reproduction est la multiplication végétative : bouturage, marcottage ou greffage.

La multiplication par semis ou multiplication sexuée ne permet pas de conserver les caractères de la plante (Reynier 1991).

Depuis l'arrivée du phylloxéra (insecte détruisant les racines) en Europe au XIX^{ème} siècle, les plants de vigne sont essentiellement obtenus par greffage, système de multiplication qui consiste à fixer un greffon sur un porte-greffe. La plantation de vignes greffées a permis de reconstituer le vignoble. Une autre voie de reconstitution avait été empruntée en plantant parallèlement des hybrides producteurs directs, résistants. Cette seconde voie est maintenant abandonnée en France. Le greffon, partie supérieure du cep de vigne, est une portion de sarment destinée à produire les feuilles et les fruits, tandis que le porte-greffe ou partie inférieure, produit le système racinaire et sert de support. Les variétés américaines, très résistantes au phylloxéra, sont utilisées comme porte-greffe et les variétés européennes comme greffon. Cette technique a permis d'associer la qualité des cépages français et la résistance des vignes américaines au parasite.

L'identification des cépages est basée sur l'observation de caractères morphologiques comme la couleur des bourgeons ou des baies, la forme des feuilles ou des rameaux, la dimension des grappes. L'ampélographie distingue ainsi quelques 5 000 cépages de manière certaine et admet la difficulté d'identifier et de classer une infinité de sous variétés obtenues au hasard d'évolutions locales ou au gré de sélections de plus en plus fines dans les laboratoires.

Selon certaines estimations, le nombre de variétés de vigne cultivées dans le monde se situerait entre 7 000 et 10 000 (Huglin & Schneider 1998). Les cépages de *Vitis vinifera* en constituent la très grande majorité, le reste comprenant des variétés d'autres espèces. En France, on dénombre une cinquantaine de cépages couramment utilisés pour produire du raisin de cuve. Les plus plantés sont :

- *en rouges* : merlot, grenache, cabernet-sauvignon, syrah, carignan, gamay, cabernet franc, pinot noir
- *en blancs* : ugni blanc, chardonnay, sauvignon, semillon, melon, chenin, colombard, riesling

Mais s'il n'est pas tout, le choix du cépage reste une étape décisive lors de l'implantation d'un vignoble. En effet, les bons cépages ne fournissent de bon vin que sur des terroirs adéquats et ne donnent le meilleur d'eux-mêmes que sur leurs terroirs de prédilection (INRA 2004). Par ailleurs, les vignerons ont constaté que chaque cépage acquiert son caractère le plus fin à la limite septentrionale de sa culture. Car si le raisin doit mûrir convenablement, la maturation doit être assez lente pour que les arômes synthétisés ne soient pas brûlés par un excès de chaleur.

1.2 Le vin naît du raisin

1.2.1 Le vin

Selon la législation de l'Union Européenne, le vin est « le produit obtenu exclusivement par la fermentation alcoolique, totale ou partielle, de raisins frais foulés ou non, ou de moûts de raisin ».

La consommation de vin est aussi vieille que l'humanité. En effet, si l'on ignore l'époque où le vin a été découvert, des traces en sont retrouvées dans toutes les civilisations d'Europe et d'Asie. Le vin fut pendant longtemps considéré comme un présent de Dieu. Les Egyptiens avaient Osiris comme Dieu du vin, les Grecs Dionysos et les Romains Bacchus. La religion chrétienne attribuait le vin au sang du Christ (Johnson 2002).

Il a fallu attendre le XIXe siècle pour que les mécanismes de la fermentation soient expliqués autrement que par la volonté de Dieu. Napoléon III demanda à Louis Pasteur de faire des études sur le vin car il s'inquiétait des dommages causés aux vins par les altérations nombreuses qu'ils subissaient alors (Christin & Junod 2004). Pasteur perça le mystère de la fermentation alcoolique. Il se pencha également sur le problème des maladies du vin et leur résolution. C'est avec l'exposition de ses travaux en 1865 à Compiègne que l'œnologie prit naissance.

La fabrication du vin est devenue aujourd'hui une véritable science, mêlant physique, chimie et biologie. Les vignerons travaillent avec les conseils d'œnologues diplômés. La composition chimique et les mécanismes de formation du vin, qui sont très complexes, ne sont aujourd'hui pas encore totalement élucidés. Grâce aux méthodes modernes de l'analyse chimique et biochimique, les chercheurs découvrent sans cesse de nouveaux composés dans le vin. Toutefois, le produit de la vigne est encore loin d'avoir délivré tous ses secrets. Il en résulte que le vin doit être jugé dans le verre et non dans l'éprouvette. Chaque vin est différent et a un bouquet qui lui est propre. La seule façon pour le connaître est bien évidemment de le goûter.

Le goût du vin est influencé par le cépage, le terrain sur lequel pousse la vigne, les conditions climatiques, la façon de vinifier, le genre de micro-organismes utilisés, la durée et la température du vieillissement. Mais en premier lieu, la qualité du vin est liée à la composition du raisin (INRA 2004).

1.2.2 Le raisin

Le raisin est le fruit de la vigne. C'est une baie classée dans le groupe des fruits charnus à pépins. Les baies de raisin sont regroupées en grappes plus ou moins importantes selon les variétés. Les grains de raisin sont plus ou moins arrondis, et possèdent à maturité une couleur verte à jaune pour le raisin blanc, et rouge à noir prumineux pour le raisin rouge. Le raisin se consomme depuis l'antiquité, frais cru en grappe, en jus, dans des pâtisseries, légèrement cuit en garniture de plats ou cuit en confitures. Il se conserve très bien sec. Il est possible d'extraire de l'huile de ses pépins. Son utilisation la plus importante économiquement est la confection de vins et d'alcools.

La baie, qui contient un à deux pépins, se compose d'un épicarpe, la peau ou la pellicule, d'un mésocarpe juteux et charnu, la pulpe, et d'un endocarpe, tissu qui tapisse les loges contenant les pépins, mais qui ne se distingue pas du reste de la pulpe (Figure 1) (Reynier 1991, Christin & Junod 2004).

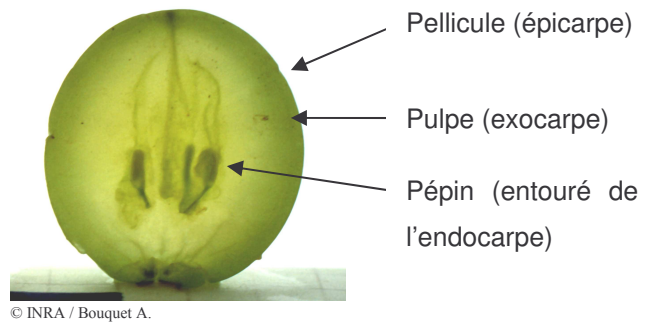


Figure 1 : Coupe transversale d'une baie de raisin.

- La pellicule

La pellicule, encore appelée enveloppe, assure l'imperméabilité et retient les levures apportées par le vent et les insectes. Elle est recouverte d'une matière cireuse appelée "la pruine" qui donne un aspect velouté au raisin.

La pellicule se caractérise surtout par les quantités importantes de produits du métabolisme secondaire, d'importance œnologique majeure, qu'elle accumule au cours de la maturation :

Les matières colorantes

Anthocyanes (responsables de la couleur des vins rouges)

Flavones (pour les vins blancs)

Tanins

Les substances aromatiques

Ces substances volatiles constituent l'arôme des raisins et sont constantes pour chaque cépage, mais d'intensité variable suivant l'année, le sol et le degré de maturité du vin.

- La pulpe

La pulpe, représente, en poids, la plus grande partie de la baie. A sa maturité, elle constitue 75 à 85 % du grain entier. Le contenu vacuolaire de ses cellules fournira le moût de raisin, qui compose la quasi totalité du poids de la pulpe. Elle est constituée de :

Eau 70 à 80 %

Sucres 100 à 300 g/litre

Acides organiques

Sels minéraux

Substances azotées

Composés aromatiques et phénoliques

- Les pépins

Les pépins se caractérisent par la présence d'un embryon capable de régénérer une plante. Ils contiennent essentiellement des tanins et des huiles non recherchés pour l'élaboration du vin.

A la surface de la baie du raisin, une microflore variée de champignons, de levures et de bactéries se développe. Son rôle est essentiel pour l'élaboration du vin et de ses caractéristiques sensorielles.

Le raisin est la matière première servant à l'élaboration des vins. Ses caractéristiques sont déterminantes pour la qualité finale des produits. La composition chimique de la baie du raisin évolue tout au long de sa maturation ; chaque composé a une évolution particulière. Le développement des baies commence à la pollinisation et se poursuit jusqu'à l'état de maturité et éventuellement de surmaturité si la récolte est retardée (Ribéreau-Gayon et al. 1998a). Trois phases se distinguent au cours du développement du raisin :

- Une première phase de croissance rapide ou *période herbacée*, dont la durée varie de 45 à 65 jours, durant laquelle la baie, verte et dure, grossit et se comporte comme un organe chlorophyllien en croissance.
- Une *période de maturation* durant laquelle la baie change de couleur, grossit encore et se comporte comme un organe de transformation et de stockage. Cette évolution débute par une *phase brutale de transition*, la véraison, de courte durée (8 à 15 jours) et continue par une *phase de maturation* progressive jusqu'à l'état de maturité. En plus du changement de sa coloration de vert à rouge ou blanc, pendant cette période de 35 à 55 jours, le grain de raisin se ramollit et sa composition chimique change. L'acidité diminue alors que les teneurs en sucres, composés phénoliques (tanins et matière colorante) et composés aromatiques augmentent.
- Une *période de surmaturation* durant laquelle le raisin flétrit et se concentre, sa composition chimique continue d'évoluer. Il peut également subir des modifications dues au développement de la pourriture noble (*Botrytis cinerea*).

Cependant, le phénomène de maturation est soumis à de nombreux facteurs de variations (nature du cépage, alimentation en eau, microclimat de la grappe, état sanitaire de la vigne...)

qui influencent de manière importante la composition des baies, notamment des composés aromatiques.

1.3 Le potentiel aromatique du raisin

Dans le raisin ou le vin, il existe plusieurs centaines de composés volatils qui ont un impact olfactif important et participent à l'arôme. Leurs teneurs varient de plusieurs milligrammes par litre à quelques nanogrammes par litre et leurs seuils de perception olfactive sont aussi extrêmement divers. En conséquence, l'impact olfactif des constituants volatils du vin est lié à la fois à leur concentration et à leur nature. L'arôme du vin est d'une grande complexité à cause du nombre de composés qui entrent en jeu mais aussi de leur origine.

1.3.1 Notions générales sur l'arôme variétal

Les constituants de l'arôme du vin ont été classés selon leur origine tout au long de la chaîne biotechnologique d'élaboration du vin (Flanzy 1998).

- Les constituants variétaux proviennent du raisin et dépendent de la variété mais aussi du sol, du climat et des pratiques viticoles. Ces substances d'origine variétale sont spécifiques du cépage et sont présentes dans le fruit à l'état libre ou sous forme de précurseurs glycosylés. Les mieux étudiés jusqu'ici sont les terpénols et les norisoprenoïdes en C13.
- Les composés d'arôme d'origine préfermentaire (aldéhydes et alcools à 6 carbones) sont le résultat de phénomènes biochimiques (oxydation, hydrolyse) déclenchés lors de l'extraction des jus et pendant la macération.
- L'arôme fermentaire prend naissance pendant la fermentation et provient de la transformation des précurseurs d'origine variétale. Leurs teneurs dans les vins dépendent notamment du cépage, de la souche de levure et des pratiques œnologiques. Quantitativement ce sont les plus abondants ; ils sont considérés comme responsables de la note vineuse commune à tous les vins.

- L'arôme post-fermentaire de vieillissement du vin, ou bouquet, se forme au cours de la conservation du vin et est influencé par les conditions de stockage. Il résulte de nombreuses réactions physico-chimiques qui agissent sur les substances volatiles elles-mêmes ou sur les précurseurs variétaux à leur tour transformés en composés volatils pouvant évoluer.

Cependant, parmi tous les constituants de l'arôme, les composés odorants provenant du raisin jouent un rôle déterminant dans la qualité et la typicité des vins. Ils constituent l'arôme variétal des vins. Il n'y a pas de composés volatils spécifiques de chaque cépage ; les mêmes composés odorants et leurs précurseurs se retrouvent dans les moûts et les vins des cépages de la même famille. La personnalité aromatique propre de chacun tient aux infinies combinaisons des concentrations de ces différents composés dans les vins.

Dans la constitution de l'arôme variétal, les composés terpéniques jouent un rôle très important dans la typicité des vins de cépages dits aromatiques comme le gewurztraminer et le muscat. Ils prennent naissance dans le raisin et ils se retrouvent intacts ou transformés dans le vin.

1.3.2 Les composés terpéniques et leur rôle dans l'arôme muscaté

Les terpènes constituent une grande famille de composés (environ 4 000) largement répandus dans le règne végétal (Flanzy 1998, Ribéreau-Gayon et al. 1998b). Dans le raisin et le vin, environ 70 composés terpéniques ont été identifiés dont une quarantaine dans le raisin et une trentaine dans le vin (Bayonove 1993). Il s'agit de monoterpènes, de quelques sesquiterpènes et des alcools et aldéhydes correspondants. Les monoterpènes les plus odorants se trouvent parmi les alcools monoterpéniques, en particulier le linalol, le géraniol, le nérol et l' α -terpinéol qui développent des odeurs de type floral. Le seuil olfactif d'une substance odorante est la concentration minimale à laquelle au moins 50% d'une population de dégustateur la perçoit. Les principaux terpénols ont des seuils de perception olfactive bas, entre quelques

Tableau 1 : Principaux monoterpénols impliqués dans l'arôme variétal muscaté et leurs teneurs dans les raisins de différents cépages (Ribéreau-Gayon et al. 1998b).

<i>Monoterpène</i>	<i>Odeur</i>	<i>Gewurztraminer</i> ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	<i>Muscat d'Alexandrie</i> ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	<i>Muscat de Frontignan</i> ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
<i>Linalol</i>	Bois de rose	6	455	473
<i>Géraniol</i>	Rose	218	506	327
<i>Nérol</i>	Rose	43	94	135
<i>α-terpinéol</i>	Muguet	3	78	87

dizaines et quelques centaines de $\mu\text{g.l}^{-1}$. Dans les vins de cépages aromatiques comme le gewurztraminer ou les muscats, les monoterpénols sont en général présents à des concentrations largement supérieures à celles relatives à leurs seuils de perception (Tableau 1). Bien qu'aucun de ces composés pris individuellement n'apporte une caractéristique aromatique de type «muscato», le mélange de l'ensemble donne une note aromatique qui s'en approche (Flanzy 1998).

Dans la plupart des variétés de raisin, les monoterpénols se trouvent sous forme libre ou sous forme glycosylée. En général ces derniers sont les plus abondants et peuvent être révélés par voie chimique ou enzymatique (Gunata et al. 1985a, Gunata et al. 1985b). Les taux de ces terpénols liés augmentent au cours du développement et de la maturation de la baie et parfois même au-delà du stade mûr. Cette accumulation constitue des réserves intéressantes d'arômes. Le taux de terpénols libres augmente également au cours du développement de la baie mais ils n'apparaissent en quantité notable qu'à partir de la véraison (Wilson et al. 1984). Ils s'accumulent tout au long de la maturation mais diminuent ensuite au-delà du stade mûr (Bayonove 1993).

Les monoterpènes libres et liés n'ont pas tout à fait la même localisation dans la baie. La pellicule est plus riche en composés terpéniques que la pulpe. La proportion relative des formes libres et liées dépend du cépage mais la pellicule renferme tout de même plus de la moitié des terpénols libres de la baie (Flanzy 1998, Ribéreau-Gayon et al. 1998b). A l'inverse, le jus présente un fort potentiel d'arômes liés qu'il faut considérer avec beaucoup d'attention étant donné qu'il est à la base de la vinification.

La biosynthèse des terpénols n'a pas été étudiée spécifiquement dans le cas de la vigne. Les voies biochimiques qui conduisent aux composés terpéniques ont été étudiées chez la levure, l'animal et des plantes aromatiques. Le schéma de biosynthèse étant resté assez constant dans les divers organismes étudiés, il est possible de penser qu'il sera le même dans le cas de *Vitis vinifera*.

Tableau 2 : Classification de quelques cépages de vigne selon leur teneur en monoterpènes (Mateo & Jimenez 2000).

(1) < 6mg/l, (2) 1 - 4 mg/l, (3) variétés non dépendantes des monoterpènes pour leur flaveur.

Cépages aromatiques muscatés (1)	Cépages aromatiques non muscatés (2)	Cépages neutres (3)
Gewurztraminer	Traminer (savagin rose)	Cabernet sauvignon
Muscat de Frontignan (Muscat à petits grains blancs d'Alsace)	Sylvaner	Chardonnay
Muscat d'Alexandrie	Riesling	Chasselas
Muscat Ottonel	Scheurebe	Chenin blanc
Muscat de Hambourg	Schoenburger	Sauvignon blanc
	Siegerrebe	Shiraz
	Müller-Thurgau	Merlot

2 Présentation du travail

L'Alsace est réputée pour le potentiel aromatique de ses vins. Abrisé des influences océaniques par le massif vosgien qui lui assure l'une des pluviométries les plus faibles de France (500 à 600 mm d'eau par an), le vignoble d'Alsace bénéficie d'un climat semi-continental ensoleillé, chaud et sec. Situé sur les collines sous-vosgiennes, entre 200 et 400 mètres d'altitude, il profite d'un rayonnement solaire maximal grâce à la hauteur particulièrement élevée des vignes. Ces atouts propres au vignoble alsacien favorisent une maturation lente et prolongée des raisins et l'éclosion d'arômes d'une grande finesse. Caractérisés par leur fraîcheur, leur fruité délicat plus ou moins marqué et leur bouquet subtil, les vins d'Alsace portent en général le nom des cépages dont ils sont issus.

Les vins d'Alsace génèrent un chiffre d'affaire de 470 millions d'euros, ce qui représente 40% du produit agricole total de la région. Les 15 230 hectares de vignes exploités produisent une récolte moyenne de 1,2 million d'hectolitres par an de vins d'Alsace AOC, soit plus de 160 millions de bouteilles (CIVA 2005a). La Figure 2 présente une image de l'encépagement du vignoble alsacien en montrant la surface de production des cépages (CIVA 2005b). Il faut remarquer que les cépages aromatiques représentent plus de 53% des variétés cultivées. En effet, peuvent être classés dans les cépages aromatiques, le riesling, le sylvaner et le traminer (ou savagnin rose également appelé klevener de Heiligenstein en Alsace) qui sont des variétés aromatiques mais non muscatées (Tableau 2) (Mateo & Jimenez 2000). Leurs teneurs en terpénols se situent entre 1 à 4 mg/l. Les cépages gewurztraminer et muscat, qui représentent 20,6% de l'encépagement, sont des variétés muscatées à forte teneur en terpénols (< 6 mg/l). La part très importante de ces cépages dans la viticulture alsacienne motive la réalisation de travaux pour la compréhension de l'expression de ces arômes.

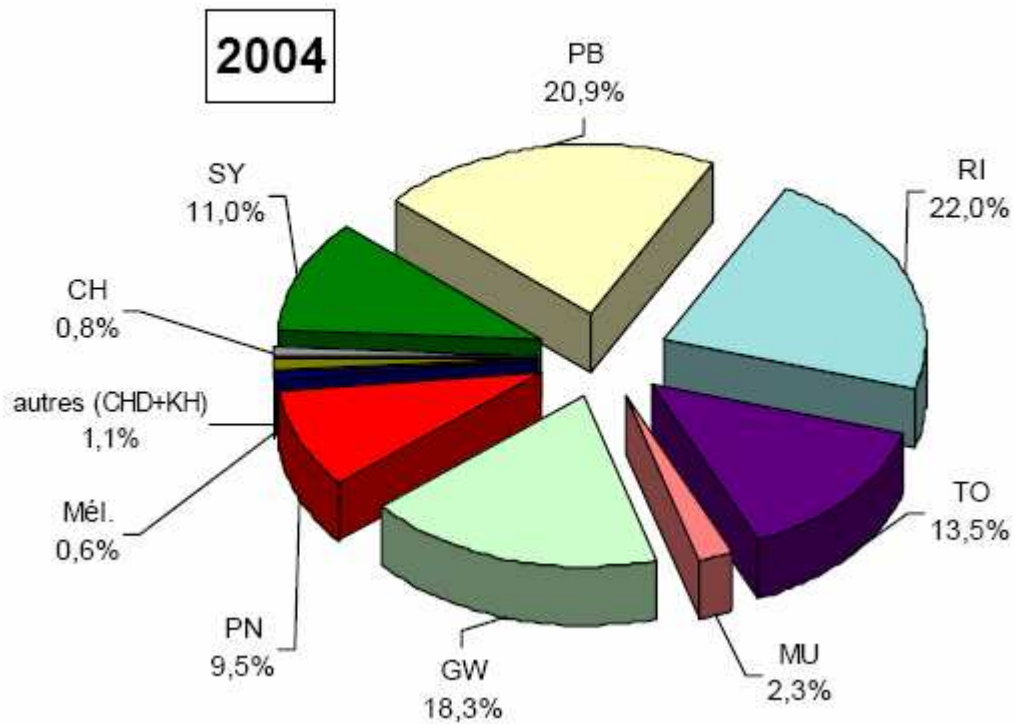
Surface globale en production 15 230 ha

Figure 2 : Surfaces de production par cépages du vignoble alsacien en 2004 (toutes AOC confondues). (SY, sylvaner ; PB, pinot blanc ; RI, riesling ; TO, tockay pinot gris ; MU, muscat ; GW, gewurztraminer ; PN, pinot noir ; Mél, mélange ; CHD, chardonnay ; KH, klevener de Heiligenstein ; CH, chasselas). (CIVA 2005b)

Chez *Vitis vinifera* le potentiel aromatique du raisin est en partie constitué par des monoterpénols comme le linalol et le géraniol qui contribuent au caractère variétal des cépages aromatiques muscatés tel le muscat et le gewurztraminer. L'implication importante de ces composés dans la qualité et la typicité du vin a stimulé la conduite d'importantes recherches sur leur distribution au niveau des organes de la plante et l'évolution de leur quantité pendant la maturation des baies et la vinification. Mais lorsque ce travail a débuté, peu de choses étaient connues sur la biosynthèse des monoterpénols chez *Vitis vinifera*.

L'objectif de notre travail était de mettre en évidence les bases moléculaires de la spécificité des cépages aromatiques de vigne. Nous nous sommes basés sur l'hypothèse que la formation du géraniol ou du linalol était liée soit à une :

- forte synthèse de géranyl diphosphate
- métabolisation du géranyl diphosphate par des terpènes synthases spécifiques

Ainsi, dans un premier temps, nous avons entrepris d'isoler les ADNc codant la géranyl diphosphate synthase (GPPS), la farnésyl diphosphate synthase (FPPS) et la linalol synthase (LIS) des cépages gewurztraminer, muscat et savagnin rose (cépage non aromatique, quasi isogénique au gewurztraminer (Galet 1990, *Catalogue des variétés et clones de vigne cultivés en France*. 1995). La FPPS a été retenue, car cette enzyme synthétise le géranyl diphosphate (GPP) comme intermédiaire de réaction et que des mutants défectifs de levure excréant du géraniol ont été décrits (Blanchard & Karst 1993).

Afin de déterminer l'influence de ces gènes dans la formation des terpénols chez la vigne, nous avons choisi d'utiliser la levure comme outil. Nous avons ainsi exprimé chez la levure les ADNc codant les activités GPPS et FPPS de vigne ainsi que la linalol synthase (LIS) de *Clarkia breweri* et la géraniol synthase (GES) récemment isolée chez le basilic (*Ocimum basilicum*), toutes deux bien caractérisées sur le plan biochimique (Pichersky et al. 1994, Dudareva et al. 1996, Iijima et al. 2004b).

3 Biosynthèse des terpènes chez les plantes

Les plantes sont une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'homme dans les fragrances, l'industrie agro-alimentaire et l'industrie pharmaceutique. Ces substances naturelles dérivent du métabolisme secondaire en opposition aux molécules indispensables à la vie issues du métabolisme primaire. Le terme de «secondaire» relève d'une époque (avant 1950) à laquelle l'importance de ces composés pour la plante n'était pas connue. Aujourd'hui, on a pu démontrer sans aucune ambiguïté que ces métabolites secondaires étaient étroitement impliqués dans les interactions entre la plante et son environnement (Harborne 2001). La diversité chimique de ces substances naturelles représente le résultat d'un processus d'évolution biochimique souvent imposé par les phénomènes de co-évolution entre la plante et les autres organismes qui interagissent avec elle. Les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes constituent les trois familles chimiques majeures représentatives de ces produits et comprennent chacune une dizaine de milliers de structures chimiques différentes (Croteau et al. 2000).

3.1 Classification des composés terpéniques

Les terpènes appartiennent à la vaste famille des isoprénoïdes. Les plantes synthétisent plus de 22 000 dérivés isopréniques qui possèdent des structures, des propriétés physiques et chimiques et des activités biologiques très diverses (Conolly & A 1992, Wink 2003). Plusieurs d'entre eux sont exploités à l'échelle industrielle (industrie des cosmétiques et des parfums, industrie du caoutchouc, industrie agro-alimentaire pour les arômes et les colorants alimentaires, etc...). Certains ont des fonctions essentielles comme par exemple les acides gibbérélliques et l'acide abscissique (phytohormones), les stérols (composés membranaires), les caroténoïdes et la chaîne phytol des chlorophylles, les ubiquinones ou encore les plastoquinones (Wink 1999). D'autres sont des substances odorantes, comme le menthol et le thymol, provenant d'huiles essentielles extraites respectivement de feuilles de menthe et de fleurs de thym ou encore le géraniol et le linalol constituants essentiels de la typicité des vins muscatés (Flanzy 1998, Kaufman et al. 1999).

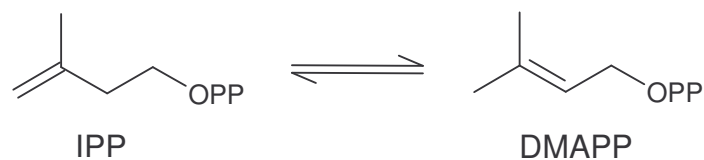


Figure 3 : Réaction catalysée par l'isopentényl diphosphate isomérase.

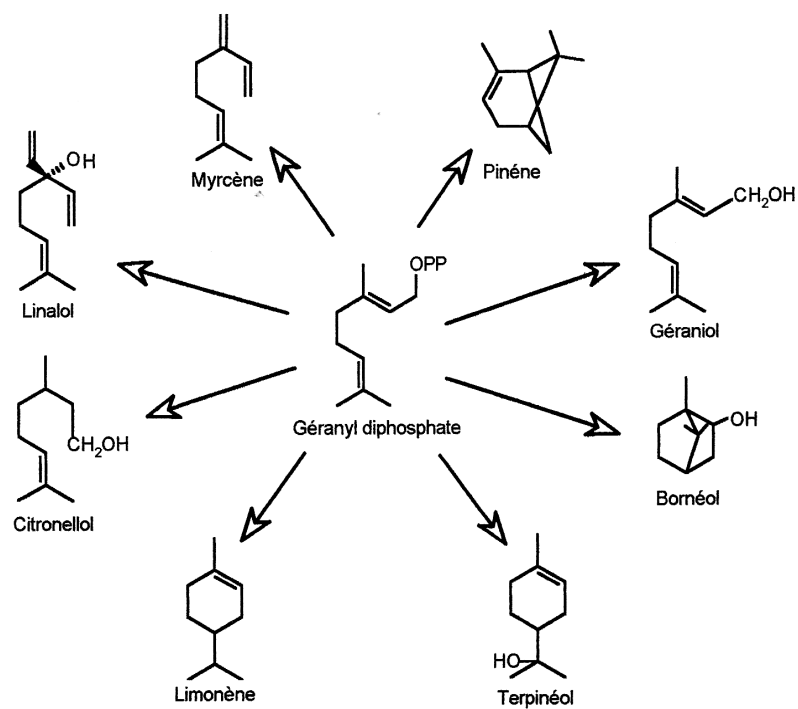


Figure 4 : Exemples de structures de monoterpènes dérivés du géranyl diphosphate.

Le mot «terpène» tire son origine du mot térébenthine. En 1818, la térébenthine a été découverte comme étant un mélange d'hydrocarbures avec un ratio carbone-hydrogène de 5 : 8. Depuis, plusieurs huiles essentielles ont été identifiées possédant le même rapport carbone-hydrogène et classifiées parmi les terpènes. Les isoprénoïdes ont une structure plus ou moins complexe issue de la condensation de molécules à chaîne carbonée linéaire à 5 atomes de carbone qui dérivent de l'isoprène. Le chimiste Ruzicka proposa une nomenclature pour les dérivés isopréniques en fonction du nombre d'unités d'isoprène qui les constitue (Ruzicka et al. 1953, Ruzicka 1959) : monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), sesterpènes (C_{25}), triterpènes (C_{30}) et caroténoïdes (C_{40}). L'isopentényl diphosphate (IPP) et le diméthylallyl diphosphate (DMAPP), équivalents biologiques de l'isoprène, sont les précurseurs communs de tous les isoprénoïdes et peuvent s'isomériser grâce à une enzyme, l'IPP isomérase (Figure 3) (Ramos-Valdivia et al. 1997). Les précurseurs des terpènes, GPP (précurseur des monoterpènes), FPP (précurseur des sesquiterpènes) et GGPP (à l'origine des diterpènes) sont obtenus par des réactions de condensations successives entre l'IPP et son isomère le DMAPP.

3.1.1 Les monoterpènes

Les monoterpènes, molécules à 10 atomes de carbone, dérivent du GPP (Figure 4). Ils existent sous la forme d'hydrocarbures simples (limonène, myrcène...), d'aldéhydes (linalal, géraniol...), d'alcools (linalol, geraniol...) et d'acides (acide linalique, gérannique) voire d'esters (acétate de linalyle...). Ce sont des composés aromatiques qui constituent les essences florales, les huiles essentielles et les résines (Singh et al. 1989, Kaufman et al. 1999). Les plus connus sont le menthol, le citronellol mais aussi le linalol et le géraniol qui constituent les principaux composants de l'arôme muscat. Dans le raisin, comme dans la plupart des plantes, les monoterpènes existent à l'état libre ou sous forme de glycosides non volatiles (Gunata et al. 1985b).

Dans la nature, ces molécules interviendraient dans l'attraction des insectes pollinisateurs (Croteau et al. 2000). On les retrouve également chez les micro-organismes bactériens et fongiques. Les propriétés sensorielles de ces molécules leur confèrent un grand intérêt

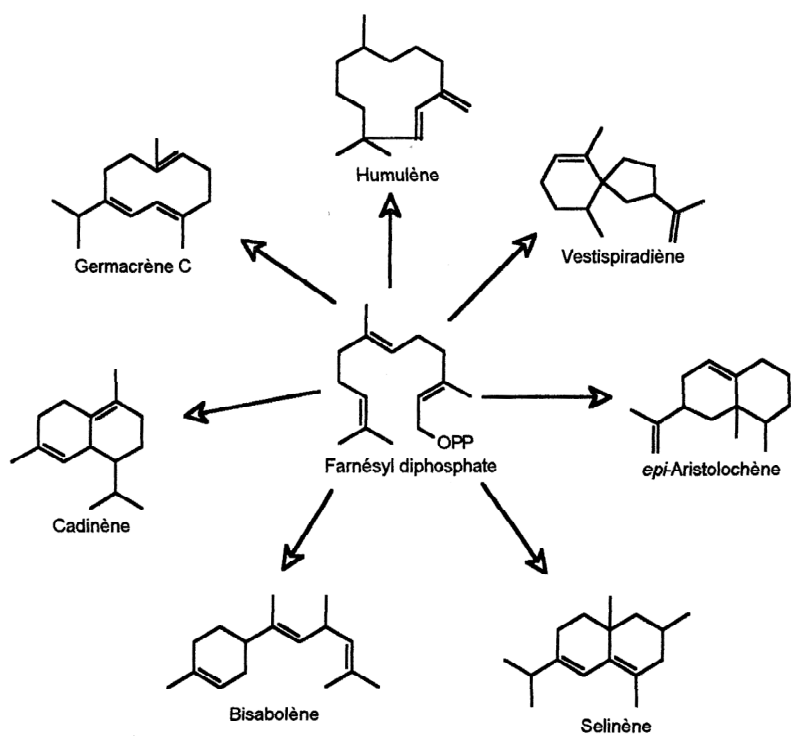


Figure 5 : Exemples de structures de sesquiterpènes dérivés du farnésyl diphosphate.

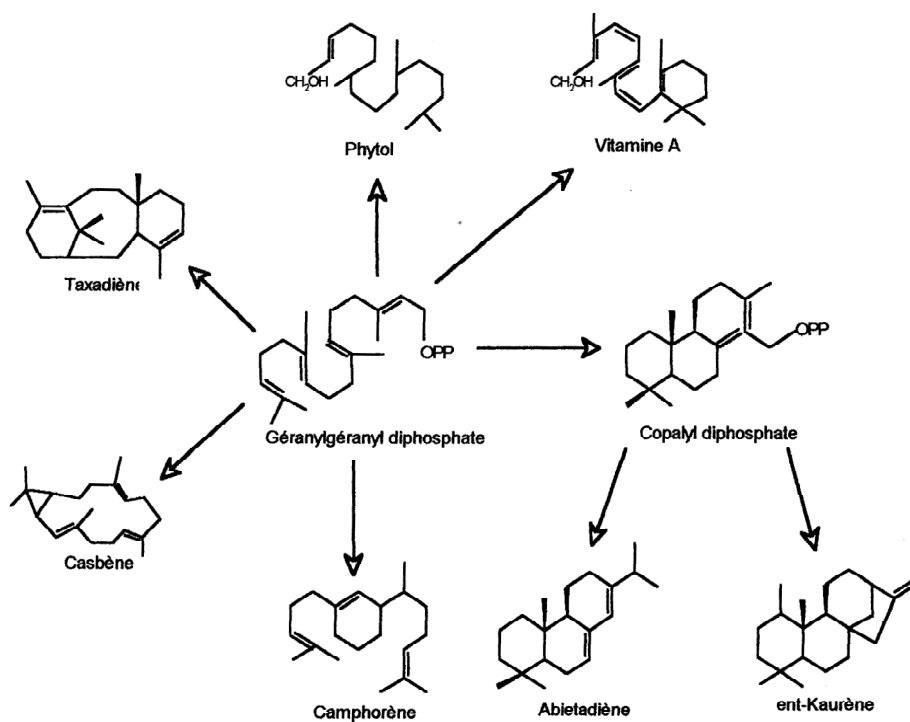


Figure 6 : Exemples de structures de diterpènes dérivés du géranylgeranyl diphosphate.

commercial dans les industries agro-alimentaires et cosmétologiques puisqu'elles composent les arômes et les parfums.

3.1.2 Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont des molécules à 15 atomes de carbone constituées de trois unités isopréniques et dérivant du FPP (Figure 5). Ils forment un sous-groupe d'environ 5 000 composés terpéniques répartis de la même façon que les monoterpènes (Wink 2003). Certaines molécules comme le farnésol ou le nérolidol ont également des propriétés aromatiques qui rentrent dans la composition des huiles essentielles mais il s'agit essentiellement de phytoalexines, molécules de défense synthétisées par les plantes en réponse à une agression comme une infection par des micro-organismes. La principale phytoalexine du piment est le capsidiol, celle du pois la pisatine ; la scopolétine ou le capsidiol sont synthétisés par le tabac. Mais tous les pathogènes ne manifestent pas la même sensibilité à une substance donnée : par exemple, le mildiou du piment est dix fois moins sensible que le mildiou de la pomme de terre au capsidiol (Gianinazzi et al. 1991). L'acide abscissique est un sesquiterpène ayant un rôle d'hormone végétale impliquée dans le développement et la germination des graines et dans la tolérance des plantes aux stress (Assman 1993).

3.1.3 Les diterpènes

La famille des diterpènes, molécules à 20 atomes de carbones synthétisées à partir du GGPP (Figure 6), comprend les gibbérellines, phytohormones du développement impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux tels que la germination, la division et l'élongation cellulaire, le phytol, chaîne hydrophobe de la chlorophylle et d'une foule de composés pharmacologiquement actifs comme le taxol (Graebe 1987, Croteau et al. 2000). Ce composé (extrait de l'écorce de l'if du pacifique) et son analogue le taxolène (obtenu part hémisynthèse à partir d'un précurseur du taxol) sont utilisés dans la chimiothérapie des cancers de l'utérus, du sein et de certains cancers du poumon (Foa et al. 1994). Ils agissent lors de la division cellulaire en inhibant la dépolymérisation de la tubuline.

3.2 Biosynthèse de l'isopentényl diphosphate

L'existence des motifs isopréniques est envisagée pour la première fois par Wallach en 1887. Il fut le premier à proposer que des condensations successives d'unités isoprène de manière «tête-à-queue» donnent des composés chimiques à n fois cinq atomes de carbone (Wallach 1887). L'isopentényl diphosphate (IPP) et le diméthylallyl diphosphate (DMAPP), équivalents biologiques de l'isoprène, sont les précurseurs communs de tous les isoprénoïdes et peuvent s'isomériser grâce à une enzyme, l'IPP isomérase.

La formation d'IPP a été considérablement étudiée dans les années 50, spécialement dans les tissus de foie, ce qui a conduit à la découverte de la voie du mévalonate ou voie du MVA, longtemps considérée comme l'unique voie de biosynthèse des isoprénoïdes dans chez les organismes vivants (Spurgeon & Porter 1981). Cette dernière décennie, une voie alternative indépendante au mévalonate a été découverte chez plusieurs eubactéries, chez les algues et dans les chloroplastes de plantes supérieures, elle est appelée voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate ou voie du MEP (Rohmer et al. 1996).

3.2.1 La voie du mévalonate

La recherche des précurseurs de l'IPP a été réalisée par des études d'incorporation de composés radioactifs. Les tissus de foie et la levure de bière ont été les principaux systèmes biologiques étudiés pour élucider cette voie de biosynthèse. Le premier précurseur reconnu a été l'acétate. Au début des années 40, Bloch et Rittenberg ont découvert que l'incorporation d'acétate de sodium deutéré chez les souris et les rats permet la formation de cholestérol deutéré (Bloch & Rittenberg 1942). Un peu plus tard, des études similaires ont montré que l'acide mévalonique est un intermédiaire spécifique de la synthèse de l'IPP aussi bien chez les animaux et les champignons que chez les plantes et les bactéries (Spurgeon & Porter 1981).

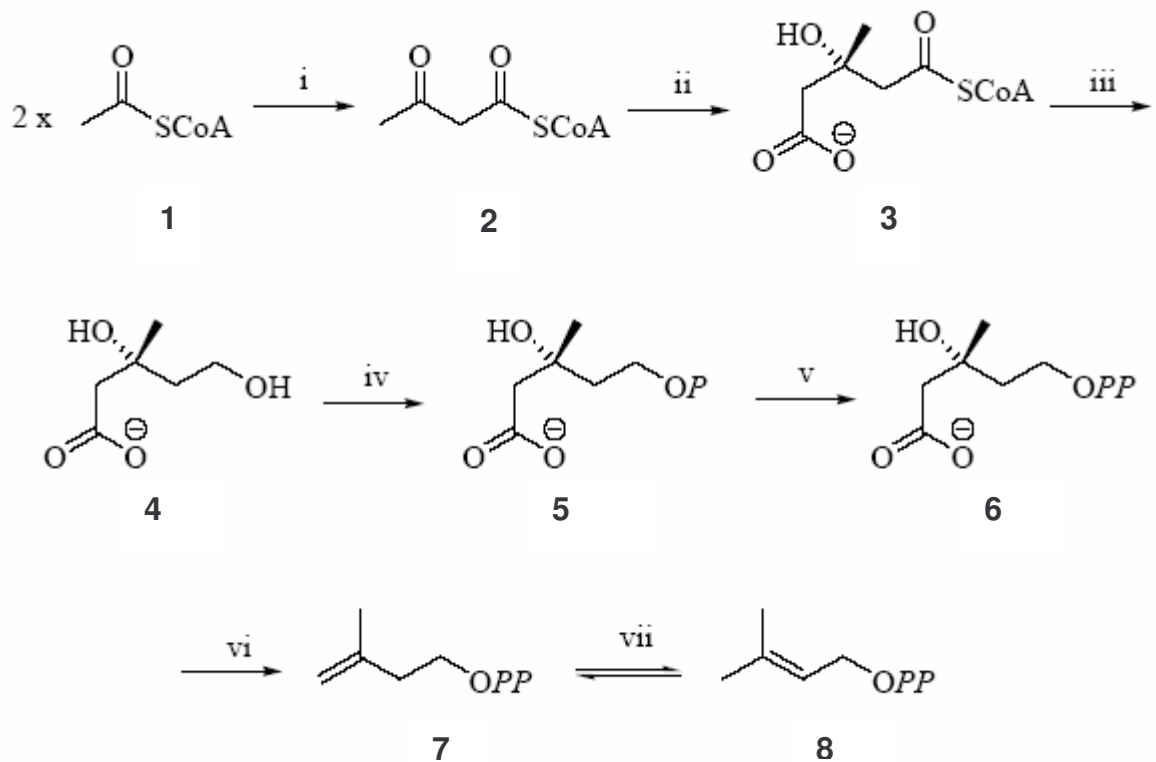


Figure 7 : Biosynthèse de l'isopentényl diphosphate selon la voie du mévalonate :

i. Acétoacétyl-CoA thiolase; ii. HMG-CoA synthase; iii. HMG-CoA réductase; iv. Mévalonate kinase; v. Mévalonate 5-phosphate kinase; vi. Mévalonate 5-diphosphate décarboxylase; vii. IPP isomérase. 1, Acétyl-CoA ; 2, Acétoacétyl-CoA ; 3, 3-hydroxyméthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) ; 4, Mévalonate ; 5, Mévalonate 5-phosphate ; 6, Mévalonate 5-diphosphate ; 7, Isopentényl diphosphate ; 8, Diméthylallyl diphosphate.

Le produit de départ est l'acétate activé sous forme d'acétyl-CoA (Figure 7). Trois unités d'acétyl-CoA sont condensées en 3-hydroxyméthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) sous l'action de deux enzymes, l'acétoacétyl-CoA thiolase (AACT) et l'HMG-CoA synthase (Luthra et al. 1999a). L'HMG-CoA est réduit en mévalonate par l'HMG-CoA réductase (Rodwell et al. 2000). Cette enzyme joue un rôle clé au niveau de la régulation de la biosynthèse des isoprénoïdes chez les plantes. Son expression est régulée par des facteurs de croissance et différents stimuli environnementaux comme la lumière, les blessures et les attaques de pathogènes (Chappell 1995, Luthra et al. 1999b). Le passage du mévalonate (MVA) à l'IPP comprend trois étapes successives. La première consiste en la phosphorylation du MVA en mévalonate 5-phosphate sous l'action de la mévalonate kinase. Une seconde phosphorylation par la phosphomévalonate kinase conduit au mévalonate 5-diphosphate. Ce dernier est ensuite décarboxylé par la diphosphomévalonate décarboxylase pour former l'IPP (Lange et al. 2000). Cette chaîne de réactions partant de l'acétyl-CoA et conduisant à l'IPP est appelée voie du mévalonate (Figure 9).

