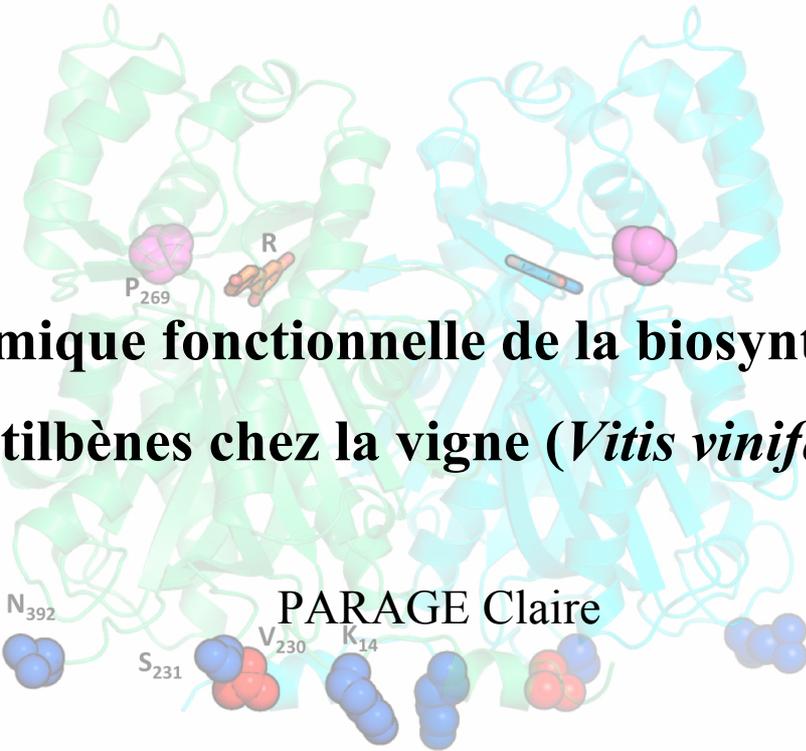


Thèse présentée pour l'obtention du titre de  
Docteur de l'université de Strasbourg  
Discipline : Sciences du vivant  
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie



**Génomique fonctionnelle de la biosynthèse des  
stilbènes chez la vigne (*Vitis vinifera*)**

PARAGE Claire  
N<sub>392</sub> S<sub>231</sub> V<sub>230</sub> K<sub>14</sub>

Thèse présentée et soutenue publiquement le 10 janvier 2013, devant les membres du Jury  
suivant :

Frédéric Bourgaud	Rapporteur
Patrick Saindrenan	Rapporteur
Danièle Werck-Reichhart	Examineur
Anne Poutaraud	Membre invité
Philippe Huguency	Directeur de thèse



*"Just love your brother and drink a good  
glass of red wine every day"  
Antonio Todde, once the world's oldest man*



# Résumé

---

Les stilbènes sont les métabolites de défense majeurs de la vigne, qui sont également connus pour leurs nombreuses propriétés pharmacologiques. Tirant parti du récent séquençage du génome de la vigne, l'objectif de ce travail est de caractériser les familles de gènes impliqués dans la biosynthèse des stilbènes chez la vigne, et de préciser leur rôle dans les défenses contre le mildiou (*Plasmopara viticola*).

La première étape de la biosynthèse des stilbènes est catalysée par la stilbène synthase (STS), pour former le resvératrol. L'analyse détaillée du génome de la vigne a permis d'identifier 48 gènes *STS*, dont 32 gènes potentiellement fonctionnels. La caractérisation fonctionnelle d'une sélection de gènes représentatifs de la diversité de la famille suggère que l'ensemble des 32 gènes *STS* code pour des protéines ayant réellement une activité stilbène synthase. L'analyse évolutive des gènes *STS* montre que la famille est très contrainte, sans trace de néo-fonctionnalisation. La famille des *STS* de la vigne représente donc un exemple unique d'une famille de plus de 30 gènes codant pour des protéines de fonction identique, et la signification biologique de cette expansion est discutée.

Une seconde enzyme importante du métabolisme des stilbènes est la resvératrol *O*-méthyltransférase (ROMT). La ROMT est impliquée dans la méthylation du resvératrol pour former le ptérostilbène, un composé hautement fongitoxique qui pourrait jouer un rôle important dans les mécanismes de défenses de la vigne. Notre analyse de la famille *ROMT* montre qu'elle est constituée de 17 gènes, dont deux seulement (*VvROMT1* et *VvROMT2*) semblent impliqués dans la synthèse de ptérostilbène. L'expression de ces deux gènes est induite suite à une infection par *P. viticola* au niveau des feuilles de vigne. Deux autres gènes de la famille, *VvROMT12* et *VvROMT13*, sont exprimés constitutivement au niveau des racines, et ne semblent pas répondre au stress. Des analyses métabolomiques sur des plants de *Nicotiana benthamiana* transgéniques exprimant ces deux *ROMT* ainsi que des tests enzymatiques *in vitro* ont été réalisés afin de déterminer la fonction des gènes *ROMT12* et *13*.

L'ensemble de ces résultats fait apparaître une amplification remarquable des gènes impliqués dans la synthèse des stilbènes chez la vigne et ouvrent la voie à l'étude détaillée de la régulation de cette voie importante du métabolisme de défense de la vigne.

Mots clés : stilbène synthase, resvératrol *O*-méthyltransférase, ptérostilbène, *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*.



# Abstract

---

Stilbenes are major defense metabolites in grapevine (*Vitis vinifera*), which are known for their many pharmacological properties. Taking advantage of the recent sequencing of the grapevine genome, the aim of this work is to characterize genes families involved in stilbene biosynthesis, in order to clarify the role of these defense compounds in the interaction with downy mildew (*Plasmopara viticola*).

The first step of stilbene biosynthesis is catalyzed by stilbene synthase (STS), to yield resveratrol. Our annotation of the *STS* gene family identified 48 *STS* genes, including at least 32 potentially functional ones. This unusual expansion of the STS family is original, since it is not found in other stilbene-producing plants. Functional characterization of a selection of STS proteins indicates that all *STS* genes are likely to encode enzymes with STS activity. Evolutionary analysis of the *STS* gene family revealed that *STS* evolution is dominated by purifying selection, with no evidence for neofunctionalization. STS family then represents a unique example a family of more than 30 genes encoding proteins with identical function, and the biological significance of this amplification is discussed.

A second important enzyme in stilbene metabolism is resveratrol O-methyltransferase (ROMT), involved in the methylation of resveratrol to yield pterostilbene. This highly fungitoxic compound is believed to play an important role in grapevine defense metabolism. Our analysis of the *ROMT* family identified 17 genes, two of them only (*VvROMT1* and *VvROMT2*) being involved in pterostilbene biosynthesis. qPCR analyses have shown an induction of the expression of these two genes after an inoculation of *P. viticola* on grapevine leaves. Two others genes, *VvROMT12* and *VvROMT13*, are constitutively expressed in grapevine roots, and do not seem to respond to stress. Metabolomic analysis on transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing these two ROMT genes, together with *in vitro* enzymatic assays, have been performed in order to determine the function of ROMT12 and ROMT 13.

All together, these results show a remarkable amplification of genes involved in stilbene biosynthesis in grapevine. This work paves the way for detailed analyses of the regulation of this important pathway of grapevine defense metabolism.

Keywords: stilbene synthase, resveratrol *O*-methyltransferase, pterostilbene, *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*.

## Remerciements

Bien plus qu'un projet d'étude, cette thèse a été pour moi une très belle aventure humaine et personnelle. Comme je l'ai toujours défendu, un projet de thèse ne se construit pas seul, aussi j'aimerais exprimer ma sincère reconnaissance à l'ensemble des personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation et au bon déroulement de cette thèse. Sans votre participation, ce projet n'aurait pas pu aboutir.

Je tiens tout d'abord à remercier Frédéric Bourgaud (ENSAIA, Nancy), Patrick Saindrenan (IBP, Orsay) et Danièle Werck-Reichhart (IBMP, Strasbourg), qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci à Bilal Camara (IBMP, Strasbourg), Julie Chong (UHA, Colmar) et une nouvelle fois Patrick Saindrenan, pour votre investissement lors de mes deux comités de thèse ; vos conseils m'ont été d'une aide précieuse.

Cette thèse n'aurait pas été réalisable sans le soutien de l'INRA et de la région Alsace qui ont financé ce projet, je voudrais donc les remercier pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse. Aussi, un grand merci à l'IUT Génie biologique de Colmar et à l'Université de Strasbourg, pour m'avoir donné l'occasion d'effectuer des vacances, j'ai pris énormément de plaisir à enseigner.

Mes remerciements les plus vifs et les plus sincères vont à mon directeur de thèse, Philippe Hugueney. Merci de m'avoir si bien encadrée, merci de t'être investi à fond dans ce projet et enfin merci pour ta sympathie et ton accessibilité de tous les jours. Bien plus qu'une chance, c'est une fierté d'avoir été l'une de tes thésardes. Merci à Anne Poutaraud de l'équipe GAV, qui a co-encadré cette thèse. Merci pour ta sympathie et les précieux conseils que tu m'as donné au cours de ces trois années.

Ce projet de thèse a été réalisé avec l'aide de plusieurs collaborateurs et collaboratrices que je voudrais remercier. Un grand merci à Raquel Tavares et Gabriel Marais (Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Université Lyon I), qui se sont beaucoup investis dans l'étude évolutive de la famille des STS et dans l'écriture de l'article. Merci à Dimitri Heintz de la plateforme de métabolomique de l'IBMP (Strasbourg), qui a pris en charge l'analyse de mes échantillons. Merci à Sébastien Aubourg de l'URGV d'Evry pour la caractérisation et l'annotation des familles des gènes *STS* et *ROMT*, et merci à Stéphane Réty du laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques de l'Université de Paris Descartes, pour m'avoir fourni les données structurales de ces enzymes. Enfin, je voudrais remercier chaleureusement Julie Chong de l'Université de Haute Alsace, pour m'avoir aidée pour les expériences de qPCR, l'analyse des plantes transgéniques, et les tests patho.

A présent, je voudrais remercier vivement l'ensemble du personnel de l'INRA de Colmar. Particulièrement, un très grand merci à toute l'équipe du métabolisme secondaire végétal : Anne Alais, Raymonde Baltenweck, Patricia Claudel, Marc Fischer, Andrea Ilg, Sophie Meyer, Lauriane Renault, Geneviève Riveill et Camille Rustenholz. Merci à Sophie

M. pour m'avoir aidé à mettre au point le protocole de transgénèse végétale, et à Anne A. pour la caractérisation des plantes. Un énorme merci à Lauriane pour ton aide précieuse dans les manips, ta bonne humeur quotidienne et ton soutien. Un grand merci à Raymonde, pour avoir passé beaucoup de temps à m'expliquer le fonctionnement (obscur) de la nouvelle chaîne UHPLC-MS, merci d'avoir toujours répondu présente lorsque j'avais besoin de toi pour mes analyses et mes nombreuses questions. Merci à Geneviève pour ta grande sympathie, et nos éternelles discussions sur notre passion commune. Dank an Andrea für ihre Freundlichkeit und Hilfe.

Je tiens à témoigner toute ma sympathie envers les thésardes, thésards et post-doc de l'INRA de Colmar que j'ai pu côtoyer pendant ces trois années : Sophie, Damien, Andréa, Lorène, Clémence, Marjorie, Lise, Antoine, Caroline, Dalya, Paule et Sylvaine. Votre présence m'a apporté beaucoup de soutien et de motivation dans mon travail, vous allez tous me manquer ! L'émulation créée par la réalisation de notre projet de bureau des doctorants commun m'a beaucoup aidée pour la rédaction de cette thèse, et ce projet n'aurait pas pu voir le jour sans le soutien et l'implication de Frédérique Pelsy. Je voudrais donc la remercier chaleureusement pour l'élaboration de ce projet, mais aussi pour avoir toujours été présente et accessible durant mes trois années de thèse. Je voudrais également remercier Sylvaine Bergeret, qui m'a aidée à mettre au point le protocole de purification des ROMT dans le cadre de son stage d'école d'ingénieur.

Un merci tout particulier à deux personnes qui me sont chères. Merci à Damien Steyer, « l'outsider » de notre équipe, fraîchement PDG ; merci pour m'avoir si chaleureusement accueillie à mon arrivée à l'INRA, merci pour tes conseils avisés et ton aide précieuse pour l'analyse de mes données. Un énorme merci pour mon amie thésarde et tenniswomen: Sophie Blanc, avec qui j'ai pu tisser des liens d'amitié forts durant ces trois années. Merci pour tes encouragements, ton soutien moral, ta présence tous les jours, tu as contribué à ta façon à la réalisation cette thèse. En cela, je t'en serai toujours reconnaissante.

Enfin, merci à tous mes amis et ma famille, avec une attention toute particulière pour mes parents et pour François. Merci de m'avoir soutenue, encouragée, et tout simplement pour avoir été présents à mes côtés au quotidien. Merci à mes parents pour m'avoir permis de réaliser ces longues études, incluant une année formidable à l'Université Laval de Québec. Pour finir sur une note plus joviale, merci à mon éponge émotionnelle féline, Lilou, et à mon fidèle destrier Quorum, qui malgré le stress grandissant généré par cette fin de thèse, a eu l'incommensurable délicatesse de ne pas me jeter à terre.

Je conclus ici en remerciant une nouvelle fois l'ensemble du personnel de l'INRA de Colmar, en vous souhaitant une très bonne continuation pour les années à venir.



# Table des matières

---

<b>INTRODUCTION : LES STILBENES</b> .....	<b>1</b>
<b>1 STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES STILBENES</b> .....	<b>2</b>
<b>2 DISTRIBUTION DES STILBENES AU SEIN DU REGNE VEGETAL</b> .....	<b>3</b>
<b>3 VOIE DE BIOSYNTHESE DES STILBENES</b> .....	<b>5</b>
3.1 LA VOIE DES PHENYLPROPANOÏDES.....	5
3.2 LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES STILBENES.....	7
3.2.1 Les stilbène synthases.....	7
3.2.2 La famille des polycétide synthases.....	11
3.2.3 Origine évolutive des stilbène synthases.....	12
3.2.4 Mécanisme de la formation des stilbènes.....	14
<b>4 DIVERSITE DES STILBENES</b> .....	<b>19</b>
4.1 GLYCOSYLATION.....	21
4.2 METHOXYLATION.....	22
4.3 OLIGOMERISATION.....	23
4.4 AUTRES MODIFICATIONS DES STILBENES.....	25
<b>5 REGULATION DE LA SYNTHÈSE DES STILBENES</b> .....	<b>26</b>
5.1 SYNTHÈSE CONSTITUTIVE.....	26
5.2 INDUCTION DE LA SYNTHÈSE DES STILBENES EN REPOSE A DIFFERENTS STRESS.....	27
<b>6 ROLE DES STILBENES DANS LES MECANISMES DE DEFENSE</b> .....	<b>28</b>
6.1 MISE EN EVIDENCE DE LA TOXICITE <i>IN PLANTA</i> .....	28
6.2 MECANISMES D'ACTION DES STILBENES ET TOXICITE <i>IN VITRO</i> .....	30
6.2.1 Toxicité des stilbènes in vitro sur les champignons phytopathogènes.....	30
6.2.2 Toxicité des stilbènes sur les végétaux.....	33
6.3 INGENIERIE DE LA BIOSYNTHESE DES STILBENES.....	33
6.3.1 Obtention de plantes transgéniques accumulant des stilbènes.....	33
6.3.2 Production de stilbènes par des cultures cellulaires végétales.....	36
6.3.3 Production de stilbènes chez les bactéries et les levures.....	39
6.3.3.1 Production chez <i>Escherichia coli</i> .....	39
6.3.3.2 Production chez la levure.....	42
6.3.1 D'où provient le resvératrol disponible dans le commerce ?.....	43
<b>7 PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DES STILBENES</b> .....	<b>45</b>
7.1 UTILISATION DES STILBENES DANS LES COSMETIQUES.....	45
7.2 IMPACT DES STILBENES SUR LA SANTE HUMAINE.....	45

7.3	EFFET DES STILBENES SUR L'ALLONGEMENT DE LA DUREE DE VIE.....	47
<b>OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>		<b>50</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>		<b>54</b>
<b>1</b>	<b>MATERIEL .....</b>	<b>56</b>
1.1	MATERIEL VEGETAL.....	56
1.1.1	Vitis vinifera.....	56
1.1.2	Arabidopsis thaliana.....	57
1.1.3	Nicotiana benthamiana .....	59
1.2	MATÉRIEL MICROBIOLOGIQUE .....	60
1.2.1	Escherichia coli.....	60
1.2.2	Agrobacterium sp .....	60
1.2.2.1	A. tumefaciens s. GV3101 :: pMP90 .....	60
1.2.2.2	A. rhizogenes s. ARqua1 .....	61
<b>2</b>	<b>METHODES.....</b>	<b>62</b>
2.1	BIOLOGIE MOLECULAIRE .....	62
2.1.1	Matériel biologique .....	62
2.1.1.1	Préparation des bactéries compétentes .....	62
2.1.1.2	Transformation des bactéries compétentes par choc thermique.....	62
2.1.2	Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne.....	63
2.1.3	Purification des fragments d'ADN obtenus par PCR.....	65
2.1.4	Système de clonage CloneJET .....	65
2.1.4.1	Purification des plasmides recombinants.....	67
2.1.4.2	Vérifications des plasmides recombinant par digestion enzymatique.....	67
2.1.4.3	Vérification des plasmides recombinants par séquençage.....	67
2.1.5	Système de clonage Gateway™ .....	68
2.1.5.1	Principe .....	68
2.1.5.2	Vecteurs d'expression Gateway™ .....	71
2.1.6	Liste des amorces.....	73
2.1.6.1	Amorces pour le clonage pJET .....	73
2.1.6.2	Amorces utilisées pour le clonage Gateway™ .....	74
2.1.6.3	Amorces pour les RT-PCR.....	75
2.1.6.4	Amorces pour la qRT-PCR.....	75
2.2	ANALYSE FONCTIONNELLE .....	76
2.2.1	Matériel microbiologique.....	76

2.2.1.1	Préparation des agrobactéries compétentes.....	76
2.2.1.2	Transformation des agrobactéries par électroporation .....	76
2.2.2	Transformation de <i>N. benthamiana</i> .....	77
2.2.2.1	Expression transitoire chez <i>N. benthamiana</i> .....	77
2.2.2.2	Transformation stable de <i>N. benthamiana</i> .....	79
2.2.2.3	Obtention de racines transgéniques ou « hairy roots ».....	80
2.2.3	Transformation stable de <i>A. thaliana</i> .....	81
2.2.3.1	Technique du « floral dip ».....	81
2.2.3.2	Stérilisation des graines et sélection in vitro .....	82
2.2.3.3	Suivi des transformants.....	83
2.3	ARN : qPCR ET RT-PCR.....	83
2.3.1	RT-PCR semi-quantitative.....	83
2.3.1.1	Extraction des ARN.....	83
2.3.1.2	RT-PCR.....	84
2.3.2	PCR quantitative.....	84
2.3.2.1	Préparation du matériel végétal .....	84
2.3.2.2	PCR quantitative en temps réel.....	85
2.4	PROTEINES : PURIFICATION DE PROTEINES ET TESTS ENZYMATIQUES .....	87
2.4.1	Matériel microbiologique et vecteurs utilisés .....	87
2.4.2	Purification des protéines .....	87
2.4.2.1	Production de protéines recombinantes.....	87
2.4.2.2	Vérification de l'expression par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) .....	88
2.4.2.3	Préparation des échantillons pour la SDS-PAGE.....	89
2.4.2.4	Système de purification.....	89
2.4.3	Tests enzymatiques .....	90
2.4.3.1	Tests enzymatiques sur surnageants de cultures.....	90
2.5	METABOLOMIQUE .....	91
2.5.1	Extraction des métabolites .....	91
2.5.1.1	A partir de matériel végétal .....	91
2.5.1.2	A partir d'extrait d' <i>Escherichia coli</i> .....	91
2.5.2	Système d'analyse des métabolites .....	92
2.5.2.1	Chromatographie en phase liquide.....	92
2.5.2.2	Spectrométrie de masse .....	93

## **CHAPITRE I : ANALYSE FONCTIONNELLE ET EVOLUTIVE DE LA FAMILLE DES STILBENE**

### **SYNTHESES DE LA VIGNE ..... 96**

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>98</b>
<b>2</b>	<b>ORGANISATION DES FAMILLES DE GENES <i>STS</i>.....</b>	<b>100</b>
<b>3</b>	<b>A PROPOS DE L'AMPLIFICATION EXCEPTIONNELLE DE LA FAMILLE DES <i>STS</i> DE VIGNE .....</b>	<b>104</b>
3.1	LA DUPLICATION GENIQUE.....	104
3.2	DEVENIR DES GENES DUPLIQUES .....	105
3.2.1	Pseudogénéisation ou non-fonctionnalisation des gènes .....	106
3.2.2	Hypothèse de la néo-fonctionnalisation.....	106
3.2.3	Théorie de l'effet dose.....	108
3.2.4	Hypothèse de la DDC : duplication – dégénérescence – complémentation.....	109
3.3	APPORT DE L'ETUDE DE VANNOZZI SUR LA SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DE L'AMPLIFICATION DES GENES <i>STS</i> .....	112
3.3.1	Expression constitutive de certains membres de la famille des <i>STS</i> .....	112
3.3.2	Induction de l'expression de la famille des <i>STS</i> .....	114
3.3.3	Hypothèse concernant l'évolution de la famille des <i>STS</i> et confrontation des conclusions concernant l'expansion de cette famille de gènes. ....	116
3.4	INTERACTION DES <i>STS</i> AVEC DES PARTENAIRES CELLULAIRES .....	117
<b>4</b>	<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>119</b>

### **CHAPITRE II : ANALYSE FONCTIONNELLE.....120**

#### **DE LA FAMILLE DES RESVERATROL O-METHYLTRANSFERASES DE LA VIGNE.....120**

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>122</b>
1.1	CLASSIFICATION DES METHYLTRANSFERASES (MT) .....	123
1.1.1.	Les O-méthyltransférases de type I.....	123
1.1.2.	Les O-méthyltransférases de type II .....	125
1.1.3.	Les O-méthyltransférases de type III.....	126
1.1	GENOMIQUE DES O-METHYLTRANSFERASES.....	128
1.2	ETUDE DE LA FAMILLE DES <i>ROMT</i> DE VIGNE.....	130
<b>2</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>130</b>
2.1	ANALYSE DE LA FAMILLE DES <i>ROMT</i> DE VIGNE.....	130
2.1.1	Identification des différents gènes .....	130
2.1.2	Clonage des gènes <i>ROMT</i> de <i>V. vinifera</i> var. PN40024 .....	134
2.2	ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES <i>ROMT</i> .....	136
2.2.1	Expression des <i>ROMT</i> en l'absence de stress.....	137

2.2.2	Profil d'expression des gènes ROMT suite à une infection par <i>Plasmopara viticola</i> .....	138
2.2.1	Profil d'expression des ROMT suite à un stress aux rayons UV .....	139
2.3	CARACTERISATION FONCTIONNELLE DES ROMT.....	141
2.3.1	Analyses fonctionnelles des ROMT.....	141
2.3.1.1	Mise au point de l'expression des protéines.....	141
2.3.1.2	Analyses préliminaires de l'activité des protéines ROMT recombinantes.....	144
2.3.1.3	Tests enzymatiques multi-substrats.....	146
2.3.2	Analyses fonctionnelles in planta .....	151
2.3.2.1	Analyses fonctionnelles par agro-infiltration.....	151
2.3.2.2	Analyses fonctionnelles par transformation stable d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	154
2.3.2.3	Transformation stable de <i>N. benthamiana</i> .....	155
2.3.3	A la recherche de substrats potentiels chez <i>Vitis vinifera</i> .....	158
2.3.1	Analyse structurale des ROMT.....	160
2.4	ETUDE DE LA FONGITOXICITE DU PTEROSTILBENE <i>IN PLANTA</i> .....	164
<b>3</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>166</b>
3.1	ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES ROMT .....	166
3.2	ETUDE FONCTIONNELLE DE LA FAMILLE DES ROMT .....	167
<b>4</b>	<b>PERSPECTIVES</b> .....	<b>170</b>
	<b><u>CONCLUSION GENERALE</u></b> .....	<b><u>174</u></b>
	<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b> .....	<b><u>178</u></b>



# Liste des figures

---

Figure 1 : Structure des formes trans- et cis-stilbènes.....	2
Figure 2 : Accumulation de stilbènes fluorescents au niveau des stomates.....	3
Figure 3 : Exemples de plantes productrices de stilbènes.....	4
Figure 4 : Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.....	6
Figure 5 : Biosynthèse du resvératrol par la stilbène synthase.....	8
Figure 6 : Exemples de réactions catalysées par les STS (tiré de Chong et al. 2009).....	10
Figure 7 : Représentation d'une polycétide synthase de type III (tiré de (Austin et al., 2004)) .....	12
Figure 8 : Analyse phylogénétique des relations entre les CHS et les STS de différentes espèces végétales.....	14
Figure 9 : Comparaison des mécanismes de condensation de type Claisen et de type Aldol, pour la formation de la chalcone et du resvératrol respectivement.....	16
Figure 10 : Régions impliquées dans la spécificité du produit des CHS et STS (Austin et al., 2004).....	17
Figure 11 : Représentation structurale des acides aminés déterminants pour la cyclisation de type Aldol chez les STS.....	18
Figure 12 : Diversité des stilbènes (adapté de Chong et al., 2009).....	20
Figure 13 : Glycosylation du resvératrol par une glycosyltransférase. UDP-glucose, uridine- diphosphate-glucose; UDP, uridine diphosphate.....	22
Figure 14 : Méthoxylation du resvératrol par la resvératrol O-méthyltransférase.....	23
Figure 15: Oligomérisation (dimérisation) du resvératrol en <i>trans-ε</i> -viniférine, sous l'action d'une peroxydase.....	24
Figure 16 : Structures de trois viniférines présentes dans les feuilles de vigne ( <i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Merzling</i> x <i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Teroldego</i> ) 6 jours post-infection par <i>P. viticola</i> , d'après Mattivi et al. 2011.....	25
Figure 17 : Dosage des stilbènes 48 h post-infection par <i>P. viticola</i> chez différentes variétés de vigne sensibles, partiellement résistantes, et résistantes (figure adaptée de Pezet et al. 2004).....	29
Figure 18 : Toxicité des stilbènes sur <i>P. viticola</i> (adapté de Pezet, Gindro, Viret, and Richter, 2004).....	32
Figure 19 : Création de plantes transgéniques surexprimant <i>Vst1</i> ( <i>V. vinifera</i> cv. <i>optima</i> ).....	34

Figure 20 : Le resvératrol dans le commerce. ....	45
Figure 21 : Voie de régulation des sirtuines chez <i>S. cerevisiae</i> , adapté de Anderson et al., 2003. ....	48
Figure 22 : Récapitulatif de l'effet du resvératrol sur la durée de vie moyenne et la durée de vie maximale de différents organismes. Adapté de Baur et Sinclair, 2006. ....	49
Figure 23 : <i>Vitis vinifera</i> cv. Pinot noir (Source : Photothèque INRA Colmar). ....	56
Figure 24 : Organisation de la famille des Vitacées. ....	57
Figure 25 : <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	57
Figure 26 : <i>Nicotiana benthamiana</i> . ....	59
Figure 27 : Schéma du vecteur pJET1.2. ....	66
Figure 28 : Principe de la recombinaison homologue Gateway™. ....	70
Figure 29 : Vecteurs d'expression Gateway™. ....	72
Figure 30 : Infiltration d'une feuille de <i>N. benthamiana</i> . ....	78
Figure 31 : Feuille de <i>Vitis vinifera</i> var. PN40024 non inoculée. ....	85
Figure 32 : Chaîne de chromatographie liquide UHPLC Dionex Ultimate 3000 (à droite sur la photo) couplée au spectromètre de masse Thermo Exactive (à gauche sur la photo). ....	93
Figure 33 : Composition du spectromètre de masse Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fischer) .....	94
Figure 34 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes et des stilbènes. ....	99
Figure 35 : Modèle de la néo-fonctionnalisation (figure adapté de (Ober, 2010)). ....	107
Figure 36 : Modèle de la sub-fonctionnalisation (adapté de Ober, 2010). ....	110
Figure 37 : Expression constitutive des stilbène synthèses de vigne. ....	111
Figure 38 : Expression constitutive de la famille des <i>STS</i> de <i>V. vinifera</i> cv. Corvina atlas (Vannozzi et al., 2012). ....	113
Figure 39 : Expression de la famille des <i>STS</i> de <i>V. vinifera</i> var. PN40024 suite à un stress (Vannozzi et al., 2012). ....	115
Figure 40 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes organisée en métabolon. (Adapté de Winkel, 2004). ....	118
Figure 41 : Exemples de classes de substrat des OMT végétales. ....	123
Figure 42: Exemples d' <i>O</i> -méthyltransférases de type I. ....	125
Figure 43: Réactions enzymatiques catalysées par la CCoAOMT (Caféoyl-CoA 3- <i>O</i> - méthyltransférase) de <i>Medicago sativa</i> . ....	126
Figure 44: Acide salicylique carboxyl-méthyltransférase (SAMT) de <i>Clarkia breweri</i> . ....	128

Figure 45 : Arbres phylogénétiques comparés des OMT chez trois espèces végétales : <i>P. patens</i> (Mousses), <i>A. thaliana</i> (Brassicacées) et <i>V. vinifera</i> (Vitacées) var. PN40024.	129
Figure 46 : Organisation physique de la famille des ROMT de vigne	131
Figure 47 : Arbre phylogénétique de la famille des ROMT de vigne.	132
Figure 48 : Structure des gènes des différentes ROMT.	134
Figure 49: Clonage des ADNc des ROMT de vigne.	135
Figure 50 : Profil d'expression des gènes ROMT au niveau des racines de plantules de vigne.	137
Figure 51 : Test d'inoculation de <i>P. viticola</i> sur <i>V. vinifera</i> var. PN40024.	138
Figure 52 : Gènes ROMT induits en réponse à une inoculation des feuilles de <i>V. vinifera</i> var. PN40024 par <i>P. viticola</i> .	140
Figure 53 : Optimisation de la production des ROMT	143
Figure 54 : Tests enzymatiques réalisés sur les ROMT du PN40024, visualisation par chromatographie en couche mince.	145
Figure 55 : Résultats des tests enzymatiques multi-substrats.	149
Figure 56 : Test enzymatique à partir d'enzymes purifiées (ROMT 2, 13 et CS11).	150
Figure 57 : Comparaison des ROMT CS11, 2 et 5 pour la biosynthèse de resvératrol dans des feuilles de <i>N. benthamiana</i> agro-infiltrées.	152
Figure 58 : Profil chromatographique obtenu suite à la co-infiltration de STS 15 et de ROMT13 dans des feuilles de <i>N. benthamiana</i> .	153
Figure 59 : Etapes de la transformation de <i>N. benthamiana</i> .	156
Figure 60 : Transformation de racines de <i>N. benthamiana</i> par <i>A. rhizogenes</i> .	157
Figure 61 : Expression de la GFP dans les racines de <i>N. benthamiana</i>	158
Figure 62 : FTMS (full time MS), ou total des ions détectés d'un extrait de racine de vigne, en mode négatif.	160
Figure 63 : Représentation tridimensionnelle de la ROMT du	161
Figure 64 : Alignement des séquences protéiques des différentes ROMT du PN40024 et de la ROMTCS11, et pourcentages d'identité correspondants.	162
Figure 65 : Représentation tridimensionnelle des régions consensus riches en glycine de la ROMT du Cabernet sauvignon.	163
Figure 66 : Analyse des lignées transgéniques Vst1-ROMT CS11 d' <i>A. thaliana</i> .	165
Figure 67 : Profils d'expression de la famille des ROMT (d'après Fasoli et al., 2012).	167



# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Quelques exemples de stilbènes simples synthétisés par différents genres végétaux .....	21
Tableau 2 : Récapitulatif de la production de resvératrol chez les plantes, adapté de (Donnez et al., 2009). MS, matière sèche ; MF, matière fraîche ; MeJA, jasmonate de méthyle ; SA, acide salicylique (+), induction/élicitation ; (-), condition contrôle. Sauf précision, les concentrations données représentent le <i>trans</i> -resvératrol. ....	38
Tableau 3 : Récapitulatif de la production de resvératrol en systèmes hétérologue bactériens. ....	41
Tableau 4 : Récapitulatif de la production de resvératrol chez les levures. (Tiré de Jeandet et al., 2012).....	44
Tableau 5 : Composition milieu MS (Murashige et Skoog) .....	58
Tableau 6 : Récapitulatif des concentrations utilisées pour la sélection des bactéries transformées. ....	63
Tableau 7 : Milieu réactionnel pour les PCR .....	64
Tableau 8 : Liste des amorces utilisées pour le séquençage et les PCR sur colonies. ....	68
Tableau 9 : Amorces pour le clonage des ROMT à partir de l'ADN génomique.....	73
Tableau 10 : Amorces utilisées pour le transfert des ROMT dans le système Gateway <sup>TM</sup> .....	74
Tableau 11 : Amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR, certains primers amplifient plusieurs ROMT. ....	75
Tableau 12 : Amorces utilisées pour les expériences de qRT-PCR. ....	75
Tableau 13 : Milieux de culture utilisés pour la transformation stable de <i>N. benthamiana</i> .....	80
Tableau 14 : Conditions utilisées pour les RT-PCR semi quantitative .....	84
Tableau 15 : Composition du gel SDS-PAGE. ....	88
Tableau 16 : Tampon utilisé pour les tests enzymatiques. ....	90
Tableau 17 : Récapitulatif des gènes <i>STS</i> présents chez différentes espèces végétales. ....	101
Tableau 18 : Récapitulatif de la famille des gènes <i>ROMT</i> . Sens : orientation du gène le long du chromosome. ....	133
Tableau 19 : Composition du mélange de substrats.....	147



# Abréviations

---

3'UTR : 3' untranslated region, région 3' non traduite

4CL : 4-coumarate : CoA ligase

5'UTR : 5' untranslated region, région 5' non traduite

AB : acide benzoïque

AG : acide gibbéréllique

AJ : acide jasmonique

AS : acide salicylique

ACC : acétyl-CoA carboxylase

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ANMT : anthranilate N-méthyltransférase

ARNm : acide ribonucléique messenger

BAMT : benzoic acid COMT, acide benzoïque COMT

BSMT : benzoic and salicylic acid COMT, acide benzoïque et salicylique COMT

C1 : carbone 1

C4H : cinnamate 4 hydroxylase

CaMV : Cauliflower mosaic virus, virus de la mosaïque du chou-fleur

CCM : chromatographie en couche mince

CCMT : cinnamates/*p*-coumarates méthyltransférases

CCoAOMT : caféoyl-CoA OMT

CHI : chalcone isomérase

ChOMT : chalcone O-méthyltransférase

CHS : chalcone synthase

CIV : culture *in vitro*

COMT : acide caféique O-méthyltransférase

COX : cyclooxygénase

DAD : diode array detector, détecteur à barrette de diode

DDC : duplication-dégénérescence-complémentation

DMSO : diméthylsulfoxyde

ED<sub>50</sub> : efficient dose 50 %, concentration effective à 50 %

EST : expressed sequence tag  
F3'5'H : flavonoïde 3',5'-hydroxylase  
F3'H : flavanone 3'-hydroxylase  
F3H : flavanone 3-hydroxylase  
GMT : gibbérelline méthyltransférase  
GT : glycosyltransférase  
GST : glutathion S-transférase  
HI4'OMT : hydroxyisoflavanone 4'-O-méthyltransférase  
HM3OMT : 6a-hydroxymaackiaïne 3-O-méthyltransférase  
HPLC : high performance liquid chromatography, chromatographie liquide à haute performance  
IAA : indole-3-acetic acid, acide indole-3-acétique  
IAMT : IAA méthyltransférases  
IOMT : isoflavone O-méthyltransférase  
IPTG : isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
JMT : jasmonate méthyltransférase  
LDL : low density lipoproteins, lipoprotéines à basse densité  
MBP : maltose binding protein, protéine liant le maltose  
MeJA: méthyl jasmonate  
MS : mass spectrometer, spectromètre de masse  
MT : méthyltransférase  
NMT : N-méthyltransférase  
NusA : N-utilizing substance A, substance A utilisatrice de N  
OMT : O-méthyltransférase  
PAL : phénylalanine ammonia-lyase  
pb : paire de bases  
PCR : polymerase chain reaction, réaction de polymérisation en chaîne  
PCS : polycétide synthase  
PMT : pinosylvine méthyltransférase  
PN40024 : *Vitis vinifera* variété PN40024  
ppm : parties par million  
PR : pathogenesis –related, lié à la pathogénèse  
qPCR : PCR quantitative  
rpm : révolutions par minute

RT-PCR : reverse transcription - PCR, rétro-transcription – PCR

ROMT : resvératrol O-méthyltransférase

ROS : reactive oxygen species, espèces réactives oxygénées

SA : salicylic acid, acide salicylique

SABATH : **S**alicylic **A**cid méthyltransférase, **B**enzoic **A**cid méthyltransférase, **T**heobromin synthase ; acide salicylique méthyltransférase, acide benzoïque méthyltransférase, théobromine synthase

SAM : S-adénosyl méthionine

SAMT : salicylic acid COMT, acide salicylique COMT

SMT : S-méthyltransférase

SOMT-2 : flavonoid 4'-O-méthyltransférase de *Glycine max*

sqPCR : PCR semi-quantitative

STCS : stilbène-carboxylate synthase

STS : stilbène synthase

TAL : tyrosine amonyla-lyase

TBSV : tomato bushy stunt virus, virus du rabougrissement buissonneux de la tomate

TIC : total ions current, courant total d'ions

TPS : terpène synthase

TRX : thiorédoxine

UDP : uridine diphosphate

UHPLC : ultra-high performance liquid chromatography, chromatographie liquide à ultra-haute performance

UV : ultraviolet

var. : variété



# Contexte

---

La viticulture nécessite l'utilisation de quantités importantes de pesticides : elle consomme en effet à elle seule 20 % des pesticides répandus en France, alors que la viticulture n'occupe que 3 % de la surface agricole utile. Les pesticides utilisés sont des insecticides, des nématicides et surtout des fongicides qui représentent 80 % du total, pour huit à dix traitements annuels (Gindro et al., 2001). La généralisation de la lutte chimique pour le contrôle des maladies fongiques de la vigne a des conséquences négatives sur le coût de production des vins, sur l'environnement ainsi que sur la santé humaine. La réduction de l'usage des fongicides représente donc une priorité en viticulture et un enjeu socioéconomique majeur. Dans ce contexte, la création de cépages résistants aux principales maladies fongiques de la vigne constitue une alternative économiquement viable et respectueuse de l'environnement. L'UMR 1131 « Santé de la Vigne et Qualité du Vin » (SVQV) conduit un programme de création de nouveaux cépages produisant des vins de qualité et dotés de résistances durables au mildiou (*Plasmopara viticola*) et à l'oïdium (*Erysiphe necator*), grâce à l'exploitation de sources de résistance issues d'espèces de *Vitis* d'origines américaine et asiatique (Bellin et al., 2009).