3.2.2 La voie du MEP

Pendant des décennies, la voie du mévalonate a été unanimement acceptée comme étant la seule voie de biosynthèse menant à l'IPP chez tous les organismes vivants. Cependant des résultats expérimentaux contradictoires ont été observés dans la biosynthèse des isoprénoïdes chez certaines bactéries et chez certaines plantes. En effet, des expériences d'incorporation d'acétate ou de mévalonate marqué au C13 chez certaines bactéries n'ont pas toujours donné les résultats attendus (Bach 1995). La localisation du marquage était en contradiction avec celle attendue avec la voie du mévalonate. En étudiant l'incorporation de précurseurs ¹³C (glucose et acétate) dans les isoprénoïdes des eubactéries, le groupe de M. Rohmer a mis en évidence une voie alternative de biosynthèse de l'IPP chez les végétaux et certains micro-organismes (Schwender et al. 1996, Lichtenhaler et al. 1997).

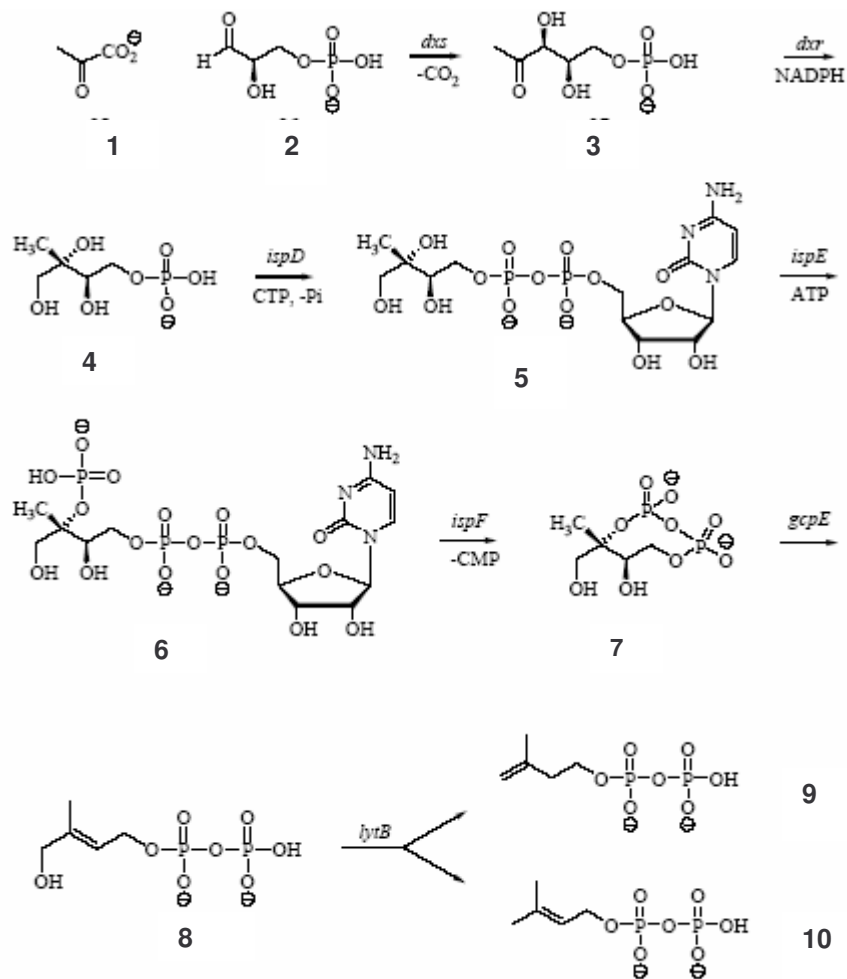


Figure 8 : Biosynthèse de l'isopentényl diphosphate selon la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) :

dxs, 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase ; *dxr*, 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase ; *ispD*, 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyltransférase ; *ispE*, 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol kinase ; *ispF*, 2-C-méthyl-D-érythritol cyclodiphosphate synthase ; *gcpE*, (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle diphosphate synthase ; *lytB*, (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle diphosphate réductase. 1, pyruvate ; 2, glycéraldéhyde 3-phosphate ; 3, 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate ; 4, 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate ; 5, 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol ; 6, 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol ; 7, 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate ; 8, (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle ; 9, isopentényl diphosphate ; 10, diméthylallyl diphosphate.

La voie débute par la condensation du glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) et du pyruvate (PYR) tous deux issus du métabolisme du glucose, dans une réaction de transcétolase (Figure 8). Le premier intermédiaire, le 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP), est synthétisé sous l'action de la DXP synthase à partir du GAP et du PYR en présence du cofacteur thiamine diphosphate. Sous l'action d'une réductoisomérase, la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase (DXR), le DXP subit un réarrangement et une condensation intramoléculaire pour devenir le 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP), second intermédiaire de la voie (Lange & Croteau 1999).

De nombreuses études ont récemment permis de compléter la voie grâce à la découverte d'un certain nombre d'intermédiaires métaboliques comme le 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol, le 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol, 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate et le (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl (Eisenreich et al. 2001, Kuzuyama & Seto 2003). Toutes les protéines qui interviennent dans ces étapes ont pu être caractérisées en grande partie grâce à de nombreuses études sur des mutants d'*E. coli*.

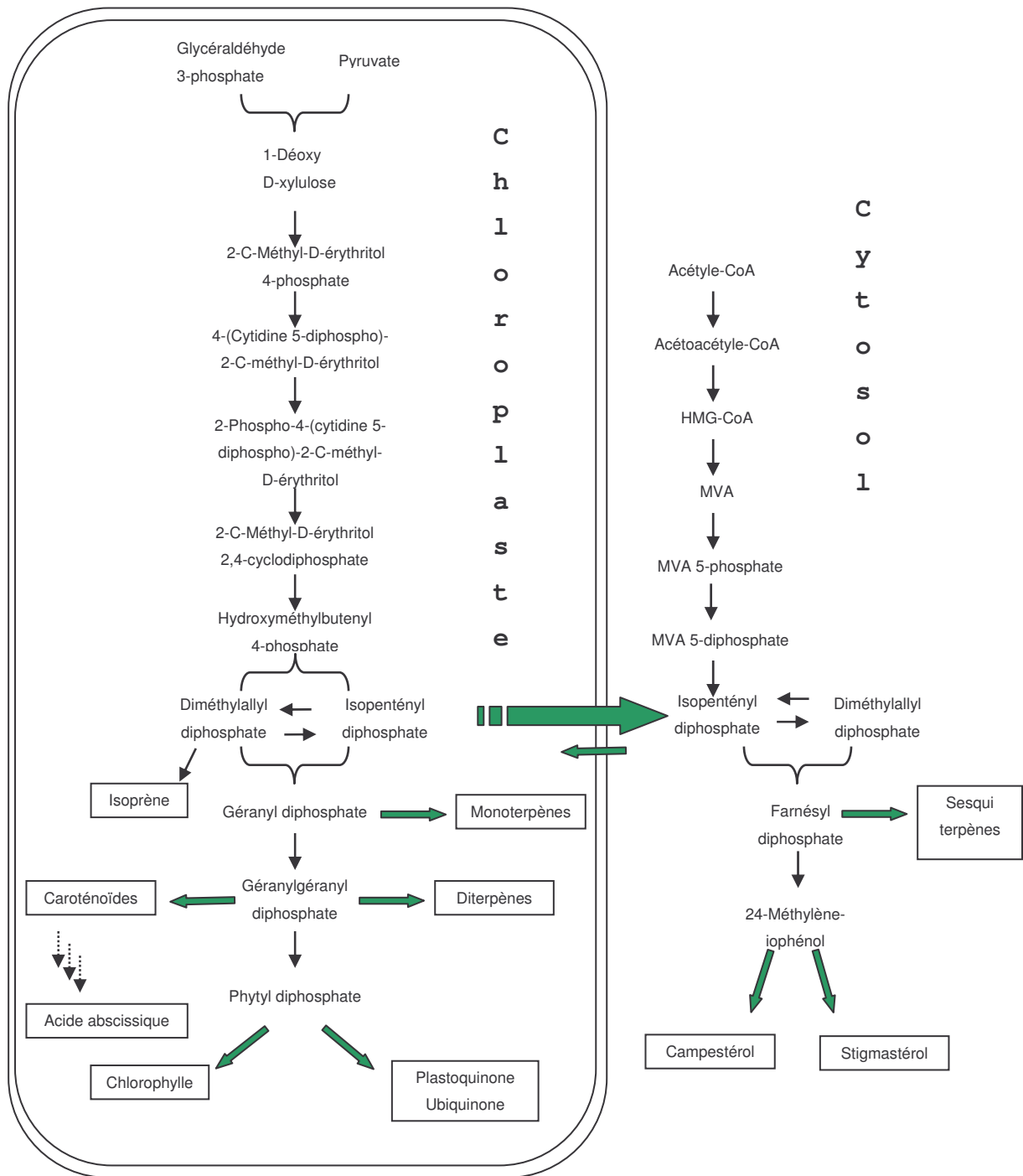


Figure 9 : Voies de biosynthèse des isoprénoïdes chez les plantes et leur localisation subcellulaire.

3.2.3 La compartimentation de la synthèse des isoprénoïdes

Le schéma général communément admis aujourd'hui propose que, chez les végétaux supérieurs, les isoprénoïdes soient synthétisés principalement dans le cytosol, les mitochondries et les plastes. La voie du MVA, opérationnelle dans le cytosol et les mitochondries, fournit l'IPP nécessaire à la synthèse des stérols, sesquiterpènes et de l'ubiquinone (Figure 9) (Disch et al. 1998). Tandis que la voie de MEP est active dans les plastes pour la synthèse des monoterpènes, diterpènes, caroténoïdes et chlorophylles (Arigoni et al. 1997, Lichtenthaler et al. 1997, Hirai et al. 2000). Des premières expériences de marquage réalisées chez le *Ginkgo biloba* montrent que la séparation compartimentale des deux voies de biosynthèse de l'IPP n'est pas hermétique (Schwarz & Arigoni 1999). Des études plus récentes indiquent que chez *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota* et *Antirrhinum majus*, il existe un échange unidirectionnel d'intermédiaires de synthèse des isoprénoïdes des plastes vers le cytosol (Laule et al. 2003, Dudareva et al. 2005, Hampel et al. 2005). Un transporteur a été caractérisé dans la membrane des plastes chez l'épinard qui permet l'exportation d'IPP et de GPP du plaste vers le cytosol (Bick & Lange 2003). A l'inverse, un transit de l'IPP a été mis en évidence dans les cellules de raisin muscat de Frontignan en culture *in vivo*, allant du cytosol vers le plaste (Soler et al. 1993). L'existence d'une telle communication dépend de l'espèce, de la présence et de la concentration des précurseurs endogènes des isoprénoïdes (Dudareva et al. 2005).

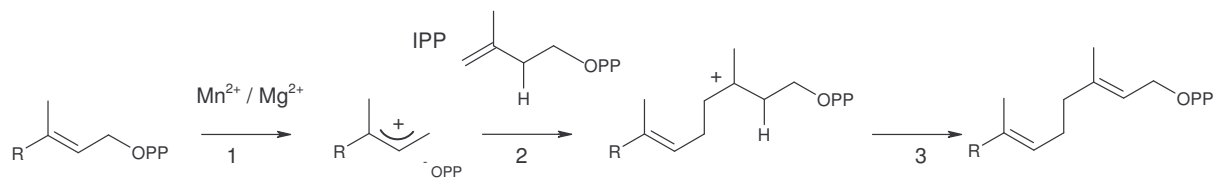


Figure 10 : Mécanisme de la condensation 1'-4 (d'après Davisson et al 1993).

- 1- Ionisation : clivage de la liaison C-O du substrat allylique.
- 2- Condensation : formation d'une liaison entre le substrat allylique et l'IPP.
- 3- Elimination : perte du proton par le carbone C2 du substrat homoallylique.



Figure 11 : Réaction catalysée par la géranyl diphosphate synthase.

3.3 De l'IPP aux molécules terpéniques

3.3.1 Les prényltransférases

Cette famille d'enzymes est impliquée dans la formation de dérivés isopréniques diphosphorylés à 10, 15 ou 20 atomes de carbones. Elles catalysent la condensation 1'-4 d'une unité isoprénique homoallylique, l'IPP, sur un substrat allylique, le DMAPP, le GPP ou le FPP (Figure 10) (Poulter & Rilling 1981).

3.3.1.1 La géranyl diphosphate synthase

La géranyl diphosphate synthase (GPPS) catalyse la formation du GPP par condensation «tête-queue» d'une molécule d'IPP sur une molécule de DMAPP (Figure 11) (Banthorpe et al. 1983). L'implication d'une telle activité dans la synthèse des monoterpènes n'a très vite fait aucun doute, même si l'existence de cette prényltransférase est restée longtemps incertaine. Ce n'est qu'à la fin des années 80 que de premières études ont révélé la présence d'une activité enzymatique géranyl diphosphate synthase chez différentes plantes sans pour autant conduire au clonage du gène correspondant.

Des purifications partielles de géranyl diphosphate synthases ont pu être réalisées à partir de cultures cellulaires de *Lithospermum erythrorhizon* (Heide & Berger 1989) et de *Salvia officinalis* (Croteau & Purkett 1989) ainsi que de feuilles de *Pelargonium roseum* (Suga & Endo 1991). La première purification à homogénéité d'une GPPS a été réalisée à partir de cellules de *Vitis vinifera* (Clastre et al. 1993). La protéine présente une masse moléculaire de 68 kDa et des Km apparents pour l'IPP et le DMAPP de 8,5 et 56,8 μ M respectivement. L'activité maximale est obtenue en présence des cations divalents Mg^{2+} et Mn^{2+} comme cofacteurs avec une efficacité plus importante pour le Mn^{2+} . Ces données sont en corrélations avec celles observées pour la GPPS de *Lithospermum erythrorhizon* (Sommer et al. 1995). Plus récemment, les ADNc codants des GPPS de *Mentha piperita* (Burke et al. 1999),

Arabidopsis thaliana (Bouvier et al. 2000), *Abies grandis* (Burke & Croteau 2002a), *Antirrhinum majus* et *Clarkia breweri* (Tholl et al. 2004) ont été isolés et les protéines correspondantes caractérisées. Toutes ces enzymes ont des séquences similaires aux prényltransférases de cette famille mais elles diffèrent dans leurs architectures. Les GPPS de *Mentha piperita* (Burke et al. 1999), *Antirrhinum majus* et *Clarkia breweri* (Tholl et al. 2004) se présentent sous la forme d'hétérodimères constitués d'une grande sous-unité (GPPS-LSU) similaire en séquence (56 à 75%) et en activité à une géranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) ainsi qu'une petite sous-unité (GPPS-SSU) ne montrant pas d'activité spécifique et peu d'homologies aux protéines de la famille des prényltransférases. L'expression chez *E. coli* des deux ADNc de *Mentha piperita* a permis de produire une protéine hétérodimérique dont les sous-unités font 28 kDa et 37 kDa respectivement (Burke et al. 1999). Cette étude montre que la liaison de la petite sous-unité à la grande modifie la spécificité de longueur de la chaîne prénylée synthétisée. Ainsi, le complexe conduit à la synthèse de GPP et non plus de GGPP pour la GGPPS-LSU seule (Burke & Croteau 2002b). Les GPPS isolées chez *Arabidopsis thaliana* et *Abies grandis* se présentent par contre sous la forme d'homodimères d'une masse moléculaire de respectivement 45 kDa et 42 kDa. Bien qu'appartenant toutes les deux à la famille des prényltransférases, elles ne sont pas très similaires, la GPPS d'*A. grandis* est plus proche d'une GGPPS (Burke & Croteau 2002a).

Toutes ces enzymes possèdent une séquence d'adressage plastidiale. Des études biochimiques ont montré une localisation plastidiale de la GPPS chez *Vitis vinifera* (Soler et al. 1992) en accord avec une localisation plastidiale de la synthèse des monoterpènes chez les plantes. Chez *Arabidopsis thaliana* ainsi que chez *Lithospermum erythrorhizon*, il a été montré la présence de GPPS dans le cytosol. L'existence de deux sites d'initiation de la traduction dans la séquence de la GPPS d'*A. thaliana* est probablement à l'origine d'une double localisation plastidiale et cytosolique (Bouvier et al. 2000).

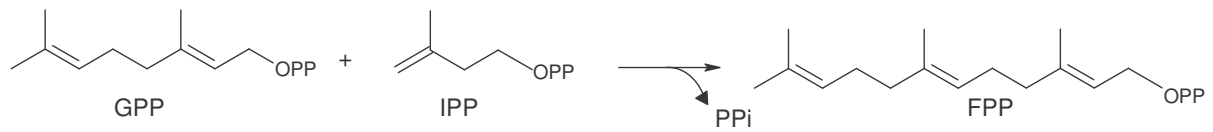


Figure 12 : Réaction catalysée par la farnésyl diphosphate synthase.

	I	II	FARM	III	IV	
<i>G.g.</i>	69.. GGK CNRGLT	107.. ELFQ AFFLVA	DDI-- MD	QSL TRRG	142.. A INDSFLLS	184.. GQMLD
<i>H.s.</i>	55.. GGK YNRGLT	93.. ELLQ AFFLVA	DDI-- MD	SSL TRRG	128.. A INDANLLEA	170.. GQtLD
<i>S.c.</i>	50.. GGK LNRLS	90.. ELLQ AYFLVA	DDM-- MD	KS ITRRG	125.. A INDAFMLEA	167.. GQLMD
<i>A.t.</i>	46.. GGK LNRLS	84.. EWLQ AYFLVL	DDI-- MD	NSV TRRG	119.. A INDGILLRN	161.. GQMID
<i>B.s.</i>	45.. GGK RIRPLL	76.. EMIHTY FLIH	DD LP SMD	NDD LRRG	115.. A-GD GLLTYA	159.. GQAAD

	V	VI	SARM	VII	
<i>G.g.</i>	214.. KT	250.. GEYFQ IQ	DD YLD	CFGDPALT GK-VGTD	355.. FLGLA QKIYKRQK
<i>H.s.</i>	200.. KT	236.. GEFFQ IQ	DD YLD	LFGDPSVT GK-IGTD	341.. FLGLA RKIYKRK
<i>S.c.</i>	197.. KT	233.. GEYFQ IQ	DD YLD	CFGTP EQIGK-IGTD	340.. LTAFL NKVYKRK
<i>A.t.</i>	191.. KT	226.. GIYFQ VQ	DD YLD	CFADPET LTK-IGTD	331.. LKSFLA KIYKRQK
<i>B.s.</i>	183.. KT	217.. GLAFQ IR	DD ILD	IEGAE EKIGKPVGSD	285.. LAYICE LVAARDH

Figure 13 : Alignement des séquences amino-acidiques des domaines conservés I à VII de plusieurs FPPS.

Les encadré FARM et SARM délimitent le premier et le second motif riches en acides aspartiques. Les acides aminés les plus conservés dans chaque domaine sont en gras.

G.g., *Gallus gallus* ; *H.s.*, *Homo sapiens* ; *S.c.*, *Saccharomyces cerevisiae* ; *A.t.*, *Arabidopsis thaliana* ; *B.s.*, *Bacillus strearothermophilus*.

3.3.1.2 La farnésyl diphosphate synthase

La farnésyl diphosphate synthase ou FPPS est considérée comme une enzyme clé de la voie de synthèse des isoprénoïdes. Elle catalyse une réaction de condensation séquentielle de deux IPP avec un DMAPP pour former une molécule de FPP par l'intermédiaire d'une molécule de GPP (Figure 12) (Poulter & Rilling 1976).

Le farnésyl diphosphate est le précurseur de la biosynthèse de nombreux métabolites cellulaires essentiels comme les stérols, l'hème a, le dolichol, l'ubiquinone et les groupements prényls des protéines (Anderegg et al. 1988). Chez les végétaux, il intervient dans la synthèse de composés secondaires de la famille des sesquiterpènes.

Les premières purifications de la FPPS à homogénéité à partir de différentes sources eucaryotiques dont *Saccharomyces cerevisiae* (Eberhardt & Rilling 1975), le foie de poulet (Reed & Rilling 1975) et d'humain (Barnard & Popjak 1981), ont montré que dans tous ces organismes, la FPPS se présente comme un dimère de 80 à 84 kDa qui nécessite la présence du cations Mg^{2+} pour son activité. Le clonage des gènes correspondant a ensuite permis d'apporter des détails supplémentaires quant à la séquence et la structure de la protéine (Clarke et al. 1987, Anderson et al. 1989, Wilkin et al. 1990). Aujourd'hui plus de vingt séquences codantes de FPPS sont isolées et caractérisées (Szkopinska & Plochocka 2005) dont celles d'*Arabidopsis thaliana* (Delourme et al. 1994), du lupin (Attucci et al. 1995) et d'*Artemisia annua* (Matsushita et al. 1996) chez les plantes. Les comparaisons de séquences de ces différents gènes révèlent sept domaines conservés notés de I à VII (Figure 13) (Koyama et al. 1993). Deux motifs caractéristiques riches en acides aspartiques ont pu être mis en évidence. Le premier appelé FARM (First Asp-Rich Motif) dans le domaine II se caractérise par une séquence du type DDXX(XX)D (D pour acide aspartique et X pour n'importe quel acide aminé). Ce motif, extrêmement conservé dans les gènes de la famille des prényltransférases, est désigné comme le site déterminant la longueur de la chaîne synthétisée. Le second motif se situe dans le domaine VI, se caractérise par une séquence DDXXD et est appelé SARM (Second First Asp-Rich Motif) (Ashby & Edwards 1990). Des études utilisant des techniques de mutagenèse dirigée ont montré l'implication certaine de ces sites conservés dans le mécanisme de catalyse des ces enzymes ainsi que dans la fixation des substrats.

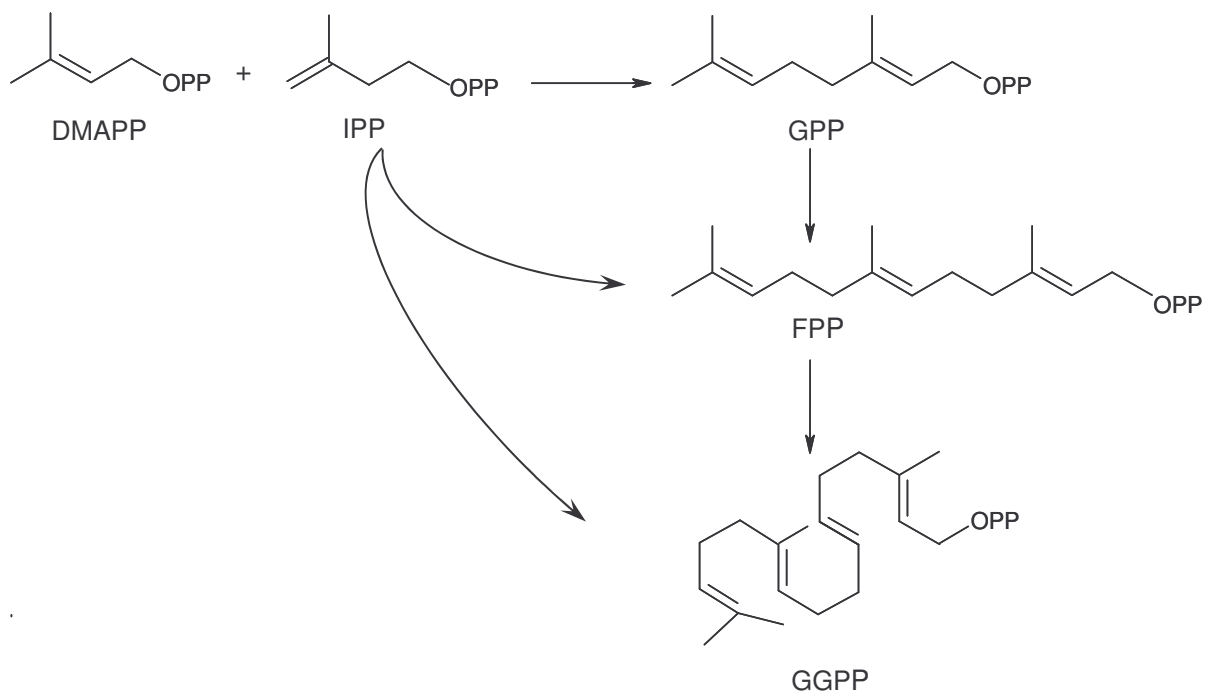


Figure 14 : Réaction catalysée par la géranylgéranyl diphosphate synthase.

Les premiers résidus aspartate des domaines FARM et SARM sont cruciaux pour l'activité de l'enzyme (Marrero et al. 1992, Joly & Edwards 1993, Song & Poulter 1994) tandis que le site SARM et les résidus phénylalanine et glutamine en amont sont impliqués dans la fixation de l'IPP et le maintien des substrats allyliques dans la conformation idéale pour la condensation (Koyama et al. 1995, Tarshis et al. 1996). Il est à noter que certaines FPPS sont capables de synthétiser du GPP en plus du FPP. Blanchard & Karst 1993 ont mis en évidence dans la FPPS de *Saccharomyces cerevisiae* une mutation K¹⁹⁷→E responsable de la diminution de l'activité enzymatique et de la sécrétion de géraniol dans le milieu de culture. Ce résidu lysine, conservé dans les séquences des prényltransférases, est probablement impliqué dans la liaison avec les substrats. La substitution de la sérine par une phénylalanine en 4^{ième} position en amont du motif FARM chez la FPPS de *Bacillus strearthermophilus* (Narita et al. 1999) ainsi que les substitutions A116W et N144W chez la FPPS de poulet (Stanley Fernandez et al. 2000) engendrent une enzyme qui présente une activité exclusivement géranyl diphosphate synthase.

Des interrogations subsistent quant à la localisation subcellulaire de la protéine. Elle a été principalement mise en évidence dans le cytosol (Grunler et al. 1994), les mitochondries (Runquist et al. 1994, Cunillera et al. 1997) et les peroxysomes (Sanmiya et al. 1999) ; il reste un doute sur sa localisation plastidiale (Hemmerlin et al. 2003).

3.3.1.3 La géranylgéranyl diphosphate synthase

La géranylgéranyl diphosphate synthase (GGPPS) catalyse la formation de GGPP par condensation successive de trois molécules d'IPP sur un substrat allylique (Figure 14) (Ogura & Koyama 1998). *In vitro*, cette enzyme est capable d'utiliser les différents composés allyliques DMAPP, GPP et FPP comme substrats (Kuntz et al. 1992). Chez les plantes supérieures, le GGPP est un précurseur essentiel pour la synthèse des caroténoïdes, des gibbérélines et de la chlorophylle (Wang & Ohnuma 1999). Il est également un point clé dans la synthèse des terpènes. Les gènes et les ADNc codant la GGPPS de nombreux organismes ont été clonés, dont ceux de *Neurospora crassa* (Sandmann et al. 1993), *Taxus canadensis*

(Hefner et al. 1998), *Arabidopsis thaliana* (Okada et al. 2000), *Scorparia dulcis* et *Croton sublyratus* (Sitthithaworn et al. 2001), *Hevea brasiliensis* (Takaya et al. 2003), ainsi que ceux de la souris et de l'homme (Kainou et al. 1999). Chez *Methanobacterium thermoformicum*, une GGPPS a été mise en évidence qui assure à elle seule toutes les activités prényltransférases (Tachibana et al. 1993). Elle est capable d'utiliser l'IPP, le DMAPP, le GPP ou le FPP comme précurseurs diphosphorylés.

Les GGPPS se présentent en général sous la forme d'un dimère constitué de deux sous-unités d'environ 40 kDa dont la séquence révèle la présence d'un peptide d'adressage aux plastes. Chez *Arabidopsis thaliana*, six séquences différentes de GGPPS ont pu être mises en évidence possédant chacune un signal de localisation subcellulaire dans la région N-terminale (Okada et al. 2000). Cinq GGPPS ont été exprimées dans la plante en fusion avec la GFP afin de suivre leur translocation. Une localisation chloroplastique a été observée pour deux d'entre elles, deux autres étaient situées dans le réticulum endoplasmique et la dernière dans les mitochondries. Les auteurs ont également remarqué une expression différentielle des différentes protéines dans les tissus de la plante. Ces résultats suggèrent qu'il y a chez *Arabidopsis thaliana* différentes voies de synthèse du GGPP.

3.3.2 Les terpènes synthases

Les terpènes synthases (TPS) utilisent toutes un substrat de type prényl diphosphate acyclique à 10, 15 ou 20 atomes de carbone pour composer l'abondante variété de molécules terpéniques observées dans la nature. Elles synthétisent les monoterpènes à partir du GPP, les sesquiterpènes à partir du FPP et les diterpènes à partir du GGPP (Croteau et al. 1987, Karp et al. 1987, Sun & Kamiya 1994). La plupart de ces produits sont cycliques mais des exemples de TPS synthétisant des molécules acycliques sont également connus.

La première étape de la réaction de synthèse des terpènes est commune à toutes les TPS à l'exception de la copalyl diphosphate synthase. Il s'agit de l'ionisation du précurseur prényl diphosphate qui forme un intermédiaire cationique par l'utilisation d'un ion métallique divalent comme cofacteur. Ensuite un grand nombre de variations dans les réactions catalysées par les TPS (cyclisations, réarrangements divers) permettent la création de l'essentiel des structures chimiques, des isomères et des dérivés à la base de la diversité des structures terpéniques (Bohlmann et al. 1998).

Les monoterpènes cyclases produisent à partir du GPP une grande variété de monoterpènes cycliques. Les réactions catalysées par ces enzymes sont régiospécifiques et exigent des ions bivalents afin de neutraliser la charge négative du groupement diphosphate et d'aider ainsi à l'ionisation du GPP. Les monoterpènes cycliques dérivent d'un même mécanisme réactionnel électrophile : ionisation en carbocation géranyl puis réarrangement avec migration du groupement diphosphate et isomérisation (Croteau 1986, Croteau et al. 1986). Cette étape ionisation-isomérisation conduit en fonction de la stéréospécificité de l'enzyme au (-)-3*R* ou au (+)-3*S*-linalyl diphosphate (LDP). Le LDP subit ensuite une rotation C2-C3 suivie par une isomérisation donnant naissance au cation linalyl. Ce dernier régénère après sa cyclisation en C6-C1 son correspondant monocyclique, le carbocation (4*R*) ou (4*S*)- α -terpényl (Rajaonarivony et al. 1992). Il s'agit d'un cation terpényl-8, véritable plaque tournante dans la biogenèse des monoterpènes cycliques. La plupart de monoterpènes cyclases synthétisent plusieurs produits finaux à l'exception de certaines monoterpènes synthases comme la géraniol synthase de *Ocimum basilicum* ou la linalol synthase de *Clarkia breweri* (Pichersky et al. 1995, Iijima et al. 2004b).

Le processus de synthèse des monoterpènes acycliques dans son ensemble passe par les mêmes types de réactions électrophiles et se décompose en une suite d'étapes d'isomérisation, de transposition allylique, de rotation de liaisons, de réarrangement des cations et de déshydrogénation.

Tous les sesquiterpènes dérivent du FPP. La diversité structurale de cette famille de composés est plus importante que celle des monoterpènes à cause du nombre de cyclisations possibles plus important grâce aux 5 atomes de carbone supplémentaires. Les mécanismes électrophiliques impliqués dans la formation des sesquiterpènes ressemblent beaucoup à ceux utilisés par les monoterpènes synthèses. La formation préliminaire d'un précurseur analogue au LPP par isomérisation du FPP conduit au 3*R* ou 3*S*-nérolidyl diphosphate. Cette réaction est suivie ensuite ou non d'une cyclisation (Bohlmann et al. 1998).

Les diterpènes synthèses assurent la synthèse des diterpènes à partir du GGPP. Bien que le diterpène le plus connu, le phytol, soit acyclique, la plupart sont cycliques. Deux cyclisations, fondamentalement différentes, ont lieu lors de la transformation du GGPP. Les diterpènes macrocycliques comme le casbène ou le taxadiène sont formés par un mécanisme de cyclisation analogue à celui des monoterpènes et des sesquiterpènes (Koepp et al. 1995). Le second mode de cyclisation implique la formation du copalyl diphosphate (CDP) comme intermédiaire bicyclique préliminaire (West 1981). L'ionisation de l'ester diphosphate induit la seconde étape de cyclisation pour donner un produit tricyclique. Cette voie mène par exemple à la synthèse d'ent-kaurène précurseur des gibbérélines par l'action de la ent-kaurène synthase (Sun & Kamiya 1994, Ait-Ali et al. 1997) ou à l'abiétadiène précurseur de l'acide abiétique (LaFever et al. 1994).

La similitude des mécanismes de réaction des monoterpènes et diterpènes synthèses plastidiales et des sesquiterpènes synthèses cytosoliques explique certainement les similitudes des propriétés observées chez ces enzymes. Le développement des outils moléculaires et l'existence de plusieurs domaines conservés dans les séquences protéiques des TPS ont permis le clonage d'un grand nombre de gènes codant des TPS chez différentes espèces de plantes comme *Clarkia breweri* (Dudareva et al. 1996), *Lycopersicon esculentum* (Colby et al. 1998), *Salvia officinalis* (Wise et al. 1998), *Abies grandis* (Bohlmann & Croteau 1999, Bohlmann et al. 1999, Hyatt & Croteau 2005), *Artemisia annua* (Mercke et al. 1999), *Arabidopsis thaliana*

(Aubourg et al. 2002), *Citrus limon* (Lucker et al. 2002), et *Vitis vinifera* (Lucker et al. 2004, Martin & Bohlmann 2004). L'histoire évolutive des TPS végétales fait l'objet de nombreuses études. Des analyses phylogénétiques ont ainsi permis de diviser cette famille mutigénique en plusieurs sous-groupes. Sur la base des motifs séquentiels communs à toutes les TPS végétales, une trentaine de séquences peptidiques de TPS ont été classifiées dans 6 groupes différents appelés *Tps* (a,b,c,d,e,et f) (McGarvey & Croteau 1995, Bohlmann et al. 1998). Cette analyse a permis de montrer que la divergence des gènes *TPS* du métabolisme primaire et du métabolisme secondaire était antérieure à la dichotomie angiospermes-gymnospermes. Une nouvelle famille de terpènes synthases *TPS-g* a été identifiée récemment (Dudareva et al. 2003). Elle comprend des gènes codant pour des monoterpènes synthases dont la séquence peptidique ne présente pas le motif conservé RR_{X8}W caractéristique des monoterpènes cyclases des familles *TPS-d* et *TPS-b*. L'analyse de la structure de la séquence génique des TPS de conifères et d'*A. thaliana* a établi que les gènes impliqués dans le métabolisme secondaire dérivent de ceux du métabolisme primaire au travers de mécanismes de duplication et de divergence dans la spécialisation structurelle et fonctionnelle (Trapp & Croteau 2001). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* comporte une famille de 40 gènes codant pour des terpènes synthases (gènes *AtTPS*) (Aubourg et al. 2002). Il s'agit de la plus grande famille de terpènes synthases actuellement identifiée chez les plantes. Les gènes *AtTPS* s'organisent dans 5 des 6 sous-familles phylogénétiques. Trente *AtTPS* sont très similaires au niveau de leur séquence protéique et de leur architecture, à la classe des monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes synthases spécifique du métabolisme secondaire. L'évolution de ces gènes résulte de duplications locales suivies de la divergence des séquences et de rares remaniements au niveau de leur structure intron-exon. Seulement deux gènes *AtTPS* ont des fonctions connues liées au métabolisme primaire, la biosynthèse des gibbérélines. Ce contraste entre la diversification des gènes des métabolismes primaires et secondaires est important pour la compréhension de l'évolution de la diversité naturelle des terpènes.

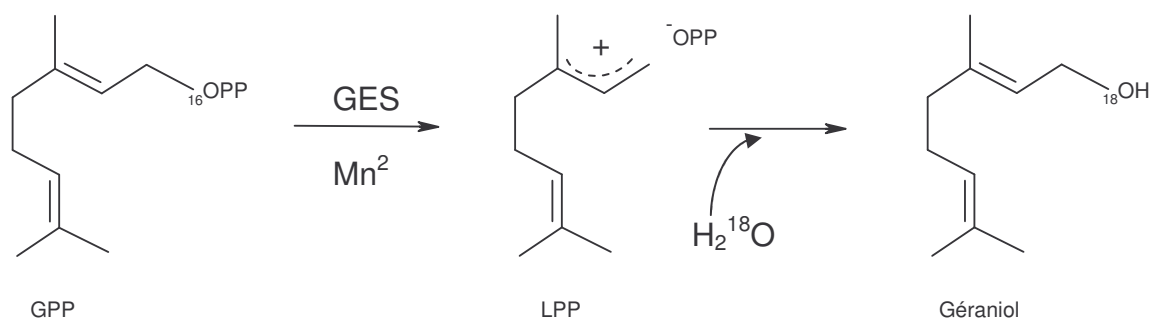


Figure 15 : Mécanisme de réaction de la géranol synthase. Le géranol n'est pas généré à partir du GPP par une activité phosphatase mais par l'addition d'un groupe hydroxyle sur le carbocation intermédiaire. (Iijima et al. 2004b)

3.3.3 La géraniol synthase (GES)

Le (*E*)-3,7-diméthyl-2,6-octadién-1-ol ou géraniol est un alcool monoterpénique acyclique présent chez les micro-organismes et les végétaux. Composant majeur des huiles essentielles de rose et de palmarosa, il est également présent en grande quantité dans les essences de géranium, de citronnelle et de bien d'autres plantes aromatiques. Le géraniol est principalement utilisé en parfumerie et cosmétique mais également comme agent antiseptique et comme germicide et fongicide. Il trouve un grand nombre d'applications dans l'industrie comme produit agglomérant, astringent et comme intermédiaire dans la fabrication de divers produits comme l'urée, les colorants, les résines mélamines, les explosifs.... Chez la plante, le géraniol participe à l'interaction entre la plante et le milieu environnant, aux mécanismes de pollinisation et aux mécanismes de défense face à des agents pathogènes (Dudareva & Pichersky 2000). Il est en général émis par les fleurs mais se trouve également dans les fruits et les parties végétatives sous forme libre volatile ou couplé à un groupement glycosyl (Gunata et al. 1985a, Gunata et al. 1985b).

Le mécanisme de biosynthèse du géraniol n'était pas connu jusqu'à récemment. Bien qu'il était admis que le géraniol devait être issu du GPP comme les autres monoterpènes, deux types de réactions enzymatiques pouvaient mener à la synthèse de géraniol à partir du GPP. La question d'une simple activité phosphatase coupant la liaison phosphodiester et produisant ainsi du géraniol ou d'une activité monoterpène synthase basée sur un mécanisme réactionnel semblable aux TPS est restée longtemps sans réponse. Iijima et al. 2004b ont été les premiers à purifier et caractériser une géraniol synthase (GES) à partir de glandes de basilic (*Ocimum basilicum*). Des comparaisons de séquences et des expériences d'incorporation d'eau marquée au ^{18}O ont permis de montrer que cette GES appartient à la famille *TPS-b* et utilise le même mécanisme réactionnel (Figure 15). En effet, bien que sa séquence ne présente pas le motif conservé $\text{RR}_{\text{X8}}\text{W}$, à l'inverse des TPS de la sous-famille g, elle utilise le carbocation LPP comme intermédiaire de synthèse.

La protéine purifiée catalyse uniquement la formation de géraniol. Le maximum d'activité est obtenu à pH 8,5 en présence de Mn^{2+} comme cofacteur (le Mg^{2+} ne permet pas la synthèse de géraniol). Les K_m pour le GPP et le Mn^{2+} sont respectivement de 21 μM et 51 μM . Le gène codant le GES de basilic a été cloné et son expression hétérologue chez *E. coli* a montré que la GES était une protéine dimérique d'environ 140 kDa, 60 kDa par sous-unité. Sa séquence peptidique primaire comprend 567 acides aminés et un peptide d'adressage plastidial a été mis en évidence à l'extrémité N-terminale. L'analyse par Northern de l'expression du gène codant la GES chez le basilic a montré la présence d'un signal uniquement dans les glandes sécrétrices du cultivar Sweet Dani et non dans les feuilles ni dans d'autres cultivars produisant d'autres monoterpènes (Iijima et al. 2004a).

Suite à ces travaux, un autre gène codant une GES a été cloné chez l'arbre *Cinnamomum tenuipilum* et la protéine caractérisée (Yang et al. 2005). A la différence de la GES de basilic, elle présente toutes les particularités de séquences des TPS dont le motif $RR_{X8}W$. Elle se classe aussi dans la sous-famille *TPS-b* des angiospermes. La protéine, de 603 acides aminés et d'une taille de 69 kDa est dépendante des cofacteurs Mg^{2+} et Mn^{2+} pour son activité et présente un K_m de 55,8 μM pour le GPP. Comme pour le basilic, le gène codant la GES de *Cinnamomum tenuipilum* s'exprime uniquement dans les cellules synthétisant les composés terpéniques du chémotype géraniol de l'espèce. Une étude d'incorporation des traceurs radiomarqués $[5,5-^2H_2]$ acide mévalonique lactone et $[5,5-^2H_2]$ -1-déoxy-D-xylulose dans différents tissus de *Vitis vinifera* cv muscat Ottonel a montré que seule la voie plastidiale du MEP est utilisée pour la biosynthèse du géraniol (Luan & Wust 2002, Luan et al. 2005). De plus, au niveau de la baie de raisin, seules les cellules de l'exocarpe synthétisent du géraniol et non celles du mésocarpe.

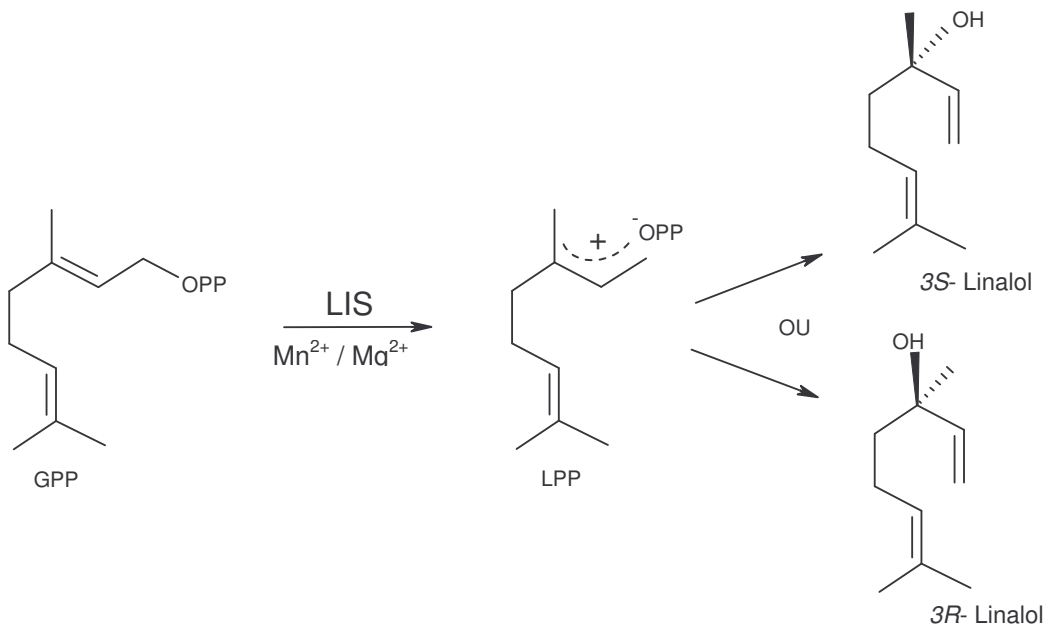


Figure 16: Mécanisme de réaction de la linalol synthase. Elle génère de manière énanti-sélective du *3S*-linalol ou du *3R*-linalol.

3.3.4 La linalol synthase (LIS)

En tant qu'alcool monoterpénique acyclique comme le géraniol, le linalol est présent chez les micro-organismes et participe à la composition du parfum de très nombreuses espèces végétales et à l'arôme des fruits. Plus de 15 000 tonnes de linalol sont utilisés annuellement dans la flaveur et la fragrance, par les industries agro-chimiques et pharmaceutiques, comme additif dans l'alimentation ou huile essentielle dans la cosmétique (Bahl et al. 2000). Son usage médical est basé sur ses propriétés antibactérienne, fongicide, anticonvulsive et sédatrice (Carson & Riley 1995, Skaltsa et al. 2000, Hammer et al. 2003).

La formation de l'alcool tertiaire du linalol à partir du GPP génère deux isomères optiques : le 3*S*-linalol et le 3*R*-linalol. Ils sont synthétisés chez les plantes par l'action d'une linalol synthase (LIS) énantio-sélective. Le GPP subit tout d'abord une ionisation en présence d'ions métalliques divalents conduisant à un carbocation intermédiaire qui réagit ensuite avec une molécule d'eau pour former du linalol (Figure 16). La première LIS a avoir été purifiée et caractérisée l'a été à partir de stigmates floraux de *Clarkia breweri* (Pichersky et al. 1995). Il s'agit d'une protéine monomérique de 76 kDa (870 acides aminés) qui présente un K_m de 0,9 μ M pour le GPP et un maximum d'activité à pH 7,4. Un peptide d'adressage plastidial se trouve à l'extrémité N-terminale. Des études ont permis de montrer que l'accumulation transcriptionnelle du gène LIS ainsi que l'accumulation et l'émission du linalol ont lieu au même niveau, préférentiellement dans les cellules épidermiques (Pichersky et al. 1994, Dudareva et al. 1996, Dudareva & Pichersky 2000). Chez la vigne, comme pour le géraniol, seule la voie plastidiale du MEP est utilisée pour la biosynthèse du linalol (Luan et al. 2005). Par contre, des quantités similaires de linalol marqué sont observées dans le mésocarpe et l'exocarpe de la baie de raisin.

Le clonage de l'ADNc entier codant la LIS de *Clarkia breweri* a ouvert la porte à l'isolement d'autres séquences putatives de plantes. L'analyse des séquences peptidiques des LIS de *Clarkia breweri*, *Clarkia concinna*, *Arabidopsis thaliana*, et *Oenothera arizonica* suggère que le gène LIS soit un composite qui résulte d'un événement de recombinaison entre la première moitié du gène de la copalyl synthase et la seconde moitié de celui de la limonène synthase

(Cseke et al. 1998). Suite à ces travaux d'autres LIS ont été caractérisées chez *Artemisia annua* (Jia et al. 1999), *Mentha citrata* (Crowell et al. 2002), et *Fragaria ananassa* (Aharoni et al. 2004). Bien que pour la première fois la séquence peptidique de la LIS d'*Artemisia annua* soit très similaire à celle d'autres monoterpènes synthases, aucune trace de linalol n'a pu être mise en évidence dans les tissus exprimant le gène correspondant. Cette observation suggère que le GPP n'est peut-être pas le substrat naturel de cette enzyme *in vivo*. La LIS de *Mentha citrata* quant à elle présente plutôt des similarités avec les monoterpènes cyclases isolées chez la menthe tant sur le plan de sa séquence que sur le mécanisme réactionnel de synthèse du linalol. Aharoni et al 2004 ont isolé chez *Fragaria ananassa* un gène codant pour une nérolidol synthase (*FaNES1*) dont l'enzyme FaNES1 est capable de synthétiser du nérolidol et/ou du linalol selon le substrat, GPP ou FPP, dont elle dispose. La protéine étant exclusivement cytosolique, le nérolidol et le linalol sont tous les deux synthétisés dans ce compartiment cellulaire. Ainsi chez la fraise, le GPP et le FPP sont en quantité suffisante dans le cytosol pour permettre la synthèse de monoterpènes et de sesquiterpènes. Sur la base d'homologies de séquences et de l'absence du motif RRx₈W, cette enzyme se classe également dans la nouvelle sous-famille des *TPS-g*. Il s'agit de la première enzyme de cette famille capable de synthétiser un sesquiterpène. Les auteurs ont mis en évidence un second gène (*FaNES2*), dans le génome de la fraise, homologue à *FaNES1* qui présente en plus une séquence d'adressage plastidiale. *FaNES1* est très vraisemblablement issu de *FaNES2* mais en ayant perdu la séquence d'adressage, la protéine a vu sa localisation changée. Ainsi elle a été mise en contact avec un nouveau substrat ce qui l'a conduite à synthétiser un nouveau produit. Cette étude est un exemple de variation dans la diversité enzymatique d'une plante par modification de la localisation subcellulaire d'une enzyme et non par mutation d'un gène affectant l'activité enzymatique de la protéine correspondante. Wilfried Schwab 2003 a souligné l'importance de ce type de phénomène dans la diversité des composés secondaires synthétisés chez les plantes. En effet, les connaissances que nous avons acquises sur le génome des plantes, notamment celui d'*Arabidopsis thaliana*, ne permettent plus de croire au concept « un gène, une protéine, un produit », sinon comment 25 500 gènes pourraient-ils être à l'origine de centaines de milliers de composés (Bevan et al. 2001, Schwab 2003) ?

Matériels & Méthodes

1 Matériels

1.1 Matériel végétal

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés à partir du matériel végétal suivant :

- *Vitis vinifera* L. cv. gewurztraminer clone 47
- *Vitis vinifera* L. cv. muscat à petits grains blancs ou muscat de Frontignan
- *Vitis vinifera* L. cv. savagnin rose

1.1.1 Prélèvement de feuilles et de baies au vignoble

Les feuilles et baies utilisées ont été prélevées dans le vignoble de l'INRA de Colmar. De «jeunes feuilles» (2 à 3 cm de long), se situant de 1 à 3 mérithalles du bourgeon principal du rameau, ainsi que des «feuilles adultes», se situant de 10 à 15 mérithalles du bourgeon principal ; ont été prélevées et immédiatement plongées dans de l'azote liquide. Selon la même procédure, des baies ont été récoltées à différents stades de maturité de façon à encadrer la véraison et la maturation du fruit. Tout ce matériel végétal est conservé à -80°C.

1.1.2 Prélèvement de racines sur bouture fructifère

Des prélèvements de racines étant difficilement réalisables en champ, du matériel racinaire a été obtenu à partir de boutures fructifères. La production de boutures fructifères est réalisée à partir de rameaux aoûtés prélevés sur des vignes adultes au début du mois de janvier. Leur croissance est réinitiée en phytotron dans des conditions contrôlées de températures et d'humidité : température jour 22°C, nuit 20°C ; photopériode de 16h/8h ; 5°C de différence entre la partie racinaire et la partie végétative ; hygrométrie 80% à 90%. Les racines ont été prélevées après 8 semaines de croissance des plants.

1.2 Souches bactériennes d'*Escherichia coli*

Les souches XL1 Blue et DH5 α ont été utilisées pour le clonage et l'amplification des plasmides. La souche XL1 Blue permet l' α -complémentation de la partie amino-terminale du gène β -galactosidase et donc l'identification des plasmides avec insert.

XL1 Blue

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' *proAB lacIqZ* Δ M15
Tn10 (Tetr)]

DH5 α

F⁻ ϕ 80d*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA*
supE44 λ ⁻ *thi-1 gyrA96 relA1*

La souche M15, propriété de Qiagen, a été utilisée pour l'expression de gènes dans la bactérie. La société Qiagen reste discrète sur les détails du génotype de la souche mais donne le phénotype suivant : Na^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺. La souche est également résistante à la kanamycine car elle porte le plasmide pREP4 qui contient le gène *lacI* codant pour le répresseur *lac*. Qiagen conseille cette souche en complément des vecteurs d'expression pQE.

1.3 Levures

Les souches de levure utilisées pour ce travail sont des levures de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*. Les souches couramment utilisées ainsi que leurs génotypes sont présentés dans le Tableau 3.

La souche FY1679-28C dérive de la souche S288C (Thierry et al. 1995). Les souches 5247 et CC25 dérivent des souches sauvages FL100 (ATCC 28383) et FL200 (ATCC 32119) respectivement (Chambon et al. 1990, Soustre et al. 1996). La souche diploïde Y21258 (Euroscarf) a été utilisée pour la construction des souches haploïdes portant un gène *ERG20* disrupté par KanMX4. La cassette KanMX4 confère la résistance au G418 Sulfate (généticine).

Tableau 3 : Génotype des souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisées dans ce travail.

Souche	Génotype	ADNc exprimé
FL100	<i>Mat a, sauvage</i>	
FL200	<i>Mat α, sauvage</i>	
Y21258	<i>Mat a/α, his 3Δ1/his 3Δ1, leu 2Δ0 / leu 2Δ0, lys 2Δ0 / LYS 2, MET 15/ met 15Δ 0, ura 3Δ0 / ura 3Δ0, YJL 167W : : kan MX4/YJL 167W</i>	
FY1679-28C	<i>Mat a , ura3-52 , trp1Δ63 , leu2Δ1 , his3Δ200</i>	
5247	<i>Mat a , ura 3-1, trp1-1</i>	
CC25	<i>Mat α , ura 3-1, trp1-1, erg 20-2, erg 12-2</i>	
MO1	CC25 [pMO2]	vGPPS
MO2	CC25 [pMO5]	GES
MO3	CC25 [pMO6]	LIS
MO8	FY1679-28C [pMO2]	vGPPS
MO10	FY1679-28C [pMO5]	GES
MO11	FY1679-28C [pMO6]	LIS
MO25	5247 [pMO2]	vGPPS
MO27	5247 [pMO5]	GES
MO29	5247 [pMO2] [pMO5]	vGPPS GES
MO52	<i>Mat α , his3Δ1, leu2Δ, ura3Δ0, trp1Δ63 , erg20::kanMX4</i> [pMO9]	vFPPS-F

MO54	<i>Mat α</i> , <i>his3ΔI</i> , <i>leu2Δ</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>erg20::kanMX4</i> [pMO11]	vFPPS-C
MO56	<i>Mat α</i> , <i>his3ΔI</i> , <i>leu2Δ</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>erg20::kanMX4</i> , [pBS]	Erg20p
MO57	<i>Mat α</i> , <i>his3ΔI</i> , <i>leu2Δ</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>erg20::kanMX4</i> , [pKS]	Erg20-2p
MO59	FY1679-28C [pBS]	Erg20p
MO60	FY1679-28C [pKS]	Erg20-2p
MO63	<i>Mat α</i> , <i>his3ΔI</i> , <i>leu2Δ</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>erg20::kanMX4</i> [pMO14]	vFPPS-F
MO64	<i>Mat α</i> , <i>his3ΔI</i> , <i>leu2Δ</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>erg20::kanMX4</i> [pMO15]	vFPPS-C
MO59 GES	FY1679-28C [pBS] [pMO5]	Erg20p GES
MO60 GES	FY1679-28C [pKS] [pMO5]	Erg20-2p GES
MO52 GES	<i>Mat α</i> , <i>his3ΔI</i> , <i>leu2Δ</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>erg20::kanMX4</i> [pMO9]	vFPPS-F GES
MO54 GES	<i>Mat α</i> , <i>his3ΔI</i> , <i>leu2Δ</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>erg20::kanMX4</i> [pMO11]	vFPPS -C GES
MO56 GES	<i>Mat α</i> , <i>his3ΔI</i> , <i>leu2Δ</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>erg20::kanMX4</i> , [pBS]	Erg20p GES
MO57 GES	<i>Mat α</i> , <i>his3ΔI</i> , <i>leu2Δ</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>erg20::kanMX4</i> , [pKS]	Erg20-2p GES
MO63 GES	<i>Mat α</i> , <i>his3ΔI</i> , <i>leu2Δ</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>erg20::kanMX4</i> [pMO14]	vFPPS-F GES
MO64 GES	<i>Mat α</i> , <i>his3ΔI</i> , <i>leu2Δ</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>erg20::kanMX4</i> [pMO15]	vFPPS-C GES

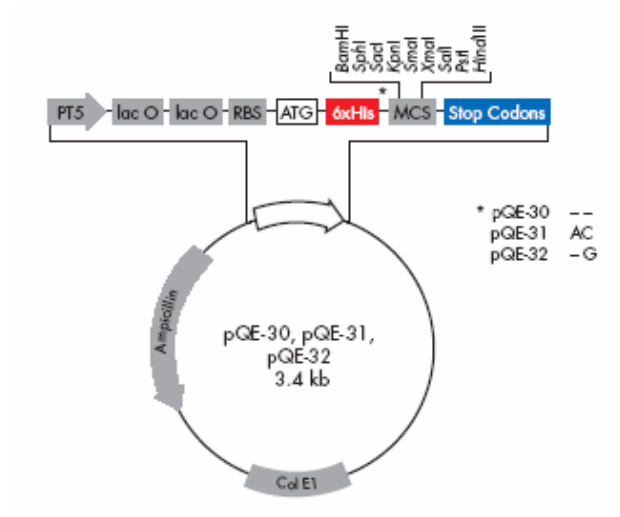


Figure 17 : Vecteur d'expression pQE30 pour *E. coli*.

1.4 Plasmides et vecteurs d'expression

1.4.1 Vecteur de répllication chez *E. coli* : **pGEM®-T Easy** (Promega)

Le vecteur pGEM®-T Easy est utilisé pour le clonage de fragments d'ADN amplifiés par PCR avec une polymérase ajoutant une déoxyadénosine aux extrémités 3'. Ce plasmide de 3015 pb possède une origine de répllication d'*E. coli*, une origine de répllication du phage filamenteux f1, un gène de résistance à l'ampicilline et un fragment du gène *lacZ* qui intègre la cassette de clonage pour permettre la sélection blanc-bleu des clones positifs. Les promoteurs des phages T7 et SP6 sont présents aux bords du site multiple de clonage. Le plasmide est vendu ouvert avec une déoxythymidine « sortante » aux extrémités 3'.

1.4.2 Vecteur d'expression chez *E. coli* : **pQE-30** (Qiagen)

Le vecteur pQE-30 est utilisé pour l'expression de protéines dans *E. coli*. Ce plasmide de 3400 pb possède l'origine de répllication Col E1 et un gène de résistance à l'ampicilline (Figure 17). Le système d'expression de protéine est basé sur le promoteur du phage T5 complété par deux séquences de l'opéron *lac* qui augmente l'efficacité du répresseur *lac*. Le plasmide possède également un site RBS (Ribosomal Binding Site) afin d'optimiser la traduction. L'arrêt de la transcription et de la traduction est assuré par la présence de multiples codons stop suivis de deux terminateurs. En amont de la cassette de clonage se trouve une séquence polyhistidine qui facilite la purification et la détection de la protéine hétérologue.

1.4.3 Vecteurs d'expression chez la levure

Les vecteurs utilisés pour l'expression de protéines hétérologues chez la levure sont des vecteurs navettes *E. coli* - *S. cerevisiae* ; leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 4. Tous ces vecteurs sont à haut nombre de copies ; ils possèdent tous l'origine de réplication du plasmide 2 μ .

Tableau 4 : Caractéristiques des plasmides d'expression chez la levure utilisés au cours de ce travail. (1) (Sauer & Stolz 1994), (2) (Sagot et al. 1999)

Nom et référence	Taille (pb)	Marqueur de sélection		Promoteur	Caractéristiques
		Levure	Bactérie		
pNEV-N (1)	7181	URA3	Amp ^R	PMA1	Site de clonage <i>NotI</i>
pMAGT	8244	TRP1	Amp ^R	PMA1	Origine pNEV-N - <i>ura3 :: trp1</i> - Cassette GFP sortie du plasmide pGB7 (2) par coupure <i>NotI-PvuII</i> et intégrée après ouverture <i>NotI-SmaI</i>
pMO1	7656	URA3	Amp ^R	PMA1	Origine pGB7 (2) - introduction du promoteur PMA1 par ligature dans le site <i>SacI-NotI</i> - protéine hétérologue fusionnée à la GFP en C-terminal

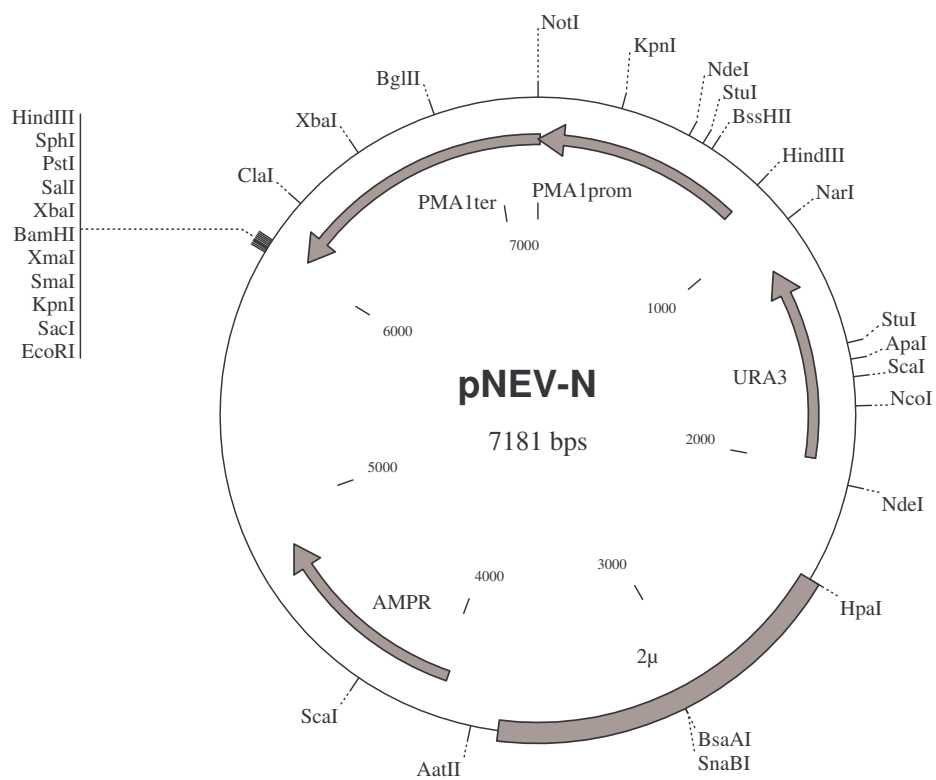


Figure 18 : Carte du vecteur d'expression dans la levure pNEV-N.

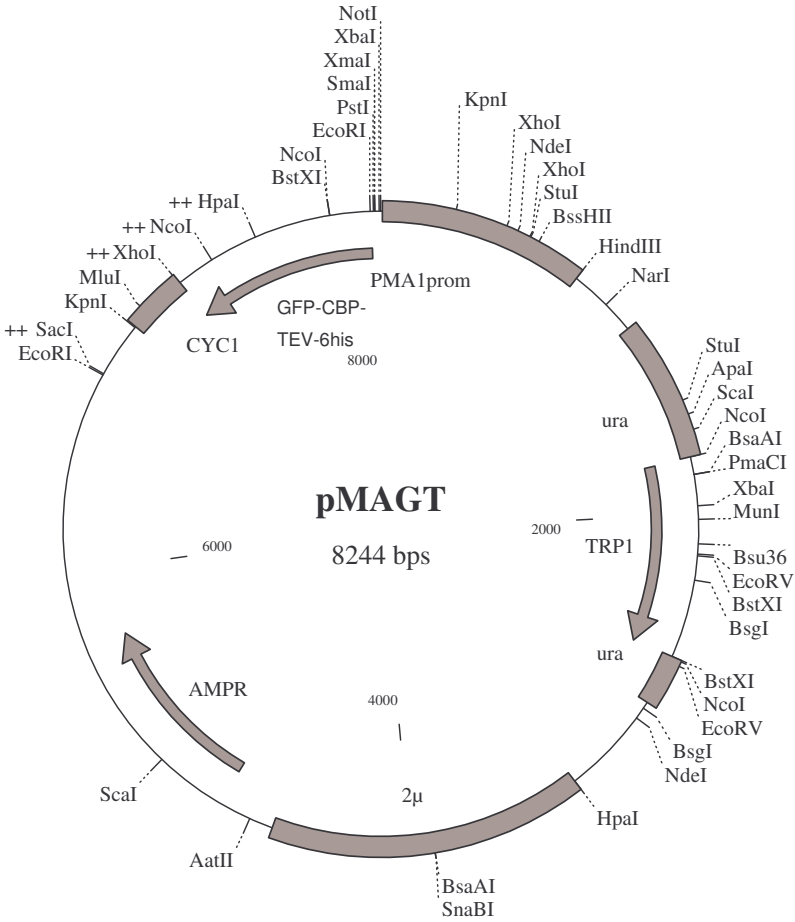


Figure 19 : Carte du vecteur d'expression dans la levure pMAGT.

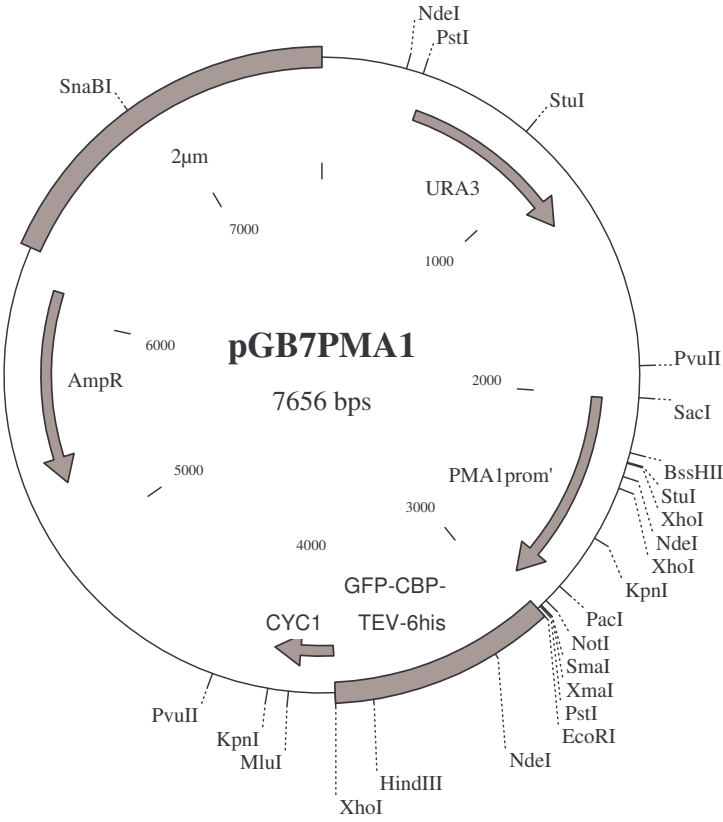


Figure 20 : Carte du vecteur d'expression dans la levure pMO1.

1.4.4 Plasmides construits au cours de ce travail

Les noms et caractéristiques des plasmides construits dans le cadre de ce travail et introduits dans la levure sont présentés dans le Tableau 5. Les ADNc des gènes *vGPPS*, *vFPPS*, *GES* et *LIS* ont été intégrés dans les plasmides par recombinaison homologue (voir Recombinaison homologue chez la levure). Les plasmides ont été préalablement ouverts au site *NotI*.

Les ADNc des gènes *ERG20* et *erg20-2* ont été introduits dans le plasmide pNEV-N par ligature après digestion par l'enzyme *NotI*.

Tableau 5 : Caractéristiques des plasmides construits au cours de ce travail.

<i>Nom du plasmide</i>	<i>Caractéristiques</i>
pMO2	pMO1 :: <i>vGPPS1-1</i> (ADNc codant l'allèle V de la GPPS de <i>Vitis vinifera</i>)
pMO5	pMAGT :: <i>GES</i> (ADNc codant la géraniol synthase d' <i>Ocimum basilicum</i>)
pMO6	pMAGT :: <i>LIS</i> (ADNc codant la linalol synthase de <i>Clarkia breweri</i>)
pMO9	pMO1 :: <i>vFPPS1-1</i> (ADNc codant l'allèle F de la FPPS de <i>Vitis vinifera</i>)
pMO11	pMO1 :: <i>vFPPS1-2</i> (ADNc codant l'allèle C de la FPPS de <i>Vitis vinifera</i>)
pBS	pNEV-N :: <i>ERG20</i> (ADNc codant la FPPS de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
pKS	pNEV-N :: <i>erg20-2</i> (ADNc codant la FPPS de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> portant la mutation K ¹⁹⁷ →E)
pMO14	pNEV-N :: <i>vFPPS1-1</i> (ADNc codant l'allèle F de la FPPS de <i>Vitis vinifera</i>)
pMO15	pNEV-N :: <i>vFPPS1-2</i> (ADNc codant l'allèle C de la FPPS de <i>Vitis vinifera</i>)

2 Méthodes

2.1 Méthodes de biologie moléculaire

2.1.1 Extraction d'acides nucléiques

2.1.1.1 Extraction d'ADN génomique de vigne

L'ADN génomique de vigne est extrait à partir de jeunes feuilles (Ø 1 à 2 cm) en suivant le protocole recommandé par le fournisseur du kit d'extraction « Dneasy Plant Mini Kit » (Qiagen).

2.1.1.2 Extraction d'ADN plasmidique bactérien

L'ADN plasmidique à séquencer est extrait de 3 ml d'une culture bactérienne d'une nuit à l'aide du kit « QIAprep Spin Miniprep Kit » (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

2.1.1.3 Extraction d'ADN plasmidique de levure

La préparation d'ADN plasmidique de levure ne permet pas son analyse directe car les quantités obtenues sont beaucoup trop faibles. Cet ADN est donc essentiellement utilisé pour transformer des bactéries afin de l'amplifier avant de pouvoir réaliser son analyse. Les levures peuvent provenir d'une culture en milieu solide ou liquide. Dans le premier cas, le milieu de culture est remplacé après centrifugation par 200 µl de TENS (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, SDS (p/v) 0.1%). Dans le second cas, une anse de cellules, en phase exponentielle de croissance, est mise en suspension dans 200 µl de TENS. Les cellules sont broyées à l'aide de billes de verre (Ø 0.45 µm) par agitation vigoureuse pendant 2 min. Le broyat est récupéré et centrifugé 10 min à 12 000 g. Le surnageant est extrait deux fois par un

volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v) puis deux fois par un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v). L'ADN est précipité par addition de deux volumes d'éthanol absolu et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M, pH5.2. Les sels sont éliminés par lavage à l'éthanol 70%, l'ADN est séché sous vide puis remis en suspension dans 20 µl d'eau déminéralisée. Généralement 10 µl de l'ADN ainsi préparé sont utilisés pour la transformation de bactéries compétentes perméabilisées au CaCl₂.

2.1.1.4 Extraction des ARN totaux de tissus végétaux

Les ARN totaux des tissus végétaux de types feuilles et racines de *Vitis vinifera* sont extraits à l'aide du kit « Rneasy Plant Mini kit » (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur. La concentration et la pureté des échantillons sont évaluées par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 unité d'absorbance = 40 µg ARN/ml) et 280 nm. Le ratio $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ doit être égal à 2 pour que les ARN soient purs.

2.1.1.5 Extraction des ARN totaux de baies de raisin

Les ARN totaux des tissus de baies de raisin sont extraits selon une méthode dérivée du protocole de *Davies et al* (1996). A partir de baies congelées, la pulpe et la pellicule sont séparées à l'aide d'une pince et d'un scalpel jusqu'à obtenir 200 mg de pellicule et 400 mg de pulpe. La pulpe des baies est écrasée à l'aide d'un pilon dans un mortier conservé à 4°C jusqu'à l'obtention d'un liquide épais sans grumeaux. La pellicule est broyée en fine poudre dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier. Les échantillons sont mélangés à 4 fois leur volume de tampon d'extraction (Perchlorate de sodium 5 M, Tris-HCl 0,3 M pH 8,3, PVPP 8,5% (p/v), PEG 4000 2% (p/v), SDS 1% (p/v), β-mercaptoethanol 1% (v/v)) et placés sous agitation lente pendant 30 min à température ambiante. Le mélange est filtré à travers de la laine de verre placée au fond d'un tube eppendorf par centrifugation à 200 g pendant 10 min. Les acides nucléiques présents dans la phase aqueuse sont précipités une première fois par ajout de 2,5 volumes d'éthanol absolu. Après une incubation de 20 min à -20°C, les échantillons sont centrifugés 15 min à 7700 g. Le culot obtenu est lavé avec 500 µl d'éthanol 70%, séché puis dissout dans 200 µl d'eau Dnase et RNase free (Sigma). La solution est

extraite deux fois par 1 volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 v/v) puis une fois par 1 volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1 v/v). Les ARN contenus dans la phase aqueuse sont additionnés de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 2,5 volume d'éthanol absolu puis stockés 20 min à -20°C . Une centrifugation de 20 min à 10 000 g permet de récupérer les ARN qui sont lavés à l'éthanol 70% et dissout dans 100 μl d'eau Sigma. La concentration et la pureté des échantillons sont évaluées par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 unité d'absorbance = 40 μg ARN/ml) et 280 nm.

2.1.2 PCR et méthodes dérivées

2.1.2.1 PCR classique

La PCR est réalisée à partir d'ADN plasmidique, génomique ou directement à partir de colonies bactériennes. Dans un volume final de 50 μ l, l'ADN est amplifié en présence de 0,1 μ M d'amorces, 0,24 mM de dNTP, 2,5 U. de *Taq polymérase* (Invitrogen) dans un tampon optimisé pour l'activité de l'enzyme contenant 1,5 mM de MgCl₂. La réaction se fait dans un Robocycleur Gradient 96 (Stratagene) équipé d'un couvercle chauffant.

Les conditions généralement utilisées lors de ce travail sont les suivantes : dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min suivie de 30 cycles composés chacun de 30 s à 94°C; 45 s à une température d'hybridation qui est fonction des amorces et 1 min/ kb d'ADN à amplifier à 72°C. Ces cycles sont suivis d'une élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits amplifiés sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

Pour chaque PCR, un témoin sans ADN est effectué permettant de contrôler si les amorces génèrent une amplification aspécifique. L'ensemble des amorces utilisées a été synthétisé par la société MWG Biotech.

2.1.2.2 Transcription reverse d'ARN en ADNc

Cette méthode permet d'obtenir des ADNc à partir d'une préparation d'ARN totaux. La réaction est réalisée par l'enzyme AMV RT (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase, Promega). Des amorces aléatoires (hexamères) sont utilisées afin d'obtenir un mélange statistique d'ADNc issu des ARN totaux. La réaction débute par l'incubation de 1 μ g d'ARN dilué dans 10 μ l pendant 10 min à 70°C afin d'éliminer les structures secondaires des ARN. La préparation est ensuite placée dans la glace pendant l'ajout de 2 μ l de tampon de réaction 10X, 4 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de dNTP 10mM et de 15 U. de reverse transcriptase pour un volume final de 20 μ l. Le mélange réactionnel est incubé 10 min à température ambiante pour permettre l'hybridation des amorces puis 30 min à 42°C. L'enzyme est ensuite dénaturée à 94°C pendant 5 min et l'ADNc obtenu est dilué 3X.

2.1.2.3 Sélection de clones recombinants par PCR

Après transformation avec les vecteurs pGEM-T easy ou pQE30, les colonies bactériennes sont analysées par PCR pour vérifier la présence effective de l'ADN recombinant et définir son sens d'insertion. Pour chaque clone, un cure-dent est inoculé et plongé dans un microtube pour réaliser une PCR classique dans un volume final de 12,5 µl. L'amplification est réalisée avec un couple d'amorces spécifiques de l'ADN recombinant ou la combinaison d'une amorce spécifique du plasmide et d'une amorce à l'intérieur de l'ADN intégré. Le programme d'amplification est classique et la température d'hybridation est fonction des amorces utilisées.

2.1.2.4 Elaboration de la RT-PCR semi-quantitative

Cette méthode moléculaire permet de réaliser une étude semi-quantitative de l'expression transcriptionnelle d'un gène. Elle consiste en une amplification simultanée de fragments différents, dans un même mélange réactionnel, à l'aide de deux couples d'amorces distincts. L'un des couples sert à synthétiser le standard interne tandis que l'autre conduira à l'amplification du fragment d'intérêt. Le standard interne utilisé est le transcrit de la β -tubuline de *Vitis vinifera* (Fillion et al. 1999). Les amorces, β -tubfw (ACAACGAAGCCAGTGGTGGGAAGGTACG) et β -tubrv (GGGTGGCAACGTTGAGAGTACGGAAGC), amplifient à 58°C un fragment de 507 pb à l'intérieur du transcrit (EbangOke 2003).

La PCR est réalisée dans les conditions classiques à partir de 0.5 à 2 µl d'ADNc matrice. La température d'hybridation des amorces est 60°C et 35 cycles ont été effectués. Les produits amplifiés sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%.

2.1.3 Purification de fragments d'ADN

2.1.3.1 Purification d'ADN à partir d'un gel d'agarose

Des fragments d'ADN de tailles différentes peuvent être séparés sur gel d'agarose puis purifiés individuellement. L'ADN est extrait du morceau d'agarose en suivant le protocole recommandé par le fournisseur du kit « QIAquick Gel Extraction Kit » (Qiagen).

2.1.3.2 Purification de fragments d'ADN obtenu par PCR

Lorsqu'il s'avère nécessaire de purifier un fragment d'ADN obtenu par PCR, les résidus du mélange de PCR sont éliminés à l'aide du kit « QIAquick PCR purification Kit » (Qiagen).

2.1.3.3 Méthode générale de purification de fragments d'ADN

Cette méthode peut être employée pour purifier tous types de fragments d'ADN provenant par exemple d'une digestion ou d'une déphosphorylation. L'échantillon est extrait une fois par un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 v/v) puis une fois par un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1 v/v). L'ADN est ensuite précipité par l'ajout de 10 µg de glycogène et d'un volume d'isopropanol. Le culot obtenu après 10 min de centrifugation à 12 000 g est lavé par 1 ml d'éthanol 70%. Après séchage, l'ADN est remis en suspension dans 20 µl d'eau déminéralisée.

2.1.4 Analyse d'acides nucléiques

2.1.4.1 Digestion par des endonucléases de restriction

La digestion enzymatique d'ADN s'effectue dans un volume de 10 à 20 μl avec une à deux endonucléases de restriction dans les conditions recommandées par les fournisseurs. Généralement la réaction se fait dans le milieu d'incubation suivant : ADN 0,1 à 1 μg , $1/10^{\circ}$ du volume final de tampon du fournisseur 10X et 2 à 10 unités d'enzyme. Le mélange réactionnel est incubé 2 heures à la température optimale. Les profils de restriction sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

2.1.4.2 Analyse des acides nucléiques par électrophorèse

La détermination de la taille, de la quantité et de la pureté d'un fragment d'ADN ainsi que la séparation de plusieurs ADN s'effectuent par électrophorèse sur un gel d'agarose de 0,8 à 2 % (selon la taille des fragments à séparer). Le gel est préparé dans du tampon TAE 0.5X (Tris acétate 20 mM pH8, EDTA 0,5 mM). Après une migration dans le même tampon pendant 30 min à 1h à 100 volts, le gel est coloré 10 min dans un bain de BET 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Les fragments d'ADN sont visualisés sous UV (300 nm) par la fluorescence du BET (agent intercalant) contenu dans l'ADN.

2.1.4.3 Séquençage et analyse des séquences

Le séquençage des ADN est réalisé par la plate-forme de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes de Strasbourg. Elle est équipée d'un séquenceur à électrophorèse capillaire 3100 d'Applied Biosystems. Les séquences ont été analysées et compilées à l'aide du logiciel Vector NTI Advance™ (Invitrogen). Les comparaisons de séquences ont été réalisées en interrogeant les banques de données (Genbank, SWISS-PROT et TIGR) à l'aide du programme BLAST du serveur NCBI. Les alignements de séquences ont été effectués à l'aide du programme MultAlin (Corpet 1988) et avec le logiciel Vector NTI Advance™ (Invitrogen).

2.1.5 Clonage d'ADNc amplifiés

2.1.5.1 Clonage dans le vecteur pGEM-T easy

Le clonage des gènes de *Vitis vinifera* a été réalisé dans le vecteur pGEM-T easy selon les instructions du fournisseur (pGEM-T easy vector systems, Promega).

Cette stratégie de clonage utilise l'activité déoxynucléotidyl terminal transférase de la *Taq* polymérase. L'enzyme ajoute une adénine supplémentaire à l'extrémité 5' des produits amplifiés. Quant au vecteur, il possède une thymine supplémentaire à ses extrémités permettant une hybridation (formation de liaisons hydrogènes) avec les extrémités cohésives complémentaires de l'insert.

2.1.5.2 Clonage par digestion / ligature

Pour réaliser cette technique, l'insert et le vecteur linéarisé doivent posséder tous deux des extrémités cohésives complémentaires. Le vecteur est ouvert par une ou deux enzymes de restriction reconnaissant des sites au niveau de la cassette de clonage. Les extrémités sont ensuite déphosphorylées 2 heures par 2 U. de phosphatase alcaline de crevette (USB).

Le fragment à insérer peut déjà être contenu dans un vecteur (pGEM-T easy par exemple) ou avoir été obtenu par PCR. Il est digéré par les enzymes de restriction compatibles avec le vecteur. Les produits de digestion sont purifiés selon la méthode générale de purification d'ADN avant d'être quantifiés sur gel d'agarose 1%.

La ligature est effectuée 20 h à 12°C dans un volume de 10 µl en présence de 30 à 50 ng de vecteur, d'une quantité d'ADN à insérer équivalente à un nombre d'extrémités cohésives 3 fois plus important, de 1 U. de T4 DNA ligase (Fermentas), le tout dans un tampon optimisé par le fournisseur pour l'activité de l'enzyme. Le produit de ligature est ensuite utilisé pour transformer une souche bactérienne par la méthode au CaCl₂.

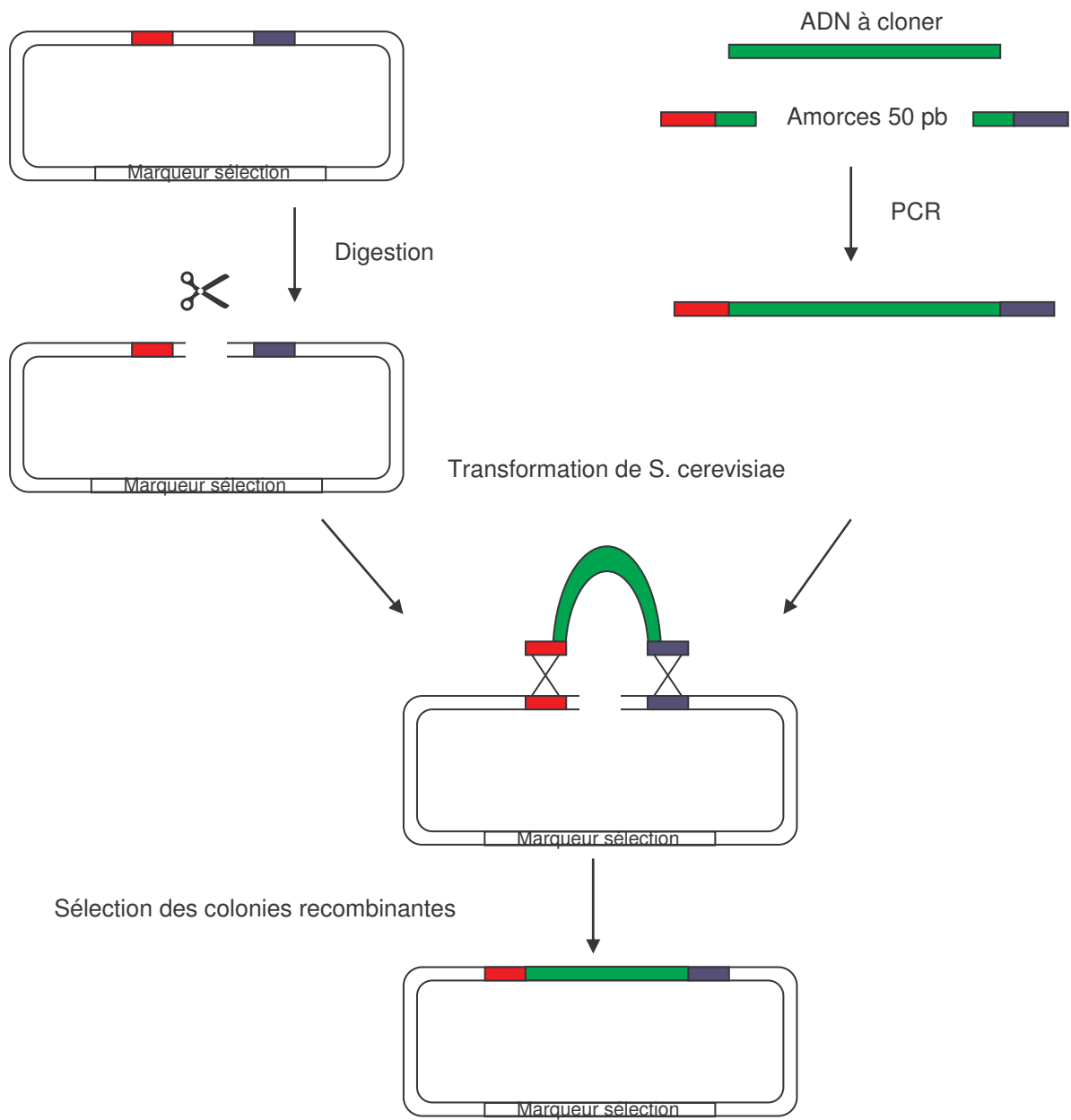


Figure 21 : Clonage d'un fragment d'ADN par recombinaison homologue chez la levure.