Ce programme de sélection s'appuie sur des travaux visant à comprendre les bases de la résistance au mildiou et à l'oïdium chez la vigne. Les programmes de création variétale actuels sont exclusivement basés sur l'introgession de combinaisons de gènes de résistance au mildiou et à l'oïdium. Cependant, l'analyse de populations issues de croisements entre des vigne possédant des gènes de résistance (gènes R) au mildiou indiquent que, même en présence d'un gène R, la résistance au mildiou est liée à l'accumulation rapide et efficace de phytoalexines stilbéniques (Malacarne et al., 2011). Les capacités de défenses métaboliques apparaissent donc comme un paramètre important à prendre en compte dans les futures créations de vignes résistantes.

Si les stilbènes de la vigne sont relativement bien décrits au niveau biochimique (Jeandet et al., 2002), très peu de gènes liés à ce métabolisme ont été caractérisés. Profitant de la disponibilité de la séquence du génome de la vigne, l'objectif de cette thèse est de réaliser une analyse approfondie de familles de gènes impliquées dans le métabolisme des stilbènes chez la vigne, et de préciser le rôle de ces gènes dans les défenses contre le mildiou.

Dans une première partie bibliographique de ce manuscrit, j'ai choisi de présenter une famille de molécules originales au sein du métabolisme secondaire des plantes: les stilbènes. Ces composés, relativement peu répandus dans le règne végétal, figurent parmi les substances naturelles les plus étudiées, en raison de leurs propriétés biologiques très intéressantes. Dans cette introduction, l'accent sera mis sur la biosynthèse des stilbènes chez la vigne, qui est mon objet d'étude. Dans les deux parties suivantes, je présenterai mes travaux de recherche sur deux familles de gènes impliquées dans la biosynthèse des stilbènes chez la vigne : les stilbène synthases et les resvératrol *O*-méthyltransférases.

# *Introduction : les stilbènes*

---



# Introduction : les stilbènes

## 1 Structure et propriétés physico-chimiques des stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques issus du métabolisme secondaire végétal, et qui dérivent de la voie des phénylpropanoïdes. Les stilbènes (1,2-diphényléthylène) sont composés de deux noyaux phényles reliés entre eux par un double pont éthène pouvant exister sous deux formes : la forme *trans* (E) et la forme *cis* (Z), cette dernière étant obtenue par photoisomérisation ou par l'action de la chaleur. La forme *trans*-stilbène étant la forme la plus stable et bioactive (Mérillon et al., 1997), elle est retrouvée en général plus abondamment dans les différentes espèces végétales productrices de stilbènes (Hart, 1981) (Figure 1).

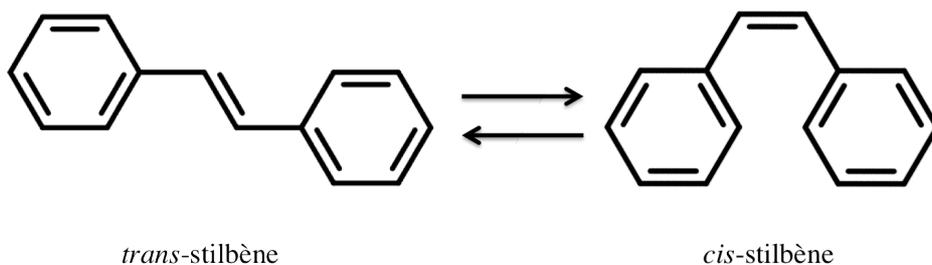


Figure 1 : Structure des formes *trans*- et *cis*-stilbènes.

Le mot stilbène dérive du grec *stilbos*, signifiant « briller », un nom donné suite à l'observation d'une forte fluorescence bleue sous l'action de rayonnements ultraviolets (UV) (Figure 2). Cette propriété physico-chimique fait des stilbènes des molécules facilement caractérisables en chromatographie en couche mince (CCM), en chromatographie en phase liquide (HPLC) par utilisation d'un détecteur UV ou d'un détecteur à barrette de diode (diode array detector, DAD), ou même directement *in planta* par éclairage en lumière UV, en raison de leur fluorescence (Poutaraud et al., 2007). Les stilbènes présentent une forte absorbance à des longueurs d'onde comprises entre 220 et 307 nm. Par exemple, les coefficients d'extinction molaires pour les deux formes du resvératrol (dans l'eau) sont :  $\epsilon_{\lambda_{\max}} = \epsilon_{304 \text{ nm}} = 30\,335 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{286 \text{ nm}} = 23\,400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (*trans*-resvératrol) et  $\epsilon_{\lambda_{\max}} = \epsilon_{286 \text{ nm}} = 14\,986 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{304 \text{ nm}} = 9515 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (*cis*-resvératrol) (Camont et al., 2009). A l'exception des formes glycosylées, les stilbènes sont faiblement solubles dans l'eau, mais généralement

solubles dans des solvants organiques comme par exemple l'éthanol, l'acétate d'éthyle, l'acétone ou l'acide acétique (Hart, 1981).

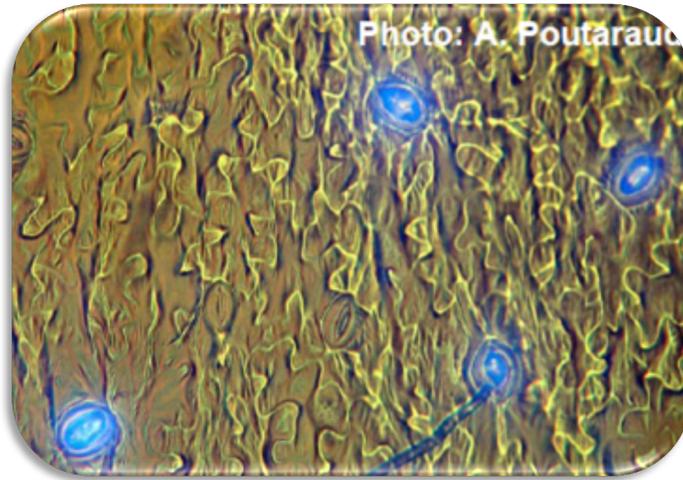


Figure 2 : Accumulation de stilbènes fluorescents au niveau des stomates. Vue de la face abaxiale de feuilles de vigne, suite à une infection par *P. viticola*. Observation sous rayonnements UV (Photo : Anne Poutaraud).

## 2 Distribution des stilbènes au sein du règne végétal

La distribution des stilbènes au sein du règne végétal n'est pas très large, puisqu'elle est limitée à quelques dizaines d'espèces végétales seulement, qui ont acquis au cours de l'évolution la capacité à synthétiser ces molécules. Il existe en tout 72 espèces connues capables de synthétiser des stilbènes, distribuées en 31 genres et 12 familles (Jang, 1997). Parmi ces espèces, toutes appartiennent au règne des spermatophytes équivalant aux plantes à graines, mais leur distribution n'est pas homogène au sein du règne. On retrouve ainsi des stilbènes chez des plantes ligneuses telles que les Vitacées (Langcake and Pryce, 1977a), les Fagacées, les Pinacées, les Diptérocarpacées ; des plantes herbacées telles que les Fabacées ; des familles produisant des baies telles que les Myrtacées ou les Moracées ; des espèces plus primitives telles que les Gnétacées ; ou encore des plantes monocotylédones telles que les Liliacées et les Poacées (Counet et al., 2006 ; Takaya et al., 2002). Cependant, l'essentiel des connaissances ont été acquises grâce à l'étude d'un petit nombre de plantes telles que l'arachide (*Arachis hypogea*), la vigne (*Vitis vinifera*), la renouée du Japon (*Fallopia japonica*) et différentes espèces de pins (*Pinus* spp) (Chong et al., 2009) (Figure 3).



Figure 3 : Exemples de plantes productrices de stilbènes.

## 3 Voie de biosynthèse des stilbènes

### 3.1 La voie des phénylpropanoïdes

Au cours de l'évolution, les végétaux ont dû continuellement s'adapter à leur environnement. L'émergence des plantes primitives du monde aquatique vers le monde terrestre n'aurait pas été possible sans la création de mécanismes de défense contre les rayonnements UV, les agents pathogènes, les herbivores, ou encore les stress abiotiques tels que les stress hydrique ou salin. Les plantes nous montrent un parfait exemple d'adaptation, par la création de nouvelles molécules, de nouvelles structures et de nouvelles fonctions. Parmi ces molécules, certaines appartiennent au métabolisme primaire (photosynthèse, glycolyse,...) et d'autres appartiennent au métabolisme dit « secondaire ». Le métabolisme secondaire est une particularité des végétaux supérieurs qui les distingue des animaux, et qui est riche de plus de 100 000 petites molécules aux propriétés étonnantes. Les métabolites secondaires des végétaux sont synthétisés à partir de quelques voies métaboliques primaires, dont la voie des phénylpropanoïdes, des terpénoïdes et des alcaloïdes. La richesse ainsi que la composition en métabolites secondaires est propre à chaque espèce végétale, mais dépend en général fortement des conditions environnementales.

Les phénylpropanoïdes, sont des composés organiques possédant un squelette carboné de type C6-C3. La synthèse de ces composés phénoliques est initiée par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), qui convertit l'acide aminé phénylalanine en acide cinnamique, par un processus de déamination (Figure 4). Cette étape, commune à tous les végétaux supérieurs, constitue une étape charnière qui permet de diriger le flux de carbone du métabolisme primaire (voie de biosynthèse du shikimate) vers le métabolisme secondaire (voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes) (Dixon and Paiva, 1995; Hahlbrock and Scheel, 1989, Vogt, 2010). L'acide cinnamique et ses nombreux dérivés, constituent un ensemble de molécules vitales pour un grand nombre de processus fondamentaux communs à de nombreuses plantes supérieures (Ferrer et al., 2008). Parmi ces processus fondamentaux, on pourrait donner comme exemple l'attraction des insectes pollinisateurs via la synthèse de pigments (anthocyanes) ou l'émission de composés volatils ; la synthèse de flavonoïdes pour la protection contre les rayonnements UV du soleil ; la synthèse de phytoalexines comme composés de défense contre les agents pathogènes ou les herbivores ; la synthèse de composés structuraux comme la lignine ou la subérine ; l'induction de la nodulation au niveau des

racines des légumineuses pour la symbiose avec les bactéries du genre *Rhizobium* (Ferrer et al., 2008; Dixon and Paiva, 1995; Hahlbrock and Scheel, 1989).

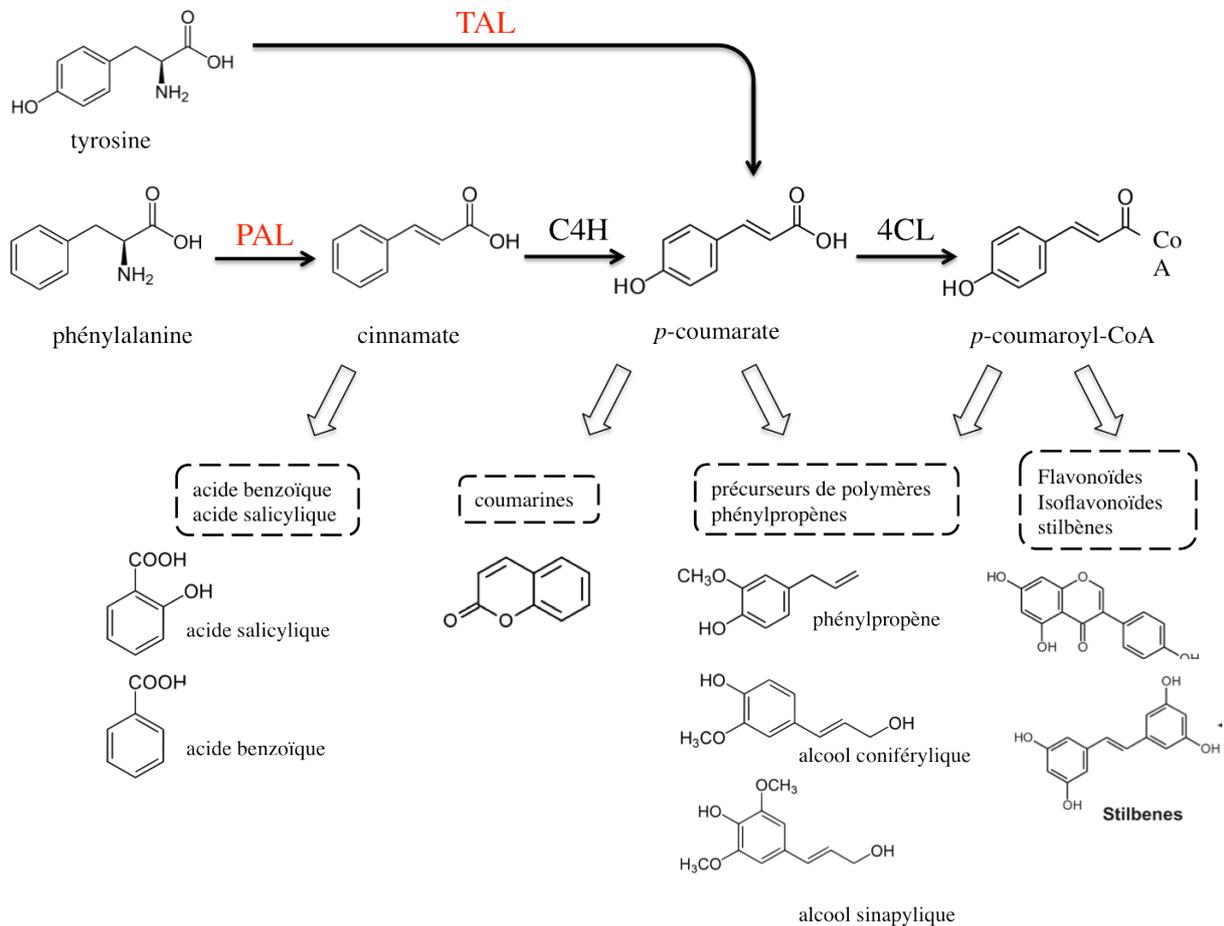


Figure 4 : Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

Illustration des premières étapes de la voie des phénylpropanoïdes, initiées par la phenylalanine amonya-lyase (PAL) ou la tyrosine amonya-lyase (TAL), ainsi que les grandes familles de métabolites associées aux dérivés des acides hydroxycinnamiques. C4H = cinnamate 4-hydroxylase, 4CL = 4-coumarate : CoA ligase (Adapté de (Ferrer et al., 2008)).

L'acide coumarique est issu de l'hydroxylation en *-para* du groupement phényl de l'acide cinnamique par un cytochrome P450 hydroxylase (C4H, cinnamate 4-hydroxylase), une hémoprotéine transmembranaire localisée au niveau du réticulum endoplasmique, ayant la particularité d'absorber à 450 nm en présence de monoxyde de carbone (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000). Le coumarate est par exemple à l'origine des phénylpropènes, qui

regroupent un ensemble de petites molécules ayant des propriétés attractives pour les insectes pollinisateurs, des propriétés défensives contre des agents pathogènes ou des herbivores, et que l'on retrouve en abondance dans certaines plantes aromatiques, comme c'est par exemple le cas de l'eugénol et du méthyl-eugénol de basilic (*Ocimum basilicum*) (Gang et al., 2002; Dudareva and Pichersky, 2008).

L'estérification de l'acide coumarique par l'enzyme 4-coumarate : CoA ligase (4CL) est à l'origine du *p*-coumaroyl-CoA, précurseur des flavonoïdes, des isoflavonoïdes, des anthocyanes, des stilbènes et d'autres familles de métabolites secondaires (Figure 4). Ensembles, les dérivés de l'acide coumarique et du *p*-coumaroyl-CoA entrent dans la composition de nombreux polymères végétaux tels que la lignine, la subérine, la cutine, ou encore les polyamines entrant dans la composition de la sporopollénine, un polymère complexe présent au niveau de la membrane des grains de pollen (Vogt, 2010; Matsuno et al., 2009). Chez les plantes monocotylédones ainsi que chez certains champignons et certaines bactéries, le *p*-coumaroyl-CoA peut être synthétisé directement à partir de l'acide aminé tyrosine, réduisant ainsi le nombre d'étapes nécessaires à l'obtention de ce métabolite (Ferrer et al., 2008) (Figure 4).

## 3.2 La voie de biosynthèse des stilbènes

### 3.2.1 Les stilbène synthèses

Les stilbènes dérivent de la voie des phénylpropanoïdes, et leur synthèse est initiée par une enzyme caractéristique des plantes productrices de stilbènes : la stilbène synthase (STS) (Chong et al., 2009). Cette enzyme fut pour la première fois identifiée puis purifiée en 1984 à partir de suspensions cellulaires d'arachide (*A. hypogea*) (Schöppner and Kindl, 1984). La stilbène synthase permet la synthèse de resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène) ou de pinosylvine à partir de 3 molécules de malonyl-CoA et d'un dérivé ester-CoA d'acide hydroxycinnamique : le *p*-coumaroyl-CoA dans le cas du resvératrol, et le *p*-cinnamoyl-CoA dans le cas de la pinosylvine (Jeandet et al., 2002). La réaction est complexe et implique la condensation de 3 unités de malonyl-CoA au niveau de l'ester-CoA d'acide hydroxycinnamique, la formation subséquente d'un polycétide intermédiaire qui sera par la suite cyclisé par une condensation du carbone 2 sur le carbone 7, accompagnée d'une étape de

décarboxylation (Tropf et al., 1994). Ce type de condensation est qualifié de condensation de type Aldol (Figure 5).

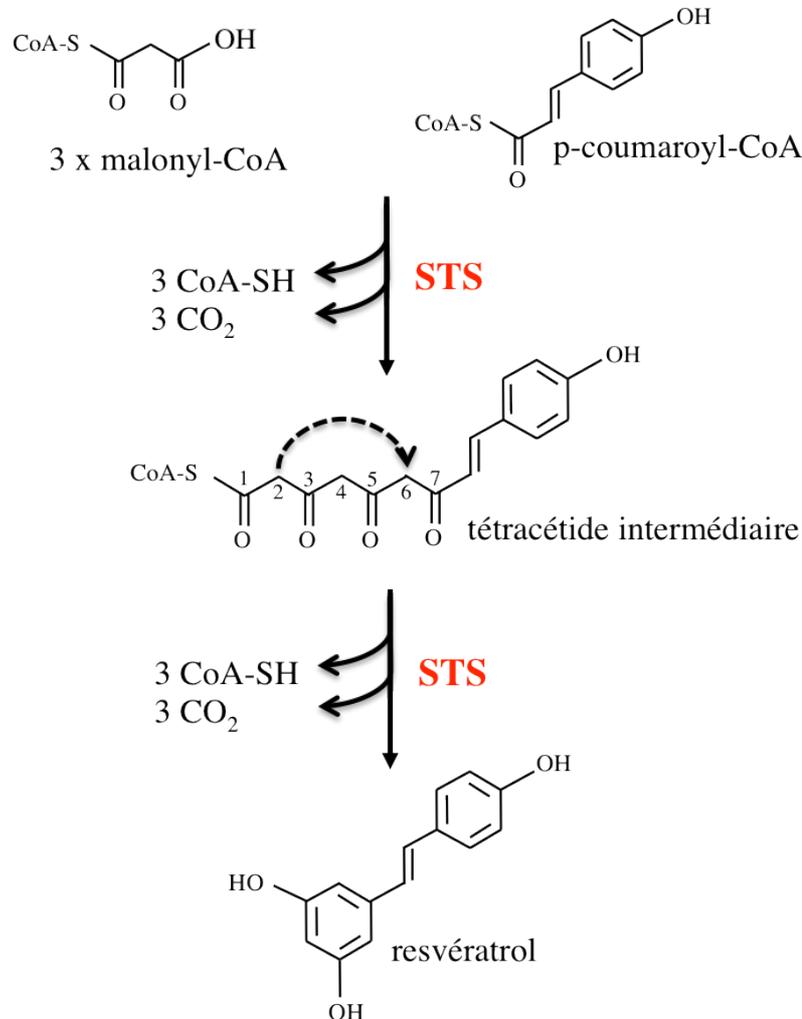


Figure 5 : Biosynthèse du resvératrol par la stilbène synthase.

Les STS qui synthétisent le resvératrol à partir du *p*-coumaroyl-CoA sont principalement retrouvées chez les plantes appartenant à la division des Angiospermes comme par exemple la vigne, le sorgho ou l'arachide ; alors que les STS qui utilisent préférentiellement le *p*-cinnamoyl-CoA pour synthétiser la pinosylvine se retrouvent uniquement chez certains végétaux de la division des Gymnospermes, et plus particulièrement chez le genre *Pinus*. Plusieurs études ont montré que les STS sont capables de condenser d'autres ester-CoA d'acides hydroxycinnamiques. Par exemple, la STS de *Pinus sylvestris* a été caractérisée comme étant également une dihydropinosylvine synthase, catalysant la

formation de la dihydropinosylvine à partir de dihydrocinnamoyl-CoA (Fliegmann et al., 1992). Des études plus anciennes ont pu montrer que la STS de *Pinus strobus* est capable de métaboliser *in vitro* le cinnamoyl-CoA de façon majoritaire (formant la pinosylvine) ; mais aussi d'autres dérivés avec une efficacité moindre, tel que le dihydrocinnamoyl-CoA (formant la dihydropinosylvine), le *p*-coumaroyl-CoA (formant du resvératrol), le caféoyl-CoA (formant le picéatannol) ou encore le féruloyl-CoA (formant la rhapontigénine) (Raiber et al., 1995). Certaines plantes synthétisent des stilbènes-carboxylates, synthétisés de la même façon que le resvératrol ou la pinosylvine, à l'exception que le groupement carboxyl (C1) n'est pas clivé lors de la condensation de l'intermédiaire de synthèse ; ces dérivés stilbéniques se rencontrent chez les Hépatiques ainsi que certaines plantes supérieures telles que *Hydrangea macrophylla* (Eckermann et al., 2003) (Figure 6D). D'autres dérivés stilbéniques synthétisés suite à une infection fongique ou une blessure ont été retrouvés au niveau du rhizome de certaines orchidées ; le gène *bbs* (bibenzyl synthase) a été identifié à partir d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) de *Phalaenopsis* et en se basant sur la séquence de l'ADNc d'un gène *STS* de vigne ; ce gène *bbs* permet en fait la conversion de dihydro-*p*-coumaroyl-CoA en bibenzyl (Preisig-Müller et al., 1995; Reinecke and Kindl, 1994) (Figure 6E).

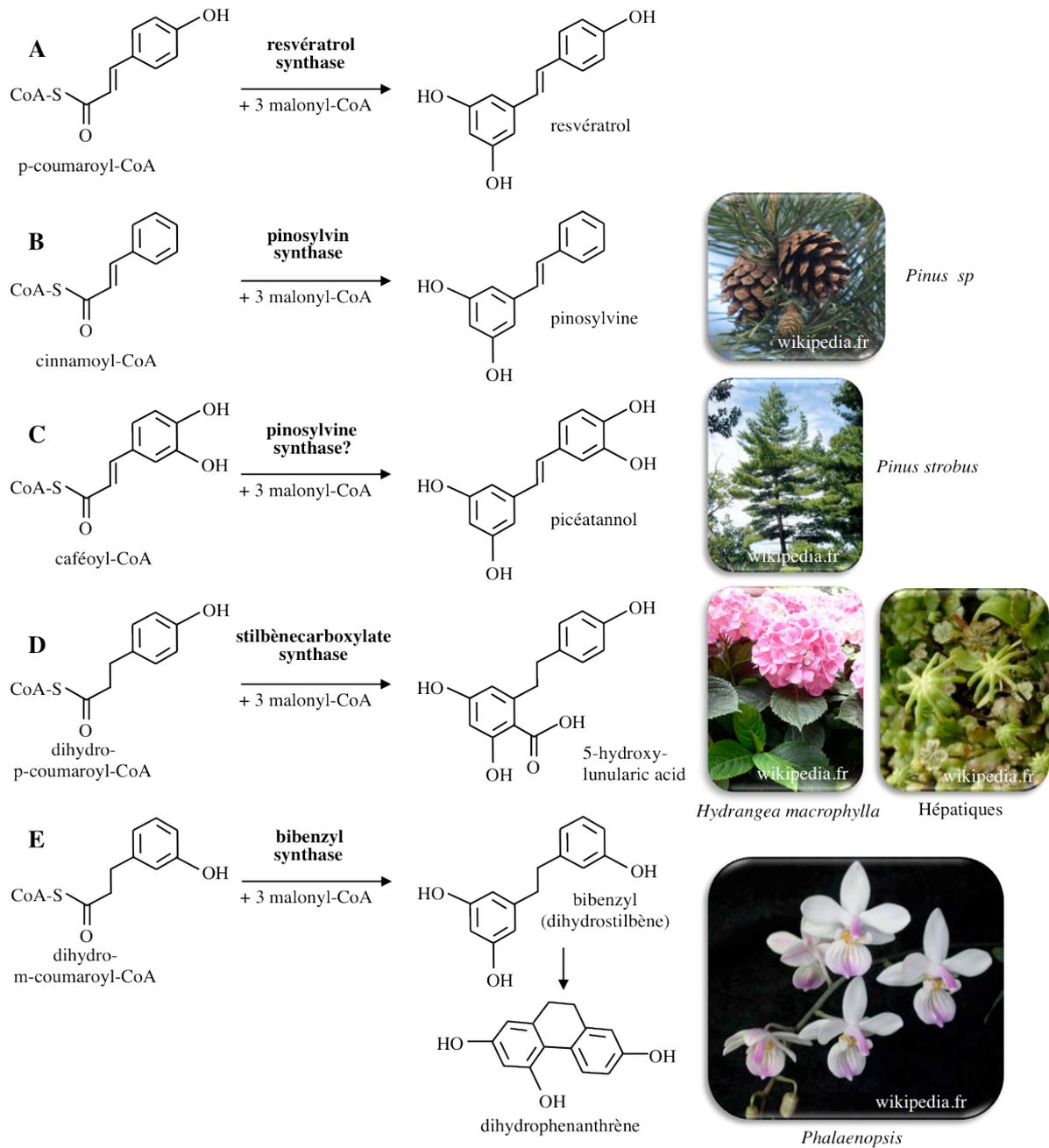


Figure 6 : Exemples de réactions catalysées par les STS (tiré de Chong et al. 2009).

### 3.2.2 La famille des polycétide synthases

La stilbène synthase appartient à la famille des polycétide synthases (PCS). Les PCS forment un groupe d'enzymes qui permettent la condensation d'ester-CoA avec d'autres ester-CoA généralement plus petits (par exemple le malonyl-CoA), pour donner naissance à une grande diversité de polymères appelés polycétides, qui peuvent être d'origine bactérienne ou fongique (antibiotiques, mycotoxines), ou encore végétale (flavonoïdes, stilbènes) (Flores-Sanchez and Verpoorte, 2009). Les PCS sont subdivisées en 3 groupes définis par leur architecture.

Les PCS de type I contiennent une ou plusieurs enzymes organisées en complexes protéiques multifonctionnels, où chaque étape enzymatique spécifique permettant la condensation d'ester-CoA et réalisée au niveau d'un site actif spécifique. Ce type d'enzyme existe chez les bactéries et les champignons. Les PCS de type II forment un système d'enzymes individuelles où chaque protéine catalyse une des différentes étapes successives de condensation des esters-CoA. Elles existent uniquement chez certaines bactéries du sol ou certains actinomycètes. Seules les PCS de type III sont présentes à la fois chez les bactéries, les champignons et les plantes (Flores-Sanchez and Verpoorte, 2009).

Les PCS de type III sont des homodimères de structure simple, possédant un site actif interne composé d'une triade d'acides aminés très conservés (Cys164, His303 et Asn336 : CHN, annotés à partir de la chalcone synthase de *M. sativa*) permettant la condensation d'unités acétyl-CoA (issues de la décarboxylation du malonyl-CoA) au niveau d'un ester-CoA receveur (Austin et al., 2004). Chaque sous-unité est composée d'environ 400 acides aminés, pour un poids moléculaire compris entre 41 et 44 kDa. Le site actif des PCS de type III est formé d'un tunnel par lequel sont amenés les différents substrats, qui débouche sur deux cavités distinctes : l'une permettant la fixation des substrats (les esters-CoA d'acides hydroxycinnamiques), et l'autre permettant la cyclisation du polycétide (Flores-Sanchez and Verpoorte, 2009). Ces enzymes fonctionnent de la façon suivante : les 3 molécules de malonyl-CoA sont décarboxylées puis séquentiellement condensées au niveau de l'ester-CoA d'acide hydroxycinnamique receveur, générant ainsi un polycétide intermédiaire linéaire qui sera par la suite cyclisé (Tropf et al., 1994). Le nombre de condensations peut aller jusqu'à sept.

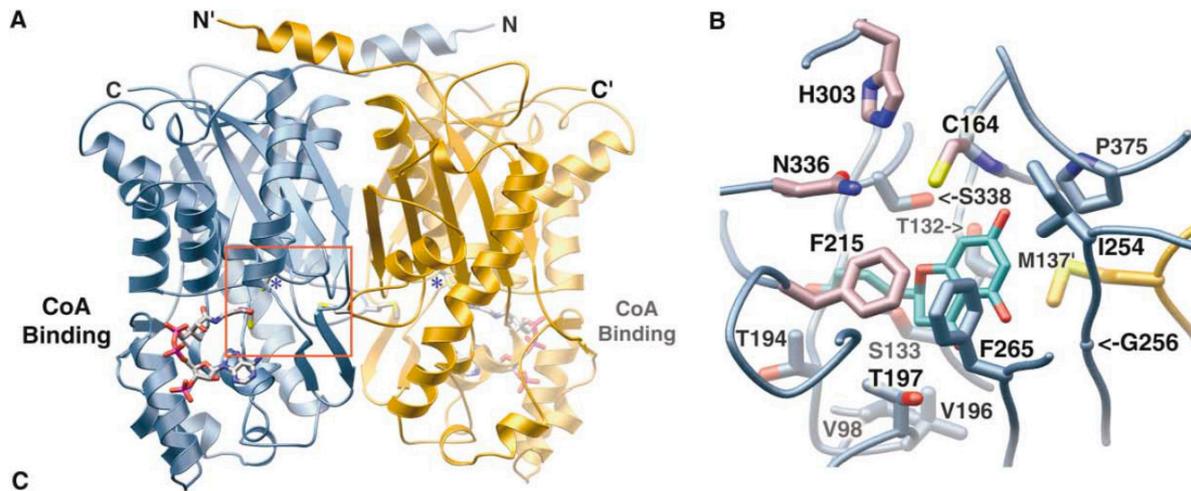


Figure 7 : Représentation d'une polycétide synthase de type III (tiré de (Austin et al., 2004))

(A) Architecture d'une PCS de type III, basée sur la structure cristallographique de la chalcone synthase (CHS) de *Medicago sativa*. Les deux monomères qui forment l'enzyme sont représentés en bleu et en jaune, l'ester-CoA est représenté pour chaque monomère au niveau du tunnel amenant au site actif de la protéine (« stick model »).

(B) Agrandissement de la zone encadrée en rouge du monomère bleu situé sur la figure A, représentant la cavité du site actif composée des acides aminés permettant la condensation des unités acétyl-CoA sur l'ester-CoA (triade catalytique Cys-His-Asn et Phe215 en rose clair) ; et le produit final de réaction : la chalcone (turquoise). Les autres acides aminés qui définissent la cavité sont représentés en bleu, le résidu de couleur or est à l'interface des deux monomères.

La diversité des molécules obtenues par les PCS de type III provient de modifications subtiles au niveau du site actif, qui ont une influence directe sur la nature des substrats sélectionnés, sur le nombre d'étapes d'élongation du polycétide intermédiaire, ainsi que sur les mécanismes de cyclisation de ce dernier (Tropf et al., 1994, Flores-Sanchez and Verpoorte, 2009). Par exemple, une cavité restreinte au niveau du site actif limite la taille du substrat ainsi que l'élongation potentielle de celui-ci par condensation de groupements acétyles.

### 3.2.3 Origine évolutive des stilbène synthases

Parmi les PCS de type III végétales, deux enzymes ont été particulièrement étudiées depuis les années 1980 par l'équipe de J. Schröder (Université de Freiburg) : les chalcone synthases (CHS) et les stilbène synthases (STS) (Schröder et al., 1988). Les CHS sont des enzymes ubiquitaires chez les plantes, et sont à l'origine des flavonoïdes et des anthocyanes, responsables de la couleur de nombreuses fleurs chez les Angiospermes (Tropf et al., 1994), alors que les STS sont associées à quelques espèces végétales uniquement, qui ont acquis au cours de l'évolution la capacité à synthétiser les stilbènes.

La similarité de fonctionnement qui existe entre les CHS et les STS suggère une origine évolutive commune. Cette hypothèse est d'autant plus pertinente que les CHS sont des enzymes ubiquitaires distribuées dans tout le règne végétal, alors que les STS semblent être apparues de façon ponctuelle chez seulement certaines familles ou genres végétaux ; laissant supposer que les STS auraient évoluées directement à partir des CHS, et cela à plusieurs reprises au cours de l'évolution. Cette hypothèse a été à l'origine de plusieurs études, qui ont eu pour conclusions de valider cette théorie.

Tropf et al. (1994) ont réalisé une étude préliminaire très intéressante, qui a permis de valider cette hypothèse, par l'analyse des séquences de plusieurs CHS et STS provenant d'espèces différentes, couplée à des expériences de mutagenèse dirigée. L'analyse des séquences de plusieurs CHS et STS regroupées en arbre phylogénétique, a pu mettre en évidence que les STS, à l'inverse des CHS, ne se regroupent pas ensemble en cluster mais se répartissent avec les CHS de la même espèce. L'arbre phylogénétique obtenu avec les séquences protéiques de CHS et des STS de plusieurs espèces (*Arabidopsis*, *Populus*, *Vitis*, *Arachis*, *Sorghum*, *Psilotum* et deux espèces de *Pinus*) illustre bien cette distribution particulière (Parage et al., 2012) (Figure 8). Le fait que les STS ne forment pas de cluster à part entière suggère d'une part qu'il n'existe pas de STS ancestrale, mais aussi que les STS auraient évolué directement à partir des CHS plusieurs fois au cours de l'évolution chez différentes espèces végétales. Ces mêmes auteurs ont pu démontrer qu'un changement subtil de trois acides aminés dans la séquence protéique primaire suffit pour convertir une CHS en STS (les modifications d'acides aminés ont été effectuées sur la partie C-terminale d'une protéine chimère composée par 287 acides aminés de la STS d'*Arachis hipogea* en N-terminal, et 107 acides aminés de la CHS de *Sinapis alba* en C-terminal ; les acides aminés mutés ont été sélectionnés sur la base d'une séquence consensus de CHS). Cependant, dans cette étude, les modifications qui ont été apportées au niveau de la CHS ne sont pas forcément



Les CHS catalysent la formation de la chalcone, par condensation de 3 unités d'acétyl-CoA au niveau du *p*-coumaroyl-CoA, suivie d'une cyclisation de type Claisen du carbone 6 sur le carbone 1 (C6 → C1) (Figure 9). La chalcone est libérée grâce au clivage de la liaison thioester existante entre le C1 et la CHS. Les STS et les CHS partagent 75 à 95 % d'identité de séquence protéique sur environ 400 acides aminés, et diffèrent dans leur mécanismes de catalyse uniquement par la réaction de cyclisation du tétracétide intermédiaire, qui subit une condensation de type Claisen (C6 → C1) pour les CHS, et une condensation de type Aldol (C2 → C7) pour les STS (Austin et al., 2004). La différence entre ces deux types de condensations réside au niveau du C1 du tétracétide intermédiaire, qui dans le cas de la condensation de type Aldol (STS), nécessite une étape supplémentaire de clivage par hydrolyse de la liaison covalente entre le C1 du tétracétide intermédiaire et la cystéine 164 présente au niveau de la triade du site catalytique. Ce clivage est assuré par une étape d'hydrolyse « thioestérase-like » portée par l'enzyme, et est suivi d'une étape de décarboxylation qui permet de libérer le produit de la réaction enzymatique ainsi qu'une molécule de CO<sub>2</sub>. Plus particulièrement, le devenir de l'intermédiaire réactionnel dépend en fait de la conformation subtile de régions voisines du site actif de ces deux enzymes (Austin et al., 2004). Dans le cas de la formation de la chalcone via la condensation de type Claisen catalysée par les CHS, il n'y a pas d'étape de clivage du tétracétide au niveau du C1, et donc pas de décarboxylation nécessaire.

En 2004, les travaux de M. B. Austin ont permis de mieux comprendre ce phénomène de conversion, par l'obtention et l'analyse de la structure cristallographique de la STS de *Pinus sylvestris* (Austin et al., 2004). Les CHS et les STS partagent 75 à 90 % d'identité de séquence protéique sur environ 400 acides aminés, mais les comparaisons des STS entre elles et des STS avec les CHS n'ont pas pu définir de séquence consensus typique de l'activité stilbène synthase. De plus, l'analyse des structures tridimensionnelles des STS et des CHS n'a pas révélé de différences chimiques ou topologiques au niveau de leur site actif. Ces constats laissent supposer que l'activité CHS ou STS serait plutôt déterminée par un remodelage stérique au niveau du site actif, mais cette hypothèse n'explique pas l'activité thioestérase des STS nécessaire au clivage du C1 du tétracétide intermédiaire. La superposition du squelette de la STS de *Pinus sylvestris* et de la CHS de *Medicago sativa* est quasiment parfaite, à l'exception de deux régions qui divergent significativement entre elles (régions A et B, Figure 10). La région A est localisée à l'interface entre les deux monomères de l'enzyme et sépare les deux sites actifs des deux monomères ; la région B est localisée au niveau du tunnel

d'accès au site actif, exposé au solvant, et par lequel l'ester-CoA pénètre dans le site actif (Figure 10)

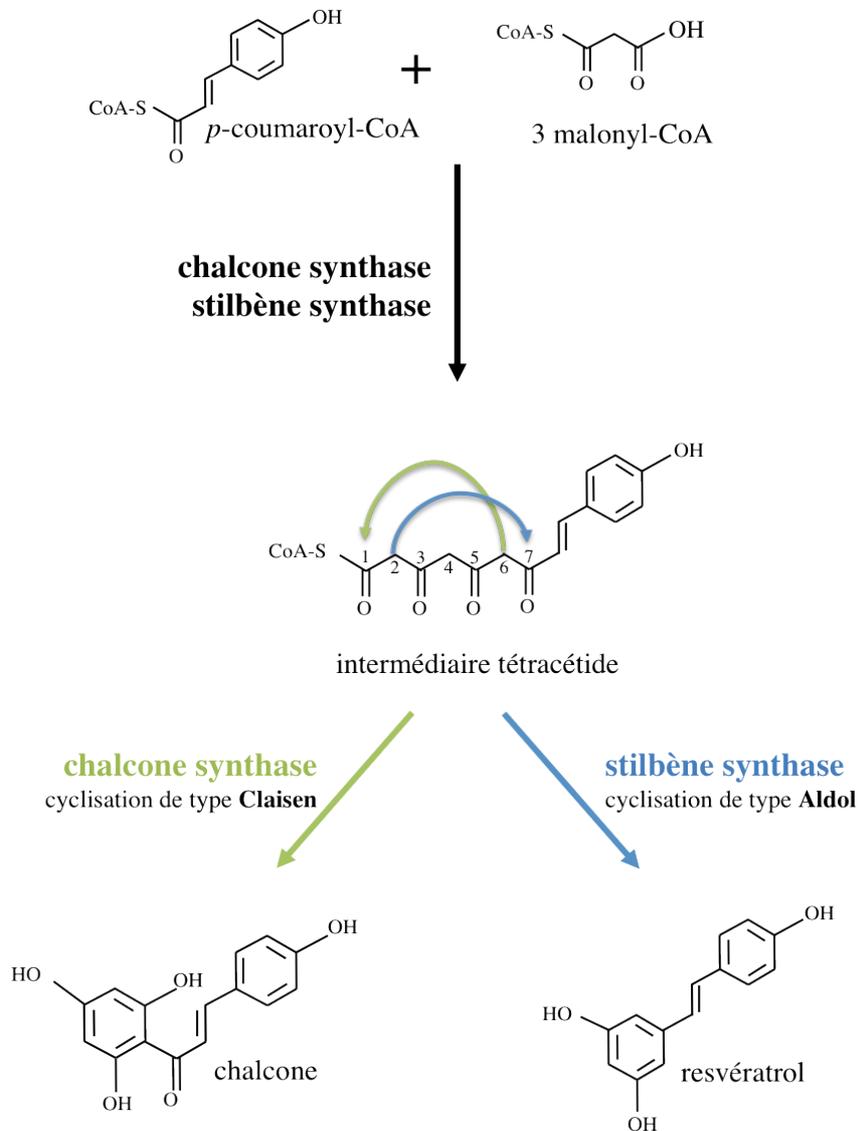


Figure 9 : Comparaison des mécanismes de condensation de type Claisen et de type Aldol, pour la formation de la chalcone et du resvératrol respectivement.

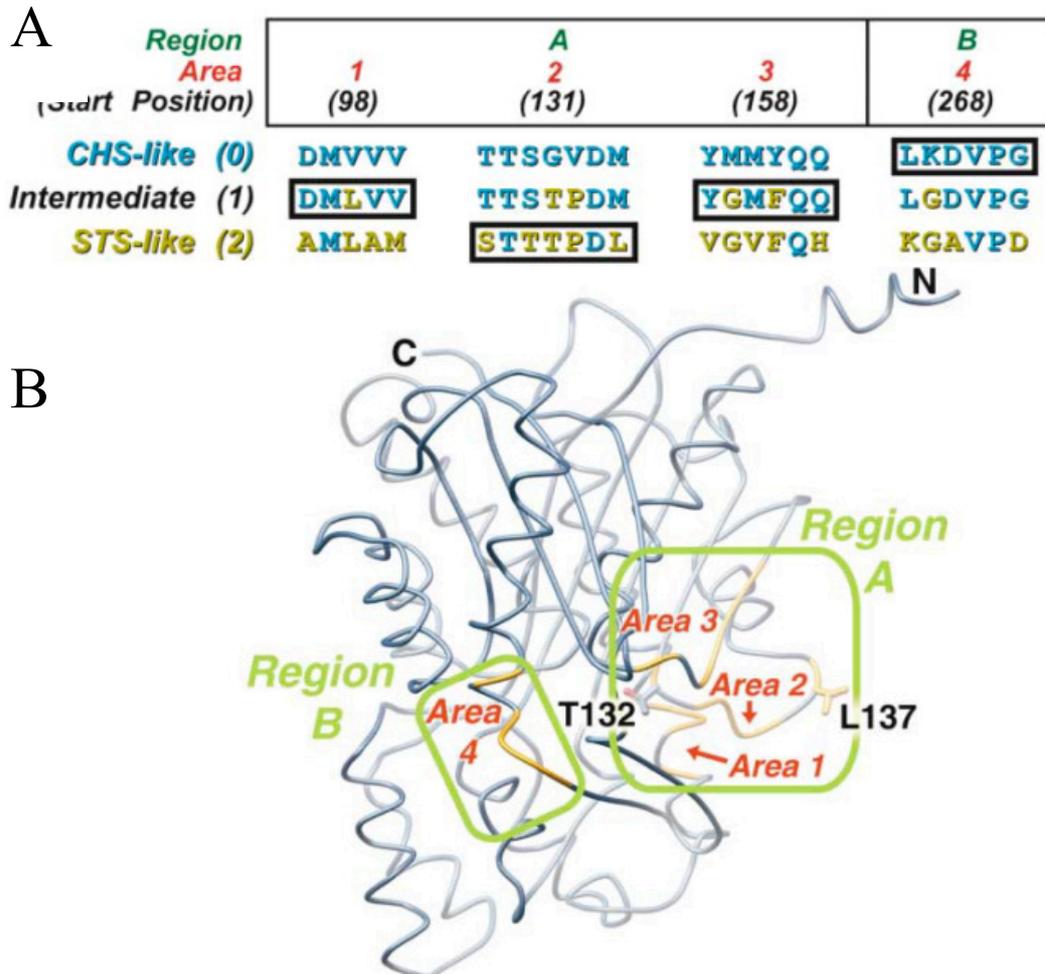


Figure 10 : Régions impliquées dans la spécificité du produit des CHS et STS  
(Austin et al., 2004).

(A) Alignement de séquences définissant les régions A et B des STS-like, CHS-like, et de l'intermédiaire hypothétique entre les deux types d'enzymes. La séquence de l'intermédiaire est basée sur les différences significatives existant entre les deux séquences protéiques sauvages des deux enzymes. Les résidus de type CHS (uniques ou partagés) sont indiqués en bleu, les résidus de type STS sont indiqués en or. Au niveau de la STS-like, les résidus de couleur or permettent de restituer une activité STS si ceux-ci sont mutés chez une CHS de *Medicago sativa* (B). Vue 3D d'un monomère d'une STS-like obtenue par mutagenèse dirigée d'une CHS de *Medicago sativa*, pour les 18 acides aminés de type STS-like (représentés en or). Les régions A et B ainsi que les aires correspondantes sont encadrées en vert.

Des expériences de mutagenèse dirigée sur ces deux régions ont permis de montrer que la région B n'est pas impliquée dans la spécificité de cyclisation des ester-CoA. Par contre, la région A, et plus particulièrement certains acides aminés de l'aire 2 permettent d'expliquer le passage entre une activité de type CHS et une activité de type STS. Ces acides aminés sont en fait à l'interface entre les deux sites actifs des deux monomères composants les CHS et les STS. L'aire 2 de la région A possède une boucle définie par la thréonine 133 de la CHS, qui restreint le volume de la cavité du site actif. En revanche, cet acide aminé est remplacé par une sérine chez la STS, ce qui a pour conséquence de décaler la boucle pour former ainsi un site actif plus profond (Figure 11).

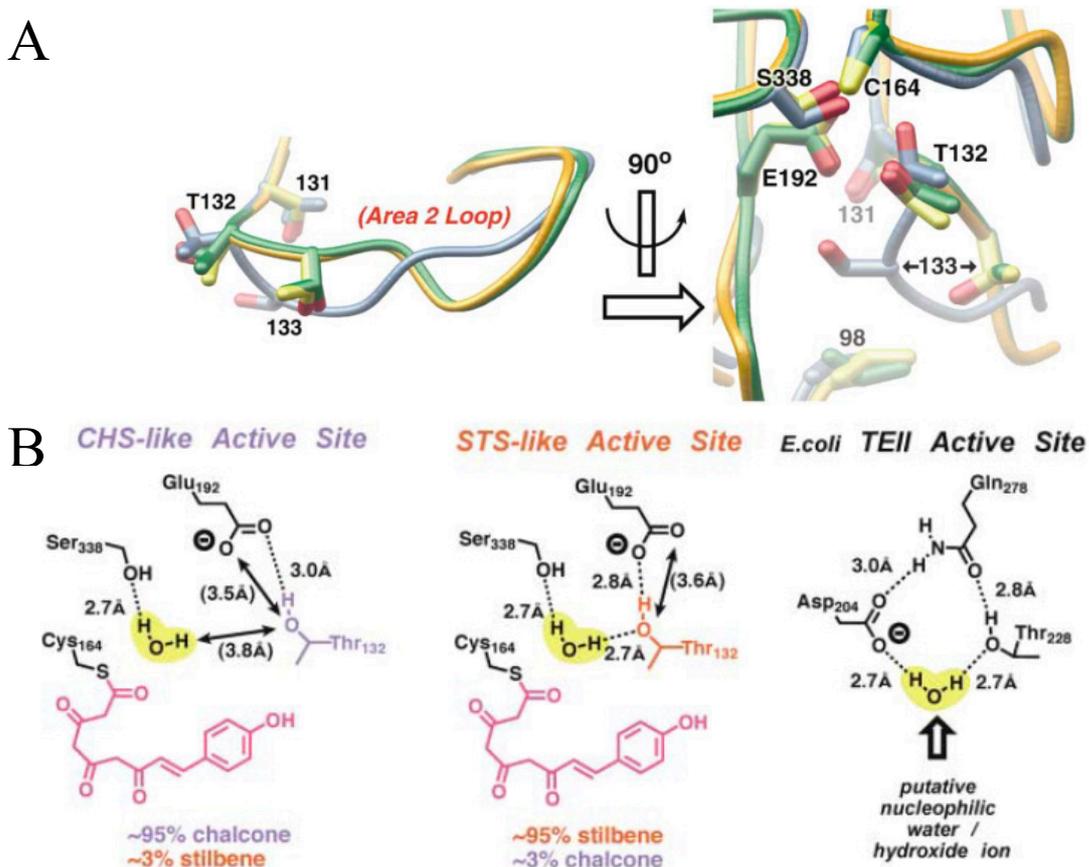


Figure 11 : Représentation structurale des acides aminés déterminants pour la cyclisation de type Aldol chez les STS.

(A) Détail de la boucle formée par l'acide aminé Thr133, chez la CHS sauvage (bleu), la STS sauvage (orange) et le mutant STS-like de la CHS (vert), muté pour 18 acides aminés type STS-like au niveau des régions A et B. (B) Détail des trois acides aminés (thréonine 132, sérine 336 et glutamine 192) stabilisant une molécule d'H<sub>2</sub>O, et permettant l'étape d'hydrolyse « thioestérase-like », capitale pour la condensation de type Aldol des STS.

La différence entre ces deux acides aminés en position 133 provoque un changement subtil au niveau de la thréonine 132 (identique pour les deux enzymes), qui permet, dans le cas de la STS, de créer des liaisons hydrogènes entre la thr132, la glu192 et la ser338 qui stabilise une molécule d'H<sub>2</sub>O également impliquée dans la formation des liaisons hydrogènes. Les liaisons hydrogènes entre ces trois acides aminés sont indispensables pour l'activité thioestérase de la STS, et cette conformation est également présente chez la thioestérase de type II d'*Escherichia coli* (*E. coli*). Cette triade d'acides aminés reliés par des liaisons hydrogènes permet le clivage de la liaison qui relie le C1 du tétracétide intermédiaire à la cystéine catalytique, dans la condensation de type Aldol (C2 → C7) assurée par les STS.

Ainsi, la différence entre les STS et les CHS ne résulte pas d'un changement au niveau de l'encombrement stérique du site actif, mais dans un changement subtil au niveau de l'environnement électronique.

## 4 Diversité des stilbènes

Les formes simples *trans*- et *cis*-stilbènes peuvent être méthylées, hydroxylées ou méthoxylées (Figure 12). Elles peuvent également être conjuguées avec des glucosides ou oligomérisées en structures plus ou moins complexes, amenant ainsi à une diversité importante de molécules (Shen et al., 2009).

Chez le genre *Pinus*, les stilbènes majoritaires sont la pinosylvine et la dihydropinosylvine, ainsi que leurs dérivés méthylés comme par exemple la pinosylvine monométhyléther (Schanz et al., 1992) (Tableau 1). Chez la vigne, les stilbènes sont principalement représentés par le resvératrol et sa forme glycosylée le picéide (Moreno-Labanda et al., 2004). On y trouve également du ptérostilbène, une forme méthylée du resvératrol (3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-trans-stilbene), identifiée pour la première fois chez le bois de santal (*Pterocarpus santalinus*) (Seshadri, 1972). La vigne est également riche en viniférines : dimères, trimères, tétramères et autres polymères plus complexes du resvératrol (Langcake and Pryce, 1977b).

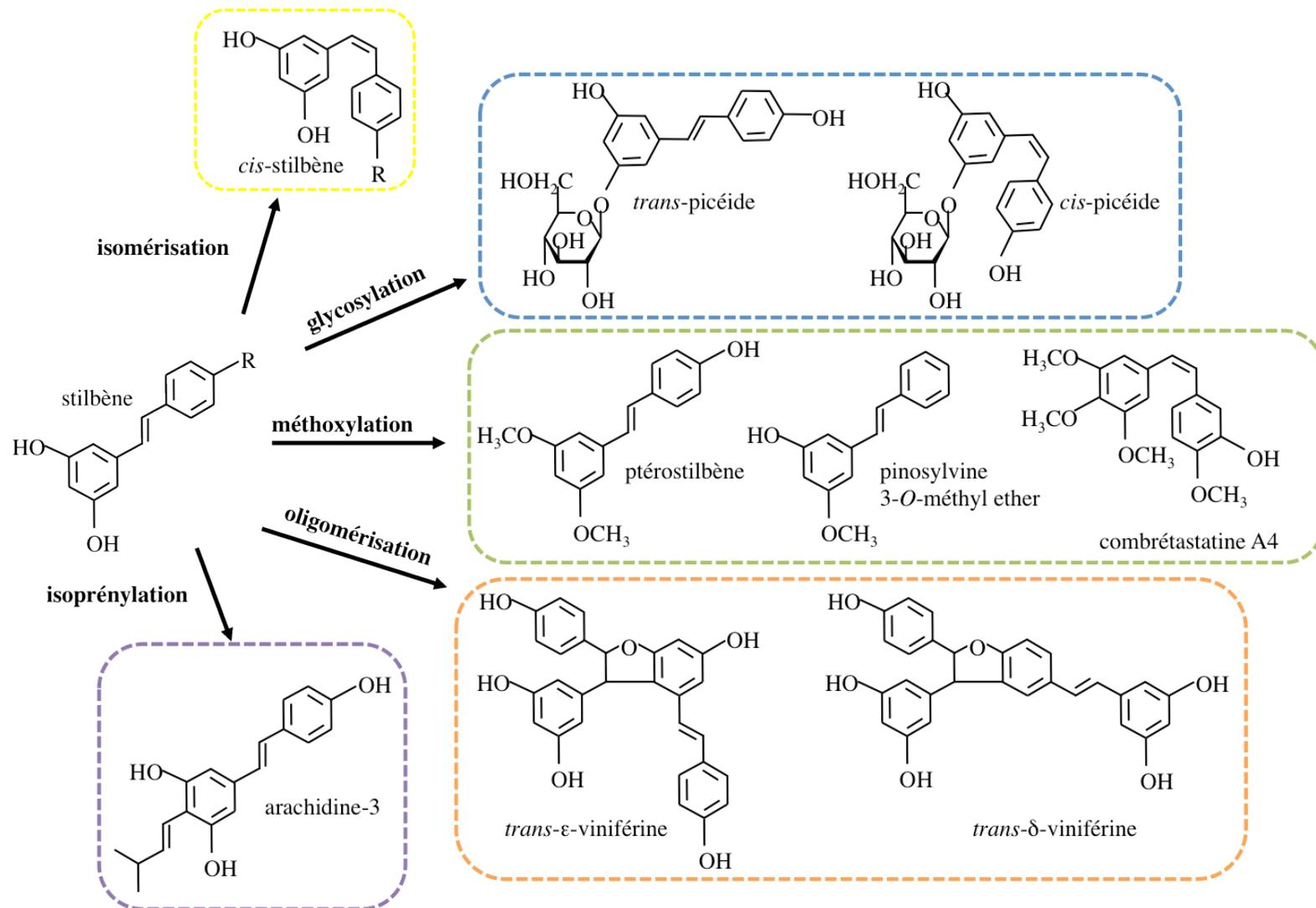


Figure 12 : Diversité des stilbènes (adapté de Chong et al., 2009).

La famille des Diptérocarpacées comprend les genres *Vateria*, *Hopea*, *Vatica* et *Shorea*, qui sont connus pour être riches en resvératrol et plus particulièrement en oligomères de resvératrol, de structures très variées et possédant des propriétés cytotoxiques, antibactériennes et antivirales (Ito et al., 2003).

Tableau 1 : Quelques exemples de stilbènes simples synthétisés par différents genres végétaux

stilbène	genre	R3	R5	R3'	R4'
<i>trans</i> -resveratrol	<i>Vitis</i> , <i>Arachis</i> , <i>Fallopia</i>	OH	OH	H	OH
<i>trans</i> -picéide	<i>Vitis</i>	OGlu	OH	H	OH
pinosylvine	<i>Pinus</i> ,	OH	OH	H	
picéatannol	<i>Picea</i>	OH	OH	OH	OH
pinosylvine monométhylether	<i>Pinus</i> , <i>Alnus</i>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OH
<i>trans</i> -ptérostilbene	<i>Vitis</i> , <i>Vaccinium</i>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OH
astringine	<i>Picea</i>	OGlu	OH	OH	OH
rhapontine	<i>Rheum</i>	OGlu	OH	OH	OCH <sub>3</sub>

## 4.1 Glycosylation

La glycosylation des métabolites secondaires est une modification très courante, ayant pour but de détoxifier, de réguler, de stocker ou encore de maintenir l'homéostasie de certains métabolites secondaires (Gachon et al., 2005). D'un point de vue biochimique, la glycosylation permet d'augmenter la stabilité des métabolites secondaires et par la protection des groupements réactifs, elle permet également d'augmenter la solubilité et de contrôler la compartimentation de certains métabolites secondaires toxiques dans la vacuole ou l'apoplasme (Gachon et al., 2005). La glycosylation des métabolites secondaires est réalisée par des glycosyltransférases (GT). Ces enzymes ne sont généralement pas considérées comme très spécifiques, puisqu'un seul gène peut produire une enzyme capable de glycosyler plusieurs substrats d'origines très différentes (Bowles et al., 2005). Chez *Vitis labrusca*, une GT localisée au niveau du mésocarpe des baies de raisin a été identifiée et permet de glycosyler *in vitro* les

stilbènes, les flavonoïdes, les coumarines, ainsi que d'autres esters d'acides hydroxycinnamiques ou hydroxybenzoïques (Hall and De Luca, 2007).

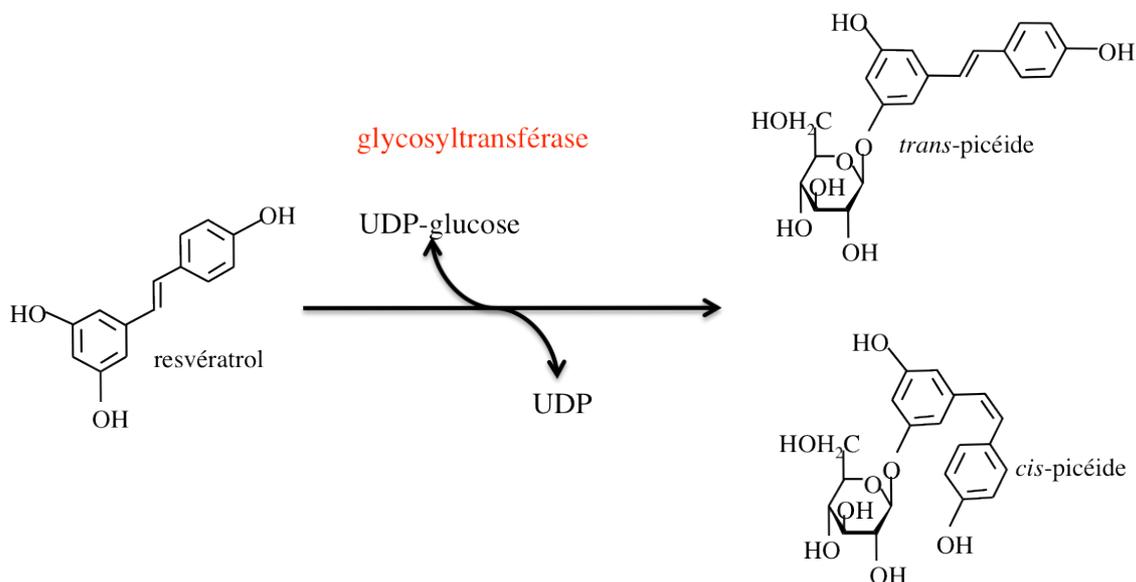


Figure 13 : Glycosylation du resvératrol par une glycosyltransférase. UDP-glucose, uridine-diphosphate-glucose; UDP, uridine diphosphate.

La glycosylation du resvératrol (Figure 13) peut empêcher son oxydation ou sa dégradation enzymatique, et permet aussi de protéger la plante d'effets toxiques potentiels (Hipskind and Paiva, 2000). La production de stilbènes dans des plantes transgéniques n'en produisant pas naturellement provoque en général l'accumulation de formes glycosylées (picéides), issues de l'action de glycosyltransférases endogènes non spécifiques (Chong et al., 2009).

## 4.2 Méthoxylation

La méthylation des stilbènes et d'un grand nombre de métabolites secondaires est réalisée par des O-méthyltransférases (OMT) S-adénosyl méthionine (SAM)-dépendantes de type I. Ces OMT catalysent la méthylation de groupements hydroxyles (-OH) d'un grand nombre de métabolites secondaires issus, en particulier, de la voie des phénylpropanoïdes, tels que les chalcones, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les ptérocarpans, ou les stilbènes (Noel et al., 2003).

La méthylation des métabolites secondaires peut affecter leur solubilité (augmentation de la liposolubilité) ou leur volatilité, modifier leur compartimentation, inactiver des groupements hydroxyles réactifs (Chiron, Drouet, Claudot, et al., 2000). Elle peut aussi permettre d'augmenter les propriétés antimicrobiennes de certains composés ; par exemple la méthylation du resvératrol par la resvératrol O-méthyltransférase (ROMT, Schmidlin et al., 2007) forme le ptérostilbène (3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-*trans*-stilbène), un composé dix fois plus toxique *in vitro* que son précurseur le resvératrol (Pezet, Gindro, Viret, and Richter, 2004) (Figure 14). La méthylation des stilbènes sera abordée plus en détail dans le chapitre II consacré à la caractérisation de la famille des resvératrol O-méthyltransférases de la vigne.

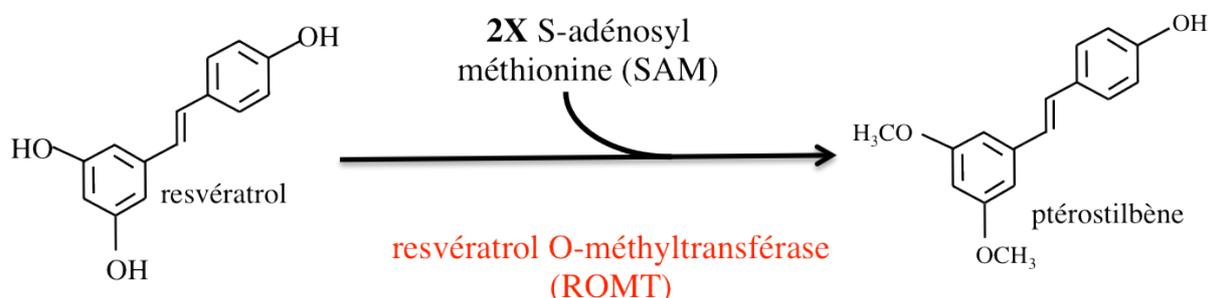


Figure 14: Méthoxylation du resvératrol par la resvératrol O-méthyltransférase.

### 4.3 Oligomérisation

Chez la vigne, la dimérisation du resvératrol permet la formation d'oligomères : les viniférines (Figure 15). Deux viniférines sont bien caractérisées : la  $\epsilon$ -viniférine (un dimère du resvératrol) et la  $\alpha$ -viniférine (trimère cyclique de resvératrol) (Jeandet et al., 2002). Chez la vigne, les viniférines sont connues pour leurs propriétés antifongiques, et leur accumulation est corrélée avec certains niveaux de résistance contre *P. viticola* (Pezet, Gindro, Viret, and Spring, 2004).

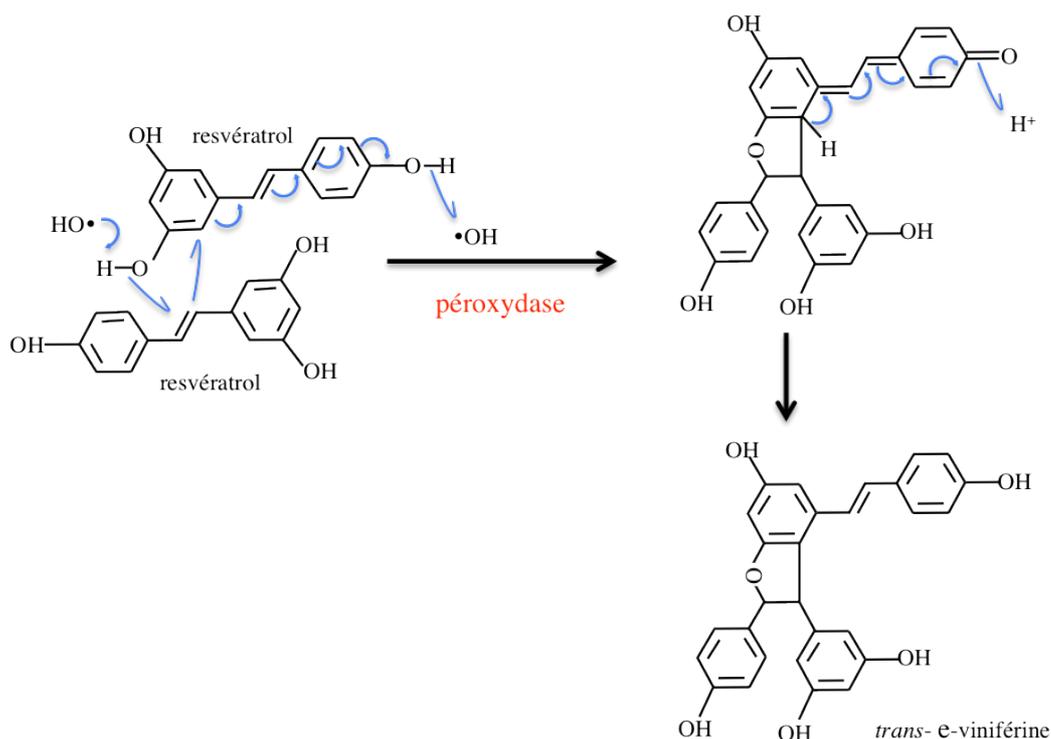


Figure 15: Oligomérisation (dimérisation) du resvératrol en *trans-ε*-viniférine, sous l'action d'une peroxydase.

Des enzymes potentiellement impliquées dans la formation des viniférines sont présentes à la fois chez les plantes, et chez certains pathogènes (Mattivi et al., 2011). La dimérisation du resvératrol a été obtenue *in vitro* grâce à une peroxydase de raifort (*Armoracia rusticana*) en présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Langcake and Pryce, 1977a; Calderón AA, Pedreño MA, Ros-Barceló A, 1990). Par ailleurs, une laccase de *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) est capable de dimériser le resvératrol et le ptérostilbène de la même manière que les peroxydases végétales, créant ainsi des oligomères insolubles *a priori* moins toxiques pour ce champignon (Breuil et al., 1999; Jeandet et al., 2007). L'oxydation du resvératrol chez *V. vinifera* cv. Gammay est contrôlée par trois isopéroxydases localisées au niveau de la paroi cellulaire et des espaces pariétaux (apoplasme) (isopéroxydases A<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>) ou au niveau de la vacuole (isopéroxydase B<sub>5</sub>) des baies ; la présence de ces enzymes semble liée au niveau de résistance constitutif et induit contre *P. viticola* (Calderón et al., 1992; Calderón AA, Pedreño MA, Ros-Barceló A, 1990; Morales et al., 1997; Morales and Barcel, 1997). D'autres viniférines possédant un plus haut degré de polymérisation ont pu être mises en évidence, mais leur caractérisation reste encore difficile à ce jour, compte tenu de la complexité de leurs structures. Cependant, les progrès techniques analytiques conduisent à l'identification continue de nouveaux stilbènes, même chez la vigne, où ils sont pourtant connus depuis

longtemps. Plusieurs viniférines ont été identifiées par HPLC-DAD-MS au niveau des feuilles d'une variété de vigne résistante au mildiou (génotype issu d'un croisement *Vitis vinifera* cv. Merzling x *Vitis vinifera* cv. Teroldego), 6 jours après infection par *P. viticola*. Ces feuilles accumulent au moins 14 viniférines différentes, dont 7 dimères, 4 trimères et 4 tétramères (Mattivi et al., 2011), pour un total de 28,5 mg de viniférines par kilogramme de matière fraîche. Trois de ces oligomères sont représentés Figure 16.