2.1.5.3 Recombinaison homologue chez la levure

La technique de recombinaison homologue permet d'intégrer un fragment d'ADN dans un vecteur sans passer par une étape de ligature (Figure 21). L'ADN doit présenter à ses extrémités une séquence identique à celle des extrémités du vecteur pour pouvoir être intégré dans le plasmide par les mécanismes de recombinaison du micro-organisme et ainsi le recirculariser. L'insertion se fait dans la cassette de clonage au nucléotide près.

L'ADN à insérer dans le vecteur est amplifié par une PCR classique à l'aide d'amorces de 50 pb dont les 30 de tête sont homologues aux extrémités du plasmide et les 20 derniers sont identiques à l'ADN à amplifier. Le vecteur est linéarisé par digestion dans la zone où doit se faire la recombinaison. Les deux ADN sont mélangés dans un rapport vecteur/insert de 1 pour 4 et utilisés pour transformer une souche de levure par la méthode à l'acétate de lithium.

Cette technique a été utilisée pour réaliser les insertions des ADNc *vGPPS*, *vFPPS*, *GES*, *LIS* et *DPP1* dans les vecteurs d'expression pMAGT et pMO1. L'amplification des ADNc est réalisée par PCR classique à l'aide des amorces longues présentées dans le Tableau 6 en utilisant comme matrice des plasmides contenant les gènes. Le produit de réaction est digéré par *DpnI* afin d'éliminer l'ADN matrice pouvant interférer à l'étape de la transformation. Les vecteurs sont linéarisés en aval du promoteur PMA1 par *NotI* et le mélange des deux ADN est transféré dans la souche FY1679-28C. Dans le cas du travail avec les vecteurs pMAGT et pMO1, les colonies ayant réalisées la recombinaison sont repérées par leur capacité à émettre de la lumière fluorescente sous éclairage UV car la recombinaison doit placer les ADNc en fusion avec le gène de la GFP.

Tableau 6 : Séquence des amorces utilisées pour amplifier les ADNc à cloner par recombinaison dans les plasmides pMAGT ou pMO1.

<i>ADNc</i>	<i>Amorces pour recombinaison</i>
<i>vGPPS</i>	recGPPSfw : (5' GAAAGAAAAAAAAATATACCCCAGCGGCCGCATGGTGGTTGCTGAGGTCCC 3') pBGPPSrv : (5' CCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTTTAGTTCTTGTAATGACTC 3')
<i>vFPPS</i>	pBpMA1fw : (5' TTGTAATACACTCACTATAGGGCGAATTGGCTTCCTGAAACGGAGAAACA 3') pBFPPSrv : (5' CCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTCTTCTGTCTCTTGTAATCTTC 3')
<i>GES</i>	recGESfw : (5' GAAAGAAAAAAAAATATACCCCAGCGGCCGCATGCCTCTAAGTTCAACTCC 3') recGESrv : (5' CCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTTGAGTGAAGAAGAGGGCATC 3')
<i>LIS</i>	recLISfw : (5' GAAAGAAAAAAAAATATACCCCAGCGGCCGCATGCAGCTCATAACAAATTT 3') recLISrv : (5' ATCCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTACTGAAACATAGTTTGATGT 3')
<i>DPPI</i>	recDPP1fw : (5' GAAAGAAAAAAAAATATACCCCAGCGGCCGCATGAACAGATTTTCGTTTAT 3') recDPP1rv : (5' ATCCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTTACATACCTTCATCGGAC 3')

2.2 Méthodes microbiologiques

2.2.1 Conditions de culture

2.2.1.1 Levures

Les souches de levure ont été cultivées à 28°C ou 36°C en milieu liquide ou solide. La culture en milieu liquide se fait selon un rapport volume de culture / volume du contenant de 1/5 sous agitation à 200 rotations / min et sur milieu solide en boîtes de pétri contenant 2% d'agar (Difco).

Milieu complet (YPG) :	Bacto Peptone (Difco)	10 g
	Bacto Yeast Extract (Difco)	10 g
	glucose	20 g
	eau distillée qsp	1 l
	stérilisation 20 min à 120°C	
Milieu minimum (YNB) :	Yeast Nitrogen Base (Difco)	
	sans acides aminés et sans sulfate d'ammonium	1,7 g
	sulfate d'ammonium	5 g
	glucose	10 g
	eau distillée qsp	1 l
	stérilisation 15 min à 110°C	
Milieu de sporulation (ACK) :	acétate de potassium	10 g
	eau distillée qsp	1 l
	stérilisation 20 min à 120°C	

Nutriments supplémentaires nécessaires à la croissance :

Les acides aminés sont ajoutés à une concentration finale de 50 µg/ml à partir d'une solution mère à 10 mg/ml.

L'ergostérol est utilisé à 80 µg/ml en milieu solide et à 2 µg/ml en milieu liquide. L'ergostérol est préparé à 5 mg/ml dans un mélange Tergitol NP-40 – éthanol (1 :1 V/V). Cette solution est conservée à température ambiante et à l'obscurité.

2.2.1.2 Bactéries

Les cultures de *E. coli* sont effectuées en milieu liquide sous forte agitation ou en milieu solide (agar Difco 2%) à 37°C.

Milieu Luria-Bertani (LB) :	Bacto Tryptone (Difco)	10 g
	Bacto Yeast Extract (Difco)	5 g
	NaCl	10 g
	eau distillée qsp	1 l
	stérilisation 20 min à 120°C	

L'ampicilline est utilisée à 100 µg/ml à partir d'une solution mère à 100 mg/ml et la kanamycine à 50 µg/ml à partir d'une solution mère à 50 mg/ml. Les solutions sont conservées à -20°C.

Pour le test d' α -complémentation du gène *lacZ* chez *E. coli*, le X-Gal (2% dans le DMF) est utilisé à 40 µg/ml et l'IPTG (0,1M) à 40µM.

2.2.2 Mesure de la croissance cellulaire

2.2.2.1 *En milieu liquide*

Pour les levures comme pour les bactéries, la croissance cellulaire est estimée par mesure de la turbidité du milieu de culture à une longueur d'onde de 600 nm (spectrophotomètre Beckman DU 64). Notons que le rapport D.O./concentration cellulaire est linéaire jusqu'à D.O.= 0,3. Au-delà de cette valeur il est indispensable d'effectuer les mesures à partir de dilutions de la culture.

2.2.2.2 *En milieu solide*

La croissance cellulaire des levures peut être estimée sur boîte de pétri par un test en gouttes. Les cellules sont mises en suspension dans de l'eau stérile et une goutte est déposée sur la gélose. Une fois le liquide absorbé, la boîte de Pétri est incubée dans les conditions souhaitées. La croissance est évaluée suivant une échelle arbitraire par comparaison avec celle de souches témoins placées sur la même boîte. Par ordre décroissant, la croissance cellulaire est notée +++, ++, +, ε ou 0. La suspension cellulaire peut être déposée sur plusieurs milieux différents et des dizaines de souches peuvent être testées simultanément. Ainsi, ce test simple peut permettre de déterminer le phénotype des souches.

2.2.3 Analyse génétique chez la levure

2.2.3.1 *Détermination du signe sexuel*

Une souche haploïde de *S. cerevisiae* peut être de signe sexuel a ou α. Deux souches de signes sexuels opposés mises en contact sont capables de former de manière transitoire des zygotes, qui ont une morphologie caractéristique visible au microscope photonique avant de prendre leur forme définitive indistincte de celle des cellules haploïdes.

Une souche de signe sexuel inconnu est croisée indépendamment avec des souches de références a et α . Les souches sont précultivées sur milieu complet pendant une nuit puis pour chaque croisement une petite quantité des deux souches est mélangée intimement sur la gélose. Après 3 à 4 heures d'incubation à 28°C, l'observation au microscope optique permet de mettre en évidence ou non, dans le mélange de copulation, les formes caractéristiques des zygotes. Cette technique peut également être utilisée pour s'assurer de l'haploïdie d'une souche.

2.2.3.2 Isolement de souches diploïdes

Lorsque la souche diploïde nouvellement obtenue possède un phénotype différent de celui des deux souches mères, il est possible d'isoler la souche diploïde simplement en repiquant le mélange de croisement sur un milieu sélectif où seules les cellules diploïdes pourront se développer.

2.2.3.3 Isolement de souches haploïdes

Les souches diploïdes sont précultivées sur milieu complet pendant 24 heures à 28°C. Elles sont ensuite transférées sur le milieu de sporulation ACK et incubées de 3 à 5 jours à 28°C. La sporulation est vérifiée au microscope photonique par l'apparition d'asques renfermant les spores.

2.2.3.4 Analyse en masse de spores

La méthode du « killing à l'éther » permet d'éliminer sélectivement les cellules végétatives mélangées aux asques. Lorsque les asques sont formées, le mélange de sporulation est mis en suspension dans 1 ml d'eau puis 1 ml d'éther éthylique est ajouté. L'ensemble est mélangé vigoureusement pendant 1 min à l'aide d'un vortex puis incubé 20 min à température ambiante. Après élimination de la phase étherée, la phase aqueuse contenant les levures est diluée de manière à étaler 100 à 200 spores par boîte de pétri. Les spores sont mises à germer sur milieu complet jusqu'à l'apparition des colonies.

2.2.4 Techniques de transformation

2.2.4.1 Transformation d'*Escherichia coli* par choc thermique

Préparation des bactéries compétentes :

Un volume de 200 ml de milieu LB est inoculé au 1/100 (V/V) avec une préculture. Les bactéries sont cultivées à 37°C sous forte agitation jusqu'à $D.O_{600nm}=0,3-0,5$. L'erenmeyer est placé dans la glace pendant 10 min. Les cellules sont centrifugées 10 min à 5000 g à 4°C, le culot est remis en suspension dans 200 ml de $MgCl_2-CaCl_2$ (80mM, 20mM). Après centrifugation 10 min à 5000g à 4°C, les cellules sont reprises dans 3 ml de $CaCl_2$ 100mM et maintenues dans la glace. Après avoir ajouté 250 µl de DMSO, la suspension bactérienne est aliquotée par 200 µl. Les bactéries compétentes ainsi préparées peuvent être conservées plusieurs mois à -80°C.

Transformation par choc thermique :

Un aliquot de 200 µl de bactéries est décongelé dans la glace puis 10 à 100 ng d'ADN à transférer sont ajoutés. Le mélange est incubé dans la glace pendant 30 minutes. Le choc thermique est réalisé par transfert du tube à 42°C pendant 1 min 30 s et retour immédiat dans la glace pendant 2 min. Après l'ajout de 1 ml de milieu LB, le mélange est incubé 1 h à 37°C sous agitation afin de permettre l'expression du gène de résistance à l'antibiotique présent sur le plasmide. Les bactéries sont ensuite étalées sur milieu LB contenant l'antibiotique adéquat. Les clones apparaissent après 12 heures d'incubation à 37°C.

2.2.4.2 *Transformation de Saccharomyces cerevisiae à l'acétate de lithium*

Les levures sont cultivées dans 30 ml de YPG à 30°C sous agitation jusqu'à la phase stationnaire de croissance. Cette culture, conservée à 4°C, peut être utilisée pendant un mois pour une transformation à l'acétate de lithium. Un volume de 1,5 ml de culture est centrifugé 5 min à 5000 g puis 0,2 à 0,5 µg d'ADN transformant et 40 µg d'ADN entraîneur (solution d'ADN de sperme de saumon à 10 µg/µl) sont ajoutés au culot. Les cellules sont remises en suspension dans 100 µl de tampon ONE STEP (acétate de lithium 0,2 M, PEG 40%, DTT 100 mM) et le mélange est incubé 30 min à 45°C. Les levures sont étalées sur milieu sélectif et les clones apparaissent après 3 à 4 jours d'incubation à 30°C.

2.3 Méthodes biochimiques

2.3.1 Analyse des terpénols synthétisés par *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.1.1 Cultures des levures

Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont cultivées dans 150 ml de milieu minimum à 30°C jusqu'à la phase stationnaire de croissance. La densité optique de la culture à 600 nm est mesurée avant d'éliminer les cellules par centrifugation 5 min à 4000 g. Le surnageant est stocké à -20°C en attendant d'être analysé.

2.3.1.2 Extraction des terpénols du milieu de culture

L'extraction des terpénols est réalisée à partir de 40 ml du surnageant de culture par extraction en phase solide (SPE). Au préalable, le pH du milieu est ajusté à 8,5 par ajout de quelques gouttes d'une solution de NaOH 4N. L'alcalinisation permet de conserver les acides organiques dans la phase aqueuse. De l'eugénol (40 µg) est ajouté comme témoin d'extraction et le mélange est fractionné sur une cartouche Bond Elut C18 de 5g (Varian). La cartouche est préalablement conditionnée au méthanol puis rincée à l'eau. Les terpénols sont élués par 10 ml de dichlorométhane. L'extrait organique est ensuite séché à l'aide de Na₂SO₄ concentré sous un flux d'azote jusqu'à un volume d'environ 500µl ; du m-crésol (20 µg) est ajouté comme standard interne puis l'échantillon est stocké à -20°C en attendant d'être analysé par GC-MS.

2.3.1.3 Identification et quantification des terpénols par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les terpénols sont identifiés par analyse sur un chromatographe en phase gazeuse Varian 3300 équipé d'un injecteur *on column* SPI couplé à un spectromètre de masse quadripolaire HP 5970 en mode impact électronique à 70 eV. Les spectres de masses sont enregistrés par le logiciel HP ChemStation v. A.03.00 et interprétés à l'aide de la banque de données Wiley 275. La séparation de 1 µl d'extrait est réalisée sur une colonne DB-Wax de 60 m de long, 0,32 de diamètre et 0,5 µm d'épaisseur de film en utilisant l'hélium, débité à une pression constante de 9 psi, comme gaz vecteur. Les conditions de séparation sont les suivantes : température initiale de l'injecteur 70°C maintenue 30s puis augmentation à 220°C à la vitesse de 160°C min⁻¹, température du four passant de 67°C à 235°C selon un gradient de 2,7°C min⁻¹ sans plateau initial, plateau à 235°C maintenu pendant 50 min. Les quantités totales de monoterpénols sont déterminés à partir d'une courbe de calibration linéaire entre 0 et 200 µg l⁻¹ (R²>0,98).

2.3.1.4 Evaluation de la répétabilité et du rendement d'extraction de la méthode d'analyse

Les rendements d'extraction du linalol, citronellol, géraniol et de l'eugénol ont été déterminés à partir d'une solution modèle ajoutée à un surnageant de culture de la souche FY1679-28C. Les taux d'extraction sont de 47% pour le linalol, 52% pour le citronellol, 55% pour le géraniol et 56% pour l'eugénol utilisé par la suite comme standard interne.

La répétabilité de la méthode d'extraction a été appréciée par analyse des teneurs en terpénols produits par la souche MO2. Un surnageant de culture a été extrait trois fois simultanément dans les mêmes conditions expérimentales. Les coefficients de variations obtenus sont de 5,1% pour le linalol, 2,4% pour le citronellol et 4,8% pour le géraniol.

La répétabilité de l'analyse chromatographique a été évaluée à partir de la comparaison des surfaces de pics de monoterpénols obtenues lors de quatre injections de trois extraits différents. Le coefficient de variation moyen est de 4,4%.

2.3.2 Analyse des stérols chez *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.2.1 Préparation des cellules

Les cellules sont cultivées dans 100 ml de milieu minimum et récoltées en phase stationnaire de croissance par centrifugation 5 min à 4000 g. Le culot est déshydraté par lyophilisation pendant une nuit (lyophilisateur Christ Alpha 1-2). Les stérols sont extraits à partir de 50 mg de poids sec de levure.

2.3.2.2 Extraction des stérols

Les stérols ont été extraits par la méthode de saponification de Breivik & Owades 1957. Les levures lyophilisées sont hydratées avec 100 μ l d'eau distillée. Deux ml de potasse méthanolique 40% (p/v) sont ajoutés et les cellules sont saponifiées 60 min à 95°C. Après addition de 0.7 ml d'eau distillée, la fraction insaponifiable est extraite 3 fois avec 2 ml d'heptane. La fraction heptanique est déshydratée par percolation sur une colonne de sulfate de sodium anhydre. Le volume de l'échantillon est ensuite mesuré à l'aide d'une pipette.

2.3.2.3 Analyse par spectrométrie

Les stérols possédant deux doubles liaisons conjuguées en C5 et C7 présentent des maxima d'adsorption à 271, 281,5 et 290 nm. Chez la levure, les Δ -5,7-diénoles sont en général l'ergostérol (75%) et l'ergosta-5,7-diénole (25%). Le spectre d'adsorption de la fraction heptanique est réalisé de 320 nm à 220 nm sur un spectrophotomètre Beckman DU 64. La quantité de stérols possédant les deux doubles liaisons est calculée à partir du coefficient d'extinction molaire de l'ergostérol. Ce coefficient est de 11 500 l.mole⁻¹.cm⁻¹ dans l'heptane.

$$\text{Quantité de } \Delta\text{-5,7-diénols (mg)} = \frac{\text{A281.5 X volume heptane (ml) X 396 (g.mol}^{-1}\text{)}}{11\ 500}$$

396 correspond à la masse molaire de l'ergostérol qui est le stérol majoritaire. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'ergostérol par gramme de poids sec.

2.3.2.4 Analyse par chromatographie en phase gazeuse

L'analyse de la composition en stérols est réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Trace GC (ThermoQuest) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), d'un injecteur *on column*, d'une précolonne en tube de silice désactivée de 1m de long et 0,53 mm de diamètre et d'une colonne capillaire SPBTM-5 (Supelco) de 15 m de long, 0,32 mm de diamètre et 0,25 µm d'épaisseur de film. Le programme de température de colonne utilisé pour séparer les stérols de levure est le suivant : un gradient de 30°C min⁻¹ de 60°C à 220°C puis de 3°C min⁻¹ de 220°C à 290°C et un plateau de 5 min à 290°C. Le gaz vecteur est l'hélium, il est débité de manière constante à 1,3 ml min⁻¹ et le FID est à une température de 290 °C. Les injections des échantillons (1µl) sont réalisées par un passeur automatique AS 2000 (Thermo Finnigan).

Le cholestérol est utilisé comme étalon interne et permet de calculer le temps de rétention relatif des stérols de levure pour chaque analyse. Ainsi les temps de rétention relatifs pour les produits majeurs caractérisés chez *S. cerevisiae* sont :

Squalène : 0,78	Zymostérol : 1,05
Ergostérol : 1,07	Ergosta-8-énol : 1,10
Ergosta-5,7-diénoles : 1.13	Lanostérol : 1,18

Les pourcentages de chaque stérol par rapport aux stérols totaux sont exprimés en %aire / %aire totale après analyse du chromatogramme.

2.3.3 Analyse de protéines

2.3.3.1 *Extraction des protéines de Saccharomyces cerevisiae*

A partir d'une culture de levures de 50 ml de milieu minimum, les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance par centrifugation 5 min à 4000 g. Elles sont lavées une fois avec de l'eau stérile froide puis une fois dans du tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 froid. Le culot est remis en suspension dans 200 µl de tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 froid. Les cellules sont broyées à l'aide de billes de verre (Ø 0.45 µm) par agitation vigoureuse pendant 5 min. La phase aqueuse est récupérée, les billes sont rincées une fois avec 200 µl de tampon puis le mélange est centrifugé 5 min à 4000 g afin d'éliminer le restant des billes et le plus gros des débris cellulaires. Le surnageant est centrifugé une seconde fois 15 min à 14 000 g. La solution protéique obtenue est prête à être dosée et utilisée pour une immunodétection. Elle est stockée à -80°C.

2.3.3.2 *Dosage des protéines (méthode de Bradford, 1976)*

Le dosage des protéines se fait suivant la méthode de Bradford à l'aide du kit « Bio-Rad Protein Assay » (Bio-Rad). Cette technique se base sur la modification de la longueur d'onde d'absorption du bleu de Coomassie G-250 lorsque ce dernier se fixe sur les protéines (entre 460 nm et 595 nm). La courbe étalon est réalisée avec une solution de BSA (2 µg/ml à 20µg/ml).

2.3.3.3 *Séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes*

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10% (épaisseur 0,75 mm) en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli (1970). Le gel est constitué d'un gel de concentration à 4% (acrylamide-bisacrylamide 19/1 ; Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; SDS 0,1%) et d'un gel de concentration à 10% (acrylamide-bisacrylamide 19/1 ; Tris-HCl 0,15 M pH 8,8 ; SDS 0,1%). Les protéines diluées au ½ dans le tampon de charge (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 ; SDS 5% ; glycérol 10% ; β-mercaptoethanol 5% ; bleu de

bromophénol 0,005%) sont chauffées 10 min à 95°C puis 40 µg sont déposés sur le gel. L'électrophorèse est conduite sous une intensité constante de 20 mA dans le tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 200 mM, SDS 0.1%). Le gel peut ensuite être soit coloré au bleu de Coomassie ou bien les protéines peuvent être transférées sur une membrane pour la réalisation d'un Western Blot.

2.3.3.4 Coloration au bleu de Coomassie

Les protéines séparées sur gel de polyacrylamide sont mises en évidence par coloration au bleu de Coomassie. Le gel est plongé pendant une heure sous agitation dans une solution de coloration contenant 10% d'acide acétique, 25% d'éthanol et 0.1% de bleu de Coomassie R-250. La décoloration est réalisée par plusieurs lavages successifs dans une solution d'acide acétique 10%, éthanol 25%.

2.3.3.5 Western Blot : immunodétection

La technique consiste à séparer les protéines en gel de polyacrylamide dénaturant puis à les transférer sur une membrane pour la détection des protéines d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifiques. Un anticorps anti-GFP a été utilisé pour révéler la présence des protéines recombinantes fusionnées à la GFP exprimées dans la levure.

Les protéines séparées sur gel dénaturant sont transférées sur membrane de nitrocellulose Optitran BA-S85 (Schleicher & Schuell) par électro-transfert semi-sec. Le gel et la membrane sont pris en "sandwich" entre deux papiers « Gel Blot Paper » (Schleicher & Schuell). Les protéines sont transférées par l'application d'un courant continu de 2,5 mA/cm² de membrane pendant 45 min dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 200 mM, éthanol 20%).

Avant d'effectuer l'immunodétection, la membrane est saturée pendant 1 h dans une solution tampon TBS/Tween 20 2% (TBS : Tris-HCl 20 mM pH 7.8, NaCl 250 mM) puis rincée 5 min dans du tampon TBST (TBS + 0.05% Tween 20). Une première incubation de 2 h avec l'anticorps primaire de souris anti-GFP (Roche) dilué au 1/3000^{ème} est réalisée. La membrane est ensuite rincée 3 X 15 min avec du TBST. Une seconde incubation de 2 h est réalisée en

présence de l'anticorps secondaire anti-souris IgG (Sigma) dilué au 1/5000^{ème}, dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à la phosphatase alcaline. A l'issue de l'incubation la membrane est lavée comme précédemment.

La révélation du complexe protéine-anticorps se fait par détection de l'activité phosphatase alcaline. La membrane est incubée quelques secondes dans un mélange de Tris-HCl 0,1 M pH 8,6 ; Fast blue RR salt 1 mM ; α -Naphthyl phosphate 0,6 mM. Des bandes noires apparaissent au niveau des complexes.

2.3.4 Mesure des activités GPPS et FPPS in vitro

La technique décrite dérive de celle proposée par (Croteau & Purkett 1989). Elle permet l'extraction par l'hexane des produits acido-labiles ayant incorporés du [¹⁴C]IPP (Sigma).

Le mélange réactionnel standard est le suivant :

Protéines	20 à 100 μ g
[¹⁴ C]IPP (2,9 mCi mmol ⁻¹)	0,64 μ M
DMAPP / IPP	10 μ M / 5 μ M
MgCl ₂	5 mM
MnCl ₂	1 mM
Tampon phosphate 50 mM pH7	qsp 200 μ l

Le mélange réactionnel est incubé 15 min à 30°C. Après addition de 100 μ l d'HCl 2N, l'hydrolyse acide est réalisée pendant 15 min à 37°C. Les produits acido-labiles sont extraits par 200 μ l d'hexane par agitation forte du tube pendant 1 min. Après centrifugation, un aliquot de la phase hexanique (50 μ l) est compté 2 min en scintillation liquide (LS6500 Beckman Coulter). L'activité spécifique GPPS ou FPPS est exprimée en quantité d'IPP transformé par mg de protéine et par minute.

2.4 Observation de colonies de levures fluorescentes sous éclairage UV

Afin de sélectionner les colonies de levures recombinantes exprimant des protéines fusionnées à la GFP, les boîtes de pétri ont été observées sous une loupe Nikon SMZ 1500 équipée d'un objectif HR Plan Apo 1X, d'un filtre EX 480/40 DM505 BA 510 et reliée à un éclairage UV Nikon HB 10104AF.

2.5 Localisation subcellulaire dans la levure de protéines fusionnées à la GFP par microscopie confocale

Les souches de levures exprimant des protéines fusionnées à la GFP ont été observées par microscopie confocale à la plate-forme de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes de Strasbourg. Il dispose d'un microscope confocal LSM 510 de marque Zeiss équipé d'un objectif Apochromat 63X. Les images sont traitées à l'aide du logiciel LSM 5 Image Browser (Zeiss).

Partie I

Isolement et caractérisation de gènes impliqués dans la biosynthèse des monoterpénols chez *Vitis vinifera*

L'arôme du vin est très complexe en raison du grand nombre et de la diversité structurale des composés volatils qui le composent. Les monoterpénols jouent un rôle important dans les caractéristiques organoleptiques des cépages aromatiques comme le gewurztraminer ou le muscat. Leurs odeurs florales et fruitées peuvent rappeler le muguet pour le linalol, le citron pour le nérol ou la rose pour le géraniol. L'importance des monoterpénols dans la qualité des vins blancs d'Alsace et leur typicité a motivé l'étude du déterminisme génétique de leur biosynthèse.

Le précurseur universel de la biosynthèse des monoterpénols est le géranyl diphosphate (GPP). Dans l'objectif d'appréhender les mécanismes moléculaires à la base de la spécificité de synthèse des monoterpénols chez les cépages aromatiques de vigne, notre intérêt s'est porté, dans un premier temps, sur les enzymes clés de la synthèse de GPP : la géranyl diphosphate synthase (GPPS) et la farnésyl diphosphate synthase (FPPS). Afin de pouvoir évaluer, dans un second temps, l'importance de l'implication des terpènes synthases dans la métabolisation du GPP chez les cépages aromatiques de vigne, nous avons entrepris d'isoler la séquence d'une terpène synthase potentielle de *Vitis vinifera*.

1 Etude d'un gène codant une potentielle géranyl diphosphate synthase de *V. vinifera*

1.1 Isolement de l'ADNc d'une GPPS *Arabidopsis thaliana*-like

1.1.1 Analyse des séquences existantes et détermination d'amorces dégénérées

Seules quelques activités GPPS ont pu être mises en évidence chez les plantes et la plupart au niveau de tissus spécialisés dans la synthèse de quantités importantes de monoterpénols (trichomes, idioblastes, canaux sécréteurs) (Croteau & Purkett 1989, Heide & Berger 1989, Clastre et al. 1993, Tholl et al. 2001). Des travaux réalisés chez la vigne ont permis la purification d'une GPPS d'une masse moléculaire de 68 kDa dans sa forme native et de 66 kDa sous forme dénaturée (Clastre et al. 1993). La purification des protéines GPPS s'étant révélée difficile, l'isolement et la caractérisation d'ADNc codant des GPPS n'a pu être réalisée que récemment. Ainsi seulement deux gènes codant une GPPS de plante avaient été caractérisés lorsque ce travail a débuté ; un premier chez *Mentha piperita* et un second chez *Arabidopsis thaliana*. Burke et al. 1999 ont montré que la GPPS de menthe se compose d'une grande sous-unité de 37 kDa et d'une petite sous-unité de 28 kDa. A l'inverse, la GPPS d'*Arabidopsis thaliana* est constituée de deux sous-unités identiques de 45 kDa (Bouvier et al. 2000). Toutes ces informations ne permettant pas de cloner directement l'ADNc codant la GPPS de *Vitis vinifera*, nous avons décidé de réaliser des amplifications par PCR sur ADN génomique à l'aide d'amorces dégénérées définies à partir des séquences des deux formes de GPPS caractérisées.

La recherche dans les bases de données de protéines similaires à celle d'*A. thaliana* a fait ressortir des séquences homologues chez *Quercus robur* et *Citrus sinensis*. La même analyse réalisée à partir des deux sous-unités qui composent la GPPS de *Mentha piperita* a mis en évidence un grand nombre de géranylgeranyl diphosphate synthases (GGPPS) de plantes homologues à la grande sous-unité de l'enzyme ainsi qu'une séquence non caractérisée d'*A. thaliana* similaire à la petite sous-unité.

Les figures 19, 20 et 21 montrent les alignements des séquences protéiques de ces trois groupes de protéines réalisés avec le logiciel Vector NTI Advance™. Concernant la grande sous-unité de la menthe, seules les trois séquences les plus homologues ont été utilisées pour la comparaison. Ces alignements ont permis de dégager des régions conservées à partir desquelles des amorces dégénérées ont été définies pour tenter d'amplifier un fragment interne d'un gène de vigne. Les couples d'amorces ont été définis dans les zones conservées, sélectionnées en fonction de leurs similitudes nucléotidiques, de manière à obtenir des amorces les moins dégénérées possibles. De plus, les amorces ont été positionnées de manière rapprochée afin de limiter les problèmes d'amplification sur ADN génomique liés à la présence d'introns.

Nous avons décidé de débiter la recherche d'un fragment de gène à partir de l'ADN génomique de *Vitis vinifera* car nous ne disposions pas d'informations précises sur l'expression du gène codant la GPPS de vigne au cours de son développement. Le choix du cépage aromatique gewurztraminer s'est imposé à nous compte tenu de son importance dans le vignoble alsacien.



Figure 22 : Positionnement des amorces utilisées pour le clonage d'une GPPS de vigne sur l'alignement des séquences peptidiques des GPPS d'*Arabidopsis thaliana* (A.th., CAC16849), *Citrus sinensis* (C.s., CAC16851) et *Quercus robur* (Q.r., CAC20852).

Les acides aminés identiques apparaissent en rouge alors que les résidus similaires sont verts. Les flèches indiquent la position des amorces dégénérées choisies pour le clonage du gène chez la vigne. La séquence des amorces est présentée dans les encarts sous la figure.

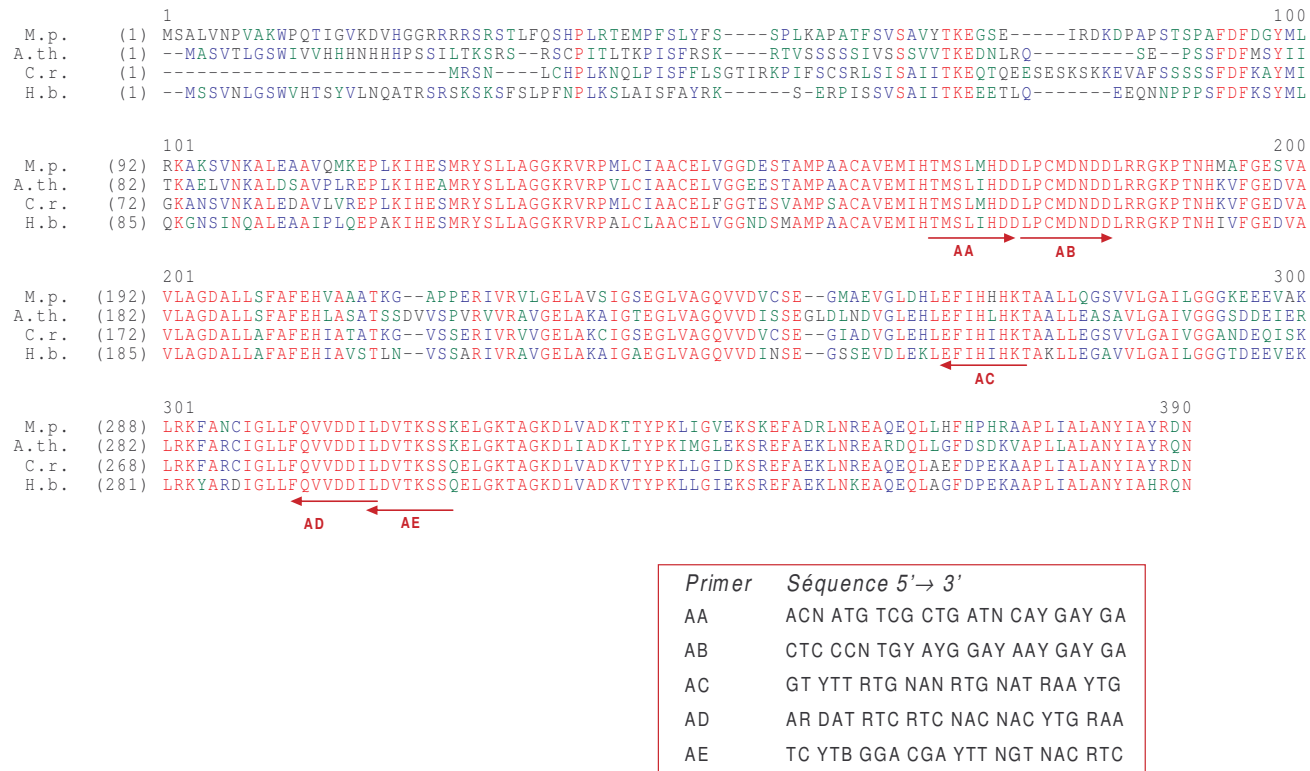
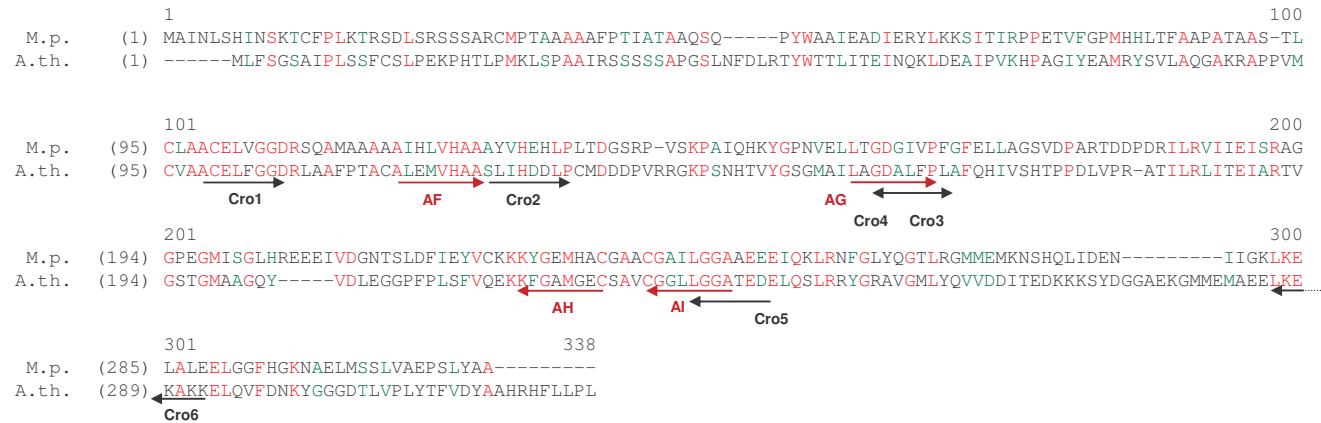


Figure 23 : Positionnement des amorces utilisées pour le clonage d'une GPPS de vigne sur l'alignement des séquences peptidiques de la grande sous-unité de la GPPS de *Mentha piperita* (M.p., AF182828) et des séquences de GGPPS d'*Arabidopsis thaliana* (A.th., P34802), *Catharanthus roseus* (C.r., Q42698) et *Hevea brasiliensis* (H.b., BAB60678).

Les acides aminés identiques apparaissent en rouge alors que les résidus similaires sont verts. Les flèches indiquent la position des amorces dégénérées choisies pour le clonage du gène chez la vigne. La séquence des amorces est présentée dans les encarts sous la figure.



Primer	Séquence 5'→3'
AF	GCN ATH CAY CTC TAY CAY GCN GC
AG	CTC ACN GGN GAY GGN ATH GTN CC
AH	GC RTG CAT YTC NCC RTA YTT YTT
AI	GC NCC NCC CAA DAT NGC NCC RC

Primer	Séquence 5'→3'
Cro1	SGC STG YGA GCT CKT CGG YGG SGA
Cro2	HKC STW VRT MCA CGA BSA CCT CCC
Cro3	CCG GDG ACG SSM TBB TSY CVY TCG
Cro4	CGA RBG RSA VVA KSS CGT CHC CGG
Cro5	YTC MTC MTC VGY KSC DCC GCC CAA
Cro6	YCW DHT MMD YSA YBA DAD YTY TTC

Figure 24 : Positionnement des amorces utilisées pour le clonage d'une GPPS de vigne sur l'alignement des séquences peptidiques de la petite sous-unité de la GPPS de *Mentha piperita* (M.p., AF182827) et d'une séquence similaire d'*Arabidopsis thaliana* (A.th., AF339725).

Les acides aminés identiques apparaissent en rouge alors que les résidus similaires sont verts. Les flèches indiquent la position des amorces dégénérées choisies pour le clonage du gène chez la vigne. La séquence des amorces est présentée dans les encarts sous la figure.

1.1.2 Clonage d'un fragment de 603 nucléotides à partir d'ADN génomique de *gewurztraminer*

Plus d'une centaine d'amplifications ont été réalisées à partir d'une première série d'amorces (Amorces A, Cam et Cro) en faisant varier la température d'hybridation des amorces de la réaction. Toutes les combinaisons possibles de couples d'amorces définis à partir de chacun des gènes ont été testées et ont permis d'amplifier un grand nombre de fragments de tailles diverses (200 pb à 800 pb). Après clonage et séquençage de chacun d'entre eux, il s'est avéré que seuls deux d'entre eux présentaient des homologies avec les séquences de GPPS de plantes.

Le premier, obtenu avec les amorces définies à partir des ADNc de menthe, présente d'importantes homologies avec la séquence nucléotidique de la grande sous-unité de la protéine, la GGPPS. Par contre, aucun fragment similaire à la petite sous-unité n'a pu être amplifié.

Le second, un fragment d'ADN génomique de 603 nucléotides appelé B1, a été amplifié par les amorces Cam3-AL (Figure 25). Il présente des homologies à ses extrémités avec les nucléotides 945 à 1044 de l'ADNc de la GPPS d'*A. thaliana* et possède un intron de 492 nucléotides.

1.1.3 Clonage d'un ADNc complet

Dans un premier temps, nous avons tenté d'augmenter la taille du fragment B1 en réalisant des PCR à partir d'une nouvelle série d'amorces choisies en début et fin du gène (Figure 19, amorces 1F à GT2R). Aucune amplification n'a pu être obtenue à partir d'ADN génomique comme matrice. Face à un grand nombre de résultats négatifs et au vu de la taille importante de l'intron identifié sur le fragment B1, il nous est apparu indispensable de tester nos amorces sur une matrice ADNc. Il nous a fallu dans un premier temps définir à partir de quel organe il serait le plus judicieux de travailler pour réaliser le clonage d'un gène impliqué dans la synthèse des monoterpénols.

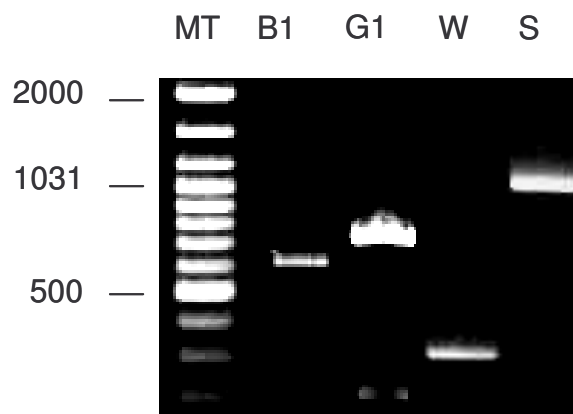
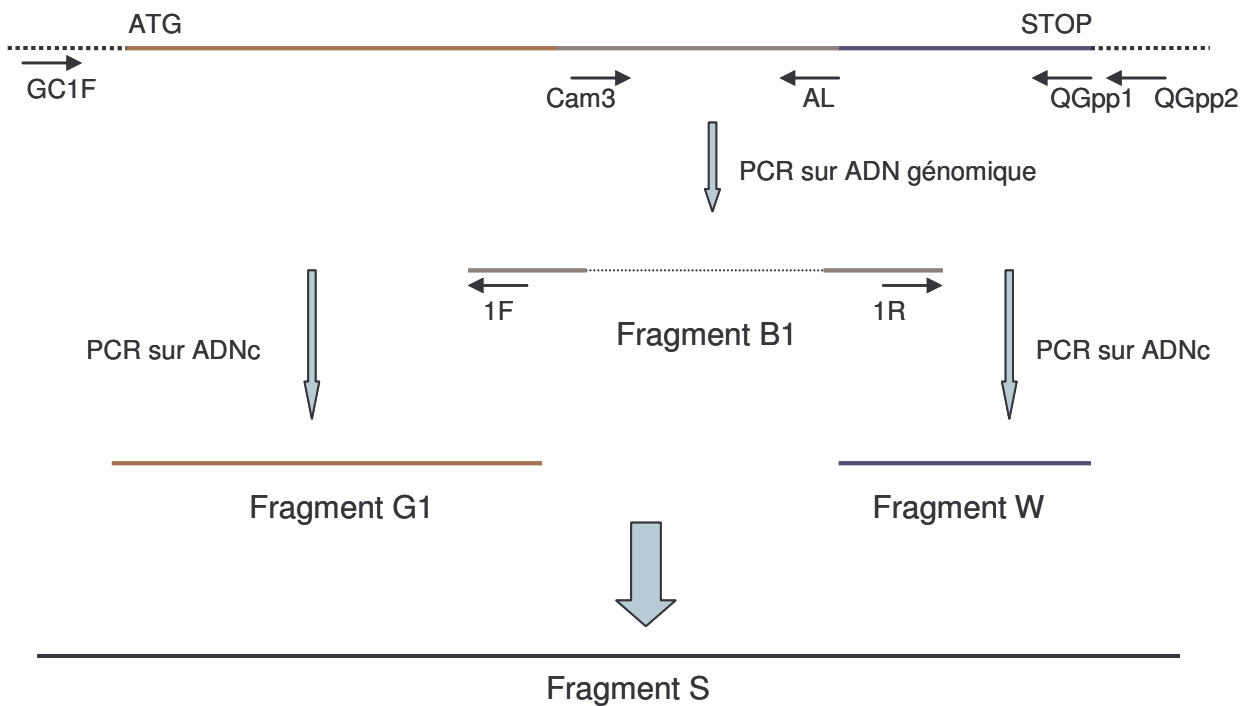


Figure 25 : Isolement du gène *vGPPS* par PCR.