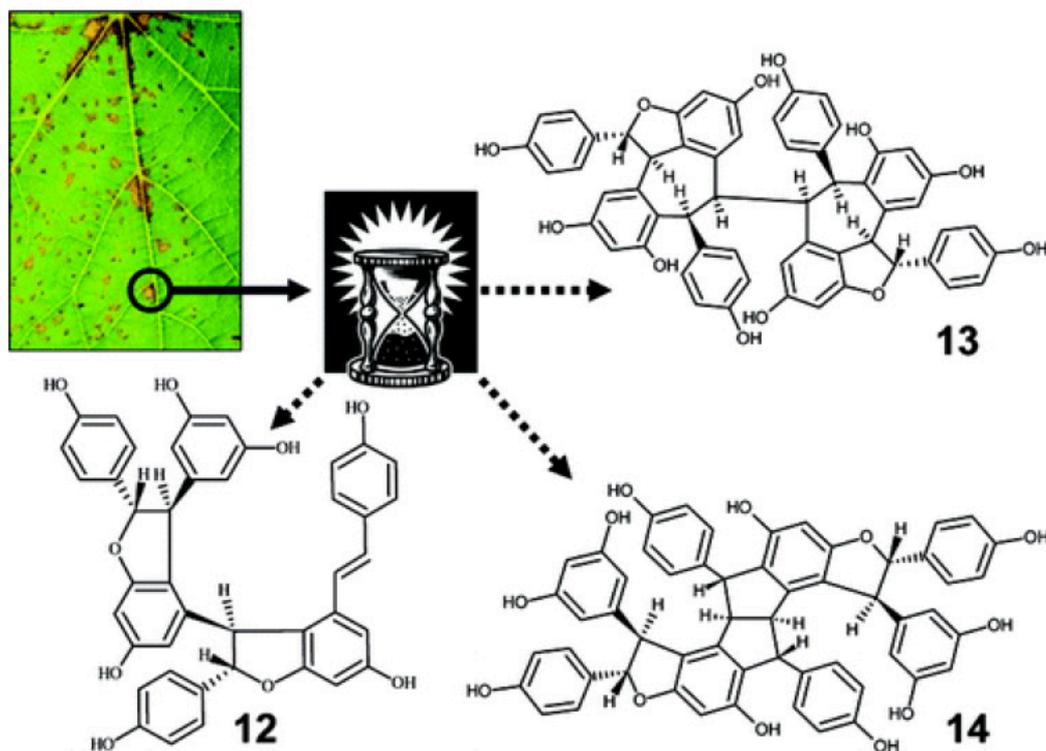


Figure 16 : Structures de trois viniférines présentes dans les feuilles de vigne (*Vitis vinifera* cv. Merzling x *Vitis vinifera* cv. Teroldego) 6 jours post-infection par *P. viticola*, d'après Mattivi et al. 2011.

Structure du trimère E-miyabénol C (12), et de deux tétramères : l'isohopéphénol (13) et l'ampélopsine H (14).

#### 4.4 Autres modifications des stilbènes

Plusieurs dérivés de stilbènes prénylés ont été mis en évidence chez différentes familles végétales. Par exemple, des formes prénylées de stilbènes (chiricanines) fongitoxiques ont été mises en évidence dans l'écorce des racines de *Lonchocarpus chiricanus*, un arbre appartenant à la famille des légumineuses trouvé exclusivement au Panama, et connu pour ses propriétés

insecticides (Ioset et al., 2001). D'autres dérivés prénylés du resvératrol (mucilage A, 4-(3-methyl-but-1-enyl)-3, 5-dimethoxy-4'-hydroxytrans-stilbene) ont été caractérisés au niveau du mucilage qui entoure les jeunes racines d'arachide (Sobolev et al., 2006). Enfin, de façon originale, des tétrahydroxystilbènes prénylés aux propriétés antioxydantes ont été identifiés dans du propolis provenant du sud de l'Australie (Abu-Mellal et al., 2012).

## 5 Régulation de la synthèse des stilbènes

### 5.1 Synthèse constitutive

Les stilbènes s'accumulent de façon constitutive dans le bois et l'écorce de certaines plantes ligneuses et en moindre quantité dans les tissus verts, le plus souvent conjugués à des glucosides ou à des groupements méthyles (Hart, 1981). Chez plusieurs genres ligneux tels que *Pinus*, *Eucalyptus* ou *Maclura*, le bois de cœur peut contenir des concentrations en stilbènes allant de 1 à 30 mg/g de matière sèche. Chez *Pinus*, la pinosylvine, la dihydroxypinosylvine ainsi que la forme méthylée de la pinosylvine : le 3-hydroxy-5-méthoxystilbène sont naturellement présents dans le bois de cœur, pouvant aller à des concentrations comprises entre 1 et 40 mg/g de matière sèche (Hart and Shrimpton, 1979).

*Fallopia japonica* (Renouée du Japon) est aussi une plante qui synthétise des stilbènes de façon constitutive, les concentrations en stilbènes au niveau des racines pouvant aller jusqu'à 16 mg/g de matière sèche pour le picéide et 1,8 mg/g de matière sèche pour le resvératrol (Benová et al., 2008). Chez la vigne, les formes *trans* et *cis*-picéide s'accumulent naturellement dans les baies de raisin (Gatto et al., 2008). Le resvératrol est naturellement présent dans les parties ligneuses ou les racines de vigne ; la teneur en resvératrol pouvant atteindre des concentrations de 700 µg/g de matière fraîche au niveau des tiges ligneuses (Langcake and Pryce, 1976) ; les racines étant généralement riches en viniférines. On retrouve également les formes *cis* et *trans*-resvératrol au niveau de l'exocarpe (pellicule) des baies de raisin, mais elles sont totalement absentes du péricarpe (pulpe) (Chong et al., 2009).

De par leur présence constitutive, les stilbènes sont souvent considérés comme étant des phytoanticipines, un terme donné aux composés de défense naturellement synthétisés et accumulés dans les plantes. En dehors de leur présence constitutive dans les parties ligneuses ou les racines d'un certain nombre de plantes, les stilbènes sont également connus en tant que

composés de défense, inductibles suite à un stress. Les stilbènes sont généralement considérés comme étant des phytoalexines.

## 5.2 Induction de la synthèse des stilbènes en réponse à différents stress

Les premières mises en évidence d'induction de la synthèse de stilbènes en réponse à des stress biotiques ou abiotiques ont été mises en évidence chez *Vitis*, *Arachis* et *Pinus*. Chez *Pinus*, les stilbènes sont synthétisés suite à un stress biotique (champignons phytopathogènes : *Fomes annosu*, *Euophium clavigerum*) ou abiotique (dessiccation, forte humidité, rayonnements UV, stress mécanique) (Hart, 1981). Par exemple, l'induction de la synthèse de stilbènes est provoquée par des traitements UV sur de jeunes plantules de *Pinus sylvestris* (Schöppner and Kindl, 1984). Ces derniers auteurs ont également mis en évidence la présence de stilbènes constitutifs dans les graines de *P. sylvestris*, la pinosylvine étant la phytoalexine majoritaire (Schöppner and Kindl, 1984; Dercks and Creasy, 1989). D'autres études ont montré une induction de la synthèse de stilbènes au niveau de jeunes aiguilles de *Pinus sylvestris* après une exposition de 4h à 0,2 µL d'ozone/l (Rosemann et al., 1991), ou bien au niveau des cellules du phloème suite à une infection par un champignon phytopathogène (Lieutier et al., 1996). Chez l'arachide (*Arachis hypogea*), la synthèse de stilbènes a été mise en évidence suite à une infection par un champignon phytopathogène (*Helminthosporium carbonum*) (Keen and Ingham, 1976; Ingham, 1976). Chez la vigne différents agents pathogènes induisent la synthèse de stilbènes: le champignon responsable de la pourriture grise : *B. cinerea* (Langcake and Mc Carthy, 1979), l'agent du mildiou : *P. viticola* (Langcake and Pryce, 1976; Adrian et al., 1997), et l'agent de l'oïdium: *Erysiphe necator* (Schnee et al., 2008; Fung et al., 2008). Certains stress abiotiques sont également capables d'induire la synthèse de stilbènes : le stress engendré par un rayonnement ultraviolet (Langcake and Pryce, 1977c, 1976), les ions aluminiums (Adrian et al., 1996), par exemple. Enfin, différentes phytohormones telles que l'éthylène ou le méthyl jasmonate sont de puissants inducteurs de la synthèse des stilbènes (Belhadj et al., 2006; Assia et al., 2008).

L'induction de la production de stilbènes est généralement corrélée avec une augmentation de la transcription des gènes impliqués. La biosynthèse de stilbènes est corrélée avec l'expression de la *PAL* et de la *STS* et dépend de voies de biosynthèse générales de

réponse au stress qui ne sont pas spécifiques des plantes productrices de stilbène (Chong et al., 2009; Hain et al., 1993).

Néanmoins, aucun facteur de transcription spécifique régulant les gènes de la voie de biosynthèse des stilbènes n'a pour le moment été identifié (Chong et al., 2009). L'induction des *STS* chez la vigne se fait en deux temps : une induction des *STS* rapide suite à un stress, et une induction plus tardive. L'induction en deux temps des *STS* a été observée chez *V. vinifera* cv. Pinot noir et Chardonnay après un traitement aux UV, et la synthèse de resvératrol est corrélée avec le niveau de transcrits des *STS* (Borie et al. 2004).

## 6 Rôle des stilbènes dans les mécanismes de défense

### 6.1 Mise en évidence de la toxicité *in planta*

De nombreuses études ont mis en évidence les propriétés toxiques des stilbènes vis à vis de différents agents phytopathogènes ou de ravageurs. A ce titre, les stilbènes synthétisés de façon constitutive sont considérés comme des agents importants des défenses passives. (Chong et al., 2009). Différents effets sont rapportés dans la littérature :

- Chez les conifères, l'accumulation de pinosylvine et de sa forme méthylée au niveau du bois de cœur pourrait prévenir la dégradation par les micro-organismes. Chez certaines espèces de pins, des stilbènes nématocides sont présents dans l'écorce et le bois de cœur. (Lieutier et al., 1996; Suga et al., 1993)
- Effet dissuasif sur les herbivores : *Alnus crusp*a accumule par exemple de la pinosylvine 3-O-méthyl éther au niveau des bourgeons foliaires et des chatons, ce qui semble avoir un effet dissuasif sur le lièvre d'Amérique. (Bryant et al., 1983)
- Effet insecticide, rapporté pour les stilbènes extraits de l'écorce de *Yucca periculosa*. Ces stilbènes inhibent la croissance et le développement des insectes ravageurs. (Torres et al., 2003)
- Propriétés anti-fongiques et anti-bactériennes. Chez la vigne, les formes *cis*- et *trans*- du resvératrol s'accumulent dans la peau (exocarpe) des baies en cours de maturation (Jeandet et al., 1991; Versari et al., 2001), et ils sont supposés former une barrière constitutive naturelle contre les nombreux champignons et bactéries phytopathogènes qui se développent préférentiellement à ce stade de développement des baies (Gatto et al., 2008).

La production de stilbènes est l'une des réponses majeures de la vigne suite à une infection par un champignon phytopathogène (Langcake and Pryce, 1977a; Langcake, 1981; Pezet and Pont, 1990, 1995; Hammerschmidt, 2004). Les stilbènes s'accumulent à de fortes concentrations au niveau des sites d'infection de feuilles de vigne résistantes (*Vitis vinifera* cv. Solaris) infectées par *P. viticola*, en comparaison avec un cultivar sensible (*V. vinifera* cv. Chasselas) (Pezet, Gindro, Viret, and Spring, 2004). Chez *V. vinifera* cv. Solaris, *P. viticola* ne se développe pas, suggérant que les stilbènes sont toxiques pour la croissance du mycélium. Les variétés de vignes sensibles et résistantes se différencient essentiellement par la nature des stilbènes produits. En effet, chez la variété sensible Chasselas infectée par le mildiou, une grande quantité de picéide relativement peu toxique est synthétisée ; alors que chez la variété résistance Solaris, le resvératrol est convertit en  $\epsilon$ - et  $\delta$ -viniférines très fongitoxiques.

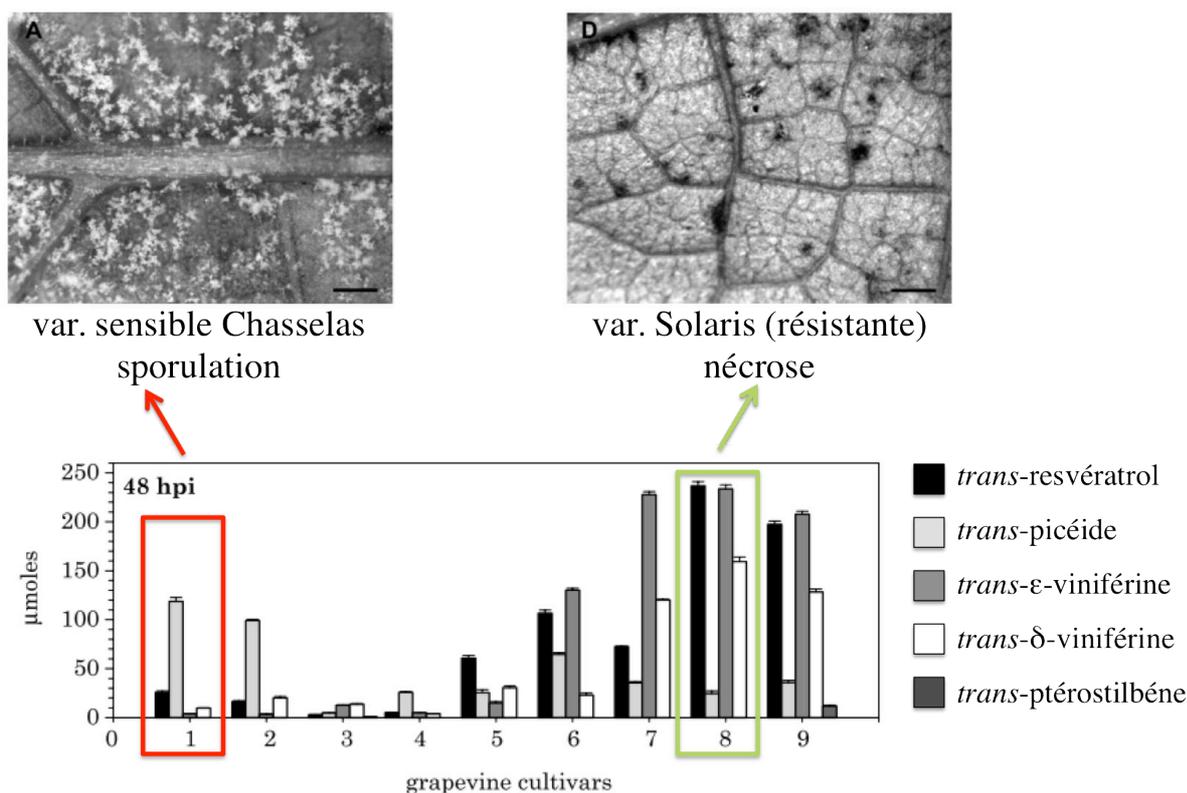


Figure 17 : Dosage des stilbènes 48 h post-infection par *P. viticola* chez différentes variétés de vigne sensibles, partiellement résistantes, et résistantes (figure adaptée de Pezet et al. 2004).

Variétés sensibles : 1, Chasselas ; 2, Gammay ; 3, Gamaret ; 4, Pinot noir ; 5, Seyval blanc ; variété partiellement résistante : 6, Johaniter (faible sporulation) ; variétés résistantes : 7, Bronner ; 8, Solaris.

Des résultats similaires ont été obtenus avec *E. necator* (Schnee et al., 2008). D'autres études ont pu mettre en évidence une corrélation positive entre la présence de resvératrol et de  $\epsilon$ -viniférines au niveau des feuilles de certains génotypes de vigne (incluant les espèces résistantes *V. rupestris* et *V. cinerea*), et la résistance contre *B. cinerea*, les concentrations en stilbènes excédant les concentrations nécessaires à l'inhibition de la croissance du champignon *in vitro* (Douillet-Breuil et al., 1999). Une étude récente en imagerie par spectrométrie de masse a comparé la localisation de la synthèse de stilbènes (resvératrol et ptérostilbène) au niveau de feuilles inoculées par le mildiou ou suite à une irradiation aux rayons UV (Hamm et al., 2010). Ces travaux ont permis de montrer que la localisation des stilbènes variait en fonction du stress appliqué au niveau des feuilles : après inoculation du mildiou (*P. viticola*), les stilbènes s'accumulent spécifiquement au niveau du mycélium et plus particulièrement au niveau des stomates, qui sont les points d'entrée du mycélium vers le mésophylle et au niveau desquels se développent les sporangiophores. Suite à un stress par irradiation aux rayons UV, les stilbènes sont synthétisés de façon homogène sur toute la surface de la feuille. Une autre étude réalisée en microscopie confocale (Bellow et al., 2012) sur des feuilles de vigne sensibles et partiellement résistantes, a permis de montrer une corrélation entre la présence de l'allèle de résistance *Rpv1* et l'accumulation des stilbènes au niveau du mésophylle, où se développe le mycélium du mildiou. Les plantes sensibles ne possédant pas l'allèle de résistance *Rpv1* montrent une synthèse de stilbènes au niveau de l'épiderme seulement. La résistance des feuilles pourrait être liée au profil de localisation des stilbènes dans les tissus foliaires.

## **6.2 Mécanismes d'action des stilbènes et toxicité *in vitro***

### **6.2.1 Toxicité des stilbènes *in vitro* sur les champignons phytopathogènes**

Les effets des stilbènes sur les cellules fongiques sont décrits dans une revue de Pezet et Pont (1995). Les stilbènes affectent la respiration des conidies en inhibant l'entrée de l'oxygène probablement par détérioration des membranes cellulaires. Cette inhibition peut être plus ou moins forte, selon la nature du stilbène utilisé, le ptérostilbène ayant l'effet le plus marqué à ce niveau. La structure chimique des stilbènes permet la libre circulation des électrons au sein de la molécule. Cette particularité chimique permettrait la formation de complexes stilbènes-

protéines qui seraient à l'origine de l'inhibition de la respiration au niveau des conidies (Hart, 1981). Les stilbènes affectent également la structure des membranes cellulaires et des organelles. Aussi, après application de ptérostilbène ( $5 \cdot 10^{-4}$  M) sur des conidies de *B. cinerea*, la dégradation des membranes cellulaires est très rapide : elle débute par la désorganisation des membranes mitochondriales et nucléaires, suivie de la désorganisation du réticulum endoplasmique, la disparition des ribosomes, pour enfin se terminer par la dissolution totale des organelles et de la membrane cellulaire. Il est fréquent de retrouver des corps lipidiques au niveau des cellules fongiques en voie de dégradation ; particulièrement à proximité des mitochondries et de la membrane nucléaire ; ces corps sont en fait formés de phospholipides provenant des membranes cellulaires désorganisées. La germination des conidies est également inhibée au contact des stilbènes, cet effet pouvant être partiel ou total en fonction des stilbènes testés. Dans le cas d'une inhibition totale de la germination obtenue avec de faibles concentrations en ptérostilbène, les organelles ainsi que les membranes cellulaires sont totalement détruites en moins de 30 minutes (Pezet and Pont, 1990). D'autres études *in vitro* ont montré que le ptérostilbène, même à de faibles concentrations, associé avec l'acide glycolique (un acide organique présent à de fortes concentrations dans les baies de raisin immatures), permettait d'inhiber la germination des conidies ainsi que la croissance du tube germinatif de *Botrytis cinerea*, (Pezet and Pont, 1988a). Ces deux auteurs considèrent le ptérostilbène comme étant généralement le stilbène le plus toxique contre les champignons phytopathogènes. Cependant, sa concentration dans des feuilles de vigne ou des baies infectées est en général très faible, si bien que son rôle réel dans les mécanismes de défense est difficile à démontrer.

Une étude plus récente a permis de montrer l'effet de différents stilbènes sur la mobilité des zoospores et le développement de *P. viticola in vitro*, (Pezet, Gindro, Viret, and Richter, 2004); les résultats de cette étude sont représentés sur la Figure 18. La toxicité des stilbènes semble varier selon deux paramètres principaux : la capacité du stilbène à traverser les membranes cellulaires et la capacité à attirer les électrons. Plus ces deux paramètres sont importants, plus le stilbène est toxique. La toxicité des stilbènes au niveau des conidies de *B. cinerea* est positivement corrélée avec la force des groupements attracteurs qui les composent, et donc la valeur sigma des stilbènes. La liposolubilité est également un facteur directement lié à la toxicité des stilbènes. Par exemple, le resvératrol est une molécule relativement hydrophile, qui pénètre difficilement à l'intérieur des membranes cellulaires. Cette caractéristique pourrait expliquer la faible capacité du resvératrol à inhiber la germination de conidies de *B. cinerea*. En

revanche, les groupements  $-OCH_3$  présents sur le ptérostilbène favoriseraient le contact avec les protéines membranaires, ce qui pourrait expliquer sa forte toxicité.

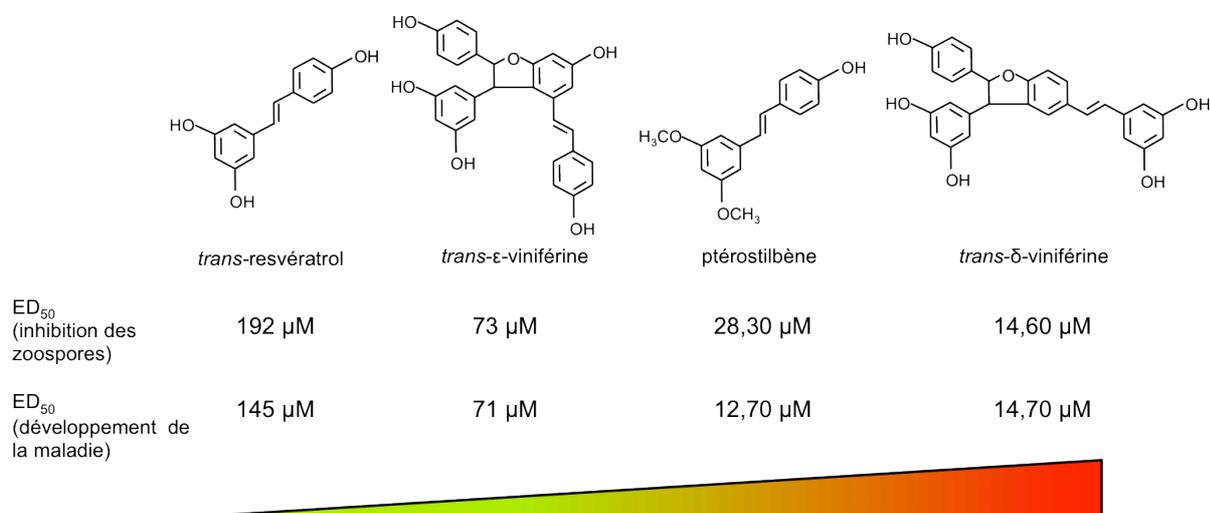


Figure 18 : Toxicité des stilbènes sur *P. viticola* (adapté de Pezet, Gindro, Viret, and Richter, 2004).

Concentrations effectives (ED<sub>50</sub>) en stilbènes requises pour une inhibition de 50 % de la mobilité des zoospores de *P. viticola*, ou une inhibition de 50 % de l'expression de la maladie (présence de sporangiophores après inoculation de feuilles de *V. vinifera* cv. Chasselas avec des zoospores de *P. viticola*).

Toutes ces observations, de l'induction de la synthèse des stilbènes par des organismes phytopathogènes, à la toxicité *in vitro* démontrée des stilbènes, ont permis d'émettre l'hypothèse que la présence de stilbènes *in planta* pourrait être directement corrélée avec le niveau de résistance des plantes, et jouer ainsi un rôle crucial dans les mécanismes de défense des plantes. En effet, des résultats récents suggèrent que les stilbènes pourraient jouer un rôle dans le déclenchement de la réaction hypersensible. Chang et al., (2011) ont montré une rapide accumulation de resvératrol et de δ-viniférines toxiques dans des lignées cellulaires de *Vitis rupestris*, une variété de vigne résistante, qui serait à l'origine de l'initiation de la réponse hypersensible induisant la mort cellulaire. Cette accumulation de resvératrol et de δ-viniférines, ainsi que la réponse hypersensible, ne sont pas observées dans les lignées cellulaires de Pinot noir, une variété sensible. Le resvératrol induit une cascade de réactions amenant à la mort cellulaire, incluant une alcalinisation rapide, l'accumulation de transcrits codant pour des protéines PR (pathogenesis-related protein), le burst oxydatif (formation des ROS : reactive

oxygen species), et la désorganisation des microtubules et l'agrégation des filaments d'actine (Chang et al., 2011). En plus d'agir comme une phytoalexine, le resvératrol pourrait donc être considéré comme une molécule signal, qui induirait l'initiation de la mort cellulaire relative à la réaction d'hypersensibilité.

### 6.2.2 Toxicité des stilbènes sur les végétaux

Les stilbènes peuvent moduler le développement des plantes environnantes en stimulant ou en inhibant l'élongation des racines et des parties végétatives selon les espèces végétales (Chong et al., 2009). Le picéatannol inhibe la photosynthèse (Gorham and Coughlan, 1980), et cela a été observé chez *Scirpus maritimus* (famille des Cypéracées) qui produit du picéatannol inhibant la croissance et la photosynthèse des plantes environnantes. Les stilbénoides de *Carex distachya* affectent aussi la croissance des plantes herbacées environnantes (Chong et al., 2009). D'un point de vue évolutif, les stilbènes ont probablement été exclus des tissus photosynthétiques à cause de leurs effets néfastes sur la photosynthèse (Hart, 1981).

## 6.3 Ingénierie de la biosynthèse des stilbènes

### 6.3.1 Obtention de plantes transgéniques accumulant des stilbènes

La biosynthèse des stilbènes se prête particulièrement bien à des approches de transgénèse végétale, car les précurseurs des stilbènes sont présents chez toutes les plantes. Théoriquement, il suffit donc d'exprimer une stilbène synthase chez une plante quelconque pour lui conférer la capacité de produire des stilbènes. Des stratégies de transgénèse ont ainsi permis d'évaluer la toxicité des stilbènes, vis à vis de certains agents pathogènes. En 1993, un fragment d'ADN génomique contenant deux gènes STS (*Vst1* et *Vst2*) a été cloné à partir de *V.vinifera* (cv. Optima) puis utilisé pour transformer *Nicotiana tabacum*. Les plantes transgéniques exprimant *Vst1* et *Vst2* sous le contrôle de leur propre promoteur montrent une réduction des symptômes de plus de 50 % suite à l'infection par *Botrytis cinerea* (Hain et al., 1993; Fischer and Hain, 1994) (Figure 19). Ceci constitue le premier exemple de l'augmentation de la résistance d'une plante vis à vis de bio-agresseurs grâce à la biosynthèse d'une phytoalexine provenant d'une autre plante.

Des études plus récentes ont permis la création de porte-greffes 41B transgéniques (issus d'un croisement *V. vinifera* cv. Chasselas X *Vitis berlandieri*) surexprimant une STS sous contrôle d'un promoteur inductible par les champignons phytopathogènes ; ces plantes transgéniques, qui accumulent localement jusqu'à 100 fois plus de resvératrol qu'une plante témoin, montrent une nette réduction des symptômes observés normalement après une infection par *Botrytis cinerea* (Coutos-Thévenot et al., 2001) (Figure 19). Les travaux de Hain et al. (1993) ont été initiateurs de beaucoup d'autres expériences de transgénèse végétale à l'aide du gène de vigne *Vst1* (*V. vinifera* var Optima), en vue de démontrer les effets bénéfiques des stilbènes contre des agents phytopathogènes, chez par exemple une légumineuse (luzerne), certaines céréales (blé, orge), certains fruits et légumes (tomate, kiwi, pomme, petit pois, papaye, houblon, laitue, banane) des arbres ligneux tels que le peuplier ou le tremble, le houblon ou encore le genre *Rehmannia* (Delaunois et al., 2009).

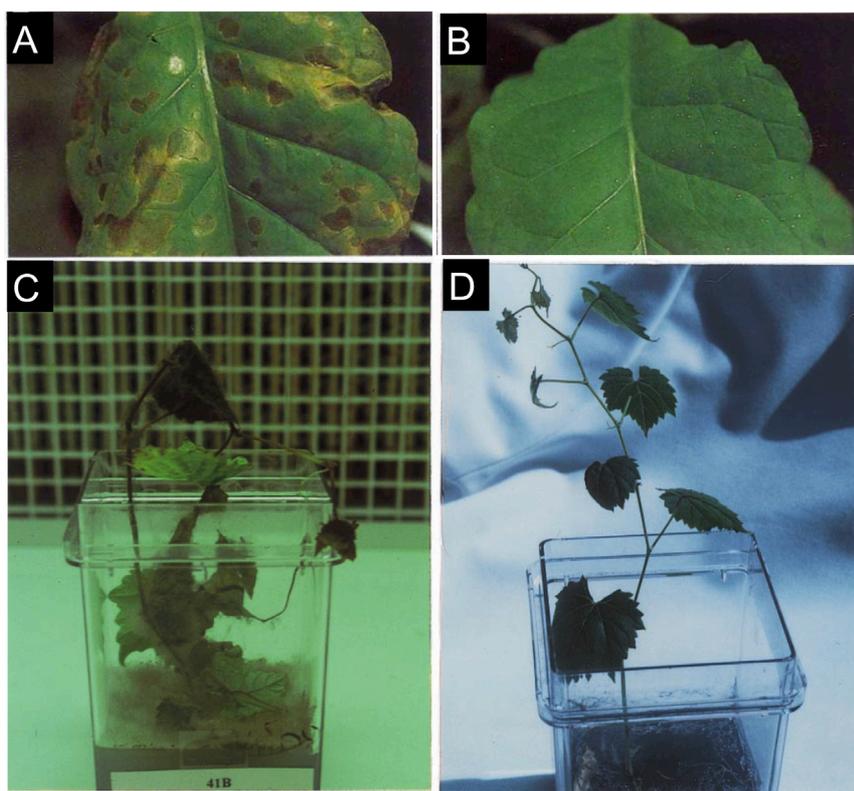


Figure 19 : Création de plantes transgéniques surexprimant *Vst1* (*V. vinifera* cv. optima). A et B, photos tirées de l'étude de Hain et al. (1993) montrant une feuille de *N. tabacum* témoin infectée par *B. cinerea* (A) ainsi qu'une feuille transgénique surexprimant *Vst1* et également infectée (B). C,D, photos tirées de l'étude de Coutos-Thévenot et al. (2001) montrant un porte-greffe 41B non transgénique infecté par *B. cinerea* (C) ainsi qu'un porte-greffe 41B transgénique surexprimant *Vst1* et également infecté (D).

Si dans la plupart de ces études les plantes transgéniques ont montré une augmentation nette de la résistance aux organismes phytopathogènes (champignons principalement) (Delaunois et al., 2009), dans certains cas la croissance des agents pathogènes n'est que ralentie (Zhu et al., 2004) et dans d'autres cas elle n'est pas affectée (Kobayashi et al., 2006). De manière inattendue, la surexpression d'une STS (*NS-Vitis3*) de *V. riparia* sous contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) chez la fraise (*Fragaria x ananassa*) a conduit à une augmentation de la susceptibilité à *Botrytis cinerea* (Hanhineva et al., 2009), probablement en raison d'une interaction avec le métabolisme des flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes sont connus pour contribuer aux mécanismes de défense des plantes (Grotewold, 2006), et de la fraise en particulier (Terry et al., 2004; Halbwirth et al., 2006; Hukkanen et al., 2007). Chez le kiwi, la surexpression d'une STS (*pBSRIP*) de *V. riparia* entraîne la production de picéide peu toxique pour les pathogènes fongiques (Kobayashi et al., 2006), les mêmes résultats ayant été obtenus chez le peuplier (*Populus alba*), avec des concentrations en picéide allant jusqu'à 615,2 µg/g de matière fraîche (feuilles) (Giorcelli et al., 2004).

Parallèlement aux approches visant à augmenter la résistance vis à vis de différents pathogènes, l'augmentation de la teneur en stilbènes de certains végétaux pourrait permettre d'obtenir de nouvelles sources de stilbènes alimentaires. Parmi les plantes consommées par l'homme, la vigne et l'arachide produisent du resvératrol à des concentrations de 4 µg/g de matière sèche, et on en retrouve en moyenne 2 mg/l dans le vin rouge, ce qui en fait, en moyenne, la première source naturelle de stilbènes alimentaires. Cependant, les concentrations sont insuffisantes en regard des concentrations utilisées lors des études sur les propriétés pharmacologiques des stilbènes, qui utilisent des doses environ 50 fois supérieures aux doses retrouvées naturellement (Reagan-Shaw et al., 2008; Baur and Sinclair, 2006). En vue d'augmenter les propriétés nutraceutiques des végétaux consommables, plusieurs études ont été menées. Chez la tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker), la surexpression du gène *StSy* de *V. vinifera* (cv. Lambrusco Foglia Frastagliata) sous contrôle du promoteur 35S du CaMV permet d'obtenir une concentration maximale de resvératrol de 26 µg/g de matière fraîche de fruit pendant sa maturation, sachant qu'une quantité équivalente est stockée sous forme glycosylée (Giovinazzo et al., 2005). Une étude plus récente portant sur le même type de plantes transgéniques (*Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker) exprimant le gène *StSy* sous contrôle d'un promoteur spécifique du fruit (TomLoxB), a montré une accumulation de resvératrol et de picéide au niveau de la peau des tomates, mais dans des quantités 20 fois

inférieures à celle retrouvée dans les plantes transgéniques où *StSy* est placé sous contrôle du promoteur 35S du CaMV (D'Introno et al., 2009). L'accumulation de resvératrol observée dans les fruits transgéniques est suffisante pour augmenter l'activité anti-oxydante globale, mais aussi la teneur en antioxydants autres que le resvératrol, comme par exemple l'acide ascorbique. Les fruits transgéniques obtenus possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, puisqu'ils permettent de contrecarrer l'effet de l'ester de phorbol (activateur de la prolifération cellulaire) produit par les macrophages, par l'inhibition de l'enzyme cyclo-oxygénase-2 (D'Introno et al., 2009). Cependant, dans ces deux études réalisées chez la tomate, la production de resvératrol a pour conséquence l'absence de graines dans les fruits. Chez la pomme (*Malus domestica* cvs. Elstar et Holsteiner Cox), le gène *VstI* (*Vitis vinifera* cv. Optima) sous contrôle de son propre promoteur permet la production de resvératrol sous sa forme glycosylée (picéide) dans les tissus verts et dans les fruits (Rühmann et al., 2006). Cette accumulation n'a pas de conséquences sur le phénotype ou la fertilité de la plante, ce qui s'explique probablement par le fait que le resvératrol n'est pas retrouvé sous sa forme libre, mais uniquement sous sa forme glycosylée.

La quantité de stilbènes naturellement produite chez les plantes est souvent supérieure aux quantités produites dans des systèmes hétérologues de type levures ou bactéries (Jeandet et al., 2012). Cependant, la synthèse de stilbènes chez les plantes est très variable car elle dépend de l'espèce végétale considérée, du promoteur utilisé, mais aussi de l'organe, du tissu ou du stade de développement considéré (Jeandet et al., 2012). Aussi, un des problèmes majeurs de la production de stilbènes *in planta* est la purification d'un seul métabolite d'intérêt à partir d'un extrait végétal complexe (Park et al., 2009). Par exemple, l'extraction et la purification du resvératrol et de ses dérivés (viniférines principalement) à partir des rafles de vigne est possible (Rayne, 2008), mais est difficilement applicable à une échelle industrielle car très coûteuse. Ce type d'extraction est réservé à des produits cosmétiques à haute valeur ajoutée (firme Caudalie par exemple).

### ***6.3.2 Production de stilbènes par des cultures cellulaires végétales***

Les cultures cellulaires végétales sont largement utilisées pour la production de métabolites secondaires tels que des alcaloïdes, des terpénoïdes, des composés phénoliques ou encore des hétérosides, destinés par exemple à la fabrication de produits pharmaceutiques, d'arômes, de colorants, ou de pesticides (Donnez et al., 2009). Ces composés sont souvent

difficiles à synthétiser chimiquement, c'est pourquoi l'utilisation de microorganismes ou de cultures cellulaires est indispensable. Dans cette technique de production, les cellules végétales des plantes productrices de stilbènes sont utilisées sans être modifiées ou transformées. La synthèse de resvératrol dans les cellules végétales dépend de nombreux paramètres dont l'ajustement est spécifique à l'espèce considérée, et la production peut être stimulée grâce à l'utilisation d'éliciteurs tels que le jasmonate de méthyle, des dérivés de cyclodextrine ou du chitosan. La culture de cellules de *Vitis vinifera* montre les meilleurs résultats en terme de biosynthèse de *trans*-resvératrol après élicitation par des cyclodextrines, et cette méthode de culture reste à ce jour la méthode la plus efficace pour la production de resvératrol et de ses dérivés, avec des concentrations produites pouvant atteindre 5 g de resvératrol / l de culture (Lucas-Abellán et al., 2007). Cependant cette technique a également quelques limites dans le cas où les cellules végétales sont cultivées à la lumière dans des bioréacteurs, ce qui peut poser deux problèmes majeurs : l'isomérisation du resvératrol dans sa forme *cis* et la production de pigments tels que les anthocyanines, issus de la voie de biosynthèse des flavonoïdes en compétition directe avec la voie de biosynthèse des stilbènes. Ce problème a été contourné par certaines firmes industrielles qui parviennent à cultiver des cellules végétales dans des bioréacteurs pouvant contenir jusqu'à 75 000 l de culture (<http://www.phytonbiotech.com/>).

L'utilisation de cals et de racines transgéniques sont deux autres approches utilisées pour la production de resvératrol. Les racines transgéniques ou chevelu racinaire (« hairy roots » en anglais), sont obtenues par transformation des cellules végétales par *Agrobacterium rhizogenes*, une agrobactérie possédant un plasmide Ri portant un ADN-T capable de s'insérer dans le génome des cellules végétales, et induisant la prolifération anarchique de racines. L'avantage de ces racines est qu'elles peuvent être cultivées en milieu liquide pour la production de métabolites secondaires. Cette méthode de culture particulière a pu être adaptée chez l'arachide (*A. hypogea*) pour une production de resvératrol de 98 µg/mg de milieu sec (Medina-Bolivar et al., 2007). La culture de cals permet aussi la synthèse de resvératrol, mais cette technique ne sera pas exposée plus en détail, dans la mesure où la mise en place d'une production en grand volume semble improbable au regard de la faible quantité de resvératrol produite par les cals (concentration comptée en µg/g de matière fraîche), de la vitesse de croissance relativement lente des cals, mais aussi de l'espace demandé pour la culture de cals.

Tableau 2 : Récapitulatif de la production de resvératrol chez les plantes, adapté de (Donnez et al., 2009). MS, matière sèche ; MF, matière fraîche ; MeJA, jasmonate de méthyle ; SA, acide salicylique (+), induction/élicitation ; (-), condition contrôle. Sauf précision, les concentrations données représentent le *trans*-resvératrol.

Espèces végétales	Culture	Elicitation/Induction	Concentration extracellulaire	Concentration intracellulaire	Références
<i>Arachis hypogea</i>	racines	(+) acétate de sodium	0,098 mg/g MS	/	(Medina-Bolivar et al., 2007).
		(-)	0,002 mg/g MS	/	(Kim et al., 2010)
		(-) traitement UV	0.8–1.5 mg/g MS	/	(Ku et al., 2005)
<i>Vitis amurensis</i> cv. Rupr.	cals	(+) variable : SA, MeJA, présence des gènes rolB/rolC	/	0,15-3,15 % MS soit 15 à 315 mg/l	(Dubrovina et al., 2010; Kiselev et al., 2007, 2010)
<i>Vitis thunbergii</i> cv. Sieb. et Zucc.	cals	acide $\alpha$ -naphthalène acétique et 6-benzyl-aminopurine	/	3,7 mg/g de MS	(Ho and Kuo, 2008)
<i>Gossypium hirsutum</i>	susp. cell.	(-)	/	7,2 $\mu$ g/g MS	(Kouakou et al., 2006)
<i>V. vinifera</i> cv. Barbera	susp. cell.	MeJA	13 $\mu$ g/g MS	39 $\mu$ g/g MS	(Tassoni et al., 2005)
		chitosane	234 $\mu$ g/g MS	/	(Ferri et al., 2009)
<i>Vitis labrusca</i> cv. Concord	susp. cell.	(+) L-Alanine	0,54 mg/l	0,01 mg/g MF	(Chen et al., 2006)
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay Fréaux cv. Teinturier	susp. cell.	(+) MeJA (+) saccharose	/ 27 mg/g MF	34-360 mg/l picéide 117 mg/g MF picéide	(Larronde et al., 1998; Vitrac et al., 2002; Krisa et al., 1999; Belhadj et al., 2008; Aumont et al., 2004)
<i>V. vinifera</i> cv. Gamay	susp. cell.	(+) (dérivés de cyclodextrine)	100-203 mg/l	93-202 mg/l picéide	(Morales et al., 1997)
<i>V. vinifera</i> cv. Gamay Rouge	susp. cell.	(+) (dérivés de cyclodextrine)	3060-3280 mg/l	/	(Bru and Pedreno, 2006; Lijavetzky et al., 2008)
<i>V. vinifera</i> cv. Monastrell Albino	susp. cell.	(+) (dérivés de cyclodextrine)	680-5027 mg/l	/	(Bru and Pedreno, 2006)

La concentration du resvératrol produit par la culture végétale cellulaire est environ égale à celle retrouvée naturellement, et l'utilisation de cette méthode de production limiterait grandement la récolte et l'arrachage des plantes naturellement riches en stilbènes (Donnez et al., 2009).

Les problématiques soulevées par l'utilisation de plantes entières pour la production de resvératrol et de ses dérivés favorisent donc l'utilisation des microorganismes ou des cultures cellulaires, largement utilisés de nos jours pour la production de nombreux médicaments et métabolites secondaires. Ces biotechnologies sont bien plus abordables d'un point de vue écologique et environnemental, permettant une purification plus simple des produits de synthèse, mais évitant aussi l'utilisation de pesticides.

### 6.3.3 Production de stilbènes chez les bactéries et les levures

Les bactéries et levures utilisées couramment en biotechnologie ne possèdent pas les enzymes clés permettant la biosynthèse des phénylpropanoïdes. Afin de pouvoir produire du resvératrol, ces systèmes hétérologues doivent produire deux substrats :

- le malonyl-CoA, naturellement présent chez les bactéries et les levures car il rentre dans la voie de biosynthèse *de novo* des acides gras.
- le *p*-coumaroyl-CoA obtenu par la 4-coumarate : CoA ligase (4CL) à partir de l'acide *p*-coumarique. La voie des phénylpropanoïdes n'existant pas chez ces microorganismes, l'enjeu de la synthèse de resvératrol réside donc dans le fait de pouvoir recréer les premières étapes de la voie de biosynthèse des phénypropanoïdes dans ces systèmes hétérologues.

#### 6.3.3.1 Production chez *Escherichia coli*

Plusieurs études ont tenté de produire de grandes quantités de resvératrol à partir d'*E. coli*, en recréant la voie de biosynthèse des stilbènes par l'addition d'une STS, mais aussi d'une 4CL permettant la synthèse de *p*-coumaroyl-CoA dans un milieu supplémenté d'acide *p*-coumarique. Le malonyl-CoA est naturellement synthétisé par les bactéries, et rentre par exemple dans la voie de biosynthèse des acides gras. L'une des premières études visant à

produire du resvératrol a été réalisée en 2006 par bioconversion, en exprimant la STS d'*A. hypogea* et la 4CL1 d'*A. thaliana*, dans la souche *E. coli* BW27784 et dans un milieu de culture optimisé pour la production de protéines recombinantes et complémenté d'acides *p*-coumarique, caféique ou férulique (Watts et al., 2006). Cette étude a permis d'obtenir respectivement des concentrations de 100 mg/l de resvératrol à partir de l'acide 4-coumarique et 13 mg/l de picéatannol à partir de l'acide caféique dans le milieu de culture bactérien. Cependant la bioconversion n'est pas totale, ce qui suggère qu'une partie des acides hydroxycinnamiques ajoutés au milieu de culture sont dégradés par les bactéries, comme cela a déjà été observé pour des phénylpropanoïdes (Díaz et al., 2001). Une étude de 2007 a permis de produire plusieurs stilbènes à des concentrations allant jusqu'à 171 mg/l, en co-exprimant une STS d'*A. hypogea*, une 4CL de *Lithospermum erythrorhizon* ainsi qu'une acétyl-CoA carboxylase (ACC) de *Corynebacterium glutamicum*, le meilleur résultat étant obtenu avec l'acide *p*-coumarique (Katsuyama et al., 2007).

Des travaux plus récents de 2011 ont permis d'augmenter les niveaux de resvératrol produits, par l'optimisation fine des paramètres de production, par le choix des souches bactériennes, des vecteurs d'expression, mais aussi par l'utilisation d'enzymes plus performantes pour la production de resvératrol (Lim et al., 2011). En coexprimant la 4CL d'*A. thaliana* et la STS de *V. vinifera* sur un même opéron sous le contrôle d'un promoteur commun T7, dans des souches d'*E. coli* BW27784 et dans un milieu enrichi en acide *p*-coumarique et en céruléine (inhibiteur de la voie de biosynthèse des acides gras, qui permet d'augmenter le « pool » de malonyl-CoA), les auteurs ont pu obtenir une plus grande quantité de resvératrol que dans les études précédentes : 2,3 g/l de milieu de culture. Le Tableau 3 résume les stratégies utilisées pour la production de stilbènes en systèmes bactériens.

Tableau 3 : Récapitulatif de la production de resvératrol en systèmes hétérologue bactériens.

*STS* : stilbène synthase ; *4CL* ; 4-coumarate : CoA ligase ; *ACC*, acétyl-CoA carboxylase (production de malonyl-CoA).

Microorganisme	Gènes utilisés	Origine des gènes	Opéron ?	Substrat(s)	Concentration en stilbène	Référence
<i>Streptomyces venezuelae</i> (DHS2001)	<i>4CL1, STS</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> ( <i>4CL1</i> ), <i>Arachis hypogea</i> ( <i>STS</i> )	Gènes en tandem	Acide <i>p</i> -coumarique 1,2 mM Acide cinnamique 1,2 mM	0,4 mg/l resvératrol 0,6 mg/l pinosylvine.	(Park et al., 2009)
<i>Escherichia. coli</i> (BW27784 pACMod)	<i>4CL1, STS</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>4CL1</i> ), <i>Arachis hypogea</i> ( <i>STS</i> )	non	Acide <i>p</i> -coumarique 1 mM Acide caféique Acide férulique	100 mg/l resvératrol 13 mg/l piceatannol /	(Watts et al., 2006).
<i>Escherichia. coli</i>	<i>4CL1, STS</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis sp.</i> ( <i>STS</i> )	? (brevet)	? (brevet)	3.6 mg/l	(Huang et al., 2006)
<i>Escherichia. coli</i>	<i>4CL1, STS</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	non	acide <i>p</i> -coumarique 5 mM	16 mg/l	(Beekwilder et al., 2006)
<i>Escherichia. coli</i> BW27784	<i>4CL1, STS</i>	<i>Arabidosps thaliana</i> ( <i>4CL1</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	oui	Acide <i>p</i> -coumarique 15 mM Céroléine 0,05 mM	2 462 mg/l resvératrol 1 380 mg/l sans céroléine	(Lim et al., 2011).
<i>Escherichia. coli</i> (BLR DE3)	<i>4CL1, STS, ACC</i>	<i>Lithospermum erythrohizon</i> ( <i>4CL1</i> ), <i>Arachis hypogea</i> ( <i>STS</i> ), <i>Corynebacterium glutamicum</i>	non	Acides hydroxycinnamiques 1 mM	171 mg/l à partir de l'acide <i>p</i> -coumarique	(Katsuyama et al., 2007)
<i>Escherichia. coli</i>	<i>TAL, 4CL, STS</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Rhodobacter capsulatus</i> ( <i>TAL</i> ), <i>Rheum tataricum</i> ( <i>STS</i> )	? (brevet)	? (brevet)	? (brevet)	(Katz et al., 2008)

### 6.3.3.2 Production chez la levure

De même que chez les bactéries, la voie des phénylpropanoïdes amenant à la production d'acide *p*-coumarique puis de *p*-coumaroyl-CoA n'existe pas chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, l'acide *p*-coumarique est présent dans les moûts de raisin utilisés pour la fermentation des levures, la production de resvératrol ne nécessiterait donc que l'apport d'une 4CL et d'une STS pour la production de resvératrol (Becker et al., 2003). Cette étude a été réalisée par J. Becker et al. dans l'optique de pouvoir enrichir les vins en resvératrol afin d'augmenter leur propriété anti-oxydante, surtout dans le cas des vins blancs naturellement pauvres en resvératrol (lors de la vinification des vins blancs, le moût de raisin est fermenté sans les peaux de raisin, à l'inverse de la vinification des vins rouges). La synthèse de resvératrol a été réalisée en milieu fermentaire supplémenté d'acide *p*-coumarique ; les levures co-exprimaient une 4CL de peuplier (cv. hybride *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) et une STS de vigne (*Vst1* du Cabernet sauvignon). La fermentation n'a malheureusement pas permis d'obtenir du resvératrol, mais plutôt son dérivé glycosylé, le picéide, à des concentrations relativement faibles pour un maximum de 1,45 µg/l. Cette étude pionnière fut la première étude permettant de recréer une voie de biosynthèse dans un système hétérologue amenant à la production de resvératrol. Par la suite, plusieurs études ont poursuivi l'amélioration de la synthèse de resvératrol chez la levure, en proposant notamment la recréation totale de la voie de biosynthèse du resvératrol, et donc les premières étapes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Le Tableau 4 résume les travaux effectués sur la production de resvératrol chez la levure par reconstitution complète de la voie de biosynthèse du resvératrol, ou par introduction de gènes spécifiques (typiquement une 4CL et une STS). La synthèse de resvératrol chez *S. cerevisiae* en présence d'une 4CL, d'une STS et du gène *araE* codant pour un transporteur d'*E. coli*, semble augmenter la production de resvératrol d'environ 2,44 fois (Wang et al., 2011). La création de protéines de fusion entre la 4CL et la STS permet d'augmenter la production de resvératrol à 5,25 mg/l (Zhang et al., 2006) ; l'utilisation d'une protéine « scaffold » reliant physiquement la 4CL et la STS, permet d'augmenter la production de resvératrol de 2,7 fois par rapport à la protéine de fusion 4CL::STS (Wang and Yu, 2012). La canalisation d'enzymes du métabolisme secondaire semble donc permettre l'optimisation de la biosynthèse de métabolites secondaires dans des systèmes hétérologues. Tout comme pour la production de resvératrol chez *E. coli*, la production chez la levure dépend de nombreux paramètres, tels que la souche de levure utilisée, l'origine des transgènes, les conditions de

culture, les plasmides, ou encore les précurseurs ajoutés au milieu de culture (Jeandet et al., 2012).

La synthèse de stilbènes à partir de microorganismes est pratique dans la mesure où ils présentent des vitesses de croissance élevées, et que les conditions de cultures industrielles sont à ce jour très bien connues, maîtrisées et relativement peu coûteuses (Donnez et al., 2009). Néanmoins, de meilleurs résultats sont obtenus grâce aux cultures cellulaires végétales, combinant les avantages d'une culture non transgénique, pouvant être réalisée dans de grands volumes (jusqu'à 75 000 l), dans un milieu de culture plus simple (sucres, minéraux et éléments régulateurs), et dont les métabolites sont plus facilement extractibles. Dans les deux cas et particulièrement pour la production dans les microorganismes, les conditions de cultures doivent encore être optimisées pour la production à l'échelle industrielle. Toutefois, l'utilisation de méthodes non transgéniques de production comme la culture de cellules de vigne, sont les méthodes les plus acceptables à l'échelle des consommateurs, et dans l'état actuel de l'opinion publique sur les OGM.

### *6.3.1 D'où provient le resvératrol disponible dans le commerce ?*

Actuellement, le resvératrol disponible dans le commerce provient de la culture de la Renouée du Japon (*Fallopia Japonica* aussi connue sous le nom de *Polygonum cuspidatum*, Figure 20 A). Les principaux producteurs sont des compagnies chinoises (ex : Wuxi Gorunjie Technology Co. et Shanghai DND Pharm-Technology Co.), qui parviennent à extraire le *trans*-resvératrol à partir des racines de *Fallopia* à différents degrés de pureté (Kiselev et al., 2010). Quelques fois, le resvératrol provient d'extraits de vigne (raisin particulièrement), les prix varient autour de 20 à 40 euros pour 60 comprimés de 250 mg (Figure 20 B).

Tableau 4 : Récapitulatif de la production de resvératrol chez les levures. (Tiré de Jeandet et al., 2012).

Microorganisme	Gènes utilisés	Origine des gènes	Concentration en stilbène	Référence
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>PAL/TAL, C4H, 4CL, STS</i>	<i>Rhodotorula glutinis (PAL/TAL), Streptomyces coelicolor (4CL), Vitis sp. (STS)</i>	1,46 mg/l	(Huang et al., 2006)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>PAL, C4H, 4CL, STS</i>	<i>Arabidopsis thaliana (PAL, C4H, 4CL), Rheum tataricum (STS)</i>	Non détectable	(Katz et al., 2008)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>TAL, protéine de fusion 4CL::STS</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides (TAL), Arabidopsis thaliana (4CL), Vitis vinifera (STS)</i>	5,25 mg/l	(Zhang et al., 2006)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>4CL, STS</i>	<i>Populus trichocarpa × Populus deltoides (4CL), Vitis vinifera (STS)</i>	1,45 mg/l	(Becker et al., 2003)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>4CL, STS</i>	<i>Nicotinana tabacum (4CL), Vitis vinifera (STS)</i>	5,8 mg/l	(Beekwilder et al., 2006)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>4CL, STS</i>	<i>Arabidopsis thaliana (4CL), Vitis vinifera (STS)</i>	262-391 mg/l	(Sydor et al., 2010)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> avec phénylalanine	<i>PAL, CPR, C4H, 4CL, STS</i>	<i>Populus trichocarpa × P. deltoides (PAL, CPR) Glycine max (C4H, 4CL), Vitis vinifera (STS)</i>	0,29 mg/l	(Trantas et al., 2009)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> avec du <i>p</i> -coumaroyl-CoA	<i>PAL, CPR, C4H, 4CL, STS</i>	<i>Populus trichocarpa × P. deltoides (PAL, CPR) Glycinemax (C4H, 4CL), Vitis vinifera (STS)</i>	0,31 mg/l	(Trantas et al., 2009)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>TAL, protéine de fusion 4CL::STS, transporteur araE</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides (TAL), Escherichia coli (araE), Arabidopsis thaliana (4CL), Vitis vinifera (STS)</i>	3.1 mg/l (1.27 mg/l sans le transprotteur araE)	(Wang et al., 2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>TAL, protéine de fusion 4CL::STS</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides (TAL), Arabidopsis thaliana (4CL), Vitis vinifera (STS)</i>	14.4 mg/l	(Wang and Yu, 2012)



Figure 20 : Le resvératrol dans le commerce.

(A) *Fallopia japonica* (source : wikipédia) ; (B) Exemple de comprimés contenant du resvératrol, disponibles dans le commerce (source : <http://www.leaderpharma.net>).

## 7 Propriétés pharmacologiques des stilbènes

### 7.1 Utilisation des stilbènes dans les cosmétiques

La firme cosmétique Caudalie exploite directement les qualités anti-oxydantes des polyphénols de la vigne, et particulièrement des stilbènes (resvératrol et viniférines principalement) pour la création de produits cosmétiques réputés anti-vieillessement. Les stilbènes sont extraits à partir de pépins de raisin, de résidus de presse et majoritairement de sarments de vigne, riches en resvératrol et dérivés, la concentration en resvératrol pouvant atteindre 700  $\mu\text{g/g}$  de matière fraîche (Langcake and Pryce, 1976). Selon Caudalie, les viniférines contenues dans les sarments de vigne possèdent des vertus anti-taches. La firme a notamment mis au point la technologie CAROL®, basée sur l'utilisation d'un complexe lipidique qui permet de complexer les stilbènes à des lipides, afin de les protéger de l'oxydation et de les délivrer directement au niveau des cellules de l'épiderme (le clivage et la libération des polyphénols sont réalisés *in vivo* au contact de l'épiderme).

### 7.2 Impact des stilbènes sur la santé humaine

Au début des années 1990, des études d'épidémiologie des maladies cardio-vasculaires ont donné naissance au concept du « French paradox », c'est-à-dire une faible incidence de ces maladies malgré une consommation importante de graisses saturées d'origine animale (Renaud

and De Lorgeril, 1992). Parallèlement, du resvératrol a été mis en évidence au niveau de la pellicule des baies de raisin (Creasy and Coffee, 1988), et dans les vins rouges (Siemann and Creasy, 1992), ceux-ci pouvant contenir jusqu'à 5,8 mg/l de resvératrol, avec une moyenne de 2 mg/l environ (Lim et al., 2011).

A la même époque, des études ont mis en évidence que le resvératrol est capable d'inhiber l'oxydation des « low density lipoproteins » (LDL) impliquées dans le transport du cholestérol sanguin (Frankel, 1993). L'idée que le « French paradox » pouvait être lié à la consommation régulière de quantités modérées de vin rouge et de l'interaction du resvératrol avec le métabolisme des stérols ont fait naître l'hypothèse que le resvératrol pourrait être la molécule active expliquant le phénomène du « French paradox » (Kopp, 1998). Par la suite, de nombreuses propriétés pharmacologiques des stilbènes ont été mises en évidence, ce qui fait du resvératrol l'une des substances naturelles les plus étudiées (Baur and Sinclair, 2006). Voici quelques exemples des propriétés pharmacologiques du resvératrol :

- **Anti-cancérigène** : le resvératrol inhibe la carcinogenèse, de l'initiation à la croissance de la tumeur dans le cas de nombreux cancers. Le resvératrol inhibe par exemple la cyclooxygénase (COX), une famille d'enzymes impliquées entre autre dans la prolifération cellulaire, et qui sont surexprimées dans le cas de plusieurs cancers (Jang, 1997). Le resvératrol est également décrit comme étant un facteur induisant l'arrêt du cycle cellulaire des cellules cancérogènes ainsi que l'apoptose (Aggarwal et al., 2004). Le resvératrol inhibe le processus d'angiogenèse (néovascularisation), un processus de vascularisation présent au niveau des sites de formation des tumeurs malignes ou des métastases (Kimura and Okuda, 2001; Tseng et al., 2004).
- **Cardio-protecteur** : le resvératrol a un effet préventif sur l'agrégation des plaquettes sanguines pouvant être à l'origine d'infarctus du myocarde (Bertelli et al., 1995). On lui connaît également des propriétés vasodilatatrices (Naderali et al., 2000; Jäger and Nguyen-Duong, 1999). Des extraits de vin et de raisin ont également montré un effet bénéfique sur la réduction du processus d'athérosclérose (accumulation de plaques de lipides sur la paroi des artères, amenant à une sclérose de l'artère) (Wang et al., 2005), du processus de peroxydation des lipides (Fuhrman et al., 1995), et d'agrégation des plaquettes (Seigneur et al., 1990; Demrow et al., 1995).
- **Détoxification des drogues** : la détoxification des drogues se fait en deux étapes, la première étant prise en charge par des cytochromes P450 qui permettent d'hydroxyler les molécules toxiques pour les rendre plus polaires et faciliter leur élimination. Le resvératrol interviendrait dans la deuxième étape de détoxification en modulant l'expression et l'activité

d'enzymes détoxifiantes ou d'enzymes permettant de conjuguer les toxines pour finalement pouvoir les éliminer (Cao and Li, 2004; Kaga et al., 2005; Floreani et al., 2003).

- **Influence sur la durée de vie de différents organismes :** le resvératrol allonge la durée de vie de *Saccharomyces cerevisiae* (Howitz, Bitterman, Cohen, Lamming, Lavu, Wood, Zipkin, et al., 2003), *Caenorhabditis elegans* (Wood et al., 2004; Viswanathan et al., 2005), *Drosophila melanogaster* (Wood et al., 2004; Bauer et al., 2004), et *Nothobranchius furzeri* (Valenzano et al., 2006) par activation des sirtuines (déacétylases NAD<sup>+</sup> dépendantes, histone déacétylases de classe III), connues pour promouvoir la survie et la résistance au stress dans le temps.
- **Antioxydant et anti-inflammatoire :** les ROS (reactive oxygen species) sont connues pour être impliquées dans l'initiation et la progression des cancers, mais aussi dans les processus de vieillissement des cellules, en causant par exemple des dommages à l'ADN ou la peroxydation des lipides. Le resvératrol est capable de piéger les radicaux libres (Martinez and Moreno, 2000; Losa, 2003), mais aussi d'activer les enzymes antioxydantes (Losa, 2003; Jang et al., 1997).

Parmi les nombreuses propriétés pharmacologiques des stilbènes, l'influence sur la durée de vie est particulièrement fascinante et est abordée plus en détails dans le paragraphe suivant.

### 7.3 Effet des stilbènes sur l'allongement de la durée de vie

Des gènes liés à la longévité ont été identifiés chez plusieurs espèces d'eucaryotes. Très conservés d'un point de vue évolutif, ces gènes sont impliqués dans la survie des organismes en réponse à des conditions environnementales difficiles (Howitz, Bitterman, Cohen, Lamming, Lavu, Wood, RE, et al., 2003). Parmi ces gènes qui régissent le rythme du vieillissement, il existe par exemple chez la levure le gène *PNC1* (pyrazinamidase/nicotinamidase 1), induit en réponse à une restriction calorique, et qui a pour effet d'épuiser le nicotinamide, un inhibiteur physiologique du gène *Sir2*, qui code pour une sirtuine.

Les sirtuines constituent une famille très conservée d'enzymes, et ont été décrites chez divers eucaryotes incluant des champignons, des protozoaires, des animaux et des plantes (Pandey et al., 2002). Ce sont des déacétylases NAD<sup>+</sup>-dépendantes (déacétylases d'histones de classe II) qui exercent leur activité sur les résidus lysines acétylés des histones ou d'autres

protéines (Schemies et al., 2009). Dans l'étude de Howitz et al., plusieurs métabolites secondaires végétaux ont été identifiés comme des activateurs des sirtuines. Parmi eux, le resvératrol présent dans le milieu de culture à 10  $\mu$ M a pour effet d'augmenter la durée de vie des levures de 70 %. Plus récemment, plusieurs études ont montré une augmentation de la durée de vie de *Caenorhabditis elegans* de 15 % (Wood et al., 2004; Viswanathan et al., 2005) et *Drosophila melanogaster* de 22 % (Anderson et al., 2003; Wood et al., 2004) si *Sir2* est présent dans le génome (Howitz, Bitterman, Cohen, Lamming, Lavu, Wood, RE, et al., 2003; Wood et al., 2004). Une augmentation de la durée de vie de 59 % a également été observée chez *Nothobranchius furzeri* (Valenzano et al., 2006), mais l'implication des sirtuines dans ce résultat reste encore à démontrer. L'une des hypothèses avancées par Howitz et al. est que les composés du métabolisme secondaire végétal tels que le resvératrol miment des activateurs endogènes des sirtuines chez les animaux et les champignons.

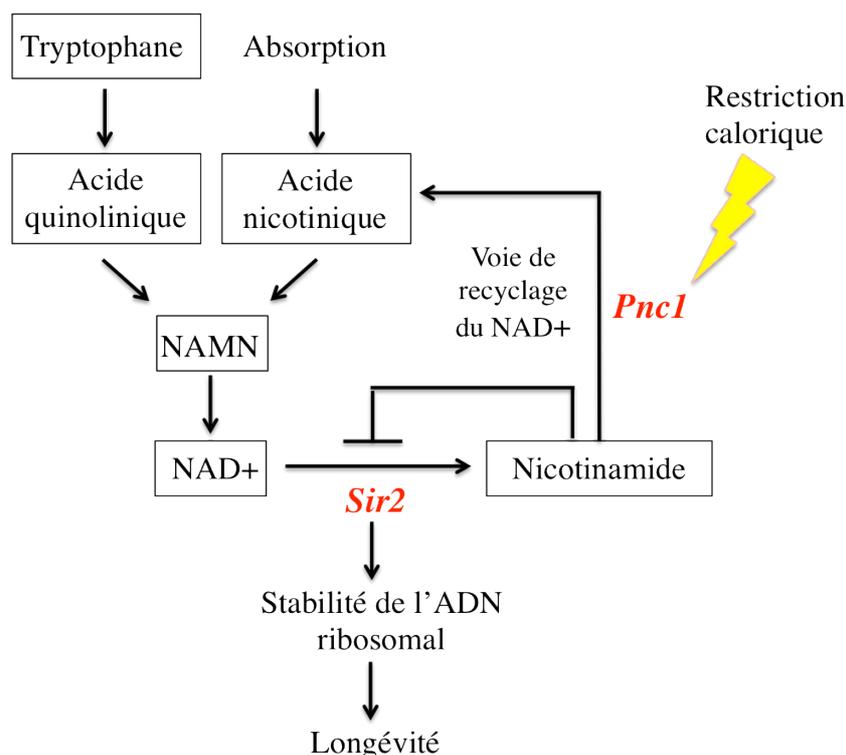


Figure 21 : Voie de régulation des sirtuines chez *S. cerevisiae*, adapté de Anderson et al., 2003. Chez la levure, le NAD<sup>+</sup> est synthétisé *de novo* à partir du tryptophane ou recyclé à partir du nicotinamide. Le stress engendré par une restriction calorique active le gène *Pnc1*, causant un épuisement de nicotinamide, ce qui active l'expression du gène *Sir2* codant pour une sirtuine.

Chez les mammifères, il existe 7 gènes de sirtuines (*SIRT1-7*), et *SIRT1* a été plus étudié, puisque c'est le gène qui possède la plus grande homologie avec le gène *Sir2* de levure. A ce

jour, de nombreux effets bénéfiques relatifs à l'activation de *SIRT1* ont été décrits, notamment concernant des maladies humaines telles que le cancer, l'obésité, l'arthrite inflammatoire, des maladies cardiovasculaires, l'ostéoporose, des maladies neuro-dégénératives ou le diabète de type II (Morris, 2012). Par contre, ni l'effet de *SIRT1* sur l'augmentation de la durée de vie, ni l'effet du resvératrol sur l'activation de *SIRT1*, n'ont été démontrés chez l'homme à ce jour.

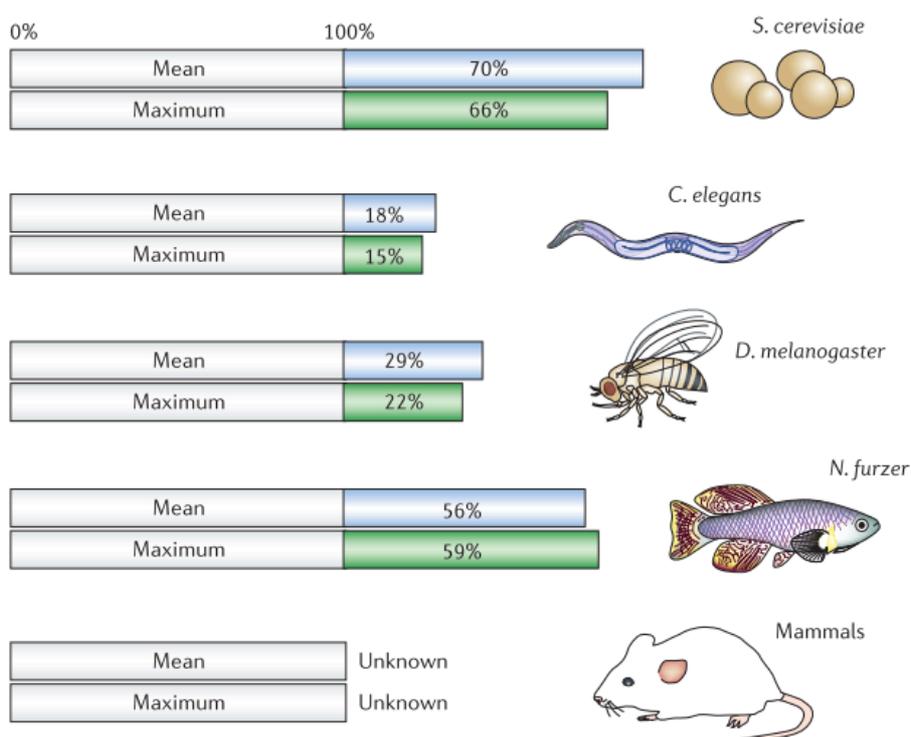


Figure 22 : Récapitulatif de l'effet du resvératrol sur la durée de vie moyenne et la durée de vie maximale de différents organismes. Adapté de Baur et Sinclair, 2006.

*S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* ; *C. elegans*, *Caenorhabditis elegans* ; *D. melanogaster*, *Drosophila melanogaster* ; *N. furzeri*, *Nothobranchius furzeri*.

## *Objectifs de la thèse*

---



# Objectifs de la thèse

---

Dans un premier temps, il est apparu nécessaire d'approfondir les connaissances sur la biologie, la physiologie et les mécanismes de résistance de la vigne, par le développement de nouveaux outils génomiques. C'est ainsi qu'un projet de séquençage franco-italien fut validé en 2005 par le conseil scientifique du Genoscope, permettant le séquençage de *Vitis vinifera* à la hauteur de 8 équivalents génomiques, puis 12 équivalents génomiques. La variété de vigne utilisée pour le séquençage est la variété PN40024, possédant un génotype quasi-homozygote et créé dans les années 1990 à l'INRA de Colmar (Bronner and Oliveira, 1990). Le génome annoté (Jaillon et al., 2007) est disponible sur le site du Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/>), associé à plusieurs outils de recherche (Bast, Blat). Des données d'expression sont également disponibles sous la forme d'EST (Expressed Sequence Tag). La mise en commun des données déjà acquises sur des espèces modèles telles que l'arabette (*Arabidopsis thaliana*) ou le riz cultivé (*Oryza sativa*), avec les données de séquençage de la vigne permettront par exemple de mieux appréhender les mécanismes de résistance par l'identification et la caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans ces mécanismes. La caractérisation des gènes responsables des caractères agronomiques de la vigne comme la maturation ou les propriétés organoleptiques de la baie de raisin fait également partie des enjeux liés à l'analyse du génome de la vigne.

L'UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin 1131 conduit depuis quelques années déjà un vaste programme de création de nouvelles variétés de vigne produisant des vins de qualité et dotées de résistances durables au mildiou (*Plasmopara viticola*) et à l'oïdium (*Erysiphe necator*), grâce à l'exploitation de sources de résistance issues d'espèces de *Vitis* d'origines américaine et asiatique. Ce programme de sélection s'appuie sur des travaux visant à comprendre les bases de la résistance au mildiou chez la vigne, et est le fruit d'un travail commun entre les équipes GAV (Génétique et amélioration de la vigne) et MSV (Métabolisme secondaire de la vigne).

L'équipe MSV de la vigne dans laquelle j'ai réalisé ma thèse travaille sur deux thématiques : la génomique fonctionnelle du métabolisme de défense de la vigne, ainsi que le métabolisme secondaire et les arômes des vins. Concernant la première thématique, les travaux

visent particulièrement à identifier les gènes clés responsables de la biosynthèse de métabolites de défense de la vigne contre le mildiou (*P. viticola*), l'oïdium (*E. necator*) ou la pourriture grise (*B. cinerea*). L'équipe a notamment participé à l'analyse et à l'annotation du génome de la vigne, et plus particulièrement à l'annotation de familles multigéniques appartenant au métabolisme secondaire, en étroite collaboration avec Sébastien Aubourg de l'URGV d'Evry. Cette analyse a permis de mettre en évidence une expansion importante de familles de gènes potentiellement impliquées dans la synthèse de métabolites de défense, comme les stilbènes ou les terpénoïdes.

Ma thèse s'articule donc autour de l'analyse de deux familles de gènes liées à la biosynthèse des stilbènes, dans une optique commune : l'étude fonctionnelle, évolutive et structurale de la famille des stilbène synthases et des resvératrol O-méthyltransférases de vigne. Pour cela, j'ai combiné des approches métabolomique, transcriptomique et de génomique fonctionnelle.

## *Matériel et méthodes*

---



# Matériel et méthodes

---

## 1 Matériel

### 1.1 Matériel végétal

#### 1.1.1 *Vitis vinifera*



Figure 23 : *Vitis vinifera* cv. Pinot noir (Source : Photothèque INRA Colmar).