Le schéma et le gel d'agarose présentent les fragments d'ADN obtenus par PCR sur ADN génomique et ADNc de *gewurztraminer*. Le fragment B1 a été obtenu à l'aide des amorces Cam3-AL à partir d'ADN génomique ; les fragments G1, W et S ont été obtenus à l'aide des amorces GC1F-1F, 1R-Qgpp1 et GC1F-Qgpp2 sur ADNc respectivement. MT, marqueur de taille, échelle en pb.

```

1
100
A.th. (1) MLFTRSVARISSKFLRNRSFYGSSQSLASHRFIIPDQGHSCSDSPHKGIVCRITTYSLKSPVFGGFHQSHLYHQSSSLVEEELDPFSLVADELSLLSNKLR
vGPPS (1) -----

101
200
A.th. (101) EMVLAIEVVKLASAAEYFFKRGVQKQFRSTILLMATALDVRVPEALIGESTDIVTSELRVQRGIAEITEMIHVASLLHDDVLDDADTRRGVGSINVM
vGPPS (1) -MVVAIEVVKLASAAEYFFKMGVEGKRXRPTVLLMATALNVPLPRPALAEVPELSTELRTRQQCIAEITEMIHVASLLHDDVLDDAETRIGISLNIMM

201
300
A.th. (201) GNKMSVLAGDFLLSRACGALAAKNTVEVALLATAVEHLVTGETMEITSTEQRYSMDYYMQKTYKTAASLISNSCKAVAVLTGQTAEVAVLAFEYGRNL
vGPPS (100) GNKVAVLAGDFLLSRACVALASLKNTEVVLLATVVEHLVTGETMQMTSTSEQRVSMEYYLQKTYKTAASLISNSCKAIALLAGQTAEVSMVAFEYGNL

301
400
A.th. (301) GLAFQLIDDI LDFTGTSASLGKGSLSDIRHGVIITAPILFAMEEFPQLREVVDQVEKDPNRVDIALEYLGKSKGIQRARELAMEHANLAAAIGSLPE TDN
vGPPS (200) GLAFQLIDDXLDFTGTSASLGKGSLSDIRHGIITAPILFAIEEFPQLDAVVKRGLDNPADIDLALDYLGRSRGIQRTRELAMKHANLAAEAIDSLPESGD

401
422
A.th. (401) EDVKRSRRALIDLTHRVITRKN
vGPPS (300) EDVLRSSRRALIDLTHRVITRKN

```

Figure 26 : Comparaison de la séquence peptidique de vGPPS (AAR08151) avec celle de la GPPS d'*A. thaliana* (A.th., CAC16849).

Les résidus identiques sont présentés en rouge.

Des dosages de monoterpénols dans les feuilles de gewurztraminer nous ont montré que du géraniol était présent en quantités notables dans les jeunes feuilles du « haut rameau » du cépage gewurztraminer et absente des feuilles adultes.

A partir d'ARN extraits de ce matériel végétal, nous avons réalisé des RT-PCR à l'aide de la seconde série d'amorces. Le couple GC1F-1F a permis l'amplification d'un fragment G1 d'environ 700 pb homologue à la partie 5' de l'ADNc de la GPPS d'*A. thaliana*.

La mise à disposition dans la base de donnée de l'Institut of Genomic Research (TIGR, Rockville, Maryland, <http://www.tigr.org>) de la séquence d'une EST de *V. vinifera* fortement similaire à l'extrémité 3' du gène d'*A. thaliana*, (N° d'accession CD007406) nous a permis de cloner rapidement la fin du gène de vigne. Deux amorces (Qgpp1 et Qgpp2) ont pu être définies au niveau du codon stop de la séquence et qui combinées aux amorces 1R et GC1F ont permis l'amplification d'un fragment d'environ 300 pb (W) et 1 000 pb (S) respectivement (Figure 25).

La reconstruction d'une séquence entière à partir des fragments partiels (région 5', 3' et fragment interne) nous a permis de cloner un ADNc complet que nous avons appelé *vGPPS*. La séquence montre un cadre ouvert de lecture codant une protéine de 321 acides aminés de masse moléculaire calculée de 34 998 Da (Figure 26). La protéine *vGPPS* possède 77% d'identité et 90% de similitude avec la GPPS d'*A. thaliana*. Les séquences montrent de fortes similarités sur toute leur longueur incluant la conservation des domaines riches en aspartate communs à toutes les prényltransférases (Figure 26). L'ADNc d'*A. thaliana* code pour une GPPS mature ainsi qu'un peptide d'adressage plastidial. Nous n'avons pas pu identifier un tel peptide sur la protéine de vigne par l'approche de clonage utilisée.

	TGPP1 →
VGPPS1-1	1 atg gtg gtt gct gag gtc cct aag ctt gcc tcg gct gct gag tac ttc ttc aag atg ggg
VGPPS1-2	
VGPPS1-3	
1	M V V A E V P K L A S A A E Y F F K M G
61	gtg gaa gga aaa agg ttc cgt ccc aca gtc cta ttg ttg atg gca aca gct tta aat gtg
21	V E G K R F R P T V L L L M A T A L N V
121	cct cta cct agg cgg gct ctt gct gaa gtt gct gag act tta tca act gaa cta cgc aca
41	P L P R P A L A E V P E T L S T E L R T
181	aga caa caa tgt ata gct gag atc aca gag atg atc cat gtg gct agc ctt ctt cat gat
61	R Q Q C I A E I T E M I H V A S L L H D
241	gat gtc ttg gat gat gct gaa acg aga cgt ggt att ggt tca tta aat att atg atg ggc
81	D V L D D A E T R R G I G S L N I M M G
301	aat aag gta gca gtg cta gca gga gat ttt ctg ctt tca cga gcc tgt gtg gcg ctt gcc
101	N K V A V L A G D F L L S R A C V A L A
361	tct ctg aaa aac act gag gtt gta tca tta tta gca aca gtt gta gag cat ctt gtt aca
121	S L K N T E V V S L L A T V V E H L V T
421	ggt gag acc atg caa atg aca agt aca tct gag caa cgt gtc agc atg gaa tat tat ttg
141	G E T M Q M T S T S E Q R V S M E Y Y L
481	cag aag aca tac tac aag act gca tct ttg att tca aac agc tgc aag gct att gct ctt
161	Q K T Y Y K T A S L I S N S C K A I A L
541	ctt gca ggg caa act gcg gaa gtt tca atg ttg gcc ttt gag tat ggc aag aat ctg gga
181	L A G Q T A E V S M L A F E Y G K N L G
601	ttg gca ttc caa tta ata gat gac atc ctt gat ttc aca ggc aca tca gct tcc ctg ggg
201	L A F Q L I D D I/V L D F T G T S A S L G
661	aag ggt tca ttg tct gac atc cgc cat gga ata ata aca gct cca ata ttg ttt gct ata
221	K G S L S D I R H G I I T A P I L F A I
721	gaa gag ttc cct caa ttg gat gct gtt gtc aaa cgg ggc ctt gac aat cct gca gat att
241	E E F P Q L D A V V K R G L D N P A D I
781	gat ctt gct ctt gac tac ctt gga agg agt cgt gga ata caa agg acg agg gag ctg gcc
261	D L A L D Y L G R S R G I Q R T R E L A
841	atg aag cat gcc aac ctt gct gcc gag gca atc gat tct ctg cct gag agt ggt gac gaa
281	M K H A N L A A E A I D S L P E S G D E
901	gat gtt tta aga tca agg cgg gca ctc ata gat ctc aca cac aga gtc att aca aga act
301	D V L R S R R A L I D L T H R V I T R T
961	--- tga aga acc ag
321	K - R T

Figure 27 : Séquence nucléotidique et protéique déduite des trois allèles *vGPPS1-1*, *vGPPS1-2* et *vGPPS1-3*.

Les résidus variables sont présentés en rouges. Les flèches indiquent les amorces utilisées lors des expériences de PCR, RT-PCR et criblage de la banque BAC.

1.2 Comparaison des séquences de plusieurs cépages

Le clonage et l'analyse des séquences nucléotidiques de *vGPPS* chez différents cépages de vigne devaient nous permettre de déterminer si un polymorphisme de séquence était à l'origine de la spécificité variétale des cépages aromatiques. Pour cela, outre le cépage gewurztraminer, des ARN totaux de jeunes feuilles de savagnin rose (cépage non aromatique, quasi isogénique au gewurztraminer) et de muscat à petits grains blancs (ou muscat de Frontignan) ont été utilisés pour le clonage par RT-PCR des ADNc de *vGPPS* (Galet 1990, *Catalogue des variétés et clones de vigne cultivés en France*. 1995).

Deux couples d'amorces distincts (TGpp1-QGpp1 et GC1F-QGpp2) ont permis l'amplification de deux fragments d'ADN différents pour chacun des trois cépages. Après clonage de ces 6 produits de PCR dans le pGEM-T easy, le séquençage pour chaque ADN de 4 clones distincts a mis en évidence un polymorphisme de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) inter et intra variétal.

Six positions variables ont été observées tout au long de la séquence codante de *vGPPS*. Les nucléotides polymorphes se répartissent tout au long de la séquence et se combinent en 3 allèles différents du gène (Figure 27). Deux allèles ont été mis en évidence chez chacun des trois cépages étudiés. Le gewurztraminer et le savagnin rose se composent des allèles *vGPPSI-1* et *vGPPSI-2* alors que le muscat présente les allèles *vGPPSI-1* et *vGPPSI-3*. La substitution A↔G à la position 625 conduit au remplacement d'une isoleucine (I) par une valine (V) dans la séquence protéique. Il faut remarquer que cette modification est mineure quant à la nature des acides aminés quelle implique, mais elle se situe au cœur du second site actif DDXXD. La substitution I↔V ayant lieu au niveau du premier X.

Organisation des clones de la banque en 6 super pools de 8 plaques 384 puits

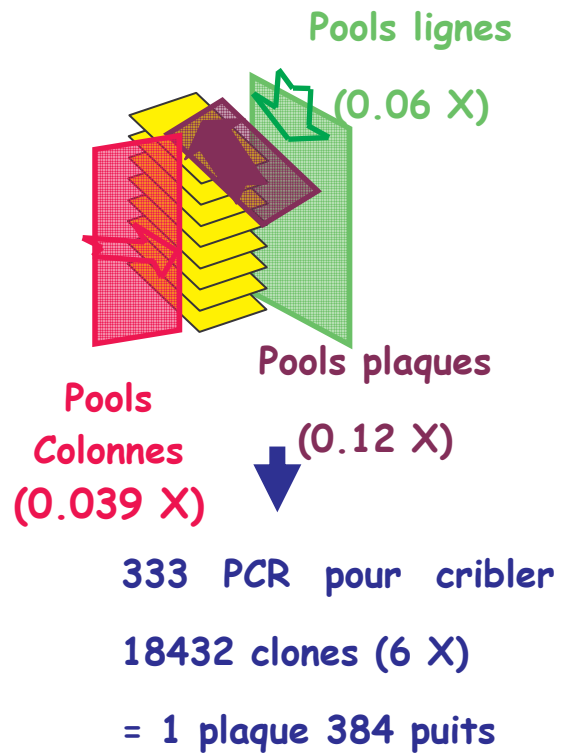
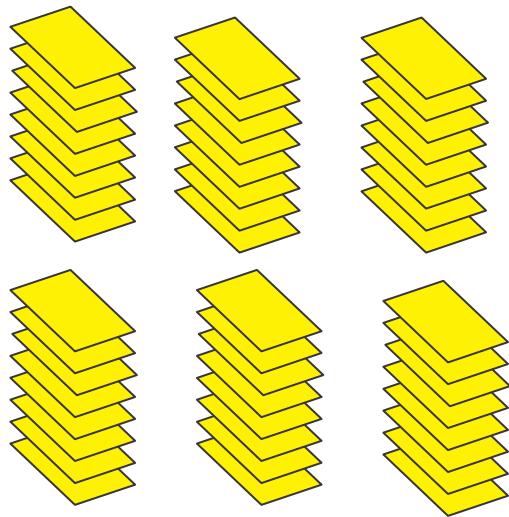


Figure 28 : Schématisation de l'organisation de la banque BAC d'ADN génomique de Cabernet sauvignon en pools permettant de cribler 18 432 clones en réalisant 333 PCR.

A ce stade du travail, nous ne pouvons pas affirmer que le polymorphisme que nous observons soit effectivement l'expression d'un polymorphisme allélique car on ne peut pas exclure qu'il résulte de deux copies de gènes homologues voire même de deux gènes paralogues. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons choisi d'utiliser la banque BAC de cabernet sauvignon construite par l'Unité Mixte de Recherche sur les Génomes des Végétaux (UMRGV) d'Evry.

1.3 Criblage d'une banque BAC d'ADN génomique de cabernet sauvignon

L'équipe de l'UMRGV d'Evry a construit des banques BAC d'ADN génomique de plusieurs cépages de *Vitis vinifera* (cabernet sauvignon, syrah, pinot noir clone 777 et clone 115) (Adam-Blondon et al. 2005). Deux d'entre elles, celles de cabernet sauvignon et de pinot noir 115, ont été organisées en pools afin de faciliter leur criblage par PCR. La Figure 28 représente la méthode d'organisation en pools permettant de cribler 18 432 clones en réalisant 333 PCR, soit une plaque de 384 puits. Les clones BAC ont été répartis sur 48 plaques de 384 puits, elles-mêmes organisées ensuite en 6 super pools de 8 plaques. Des pools lignes, colonnes et plaques de chaque super pool sont réalisés. C'est-à-dire que par exemple tous les clones des lignes A des 8 plaques du super pool I sont regroupés pour former le pool I-A, tous les clones des colonnes 1 des 8 plaques du super pool V sont mélangés pour former le pool V-1 ou encore tous les clones de la plaque 4 du super pool III forment le pool III-P4. En réalisant ainsi tous les assemblages, on obtient 333 pools. Le criblage par PCR de tous ces pools permet ainsi d'obtenir des coordonnées ligne/colonne/plaque qui permettent d'aller saisir sur l'une des 48 plaques du départ le clone individuel qui contient le gène recherché.

Nous avons, dans un premier temps, criblé de cette manière 48 plaques de la banque BAC de cabernet sauvignon, à l'aide des amorces 1R et QGXRV, ce qui représente une couverture génomique de 6X. Les amorces ont été choisies pour permettre une amplification d'une taille inférieure à 500 pb dans une zone relativement conservée entre *V. vinifera* et *Arabidopsis thaliana* afin sélectionner des clones portant spécifiquement une GPPS.

Le criblage a mis en évidence 4 clones BAC positifs. Le séquençage pour chacun des BAC de la zone comprise entre les deux amorces utilisées n'a révélé qu'une seule séquence dont les extrémités sont homologues à l'ADNc de *vGPPS*; la partie centrale se constituant d'un intron. Sachant que la couverture génomique de la banque criblée est de 6X ce qui signifie qu'un même locus se retrouve en moyenne sur 6 BAC différents (Adam-Blondon et al. 2005), ces résultats montrent qu'il n'existe vraisemblablement qu'un gène chez la vigne codant *vGPPS* et que le polymorphisme observé chez les cépages gewurztraminer, savagnin rose et muscat blanc est d'origine allélique.

Dans un second temps, nous avons tenté à l'aide de ces BAC de cloner la totalité de la séquence génomique du gène *vGPPS*. Nous avons choisi d'utiliser la méthode de marche génomique par PCR à partir d'un des BAC positifs. Cette technique permet de caractériser la séquence en amont et en aval d'une zone connue. L'ADN du BAC est digéré par une enzyme de restriction laissant des bouts francs afin de pouvoir ensuite ligaturer des adaptateurs aux extrémités. A l'aide d'une amorce spécifique de la zone connue du gène et d'une amorce complémentaire à l'adaptateur, il est possible d'amplifier par PCR la séquence inconnue comprise entre les deux. La longueur de cette séquence va dépendre de la position du site de restriction le plus proche, c'est pourquoi on utilise en général plusieurs enzymes différentes afin d'obtenir des produits de PCR de tailles différentes.

Nous avons digéré un des BAC à l'aide des trois enzymes laissant des bouts francs *HaeIII*, *SmaI* et *PvuI*. Il a ensuite été nécessaire de réaliser des PCR gigognes mettant en jeu deux amorces dans l'adaptateur ainsi que deux amorces dans le gène afin d'obtenir des amplifications. Après plusieurs séries de PCR nous nous sommes aperçus de la présence dans le gène de nombreux introns de grande taille rendant le clonage de l'ADN génomique entier du gène très difficile par cette méthode.

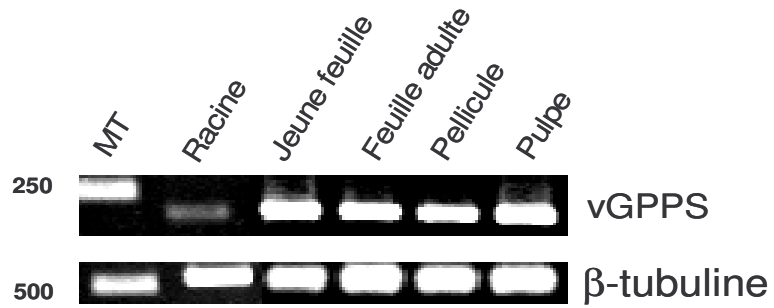


Figure 29 : Analyse du niveau de transcrit du gène *vGPPS*.

L'analyse a été réalisée par RT-PCR à partir d'ARN extraits de racines, jeunes feuilles, feuilles adultes, pellicule et pulpe de baies mûres de gewurztraminer. L'expression de la β -tubuline est utilisée comme standard interne. MT, marqueur de taille, échelle en pb.

1.4 Etude de l'expression du gène chez la plante

Nous avons étudié l'expression spatiale du gène *vGPPS* par la méthode de RT-PCR semi-quantitative. Cette technique très sensible consiste à amplifier de façon simultanée l'ADNc d'un gène d'intérêt et celui d'un standard interne à l'aide de deux couples d'amorces distincts. Le gène de la β -tubuline, dont la protéine est exprimée de manière constitutive dans la cellule, a été choisi comme standard interne (Fillion et al. 1999). Des conditions expérimentales d'amplification et d'hybridation compatibles ont été définies pour les deux gènes (*cf.* Matériels et Méthodes, 2.1.2.4 *Elaboration de la RT-PCR semi-quantitative*). Les amorces β -tubfw et β -tubrv amplifient un fragment de 507 pb et ont une température de fusion élevée (65,5°C et 67°C respectivement) de manière à être très spécifiques. Les amorces QGXFV et QGXRV ont été choisies à l'intérieur de l'ADNc de *vGPPS* de manière à amplifier un fragment de taille inférieure au standard mais supérieure à 200 pb. Elles présentent également des températures de fusion avoisinant 65°C permettant une amplification très spécifique de chaque gène.

L'expression spatiale du gène *vGPPS* a été étudiée dans les racines, les jeunes feuilles, les feuilles adultes, la pellicule et la pulpe de baies mûres de gewurztraminer (Figure 29). Les baies ont été prélevées 40 jours après la véraison et présentaient une concentration en sucre de 185 g l⁻¹. Un transcrite *vGPPS* a été détecté dans tous les tissus. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas mis en évidence des différences significatives entre les niveaux des transcrits dans les feuilles et la baie. Par contre, il faut remarquer le niveau faible de transcrits dans les racines. Des résultats semblables ont été obtenus à partir de tissus prélevés sur les cépages savagnin rose et muscat à petits grains blancs.

```

          FPPSPN1                                     FPPSPN2 -----
1  GCACGAGGGCTCATAGTTCTTTCTTTCTCTGCAAATCCATTCTTTCTGTGTCTGGAAAT
61  GCGAGACGAAGTCCAAATCTTGGAGGTGACTCCGTTTTGAAGTCGGAGCTTCTTAACC
121 CCCCCTTTTGAGTTCACAGGACTGACGATTCTCGCAATGGGTCGAGCGTATGTTGACTAGTA
181 CCTGGAGGAAAGCTAAATCGAGGGCTCTCTGTTGTTGACAGCTACAAGTTGCTGGCAGGC
241 CAACTGACTGATGACGAAGTTTTCTTGCATGTGTCCTGGGTGGTGCATTGGCTTCAAG
301 CATATTTCTTGTGCTTGATGATATTATGGATAACTCGCATAACGGGTCAACCTTGCTG
361 GTTCAGGGTTCCAAGTTGGTATGATTGCTGCGAATGATGGATTCTTCGCAATCAAATC
421 CCTAGAATTCTCAAGAACCATTTCAAAGGAAAGCCATAGTGGATCTTCTGGATTTGTTTA
481 ATGAGGTGGAATTCAGACAGCCTCAGGACAGATGATAGATTTGATCAGACTATTGAAG
541 GAGAGAAAGATCTATCAAAGTATTCATTGCCTCTTCACCGCCGATTGTTTCAGTACAAAA
601 CTGCTTATTACTCATTTTACCTTCCAGTTGCATGTGCATTGCTTATGGCAGGCGAAAATT
661 TGGACAATCACACTTCTGTAAAGGACATCTTGTTCAAATGGGAATCTATTTTCAAGTAC
721 AGGATGATTATCTGGATTGTTTCGGTGACCCCCAAGTGATTGGTAAGATCGGAACGGATA
781 TTGAAGATTTTAAGTGCTCTTGGTTGGTTGTGAAAACACTAGAGATTTGTAATGAGGAAC
841 AGAAAAAACCTTATATGGAAACTATGGGAAAGCAGATCCAGCCAATGTTGCAAAAGTGA
901 AGGCACCTTTATAAAGACCTCGATCTTCAGGGTGTGTTTCTGGAGTATGAGAGCAAAAGTT
961 TAGAGACGTTAGTGAGCTCCATTGAAGCTCATCCAAGTAAGGCAGTACAAGCAGTGCTGA
1021 AATCGTTCTTGGGGAAGATTACAAGAGACAGAAGTAGGGTTTTTCAGCAGAAGGAAGAGG
          FPPSPN 3
1081 GTGGATGGAGTAACTTCGGATTTTTCTTAATGTGACCTAGTGTGTTGGATTGTCCCAGTG
1141 TCCCAGTGTCTTAGTCTCATGAATTTACAGGCCTCTTTCAGTGTAGGGTTGTTTGCTTTG
          FPPSPN 4
1201 TTGTCATTTTGTGTTGGTTGAAGGACTCATTGTTTAGGCTGATCTCAAATAGAAGAAGT
1261 GGATCTTCCTCCACCATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGGGGGGG

```

Figure 30 : Positionnement des amorces utilisées pour le clonage de l'ADNc *vFPPS* sur la séquence d'une EST de pinot noir (Terrier et al. 2001).

Les amorces utilisées pour le clonage de l'ADNc *vFPPS* aux bornes d'un codon initiateur et d'un codon stop (représentés en rouge) sont indiquées par des flèches.

2 Etude d'un gène codant une farnésyl diphosphate synthase de *V. vinifera*

Bien que le GPP ne soit pas le produit principal de la farnésyl diphosphate synthase (FPPS), plusieurs études ont montré que des FPPS, notamment chez la bactérie et la levure, étaient capables de synthétiser du GPP en plus du FPP (Blanchard & Karst 1993, Narita et al. 1999). C'est pourquoi, nous avons décidé de nous intéresser également à la FPPS dans le cadre de notre étude sur le déterminisme génétique de la biosynthèse des monoterpénols chez la vigne.

2.1 Clonage des ADNc codant une farnésyl diphosphate synthase de différents cépages de *V. vinifera*

Charles Romieu (INRA, Montpellier) nous a fourni un plasmide contenant une EST de pinot noir présentant des similitudes avec les FPPS de plantes (Terrier et al. 2001). L'analyse de la séquence de cette EST a montré un cadre ouvert de lecture codant une protéine de 341 acides aminés et de masse moléculaire calculée de 38 980 Da (Figure 30). Nous avons appelé cette protéine *vFPPS*. Elle possède 79% d'identité et 88% de similitude avec la FPPS1 d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 31).

Toujours dans l'objectif de déterminer s'il existe un polymorphisme de séquence pour les gènes de la voie de synthèse des monoterpènes entre des cépages de vigne aromatiques et non aromatiques, nous avons isolé les ADNc correspondant à *vFPPS* chez le gewurztraminer, le savagnin rose et le muscat à petits grains blancs.

La méthode de clonage a été la même que celle suivie pour l'ADNc *vGPPS* en utilisant les deux couples d'amorces FPPSPN1-FPPSPN3 et FPPSPN2-FPPSPN4.

	1		100
<i>A.th.</i>	(1)	METDLKSTFLNVYSVLKSDLLHDPSEFEFTNESRLWVDRMLDYNVRGGKLNRLSVVDSFKLLKQGNDLTEQEVFLSCALGWCIEWLQAYFLVLDDIMDNS	
<i>vFPPS</i>	(1)	-MSETKSKFLEVYSVLKSELNDPAFEFTDDSRQWVERMLDYNVPGGKLNRLSVVDSYKLLQ-GRQLTDEEVFLACVLGLCIEWLQAYFLVLDDIMDNS	
	101		200
<i>A.th.</i>	(101)	VTRRGQPCWFRVPQVGMVAINDGILLRNHIHRILKKHFRDKPYVDLVDLFNEVELQTACGQMIDLITTFEGEKDLKSKYSLSIHRRIVQHKTAYYSFYLP	
<i>vFPPS</i>	(99)	HTRRGQPCWFRVPKVGMIANDGVILRNQIPRIILKNHFKGPYYVDLLDLFNEVEFQTASGQMIDLITTFEGEKDLKSKYSLPLHRRIVQYKTAYYSFHLP	
	201		300
<i>A.th.</i>	(201)	VACALLMAGENLENHIDVKNVLDVDMGIYFQVQDDYLDLDFADPETLGKIGTDIEDFKCSWLIVKALERCSEEQTKILYENYKTDPSNVAKVKDLYKELDL	
<i>vFPPS</i>	(199)	VACALLMAGENLDNHTSVKDILVQMGIFYFQVQDDYLDLDFADPETLGKIGTDIEDFKCSWLIVKALEICNEEQKTKLYGNYKADPANVAKVKALYKDLDL	
	301		343
<i>A.th.</i>	(301)	EGVFMYESKSYEKLTAIEGHQSKAIQAVLKSFLAKIYKRQK	
<i>vFPPS</i>	(299)	QGVFLEYESKSYETLVSSIEAHPKAVQAVLKSFLGKIYKRQK	

Figure 31 : Comparaison de la séquence peptidique de *vFPPS* (AAX76910) avec celle de la *FPPS1* d'*A. thaliana* (*A.th.*, S52009).

Les résidus identiques sont présentés en rouge.

```

vFPPS1-1      1 atg agc gag acg aag tcc aaa ttc ttg gag gtg tac tcc gtt ttg aag tcg gag ctt ctg
vFPPS1-2      1 M S E T K S K F L E V Y S V L K S E L L

vFPPS1-1     61 aat gac ccc gct ttt gag ttc act gac gat tct cgc caa tgg gtc gag cgt atg ttg gac
vFPPS1-2     21 N D P A F E F T D D S R Q W V E R M L D

vFPPS1-1    121 tac aat gta cct gga gga aag cta aat cga ggg ctc tct gtt gtt gac agc tac aag ttg
vFPPS1-2     41 Y N V P G G K L N R G L S V V D S Y K L
                QXFW
vFPPS1-1    181 ctg caa ggc agg caa ctg act gat gac gaa gtt ttt ctt gca tgt gtc ctg ggt tgg tgc
vFPPS1-2     61 L Q G R Q L T D D E V g F/C L A C V L G W C
                g
vFPPS1-1    241 att gaa tgg ctt caa gca tat ttc ctt gtg ctt gat gat att atg gat aac tcg cat aca
vFPPS1-2     81 I E W L Q A Y F L V L D D I M D N S H T
                QF1FW
vFPPS1-1    301 cgt cga ggt caa cct tgc tgg ttc agg gtt ccc aag gtt ggt atg att gct gcg aat gat
vFPPS1-2    101 R R G Q P C W F R V P K V G M I A A N D

vFPPS1-1    361 ggg gtg att ctt cgc aat caa atc cct aga att ctc aag aac cat ttc aaa gga aag cca
vFPPS1-2    121 G V I L R N Q I P R I L K N H F K G K P
                QFXRV
vFPPS1-1    421 tat tat gtg gat ctt ctg gat ttg ttt aat gag gtg gaa ttt cag aca gcc tca gga cag
vFPPS1-2    141 Y Y V D L L D L F N E V E F Q T A S G Q
                QF3RV
vFPPS1-1    481 atg ata gat ttg atc acg act att gaa gga gag aaa gat cta tca aag tat tca ttg cct
vFPPS1-2    161 M I D L I T T I E G E K D L S K Y S L P

vFPPS1-1    541 ctt cac cgc cgc att gtt cag tac aaa act gct tat tac tca ttt tac ctt cca gtt gca
vFPPS1-2    181 L H R R I V Q Y K T A Y Y S F Y L P V A

vFPPS1-1    601 tgt gca ttg ctt atg gca ggc gaa aat ttg gac aat cac act tct gta aag gac att ctt
vFPPS1-2    201 C A L L M A G E N L D N H T S V K D I L

vFPPS1-1    661 gtt caa atg gga atc tat ttt caa gta cag gat gat tat ctg gat tgt ttc ggt gac ccc
vFPPS1-2    221 V Q M G I Y F Q V Q D D Y L D C F G D P

vFPPS1-1    721 caa gtg att ggt aag atc gga acg gat att gaa gat ttt aag tgc tct tgg ttg att gtg
vFPPS1-2    241 Q V I G K I G T D I E D F K C S W L I V

vFPPS1-1    781 aaa gca cta gag att tgt aat gag gaa cag aaa aaa acc tta tat gga aac tat ggg aaa
vFPPS1-2    261 K A L E I C N E E Q K K T L Y G N Y G K

vFPPS1-1    841 gca gat ccg gcc aat gtt gca aaa gtg aag gca ctt tat aaa gac ctc gat ctt cag ggt
vFPPS1-2    281 A D P a A N V A K V K A L Y K D L D L Q G
                a
vFPPS1-1    901 gtg ttt ctg gag tat gag agc aaa agt tat gag acg tta gtg agc tcc att gaa gct cat
vFPPS1-2    301 V F L E Y E S K S Y E T L V S S I E A H

vFPPS1-1    961 cca agt aag gca gta caa gca gtg ctg aaa tcg ttc ttg ggg aag att tac aag aga cag
vFPPS1-2    321 P S K A V Q A V L K S F L G K I Y K R Q

vFPPS1-1   1021 aag tag
vFPPS1-2   341 K -

```

Figure 32 : Séquences nucléotidique et protéique déduites des deux allèles *vFPPS1-1* et *vFPPS1-2*.

Les résidus variables sont présentés en rouges. Les flèches indiquent les amorces utilisées lors des expériences de RT-PCR et de criblage de la banque BAC.

La comparaison des séquences de tous les clones a mis en évidence un polymorphisme de type SNP au niveau de deux positions sur le gène (Figure 32). Ces deux variations constituent deux types de séquences alléliques distinguables, *vFPPI-1* et *vFPPI-2*. Ce polymorphisme n'a pu être observé que chez les cépages gewurztraminer et muscat. Seul l'allèle *vFPPI-1* a été détecté chez la variété savagnin rose. La substitution G \leftrightarrow T à la position 214 amène une variation dans la séquence de la protéine. Une cystéine est échangée avec une phénylalanine à la position -20 du premier site actif DDXXD. Ainsi deux protéines différentes sont codées par les deux ADNc, une protéine que nous avons appelée vFPPI-F codée par *vFPPI-1* et une protéine vFPPI-C codée par *vFPPI-2*.

2.2 Deux copies du gène *vFPPI*

Le criblage de la banque BAC d'ADN génomique de cabernet sauvignon, à l'aide des amorces QF1FW et QF3RV spécifiques du gène *vFPPI*, a mis en évidence 10 clones BAC positifs. Ces 10 BAC qui sont de tailles différentes et qui possèdent des extrémités distinctes, présentent la même séquence nucléotidique entre les amorces QF1FW et QF3RV. Sachant que la couverture génomique de la banque criblée est de 6X (Adam-Blondon et al. 2005), ces informations nous permettent de dire qu'il existe vraisemblablement deux copies du même gène *vFPPI* dans le génome de la vigne.

2.3 Une expression spatiale homogène du gène *vFPPI*

La même procédure que celle utilisée pour l'étude de l'expression des transcrits de *vGPPS* a été suivie pour *vFPPI*. Les amorces QFXFW et QFXRV ont été utilisées en combinaison des amorces β -tubfw et β -tubrv sur l'ADNc de racines, jeunes feuilles, feuilles adultes, pellicule et pulpe de baies mûres de gewurztraminer. Les résultats montrent que le gène *vFPPI* est transcrit de manière importante et homogène dans ces tissus de la plante (Figure 33).

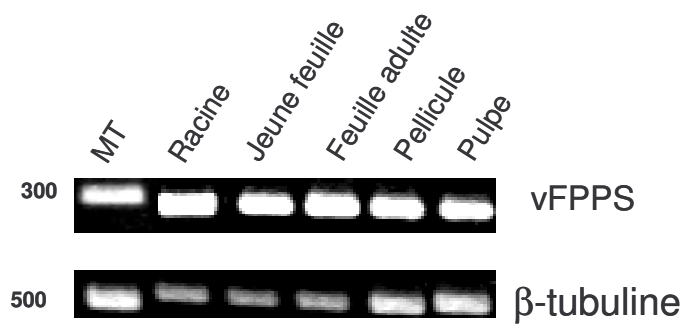


Figure 33 : Analyse du niveau de transcrit du gène *vFPFS*.

L'analyse a été réalisée par RT-PCR à partir d'ARN extraits de racines, jeunes feuilles, feuilles adultes, pellicule et pulpe de baies mûres de gewurztraminer. L'expression de la β -tubuline est utilisée comme standard interne. MT, marqueur de taille, échelle en pb.

```

          Lil1FW
1  agc aag aca ata ttt gaa gcc ctg gat gat ctt gta aat gaa gtt aga ctc aag tgt ttc
1  S  K  T  I  F  E  A  L  D  D  L  V  N  E  V  R  L  K  C  F

61  caa caa aat gga caa gac atc aaa aac aat ctc caa caa tta tgg tat gaa aca ttc cat
21  Q  Q  N  G  Q  D  I  K  N  N  L  Q  Q  L  W  Y  E  T  F  H
          Lil1QFW
121 tca tgg ctt atg gaa gct aag tgg ggg aag ggg tta aca agt aaa cca tct gta gat gtg
41  S  W  L  M  E  A  K  W  G  K  G  L  T  S  K  P  S  V  D  V

181 tat ctt gga aat gca atg aca tcc ata gca gct cac acc atg gtc ctt aca gca tcc tgt
61  Y  L  G  N  A  M  T  S  I  A  A  H  T  M  V  L  T  A  S  C

241 ctt cta ggt ccc ggt ttc ccg gtt cac caa cta tgg tgc caa agg cgc cac cag gac att
81  L  L  G  P  G  F  P  V  H  Q  L  W  S  Q  R  R  H  Q  D  I

301 aca tcc ttg ctc atg gtc ttg act cgc ttg cta aat gac att caa tcc tac ttg aaa gaa
101 T  S  L  L  M  V  L  T  R  L  L  N  D  I  Q  S  Y  L  K  E

361 gaa gac gaa gga aaa ata aac tat gta tgg atg tac atg atc gag aac aat caa gcg tcg
121 E  D  E  G  K  I  N  Y  V  W  M  Y  M  I  E  N  N  Q  A  S
          Lil1QRV
421 ata gat gac tcg gtt cga cac gtc cag acg ata atc aat gta aaa aag caa gaa ttc atc
141 I  D  D  S  V  R  H  V  Q  T  I  I  N  V  K  K  Q  E  F  I

481 caa cgt gtt cta tcg gat caa cat tgc aat ctc cca aag tca ttc aag cag ctc cac ttc
161 Q  R  V  L  S  D  Q  H  C  N  I  P  K  S  F  K  Q  L  H  F
          Lil1RV
541 tcc tgc ctc aaa gta ttc aac atg ttc ttc aaa tcc tcg aac
181 S  C  L  K  V  F  N  M  F  F  K  S  S  N

```

Figure 34 : Séquences nucléotidique et peptidique du fragment d'ADNc de muscat de Frontignan, cloné par l'équipe du Professeur Ambid, homologue à la LIS de *Clarkia breweri* (EbangOke 2003).

Les amorces utilisées pour les manipulations de PCR et RT-PCR sont présentées par des flèches.

3 Recherche d'un gène codant une terpène synthase chez *V. vinifera*

La compréhension du mécanisme permettant la biosynthèse des monoterpénols chez la vigne passe également par l'étude de l'implication des terpènes synthases dans la métabolisation du GPP. Nous avons vu en introduction que les principaux alcools monoterpéniques impliqués dans l'arôme variétal des cépages aromatiques muscatés étaient le linalol, le géraniol, le nérol et l' α -terpinéol qui développent des odeurs de type floral. Parmi ces composés la seule enzyme catalysant leur synthèse, et dont la séquence codante était connue chez certaines plantes lorsque nous avons entrepris cette étude, était la linalol synthase. Ainsi dans l'objectif de cloner une monoterpène synthase de vigne, nous nous sommes intéressés aux différentes séquences de linalol synthases de plantes et avons adopté deux stratégies en parallèle. La première se base sur les résultats d'un travail de thèse réalisé par J.P. EbangOke (ENSAT, Toulouse) sur une *S*-linalol synthase de Muscat de Frontignan et la seconde a été entreprise à partir des informations sur les EST de vigne présentes dans les bases de données de l'Institut for Genomic Research (TIGR).

3.1 Aucune amplification de la *S*-linalol synthase de muscat de Frontignan

L'équipe du Professeur Ambid (ENSAT, Toulouse) a réussi à amplifier un fragment d'ADNc de muscat de Frontignan homologue à une linalol synthase (LIS) en utilisant deux couples d'amorces choisis dans des régions consensus des ADNc des linalol synthases de *Clarkia breweri*, *Clarkia concinna*, *Arabidopsis thaliana* et *Oenothera arizonica* (Figure 31) (EbangOke 2003). La séquence nucléotidique du fragment de 584 pb présente 99% d'homologie avec celle de l'ADNc de la *S*-linalol synthase 1 de *Clarkia breweri*, soit 3 nucléotides différents sur les 584. Un seul acide aminé distingue les deux séquences protéiques codées par ces ADNc. L'étude de l'expression du gène *S*-linalol synthase de

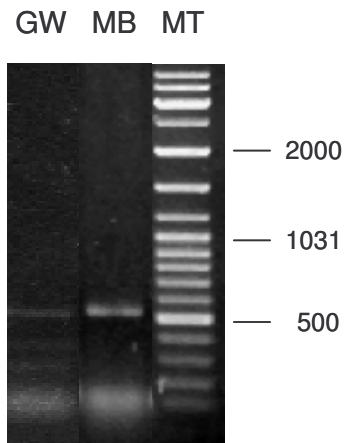


Figure 35 : Analyse par gel d'agarose des amplifications obtenues par PCR à l'aide des amorces LiQFW et LiQRV à partir d'ADNc de gewurztraminer (GW) et muscat à petits grains blancs (MB). MT, marqueur de taille, échelle en pb.

muscat de Frontignan (*mfLIS*), par RT-PCR semi-quantitative et Northern-blot, a montré la présence de transcrits dans les feuilles (jeunes et adultes), la pellicule et la pulpe. Le gène semble également différentiellement exprimé au cours de la maturation de la baie de raisin avec une expression accrue au début de la phase de maturation puis un déclin lorsque le fruit arrive à maturité.

Dans l'objectif de clonage du gène entier, nous avons dans un premier temps voulu réamplifier le fragment de 584 pb en utilisant les amorces décrites dans la thèse à partir des ADNc de gewurztraminer et muscat à petits grains blancs. Les appellations muscat à petits grains blancs et muscat de Frontignan désignent le même cépage (Galet 1990, *Catalogue des variétés et clones de vigne cultivés en France*. 1995). Les ADNc de ce cépage servent donc de témoin d'amplification par rapport à ceux de gewurztraminer.

La Figure 35 montre les amplifications que nous avons obtenues avec les amorces LilQFW et LilQRV, identiques aux amorces Lil-5'Q et Lil-3'Q utilisées pour les RT-PCR par l'équipe de Toulouse, en utilisant des ADNc de gewurztraminer et muscat à petits grains blancs comme matrice. En suivant les conditions de réaction utilisées dans la thèse, nous obtenons un fragment d'ADN d'environ 600 pb alors que les amorces doivent normalement amplifier un fragment de 338 pb. Après séquençage, il s'est avéré que le fragment que nous avons obtenu ne correspond effectivement pas à la séquence de *mfLIS* et n'est d'ailleurs homologue à aucun gène connu de plante. Nous avons ensuite testé de nombreuses conditions de réaction afin d'amplifier le fragment de *mfLIS* sur ADNc, elles se sont toutes révélées sans succès.

Des essais d'amplification réalisés sur ADN génomique avec ces amorces ainsi qu'un couple d'amorces choisies aux extrémités du fragment de 584 pb (Lil1FW et Lil1RV) n'ont également conduit à aucune amplification. Etant donné ces résultats nous n'avons pas pu continuer le travail sur ce gène potentiel de muscat de Frontignan.

```

1  gtg gaa gta act agg tgg tcc aag gac ttg ggt ctc agc aat atg gga ttt ggt agg gaa
1  V  E  V  T  R  W  S  K  D  L  G  L  S  N  M  G  F  G  R  E
                                     PutLis1FW -----
61  aaa act aca tac tgt tac ttt gct tct gct gct gcc agc agt tca cag ctt cct cac cat
21  K  T  T  Y  C  Y  F  A  S  A  A  A  S  S  S  Q  L  P  H  H
121 tcg gaa gta cgg tta gta gtt gca aag gtc gca ata cta atc act gtt gca gat gat ttt
41  S  E  V  R  L  V  V  A  K  V  A  I  L  I  T  V  A  D  D  F
181 ttc gat atg caa ggt tct ctg gat gag ttg gaa agc cta act gag gca gtc cga aga tgg
61  F  D  M  Q  G  S  L  D  E  L  E  S  L  T  E  A  V  R  R  W
241 gat ggc cgt ggc ttg acc ggc cac agc gag gtt atc ttt aag gcc ctt gat aat ctt gtc
81  D  G  R  G  L  T  G  H  S  E  V  I  F  K  A  L  D  N  L  V
                                     PutLis1RV ←-----
301 aat gac att gct ggc aaa tac atc cat caa cag gga ggg gaa tgt gac ata gcc aaa att
101 N  D  I  A  G  K  Y  I  H  Q  Q  G  G  G  E  C  D  I  A  K  I
                                     PutLis2FW -----→
361 ctt cat gat atg tgg tat gaa gcg ttt tct tca tgg ctg acg gaa gct aag tgg agc aaa
121 L  H  D  M  W  Y  E  A  F  S  S  W  L  T  E  A  K  W  S  K
421 agc ggg tac ata cca tct act gaa gaa tac ctt cgg act ggc atg ata tcc att gca gca
141 S  G  Y  I  P  S  T  E  E  Y  L  R  T  G  M  I  S  I  A  A
481 cat act gtg gct ctg caa ggt tca tgt ttc ttg aac ccc agc tta cca att tac aaa ctt
161 H  T  V  A  L  Q  G  S  C  F  L  N  P  S  L  P  I  Y  K  L
541 aca cct act cag tac gaa cct gtc aca aaa ttg cta atg gtc ata act cgt ctg ttg aat
181 T  P  T  Q  Y  E  P  V  T  K  L  L  M  V  I  T  R  L  L  N
                                     PutLis2RV ←-----
601 gac ata caa agc tac cag aag gag caa gtg gat ggg aag acg aac ctt gtg ctg ctt cac
201 D  I  Q  S  Y  Q  K  E  Q  V  D  G  K  T  N  L  V  L  L  H
661 aag aaa gaa aac cca gaa aca gat att gaa gat tca att tct tac gtg aga ggr ata ctg
221 K  K  E  N  P  E  T  D  I  E  D  S  I  S  Y  V  R  X  I  L
721 gat gag aag aag aaa gag cta ctt gaa cat gtt ctt tca gat ggc tta agt gat tta ccc
241 D  E  K  K  K  E  L  L  E  H  V  L  S  D  G  L  S  D  L  P
781 aag tca tgc aaa cat att cac cta tca tgt atg aaa gta ttt cag atg ttc ttc aac tct
261 K  S  C  K  H  I  H  L  S  C  M  K  V  F  Q  M  F  F  N  S
841 ggc aat gaa ttc gac tcc aac acc agc gaa atg ctt gaa gac atc aaa caa g
281 G  N  E  F  D  S  N  T  S  E  M  L  E  D  I  K  Q

```

Figure 36 : Séquences nucléotidique et peptidique déduites du fragment d'ADNc *vLIS*.