**Division** : Magnoliophyta ; **Classe** : Magnoliopsida ; **Ordre** : Rhamnales; **Famille** : Vitacées; **Genre** : *Vitis* ; **Espèce** : *vinifera* (L.) ; **Cultivars/variétés utilisé(s)** : PN40024, Cabernet sauvignon, Muscat Ottonel ; **Origine** : Asie centrale et mineure.

*Vitis vinifera* ( $2n = 38$ ) est une plante pérenne ligneuse appartenant à la famille des Vitacées, comprenant 700 espèces réparties en 17 genres. Seul le genre *Vitis* comprenant une soixantaine d'espèces est utilisé à des fins agronomiques, soit pour la consommation de raisins de table, pour la production de jus, sirops, ou de vins, mais également pour l'industrie cosmétique. *Vitis vinifera* est répartie en plusieurs sous-espèces, dont la sous-espèce *sativa* est répartie en 10 000 cépages à travers le monde (Figure 24).

La vigne est cultivée dans des godets de 630 ml, remplis d'un terreau composé de perlite, de tourbe blonde et de sphaigne (Steckmedium, KLASMANN). Ce substrat de

bouturage est aéré, drainant et possède une bonne réserve hydrique, il favorise aussi l'enracinement tout en limitant les risques de maladie. Les vignes sont cultivées en serre, sous éclairage naturel.

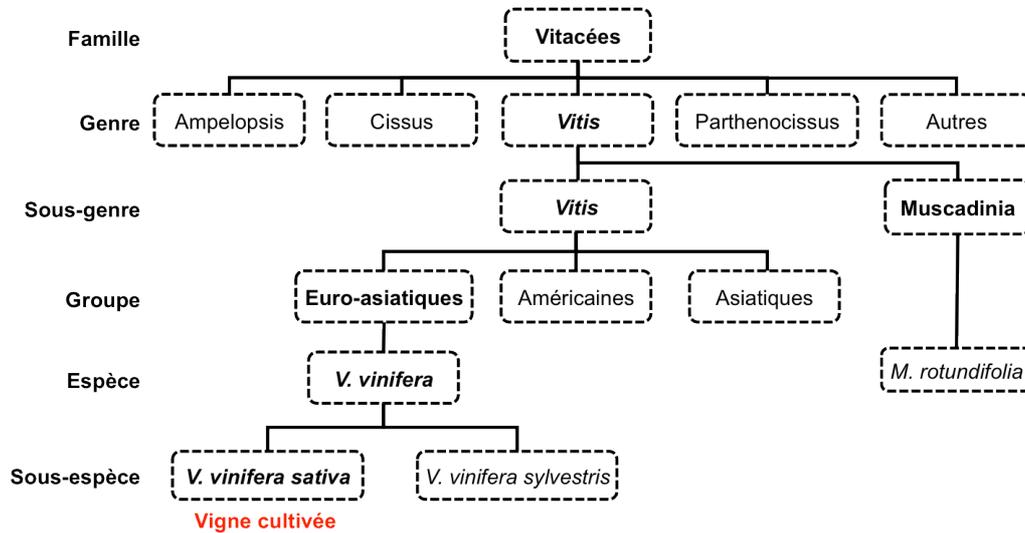


Figure 24 : Organisation de la famille des Vitacées.

### 1.1.2 *Arabidopsis thaliana*



Figure 25 : *Arabidopsis thaliana*.

**Division** : Magnoliophyta ; **Classe** : Magnoliopsida ; **Ordre** : Brassicales ; **Famille** : Brassicacées ; **Genre** : *Arabidopsis* ; **Espèce** : *thaliana* (L.) ; **Ecotype** : Columbia 0 (Col-0) ; **Origine** : Europe.

Pour les cultures en terre, les plantes sont placées dans des pots en plastiques de 155 ml, le terreau utilisé est composé de tourbe blonde et de tourbe noire (terreau TS 3 fin 416, Klasmann). Pour la croissance des parties végétatives, les plantes se développent en chambre de culture maintenue à une température de 22 °C le jour et 18 °C la nuit, avec une photopériode de 8 h de lumière et de 16 h d'obscurité. Pour la formation des inflorescences, les plantes se développent en chambre de culture maintenue à une température de 21 °C le jour et 18 °C la nuit, avec une photopériode de 14 h de lumière et de 10 h d'obscurité.

Le milieu de culture utilisé pour la culture *in vitro* est le milieu Murashige et Skoog (Tableau 5) supplémenté des antibiotiques de sélection adéquats dans le cas des expériences de transformation stable. La chambre de culture *in vitro* (« rotoplant ») est soumise à une photopériode de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité, à 24 °C, avec une humidité relative de 60 %, et une intensité lumineuse de 5 000 lux.

Tableau 5 : Composition milieu MS (Murashige et Skoog)

<b>Milieu MS (Duchefa : macro- et micro- éléments)</b>	4,3 g.l <sup>-1</sup>
<b>Vitamines</b>	
Glycine	2 mg.l <sup>-1</sup>
Myo-inositol	100 mg.l <sup>-1</sup>
Nicotinic acid	0,5 mg.l <sup>-1</sup>
Pyroxidine HCl	0,5 mg.l <sup>-1</sup>
Thiamine HCl	0,16 mg.l <sup>-1</sup>
<b>Saccharose</b>	
<i>N. benthamiana</i>	30 g.l <sup>-1</sup>
<i>A. thaliana</i>	10 g.l <sup>-1</sup>
pH 5,2 ( <i>N. benthamiana</i> ) avec KOH pH 5,7 ( <i>A. thaliana</i> ) avec NaOH	
<b>Bacto™ agar B</b>	6 g.l <sup>-1</sup>
Stérilisation 1 bar 20 min 121 °C Ajout des antibiotiques à une température inférieure à 60 °C Etaler sur boîte de Petri de 75 ml	

J'ai surtout utilisé *A. thaliana* pour la création de lignées transgéniques exprimant les différents gènes que j'ai eu l'occasion d'étudier pendant ma thèse. Cela aussi bien pour la

création des doubles transformant *STS-ROMT*, que pour la création des plantes transgéniques exprimant les différents gènes *ROMT* de vigne.

### 1.1.3 *Nicotiana benthamiana*



Figure 26 : *Nicotiana benthamiana*.

**Division** : Magnoliophyta ; **Classe** : Magnoliopsida ; **Ordre** : Solanales ; **Famille** : Solanacées ; **Genre** : *Nicotiana* ; **Espèce** : *benthamiana* (L.) ; **Origine** : Australie

*N. benthamiana* est une plante très largement utilisée en recherche pour les expériences d'agro-infiltration et de transformation stable, que j'ai eu l'occasion de réaliser à de nombreuses reprises au cours de ma thèse.

Les plantes se développent en chambre de culture soumise à une température de 23 °C le jour et 20 °C la nuit, avec une photopériode de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité. Pour les expériences de culture *in vitro*, les plantes se développent dans une chambre de culture *in vitro* (« rotoplant ») est soumise à une photopériode de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité, à 24 °C, avec une humidité relative de 60 %, et une intensité lumineuse de 5 000 lux. Le milieu de culture utilisé pour la culture *in vitro* est le milieu Murashige et Skoog (Tableau 5) supplémenté des antibiotiques de sélection adéquats dans le cas des expériences de transformation stable.

## 1.2 Matériel microbiologique

### 1.2.1 *Escherichia coli*

#### ***E. coli* s. XL1-Blue (Stratagene)**

Ces bactéries sont utilisées pour toutes les expériences de biologie moléculaire : transformation, amplification des plasmides, cultures cellulaires.

- Génotype : endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)
- Résistance à l'acide nalidixique
- Résistance à la tétracycline 5 mg/l (résistance portée par le plasmide plasmide F)

#### ***E. coli* s. BL21 (DE3)**

Cette souche est utilisée pour exprimer les protéines recombinantes, pour les expériences de purification ou les tests enzymatiques *in vitro*.

- Génotype : F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]).
- La souche DE3 contient un prophage λ, possédant le gène de l'ARN polymérase du phage T7 placé sous contrôle du promoteur lac UV5 inducible par l'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) ainsi que le gène *lacI* qui exprime le répresseur de l'opéron lactose.
- Les plasmides utilisés pour transformer cette souche (pHNGWA et pHNWA Figure 29) et dont l'expression des gènes sont sous contrôle du promoteur T7, sont réprimés jusqu'à leur induction par l'IPTG. L'IPTG active le promoteur lac UV5 qui permet l'expression de l'ARN polymérase T7, et donc les gènes sous contrôle du promoteur T7.

### 1.2.2 *Agrobacterium sp.*

#### **1.2.2.1 *A. tumefaciens* s. GV3101 :: pMP90**

Cette bactérie phytopathogène est responsable de la galle du collet. Les agrobactéries contiennent en plus du chromosome bactérien un plasmide Ti (tumor-inducing) virulent. Ce plasmide porte plusieurs gènes, codant pour des gènes de virulence (gènes *vir*, responsables du transfert de l'ADN-T et de la fixation des bactéries au niveau des cellules végétales), des oncogènes (gènes *onc*, intervenant dans l'infection tumorale) ainsi que des gènes codant pour la

synthèse d'opines (dérivés d'acides aminés). Le plasmide Ti possède un fragment d'ADN, l'ADN-T, dont une copie sera directement intégrée dans le génome de la plante par recombinaison, pour induire les tumeurs caractéristiques de la maladie issues d'une prolifération anarchique des cellules végétales au lieu de l'infection. L'ADN-T porte les gènes qui codent pour la synthèse d'opines, ainsi que les gènes *onc* : *tms-1* et *tms-2* responsables de la synthèse d'auxine (acide indole-3-acétique) et les gènes *tmr* responsables de la synthèse de cytokinines. Ensembles, ces deux hormones induisent la tumorigénèse.

La souche *A. tumefaciens* GV3101 :: pMP90 dérive de la souche C58C1 dont le génome a été entièrement séquencé en 2001, et porte le gène de résistance à la rifampicine sur son chromosome ainsi qu'un gène de résistance à la gentamycine sur un plasmide (Holsters et al., 1980). Cette souche est désarmée, c'est-à-dire qu'elle ne possède pas les gènes responsables de la synthèse d'hormones végétales. Cette souche est utilisée pour les expériences de transformations stable et transitoire.

#### **1.2.2.2 *A. rhizogenes* s. ARqual**

Cette bactérie phytopathogène induit la prolifération de racines adventices au niveau du point d'infection. Ces racines sont communément appelées les « hairy roots », ou le chevelu racinaire. Le mécanisme d'infection de cette bactérie est similaire à celui d'*A. tumefaciens*, et fait intervenir le plasmide Ri (root-inducing), ainsi que les gènes *tms-1* et *tms-2* responsables de la synthèse d'auxine (White et al., 1985). La surproduction d'auxine induite suite à l'insertion de l'ADN-T dans le génome végétal explique la prolifération racinaire. La souche que j'ai utilisé est la souche ARqual (Quandt et al., 1993), qui dérive de la souche R1000 (pRIA4b), elle-même issue de la souche A4T (White et al., 1985; Moore et al., 1979). La souche ARqual possède un gène de résistance à la Streptomycine au niveau du chromosome bactérien.

## 2 Méthodes

### 2.1 Biologie moléculaire

#### 2.1.1 Matériel biologique

Pour toutes les étapes de clonage décrites ci-dessous, la souche *Escherichia coli* s. XL1-Blue (Stratagene) a été utilisée. Cette souche est cultivée en milieu LB (Luria Bertani ; Bacto Tryptone 10 g.l<sup>-1</sup> ; NaCl 5 g.l<sup>-1</sup> ; extrait de levure 15 g.l<sup>-1</sup> ; pH 7,5 et ajout de Pastagar B 1,5 % pour les milieux solides). Cette souche est rendue thermo-compétente, et pourra être transformée avec un vecteur d'intérêt par choc thermique (voir 2.1.1.2).

##### 2.1.1.1 Préparation des bactéries compétentes

Afin de pouvoir intégrer de l'ADN exogène, les bactéries *E. coli* s. XL1-blue doivent être rendues compétentes. Le protocole de Inoue a été utilisé (Inoue et al., 1990). Pour cela, un erlenmeyer contenant 200 ml de milieu LB préchauffé à 37 °C est inoculé par 2 ml d'une pré-culture de 12 h de la souche d'*E. coli* à préparer. La culture est placée sous agitation à 28 °C jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0,3 et 0,5. Une fois cette valeur atteinte, la culture est placée 10 min sur glace avant d'être centrifugée 10 min à 7 000 rpm, à 4 °C. Le surnageant éliminé, le culot est remis en suspension délicatement à l'aide d'une pipette dans 200 ml de tampon (MgCl<sub>2</sub> 80 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM). La suspension est à nouveau centrifugée 10 min à 7 000 rpm à 4 °C, puis le culot est repris dans 3 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M auquel sont rajoutés 140 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO). Après 15 min de repos sur glace, le mélange est réparti par 200 µl dans des microtubes pré-refroidis, puis les tubes sont stockés dans un congélateur à -80 °C.

##### 2.1.1.2 Transformation des bactéries compétentes par choc thermique

La transformation des *E. coli* par choc thermique est réalisée selon une modification du protocole de Bergmans (Bergmans et al., 1981). L'ADN du vecteur à transférer est mélangé à 50 µl de bactéries thermo-compétentes à raison de 1 à 10 ng d'ADN / ml final. Le mélange est laissé à reposer 30 min sur glace afin de permettre à l'ADN de s'adsorber à la surface des

bactéries (sans toutefois pouvoir y pénétrer, car à 0 °C la membrane est imperméable). Le choc thermique (1 min 30 s à 42 °C) et le DMSO permettent de restaurer la fluidité des membranes et de créer des pseudo-pores à leur surface, permettant ainsi l'entrée de l'ADN dans les bactéries. Ces dernières sont par la suite placées 3 à 4 min sur glace avant l'ajout de 1 ml de milieu LB, puis incubées 1 h à 37 °C sous agitation afin de permettre la restauration du métabolisme, la croissance des bactéries, la réplication du plasmide, et l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques de sélection. Après culture, les bactéries sont étalées sur boîtes de Petri contenant du milieu LB solide supplémenté de l'antibiotique adéquat pour la sélection du plasmide et si c'est le cas, la sélection de la souche bactérienne (récapitulatif des concentrations dans le Tableau 6). Les boîtes sont ensuite incubées une nuit à 37 °C.

Tableau 6 : Récapitulatif des concentrations utilisées pour la sélection des bactéries transformées.

Antibiotique	Concentration (mg.l <sup>-1</sup> )	Vecteur	Souche
Ampicilline	100	pJET pH(N)GWA	<i>E. coli</i> s. XL1-Blue <i>A. rhizogenes</i> s. ARqua1
Gentamycine	20	pDONR207	<i>E. coli</i> s. XL1-Blue
Gentamycine	20		<i>A. tumefaciens</i> s. GV3101 :: pMP90
Kanamycine	100	pMDC32 pMDC83	<i>E. coli</i> s. XL1-Blue <i>A. tumefaciens</i> s. GV3101 :: pMP90
Rifampicine	50		<i>A. tumefaciens</i> s. GV3101 :: pMP90
Tétracycline	2		<i>E. coli</i> s. BL21 DE3 <i>E. coli</i> s. XL1-Blue

### 2.1.2 Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique d'amplification exponentielle de l'ADN *in vitro*, par une ADN polymérase thermostable issue à l'origine d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus* (Taq polymerase), découverte en 1969 et capable de résister à de hautes températures (jusqu'à 98 °C). D'autres polymérases thermostables plus performantes sont également utilisées de nos jours. L'amplification d'un fragment d'ADN par PCR nécessite une matrice d'ADN ainsi qu'un couple d'amorces (oligodésoxyribonucléotides)

capable d'amplifier spécifiquement ce fragment. Dans le cadre de ma thèse, j'ai principalement utilisé de l'ADN génomique de *Vitis vinifera* var. PN40024 comme matrice de PCR, ainsi que des ADNc produits à partir d'ARN de différents organes de cette même variété. La réaction PCR se déroule dans un milieu réactionnel décrit ci-dessous (Tableau 7). Deux polymérase ont été utilisées : la Taq polymérase (Taq Core Kit, MP Biomedicals) pour les amplifications de routine et la polymérase Phusion (Thermo Scientific) pour l'amplification des gènes d'intérêt. La Phusion possède une activité de « proofreading » lui conférant un taux d'erreur très faible ( $4,4 \cdot 10^{-7}$ ).

Tableau 7 : Milieu réactionnel pour les PCR

Milieu réactionnel classique	Milieu réactionnel pour la polymérase Phusion
Taq polymérase 1,5 U	MasterMix Phusion HF (ADN Polymérase Phusion 0,4 U final, tampon HF 1 X final, dNTP 200 $\mu$ M final)
Tampon PCR 1 X	
dNTP 200 $\mu$ M chacun	
Primer sens 0,5 mM	Primer sens 0,5 mM
Primer anti-sens 0,5 mM	Primer anti-sens 0,5 mM
Matrice : concentration variable	Matrice : concentration variable
H <sub>2</sub> O qsp 20 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O qsp 20 $\mu$ l

La réaction PCR se déroule dans un thermocycleur, et est constituée d'un cycle de base comprenant une étape de 30 s de dénaturation de l'ADN à 98 °C, suivi d'une étape de 30 s d'hybridation des amorces à une température qui varie selon la température de fusion des amorces (typiquement entre 50 et 65 °C, température déterminée entre autre par le % en GC des amorces), pour terminer par une étape d'élongation de l'ADN à 72 °C, qui elle aussi varie selon la taille du fragment à amplifier ainsi que de la vitesse de l'ADN polymérase utilisée (typiquement,  $v = 1 \text{ min} / \text{kb d'ADN}$ ). Ce cycle de dénaturation / hybridation / élongation est répété 20 à 35 fois, et est précédé d'une phase de dénaturation initiale à 98 °C de 5 min, et est suivi par une phase d'élongation finale de 2 min à 72 °C. Une fois la PCR terminée, les produits sont refroidis dans de la glace, puis séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. L'électrophorèse permet de séparer l'ADN suivant sa taille grâce à un courant électrique, en exploitant ainsi la charge négative naturelle de l'ADN. La cuve à électrophorèse contient un tampon TAE 1 X (Tris base 48,4 g.l<sup>-1</sup>, Glycérol 1 %, EDTA pH 8 10 mM), et l'ADN est déposé dans un gel d'agarose (1 à 1,5 % d'agarose, TAE 0,5 X). La migration est réalisée 20 à 30 min,

puis le gel est placé dans un bain d'eau distillée contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium pendant 10 min environ. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant des bases de l'ADN, et a la propriété d'être 20 fois plus fluorescent (couleur rouge-orangée) sous lumière UV lorsqu'il est lié à de l'ADN. Cette propriété permet d'analyser et de photographier les gels de PCR. Les amplicons obtenus lors de la réaction PCR peuvent également être utilisés pour les réactions de clonage, tel que décrit ci-dessous.

### *2.1.3 Purification des fragments d'ADN obtenus par PCR*

Les produits de PCR sont purifiés par chromatographie d'exclusion sur une colonne contenant de la résine Sephacryl S-400 (Sigma), afin d'éliminer les amorces et les dNTP résiduels qui pourraient inhiber la réaction de clonage. Les colonnes de Sephacryl sont réalisées dans un microtube de 0,5 ml à partir de 500 µl d'une suspension de Sephacryl S-400 (dans de l'eau milli-Q), l'ensemble est centrifugé à 2000 rpm pendant 2 min pour éliminer l'eau et ainsi former la colonne. L'ensemble de la réaction PCR (50 µl) est ensuite déposé sur la colonne de séphacryl, qui est placée sur un microtube collecteur de 2 ml, puis la colonne est centrifugée à nouveau à 2000 rpm pendant 2 min. Le fragment PCR, de haut poids moléculaire, est exclu de la résine et est élué directement, tandis que les produits de faible poids moléculaire (amorces et dNTP) pénètrent dans les pores de la résine et sont donc retenus. Le produit PCR purifié peut ensuite être utilisé pour le clonage pJET®.

### *2.1.4 Système de clonage CloneJET*

Le kit CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas) a été utilisé pour toutes les premières étapes de clonage, selon le protocole du fournisseur. Le kit CloneJET est spécialement adapté au clonage des fragments PCR obtenus avec des ADN polymérase à haute fidélité qui génèrent des extrémités franches (« blunt ») (Polymérase Phusion).

Les inserts à extrémités franches sont clonés dans le plasmide pJET1.2 (Figure 27) grâce à l'action d'une T4 DNA ligase (150 ng produit PCR, 1 µL pJET1.2 blunt Cloning Vector 50 ng/µL, 10 µl tampon de réaction 2X, T4 DNA Ligase, eau ultra pure qsp 20 µl, incubation à température ambiante pendant 30 min ou une nuit pour plus d'efficacité). La T4

DNA ligase permet la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 3'-OH et 5'-PO<sub>4</sub> des molécules d'ADN.

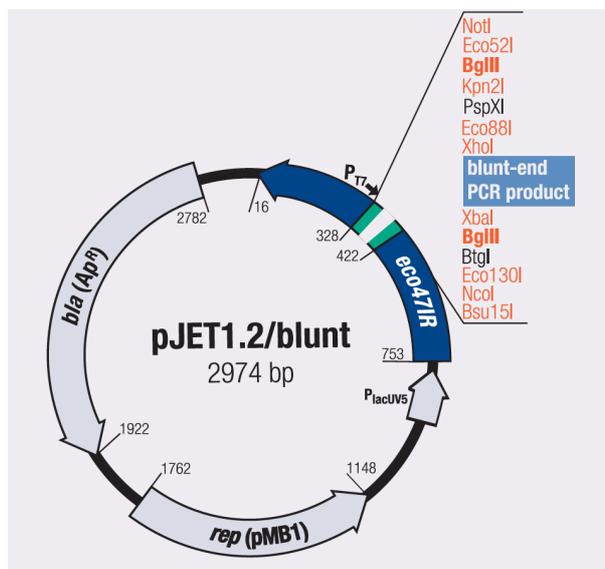


Figure 27 : Schéma du vecteur pJET1.2

Rep(pMB1), site de réplication du pJET1.2 provenant du pMBI ; *bla* (Amp<sup>R</sup>), gène de résistance à l'ampicilline codant pour une β-lactamase ; *eco47IR*, gène létal permettant une sélection négative des bactéries n'ayant pas intégré de fragment d'intérêt ; P<sub>lacUV5</sub>, promoteur P<sub>lac</sub> modifié pour l'expression du gène létal *eco47IR* ; T7 promoter, promoteur T7 de l'ARN polymérase qui permet la transcription de l'insert.

Le produit de la réaction est utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* s. XL1-Blue thermo-compétentes, qui seront par la suite sélectionnées pour leur résistance à l'ampicilline. La technologie pJET permet une double sélection grâce à un gène létal *eco47IR*, permettant d'éliminer les colonies bactériennes contenant le plasmide re-circularisé n'ayant pas intégré d'insert, ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline (apporté par le gène *bla* codant pour une β-lactamase). Cela permet la sélection des colonies bactériennes portant un plasmide avec insert.

Après sélection sur milieu LB solide des clones positifs, une PCR sur colonies est nécessaire afin de valider ou non la présence de l'insert ainsi que sa taille. Les PCR sur colonies sont réalisées dans les mêmes conditions que les PCR standard, avec un couple d'amorces spécifiques de chaque vecteur utilisé (Tableau 8, page 68). A chaque milieu réactionnel est ajouté une très faible quantité de bactéries prélevées à l'aide d'un cône de micropipette en plastique stérile au niveau des colonies à analyser. La quantité de bactéries ajoutées au mix est un élément limitant de l'amplification PCR si une trop grande quantité de matériel est ajoutée.

#### ***2.1.4.1 Purification des plasmides recombinants***

La purification des plasmides contenus dans les clones recombinants positifs est réalisée à l'aide d'un kit de purification Nucleospin®Plasmid (Macherey-Nagel). Pour cela, 4,5 ml de milieu LB liquide contenant les antibiotiques appropriés sont inoculés avec une colonie recombinante préalablement vérifiée par PCR sur colonies (liste des amorces utilisées Tableau 8), et mis à incuber une nuit à 37 °C sous agitation. Le lendemain, les bactéries sont récoltées par centrifugation puis les plasmides sont purifiés selon le protocole du fournisseur.

Les plasmides purifiés sont digérés par des enzymes de restriction afin de confirmer la présence de l'insert et l'intégrité du plasmide, puis ils pourront être séquencés et/ou utilisés pour les étapes de clonage suivantes.

#### ***2.1.4.2 Vérifications des plasmides recombinant par digestion enzymatique***

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui sont capable de reconnaître et de couper l'ADN au niveau d'une séquence spécifique à chaque enzyme – généralement palindromique – appelée site de restriction. Les enzymes de restriction sont utilisées pour les clonages, mais peuvent également servir à valider la présence d'un insert au niveau d'un plasmide. Les enzymes de restriction FastDigest® (Fermentas) permettent une digestion rapide des plasmides en 10 min à 37 °C à raison de 50 ng de plasmide /  $\mu\text{L}$  (1,5  $\mu\text{l}$  FastDigest® Green buffer ; 0,3  $\mu\text{l}$  FastDigest® Restriction enzyme 1 Fast Digest Unit /  $\mu\text{L}$  ; qsp 15  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O, 200 ng de plasmide). L'avantage du FastDigest® Green buffer réside dans le fait que le tampon de charge vert est déjà présent dans le milieu de digestion, ce qui permet un dépôt sur gel d'agarose direct, et donc une analyse des résultats plus rapide.

#### ***2.1.4.3 Vérification des plasmides recombinants par séquençage***

Les plasmides recombinants vérifiés par digestion enzymatique sont, à cette étape de clonage, envoyés au séquençage (Genoscreen) selon les recommandations du prestataire. Les gènes que j'ai clonés durant ma thèse étaient suffisamment petits pour qu'un seul couple d'amorces - dessiné de part et d'autre de la région à séquencer - recouvre la totalité du gène inséré (amorces utilisées Tableau 8). Tous les gènes clonés après amplification par PCR ont été séquencés, de manière à s'assurer qu'aucune mutation n'a été introduite lors de l'amplification. L'entreprise Genoscreen utilise le séquençage d'ADN par la méthode de Sanger (Sanger and Nicklen, 1977), modifiée pour l'utilisation de dNTP couplés à des fluorochromes (Smith et al., 1986). Les séquences sont obtenues grâce à une séparation par électrophorèse capillaire sur un appareil 3730xl DNA Analyzer (Applied biosystems).

Tableau 8 : Liste des amorces utilisées pour le séquençage et les PCR sur colonies.

Nom amorces	Amorces	Utilisation
SeqLA (Vecteurs Gateway™ Sens)	5' - TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC - 3'	Vecteurs Gateway™
SeqLB (Vecteurs Gateway™ Anti-sens)	5' - GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC - 3'	
pJET® Sens	5' - AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG - 3'	Vecteur pJET®
pJET® Anti-sens	5' - CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC - 3'	

## 2.1.5 Système de clonage Gateway™

### 2.1.5.1 Principe

La technique de clonage Gateway™ (Invitrogen) est une méthode rapide et efficace, qui permet de transférer des fragments d'ADN dans une grande variété de vecteur d'expression différents, permettant par exemple l'expression de protéines d'intérêt *in vivo* (études fonctionnelles de gènes *in planta*), ou l'expression de protéines recombinantes dans *E. coli* destinées à la purification (études *in vitro*). Cette technologie est basée sur un système de recombinaison spécifique dérivé du bactériophage lambda (Landy, 1989) ; qui est utilisé afin de permettre l'intégration de fragments d'ADN au niveau des plasmides Gateway™ compatibles. Le passage de fragments d'ADN dans un vecteur d'expression final se fait en deux étapes de recombinaison, il nécessite en effet le passage préalable du fragment d'ADN dans un plasmide donneur intermédiaire. Le fragment PCR qui a été cloné dans un plasmide

pJET® doit être préalablement ré-amplifié à l'aide d'amorces spécifiques permettant d'ajouter en 5' et en 3' du fragment PCR des séquences de recombinaison *attB* (*attB1* et *attB2*) de 15 pb (Figure 28).

La 1<sup>ère</sup> réaction permet de recombiner le fragment PCR flanqué des régions *attB* (*attB1* et *attB2*) avec le plasmide donneur (pDONR) possédant les séquences de recombinaisons *attP* (*attP1* et *attP2*). Cette recombinaison est donc appelée BP. Cela génère un plasmide recombinant contenant les sites *attL* (*attL1* et *attL2*), nommé pENTRY ou clone d'entrée. La réaction est catalysée par un recombinaise spécifique, la BP Clonase™ (1 µL BP Clonase™ II enzyme mix ; TE Buffer : Tris HCl 10 mM, pH 8, EDTA 01 mM ; 150 ng pDONR ; 150 ng fragment PCR ; dans 5 µl H<sub>2</sub>O final), 1 heure ou toute une nuit à 25 °C, puis la réaction est arrêtée par l'addition d'1 µg de Protéinase K (10 min à 37 °C). Le produit de la réaction BP est directement utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* XL1-Blue thermo-compétentes. La sélection des colonies positives se fait par deux mécanismes. Le premier consiste en la sélection positive des bactéries ayant intégré un plasmide donneur ou un plasmide d'entrée, qui confère une résistance à un antibiotique (ex : résistance à la gentamycine pour le pDONR207). Le second mécanisme est un mécanisme de sélection négative assuré par le gène *ccdB*, produisant une toxine qui inhibe fortement l'activité de l'ADN gyrase, nécessaire à la réplication des bactéries. Ce gène est présent entre les sites de recombinaison *attP1* et *attP2* du pDONR et est éliminé en cas de recombinaison BP. En l'absence de recombinaison, le pDONR vide transféré dans les bactéries *E. coli* est létal pour la croissance des bactéries. Ainsi, seuls les vecteurs d'entrée contenant la séquence d'intérêt et ayant donc perdu le gène *ccdB* sont sélectionnés.

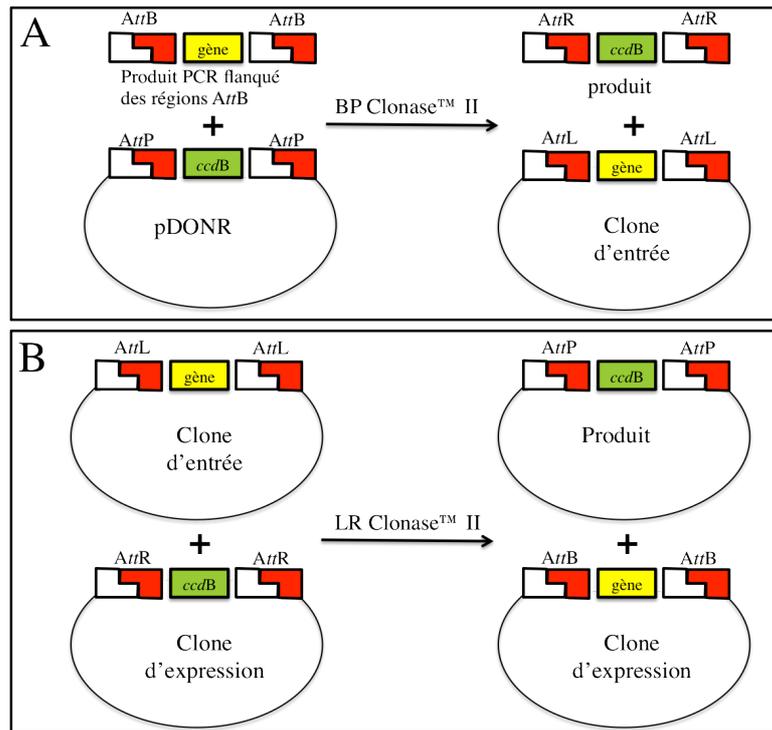


Figure 28 : Principe de la recombinaison homologue Gateway™.

Après sélection des clones positifs, purification des plasmides et vérification par digestion enzymatique, 2 ou 3 clones d'entrée positifs sont séquencés pour s'assurer qu'ils ne contiennent pas de mutation. Les clones d'entrée sont utilisés pour la seconde réaction de recombinaison, la réaction LR, qui permet de transférer le fragment d'intérêt du plasmide d'entrée vers un plasmide de destination. Le principe est similaire à la réaction BP : le clone d'entrée contenant le fragment d'intérêt flanqué des séquences de recombinaison *attL* subit une recombinaison avec le plasmide de destination contenant des séquences de recombinaisons *attR*, au milieu desquelles se situe le gène de sélection négative *ccdB*. Le produit final contenant la séquence d'intérêt est appelé clone d'expression. La réaction de recombinaison est catalysée par la LR Clonase™ (1 µL LR Clonase™ II enzyme mix ; TE Buffer : Tris HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM ; 150 ng clone d'entrée ; 150 ng plasmide de destination; dans 5 µl H<sub>2</sub>O final), 1 h ou toute une nuit à 25 °C, puis la réaction est arrêtée par l'addition d'1 µg de Protéinase K (10 min à 37 °C). Le produit de la réaction sera lui aussi directement utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* XL1-Blue thermo-compétentes. Après purification et vérification par digestion enzymatique, les clones d'expression peuvent être utilisés pour exprimer la protéine d'intérêt dans différents systèmes.

### 2.1.5.2 Vecteurs d'expression Gateway™

Pour l'expression *in planta*, j'ai utilisé des vecteurs d'expression Gateway™ adaptés à l'expression *in planta* (Curtis and Grossniklaus, 2003). Il existe tout un panel de vecteurs d'expression différents selon le but des expériences menées : avec promoteur inductible (promoteur inductible aux œstrogènes, pMDC7) ou non, en fusion N-terminale ou C-terminale avec la GFP (green fluorescent protein, pMDC43 à 45 et 83 à 85) ou GUS ( $\beta$ -glucuronidase, pMDC139 à 141 et pMDC162 à 164) pour les expériences de localisation sub-cellulaire ou tissulaire par exemple. Durant ma thèse, j'ai utilisé principalement les vecteurs pMDC32 et pMDC83, notamment pour les expériences de transformations stable ou transitoire. Le vecteur pMDC83 ayant la particularité de posséder le gène *gfp* en 3' du gène inséré dans le vecteur, codant ainsi pour une protéine de fusion avec la GFP en N-ter (Figure 29).

Pour les expériences d'expression chez *E. coli* destinées à la purification de protéines et les tests enzymatiques *in vitro*, les vecteurs pHNGWA et pHGWA ont été utilisés (Busso et al., 2005). Tout comme pour les vecteurs d'expression *in planta*, il existe une gamme de vecteurs utilisés pour l'expression chez *E. coli*. Par exemple il est possible d'obtenir une protéine d'intérêt en phase avec différents types de fusions telles que la GST (glutathion S-transférase), la MBP (maltose binding protein), la TRX (thioredoxine) ou dans notre cas NusA (N-utilizing substance A). Les protéines de fusion améliorent souvent de façon significative la solubilité des protéines, et l'expertise présente dans le laboratoire à mon arrivée a facilité le choix du vecteur d'expression utilisé, à savoir principalement le vecteur d'expression pHNGWA (Figure 29).