Les amorces utilisées pour les manipulations de PCR, RT-PCR et criblage de la banque BAC sont représentées par des flèches.

3.2 Essai de clonage d'une monoterpène synthase par criblage de la banque BAC d'ADN génomique.

3.2.1 Analyse des EST de *V. vinifera* de la base de données de l'Institut for Genomic Research (TIGR)

Nous avons utilisé les différentes séquences codantes des linalol synthases caractérisées chez les plantes pour cribler la base de données d'EST de vigne mise à disposition sur le site de TIGR (TIGR 2005). La base de données de TIGR se compose à ce jour de 139 380 EST de vigne annotées et assemblées en 13 571 compilations. Le site dispose d'un logiciel BLAST intégré qui recherche les EST et les compilations d'EST homologues à la séquence que vous voulez comparer. Nous avons choisi de travailler à partir des données de TIGR car il s'agissait de la base la plus complète et la plus facilement maniable. Les résultats de l'analyse que nous avons effectuée à partir des séquences de LIS de plantes en 2003 sont toujours valables à ce jour malgré l'augmentation constante du nombre de séquences déposées.

Toutes les séquences de LIS de plantes ont été exploitées dans une recherche BLAST puis nous avons analysé les séquences homologues identifiées selon leur degré d'homologie aux monoterpènes synthases de plantes et plus particulièrement aux enzymes synthétisant des monoterpénols. C'est-à-dire que nous avons éliminé de l'étude les séquences similaires à des sesquiterpènes ou diterpènes synthases. Il s'est avéré que seules deux compilations d'EST, la TC40683 et la TC40684, présentaient de fortes homologues aux gènes de LIS de plantes. Elles se composent d'EST issues d'échantillons de fleurs de cabernet sauvignon avant floraison. Aucune autre EST potentiellement intéressante pour notre étude n'est ressortie de l'analyse de cette base de données.

Les séquences TC40683 et TC40684 se chevauchent sur environ 160 pb à leurs extrémités 5' et 3' respectivement formant ainsi une séquence reconstruite de 893 pb (Figure 36). La séquence protéique déduite de ce fragment de gène présente 55% d'identité avec celle de la LIS potentielle d'*Arabidopsis thaliana* et 53% avec la LIS de *Clarkia concinna*, c'est pourquoi nous avons appelé ce fragment de gène *vLIS* (Figure 37).


```

100
A.th. (1) MKSSYGSS--SNDLHAFVNEIKGEIQLSNINLDPYSFVSPSAYDTAWLSMIEEDINVDDNELKPMFQGCLDWIMCNQAREGFWMNSTSYTTVADGRDED
C.con. (1) MQPITKSSSTSSELEFLVDKVKRESLSSSSSDTQNLFLSASPYDTAWLALIPHHHHHHHG-PPMFEKCLQWILHNQTP-QGFWTAAG----DNISDTD
vLis (1) -----
201 200
A.th. (99) GEKDMCILTSTLACVVALQKWNIGCFHLHKGTRYIERNTEMIIGKYINEEGSYPRWFAIKFTGILELELAQKLGLHFVSSRCIEMIKGMFYQRQEI IQREK
C.con. (95) DDVTLDCLLSTLACLVALKRWQLAPDMIHKGLEFVHRNTERLVMKQK--PSDVPRWFTIMFPAMLELAGASGLRVDFSENLRILVELTQNRDDILTREE
vLis (1) -----
301 300
A.th. (199) LVHDCNYKPLLAYLEVLP SKLYVTNQEDIIVKSLDSMDGSLFQSPSATASAFMLTRNTKCLAYLQNLVQKCPNG-VPQKYPLNEDLIKLSMVNLIESTGL
C.con. (193) VGEKKQYSPLLLFLEALPAQSYS DSVLKQIIDKKLSSDGS LFQSPSATARAYMITGNTRCLSYLHSLTNSCSNGGVP SFYPVDDDLHDLVMVNQLTRSGL
vLis (1) -----
401 400
A.th. (298) GEFFGIEIEHVLEQVYSRYEEKDFERMPMSY LADQLHKDSLAFRMLRMHGRDVSPRSFCWFLNDQETRNHLERNIDS FLLVILSVYRATDLMFPG EHDLQ
C.con. (293) TEHLIPEIDHLLLKVKQNYK YKKASPKSLYIAAE LKDSLAFWLLRVNSHWVTPSIFCWF LNDEEIRDHIETNYKEFAAVLLNVYRATDLMFSGEVQLV
vLis (1) -----
501 500
A.th. (398) EAREYTRNLL EKRRS-----I KEKMIHELSTPW IARLKHLDHRMWIEDKNSNVLSMEKASFLRLHSSYSDKLTHLAARNFEFQQAKYCREL
C.con. (393) EARSFATKYLEKILATGNIQKT NADISSSLHKMIEHEL RVPWTARM DHVENRIWIEEIASGALWFGKSSYLRLSCLHKNLQQLAVKNYTLRQSVYRDEL
vLis (1) -----
601 600
A.th. (485) EELTMWVKKWLSDIGFGREKTTYCYFATVTS--LPYEYAIKFGKLAAKTALIT IADDFDEKGSFNDLEGLTKAVLRWEGEELKSYGNIIFRALDDIV
C.con. (493) AEVERWSKERGLCDMGFGREKTYCYFAFAS--TCLPWS SDVRLVLTKA AVVITVADDFDVEGSMDDLEKLTDAVRRWDAEGLGSHSKTIF EALDDL V
vLis (1) VEVTRWSKDLGLSNMGFGREKTTYCYFA SAAASSQLPHHSEVRLVVAKVAIITVADDFDMQGS LDELESLTEAVRRWDGRGLTGHSEVIFKALDNLV
601 700
A.th. (583) RETANTCRTHHKT--DIIVHLRNIWGETFESWLREAEWSKKGHTS--SMDEYIRNGMISIAAHTIALSISCLMEPCFPHNKLKPG-NYDSIT TLLMIIPR
C.con. (591) NEVRLKCFQQNGQ--DIKNNLQQLWYETFHSWLMEAKWG-KGLTSKPSVDVYLG NAMTSIAAHTMVL TASCLLGPGFPVHQLWSERHHQDITSLLMVLTR
vLis (101) NDIAGKYIHQQGGECDIAKILHDMWYEA FSSWLTEAKWSKSGYIP--STE EYLRTGMISIAAHTVALQGS CFLNPSLPIYKLTPT-QYEPVTKLLMVI TR
701 800
A.th. (678) LLNDLQSYQKEQE QGKMNSVLLHMKNHPGLEIEDSIAHIEKIIDS KRKEFLEHVLDGLSDLPKPCKEIHMSCCKVFE MFFNKKNRYDSNTEMLHDIKKA
C.con. (688) LLNDIQSYLKEEDEGKIN YVWMIENNQVSIDDSVRHQ TIIINVKKQEFIQRVLSDKHCNLPKSFKQLHFSCLKVFNMFFNSSNIFD TDLLLDIHKKA
vLis (198) LLNDIQSYQKEQVDGKTNLVLLHKKENPETDIEDSISYVRXILDEKKELLEHVLS DGLSDLPKSKCHIHLSCMKVFMFFNSGNEFDSNTSEMLEDIKQ
801 900
A.th. (778) LYDPINVYELSEM EPMPLMAHGDEYMIPLPLLNSLPNILEFKRKDG YGAMKTSMCFGRSRYRVNKRVMASQLDDQHKLKIVASQRKPVPMMQSIFAPCFY
C.con. (788) FVSPP---QVPKFKPHIKPPHQLPATLQPPHQ---PRQIMVNKKKVEMVYKSYHHPFKVFNLPK-QSSSGHGT MNPRASILAG----PNIKLCS----
vLis (298) -----

```

Figure 37 : Comparaison de la séquence peptidique de vLIS avec celles de la LIS d'*Arabidopsis thaliana* (A.th., AAL24105).et de *Clarkia concinna* (C.con., AAD19839)

Les résidus identiques sont présentés en rouge alors que les résidus similaires sont verts.

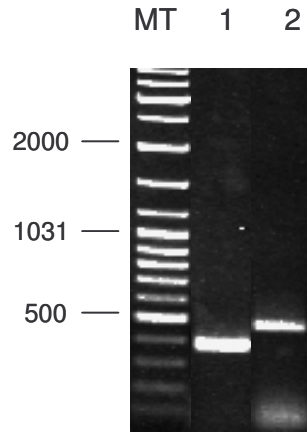


Figure 38 : Analyse par gel d'agarose des amplifications obtenues par PCR à l'aide des amorces PutLis1FW-PutLis1RV (piste 1) et PutLis2FW-PutLis2RV (piste 2) à partir d'ADN génomique de gewurztraminer. MT, marqueur de taille, échelle en pb.

Nous avons voulu dans un premier temps vérifier la présence de cette séquence dans nos cépages d'intérêt, gewurztraminer, savagnin rose et muscat à petits grains blancs. Deux couples d'amorces (PutLis1FW-PutLis1RV et PutLis2FW-PutLis2RV) ont été choisis afin d'amplifier des fragments du gène *vLIS* inférieurs à 500 pb afin de pouvoir étudier son expression par RT-PCR ainsi que de permettre une amplification sur ADN génomique (Figure 36).

Aucune amplification n'a été obtenue malgré de nombreuses conditions d'amplification par PCR testées à partir d'ADNc de feuilles, fleurs et baies mûres de gewurztraminer et muscat. Les deux couples d'amorces PutLis1FW-PutLis1RV et PutLis2FW-PutLis2RV ont par contre permis des amplifications d'environ 400 et 500 pb respectivement à partir d'une matrice d'ADN génomique de gewurztraminer. L'analyse de la séquence de ces fragments d'ADN a montré qu'il s'agissait effectivement des séquences de *vLIS* attendues, chacune comprenant un intron de 91 et 235 pb respectivement (Figure 38).

3.2.2 Criblage de la banque BAC

Etant donné qu'aucune expression du gène *vLIS* n'a pu être facilement mise en évidence dans les principaux tissus de vigne, nous avons décidé de cloner la séquence entière du gène après criblage de la banque BAC d'ADN génomique de cabernet sauvignon par sous-clonage d'un BAC positif.

Le criblage de la banque BAC à l'aide des amorces PutLis1FW et PutLis1RV a révélé 3 clones positifs. Le séquençage des zones amplifiées de chacun des BAC a montré une parfaite homologie entre les séquences.

Au moment de sous-cloner un des BAC positifs afin d'isoler la séquence entière du gène *vLIS*, nous avons rencontré les mêmes problèmes que pour les travaux réalisés sur *vGPPS* et *vFPPS*. Nous avons eu encore plus de difficultés à assembler les séquences obtenues pour *vLIS* que pour les autres gènes étant donné que nous n'avions pas la séquence codante du gène comme point de repère entre les nombreux introns. Ainsi, la séquence du gène n'a pu être obtenue à ce jour.

4 Expression des protéines recombinantes *vGPPS* et *vFPPS* chez *Saccharomyces cerevisiae*

4.1 Construction de souches exprimant *vGPPS* et *vFPPS* en fusion avec la GFP

Nous avons choisi d'exprimer les protéines codées par les ADNc *vGPPS* et *vFPPS* chez *Saccharomyces cerevisiae* car nous disposons de mutants de la voie des stérols pouvant nous aider à les caractériser sur le plan fonctionnel. Ne disposant pas d'anticorps spécifiques des deux protéines de vigne, nous avons décidé de cloner les cadres ouverts de lecture en fusion avec la GFP (green fluorescent protein) en position N-terminale dans le plasmide pGB7 (Sagot et al. 1999). Ainsi, à l'aide d'anticorps dirigé contre la protéine GFP, nous avons pu vérifier la présence de la protéine hétérologue, la quantifier et visualiser sa localisation subcellulaire. Ce vecteur présente également la particularité de posséder une séquence de 6-histidines en position N-terminale de la GFP qui doit permettre la purification de la protéine recombinante. Il nous fallait également disposer d'une quantité relativement importante de protéines afin d'envisager leur purification. Nous avons choisi d'utiliser comme promoteur celui du gène de l'ATPase de la membrane plasmique de levure, le gène PMA1. Il se classe parmi les promoteurs forts de levure. Nous avons ainsi tout d'abord procédé à la construction de deux plasmides afin qu'ils puissent nous servir à l'expression de tous nos gènes d'intérêt.

Le promoteur PMA1 a été introduit dans le vecteur pGB7 par ligature au niveau des sites *SacI* et *NotI* après son amplification par PCR à l'aide d'amorces contenant les séquences de coupures de ces deux enzymes. Le plasmide ainsi obtenu a été appelé pMO1, il possède le marqueur de sélection URA3. Comme nous souhaitons disposer pour la suite du travail d'un vecteur du même type mais possédant un autre marqueur de sélection de levure, nous avons construit le vecteur pMAGT. Pour cela, nous sommes partis du vecteur dont nous disposons,

le pNEV. Pour les besoins d'un travail précédant, l'équipe du laboratoire avait procédé à la disruption du gène *URA3* par *TRP1* par recombinaison homologue. Nous avons donc à notre disposition un vecteur possédant un marqueur TRP1 et le promoteur PMA1. Il nous a suffi d'introduire la cassette GFP sortie du vecteur pGB7 par coupure *NotI-PvuII* au niveau des sites *NotI-SmaI* (cf. Matériels et Méthodes, 1.4 Plasmides et vecteurs d'expression).

Nous avons utilisé la technique de recombinaison homologue chez la levure pour cloner les différents gènes dans les vecteurs (cf. Matériels et Méthodes, 2.1.5.3 *Recombinaison homologue chez la levure*). L'ADNc *vGPPS1-2* a ainsi été introduit dans un premier temps dans le vecteur pMO1 par recombinaison dans la souche FY1679-28C ainsi que les deux allèles *vFPPS1-1* et *vFPPS1-2*. La validité des constructions plasmidiques et de la séquence des ADNc a été vérifiée par séquençage et les plasmides ont été nommés pMO2, pMO9 et pMO11 respectivement.

Différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* ont ensuite été transformées avec ces plasmides. Les souches choisies correspondent d'une part à des souches sauvages et d'autre part à des souches affectées dans la FPPS. La souche défective utilisée a été le mutant CC25 de génotype *erg12-2, erg20-2* qui est caractérisée par un phénotype Erg^- . Cette souche, qui a permis l'isolement de l'ADNc codant la FPPS d'*Arabidopsis thaliana*, présente la particularité d'excréter de faibles quantités de géraniol et de linalol (Delourme et al. 1994). Blanchard et Karst (1993) ont montré que cette particularité était spécifiquement liée à l'allèle défectif *erg20-2* qui porte une transition AT→GC conduisant à une substitution $\text{K}^{197} \rightarrow \text{E}$ dans la farnésyl diphosphate synthase. La mesure de l'activité enzymatique *in vitro* de la protéine Erg20-2p révèle que les produits de réaction se répartissent en 75% de GPP et 25% de FPP alors que pour la protéine sauvage le ratio est en faveur de FPP 75% contre seulement 25% de GPP. L'autre souche utilisée est la souche diploïde hétérozygote Y21258 (Euroscarf) portant un allèle délété de *ERG20*. Il faut préciser ici que chez la levure le gène *ERG20* est un gène essentiel.

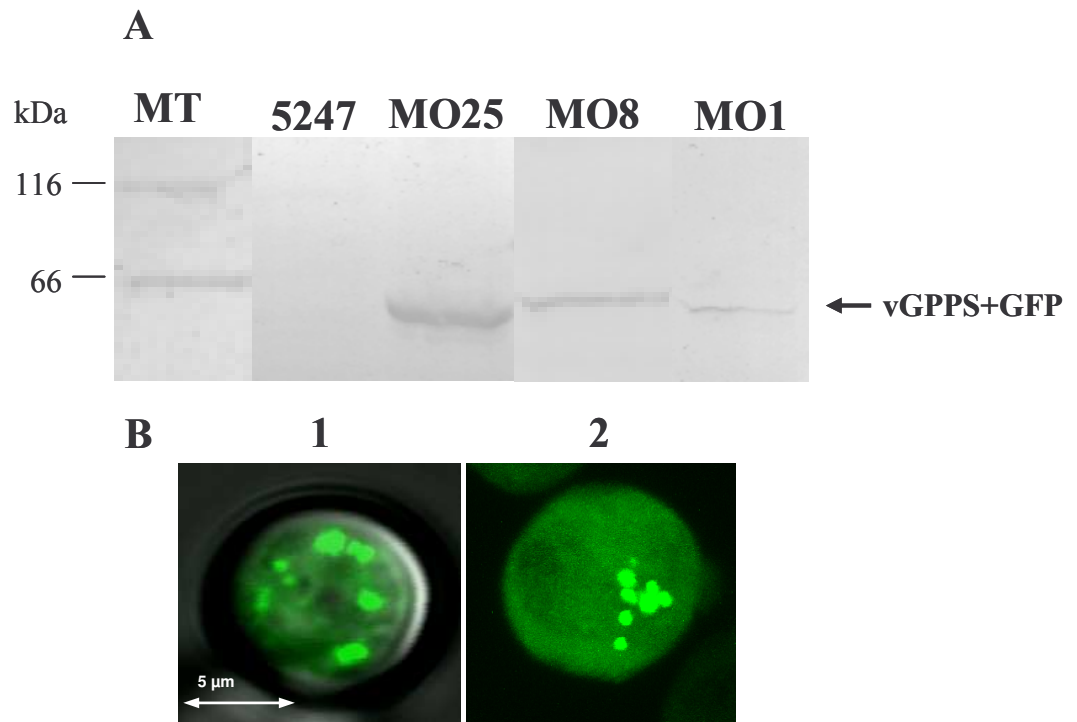


Figure 39 : Mis en évidence par Western blot de la protéine vGPPS fusionnée à la GFP dans des extraits protéiques bruts de levures et visualisation par microscopie confocale de sa localisation subcellulaire.

A, Western blot réalisés à partir de 40 μg protéines totales des souches MO8, MO25 et MO1 révélés par un anticorps monoclonal anti-GFP. La souche 5247 porte un vecteur vide et sert de témoin. MT, marqueur de taille. (vGPPS, 35 kDa ; GFP, 26 kDa)

B, localisation subcellulaire de la protéine vGPPS fusionnée à la GFP. Les photos présentent une vue transversale (1) et une vision en deux dimensions (2) d'une cellule de la souche MO8. Les mêmes résultats ont été observés pour les autres souches exprimant l'ADNc *vGPPS*.

A partir des souches transformées par les ADNc de vigne, nous avons recherché des phénotypes liés à la présence des protéines de vigne. Comme il s'agit de protéines impliquées dans la voie de biosynthèse des isoprénoïdes, nous avons étudié la variation de la composition stérolique de ces souches ainsi que leur capacité à synthétiser des monoterpénols. Par ailleurs, nous avons testé la complémentation fonctionnelle des souches délétées pour le gène *ERG20*.

4.2 Recherche de phénotypes liés à l'expression de *vGPPS*

4.2.1 Détection de la protéine *vGPPS* dans les souches transformées

Les souches FY1679-28C, 5247 et CC25 ont été transformées par le plasmide pMO2 portant l'ADNc qui code pour la *vGPPS* ; les souches obtenues ont été appelées MO8, MO25 et MO1 respectivement. La synthèse effective de la protéine a été vérifiée par Western blot et les souches ont été observées au microscope confocal afin de déterminer sa localisation subcellulaire.

Les Western blots réalisés à l'aide d'anticorps anti-GFP sur les protéines totales des trois souches, confirment la présence de la protéine *vGPPS* dans chacune. Il semble par contre que la quantité de protéines soit plus faible dans la souche CC25 que dans les souches Erg+ (Figure 39).

L'observation des souches au microscope confocal révèle que la protéine *vGPPS* se localise dans le cytoplasme mais qu'elle a aussi tendance à s'agréger dans des vésicules. Le profil subcellulaire est identique pour les trois souches mais il faut remarquer que le nombre de cellules fluorescentes est très nettement inférieur chez la souche CC25 par rapport aux autres, ce qui permet d'expliquer que la quantité de protéine hétérologue soit réduite.

Tableau 7 : Teneur en Δ -5,7 stérols des souches de levures sauvages exprimant l'ADNc *vGPPS*.

Les stérols ont été extraits par saponification à partir de cellules lyophilisées après une croissance en milieu minimum jusqu'à la phase stationnaire. Les données sont les moyennes de deux répétitions indépendantes (Breivik & Owades 1957).

<i>Souche</i>	<i>ADNc exprimé</i>	<i>Δ-5,7stérols $\mu\text{g (mg Poids Sec)}^{-1}$</i>
FY1679-28C vecteur vide	-	4,3 \pm 0,3
MO8	<i>vGPPS</i>	4,7 \pm 0,6
5247 vecteur vide	-	7,2 \pm 1,1
MO25	<i>vGPPS</i>	3,9 \pm 0,1

Tableau 8 : Monoterpénols produits par des souches sauvages ou mutantes exprimant l'ADNc *vGPPS*.

Les terpénols ont été extraits du milieu de culture en phase stationnaire de croissance par fractionnement sur cartouche Bond Elut C18. La séparation et l'identification des composés volatils ont été réalisées par GC-MS. Les valeurs sont la moyenne et l'indice de confiance calculés à partir des résultats de trois expérimentations indépendantes.

<i>Souche</i>	<i>ADNc exprimé</i>	<i>Géraniol $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$</i>	<i>Linalol $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$</i>
FY1679-28C vecteur vide	-	nd ^a	nd
MO8	<i>vGPPS</i>	nd	nd
5247 vecteur vide	-	nd	nd
MO25	<i>vGPPS</i>	TRACES ^b	nd
CC25 vecteur vide	-	70 \pm 17	47 \pm 12
MO1	<i>vGPPS</i>	68 \pm 13	50 \pm 17

a : non détecté dans nos conditions expérimentales

b : quantités détectées $>10 \mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$

4.2.2 Dosage des Δ -5,7stérols dans les souches transformées ainsi que des monoterpénols excrétés

La quantification des Δ -5,7stérols a été réalisée sur les culots cellulaires lyophilisés des souches MO8 et MO25 après culture en milieu minimum jusqu'à la phase stationnaire de croissance selon la méthode de saponification (Breivik & Owades 1957). Il n'est pas intéressant de réaliser le dosage des stérols sur les souches dérivées de CC25 car ces dernières nécessitent un apport d'ergostérol exogène pour sa croissance.

Des résultats opposés sont obtenus pour les deux souches Erg⁺ FY1679-28C et 5247 (Tableau 7). Chez la première souche, l'expression de la vGPPS est sans effet sur la teneur en ergostérol alors que chez la seconde la teneur est clairement réduite.

Le Tableau 8 présente les résultats des extractions de terpènes réalisées à partir des milieux de culture des souches surexprimant vGPPS en comparaison à ceux des souches témoins portant un plasmide vide. Comme attendu, nous n'avons pas détecté de terpénols dans les souches sauvages. En effet, il est bien connu que les levures *S. cerevisiae* ne produisent pas de terpénols. Du géraniol et du linalol ont été mis en évidence, à partir des souches CC25 contrôles et transformées, à des concentrations similaires. Il s'agit des teneurs habituelles obtenues pour la souche CC25. Aucun terpénol n'a été observé à partir des deux souches sauvages exprimant vGPPS mis à part des traces de géraniol chez la souche 5247 détectées grâce à une analyse fine par spectrométrie de masse.

Même si ces résultats semblent indiquer un effet de la vGPPS sur la voie de biosynthèse des isoprénoïdes de levure, ils ne permettent pas de conclure quant à l'activité de synthèse de GPP par la protéine GPPS de vigne.

4.2.3 Test de la complémentation fonctionnelle de l'activité farnésyl diphosphate synthase par vGPPS

En l'absence de phénotypes clairs montrant l'activité de vGPPS dans les souches MO8, MO25 et MO1, nous avons voulu savoir si la protéine possédait une activité farnésyl diphosphate synthase, même faible, mais qui pourrait être éventuellement suffisante pour compléter une souche délétée pour le gène *ERG20*. Rappelons que l'absence de toute activité FPPS est létale pour les levures.

Nous avons donc transformé une souche délétée pour le gène *ERG20* et complémentée par un plasmide portant le gène *ERG20* et le marqueur *URA3* de levure, par l'ADNc codant la vGPPS de vigne portée par un plasmide dont le marqueur de sélection est *TRP1*. La culture de la souche sur milieu supplémenté en uracile et en acide 5-Fluoro-orotique (5-FOA) permet de sélectionner les souches Ura^- . En effet, le 5-FOA est toxique pour les levures Ura^+ .

Malgré plusieurs essais réalisés en présence et en absence d'ergostérol, il n'a pas été possible de faire perdre le plasmide *URA3-ERG20* à la souche, ce qui indique que la vGPPS exprimée chez la levure n'a pas la capacité de synthétiser du FPP pour permettre sa croissance, même en présence d'un apport exogène en ergostérol.

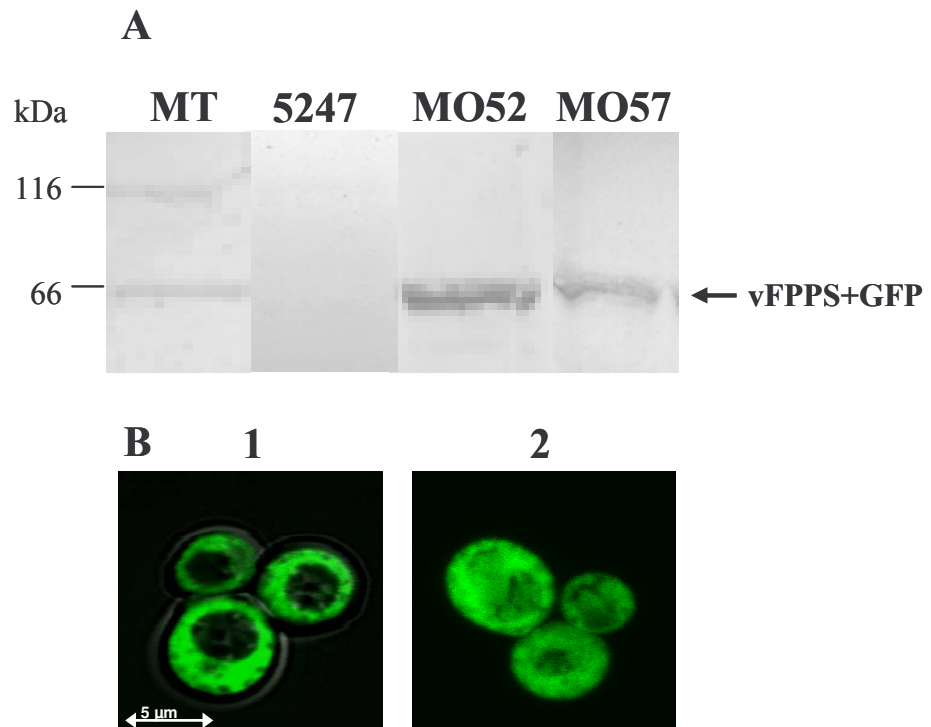


Figure 40 : Mis en évidence par Western blot de la protéine vFPPS fusionnée à la GFP dans des extraits protéiques bruts de levures et visualisation par microscopie confocale de sa localisation subcellulaire.

A, Western blot réalisés à partir de 40 µg protéines totales des souches MO52 et MO54 révélés par un anticorps monoclonal anti-GFP. La souche 5247 porte un vecteur vide et sert de témoin. MT, marqueur de taille. (vGPPS, 35 kDa ; GFP, 26 kDa)

B, localisation subcellulaire de la protéine vGPPS fusionnées à la GFP. Les photos présentent une vue transversale (1) et une vision en deux dimensions (2) d'une cellule de la souche MO8. Les mêmes résultats ont été observés pour les autres souches exprimant l'ADNc vGPPS.

4.3 Confirmation *in vivo* de l'activité farnésyl diphosphate synthase de vFPPS

4.3.1 Complémentation fonctionnelle chez la levure de l'activité farnésyl diphosphate synthase par vFPPS

La démonstration de l'activité farnésyl diphosphate synthase de vFPPS peut être réalisée par un test de complémentation à partir d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* délétée pour le gène *ERG20*. En effet, une souche haploïde exprimant vFPPS et possédant une copie disruptée du gène *ERG20* ne sera viable que si vFPPS possède effectivement une activité farnésyl diphosphate synthase.

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé la souche diploïde Y21258 qui possède le génotype : *Mat a/α, his 3Δ1/his 3Δ1, leu 2Δ0 / leu 2Δ0, lys 2Δ0 / LYS 2, MET 15/ met 15Δ 0, ura 3Δ0 / ura 3Δ0, ERG20/erg20 :: kan MX4*. Les souches MO52 et MO54 ont pu être obtenues après transformation du diploïde Y21258 par les plasmides pMO9 et pMO11 exprimant respectivement les allèles *vFPPSI-1* et *vFPPSI-2*, sporulation des souches obtenues et sélection de clones haploïdes prototrophes pour l'uracile et résistant à la kanamycine.

La viabilité de ces deux souches en tant que telle nous assure de la présence d'une protéine vFPPS fonctionnelle dans les cellules. Un Western blot et une localisation subcellulaire par microscopie confocale nous ont confirmé sa présence en grande quantité dans le cytoplasme des cellules (Figure 40). Ces résultats montrent que les protéines vFPPS-F et vFPPS-C possèdent des activités farnésyl diphosphate synthase suffisantes pour permettre la croissance de la levure.

Tableau 9 : Teneur en Δ -5,7 stérols des souches exprimant les ADNc *vFPPS1-1*, *vFPPS1-2* en comparaison à des souches exprimant *ERG20* ou *erg20-2*. *

Les stérols ont été extraits par saponification à partir de cellules lyophilisées après une croissance en milieu minimum jusqu'à la phase stationnaire. Les données sont les moyennes de deux répétitions indépendantes (Breivik & Owades 1957).

<i>Souche</i>	<i>ADNc exprimé</i>	Δ -5,7stérols $\mu\text{g (mg Poid Sec)}^{-1}$
MO56	<i>ERG20</i>	3,9 \pm 1,0
MO57	<i>erg20-2</i>	3,7 \pm 1,1
MO52	<i>vFPPS-F</i> ^a	3,4 \pm 1,1
MO54	<i>vFPPS-C</i> ^a	3,0 \pm 0,4
MO63	<i>vFPPS-F</i>	4,8 \pm 0,8
MO64	<i>vFPPS-C</i>	4,0 \pm 0,8

a : ADNc exprimé en fusion avec la GFP

Tableau 10 : Monoterpénols produits par des souches exprimant les ADNc *vFPPS1-1*, *vFPPS1-2* en comparaison à des souches exprimant *ERG20* ou *erg20-2*. *

La séparation et l'identification des composés volatils du milieu de culture en phase stationnaire de croissance ont été réalisées par GC-MS. Les valeurs sont la moyenne et l'indice de confiance calculés à partir des résultats de trois expérimentations indépendantes.

<i>Souche</i>	<i>ADNc exprimé</i>	<i>Géranol</i> $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$	<i>Linalol</i> $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$
MO56	<i>ERG20</i>	nd ^a	nd
MO57	<i>erg20-2</i>	23 \pm 2	46 \pm 10
MO52	<i>vFPPS-F</i> ^b	16 \pm 6	42 \pm 29
MO54	<i>vFPPS-C</i> ^b	17 \pm 4	49 \pm 11
MO63	<i>vFPPS-F</i>	nd	nd
MO64	<i>vFPPS-C</i>	nd	nd

a : non détecté dans nos conditions expérimentales

b : ADNc exprimé en fusion avec la GFP

* Les souches MO56, MO57, MO52, MO54, MO63 et MO64 sont délétées pour le gène *ERG20* et complétées par les gènes *ERG20*, *erg20-2* ou les gènes *vFPPS* de vigne.

4.3.2 Teneur en Δ -5,7stérols et en terpénols de souches complémentées par vFPPS-F et vFPPS-C

Nous avons comparé les teneurs en stérols et en terpénols des souches MO52 et MO54 à celles de souches construites selon le même schéma mais complémentées par le gène *ERG20* (souche MO56) ou le gène *erg20-2* (souche MO57) portés par le plasmide pNEV-N.

La teneur en Δ -5,7stérols des souches transformées est similaire pour l'ensemble des souches, ce qui confirme que l'activité enzymatique des deux protéines de vigne est suffisante pour permettre une synthèse normale de stérols. (Tableau 9).

L'analyse des terpénols excrétés révèle que les souches MO57, MO52 et MO54 exprimant respectivement les gènes *erg20-2*, *vFPPS1-1* et *vFPPS1-2* produisent des quantités de géraniol et de linalol similaires à celles de la souche CC25 (Tableau 10). Ce résultat tend à montrer que les protéines vFPPS-F et vFPPS-C fusionnées à la GFP possèdent des propriétés catalytiques proches de l'enzyme de levure Erg20-2p qui présente la particularité de synthétiser du GPP.

La question qui se pose alors est de savoir si les protéines vFPPS-F et vFPPS-C non marquées par la GFP présentent la même propriété. Pour y répondre, nous avons construit les souches MO63 et MO64 complémentées par les allèles *vFPPS1-1* et *vFPPS1-2* non marquées par la GFP.

Les teneurs en ergostérol sont similaires pour ces souches par rapport au témoin MO56 (Tableau 9). Par contre les souches portant les allèles natifs de la vFPPS n'excrètent pas de monoterpénols contrairement aux souches portant la vFPPS fusionnée à la GFP (Tableau 10). Ces résultats suggèrent que les protéines vFPPS-F et vFPPS-C possèdent des activités enzymatiques spécifiques de la production de FPP mais qu'à l'image de l'enzyme de levure Erg20-2p, elles peuvent synthétiser du GPP quand leurs propriétés catalytiques sont altérées.

4.4 Activité enzymatique *in vitro* de vGPPS et vFPPS

Dans l'objectif d'étudier l'activité enzymatique *in vitro* des protéines codées par les ADNc vGPPS, vFPPSI-1 et vFPPSI-2, nous voulions procéder à leur purification. En effet, s'il est possible de mesurer l'activité enzymatique de vFPPS directement dans un extrait acellulaire de levures complémentées comme MO52 et MO54, ce n'est pas le cas pour vGPPS qui verrait son activité masquée par celle de la FPPS endogène de levure. Outre la présence de la protéine GFP sur le vecteur d'expression pMO1 que nous avons utilisé pour exprimer ces gènes, celle-ci est marquée à son extrémité par 6 résidus histidines qui doivent permettre une purification de la protéine fusion. Il existe en effet des systèmes de chromatographie par gel d'affinité au nickel qui permettent de retenir des protéines possédant une extrémité riche en résidus histidines. Les protéines sont ensuite éluées par compétition avec de l'imidazole.

La purification des protéines fusion n'a pas été possible par cette méthode à partir d'extraits bruts de levure. Il n'y avait vraisemblablement pas une quantité suffisante de protéines dans les extraits pour permettre une purification efficace. Cette technique nécessite en effet des quantités importantes de protéine fusion car l'efficacité d'accrochage et d'éluion est très variable en fonction de la protéine exprimée.

Face à ces difficultés, nous avons essayé d'exprimer les trois ADNc chez *Escherichia coli*. Nous disposons du système QIAexpress de Qiagen qui comprend une famille de vecteurs pQE permettant de cloner et d'exprimer des gènes en fusion avec une queue 6 histidines. Les ADNc vGPPS, vFPPSI-1 et vFPPSI-2 ont été clonés dans le vecteur pQE30 qui intègre les résidus histidines à l'extrémité C-terminale de la protéine. Malgré tous nos efforts, nous n'avons pas réussi à induire l'expression de ces protéines chez la bactérie. De nombreux essais ont été réalisés afin d'optimiser la température de culture des souches avant et pendant l'induction, la concentration en IPTG, le moment et la durée de l'induction. Ils se sont tous révélés infructueux. Nous n'avons pas pu observer, sur un profil de migration des protéines totales par SDS-PAGE, l'apparition de bandes spécifiques correspondant aux protéines exprimées.

Dans ce contexte, nous avons décidé de tester tout de même l'activité enzymatique des trois protéines à partir d'un extrait acellulaire de levure. Notre objectif était de déterminer si vGPPS possédait effectivement une activité prényl transférase et de comparer les activités de la vFPPS-F codée par *vFPPS1-1* et de la vFPPS-C codée par *vFPPS1-2*.

4.4.1 Une activité spécifique très faible pour vGPPS

La souche CC25, qui possède la mutation *erg20-2*, présente une activité spécifique farnésyl diphosphate synthase extrêmement faible qui la rend quasiment indétectable dans certaines conditions expérimentales (Blanchard & Karst 1993). Nous avons décidé d'utiliser cette souche pour estimer l'activité spécifique de la protéine vGPPS afin de limiter au maximum l'activité FPPS qui masquerait celle de la vGPPS.

Les essais enzymatiques ont été réalisés à partir d'extraits protéiques bruts des souches CC25 et MO1 (CC25 exprimant *vGPPS*). Après incubation des protéines en présence de [¹⁴C]IPP et de DMAPP, les produits de réaction sont déphosphorylés en milieu acide puis les composés acido-labiles sont extraits par l'hexane. Le comptage de la radioactivité des extraits ainsi préparés a révélé des activités enzymatiques extrêmement faibles mais différentes entre les deux souches montrant une activité spécifique réelle de vGPPS. Cependant, le nombre de coups par minute obtenu n'est pas suffisamment significatif pour permettre le calcul d'une valeur précise de cette activité. L'analyse des produits de réaction par chromatographie sur couche mince a révélé la présence d'un produit majoritaire dont la migration est similaire à celle du géraniol dans les extraits contenant vGPPS. Il faut toutefois prendre cette information avec prudence à cause de la radioactivité très faible observée sur la plaque.

Ces résultats confirment que la protéine vGPPS fusionnée à la GFP possède une activité très faible. Ils suggèrent également fortement que cette activité conduit à la synthèse de GPP.

Tableau 11 : Activité spécifique des deux protéines vFPPS-F et vFPPS-C fusionnées ou non à la GFP.

Les extraits protéiques bruts des souches sont incubés en présence de [¹⁴C]IPP et de DMAPP. Les souches MO63, MO64, MO52 et MO54 sont délétées pour le gène *ERG20* et complétées par les gènes *vFPPS* de vigne fusionnées ou non à la GFP.

<i>Souche</i>	<i>ADNc exprimé</i>	<i>Activité spécifique</i> <i>nmol min⁻¹ (mg Protéines)⁻¹</i>
MO63	<i>vFPPS-F</i>	0,26
MO64	<i>vFPPS-C</i>	0,10
MO52	<i>vFPPS-F^a</i>	0,10
MO54	<i>vFPPS-C^a</i>	0,07

a : ADNc exprimé en fusion avec la GFP

4.4.2 Des activités spécifiques différentes entre vFPPS-F et vFPPS-C

La mesure de l'activité spécifique des protéines vFPPS-F et vFPPS-C a été réalisée à partir des extraits protéiques des souches MO63, MO64, MO52 et MO54 délétées pour le gène *ERG20* et complémentées par les protéines de vigne fusionnées ou non à la GFP. Les réactions ont été effectuées à des concentrations en substrats IPP et DMAPP proches du K_m apparent de la FPPS d'*Arabidopsis thaliana* car dans ces conditions, où l'enzyme n'est pas saturée en substrats, une différence d'activité spécifique est peut-être plus facilement décelable (*cf.* Matériels et Méthodes, 2.3.4 *Mesure des activités GPPS et FPPS in vitro*).

La comparaison des activités spécifiques obtenues pour les protéines vFPPS non marquées à la GFP révèle que la protéine vFPPS-C possède une activité deux fois inférieure à celle de la protéine vFPPS-F (Tableau 11). Nous avons également pu observer que la GFP fusionnée en N-terminal des deux vFPPS inhibe leur activité d'environ 50%.

Ces résultats sont faussés par l'activité IPP isomérase car nous ne disposons pas d'un inhibiteur spécifique mais ils montrent de façon relative qu'il existe une différence d'activité *in vitro* entre les protéines. Il faut remarquer que la queue GFP ne diminue l'activité spécifique des deux protéines que de moitié.

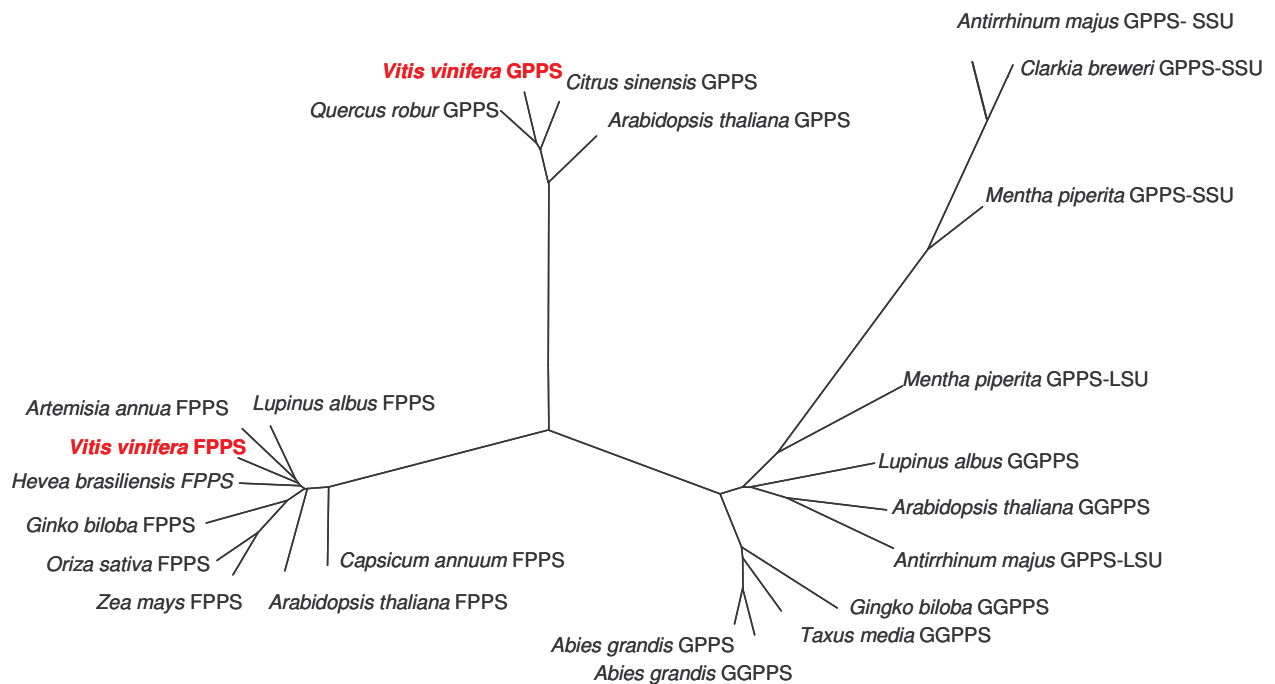


Figure 41 : Arbre phylogénique construit par la méthode du Neighbor-Joining basée sur les similarités de séquence entre des GPPS, FPPS et GGPPS de plantes.

La comparaison des séquences et l'arbre ont été réalisés à l'aide du logiciel *MEGA* version 3.1 (Kumar et al. 2004). Seule une partie des séquences connues de FPPS et de GGPPS de plantes ont été utilisées.

Numéros d'accession GenBank : *Artemisia annua* FPPS, AF112881 ; *Lupinus albus* FPPS, U15777 ; *Vitis vinifera* FPPS, AY966012 ; *Hevea brasiliensis* FPPS, AY135188 ; *Ginkgo biloba* FPPS, AY389818 ; *Oriza sativa* FPPS, AB021747 ; *Zea mays* FPPS, L39789 ; *Arabidopsis thaliana* FPPS, X75789 ; *Capsicum annuum* FPPS, X84695 ; *Abies grandis* GPPS, AF513111 ; *Abies grandis* GGPPS, AF425235 ; *Taxus media* GPPS, AY453404 ; *Ginkgo biloba* GGPPS, AY371321 ; *Antirrhinum majus* GPPS-LSU, AY534687 ; *Arabidopsis thaliana* GGPPS, NM119845 ; *Lupinus albus* GGPPS, U15778 ; *Mentha piperita* GPPS-LSU, AF182828 ; *Mentha piperita* GPPS-SSU, AF182827 ; *Clarkia breweri* GPPS-SSU, AY534745 ; *Antirrhinum majus* GPPS-SSU, AY534686 ; *Arabidopsis thaliana* GPPS, Y17376 ; *Citrus sinensis* GPPS, AJ243739 ; *Vitis vinifera* GPPS AY351862 ; *Quercus robur* GPPS, AJ298245.

5 Discussion

Nous avons cloné deux gènes de prényltransférases potentielles de *Vitis vinifera*, *vGPPS* et *vFPPS*, par PCR à partir d'ADNc. L'arbre phylogénique construit à partir des séquences nucléotidiques de GPPS, FPPS et GGPPS de plantes et des deux ADNc de vigne confirme que ces deux gènes appartiennent à la famille des prényltransférases (Figure 41). Plus particulièrement, *vGPPS* se positionne parmi les séquences des géranyl diphosphate synthases de type *Arabidopsis thaliana* et *vFPPS* parmi les séquences de farnésyl diphosphate synthases.

Les fortes similitudes de séquences entre l'ADNc *vGPPS* et le gène codant la GPPS homodimérique d'*Arabidopsis thaliana* laissent présager que la protéine *vGPPS* de *Vitis vinifera* est également de forme homodimérique. Les formes hétérodimériques de GPPS n'ont jusqu'ici été isolées que chez des plantes possédant des tissus spécialisés dans la synthèse de terpènes, absents chez la vigne, ce qui explique peut-être que nous n'ayons pas trouvé une telle protéine (Burke et al. 1999, Tholl et al. 2004).

Nous avons mis en évidence trois formes alléliques de *vGPPS* par clonage de l'ADNc chez trois variétés de vigne. Ce polymorphisme engendre deux formes protéiques qui se distinguent par une substitution d'acides aminés isoleucine \leftrightarrow valine (I/V) en position 209. Remarquons que la protéine caractérisée chez *Arabidopsis thaliana* possède l'acide aminé isoleucine à cette position. L'expression hétérologue chez la levure de l'allèle I de la protéine *vGPPS* nous a permis de montrer que la protéine fusionnée à la GFP possède une activité enzymatique très faible mais liée à la biosynthèse des isoprénoïdes. En effet, même si elle ne permet pas la complémentation fonctionnelle d'une souche délétée pour son activité farnésyl diphosphate synthase, la surexpression de *vGPPS* dans la souche sauvage 5247 diminue sa teneur en ergostérol et entraîne l'excrétion de petites quantités de géraniol. Ces observations contradictoires ne permettent pas de définir le produit de réaction spécifique de la protéine car si la présence de géraniol suggère que *vGPPS* possède une activité géranyl diphosphate synthase, les faibles quantités observées ne permettent pas d'expliquer la baisse importante de l'ergostérol. Il n'a pas non plus été possible de déterminer clairement *in vitro* le produit de

réaction spécifique de la protéine vGPPS car l'activité enzymatique observée à partir d'extraits acellulaires de levure est trop faible. Il est possible que cette très faible activité soit liée au marquage de la protéine par la GFP. Ainsi pour pouvoir conclure définitivement, il sera nécessaire de tester la protéine vGPPS native chez la levure ou de réussir à la purifier dans sa forme native afin de la tester *in vitro* dans des conditions optimales. Il sera alors envisageable de comparer les activités spécifiques des deux types alléliques I et V de la protéine afin de déterminer si elles présentent des différences.

Face à ces résultats, il faut tout de même souligner que même si la protéine vGPPS isolée se révèle effectivement être une géranyl diphosphate synthase, il ne s'agit pas de la protéine ayant une activité GPPS mise en évidence dans les cultures cellulaires de muscat par Clastre *et al.* en 1993. En effet, l'ADNc que nous avons cloné code pour une protéine ayant une taille d'environ 35 kDa alors que celle associée à l'activité GPPS chez le muscat présente une masse moléculaire de 66 kDa.

Le clonage de l'ADNc *vFPPS* chez trois variétés de *Vitis vinifera* a mis en évidence deux formes alléliques de la protéine. Elles se distinguent par la substitution d'acides aminés phénylalanine / cystéine en position 72. La complémentation fonctionnelle chez la levure a montré que les deux formes de la protéine vFPPS possèdent une activité farnésyl diphosphate synthase. Par contre, nous avons pu mettre en évidence *in vitro* des activités spécifiques différentes entre les deux protéines. Il paraît important de déterminer maintenant le ratio des produits de réaction GPP/FPP des protéines et de confirmer leurs activités *in planta*. En effet, il a été montré que la fraise de culture possède une terpène synthase cytoplasmique qui utilise le GPP et le FPP du cytoplasme pour synthétiser du linalol et du nérolidol (Aharoni et al. 2004). Il se peut que dans un tel contexte l'activité catalytique de la FPPS influence les quantités de terpénols synthétisés en fonction de sa propre capacité à produire plus ou moins de GPP. Ainsi, si l'une des deux formes de vFPPS synthétise des quantités plus importantes de GPP, il serait intéressant de comparer le lieu et le moment d'expression de chacun des deux allèles à l'évolution des teneurs en terpénols des différents tissus de la plante afin d'évaluer s'il existe un lien entre les deux. De plus, notons que les deux allèles de *vFPPS* ont pu être clonés chez les cépages gewurztraminer et muscat alors que nous n'avons mis en évidence que l'allèle codant la forme F, la plus active, chez le savagnin rose, cépage

non aromatique.

Nous avons pu constater lors de ce travail que le clonage de gènes chez *Vitis vinifera* à partir d'ADN génomique ne s'avère pas toujours aisé. En effet, l'utilisation de la technique de marche génomique se confronte à des difficultés liées à un fort polymorphisme de certains gènes et à la présence de nombreux introns de grandes tailles. L'utilisation de la technique de RT-PCR ne résout pas toujours ces problèmes car elle nécessite que le gène que l'on souhaite cloner soit correctement exprimé. Nous n'avons ainsi pas réussi à cloner l'ADNc entier de la terpène synthase potentielle vLIS car le gène ne s'exprime pas dans les feuilles, les fleurs et les baies mûres des trois cépages gewurztraminer, muscat à petits grains blancs et savagnin rose. Une étude approfondie des conditions et des lieux d'expression du gène s'avère donc indispensable avant tout clonage d'un gène de la voie de synthèse des monoterpénols. Remarquons ici qu'il n'y a que 11 EST, sur les 23 871 que contient la base de donnée TIGR à ce jour, annotées comme similaires à des terpènes synthases de plantes. Ce chiffre peut être considéré comme un indicateur du faible nombre de gènes de la voie de biosynthèse des terpénoïdes qui s'expriment chez la vigne.

Partie II

Etude de la synthèse des monoterpénols : utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle

Outre l'intérêt d'étudier les enzymes impliquées dans la synthèse du GPP pour comprendre la spécificité de production des monoterpénols chez les cépages aromatiques de vigne, il faut s'intéresser à la métabolisation du GPP par des terpènes synthases spécifiques. Nous avons décidé d'utiliser la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour étudier les mécanismes de biosynthèse des monoterpénols. En effet, la levure est un organisme modèle pour l'étude et l'ingénierie des voies métaboliques complexes des cellules eucaryotes. C'est également un organisme favorable à la production de protéines recombinantes ce qui le rend également adapté à la production de molécules d'intérêt industriel soit par bioconversion soit par synthèse *de novo*. Ainsi, nous avons analysé la capacité de souches de levure exprimant des gènes de terpènes synthases (TPS) à synthétiser des terpénols. Nous avons également entrepris de combiner l'expression de ces TPS à celle d'ADNc codant des enzymes impliquées dans la synthèse du GPP. Ne disposant pas de TPS de *Vitis vinifera*, nous avons utilisé les ADNc codant la géraniol synthase (GES) récemment isolée chez le basilic (*Ocimum basilicum*) et la linalol synthase (LIS) de *Clarkia breweri*, toutes deux caractérisées sur le plan biochimique (Pichersky et al. 1994, Dudareva et al. 1996, Iijima et al. 2004b).

1 Analyse des phénotypes liés à l'expression de la LIS de *Clarkia breweri* et de la GES d'*Ocimum basilicum* chez des souches sauvages de levure

1.1 Construction des souches et mise en évidence des protéines

Les ADNc de la linalol synthase de *Clarkia breweri* (N° accession AAD19838) et de la géraniol synthase d'*Ocimum basilicum* (N° accession AAR11765), clonés dans le vecteur pBluescript, nous ont été gracieusement fournis par le Dr Eran Pichersky (Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, Université de Michigan). Les cadres ouverts de lecture ont été clonés par recombinaison en fusion avec la GFP dans le vecteur pMAGT (cf. Matériels et Méthodes, 2.1.5.3 *Recombinaison homologue chez la levure*). L'analyse des ADNc LIS et GES a révélé l'existence d'une séquence d'adressage plastidiale à l'extrémité 5' (Dudareva et al. 1996, Iijima et al. 2004b). En règle générale, il est préférable de retirer les séquences d'adressage plastidiales du cadre de lecture lorsqu'on réalise de l'expression génique chez la levure. Dans le cas de l'ADNc LIS, au risque d'obtenir une protéine non active car le site exact du clivage n'est pas connu, nous n'avons pas éliminé cette séquence au moment du clonage. Un ADNc GES tronqué de sa séquence d'adressage a par contre été cloné dans le pMAGT. On a effectivement montré que l'expression chez *E. coli* du fragment commençant à la Met-44 permet la synthèse d'une protéine active (Iijima et al. 2004b).

Nous avons ainsi construit les plasmides pMO5 et pMO6 qui expriment les ADNc GES et LIS respectivement. Les souches sauvages FY1679-28C et 5247 ont été transformées par ces deux plasmides ; les souches obtenues ont été nommées MO10, MO11 et MO27, MO28. La synthèse effective de chaque protéine a été vérifiée par Western blot et leur localisation subcellulaire a été déterminée par microscopie confocale.

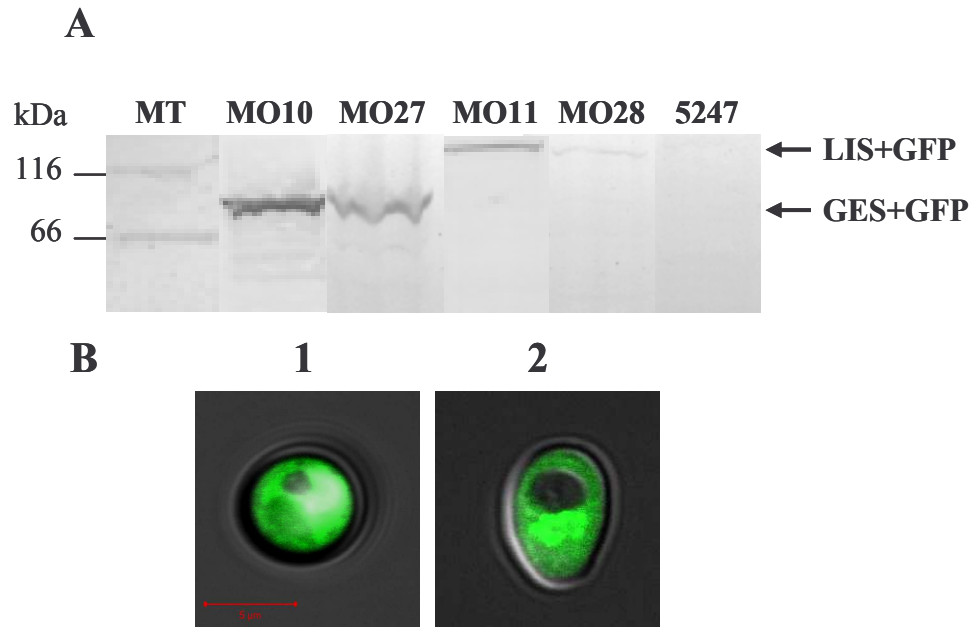


Figure 42 : Mises en évidence par Western blot des protéines GES et LIS fusionnées à la GFP dans des extraits protéiques bruts de levures et visualisation par microscopie confocale de leur localisation subcellulaire.

A, Western blot réalisés à partir de 40 μ g protéines totales des souches MO10 , MO27, MO11 et MO28 révélés par un anticorps monoclonal anti-GFP. La souche 5247 porte un vecteur vide et sert de témoin. MT, marqueur de taille. (GES, 65 kDa ; LIS, 100 kDa ; GFP, 26 kDa)

B, localisation subcellulaire des protéines GES (1) et LIS (2) fusionnées à la GFP. Les photos présentent une vue transversale d'une cellule de la souche MO10 (1) et MO11 (2). Les mêmes résultats ont été observés pour les autres souches exprimant les ADNc *GES* ou *LIS*.

Les Western blots réalisés à l'aide d'anticorps anti-GFP sur les protéines totales des quatre souches confirment la présence de la protéine GES en grande quantité dans les deux souches (Figure 42). La protéine LIS se trouve par contre en quantité plus faible dans la souche FY1679-28C et quasiment absente dans la souche 5247.

L'observation des souches au microscope confocal montre une localisation cytoplasmique des deux protéines. Il faut remarquer qu'une grande quantité de la protéine LIS s'agrège dans des structures vésiculaires. De plus, le nombre de cellules fluorescentes est très nettement inférieur chez les souches exprimant ce gène par rapport aux autres. Cette observation explique que la quantité de protéine hétérologue soit faible sur les Western blots.

Tableau 12 : Monoterpénols excrétés par des souches de levure sauvages exprimant l'ADNc *GES* ou *LIS*.

Les terpénols ont été extraits du milieu de culture en phase stationnaire de croissance par fractionnement sur cartouche Bond Elut C18. La séparation et l'identification des composés volatils ont été réalisées par GC-MS. Les valeurs sont la moyenne et l'indice de confiance calculés à partir des résultats de trois expérimentations indépendantes.

<i>Souche</i>	<i>ADNc exprimé</i>	<i>Géraniol</i> $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$	<i>Linalol</i> $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$	<i>Citronellol</i> $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$
FY1679-28C vecteur vide	-	nd ^a	nd	nd
MO10	<i>GES</i>	447 ± 94	29 ± 10	12 ± 6
MO11	<i>LIS</i>	nd	nd	nd
5247 vecteur vide	-	nd	nd	nd
MO27	<i>GES</i>	559 ± 145	43 ± 41	31 ± 13
MO28	<i>LIS</i>	nd	nd	nd

a : non détecté dans nos conditions expérimentales

1.2 Dosage des monoterpénols excrétés par les souches transformées

Nous avons comparé la quantité de terpénols excrétés par les souches exprimant les gènes *GES* et *LIS* à celles de souches sauvages possédant un plasmide sans insert (Tableau 12). Aucun terpénol n'a pu être détecté pour les souches sauvages ainsi que pour les souches exprimant l'ADNc *LIS*. Une quantité très importante de géraniol (environ $500 \mu\text{g l}^{-1} \text{ DO}_{600}^{-1}$) accompagnée d'une quantité non négligeable de linalol ont été mises en évidence pour les souches exprimant l'ADNc *GES*. Par comparaison, il s'agit de teneurs en géraniol dix fois plus importantes que celle du mutant CC25. Le géraniol et le linalol sont les monoterpénols majeurs détectés dans les milieux mais il faut remarquer qu'ils s'accompagnent en général de citronellol.

Les profils chromatographiques, obtenus par analyse des milieux de culture des souches MO27 et MO28 exprimant les ADNc *GES* et *LIS* respectivement, illustrent clairement la différence de production de monoterpénols observée entre ces souches (Figure 43). Les monoterpénols ont été extraits des milieux de culture par fractionnement sur cartouche Bond Elut C18 puis identifiés et quantifiés par GC-MS. Cette méthode a été choisie pour sa faisabilité sur un grand nombre d'échantillons et pour sa fiabilité. En effet, nous avons pu déterminer que la répétabilité de l'extraction ainsi que celle de l'analyse chromatographique sont supérieures à 95% (*cf.* Matériels et Méthodes, 2.3.1.4 *Evaluation de la répétabilité et du rendement d'extraction de la méthode d'analyse*). Ainsi, il faut remarquer que la forte variabilité des indices de confiance observée pour les teneurs en terpénols de certaines souches doit être imputée aux difficultés de reproductibilité des cultures de levure.

Ces résultats montrent qu'il y a du GPP disponible dans les cellules des levures sauvages que la protéine *GES* arrive à utiliser pour la synthèse de géraniol. La présence de linalol et de citronellol en plus du géraniol peut s'expliquer par les capacités connues de *Saccharomyces cerevisiae* à réduire le géraniol en *R*-(+)-citronellol et à former du linalol à partir du géraniol (Gramatica et al. 1982, King & Richard Dickinson 2000). L'absence de linalol dans les milieux de culture des souches exprimant la *LIS* indique que soit la protéine n'est pas active soit elle se trouve en trop faible quantité pour que l'on puisse détecter son produit.

Figure 43 : Séparation et identification par GC-MS des composés volatils présents dans les milieux de culture des souches MO27 et MO28.

A : spectres de masse des monoterpénols produits par la souche MO27.

B : profil chromatographique d'un extrait obtenu après fractionnement sur cartouche C18 d'un milieu de culture de la souche MO27 qui exprime la GES.

C : profil chromatographique d'un extrait obtenu après fractionnement sur cartouche C18 d'un milieu de culture de la souche MO28 qui exprime la LIS.

1, linalol ; 2, citronellol ; 3, géraniol ; 4, 2-phényléthanol ; 5, néroliol ; 6, m-crésol (standard interne) ; 6, eugénol (standard interne).

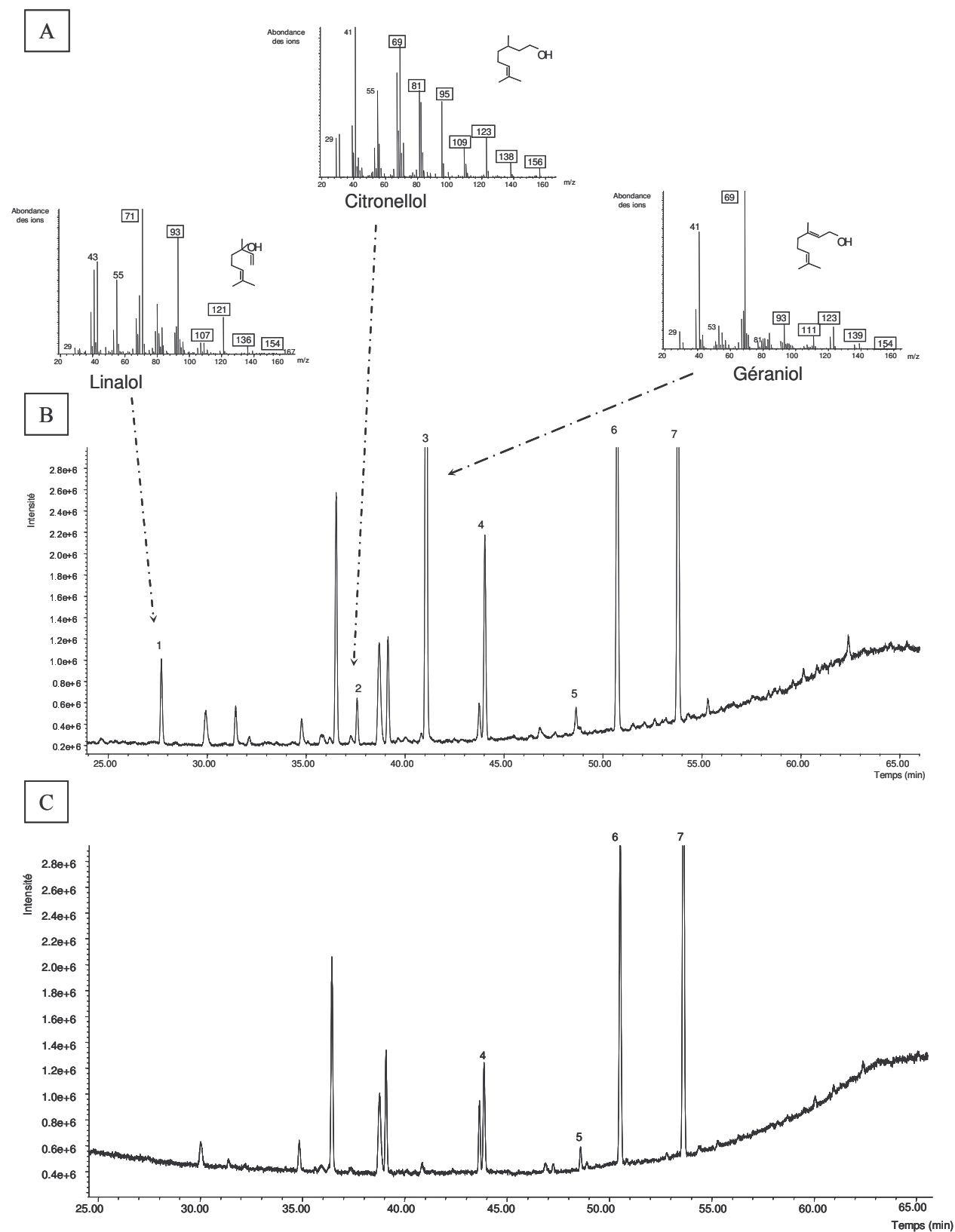


Tableau 13 : Teneur en Δ -5,7 stérols des souches de levures sauvages exprimant la protéine GES.

Les stérols ont été extraits par saponification à partir de cellules lyophilisées après une croissance en milieu minimum jusqu'à la phase stationnaire. Les données sont les moyennes de deux répétitions indépendantes (Breivik & Owades 1957).

<i>Souche</i>	<i>ADNc exprimé</i>	<i>Δ-5,7stérols $\mu\text{g (mg Poids Sec)}^{-1}$</i>
FY1679-28C vecteur vide	-	4,3 \pm 0,3
MO10	<i>GES</i>	3,9 \pm 0,6
5247 vecteur vide	-	7,2 \pm 1,1
MO27	<i>GES</i>	4,7 \pm 0,7

1.3 Effet de la GES sur la voie de biosynthèse des stérols

Au vu des quantités importantes de géraniol synthétisées dans les souches sauvages exprimant la GES, on peut se demander si ce détournement de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes aura des conséquences sur la synthèse des stérols.

Nous avons mesuré la teneur en Δ -5,7stérols des souches FY1679-28C et 5247 possédant ou non la GES. Des résultats opposés sont obtenus pour les deux souches (Tableau 13). En effet, la teneur en ergostérol de la souche FY1679-28C n'est pas affectée par l'activité de la GES alors que celle de la souche 5247 est diminuée de près de 35%.

Afin d'aller plus loin dans l'analyse de cet effet sur la synthèse des stérols chez la levure, nous avons testé deux inhibiteurs de biosynthèse des stérols, la simvastatine et l'amorolfine, sur la souche 5247 exprimant la GES. La simvastatine inhibe l'HMG-CoA réductase dont l'activité se situe en amont de la synthèse de GPPS alors que l'amorolfine inhibe la Δ -8,7stérol isomérase dont l'action se situe vers la fin de la voie.

Comme attendu, la simvastatine réduit la formation d'ergostérol ainsi que celle des monoterpénols ce qui montre que la géraniol excrété a bien comme origine la voie du mévalonate (Figure 44).

L'amorolfine quant à elle diminue la synthèse d'ergostérol mais sans affecter celle des monoterpénols (Figure 45). Ce résultat montre qu'il n'est par contre pas possible d'augmenter les quantités de géraniol formé en bloquant la synthèse d'ergostérol, produit terminal de la voie des stérols.

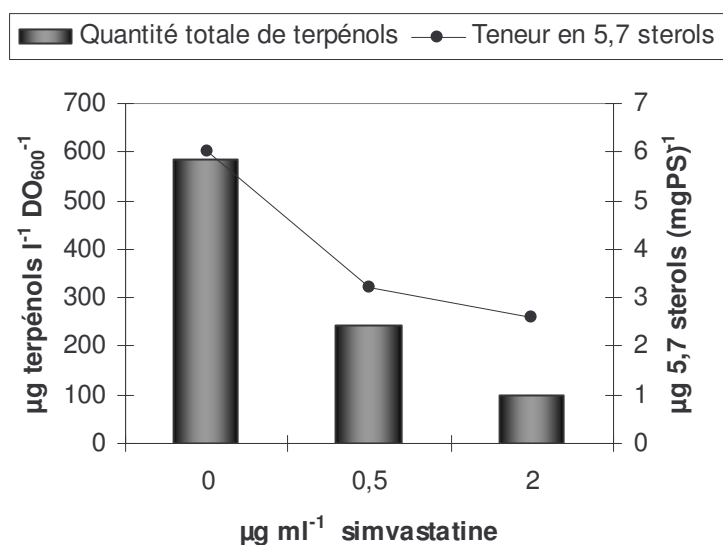


Figure 44 : Effet de la simvastatine sur la synthèse de monoterpénols et la teneur en Δ -5,7 stérols de la souche MO27 qui exprime l'ADNc *GES*.

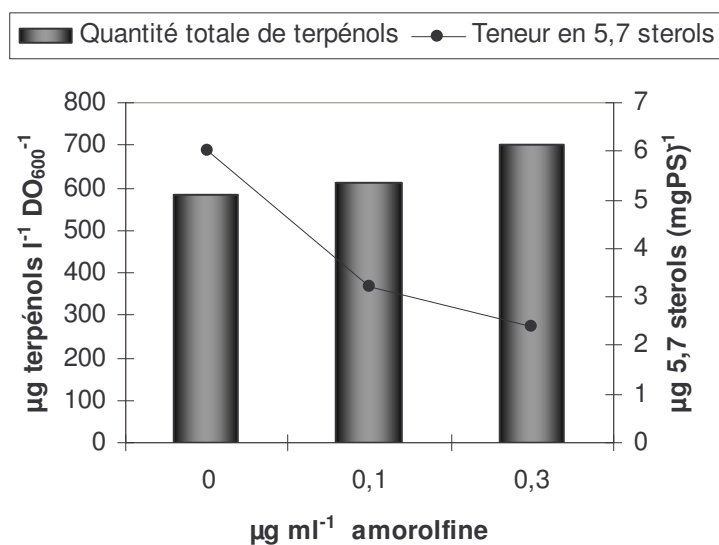


Figure 45 : Effet de l'amorolfine sur la synthèse de monoterpénols et la teneur en Δ -5,7 stérols de la souche MO27 qui exprime l'ADNc *GES*.

Tableau 14 : Monoterpénols produits par des souches de levures sauvages ou mutantes exprimant l'ADNc *GES* et/ou les gènes *ERG20* et *erg20-2*.

Les souches MO59 et MO60 sont des souches sauvages surexprimant les gènes *ERG20* ou *erg20*. Les souches MO56 et MO57 sont délétées pour le gène *ERG20* et complétées par les gènes *ERG20*, ou *erg20-2*.

La séparation et l'identification des composés volatils du milieu de culture en phase stationnaire de croissance ont été réalisées par GC-MS. Les valeurs sont la moyenne et l'indice de confiance calculés à partir des résultats de trois expérimentations indépendantes.

<i>Souche</i>	<i>ADNc exprimé</i>	<i>Géraninol</i> $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$	<i>Linalol</i> $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$	<i>Citronellol</i> $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$
CC25 vecteur vide		70 ± 17	47 12	nd ^a
MO2	<i>GES</i>	920 ± 256	60 ± 39	30 24
MO59	<i>ERG20</i>	nd	nd	nd
MO59 GES	<i>ERG20 GES</i>	447 ± 159	17 ± 33	15 ± 29
MO60	<i>erg20-2</i>	nd	nd	nd
MO60 GES	<i>erg20-2 GES</i>	476 ± 167	22 ± 21	14 ± 29
MO56	<i>ERG20</i>	nd	nd	nd
MO56 GES	<i>ERG20 GES</i>	797 ± 69	96 ± 143	45 ± 88
MO57	<i>erg20-2</i>	23 ± 2	46 ± 10	nd
MO57 GES	<i>erg20-2 GES</i>	989 ± 371	7 ± 13	82 ± 33

a : non détecté dans nos conditions expérimentales

2 Expression de la GES chez des levures affectées dans la farnésyl diphosphate synthase

L'excrétion de géraniol par des souches sauvages possédant une géraniol synthase a montré qu'il y a du GPP dans les cellules qui peut être déphosphorylé en géraniol. Quel est le facteur limitant dans cette équation ? Est-ce que la GES a pu déphosphoryler tout le substrat disponible et donc en augmentant la production de GPP il devrait y avoir augmentation de la teneur en géraniol ? Ou est-ce que l'activité de déphosphorylation est limitante ce qui signifierait que, dans ce contexte, il n'y a pas possibilité d'obtenir plus de géraniol en augmentant la production de GPP ? Afin de répondre à ces questions, nous avons exprimé l'ADNc *GES* dans des souches affectées dans la FPPS. Rappelons que la FPPS est codée chez la levure par un gène unique et essentiel appelé *ERG20* et que des mutants portant l'allèle *erg20-2* excrètent des faibles quantités de géraniol et de linalol car la protéine Erg20-2p produit 75% de GPP et 25% de FPP (Blanchard & Karst 1993).

Dans un premier temps, nous avons transformé la souche CC25 avec le plasmide pMO5 qui porte le gène de la GES. L'analyse des terpénols excrétés par cette souche, nommée MO2, a révélé une concentration de $920 \mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$ (Tableau 14). Cette teneur est presque deux fois supérieure à celles des souches sauvages exprimant la GES. Ce résultat confirme qu'il s'agit de la quantité de GPP disponible dans la cellule qui est limitante pour l'accroissement de la synthèse de géraniol face à l'activité géraniol synthase. La biosynthèse de géraniol dans les levures transformées peut donc être augmentée par le renforcement du pool de GPP disponible dans la cellule.

Dans cette optique, nous avons voulu dans un second temps essayer d'augmenter la biosynthèse de géraniol des souches transformées en surexprimant les gènes *ERG20* et *erg20-2*. Pour cela, nous avons transformé la souche FY1679-28C possédant ou non la GES par les plasmides pBS et pKS qui expriment les deux gènes sous le contrôle du promoteur fort pMA1. L'analyse des terpénols excrétés par les quatre souches ainsi obtenues, MO59 et MO59 GES qui portent pBS et MO60 et MO60 GES qui portent pKS, montrent une teneur en géraniol similaire à celle des souches d'origine (Tableau 14). Elles synthétisent toutes environ $500 \mu\text{g l}^{-1} \text{ DO}_{600}^{-1}$ lorsqu'elles expriment la GES. Même la surexpression du gène *erg20-2* ne permet pas une augmentation de la synthèse de géraniol.

A l'inverse, nous avons pu constater que la complémentation de souches délétées pour le gène *ERG20*, par les plasmides pBS et pKS, accompagnée de la présence de la GES permettait une augmentation de l'excrétion de géraniol (Tableau 14). Ainsi la souche MO56 GES, complétementée par *ERG20*, excrète environ deux fois plus de géraniol que la souche MO59 GES. De même la souche MO57 GES, complétementée par *erg20-2*, synthétise deux fois plus de géraniol que la souche MO60 GES. Mais il faut remarquer que la teneur maximale observée pour la souche MO57 GES est similaire à celle de la souche CC25 avec la GES.

Ces résultats montrent donc que la surexpression de l'activité FPPS, même de la forme Erg20-2p dans une souche délétée, ne permet pas d'augmenter la formation de géraniol.

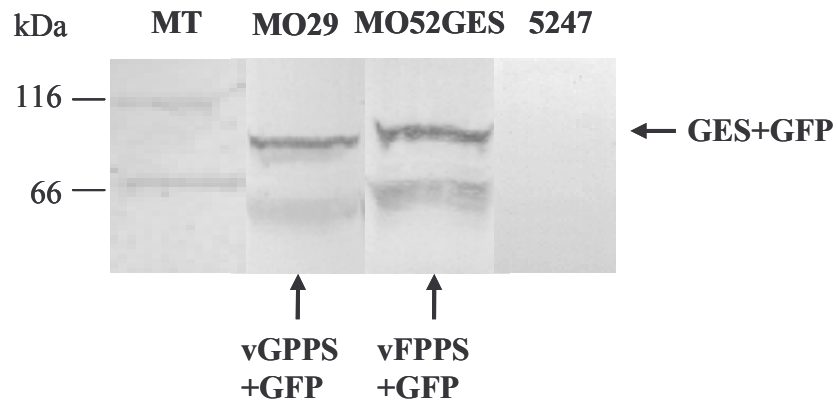


Figure 46 : Analyse par Western blot de la présence des protéines vGPPS, vFPPS et GES dans un extrait protéique brut des souches MO29 et MO52 GES.

Une quantité de 40 μ g de protéine totale a été utilisée pour chaque souche. La souche 5247 porte un vecteur vide et sert de témoin. MT, marqueur de taille. (vGPPS, 35 kDa ; vFPPS, 39 kDa ; GES, 65 kDa ; GFP, 26 kDa)

3 Etude de *vGPPS* et *vFPFS* par leur expression combinée à celle de la GES chez la levure

Au vu des résultats obtenus précédemment, nous avons pensé poursuivre l'étude chez la levure des gènes *vGPPS* et *vFPFS* en les exprimant de manière combinée à celle de l'ADNc codant la GES. En effet, il nous a paru judicieux de les exprimer conjointement à la GES pour analyser la capacité de ces protéines à produire du GPP. La teneur en terpénols mesurée pour ces souches sera considérée comme un marqueur de leur potentiel à synthétiser du GPP.

3.1 Construction des souches et mise en évidence des protéines

La construction des souches pour cette étude ne posait a priori aucun problème car il s'agissait simplement d'introduire le plasmide pMO5 portant la GES dans les souches qui expriment les ADNc *vGPPS* et *vFPFS* étudiées dans la partie I. Il n'y a effectivement eu aucun obstacle pour les souches MO52, MO54, MO63 et MO64 complémentées par les ADNc *vFPFSI-1* et *vFPFSI-2* marqués ou non à la GFP. Nous avons obtenu dès le premier essai leur équivalent exprimant la GES. Par contre, des difficultés sont apparues au moment de construire les souches exprimant *vGPPS* et GES. Les souches CC25 et FY1679-28C exprimant *vGPPS* et transformées par le plasmide pMO5 n'ont pu être obtenues malgré plusieurs essais. Nous avons également tenté d'obtenir des transformants sur des milieux contenant de la simvastatine afin de réduire l'effet toxique potentiel du géraniol, mais sans succès. A l'inverse, nous n'avons rencontré aucun problème avec la souche 5247 qui a très bien supporté l'expression combinée des ADNc *vGPPS* et GES.

Les Western blots réalisés à partir des protéines totales des souches MO29 et MO52 GES confirment la présence des protéines *vGPPS* et GES pour la souche MO29 et des protéines *vFPFS* et GES pour la souche MO52 GES (Figure 46). Des Western blots contrôles ont également été réalisés sur les autres souches confirmant à chaque fois la présence des protéines *vFPFS* et/ou GES (résultats non montrés).

Tableau 15 : Monoterpénols produits par des souches co-exprimant les ADNc *vGPPS* et/ou *vFPPS1-1*, *vFPPS-1-2* avec celui codant la protéine GES.

Les souches MO27 et MO29 sont des souches sauvages surexprimant les gènes *vGPPS* et/ou *GES*. Les souches MO52,t MO54, MO63 et MO64 sont délétées pour le gène *ERG20* et complémentées par les gènes *vFPPS* fusionnés ou non à la GFP.

La séparation et l'identification des composés volatils du milieu de culture en phase stationnaire de croissance ont été réalisées par GC-MS. Les valeurs sont la moyenne et l'indice de confiance calculés à partir des résultats de trois expérimentations indépendantes.

<i>Souche</i>	<i>ADNc exprimé</i>	<i>Géraniol</i> $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$	<i>Linalol</i> $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$	<i>Citronellol</i> $\mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$
MO27	<i>GES</i>	559 ± 145	43 ± 41	31 ± 13
MO29	<i>vGPPS GES</i>	828 ± 163	34 ± 10	26 ± 9
MO63	<i>vFPPS-F</i>	nd ^a	nd	nd
MO63 GES	<i>vFPPS-F GES</i>	147 ± 31	4 ± 7	20 ± 17
MO64	<i>vFPPS-C</i>	nd	nd	nd
MO64 GES	<i>vFPPS-C GES</i>	763 ± 114	70 ± 4	66 ± 7
MO52	<i>vFPPS-F^b</i>	16 ± 6	42 ± 29	nd
MO52 GES	<i>vFPPS-F^b GES</i>	2516 ± 720	98 ± 37	173 ± 162
MO54	<i>vFPPS-C^b</i>	17 ± 4	49 ± 11	nd
MO54 GES	<i>vFPPS-C^b GES</i>	1844 ± 696	85 ± 67	57 ± 46

a : non détecté dans nos conditions expérimentales

b : ADNc exprimé en fusion avec la GFP

3.2 Effet de l'expression combinée des ADNc *vGPPS* et *GES* sur la souche 5247

La mesure des terpénols excrétés par la souche MO29 co-exprimant les ADNc *vGPPS* et *GES* montre qu'elle synthétise environ 30% de géraniol en plus que la souche MO27 qui ne possède que la *GES* (Tableau 15). Ces résultats suggèrent fortement que la protéine *vGPPS* est enzymatiquement fonctionnelle pour la synthèse de GPP. Par ailleurs, il faut noter que l'expression simultanée de *vGPPS* et *GES* n'entraîne pas une diminution supplémentaire de la teneur en ergostérol par rapport aux souches n'exprimant qu'un seul des deux ADNc. Les deux souches contiennent environ $5 \mu\text{g (mg Poids Sec)}^{-1}$ de Δ -5,7 stérols (résultats non montrés).

3.3 Analyse de la synthèse de géraniol par les souches coexprimant les ADNc *vFPPS* et *GES*

L'analyse des terpénols excrétés par les souches MO63 *GES* et MO64 *GES* qui co-expriment l'ADNc *GES* avec les ADNc *vFPPSI-1* et *vFPPSI-2* respectivement montre que les deux souches produisent du géraniol en quantité différente (Tableau 15). En effet on observe que la souche MO63 *GES* complémentée par *vFPPS-F* synthétise seulement $150 \mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$ de géraniol alors que la souche MO64 *GES* complémentée par *vFPPS-C* en synthétise $750 \mu\text{g l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$.

Par ailleurs, il faut remarquer que les souches MO52 *GES* et MO54 *GES*, qui co-expriment l'ADNc *GES* et les ADNc de *FPPS* de vigne marqués à la GFP, excrètent des quantités très importantes de monoterpénols, environ $2 \text{ mg l}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1}$ (Tableau 15). La concentration en géraniol dans le milieu de culture de la souche MO52 *GES* est 2,5 fois supérieure à celle de la souche CC25 possédant la *GES*. La souche MO54 *GES* complémentée par l'allèle *vFPPSI-2* synthétise une quantité plus faible de géraniol mais qui reste très supérieure à la moyenne observée pour les souches sauvages ou mutantes.

Ces résultats confirment que les deux protéines vFPPS-F et vFPPS-C ont des activités catalytiques différentes. Il semble que la protéine vFPPS-F possède une activité enzymatique spécifique de la production de FPP alors que la protéine vFPPS-C semble posséder des propriétés plus proches de l'enzyme de levure Erg20-2p qui est caractérisée par la particularité de libérer du GPP au cours de la catalyse. De plus, la forte excrétion de géraniol observée pour les souches exprimant les FPPS marquées à la GFP suggère fortement que les protéines de fusion ont leurs activités catalytiques altérées ce qui les conduit à libérer de grandes quantités de GPP.