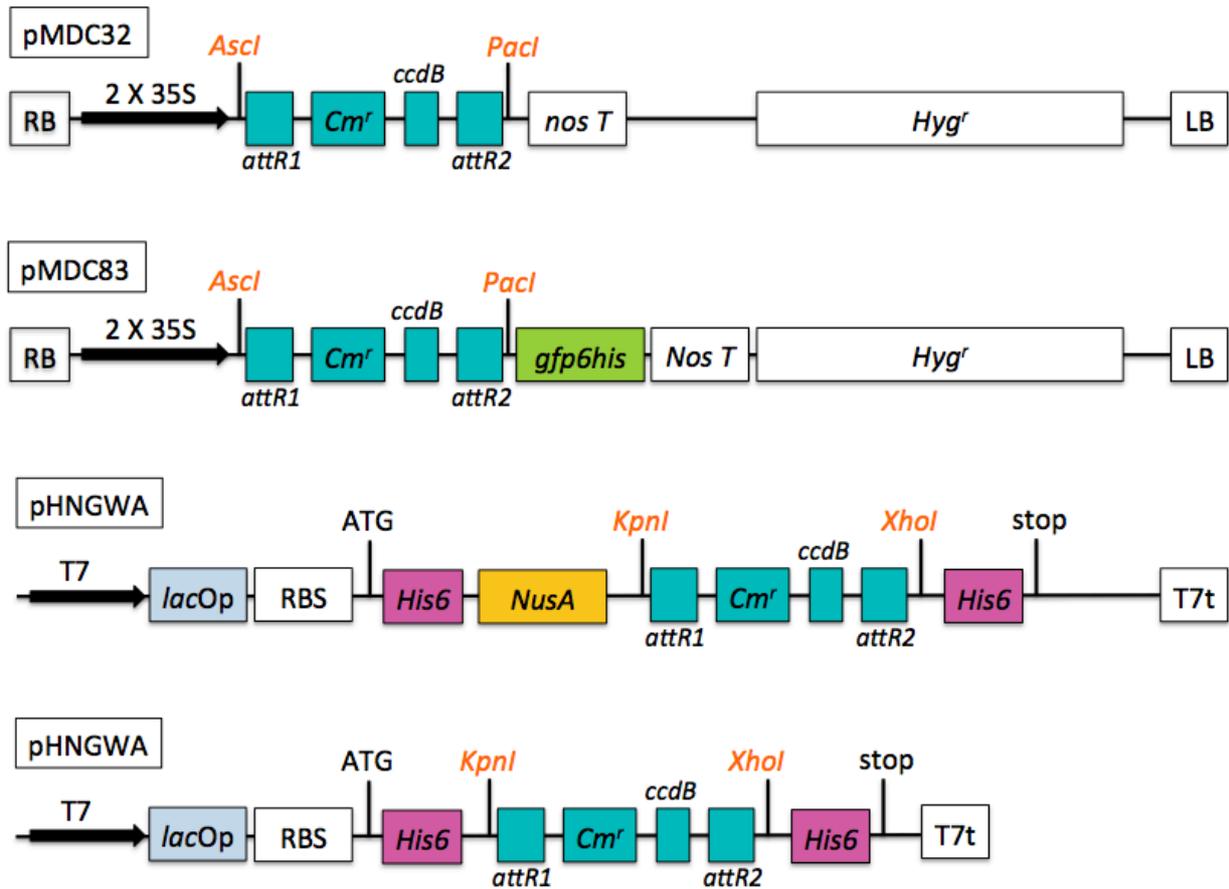


Figure 29 : Vecteurs d'expression Gateway™.

Ce schéma représente la cassette d'expression de chaque vecteur d'expression utilisé au cours de ma thèse. Les vecteurs pMDC32 et pMDC83 sont les vecteurs utilisés pour l'expression *in planta*, ils possèdent un gène de résistance à la kanamycine pour la sélection dans les bactéries. Les vecteurs pHNGWA et pHGWA sont utilisés pour l'expression de protéines chez *E. coli*. RB, right border ; LB , left border ; Nus-A, N-utilizing substance ; His6, étiquette six-histidine ; *ccdB*, inhibiteur de l'activité ligase de la gyrase, utilisé pour la sélection des plasmides vides; *lacOp*, *lac* operator ; RBS, ribosome binding site ; *Hyg<sup>R</sup>*, gène de résistance à l'hygromycine ; *Cm<sup>R</sup>*, gène de résistance au chloramphénicol ; 2X35S, promoteur double 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur ; *Nos T*, Termineur nos ; T7, promoteur T7 ; T7t, terminateur T7 ; *attR1* et *attR2* : régions recombinantes du système Gateway™ ; *KpnI*, *XhoI*, *AsclI*, sites de restriction.

## 2.1.6 Liste des amorces

### 2.1.6.1 Amorces pour le clonage pJET

Tableau 9 : Amorces pour le clonage des ROMT à partir de l'ADN génomique.

\* Amplifie également la ROMT2, \*\* Amplifie également la *VvROMT9*, \*\*\* Amplifie également *VvROMT1-2-10-5-7*

ROMT clonée	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille amplicon Gène cloné
<i>VvROMT1</i>	AATCAGCGGTAAGAGATCG GTGTGAGATACATG***	TGCCCAATCAAACGGAGCA AGAACCATCTTAATC*	1548 pb <i>VvROMT2 et 1</i>
<i>VvROMT2</i>	AATCAGCGGTAAGAGATCG GTGTGAGATACATG***	GAGCAAGAACCATCTTAATC TCAGCAGACTTTGTGAA et GCTGAGATTAAGATGGTTCT TGCTCCGTTTGATTG	1528 pb <i>VvROMT2</i>
<i>VvROMT4</i>	CTTTATTTAGAGATCAGGGT GTGAGACATGGATTT **	AACACACAAATTTGGAAAT ATTACTACCGATAGATATTT A	1348 pb Allèle <i>VvROMT9</i> ?
<i>VvROMT5-7</i>	AATCAGCGGTAAGAGATCG GTGTGAGATACATG***	GGGAAAAACATAAAGAATG AGATTCAAATAACAAGTAAT TTTTC	1804 pb <i>VvROMT5 et 7</i>
<i>VvROMT6</i>	CCTTAGAGATCAGGGTGTGA GACATGGATTTG	GAGTTTATTAACACACAAA TTTGAAATATTTATCAAGG	1335 pb <i>VvROMT6</i>
<i>VvROMT9</i>	CTTTATTTAGAGATCAGGGT GTGAGACATGGATTT	CACTCTGGTTCTAATAATAC ATTTTCATAGAAG	1516 pb <i>VvROMT4</i>
<i>VvROMT10</i>	AATCAGCGGTAAGAGATCG GTGTGAGATACATG***	GAAGAAAGATGAACAGTAC TTCTGCCCAATCAAACAGA	1595 pb <i>VvROMT10</i>
<i>VvROMT11</i>	CACTCTACATGATTGGTAT GGGTTTATGCACTTAAAAGA	CTCACCTCACAAAATACCT ATGCAATTTTAAAACAAC	1982 pb <i>VvROMT11</i>
<i>VvROMT12</i>	ATAAGCAGCTTAATTCTCCG ATCAGGGTGAGGTA	CGAACACAACTTGATAGG GTCCTGATCTCCAA	2201 pb Pas d'amplification
<i>VvROMT14</i>	CACACATGATTTTTGAAATT TATATTTTCAAGTGTGAGG	ACCGGCGAATTTAATATTAC AGAAAATGACATGCA	1617 pb <i>VvROMT14</i>
<i>VvROMT15-17</i>	TAGCAGCGTAAGAGGTCA GTGTGAGGTA	GGTCAATTGTTTCGACACAC AACTGAGTAC	1803 pb Echec du clonage

### 2.1.6.2 Amorces utilisées pour le clonage Gateway<sup>TM</sup>

Tableau 10 : Amorces utilisées pour le transfert des ROMT dans le système Gateway<sup>TM</sup>. Les amorces sens sont représentées sur fond blanc, les anti-sens sur fond bleu clair. L'amorce attB2-ROMT2/5/7/10/12/14/14-stop permet d'amplifier un grand nombre de ROMT, grâce à la forte conservation de l'extrémité 3' des gènes.

Amorce Gateway <sup>TM</sup>	Amorces
<b>attB1-THR-ROMT2/10</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTTCCGCGTGGATC AATGGATTTGGCAAACGGTGAGATATCAGCT
<b>attB1-THR-ROMT4</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTTCCGCGTGGATC AATGGATTTGGCAAATGGTGGGAGATCTAGT
<b>attB1-THR-ROMT5/7</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTTCCGCGTGGATC AATGGACTTCGCAAACGGTGAGATATCAGCT
<b>attB1-THR-ROMT6</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTTCCGCGTGGATC AATGGATTTGGCAAATGGTGAGAGATCTAGTG
<b>attB1-THR-ROMT11</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTTCCGCGTGGATC AATGTTTATAATATTAGGACCCACTCTTATACACATAACT
<b>attB1-THR-ROMT12</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTTCCGCGTGGATC AATGGATTTGGAAAGTGTTGAGACATCCAGTGA
<b>attB1-THR-ROMT13</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTTCCGCGTGGATC AATGGCTTTGGCAGTTGGTGAGACATCG
<b>attB1-THR-ROMT14</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTTCCGCGTGGATC AATGGATCCGGCAAAGGGTGAGATATCAAGT
<b>attB2-ROMT2/5/7/10/12/ 13/14-stop</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAGGATAAACCTCA ATGAGGGACCTCAA
<b>attB2-ROMT11-stop</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAATGAGGGACCTCA AACCCAAAATGG

### 2.1.6.3 Amorces pour les RT-PCR

Tableau 11 : Amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR, certains primers amplifient plusieurs ROMT.

Amorce	Amorce sens	Amorce antisens
<b><i>VvROMT1-2-5-7-10</i></b>	GCTGAGCTGCTTCATGCTCA	GGACTTGTAGTCTCCTTGATTCT
<b><i>VvROMT4-6-9</i></b>	TGTCCGTCGGAATAAGACACT	GAATCGCCATGTCTATGATCAT
<b><i>VvROMT11</i></b>	TAATATTAGGACCCACTCTTATAC AC	GGACTTGTAGTCTCCTTGATTCT
<b><i>VvROMT12</i></b>	GTTTGGTGCGTTTACCGTCT	CCTTTAAACATGTCGCCTCC
<b><i>VvROMT13</i></b>	AGAGAAGACGAAATGCGTGTACC	AATGTTCCCTCTCTTGGCCCGTT
<b><i>VvROMT14-15-17</i></b>	TGTTCTTGTTCAATCTGACTTCTT	GGGAAACACAGCTGTTCTTC

### 2.1.6.4 Amorces pour la qRT-PCR

Tableau 12 : Amorces utilisées pour les expériences de qRT-PCR.

Les amorces marquées avec un \* sont des amorces spécifiques au gène indiqué dans la première colonne. Tout comme pour les RT-PCR, certaines amorces permettent l'amplification de plusieurs gènes.

Amorce	Amorce sens	Amorce anti-sens
<b><i>VvROMT1-2</i></b>	CAGTCACTACAAGATAACTCCCATT	<i>AGCAGACTTTGTGAATTAACCATG*</i>
<b><i>VvROMT3</i></b>	GCAAATCCAGAGAAACACAGC*	<i>AGCATGGGTGTTCTTGTAGTGA</i>
<b><i>VvROMT4-9</i></b>	TGGCATTATGTAAGTGCTTGG*	<i>ACCTCGGTTTCATGGCAAC</i>
<b><i>VvROMT6</i></b>	CCTTCTTGCTACTGCTCGAC*	<i>ATGGCAACCATAATCCCAA</i>
<b><i>VvROMT8</i></b>	GGAGACTGCAAATCCTGAGAA	<i>AATCCCCCATCTTTCTCC*</i>
<b><i>VvROMT5-7</i></b>	GGTTTGAGGTCCTCATTG	<i>CCATCTTAATCATAGCAGACTTTGAG*</i>
<b><i>VvROMT10</i></b>	GGTTTGAGGTCCTCATTG	<i>TCATTACTCCAAAACAAACACAGA*</i>
<b><i>VvROMT11</i></b>	AAGAATCAAGGAGACTACAAGTCC A	<i>CTAGCTCCCATTCGTTCTCG*</i>
<b><i>VvROMT12</i></b>	GTTTGGTGCGTTTACCGTC*	<i>GCCTAGAGGCATGTGTAAGCA</i>
<b><i>VvROMT13</i></b>	CCAAGAGAGGAACATTAAGACTG*	<i>CCTCGATGAGAGACCTTAAACC*</i>
<b><i>VvROMT14-15-17</i></b>	GGAACCACATATTCAATTCGTC*	<i>AGGAAGAGTCATGGGCTTGC</i>

## 2.2 Analyse fonctionnelle

### 2.2.1 Matériel microbiologique

#### 2.2.1.1 Préparation des agrobactéries compétentes

La compétence des agrobactéries se traduit par la capacité de celles-ci à intégrer de l'ADN exogène, selon un protocole adapté de (Weigel and Glazebrook, 2006). Ce protocole se réalise sur trois à quatre jours. Dans un premier temps, la souche conservée en stock glycérol à -80 °C est mise en culture solide sur un milieu LB contenant les antibiotiques adéquats (varie selon la souche, cf tableau). Après un à deux jours de culture à 28 °C, une colonie isolée sert à ensemer 5 ml de milieu LB liquide contenant les mêmes antibiotiques, cette pré-culture est placée une nuit sous agitation à 28 °C. Après incubation, elle servira à ensemer une culture de 200 ml de milieu LB liquide supplémenté des mêmes antibiotiques. Cette culture est ensuite incubée à 28 °C jusqu'à une  $DO_{600nm}$  de 0,3 à 0,4 (ce qui équivaut à environ à  $1,2 \cdot 10^8$  agrobactéries). Arrivée à cette valeur, la culture est transférée dans un flacon de 250 ml préalablement refroidi, puis disposée dans de la glace environ 30 min afin de stopper totalement la croissance des agrobactéries. Une fois la culture refroidie, les agrobactéries sont centrifugées 10 min à 5 000 rpm à 4 °C. Le surnageant éliminé, le culot est remis en suspension dans 20 ml de tampon préalablement refroidit à 4 °C (tampon : 1 mM HEPES, pH 7, stérilisé par filtration). Cette étape est répétée 3 fois afin d'éliminer les traces de milieu LB et d'antibiotiques de la culture. Après le troisième lavage, les agrobactéries sont reprises dans 2 ml de glycérol à 10 %. La préparation est ensuite répartie dans des microtubes préalablement refroidis, par 40  $\mu$ l, puis les tubes sont congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80 °C.

#### 2.2.1.2 Transformation des agrobactéries par électroporation

La transformation des agrobactéries est effectuée par électroporation. Pour cela, un maximum de 100 ng d'ADN plasmidique est ajouté à 40  $\mu$ l d'une solution d'agrobactéries compétentes provenant d'un stock glycérol 10 %. Le mélange est placé dans un eppendorf puis refroidit sur glace environ 10 min jusqu'à refroidissement complet de la solution, ce qui permet à l'ADN plasmidique de s'adsorber sur les membranes des agrobactéries. La solution est ensuite transférée dans une cuve à électroporation préalablement refroidie (cette précaution permet d'éviter au maximum la formation d'un arc électrique lors du processus

d'électroporation, qui viendrait détruire les cellules bactériennes). La cuve est ensuite placée dans un électroporateur. L'électroporation se fait à une tension de 2,4 kV, une capacité de 25  $\mu$ F et une résistance de 200  $\Omega$ . L'électroporation provoque des pseudo-pores dans la membrane des agrobactéries par lesquels les plasmides pourront pénétrer. Après transformation, les agrobactéries sont reprises dans 1 ml de milieu LB liquide, placées dans un tube de culture de 20 ml et incubées 4 h sous agitation à 28 °C. Ce délai d'incubation permet aux agrobactéries ayant été transformées d'exprimer le gène de résistance contenu dans le vecteur utilisé pour la transformation, les 4 h d'incubation étant nécessaires en raison du faible temps de génération des agrobactéries. Après incubation, les agrobactéries sont centrifugées 2 min à 4 500 rpm, puis le culot est resuspendu dans 100  $\mu$ l de milieu LB liquide avant d'être étalé sur un milieu LB solide supplémenté des antibiotiques permettant de sélectionner le vecteur d'intérêt. Les boîtes de culture sont incubées à 28 °C pendant 1 à 3 jours selon la vitesse de croissance des agrobactéries.

## 2.2.2 Transformation de *N. benthamiana*

### 2.2.2.1 Expression transitoire chez *N. benthamiana*

L'expression transitoire par agro-infiltration est une méthode de choix pour analyser la fonction d'un ou de plusieurs gène(s), ou étudier les voies de biosynthèse de certains métabolites secondaires. Cette méthode consiste à infiltrer des feuilles de *N. benthamiana* à l'aide d'agrobactéries, qui transforment les cellules du mésophylle et de l'épiderme foliaire. Les cellules ayant intégrées une ou plusieurs copies du/des ADN-T expriment alors le ou les gène(s) d'intérêt(s), et ses effets sont potentiellement quantifiables.

#### *Préparation des agrobactéries*

Une colonie isolée d'agrobactéries transformées est mise en culture dans 15 ml de milieu LB, contenant les antibiotiques adéquats, puis incubée une nuit, à 28 °C sous agitation. Le lendemain, la culture est centrifugée 10 min à 5 000 rpm, puis le culot est repris dans 40 ml de tampon d'infiltration (MgCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ M, acétosyringone 100  $\mu$ M), avant d'être re-centrifugé 10 min à 5 000 rpm. Le culot est ensuite repris dans un volume final choisi pour obtenir une DO<sub>600nm</sub> de 0,4 par construction infiltrée.



Figure 30 : Infiltration d'une feuille de *N. benthamiana*

#### *Infiltration des feuilles*

La solution d'agrobactéries est ensuite infiltrée par la face abaxiale des feuilles de *N. benthamiana* âgées d'environ 5 semaines, à l'aide d'une seringue sans aiguille (Figure 30). Une petite zone doit préalablement être lésée à l'aide d'une aiguille ou d'un cône fin afin de permettre une diffusion efficace de la solution d'agrobactéries dans la totalité de la surface foliaire. Les feuilles infiltrées sont en général les feuilles les plus jeunes, mais avec une surface suffisamment grande pour avoir assez de matériel végétal à analyser par la suite (environ 20 cm<sup>2</sup>). Deux à trois feuilles par plant sont infiltrées. Après infiltration, les feuilles sont délicatement séchées à l'aide d'un papier absorbant puis les plants sont disposés dans une mini-serre placée en chambre de culture végétale pendant quatre jours maximum (passé ce délai, la quantité de protéines surexprimées tend à diminuer). Dans le cadre de l'expression des STS et des ROMT, une co-infiltration avec un vecteur permettant l'expression de P19 (suppresseur de silencing du Tomato bushy stunt virus ou TBSV) est nécessaire dans certains cas, afin de limiter au maximum l'effet du silencing.

#### *Collecte des feuilles*

Après quatre jours d'incubation, les feuilles sont collectées en deux parties :

- 300 mg sont utilisés pour réaliser les extractions de métabolites

- 300 mg sont utilisés pour mesurer le poids sec de l'échantillon, après incubation à 75 °C pendant une nuit. Le poids sec permettra d'obtenir des valeurs de concentration en métabolites relatives à la masse de matière sèche.

#### 2.2.2.2 Transformation stable de *N. benthamiana*

La transformation de se fait selon une procédure adaptée du protocole de Sparkes (Sparkes et al., 2006). Des feuilles de *N. benthamiana* infiltrées (protocole 2.2.2.1 page 77) sont utilisées 3 jours post-infiltration. Les feuilles sont préalablement stérilisées 10 min dans une solution de stérilisation (1/2 Hypochlorite 4-6 % ; 1/2 H<sub>2</sub>O ; Tween 20 0,01 %), avant d'être rincées successivement dans 3 béciers contenant de l'eau ultra pure stérile. Les feuilles sont ensuite découpées en sections de 1 à 2 cm<sup>2</sup> puis disposées sur des boîtes de culture contenant du milieu favorisant le développement de feuilles (« shooting media », Tableau 13), supplémenté des antibiotiques adéquats pour la sélection de l'ADN-T contenant le transgène. Les boîtes de cultures sont incubées dans une chambre rotative. Après 1 mois de culture avec un repiquage hebdomadaire, les sections de feuilles présentent normalement plusieurs cals sur lesquels se développent de jeunes feuilles. Une fois que les feuilles ont atteint une taille d'environ 1 cm, celles-ci sont détachées délicatement puis transférée sur un milieu de culture favorisant la formation de racines (« rooting media » ; Tableau 13), supplémenté avec les antibiotiques adéquats. Après deux semaines de culture, les racines apparaissent au niveau des plantules transgéniques, et une fois arrivés à une taille suffisante (5 à 10 cm), les jeunes plants sont acclimatés en terre. Pour cela, les plantules sont délicatement extraites des tubes de culture et un maximum de gélose est retiré au niveau des racines, afin de pouvoir repoter les plantules facilement en terre. Les plantules sont ensuite placées en terre sous mini serre mi-close pendant 2 jours, puis la mini-serre est peu à peu ouverte les jours suivants avant d'être retirée complètement. Les plantes sont cultivées jusqu'à floraison et formation des fruits, puis séchées par déshydratation du terreau afin de pouvoir récolter les graines des capsules.

Tableau 13 : Milieux de culture utilisés pour la transformation stable de *N. benthamiana*.

	« Shooting media »	« Rooting media »
Milieu MS + Vitamines	2,15 g	
Auxine (Acide $\beta$ -indole butyrique)	0,1 mg.l <sup>-1</sup>	0,5 mg.l <sup>-1</sup>
Cytokinine (6-Benzylaminopurine)	0,8 mg.l <sup>-1</sup>	
Carbénicilline	500 mg.l <sup>-1</sup>	500 mg.l <sup>-1</sup>
Ticarcilline	0,2 mg.l <sup>-1</sup>	0,2 mg.l <sup>-1</sup>
PPM <sup>TM</sup> (Plant Preservative Mixture, fongicide/biocide à large spectre pour culture végétales)	1 ml	1 ml
<u>Antibiotiques de sélection</u>		
Kanamycine	50 mg.l <sup>-1</sup>	50 mg.l <sup>-1</sup>
ou		
Hygromycine	15 mg.l <sup>-1</sup>	15 mg.l <sup>-1</sup>

### 2.2.2.3 Obtention de racines transgéniques ou « hairy roots »

J'ai mis au point ce protocole en m'inspirant de plusieurs protocoles de transformation de racines de vigne et d'arachide (Cutanda-Perez et al., 2009 ; Medina-Bolivar et al., 2007; Cutanda-Perez et al., 2009; Torregrosa and Bouquet, 1997).

#### Préparation des agrobactéries

Une colonie isolée d'agrobactéries ARqua1 transformées est mise en culture dans 15 ml de milieu LB, contenant les antibiotiques adéquats, puis incubée une nuit à 28 °C sous agitation. Le lendemain, la culture est centrifugée 10 min à 5000 rpm, puis le culot est repris dans 40 ml de tampon (milieu MS avec vitamines 2,15 g/l, acétosyringone 50  $\mu$ M), avant d'être re-centrifugé 10 min à 5 000 rpm. Le culot est ensuite repris dans un volume final choisi pour obtenir une DO<sub>600nm</sub> finale de 1,3.

#### Inoculation des agrobactéries au niveau des tiges

La régénération de racines est réalisée à partir de tiges de *N. benthamiana* âgés d'environ 5 semaines. Les tiges sont coupées en sections d'environ 4 cm de longueur, chaque

section est composée de deux entre-nœuds comprenant un nœud avec une feuille et son bourgeon axillaire. La feuille est retirée en prenant soin de ne pas endommager le bourgeon axillaire. Les sections sont préalablement stérilisées 10 min dans une solution de stérilisation (1/2 Hypochlorite 4-6 % ; 1/2 H<sub>2</sub>O ; Tween 20 0,01 %), avant d'être rincées successivement dans 3 béchers contenant de l'eau ultra pure stérile. Après stérilisation, les extrémités des sections blanchies par la solution d'hypochlorite doivent être retirées. L'extrémité supérieure de la tige est ensuite abîmée et légèrement écrasée sur 1 cm maximum, à l'aide d'une pince crantée. L'extrémité endommagée est ensuite immergée brièvement dans la solution d'agrobactéries, en prenant soin à ne pas contaminer les autres parties de la section. Les sections de tiges sont ensuite placées dans des tubes de culture *in vitro* contenant du milieu MS (milieu MD 2,15 g/l ; PhytoAgar 0,8 % w/v; saccharose 3 % w/v; pH 5,2; 1 ml de PPM<sup>TM</sup>). Les racines transgéniques apparaissent au bout de deux semaines, et sont détachées des tiges au bout d'un mois environ, afin d'être transférées sur un milieu solide sélectif (boîtes de Petri). Les racines colonisent les boîtes de Petri en 1 à 2 mois environ, leur vitesse de croissance étant relativement lente.

### 2.2.3 Transformation stable de *A. thaliana*

#### 2.2.3.1 Technique du « floral dip »

##### *Préparation des plants*

Les plants d'*A. thaliana* utilisés pour les transformations stables sont âgés d'environ cinq semaines, leurs premières inflorescences sont coupées dès leur apparition, vers environ quatre semaines, afin de stimuler la croissance des bourgeons floraux axillaires, ce qui permettra au final d'obtenir deux voire trois hampes florales par plant. Les plants d'*A. thaliana* sont également plantés par trois dans un même pot afin d'augmenter le nombre d'inflorescences.

##### *Préparation des agrobactéries*

Après l'obtention d'agrobactéries transformées (protocole 8.2.3), une colonie isolée est mise en pré-culture dans 5 ml de milieu LB contenant les antibiotiques adéquats. La pré-culture est incubée une nuit à 28 °C sous agitation (250 rpm), puis est utilisée pour ensemercer 200 ml de milieu LB complété des antibiotiques adéquats, lui-même incubé une nuit à 28 °C sous

agitation (250 rpm). Le lendemain, les agrobactéries sont centrifugées dans des tubes de 250 ml, 20 min à 4500 rpm, puis les culots sont repris dans un solution de saccharose 5 % supplémentée de Silwet L-77 0,05 %. Le Silwet L-77 est un agent mouillant qui permettra à la suspension d'agrobactéries de mieux pénétrer dans les inflorescences d'*A. thaliana* favorisant ainsi le contact entre les agrobactéries et les cellules végétales.

#### *Inoculation des agrobactéries et suivi*

Les inflorescences préalablement débarrassées de leurs siliques et de leurs fleurs ouvertes sont trempées dans la solution d'agrobactéries pendant environ 5 à 10 secondes sous légère agitation manuelle. Après avoir égoutté les inflorescences sur une feuille de papier absorbant, les plants sont placés en chambre de culture, dans une mini-serre mi-close afin de maintenir un taux d'humidité élevé favorisant la mobilité des agrobactéries et donc le processus d'infection. Le lendemain, la mini-serre est ouverte petit à petit puis les plants sont transférés dans des bacs. C'est une transformation au niveau des cellules-mère des grains de pollen ou des cellules-mère des ovules qui permettra *in fine* l'obtention de graines transgéniques.

#### *Récolte et stockage des graines*

Environ trois à quatre semaines après transformation, l'arrosage est interrompu et les plantes sont mises à sécher. Les hampes florales sont disposées préalablement dans des sachets plastiques avant dessiccation totale de la plante. Les graines sont récoltées à l'aide de tamis successifs. Le tamisage permet de séparer le matériel végétal indésirable (siliques, tiges, feuilles, résidus floraux ...) des graines, qui seront ensuite conservées à l'obscurité et à température ambiante dans un microtube.

#### **2.2.3.2 Stérilisation des graines et sélection *in vitro***

Les graines sont incubées avec 1 ml d'une solution de stérilisation (9 volumes d'éthanol 95 %, 1 goutte de tween 20, 1 volume de solution d'eau de Javel : 1 pastille de Javel dans 40 ml d'eau ultra pure), pendant 6 minutes sous agitation permanente. Après stérilisation, les graines sont lavées 2 fois avec 1 ml d'EtOH 95 % afin d'éliminer l'eau de Javel. Après le 2<sup>ème</sup> lavage, les graines sont débarrassées de l'éthanol puis re-suspendues dans de l'eau ultra pure stérile avant d'être disposées en quadrillage sur des boîtes de Petri contenant du milieu MS supplémenté de l'antibiotique adéquat. Les cultures sont disposées dans l'incubateur rotatif le

temps de la germination et de l'apparition des transformants, 2 à 3 semaine après semis. Les plantules ne possédant pas dans leur génome au moins une copie d'ADN-T provenant des vecteurs utilisés pour la transformation jaunissent au bout de 2 à 3 semaines. Les transformants, au contraire, se développent normalement (si absence de phénotype particulier issu de la transformation, ou insertion de l'ADN-T dans un gène essentiel à la survie de la plante).

### **2.2.3.3 Suivi des transformants**

Une fois les plantules suffisamment grandes, celles-ci sont replantées en terre puis disposées en chambre de culture végétale (phytotron). Les graines de la génération T0 sont récoltées puis re-sélectionnées pour leur résistance à l'antibiotique sélectif. Si la première sélection a été efficace, on observe normalement au niveau de la génération F1 une ségrégation mendélienne de type 1/4 homozygotes résistants, 1/4 homozygotes sensibles, et 1/2 hétérozygotes résistants, dans le cas où un seul événement d'insertion de l'ADN-T dans le génome a eu lieu. Dix plantes résistantes sont sélectionnées puis montées à graine. Les dix génotypes sont ensuite re-testés *in vitro* pour la résistance à l'antibiotique sélectif. Seuls les génotypes montrant une ségrégation de type 100 % résistants à la génération suivante sont homozygotes pour le transgène ; ces plantules forment la « lignée pure », et pourront ainsi être utilisées pour les différentes expérimentations.

## **2.3 ARN : qPCR et RT-PCR**

### **2.3.1 RT-PCR semi-quantitative**

#### **2.3.1.1 Extraction des ARN**

L'extraction des ARN de plantes herbacées (*N. benthamiana*, *A. thaliana*) est réalisée avec le Kit Qiagen RNeasy Plant MiniKit, selon le protocole du fournisseur (comprenant la digestion de l'ADN avec la DNase Qiagen). Les échantillons sont préalablement broyés dans l'azote liquide en une poudre fine.

Pour l'extraction d'ARN de vigne, ce protocole est légèrement modifié puisque la vigne est très riche en composés phénoliques qui interfèrent avec la purification de l'ARN. Les échantillons de vigne préalablement broyés sont repris dans 600 µl de tampon de lyse (Tampon

RLT Qiagen, 1% mercaptoéthanol, 2,5% PVP), puis vortexés jusqu'à homogénéisation complète de l'échantillon. Après homogénéisation, la solution est additionnée de 60 µl de Sarkosyl 20 % (détergent), puis placée dans un bain-marie à 70 °C pendant 10 min. Les échantillons sont vortexés toutes les minutes durant l'incubation. Le reste du protocole se déroule à l'identique du protocole du fournisseur.

### 2.3.1.2 RT-PCR

Le kit Promega « Reverse Transcription System » a été utilisé pour les RT-PCR. La quantité d'ARN de chaque lot utilisée pour la réaction de rétro-transcription est normalisée à 1 µg afin d'obtenir les mêmes quantités d'ADNc finales. La RT-PCR semi-quantitative est réalisée selon les modalités détaillées dans le Tableau 14 ci-dessous.

Tableau 14 : Conditions utilisées pour les RT-PCR semi quantitative

Milieu réactionnel pour la RT-PCR semi-quant.	Cycle PCR
Taq polymérase 1,5 U	94 °C 1 min
Tampon PCR 1 X	94 °C 15 s
dNTP 200 µM chacun	Δ °C 30 s
Primer sens 0,5 mM	72 °C 2 min
Primer anti-sens 0,5 mM	4 °C ∞
ADNc 1 µL (environ 50 ng)	
H <sub>2</sub> O qsp 10 µl	

## 2.3.2 PCR quantitative

### 2.3.2.1 Préparation du matériel végétal

Les expériences de PCR quantitatives ont été réalisées sur des feuilles de *V. vinifera* var. PN40024 infectées ou non par le mildiou. Pour cela, les feuilles 5 et 6 en partant de l'extrémité d'un rameau feuillu de vigne sont prélevées. Si les feuilles sont trop jeune, *P.*

*viticola* ne s'y développera pas, et si les feuilles sont trop âgées, elles sont résistantes (résistance ontogénétique, liée à l'âge). Les feuilles sont ensuite immergées soit dans une solution d'eau ultra pure (témoin), soit dans une suspension de sporanges de *P. viticola* cv. Resdur à raison d'environ  $10^4$  sporanges / ml. Après une heure d'immersion, les feuilles sont placées dans des boîtes de Petri larges dans lesquelles est disposé un papier filtre humidifié avec de l'eau (Figure 31). Les feuilles sont ensuite prélevées directement (T = 0 h), à 12 h, 24 h, 48 h et 72 h post-traitement, puis congelées dans de l'azote liquide et stockées à -80 °C. L'ARN des feuilles est ensuite extrait puis convertit en ADNc.

Les sporanges de *P. viticola* sont multipliés sur *V. vinifera* cv. Muscat Ottonel, une variété de vigne très sensible au mildiou. Cette expérience a été réalisée grâce à la collaboration avec l'équipe GAV (Génétique et amélioration de la vigne) de l'INRA de Colmar, qui possède l'expertise et les équipements nécessaires aux expériences d'inoculation de champignons phytopathogènes de la vigne, utilisées par exemple pour les phénotypages de populations de vigne.



Figure 31 : Feuille de *Vitis vinifera* var. PN40024 non inoculée

### **2.3.2.2 PCR quantitative en temps réel**

La PCR en temps réel repose sur la détection de la fluorescence émise par un fluorophore lié à l'ADN, au cours de chaque cycle d'amplification. Le fluorophore utilisé est le SybrGreen, capable de se lier à l'ADN et d'émettre une fluorescence uniquement lorsqu'il est intégré dans l'ADN double brin de façon aspécifique. Au cours de la phase exponentielle de la PCR, la fluorescence sera directement proportionnelle à la quantité d'amplicons formés, mais aussi à la quantité de matrice initiale. Le système optique couplé au thermocycleur iCycler

System (Biorad) permet de détecter à chaque cycle d'amplification la fluorescence du SybrGreen. Les données de fluorescence sont transmises au logiciel MyIQ (Biorad) qui détermine un cycle « seuil », Ct (Threshold Cycle), pour lequel le signal fluorescent émis est supérieur au bruit de fond. Le Ct sera donc d'autant plus faible que la quantité de matrice cible initiale sera élevée.

Dans chaque puit ont été déposés 5  $\mu$ L d'ADNc dilués (équivalent à 10 ng d'ARN totaux), 12,5  $\mu$ L de SybrGreen Supermix (Biorad) et 200 nM de chaque amorce, pour un volume final de 25  $\mu$ L. Chaque réaction a été réalisée en triplicat. Pour chaque plaque, un témoin sans matrice ainsi qu'une gamme étalon de la matrice cible ont été déposés. Pour établir la gamme étalon de chaque fragment cible, celui-ci a été amplifié par PCR puis dosé par spectrophotométrie (Nanodrop). Le nombre de chaque nucléotide a permis d'établir la masse molaire de l'amplicon ainsi que la concentration de l'amplicon en nombre de copies /  $\mu$ L. La gamme étalon a enfin été ajustée par dilution en cascade au 1/10<sup>ème</sup> pour déposer de 10<sup>8</sup> à 10<sup>2</sup> copies. La pente de la droite établie grâce à la gamme étalon a permis de vérifier l'efficacité de la PCR : Efficacité (E) = 10<sup>-1/pente</sup> Celle-ci doit être comprise entre 80 et 100%. De plus, le coefficient de corrélation de cette droite doit être supérieur à 0,990. La liste des amorces utilisées est indiquée dans l'annexe 2.

Le programme du thermocycleur est le suivant : dénaturation initiale : 95 °C pendant 30 s ; 40 cycles composés chacun d'une dénaturation à 94 °C pendant 15 s, d'une hybridation à 60 °C pendant 15 s et d'une élongation à 72 °C pendant 15 s ; l'acquisition de la fluorescence est réalisée à 77 °C pendant 10 s ; une courbe de fusion est réalisée de 55 °C à 95 °C, avec un pas de 0,5 °C toutes les 10 s. Cette courbe de fusion permet de déterminer le T<sub>m</sub> de l'amplicon, de vérifier l'absence d'amplification non spécifique et lors des premiers essais, de fixer la température d'acquisition afin d'éviter de prendre en compte la fluorescence émise par d'éventuels dimères formés par les amorces. Les températures d'acquisition étaient de 77 °C pour chaque gène.