4 Discussion

Il n'y a que quelques levures comme *Kluyveromyces lactis* (Drawert & Barton 1978), *Torulaspora delbrueckii* (Fagan et al. 1981) et *Ambrosiozyma monospora* (Klingenberg & Sprecher 1985) capables de produire des terpènes. La levure *Saccharomyces cerevisiae* sauvage ne produit généralement pas de monoterpènes. Seules des traces de géraniol, linalol, citronellol et α -terpinéol ont été détectées pour cinq souches œnologiques après fermentation d'un milieu synthétique (Carrau et al. 2005). Et pourtant nous avons vu que l'expression chez *Saccharomyces cerevisiae* d'un gène de terpène synthase de plante, l'ADNc codant la GES d'*Ocimum basilicum*, conduit à une excrétion importante de géraniol dans le milieu de culture accompagné de citronellol et de linalol. Ce résultat montre que la levure dispose de suffisamment de précurseurs pour permettre la synthèse de quantités importantes de monoterpénols. Ainsi, la formation des monoterpénols chez la levure est dépendante d'une activité terpène synthase dont elle est dépourvue et non d'une indisponibilité du GPP. La question qui se pose alors concerne l'origine de l'activité enzymatique impliquée dans la déphosphorylation du GPP dans le cas de mutants comme CC25 qui produisent de petites quantités de géraniol et de linalol. Une étude bibliographique a mis en évidence les gènes de levure *DPPI* et *LPPI* qui codent pour des diacylglycérol phosphate phosphatases qui possèdent également une activité isoprénoïdes diphosphate phosphatase *in vitro* (Faulkner et al. 1999). La surexpression du gène *DPPI*, par le même schéma technique, dans une souche sauvage et dans CC25 n'a pas conduit à l'excrétion de monoterpénols. Ces résultats montrent que la protéine Dpp1p n'est pas impliquée dans la formation des monoterpènes *in vivo* chez la levure. La protéine responsable de la déphosphorylation du GPP *in vivo* reste encore à découvrir.

Les résultats obtenus par l'expression de la GES, nous ont montré que la levure est un outil intéressant pour l'analyse fonctionnelle *in vivo* des enzymes du métabolisme des monoterpénoïdes. Les recherches portant sur l'analyse fonctionnelle de gènes de plantes impliqués dans la formation des composés aromatiques de type isoprénoïdes ont fait appel uniquement à l'expression hétérologue chez *Escherichia coli*. Chez cette bactérie, la production de terpénoïdes est limitée par la formation des précurseurs biosynthétiques, DMAPP et IPP. Or nous avons pu voir que la levure dispose de suffisamment de GPP pour la

formation de quantités importantes de monoterpénoïdes. Ces résultats suggèrent également que la levure serait un outil de choix pour la production de composés monoterpéniques par voie biotechnologique. Toutefois, le choix de la souche semble très important au moment d'exprimer des gènes de la voie de biosynthèse de terpènes. Nous avons vu que les souches FY1679-28C et 5247 ne réagissent pas de la même manière à la surexpression de l'ADNc *GES* et encore moins à la coexpression de *vGPPS* et de *GES*. De plus, des difficultés pour l'expression hétérologue de certains gènes peuvent apparaître. En effet, nous n'avons pas observé de synthèse de linalol par expression du gène de la linalol synthase de *Clarkia breweri*. Ce résultat peut être lié à la construction plasmidique que nous avons utilisée. Il aurait certainement été préférable d'éliminer la séquence codant le peptide signal pour exprimer une LIS native et pour éviter qu'elle ne s'agrège dans la levure. En effet, la présence du peptide d'adressage plastidial est souvent mise en cause dans la formation de corps d'inclusion chez *E.coli* et dans l'expression de protéines inactives (Ferrer et al. 1990, Williams et al. 1998). Nous avons également pu constater que la production de la protéine LIS se limite à quelques cellules et que cette accumulation semble transitoire car les colonies perdent rapidement leur fluorescence. De plus l'accumulation des transcrits *LIS* est extrêmement faible (données non montrées) ce qui nous oriente plutôt vers des problèmes de toxicité de la protéine ou de son produit que la levure essaierait de contourner en réprimant l'expression du gène. Ainsi il serait peut être plus judicieux de tester l'expression de ce gène sous le contrôle d'un promoteur de levure qui soit moins fort.

Habituellement les produits majeurs de la voie de synthèse des isoprénoïdes chez la levure sont les stérols et les dolichols. La levure en produit environ $10\mu\text{g (mg Poids Sec)}^{-1}$. Nous avons calculé que $500\mu\text{g l}^{-1}$ de géraniol détecté chez les souches sauvages exprimant la *GES* correspond à la synthèse de $30\mu\text{g (mg Poids Sec)}^{-1}$ d'isoprénoïdes supplémentaires. La formation d'une telle quantité de monoterpènes implique une forte induction de la voie des isoprénoïdes puisque les teneurs en stérols des souches restent à des niveaux importants voire normaux. Il a été montré que le GPP et le FPP inhibent l'activité de la mévalonate kinase *in vitro* par compétition avec l'ATP au niveau du site actif de l'enzyme (Dorsey & Porter 1968, Oulmouden & Karst 1990). La réalité physiologique de cette régulation n'a jamais pu être démontrée pour le moment. Nos résultats suggèrent que ce mécanisme de régulation est effectif *in vivo* et que la conversion du GPP en géraniol libère l'activité de la mévalonate kinase et par conséquent augmente le flux biosynthétique. Nous avons vu que certaines

souches ne supportent pas la co-expression des ADNc *vGPPS* et *GES*. Nous avons tout d'abord pensé que cette combinaison entraînait une synthèse très importante de géraniol au point d'en devenir toxique pour la levure. Cette hypothèse n'est pas plausible sachant que la croissance de la levure n'est pas affectée par des concentrations de 25 mg l⁻¹ en culture liquide (King & Richard Dickinson 2000) et qu'on a montré que les terpènes pénètrent la membrane cellulaire de la levure par diffusion passive (Bishop et al. 1998). Il est plus vraisemblable que ce soit une diminution trop importante de la capacité à synthétiser des stérols par ces souches qui les mettent en difficulté. En effet, nous avons vu que la présence de la protéine *vGPPS* et de la protéine *GES* individuellement pouvait entraîner une baisse des teneurs en stérols ; ainsi la combinaison des deux réduit peut-être trop sensiblement la synthèse des stérols en déviant fortement le flux de GPP et donc de FPP. D'ailleurs on observe bien que la co-expression des gènes *ERG20* ou *erg20-2* avec celui de la *GES* ne pose elle aucun problème. Il s'agit de protéines qui, même si elles synthétisent du GPP, produisent essentiellement du FPP, alors disponible pour une synthèse normale de stérols.

L'analyse des quantités de monoterpénols excrétés par les souches complémentées par les gènes *ERG20* ou *erg20-2* et exprimant l'ADNc *GES* a permis de montrer que la quantité de géraniol synthétisée est liée aux propriétés catalytiques de la protéine FPPS présente dans la souche. Plus celle-ci possède la capacité à produire du GPP en plus du FPP, plus la quantité de géraniol synthétisée sera importante. L'exploitation de cette caractéristique pour étudier les protéines de vigne *vGPPS*, *vFPPS-F* et *vFPPS-C* nous a permis de mettre en évidence des propriétés catalytiques différentes entre *vFPPS-F* et *vFPPS-C* et de confirmer que la protéine *vGPPS* possède une activité liée à la voie de synthèse des isoprénoïdes. Il faut remarquer que le contexte levure est un système hétérologue où certains éléments de régulation typiquement végétaux sont absents. Il ne permet probablement pas une expression optimale des activités enzymatiques des protéines *vGPPS*, *vFPPS-F* et *vFPPS-C*. Pour ces raisons, il convient de confirmer les activités des trois protéines *in planta*. Ainsi, il serait intéressant de surexprimer ces protéines chez la vigne en analysant en parallèle les effets de la co-expression de monoterpènes synthases comme la *GES* ou l' α -terpinéol synthase de vigne qui a été caractérisée récemment (Martin & Bohlmann 2004).

Conclusion et perspectives

L'étude des phénomènes impliqués dans la production des alcools monoterpéniques chez les cépages aromatiques de vigne nous a conduits à nous intéresser à leur voie de biosynthèse et plus particulièrement à certaines enzymes participant à ce métabolisme. Nos travaux se sont basés sur l'hypothèse que la formation des monoterpénols était liée à une forte synthèse de géranyl diphosphate (GPP) et/ou à sa métabolisation par des terpènes synthases spécifiques (TPS). Ainsi nous nous sommes focalisés sur deux axes principaux : l'isolement des gènes codant les protéines impliquées dans la synthèse du GPP et l'étude *in vivo* chez la levure de la métabolisation du GPP par des terpènes synthases.

Ainsi, nous avons dans un premier temps isolé, par amplification par RT-PCR, deux gènes de *Vitis vinifera*, *vGPPS* et *vFPPS*, qui appartiennent à la famille des prényltransférases de plantes. La protéine codée par l'ADNc *vGPPS* présente de fortes homologues de séquence avec la géranyl diphosphate synthase d'*Arabidopsis thaliana*. L'expression chez la levure du gène en fusion avec celui de la GFP, nous a montré une activité très faible de la protéine et ne nous a pas permis de déterminer son produit exact de réaction. Nous avons par contre pu montrer que son activité était liée à la voie de biosynthèse des isoprénoïdes.

L'ADNc *vFPPS* présente quant à lui de fortes similitudes avec les gènes codant les FPPS de plantes. L'isolement du gène à partir de trois cépages de vigne, nous a permis de mettre en évidence deux séquences alléliques codant deux protéines différentes nommées *vFPPS-F* et *vFPPS-C* car elles possèdent une substitution phénylalanine ↔ cystéine en position 72. L'analyse de leurs propriétés catalytiques par expression hétérologue chez la levure a montré qu'elles possèdent toutes deux une activité farnésyl diphosphate synthase suffisante pour permettre une synthèse normale de stérols. Par contre, nous avons pu voir *in vitro* qu'elles présentent des activités spécifiques différentes.

Dans un second temps, afin de poursuivre l'étude de l'influence des protéines *vGPPS* et *vFPPS* de la biosynthèse des monoterpénols et de déterminer le rôle des terpènes synthases, nous avons entrepris de reconstituer chez la levure les dernières étapes de la voie. Nous avons utilisé la levure *Saccharomyces cerevisiae* car il s'agit d'un organisme modèle pour l'étude

et l'ingénierie des voies métaboliques et qu'elle ne synthétise que de très faibles quantités de monoterpénols dans des conditions bien particulières. Nous avons pu observer que la surexpression du gène de la géraniol synthase de basilic (GES) amène les levures de type sauvage à produire d'importantes quantités de géraniol. Nous avons également pu constater que la quantité de géraniol synthétisée varie en fonction de l'activité farnésyl diphosphate synthase de la souche. En effet, la présence de la FPPS mutée de levure, Erg20-2p, qui se caractérise par la particularité de libérer du GPP au cours de la catalyse, entraîne une augmentation de la quantité de géraniol produit. Ces résultats montrent qu'une activité terpène synthase est nécessaire à la biosynthèse des monoterpénols chez la levure et que leur production est fonction du substrat disponible dans la cellule. Ainsi, nous avons analysé la capacité à produire du géraniol par des souches levure complémentées par les protéines vFPPS-F et vFPPS-C de vigne. Nous avons pu observer qu'en présence de la GES, les deux souches produisent des quantités de géraniol différentes avec un avantage à la souche qui possède la protéine vFPPS-C. Nous en avons déduit que les deux protéines présentent des propriétés catalytiques différentes et que vFPPS-C possède comme la protéine Erg20-2p de levure la caractéristique de produire du GPP.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail démontre le rôle fondamental des terpènes synthases dans la biosynthèse des monoterpènes. De plus, les données obtenues soulèvent un questionnement sur l'impact de l'activité farnésyl diphosphate synthase sur la voie de biosynthèse chez la vigne. Les résultats obtenus chez la levure montrent l'intérêt d'une approche fonctionnelle prenant en compte différentes étapes de la biosynthèse des terpènes. Il est maintenant nécessaire de conduire cette approche chez la vigne afin de mettre en évidence les spécificités métaboliques des cépages aromatiques.

Bibliographie

- Adam-Blondon AF, Bernole A, Faes G, Lamoureux D, Pateyron S, et al. 2005. Construction and characterization of BAC libraries from major grapevine cultivars. *Theor Appl Genet* 110: 1363-71
- Aharoni A, Giri AP, Verstappen FW, Berteaux CM, Sevenier R, et al. 2004. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell* 16: 3110-31
- Ait-Ali T, Swain SM, Reid JB, Sun T, Kamiya Y. 1997. The LS locus of pea encodes the gibberellin biosynthesis enzyme ent-kaurene synthase A. *Plant J* 11: 443-54
- Anderegg RJ, Betz R, Carr SA, Crabb JW, Duntze W. 1988. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* mating hormone α -factor. Identification of S-farnesyl cysteine as a structural component. *J Biol Chem* 263: 18236-40
- Anderson MS, Yarger JG, Burck CL, Poulter CD. 1989. Farnesyl diphosphate synthetase. Molecular cloning, sequence, and expression of an essential gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 264: 19176-84
- Arigoni D, Sagner S, Latzel C, Eisenreich W, Bacher A, Zenk MH. 1997. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10600-5
- Ashby MN, Edwards PA. 1990. Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *J Biol Chem* 265: 13157-64
- Assman. 1993. Signal transduction in guard cells. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9: 345-375
- Attucci S, Aitken SM, Gulick PJ, Ibrahim RK. 1995. Farnesyl pyrophosphate synthase from white lupin: molecular cloning, expression, and purification of the expressed protein. *Arch Biochem Biophys* 321: 493-500
- Aubourg S, Lecharny A, Bohlmann J. 2002. Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* 267: 730-45
- Bach TJ. 1995. Some New Aspects of Isoprenoid Biosynthesis in Plants - a Review. *Lipids* 30: 191-202
- Bahl JR, Garg SN, Singh SC, Bansal RP, Naqvi AA, Sushil K. 2000. Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in India plains. *Flavour and Fragrance Journal* 15(3): 199-200
- Banthorpe DV, Long DRS, Pink CR. 1983. Biosynthesis of geraniol and related monoterpenes in *Pelargonium graveolens*. *Phytochemistry* 22

- Barnard GF, Popjak G. 1981. Human liver prenyltransferase and its characterization. *Biochim Biophys Acta* 661: 87-99
- Bayonove C. 1993. Les composés terpéniques. In *Les acquisitions récentes en chromatographie du vin*, ed. D B., pp. 99-119. Paris: Lavoisier
- Bevan M, Mayer K, White O, Eisen JA, Preuss D, et al. 2001. Sequence and analysis of the Arabidopsis genome. *Curr Opin Plant Biol* 4: 105-10
- Bick JA, Lange BM. 2003. Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch Biochem Biophys* 415: 146-54
- Bishop JR, Nelson G, Lamb J. 1998. Microencapsulation in yeast cells. *J Microencapsul* 15: 761-73
- Blanchard L, Karst F. 1993. Characterization of a lysine-to-glutamic acid mutation in a conservative sequence of farnesyl diphosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 125: 185-9
- Bloch K, Rittenberg D. 1942.
- Bohlmann J, Croteau R. 1999. Diversity and variability of terpenoid defences in conifers: molecular genetics, biochemistry and evolution of the terpene synthase gene family in grand fir (*Abies grandis*). *Novartis Found Symp* 223: 132-45; discussion 146-9
- Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R. 1998. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95: 4126-4133
- Bohlmann J, Phillips M, Ramachandiran V, Katoh S, Croteau R. 1999. cDNA cloning, characterization, and functional expression of four new monoterpene synthase members of the Tpsd gene family from grand fir (*Abies grandis*). *Arch Biochem Biophys* 368: 232-43
- Bouvier F, Suire C, d'Harlingue A, Backhaus RA, Camara B. 2000. Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *Plant J* 24: 241-52
- Breivik ON, Owades JL. 1957. Spectrophotometric semimicro determination of ergosterol in yeast. *Agr. Food Chem.* 5: 360-363
- Burke C, Croteau R. 2002a. Geranyl diphosphate synthase from *Abies grandis*: cDNA isolation, functional expression, and characterization. *Arch Biochem Biophys* 405: 130-6
- Burke C, Croteau R. 2002b. Interaction with the small subunit of geranyl diphosphate synthase modifies the chain length specificity of geranylgeranyl diphosphate synthase to produce geranyl diphosphate. *J Biol Chem* 277: 3141-9

- Burke CC, Wildung MR, Croteau R. 1999. Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13062-7
- Carrau FM, Medina K, Boido E, Farina L, Gaggero C, et al. 2005. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 243: 107-15
- Carson CF, Riley TV. 1995. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Bacteriol* 78: 264-9
- Catalogue des variétés et clones de vigne cultivés en France*. 1995.
- Chambon C, Ladeveze V, Oulmouden A, Servouse M, Karst F. 1990. Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthetase. *Curr Genet* 18: 41-6
- Chappell J. 1995. The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism. *Plant Physiol* 107: 1-6
- Christin P-A, Junod O. 2004. *La chimie du vin*. Futura Sciences. <http://www.futura-sciences.com/comprendre/d/dossier381-1.php>Access. (Page consultée en Septembre 2005)
- CIVA. 2005a. *Le marché français des vins d'Alsace*. Conseil Interprofessionnel des Vins d'Alsace. <http://www.vinsalsace.com/fr/Access>. (Page consultée en octobre 2005)
- CIVA. 2005b. *Le vignoble d'Alsace en quelques chiffres clés*. Conseil Interprofessionnel des Vins d'Alsace. <http://www.vinsalsace.com/fr/Access>. (Page consultée en octobre 2005)
- Clarke CF, Tanaka RD, Svenson K, Wamsley M, Fogelman AM, Edwards PA. 1987. Molecular cloning and sequence of a cholesterol-repressible enzyme related to prenyltransferase in the isoprene biosynthetic pathway. *Mol Cell Biol* 7: 3138-46
- Clastre M, Bantignies B, Feron G, Soler E, Ambid C. 1993. Purification and Characterization of Geranyl Diphosphate Synthase from *Vitis vinifera* L. cv Muscat de Frontignan Cell Cultures. *Plant Physiol* 102: 205-211
- Colby SM, Crock J, Dowdle-Rizzo B, Lemaux PG, Croteau R. 1998. Germacrene C synthase from *Lycopersicon esculentum* cv. VFNT cherry tomato: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the multiple product sesquiterpene cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2216-21
- Conolly JD, A HR. 1992. *Dictionnaire of terpenoids*. New York: Chapman, and Hall
- Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16: 10881-90

- Croteau R. 1986. Evidence for the ionization steps in monoterpene cyclization reactions using 2-fluorogeranyl and 2-fluorolinalyl pyrophosphates as substrates. *Arch Biochem Biophys* 251: 777-82
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, ed. B Buchanan, W Gruissem, R Jones: American Society of Plant Physiologists
- Croteau R, Munck SL, Akoh CC, Fisk HJ, Satterwhite DM. 1987. Biosynthesis of the sesquiterpene patchoulol from farnesyl pyrophosphate in leaf extracts of *Pogostemon cablin* (patchouli): mechanistic considerations. *Arch Biochem Biophys* 256: 56-68
- Croteau R, Purkett PT. 1989. Geranyl pyrophosphate synthase: characterization of the enzyme and evidence that this chain-length specific prenyltransferase is associated with monoterpene biosynthesis in sage (*Salvia officinalis*). *Arch Biochem Biophys* 271: 524-35
- Croteau R, Satterwhite DM, Cane DE, Chang CC. 1986. Biosynthesis of monoterpenes. Enantioselectivity in the enzymatic cyclization of (+)- and (-)-linalyl pyrophosphate to (+)- and (-)-bornyl pyrophosphate. *J Biol Chem* 261: 13438-45
- Crowell AL, Williams DC, Davis EM, Wildung MR, Croteau R. 2002. Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase. *Arch Biochem Biophys* 405: 112-21
- Cseke L, Dudareva N, Pichersky E. 1998. Structure and evolution of linalool synthase. *Mol Biol Evol* 15: 1491-8
- Cunillera N, Boronat A, Ferrer A. 1997. The *Arabidopsis thaliana* FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. *J Biol Chem* 272: 15381-8
- Delourme D, Lacroute F, Karst F. 1994. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for farnesyl diphosphate synthase by functional complementation in yeast. *Plant Mol Biol* 26: 1867-73
- Disch A, Hemmerlin A, Bach TJ, Rohmer M. 1998. Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochemical Journal* 331: 615-621
- Dorsey JK, Porter JW. 1968. The inhibition of mevalonic kinase by geranyl and farnesyl pyrophosphates. *J Biol Chem* 243: 4667-70
- Drawert F, Barton H. 1978. Biosynthesis of flavor compounds by micro-organisms.3. Production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J G J Agric Food Chem*: 765-767
- Dudareva N, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, et al. 2005. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 933-8

- Dudareva N, Cseke L, Blanc VM, Pichersky E. 1996. Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell* 8: 1137-48
- Dudareva N, Martin D, Kish CM, Kolosova N, Gorenstein N, et al. 2003. (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *Plant Cell* 15: 1227-41
- Dudareva N, Pichersky E. 2000. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiol* 122: 627-33
- EbangOke JP. 2003. *La S-Linalyl synthase chez Vitis vinifera L. cv Muscat de Frontignan. Approche biochimique et moléculaire*. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse
- Eberhardt NL, Rilling HC. 1975. Prenyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification to homogeneity and molecular properties. *J Biol Chem* 250: 863-6
- Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A. 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* 6: 78-84
- Fagan GL, Kepner RE, Webb AD. 1981. Production of linalool, *cis*-nerolidol and *trans*-nerolidol, and *trans, trans*-farnesol by *Saccharomyces fermentati* growing as a film on simulated wine. *Vitis* 20
- Faulkner A, Chen X, Rush J, Horazdovsky B, Waechter CJ, et al. 1999. The LPP1 and DPP1 gene products account for most of the isoprenoid phosphate phosphatase activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 14831-7
- Ferrer A, Aparicio C, Nogues N, Wettstein A, Bach TJ, Boronat A. 1990. Expression of catalytically active radish 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 266: 67-71
- Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thevenot P, Lemoine R, et al. 1999. Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiol* 120: 1083-94
- Flanzy C. 1998. *Oenologie. Fondements scientifiques et ethnologiques*. Paris: Lavoisier
- Foa R, Norton L, Seidman AD. 1994. Taxol (paclitaxel): a novel anti-microtubule agent with remarkable anti-neoplastic activity. *Int J Clin Lab Res* 24: 6-14
- Galet P. 1990. *Cépages et vignobles de France. L'ampélographie française*.
- Gianinazzi S, Marco Y, Milat ML, Molot PM, Ricci P, et al. 1991. Les Relations Plantes-Microorganismes. In *Les dossiers de l'INRA*. Paris: INRA

- Graebe JE. 1987. Gibberellin biosynthesis and control. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 419-465
- Gramatica P, Manitto P, Ranzi B, Delbianco A, Francavilla M. 1982. Stereospecific reduction of geraniol to (R)-(+)-citronellol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimentia* 38: 775-776
- Grunler J, Ericsson J, Dallner G. 1994. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1212: 259-77
- Gunata Z, Bayonove C, Baumes R, Cordonnier R. 1985a. The aroma of grape. Localization and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components cv Muscat during first development and maturation. *J. Sci. Food Agric.* 36(9): 857-862
- Gunata Z, Bayonove C, Cordonnier R. 1985b. The aroma of grape. Extraction and determination of free and glycosidically bound fraction of some grape aroma components. *J. Chromatogr.* 331(1): 83-90
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol* 95: 853-60
- Hampel D, Mosandl A, Wust M. 2005. Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. *Phytochemistry* 66: 305-11
- Harborne JB. 2001. Twenty-five years of chemical ecology. *Nat Prod Rep* 18: 361-79
- Hefner J, Ketchum RE, Croteau R. 1998. Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for taxol production. *Arch Biochem Biophys* 360: 62-74
- Heide L, Berger U. 1989. Partial purification and properties of geranyl pyrophosphate synthase from *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Arch Biochem Biophys* 273: 331-8
- Hemmerlin A, Rivera SB, Erickson HK, Poulter CD. 2003. Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the Big Sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. *J Biol Chem* 278: 32132-40
- Hirai N, Yoshida R, Todoroki Y, Ohigashi H. 2000. Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1448-58
- Huglin P, Schneider C. 1998. *Biologie et écologie de la vigne*. Paris: Lavoisier
- Hyatt DC, Croteau R. 2005. Mutational analysis of a monoterpene synthase reaction: altered catalysis through directed mutagenesis of (-)-pinene synthase from *Abies grandis*. *Arch Biochem Biophys* 439: 222-33

- Iijima Y, Davidovich-Rikanati R, Fridman E, Gang DR, Bar E, et al. 2004a. The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. *Plant Physiol* 136: 3724-36
- Iijima Y, Gang DR, Fridman E, Lewinsohn E, Pichersky E. 2004b. Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiol* 134: 370-9
- INRA. 2004. *Dossier. La qualité de nos aliments*.
<http://www.inra.fr/actualites/DOSSIERS/qualite-aliments/#Access>. (Page consultée en Octobre 2005)
- Jia JW, Crock J, Lu S, Croteau R, Chen XY. 1999. (3R)-Linalool synthase from *Artemisia annua* L.: cDNA isolation, characterization, and wound induction. *Arch Biochem Biophys* 372: 143-9
- Johnson H. 2002. *Une histoire mondiale du vin, De l'Antiquité à nos jours*. Paris: Hachette pratique
- Joly A, Edwards PA. 1993. Effect of site-directed mutagenesis of conserved aspartate and arginine residues upon farnesyl diphosphate synthase activity. *J Biol Chem* 268: 26983-9
- Kainou T, Kawamura K, Tanaka K, Matsuda H, Kawamukai M. 1999. Identification of the GGPS1 genes encoding geranylgeranyl diphosphate synthases from mouse and human. *Biochim Biophys Acta* 1437: 333-40
- Karp F, Harris JL, Croteau R. 1987. Metabolism of monoterpenes: demonstration of the hydroxylation of (+)-sabinene to (+)-cis-sabinol by an enzyme preparation from sage (*Salvia officinalis*) leaves. *Arch Biochem Biophys* 256: 179-93
- Kaufman PB, Cseke LJ, Warber S, Duke JA, H L. 1999. *Natural products from plants*: CRC Press LLC
- King A, Richard Dickinson J. 2000. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16: 499-506
- Klingenberg A, Sprecher E. 1985. Production of monoterpenes in liquid cultures by the yeast *Ambrosiozyma monospora*. *Planta Medica* 3: 264-265
- Koepp AE, Hezari M, Zajicek J, Vogel BS, LaFever RE, et al. 1995. Cyclization of geranylgeranyl diphosphate to taxa-4(5),11(12)-diene is the committed step of taxol biosynthesis in Pacific yew. *J Biol Chem* 270: 8686-90

- Koyama T, Obata S, Osabe M, Takeshita A, Yokoyama K, et al. 1993. Thermostable farnesyl diphosphate synthase of *Bacillus stearothermophilus*: molecular cloning, sequence determination, overproduction, and purification. *J Biochem (Tokyo)* 113: 355-63
- Koyama T, Tajima M, Nishino T, Ogura K. 1995. Significance of Phe-220 and Gln-221 in the catalytic mechanism of farnesyl diphosphate synthase of *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 681-6
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5
- Kuntz M, Romer S, Suire C, Hugueney P, Weil JH, et al. 1992. Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. *Plant J* 2: 25-34
- Kuzuyama T, Seto H. 2003. Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat Prod Rep* 20: 171-83
- LaFever RE, Vogel BS, Croteau R. 1994. Diterpenoid resin acid biosynthesis in conifers: enzymatic cyclization of geranylgeranyl pyrophosphate to abietadiene, the precursor of abietic acid. *Arch Biochem Biophys* 313: 139-49
- Lange BM, Croteau R. 1999. Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch Biochem Biophys* 365: 170-4
- Lange BM, Rujan T, Martin W, Croteau R. 2000. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13172-7
- Laule O, Furholz A, Chang HS, Zhu T, Wang X, et al. 2003. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6866-71
- Lichtenhaler HK, Schwender J, Dish A, Rohmer M. 1997. Biosynthesis of isoprenoid in higher plant chloroplasts proceed via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* 400: 271-274
- Lichtenhaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M. 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* 400: 271-4
- Luan F, Mosandl A, Munch A, Wust M. 2005. Metabolism of geraniol in grape berry mesocarp of *Vitis vinifera* L. cv. Scheurebe: demonstration of stereoselective reduction, E/Z-isomerization, oxidation and glycosylation. *Phytochemistry* 66: 295-303

- Luan F, Wust M. 2002. Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp. *Phytochemistry* 60: 451-9
- Lucker J, Bowen P, Bohlmann J. 2004. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochemistry* 65: 2649-59
- Lucker J, El Tamer MK, Schwab W, Verstappen FW, van der Plas LH, et al. 2002. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*). cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *Eur J Biochem* 269: 3160-71
- Luthra R, Dubey VS, Kumar S. 1999a. Is 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase the key regulatory enzyme in isoprenoid biosynthesis in higher plants? *J. Med. Arom. Plant Sci.* 21: 647-649
- Luthra R, Luthra PM, Kumar S. 1999b. Redefined role of mevalonate-isoprenoid pathway in terpenoid biosynthesis in higher plants. *Current Science* 76: 133-135
- Marrero PF, Poulter CD, Edwards PA. 1992. Effects of site-directed mutagenesis of the highly conserved aspartate residues in domain II of farnesyl diphosphate synthase activity. *J Biol Chem* 267: 21873-8
- Martin DM, Bohlmann J. 2004. Identification of *Vitis vinifera* (-)-alpha-terpineol synthase by in silico screening of full-length cDNA ESTs and functional characterization of recombinant terpene synthase. *Phytochemistry* 65: 1223-9
- Mateo JJ, Jimenez M. 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. *J Chromatogr A* 881: 557-67
- Matsushita Y, Kang W, Charlwood BV. 1996. Cloning and analysis of a cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from *Artemisia annua*. *Gene* 172: 207-9
- McGarvey DJ, Croteau R. 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1015-26
- Mercke P, Crock J, Croteau R, Brodelius PE. 1999. Cloning, expression, and characterization of epi-cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys* 369: 213-22
- Narita K, Ohnuma S, Nishino T. 1999. Protein design of geranyl diphosphate synthase. Structural features that define the product specificities of prenyltransferases. *J Biochem (Tokyo)* 126: 566-71
- Ogura K, Koyama T. 1998. Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chem Rev* 98: 1263-1276

- Okada K, Saito T, Nakagawa T, Kawamukai M, Kamiya Y. 2000. Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis. *Plant Physiol* 122: 1045-56
- Onivins. *Mieux connaître le vin*. Site de l'Office National Interprofessionnel des vins. <http://www.onivins.fr/Vin/Index.asp>Access. (Page consultée en septembre 2005)
- Oulmouden A, Karst F. 1990. Isolation of the ERG12 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding mevalonate kinase. *Gene* 88: 253-7
- Pichersky E, Lewinsohn E, Croteau R. 1995. Purification and characterization of S-linalool synthase, an enzyme involved in the production of floral scent in *Clarkia breweri*. *Arch Biochem Biophys* 316: 803-7
- Pichersky E, Raguso RA, Lewinsohn E, Croteau R. 1994. Floral Scent Production in *Clarkia* (Onagraceae) (I. Localization and Developmental Modulation of Monoterpene Emission and Linalool Synthase Activity). *Plant Physiol* 106: 1533-1540
- Poulter CD, Rilling HC. 1976. Prenyltransferase: The mechanism of the reaction. *Biochemistry* 15: 1079-1083
- Poulter CD, Rilling HC. 1981. Prenyltransferases and isomerases. Biosynthesis of isoprenoids compounds. New York: J.W. Porter and S.L. Spurgeon
- Rajaonarivony JI, Gershenzon J, Croteau R. 1992. Characterization and mechanism of (4S)-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*). *Arch Biochem Biophys* 296: 49-57
- Ramos-Valdivia AC, van der Heijden R, Verpoorte R. 1997. Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function. *Nat Prod Rep* 14: 591-603
- Reed BC, Rilling HC. 1975. Crystallization and partial characterization of prenyltransferase from avian liver. *Biochemistry* 14: 50-4
- Reynier A. 1991. *Manuel de viticulture*. Paris: Lavoisier
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. 1998a. *Traité d'oenologie. 1. Microbiologie du vin, Vinifications*. Paris: Dunod
- Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. 1998b. *Traité D'oenologie. 2. Chimie du vin. Stabilisation et traitement*. Paris: Dunod
- Rodwell VW, Beach MJ, Bischoff KM, Bochar DA, Darnay BG, et al. 2000. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Methods Enzymol* 324: 259-80
- Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S, Sahm H. 1996. Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursor of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 2564-2566

- Runquist M, Ericsson J, Thelin A, Chojnacki T, Dallner G. 1994. Isoprenoid biosynthesis in rat liver mitochondria. Studies on farnesyl pyrophosphate synthase and trans-prenyltransferase. *J Biol Chem* 269: 5804-9
- Ruzicka L. 1959. *Proc. Chem. Soc.*: 341-360
- Ruzicka L, Eschenmoser A, H H. 1953. *Experientia* 9: 357-396
- Sagot I, Bonneau M, Balguerie A, Aigle M. 1999. Imaging fluorescence resonance energy transfer between two green fluorescent proteins in living yeast. *FEBS Lett* 447: 53-7
- Sandmann G, Misawa N, Wiedemann M, Vittorioso P, Carattoli A, et al. 1993. Functional identification of al-3 from *Neurospora crassa* as the gene for geranylgeranyl pyrophosphate synthase by complementation with crt genes, in vitro characterization of the gene product and mutant analysis. *J Photochem Photobiol B* 18: 245-51
- Sanmiya K, Ueno O, Matsuoka M, Yamamoto N. 1999. Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 40: 348-54
- Sauer N, Stolz J. 1994. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J* 6: 67-77
- Schwab W. 2003. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry* 62: 837-49
- Schwarz M, Arigoni D. 1999. In *Comprehensive Natural Product Biochemistry*, ed. DE Cane, pp. 367-399. Oxford: Pergamon
- Schwender J, Seemann M, Lichtenhaler HK, Rohmer M. 1996. Biosynthesis of isoprenoid (carotenoids, sterols, prenyl side chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.* 316: 73-80
- Singh N, Luthra R, Sangwan RS, Thakur RS. 1989. Metabolism of monoterpenoids in aromatics plants. *Curr. Res. Med. Arom.Plants* 11: 174-197
- Sitthithaworn W, Kojima N, Viroonchatapan E, Suh DY, Iwanami N, et al. 2001. Geranylgeranyl diphosphate synthase from *Scoparia dulcis* and *Croton sublyratus*. Plastid localization and conversion to a farnesyl diphosphate synthase by mutagenesis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 49: 197-202
- Skaltsa HD, Lazari DM, Mavromati AS, Tiligada EA, Constantinidis TA. 2000. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria albida* ssp. *albida* from Greece. *Planta Med* 66: 672-4

- Soler E, Clastre M, Bantignies B, Maigo G, Ambid C. 1993. Uptake of isopentenyl diphosphate by plastids isolated from *Vitis vinifera* L. cell suspension. *Planta* 191: 324-329
- Soler E, Feron G, Clastre M, Dargent R, Gleizes M, Ambid C. 1992. Evidence of a geranyl diphosphate synthase located within the plastids of *Vitis vinifera* L. cultivated in vitro. *Planta* 187: 171-175
- Sommer S, Severin K, Camara B, Heide L. 1995. Intracellular-Localization of Geranylpyrophosphate Synthase from Cell-Cultures of *Lithospermum-Erythrorhizon*. *Phytochemistry* 38: 623-627
- Song L, Poulter CD. 1994. Yeast farnesyl-diphosphate synthase: site-directed mutagenesis of residues in highly conserved prenyltransferase domains I and II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3044-8
- Soustre I, Letourneux Y, Karst F. 1996. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* RTA1 gene involved in 7-aminocholesterol resistance. *Curr Genet* 30: 121-5
- Spurgeon SL, Porter JW. 1981. Introduction. In *Biosynthesis of isoprenoid compounds. Voll*, ed. PSL Porter J.W., pp. 1-46. New York: J.Wiley and sons
- Stanley Fernandez SM, Kellogg BA, Poulter CD. 2000. Farnesyl diphosphate synthase. Altering the catalytic site to select for geranyl diphosphate activity. *Biochemistry* 39: 15316-21
- Suga T, Endo T. 1991. Geranyl diphosphate synthase in leaves of *Pelargonium roseum*. *Phytochemistry* 30: 1757-1761
- Sun TP, Kamiya Y. 1994. The *Arabidopsis* GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* 6: 1509-18
- Szkopinska A, Plochocka D. 2005. Farnesyl diphosphate synthase; regulation of product specificity. *Acta Biochim Pol* 52: 45-55
- Tachibana A, Tanaka T, Taniguchi M, Oi S. 1993. Potassium-stimulating mechanism of geranylgeranyl diphosphate synthase of *Methanobacterium thermoformicum* SF-4. *J Biochem (Tokyo)* 114: 389-92
- Takaya A, Zhang YW, Asawatreratanakul K, Wititsuwannakul D, Wititsuwannakul R, et al. 2003. Cloning, expression and characterization of a functional cDNA clone encoding geranylgeranyl diphosphate synthase of *Hevea brasiliensis*. *Biochim Biophys Acta* 1625: 214-20
- Tarshis LC, Proteau PJ, Kellogg BA, Sacchettini JC, Poulter CD. 1996. Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15018-23

- Terrier N, Ageorges A, Abbal P, Romieu C. 2001. Generation of ESTs from grape berry at various developmental stages. *Journal of Plant Physiology* 158: 1575-1583
- Thierry A, Gaillon L, Galibert F, Dujon B. 1995. Construction of a complete genomic library of *Saccharomyces cerevisiae* and physical mapping of chromosome XI at 3.7 kb resolution. *Yeast* 11: 121-35
- Tholl D, Croteau R, Gershenzon J. 2001. Partial purification and characterization of the short-chain prenyltransferases, geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase, from *Abies grandis* (grand fir). *Arch Biochem Biophys* 386: 233-42
- Tholl D, Kish CM, Orlova I, Sherman D, Gershenzon J, et al. 2004. Formation of monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* flowers involves heterodimeric geranyl diphosphate synthases. *Plant Cell* 16: 977-92
- TIGR. 2005. Rockville, Maryland
- Trapp SC, Croteau RB. 2001. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* 158: 811-32
- Wallach O. 1887. *Liebigs Ann. Chem.* 239: 1-54
- Wang K, Ohnuma S. 1999. Chain-length determination mechanism of isoprenyl diphosphate synthases and implications for molecular evolution. *Trends Biochem Sci* 24: 445-51
- West CA. 1981. In *Biosynthesis of isoprenoid compounds*, ed. PSL Porter J.W., pp. 376-411. New York: Wiley
- Wilkin DJ, Kutsunai SY, Edwards PA. 1990. Isolation and sequence of the human farnesyl pyrophosphate synthetase cDNA. Coordinate regulation of the mRNAs for farnesyl pyrophosphate synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase by phorbol ester. *J Biol Chem* 265: 4607-14
- Williams DC, McGarvey DJ, Katahira EJ, Croteau R. 1998. Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry* 37: 12213-20
- Wilson B, Strauss CR, Williams PJ. 1984. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.* 32: 919-924
- Wink M. 1999. *Function of plant secondary metabolites and their application in biotechnology*. Sheffield: Academic Press, Sheffield
- Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19

-
- Wise ML, Savage TJ, Katahira E, Croteau R. 1998. Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. *J Biol Chem* 273: 14891-9
- Yang T, Li J, Wang HX, Zeng Y. 2005. A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum*. *Phytochemistry* 66: 285-93

Résumé

Chez *Vitis vinifera* le potentiel aromatique du raisin est en partie constitué par des monoterpénols comme le linalol et le géraniol qui contribuent au caractère variétal des cépages aromatiques comme le muscat et le gewurztraminer. Le rôle de ces composés dans la qualité et la typicité du vin a stimulé la conduite d'importantes recherches sur leur distribution au niveau des organes de la plante et l'évolution de leur quantité pendant la maturation des baies et la vinification. L'objectif de notre travail était de mettre en évidence les bases moléculaires de la spécificité des cépages aromatiques de vigne. Nous nous sommes basés sur l'hypothèse que la formation des monoterpénols était liée à une forte synthèse de géranyl diphosphate (GPP) et/ou à la métabolisation du GPP par des terpènes synthèses (TPS). Ainsi, nous avons cloné les ADNc *vGPPS* et *vFPPS* codant une géranyl diphosphate synthase (*vGPPS*) potentielle et une farnésyl diphosphate synthase (*vFPPS*) de *Vitis vinifera* homologues à 90% et 88% aux séquences protéiques de la *GPPS* et de la *FPPS1* d'*Arabidopsis thaliana* respectivement. L'expression hétérologue des ces ADNc chez *Saccharomyces cerevisiae* nous a permis de montrer l'activité farnésyl diphosphate synthase de la protéine *vFPPS*. Par contre, l'activité enzymatique de *vGPPS* est extrêmement faible. Nous n'avons pas pu confirmer son produit final de réaction. Afin de poursuivre l'étude de l'influence des protéines *vGPPS* et *vFPPS* sur la biosynthèse des monoterpénols, nous avons entrepris de reconstituer chez la levure les dernières étapes de la voie de synthèse. Ainsi, nous avons exprimé conjointement chez la levure les ADNc *vGPPS* et *vFPPS* de vigne avec les gènes codant la géraniol synthase récemment isolée chez le basilic (*Ocimum basilicum*) et la linalol synthase de *Clarkia breweri* toutes deux caractérisées sur le plan biochimique. Nous avons pu observer chez la levure que la formation des monoterpénols est dépendante d'une activité terpène synthase et que le substrat GPP est un facteur limitant.

Les résultats obtenus chez la levure montrent l'intérêt d'une approche fonctionnelle prenant en compte différentes étapes de la biosynthèse des terpènes. Il est maintenant nécessaire de conduire cette approche chez la vigne afin de mettre en évidence les spécificités métaboliques des cépages aromatiques.

Abstract

The floral character of aromatic varieties of *Vitis vinifera* is partly linked to the presence in the berry skin of monoterpene alcohols such as geraniol and linalool found in large amounts. Non aromatic grapevine varieties, in contrast, exhibit much lower terpenoid concentrations. Combining genetic, biochemical and molecular approaches, we tried to decipher the metabolic pathway which leads to monoterpene alcohols synthesis in aromatic grapevine varieties. It is commonly admitted that monoterpene alcohols arise from geranyl diphosphate (GPP). So we hypothesized that the high yield of monoterpene alcohols synthesized in aromatic plants requires either an excess of GPP synthesis and/or a specific metabolization of GPP by terpene synthases (TPS). We isolated *vGPPS* and *vFPPS* cDNAs encoding putative geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase from *Vitis vinifera* gewurztraminer, muscat and savagnin rose varieties. Both *vGPPS* and *vFPPS* from grapevine share 90% and 88% homology with the corresponding enzymes from *Arabidopsis thaliana*. A functional analysis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using adapted mutants strains led us to demonstrate the farnesyl diphosphate activity of *vFPPS*. In contrast, this approach failed to reveal the end product of *vGPPS*. To determine the effect of *vGPPS* and *vFPPS* on the terpenoid biosynthesis pathway, we expressed in yeast these two cDNAs in combination with the *Ocimum basilicum* geraniol synthase and the *Clarkia breweri* linalool synthase. Under these experimental conditions, we showed that GPP amount is an important factor of the pathway together with terpene synthases which are the basic actors.

Altogether, our data suggest that the functional analysis approach in yeast was an adequate system to help us for deciphering the first basic steps of the grapevine terpenoid biosynthesis pathway. This approach must now be conducted in grape to clarify differences between aromatic and non aromatic grapevine genotypes.