Les résultats de PCR en temps réel ont été analysés selon la méthode décrite par Pfaffl et al. (2001), selon la formule indiquée ci-dessous. L'expression de chaque gène d'intérêt (GOI) a été normalisée par rapport au gène codant pour le facteur d'élongation 1 de vigne (*VvEFI*). Le taux d'expression relatif de chaque gène d'intérêt (gene of interest, GOI) a été calculé entre les conditions inoculées et les plantes au temps 0 de l'expérience. Le calcul tient compte de l'efficacité (E) de PCR qui peut varier d'un gène à l'autre.

$$\text{Taux expression relatif} = \frac{(1 + E_{GOI})^{\Delta Ct(\text{Eau} - \text{inoculé})}}{(1 + E_{V_{ACT}})^{\Delta Ct(\text{Eau} - \text{inoculé})}}$$

Où E : Efficacité de la PCR ;  $\Delta Ct$  : Différence entre le cycle seuil pour la condition témoin (ex : eau) et le cycle seuil pour l'autre condition (ex : inoculé).

## 2.4 Protéines : purification de protéines et tests enzymatiques

### 2.4.1 Matériel microbiologique et vecteurs utilisés

Pour l'expression de protéines, j'ai utilisé les vecteurs d'expression Gateway™ : pHNGWA et pHGWA. Le vecteur pHNGWA permet d'obtenir après insertion du gène d'intérêt, une protéine de fusion avec la protéine NusA, ainsi que 6 histidines consécutives (His-tag) à son extrémité N-terminale. Ce vecteur a été utilisé avec succès au laboratoire pour l'expression d'une grande variété de protéines recombinantes, la protéine NusA permettant généralement d'obtenir une bonne solubilité des protéines recombinantes.

Les vecteurs sont utilisés pour transformer des bactéries *E. coli* compétentes de souche BL21 DE3 (Startagene). Cette souche d'*E. coli* est compatible avec les vecteurs dont la cassette d'expression est sous contrôle d'un promoteur T7 (comme c'est le cas pour les vecteurs pHNGWA et pHGWA), et permet une expression efficace des protéines recombinantes. Cette souche est cultivée en milieu LB (Luria Bertani ; bacto Tryptone 10 g.l<sup>-1</sup> ; NaCl 5 g.l<sup>-1</sup> ; extrait de levure 15 g.l<sup>-1</sup> ; pH 7,5, ajout de Pastagar B 1,5 % pour les milieux solides), supplémenté de glycérol 0,5 % et d'ampicilline (100 µg.ml<sup>-1</sup>).

### 2.4.2 Purification des protéines

#### 2.4.2.1 Production de protéines recombinantes

Une colonie isolée d'*E. coli* BL21 DE3 transformée est mise en pré-culture de 2 ml dans un milieu LB sélectif à 37 °C une nuit. Le lendemain, cette culture sert àensemencer 25 ml de milieu LB supplémenté des antibiotiques adéquats, et remis en culture à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0,4 et 0,6. A cette valeur, les bactéries entrent en phase exponentielle de croissance et sont prêtes à être induites. La synthèse de protéines

recombinantes est induite par 0,1 mM d'IPTG (Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside), après quoi la culture est placée à 20 °C sous agitation, une nuit. La culture sera récoltée le lendemain afin d'être utilisée pour une purification ou des tests enzymatiques.

#### 2.4.2.2 *Vérification de l'expression par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)*

Il est toujours important de vérifier la solubilité d'une protéine recombinante, condition préalable à la purification ou aux tests d'activité enzymatique. Un gel SDS-PAGE est composé de deux couches, la première couche (gel de concentration) permet de concentrer les protéines pour pouvoir ensuite les séparer selon leur taille au niveau du gel de séparation (composition du gel SDS-PAGE Tableau 15 ci-dessous). L'ajout de TEMED et de persulfate d'ammonium permet l'initiation de la polymérisation de l'acrylamide. La résolution du gel peut varier selon la concentration d'acrylamide ajoutée et selon la taille des protéines que l'on souhaite séparer. Après dépôt des échantillons, la migration s'effectue dans un tampon de migration (Tris 25 mM pH 8,3 ; Glycine 192 mM ; SDS 0,1 %) grâce à un gradient électrique pendant 15 min à 130 V (vitesse assez lente pour concentrer les protéines dans le gel de concentration), puis environ 45 min à 180 V pour accélérer la migration. Quand la migration est terminée, le gel est délicatement déposé dans une solution de bleu de Coomassie qui permet de colorer les protéines (1,25 g Coomassie Brilliant Blue dans 500 ml d'eau / éthanol / acide acétique (227:227:46, v/v/v)) pendant environ une heure, puis le gel est transféré dans une solution de décoloration (acide acétique 7,5 %, éthanol 20 %) pendant une à deux heures jusqu'à ce que les parties du gel dépourvues de protéines deviennent incolores. Le gel est ensuite lavé avec de l'eau distillée et conservé dans de l'eau ultra pure à 4 °C.

Tableau 15 : Composition du gel SDS-PAGE.

	Gel de séparation	Gel de concentration
<b>Acrylamide</b>	4 %	10-15 %
<b>Tris-HCl pH 6,8</b>	125 mM	
<b>Tris-HCl pH 8,8</b>		375 mM
<b>SDS</b>	0,1 %	0,1 %
<b>Persulfate d'ammonium</b>	0,05 %	0,05 %
<b>TEMED</b>	0,05 %	0,05 %

### **2.4.2.3 Préparation des échantillons pour la SDS-PAGE**

Pour la préparation des échantillons à déposer sur le gel, une aliquote de 1,5 ml de la culture principale de 25 ml est prélevée, puis centrifugée 1 min à 11 000 rpm. Le culot est repris dans 500 µl d'eau ultra pure, puis soniqué : les cellules bactériennes sont cassées par ultrasons (intensité : 2,5 sur un sonicateur Branson 450 Sonifier ; durée d'une pulsation : 0,3 s ; 3 cycles de 20 pulsations). Après sonication, une aliquote de 100 µl est prélevée et servira d'indicateur « d'extrait de protéines brutes » de la culture induite ; tandis que le reste de l'échantillon est centrifugé 2 min à 5000 rpm. Après centrifugation, 100 µl du surnageant obtenu servira d'indicateur « d'extrait de protéines solubles ». Les deux extraits de 100 µl sont supplémentés de 25 µl de tampon de charge (Tris HCl pH 6,8 240 mM ; glycérol 40 % ; SDS 8 % ; β-mercaptoéthanol 10 % ; bleu de bromophénol 0,01 %) puis les protéines sont dénaturées 10 minutes à 96 °C. Les échantillons ainsi obtenus pourront être déposés sur gel.

### **2.4.2.4 Système de purification**

Si l'expression protéique est concluante, c'est-à-dire si les protéines recombinantes sont présentes dans la fraction soluble de la culture bactérienne induite, les 24 ml de milieu de culture restants sont utilisés pour la purification des protéines par chromatographie d'affinité pour les ions métalliques. La culture est transférée dans des tubes Falcon<sup>®</sup> de 50 ml, puis centrifugée 10 min à 6 000 rpm à 4 °C, le culot est repris dans 5 ml de tampon de purification (tampon phosphate pH 7,5 : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 mM et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM ; MgCl<sub>2</sub> 5 mM ; Glycérol 10 % ; β-mercaptoéthanol 1,4 mM ; NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM,) avant d'être soniqué (intensité : 5 sur un sonicateur Branson 450 Sonifier ; durée d'une pulsation : 0,5 s ; 3 cycles de 20 pulsations) puis à nouveau centrifugé 5 min à 13000 rpm. Le surnageant obtenu est utilisé pour charger les colonnes de purification Protino<sup>®</sup> Ni-TED (Macherey-Nagel) ou Ni-NTA (Qiagen), préalablement équilibrées avec 2 X 5 ml de tampon de purification. L'élution sur la colonne se fait goutte à goutte par gravité. Le surnageant est passé deux fois sur la colonne, puis la colonne subit une série de quatre lavages consécutifs avec 5 ml de tampon de purification, afin d'éliminer toutes les protéines non fixées à la colonne. Après lavage, la protéine de fusion His6-NusA-ROMT est clivée à l'aide d'une solution de thrombine (20 U, incubation 3 h à température ambiante), puis l'éluat est obtenu après centrifugation de la colonne (2 min à 3 000 rpm). Les protéines résiduelles non clivées sont récupérées grâce à une

élution supplémentaire par compétition à l'imidazole à 200 mM. Une analyse par SDS-PAGE est également réalisée avec des prélèvements représentant les différentes étapes de la purification, afin de vérifier si la purification a fonctionné.

### 2.4.3 Tests enzymatiques

#### 2.4.3.1 Tests enzymatiques sur surnageants de cultures

Les tests enzymatiques des OMT sont réalisés à partir de protéines purifiées ou de surnageants de culture induite et lysée (extraits identiques à ceux utilisés pour les étapes de purification). Après sonication et clarification comme décrit plus haut, le surnageant pourra être directement utilisé pour réaliser les tests enzymatiques (voir conditions Tableau 16), si toutefois une vérification par gel SDS-PAGE a été réalisé pour vérifier que la protéine est bien présente dans la fraction soluble et en quantité suffisante.

Tableau 16 : Tampon utilisé pour les tests enzymatiques.

A partir de surnageants de culture	A partir d'enzymes purifiées
HEPES pH7 25 mM	HEPES pH7 25 mM
MgCl <sub>2</sub> 5 mM	MgCl <sub>2</sub> 5 mM
β-mercaptoéthanol 14,3 mM	β-mercaptoéthanol 14,3 mM
Surnageant de culture 50 µl	Enzyme purifiée 5 à 10 µl
S-Adénosyl-L-méthionine 0,5 mM	S-Adénosyl-L-méthionine 0,5 mM
Substrat(s) 10 à 50 µM	Substrat(s) 10 à 50 µM
H <sub>2</sub> O qsp 200 µl	H <sub>2</sub> O qsp 200 µl
Incubation sur la nuit à 28 °C	Incubation sur la nuit à 28 °C

Pour les expériences de tests enzymatiques à partir d'un mélange de substrats, les substrats sont ajusté à 10 mM chacun dans la solution mère, le mélange est ensuite dilué selon la concentration finale voulue (de 10 à 50 µM).

## 2.5 Métabolomique

### 2.5.1 *Extraction des métabolites*

#### 2.5.1.1 *A partir de matériel végétal*

Les extractions sont réalisées à 60 °C au méthanol pur, à partir de 300 mg de poids frais de matériel végétal préalablement découpé en petits morceaux d'environ 5 mm<sup>2</sup>. Le volume de méthanol est ajusté pour obtenir une concentration égale en matière sèche pour chaque échantillon.

Après incubation, le mélange est centrifugé 30 min à 11 000 rpm puis le surnageant est récolté avant d'être placé une nuit à -20 °C (cette phase de repos permet aux débris cellulaires restants de sédimenter). Le lendemain, ce mélange est re-centrifugé 30 min à 11 000 rpm, puis le surnageant clair est placé dans des tubes en verre adaptés aux injecteurs automatiques (vials contenant des inserts).

#### 2.5.1.2 *A partir d'extrait d'Escherichia coli*

Suite aux tests enzymatiques, les surnageants de culture sont extraits avec 200 µl d'acétate d'éthyle. Le mélange est vortexé puis centrifugé 10 min à 4 °C à 13 000 rpm, puis la phase d'acétate d'éthyle (phase supérieure) est délicatement prélevée et transvasée dans un nouveau microtube.

Pour l'analyse en chromatographie en couche mince (CCM), l'extrait est concentré par évaporation à l'azote gazeux jusqu'à l'obtention d'un plus petit volume (20 à 50 µl). La solution obtenue est déposée goutte à goutte sur la plaque de silice, qui est ensuite séchée à l'air libre environ 2 min. La plaque de silice est ensuite disposée dans une cuve en verre contenant un mélange de 43 ml de solvants (40 ml de dichlorométhane et 3 ml d'acétone). La migration se fait par capillarité et est stoppée à mi-hauteur de la plaque (soit environ 30 à 45 minutes de migration). Une fois la migration arrivée à mi-hauteur, la plaque est sortie de la cuve puis séchée 5 min à température ambiante. La plupart des expériences de CCM ont été réalisées avec des stilbènes, qui ont la particularité d'être fluorescents sous rayons UV, ainsi les résultats sont directement observables sous lumière ultraviolette.

Pour l'analyse par HPLC-MS, les échantillons sont placés dans des tubes en verre adaptés aux injecteurs automatiques (vials contenant des inserts), puis stockés à -20°C avant analyse.

### *2.5.2 Système d'analyse des métabolites*

Durant ma thèse, les analyses de mes échantillons ont été réalisées sur plusieurs HPLC différentes, dont l'UPLC-MS (Waters) de la plateforme métabolomique de l'IBMP de Strasbourg (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes), une HPLC Agilent ainsi qu'une UHPLC couplée à un spectromètre de masse Exactive (Thermo) disponibles à l'INRA de Colmar.

Pour plus de simplicité, je vais décrire l'utilisation de l'UHPLC ainsi que du spectromètre de masse Exactive sur lesquels j'ai majoritairement travaillé et qui ont été récemment acquis par le laboratoire.

#### *2.5.2.1 Chromatographie en phase liquide*

L'essentiel des analyses a été réalisé sur un système de chromatographie liquide à ultra-haute performance (UHPLC) Dionex Ultimate 3000, équipé d'une colonne Nucleodur C18 HTec (Macherey-Nagel, 50 x 2 mm diamètre interne, particules de 1,8 µm de diamètre) maintenue à 20 °C (Figure 32). Les solvants utilisés sont les suivants : eau / acide formique (0,1 %, v/v ; éluant A) et acétonitrile / acide formique (0,1 %, v/v; éluant B) ; le débit est maintenu à 0,4 ml / min. Le programme de séparation utilisé est le suivant : isocratique pendant 1 min avec 15 % d'éluant B, puis montée de 15 % à 95 % d'éluant B en 5 min, et enfin isocratique avec 95% d'éluant B pendant 1 min. Le volume d'échantillon injecté est de 2 µl.

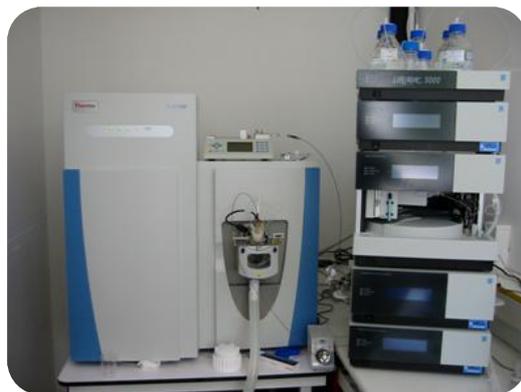


Figure 32: Chaîne de chromatographie liquide UHPLC Dionex Ultimate 3000 (à droite sur la photo) couplée au spectromètre de masse Thermo Exactive (à gauche sur la photo).

### 2.5.2.2 *Spectrométrie de masse*

Le spectromètre de masse Exactive (Thermo Fischer) possède un analyseur de masse Orbitrap™ permettant une analyse qualitative et quantitative des tous les métabolites présents dans un échantillon complexe (méthode « full scan »), de masses comprises entre 50 et 6 000  $m/z$ , avec une excellente sensibilité, et une très haute résolution. La figure ci-dessous schématise les différentes parties qui composent le spectromètre de masse. Les métabolites provenant de l'UHPLC ou injectés directement dans le spectromètre de masse par infusion, sont ionisés par une source d'ionisation électrospray (ESI : electro spray ionisation source). Le flux d'ions est dirigé par deux gaz d'azote : le flux de gaz enrobant la source d'ionisation, et le gaz auxiliaire qui permet de focaliser le spray au niveau du point d'entrée du spectromètre de masse. Les ions peuvent ensuite être sélectionnés selon les rapports  $m/z$  au niveau de l'octapole et du flatapole (Transfer Multipole), ce qui permet de cibler une gamme particulière de masses. La cellule C-Trap permet de rediriger le flux d'ions soit vers la cellule HCD qui permet de fragmenter les ions (utilisation pour la détermination de structure), soit vers la cellule Orbitrap™. La cellule Orbitrap™ est une électrode creuse à l'intérieure de laquelle est placée une électrode en fuseau, cette cellule permet de piéger les ions par une force électrostatique. Les ions qui pénètrent dans la cellule Orbitrap™ entament un mouvement oscillato-rotatoire autour de l'électrode. Ce mouvement est détecté et analysée par la cellule Orbitrap™ et permet une mesure de  $m/z$  très précise (de 1 à 2 ppm) et une excellente résolution (env. 100 000).

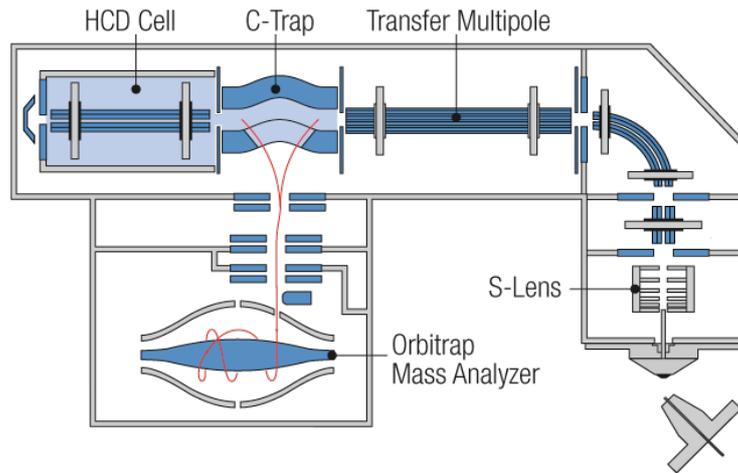


Figure 33 : Composition du spectromètre de masse Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fischer)

Ce spectromètre permet également de réaliser des cycles avec différentes polarités (changement de polarité réalisé en moins d'une seconde), ce qui permet par exemple de quantifier au cours d'une même analyse le resvératrol (mode négatif) et le ptérostilbène (mode positif).



*CHAPITRE I :*  
*Analyse fonctionnelle et évolutive*  
*de la famille des stilbène*  
*synthèses de la vigne*

---



# CHAPITRE I : Analyse fonctionnelle et évolutive de la famille des stilbène synthases de la vigne

---

## 1 Introduction

Les dizaines de milliers de métabolites secondaires connus chez les végétaux participent à la richesse biochimique spécifique à chaque famille ou à chaque espèce végétale. Cette richesse est apparue au cours de l'évolution à partir de quelques voies de biosynthèse ubiquitaires qui se sont diversifiées grâce à des duplications géniques suivies d'événements de néo-fonctionnalisation (Pichersky and Gang, 2000). Les stilbènes appartiennent à une famille de métabolites secondaires particulièrement intéressants puisqu'ils illustrent parfaitement cette spécificité biochimique, dans la mesure où les stilbènes sont synthétisés uniquement chez une douzaine de familles de plantes. Parmi elles, on distingue par exemple des gymnospermes comme le pin (*Pinus*, Pinacées) ou l'épicéa (*Picea*, Pinacées), des angiospermes monocotylédones comme le sorgho (*Sorghum bicolor*, Poacées) et dicotylédones telles que la vigne (*Vitis vinifera*, Vitacées), la renouée du Japon (*Fallopia japonica*, Polygonacées) ou encore l'arachide (*Arachis hypogea*, Fabacées). La capacité à synthétiser des stilbènes semble être une caractéristique qui est apparue ponctuellement à plusieurs reprises au cours de l'évolution, et cela de façon hétérogène au sein des différentes familles végétales. La synthèse des stilbènes est rendue possible grâce à la présence d'une enzyme clé déterminante, à la base de la voie de biosynthèse des stilbène : la stilbène synthase (STS).

L'analyse phylogénétique des gènes *STS* chez le pin, la vigne et l'arachide a montré que les stilbène synthases ont évolué à partir des chalcone synthases, et cela à plusieurs reprises au cours de l'évolution (Tropf et al., 1994; Austin et al., 2004). La chalcone synthase est une enzyme ubiquitaire présente chez tous les végétaux qui est à l'origine de la biosynthèse des flavonoïdes, des molécules indispensables à la survie de la plante (Figure 34). Parmi les fonctions des flavonoïdes, la synthèse de pigments au niveau des fleurs et des fruits, l'attraction des insectes pollinisateurs pour la dispersion du pollen ou encore une fonction de protection contre les organismes phytopathogènes et les rayonnements UV (Schijlen et al., 2004).

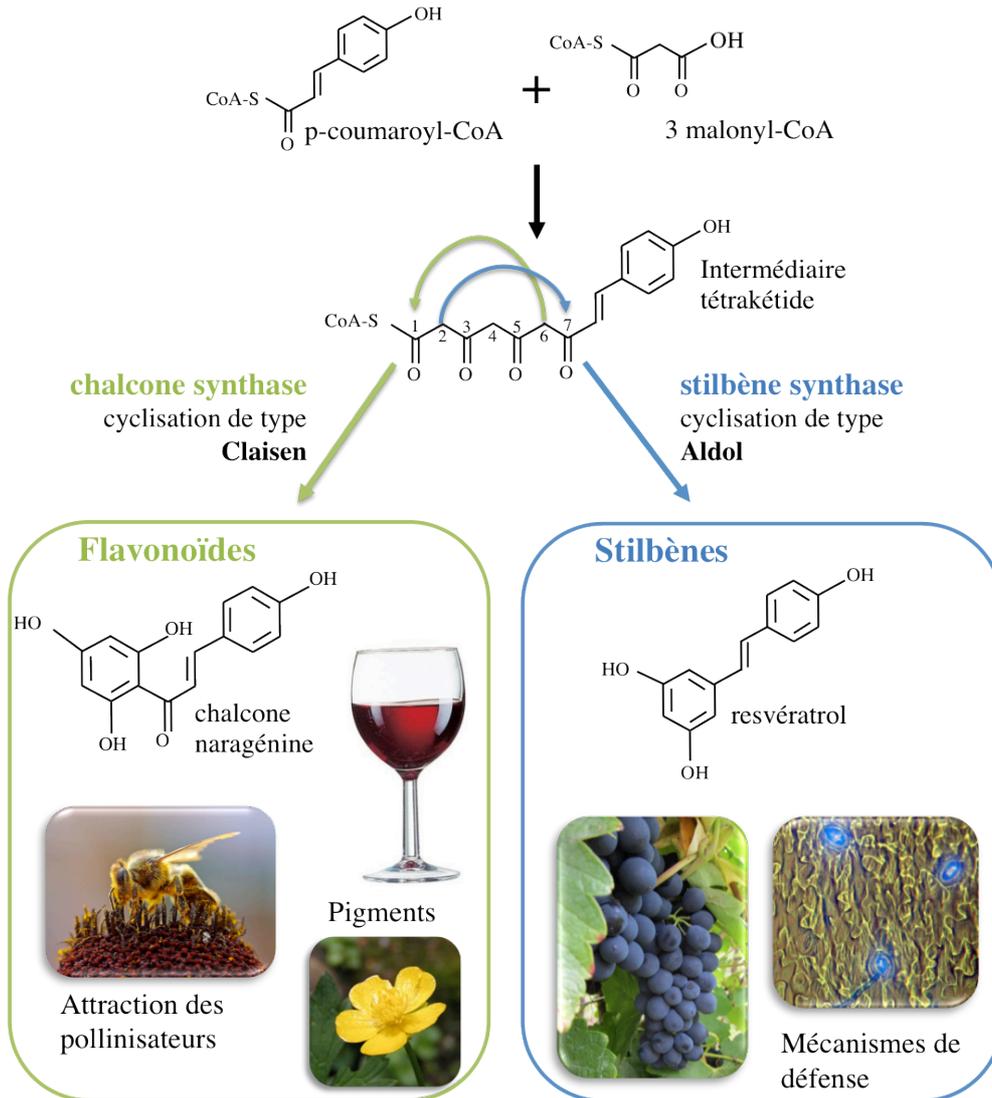


Figure 34 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes et des stilbènes.

Les photos illustrent les rôles majeurs assurés par les deux familles de molécules (source des photos : wikipedia.fr ; Anne Poutaraud).

Les CHS et les STS appartiennent à la famille des polycétides synthases de type III, et permettent la condensation d'unités malonyl-CoA au niveau d'esters d'acides hydroxycinnamiques (typiquement le *p*-coumaroyl-CoA) par un mécanisme de cyclisation bien spécifique. Les deux enzymes utilisent le même substrat et synthétisent le même tétracétide intermédiaire. La différence entre ces deux enzymes réside au niveau de la cyclisation du tétracétide intermédiaire : la CHS assure une condensation de type Claisen formant la chalcone, et la STS catalyse une condensation de type Aldol responsable de la synthèse d'un stilbène. Cette spécificité de cyclisation provient d'un changement subtil au niveau de l'environnement électronique du site actif, qui a permis le passage d'une activité de type CHS à une activité de type STS (Austin et al., 2004).

## 2 Organisation des familles de gènes *STS*

L'organisation des stilbène synthases au sein des différents génomes des plantes productrices de stilbènes est très contrastée. Le tableau ci-dessous récapitule l'état des connaissances sur les familles de gènes *STS* au sein du règne végétal.

La plupart des espèces productrices de stilbènes possèdent une à deux copies de gènes *STS*, c'est par exemple le cas du sorgho et de la renouée du Japon, qui possèdent une seule copie du gène *STS* ; ou encore l'arachide et *P. nodum* qui possèdent 2 gènes *STS*. Cependant, le nombre de copies de gènes *STS* est susceptible d'évoluer dans la mesure où, mis à part le sorgho, les génomes de ces différentes plantes ne sont pas encore séquencés. Les données concernant le nombre de copies de gènes ont été obtenues par des expériences de clonage basées sur l'homologie de séquence existant entre les gènes *STS* et les *CHS* correspondantes, les *CHS* étant largement plus connues, étudiées et répertoriées. Seul *P. sylvestris* possède une petite famille de 5 gènes *STS*, mais cette famille paraît assez restreinte en comparaison de la famille de 43 gènes *STS* putatifs qui a été identifiée lors de l'analyse de la première version (8x) de la séquence du génome de la vigne (Jaillon et al., 2007).

Le début de ma thèse a coïncidé avec la mise à disposition d'une seconde version de la séquence du génome de la vigne (12x). La meilleure qualité de cette séquence rendait alors possible l'analyse fine de la famille des gènes *STS*, ce qui nous a incité à aborder l'étude de cette famille aux caractéristiques peu communes. L'analyse de la version 12x de la séquence du génome de *V. vinifera* var. PN40024 a permis de confirmer l'étendue de la famille *STS*. Parmi 48 locus *STS* putatifs identifiés, 32 gènes sont complets, 5 gènes sont partiels et 11 sont probablement des pseudogènes. Ces gènes sont disposés en tandem sous la forme de deux clusters, l'un sur le chromosome 10 (6 *STS* réparties sur 91 kb) et l'autre sur le chromosome 16 (42 *STS* réparties sur 473 kb).

Tableau 17 : Récapitulatif des gènes *STS* présents chez différentes espèces végétales. STS : stilbène synthase ; STCS : stilbènes-carboxylate synthase). Les STS retrouvées chez les conifères ainsi que chez *P. nodum* sont des pinosylvine synthases ou des dihydropinosylvine synthases.

Espèce végétale	Nombre de gènes	Nom du/des gène(s)	Source
<i>Psilotum nodum</i>	2	<i>PnI</i> et <i>PnL</i>	(Yamazaki et al., 2001)
<i>Marchantia polymorpha</i>	2 ?	<i>STCS1</i> et <i>STCS2</i>	www.biologie.uni-freibourg.de/data/bio2/schroder/STSCS_Marchantia_polymorpha.html
<i>Arachis hypogea</i>	2	<i>pGSC1</i> et <i>pGSC2</i>	(Schröder et al., 1988)
<i>Rheum tataricum</i>	1 ou 2 ?	<i>RsSTS1</i> <i>RsSTS2</i> ?	(Samappito et al., 2003)
<i>Hydrangea macrophylla</i>	1 ?	<i>HmSTCS</i>	(Eckermann et al., 2003)
<i>Sorghum bicolor</i>	1	<i>SbSTS1</i>	(Yu et al., 2005; Paterson et al., 2009)
<i>Fallopia japonica</i> <i>Polygonum cuspidatum</i>	1	<i>PcRS</i>	(Liu et al., 2011)
<i>Pinus sylvestris</i>	5 ?	<i>PST-1, PST-2, PST-3, PST-4, PST-5</i>	(Preisig-Müller et al., 1999)
<i>Pinus strobus</i>	2	<i>STS1</i> et <i>STS2</i>	(Raiber et al., 1995)
<i>Pinus densiflora</i>	3	<i>PdSTS1, PdSTS2</i> et <i>PdSTS3</i>	(Kodan et al., 2002)
<i>Vitis vinifera</i>	<b>48</b>	<b><i>VvSTS1</i> à <i>VvSTS48</i></b>	<b>(Parage et al., 2012; Vannozzi et al., 2012)</b>

La taille de la famille STS chez la vigne est, à ce jour, unique chez les végétaux. La question de la signification biologique d'une telle amplification s'est donc posée, et l'étude fonctionnelle et évolutive de cette famille de gènes a constitué la première partie de ma thèse. Cette partie a fait l'objet d'une étude dont les résultats sont présentés dans l'article suivant.

Cette étude est le fruit d'une collaboration entre quatre équipes de recherche. L'équipe de Sébastien Aubourg (URGV, Evry) a réalisé l'étude de génomique structurale, pour l'identification et l'annotation des gènes *STS* et *CHS* au sein du génome du PN40024 ; notre équipe a réalisé l'étude de génomique fonctionnelle (qui constitue le centre de mon travail) et a coordonné l'ensemble de ce projet ; l'équipe de Gabriel Marais et Raquel Tavares (Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Université Lyon I) a pris en charge l'approche de génomique évolutive et Stéphane Réty (Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, Université Paris Descartes) a réalisé le modèle structural d'une STS de vigne.



## 3 A propos de l'amplification exceptionnelle de la famille des STS de vigne

### 3.1 La duplication génique

Le métabolisme végétal est riche de plus d'une centaine de milliers de métabolites de faible poids moléculaire dont une petite partie appartient au métabolisme primaire (métabolisme fondamental et commun à tous les végétaux) et dont la majeure partie comprend les métabolites secondaires dont la biosynthèse est restreinte et spécifique aux différents groupes végétaux (Pichersky and Gang, 2000). Les végétaux possèdent des familles de gènes très conservées au cours de l'évolution, servant de base commune à l'évolution génétique et à l'adaptabilité, et participant ainsi à la spécificité génétique inter-espèce (Flagel and Wendel, 2009). A l'origine d'une telle diversité, le phénomène de duplication génique. La duplication génique génère deux copies d'un même gène : la copie originelle (ou copie mère) maintient sa fonction originelle alors que la copie issue de la duplication (copie fille) n'est théoriquement pas soumise aux mêmes pressions de sélection naturelles, ce qui permet à celle-ci d'accumuler des mutations pouvant amener à la pseudogénéisation, ou à l'acquisition de nouvelles fonctions et à sa fixation définitive dans une population donnée (Ohno, 1970; Pichersky and Gang, 2000; Flagel and Wendel, 2009).

La duplication génique peut avoir plusieurs origines. Elle peut impliquer des fragments géniques courts, un gène entier, ou bien encore concerner le chromosome ou le génome dans sa totalité. Voici un récapitulatif des mécanismes à l'origine de la duplication de fragments d'ADN :

- **L'enjambement inégal** (ou crossing-over inégal), qui a lieu lors de la prophase I de la méiose. Ce mécanisme est à l'origine du brassage génétique, mais peut dans certains cas générer des duplications en tandem par crossing-over inégal.
- **La transposition.** Les transposons peuvent capturer et transposer des gènes entiers de façon aléatoire (transduplication). Par ailleurs, un ARNm épissé peut être réintégré dans le génome (rétroposition), ce mécanisme faisant intervenir une transcriptase inverse ainsi qu'une intégrase. La rétroposition génère des copies dépourvues d'introns et d'éléments régulateurs, et l'insertion dans le génome est aléatoire.

- **La polyplôidisation**, ou la duplication totale du génome suivie de sa réorganisation. On estime que 50 à 70 % des Angiospermes sont polyploïdes, ce qui est le cas de nombreuses plantes cultivées comme la luzerne (*Medicago sativa*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), le blé (*Triticum aestivum*), le coton (*Avena sativa*) ou le café (*Coffea arabica*) ; ce mécanisme pouvant être ancien puisque de nombreuses espèces actuellement diploïdes sont issues de la polyplôidisation, comme par exemple le maïs (*Zea mays*), le soja (*Glycine max*) ou encore l'arabette (*Arabidopsis thaliana*) (Blanc and Wolfe, 2004). Particulièrement chez *A. thaliana*, 27 % des gènes issus de la duplication totale du génome ont été maintenus au cours de l'évolution (Blanc and Wolfe, 2004). Ce mécanisme est certainement le plus important contributeur à la duplication génique (Pichersky and Gang, 2000). Le mécanisme à l'origine de la polyplôidisation est encore mal connu, mais ferait intervenir des gamètes n'ayant pas subi de séparation des chromosomes lors de l'étape de télophase de la méiose (Soltis, 2005).
- **La duplication d'un chromosome entier**, par répartition inégale des chromosomes lors de la télophase de la méiose.

### 3.2 Devenir des gènes dupliqués

La duplication de gènes a concrètement trois devenir possibles (Lynch and Conery, 2000):

- **La non-fonctionnalisation** : la dégénérescence de l'une des deux copies par l'effet de mutations délétères (pseudogénéisation).
- **La néo-fonctionnalisation** : l'acquisition d'une nouvelle fonction bénéfique et maintenue par les pressions de sélection naturelles par l'une des deux copies, l'autre copie gardant sa fonction originelle.
- **La sub-fonctionnalisation** (DDC : duplication-dégénération-complémentation), c'est à dire une duplication génique suivie de mutations dégénératives mais complémentaires entre les deux gènes dupliqués, qui parviennent ensemble à restituer la fonction originelle assurée par le gène ancestral.

De façon plus générale, la duplication de gènes peut être réalisée en tandem ou de façon segmentaire. La duplication en tandem aboutit à une organisation des gènes dupliqués en cluster, à proximité les uns des autres, et fait principalement intervenir des mécanismes d'enjambements inégaux, alors que la duplication segmentaire provient généralement d'anciens

événements de polyploïdisation ayant généré une réorganisation du génome (Haberer et al., 2004). Les gènes dupliqués en tandem ont tendance à s'homogénéiser par des événements d'enjambements inégaux, alors que la duplication segmentaire permet aux copies de gènes d'échapper à l'homogénéisation au sein d'un cluster et permet ainsi de placer ces dernières dans un nouveau contexte évolutif, favorisant une divergence plus rapide (Flagel and Wendel, 2009; Baumgarten et al., 2003). Par exemple, le génome d'*A. thaliana* possède plusieurs gènes de résistance R dupliqués en tandem et probablement issus d'événements d'enjambements inégaux. Cependant, plusieurs événements de duplication segmentaire (ou ectopiques), ont eu lieu dans le génome de façon totalement aléatoire ; et ces duplications ont replacé certains gènes R dans un nouveau contexte évolutif, favorisant ainsi leur diversification (Haberer et al., 2004). De façon générale, les gènes de défense sont hautement dupliqués puisqu'ils doivent continuellement évoluer pour répondre à la pression de sélection générée par les pathogènes (Blanc and Wolfe, 2004). Beaucoup de gènes dupliqués en tandem ou segmentaires possèdent les mêmes caractéristiques d'expression, mais plusieurs études ont montré que leur profils d'expression divergent rapidement au cours de l'évolution (Haberer et al., 2004; Schmid et al., 2005).

### *3.2.1 Pseudogénéisation ou non-fonctionnalisation des gènes*

Les mutations dégénératives sont des événements bien plus fréquents que les mutations avantageuses, c'est pourquoi les gènes dupliqués dégèrent le plus souvent en pseudogènes (Rodin and Riggs, 2003; Ober, 2010). La pseudogénéisation peut avoir plusieurs origines. Premièrement, en l'absence de pression de sélection, des mutations délétères apparaissent et le gène perd naturellement sa fonction. Deuxièmement, il arrive que la duplication ou la transposition soit incomplète. Enfin, l'absence de promoteur ou d'éléments régulateurs peut entraîner la pseudogénéisation. L'expression réduite des gènes dupliqués est généralement associée à la pseudogénéisation (Rutter et al., 2012).

### *3.2.2 Hypothèse de la néo-fonctionnalisation*

Dans son livre « Evolution by gene duplication », Ohno (1970) définit la néo-fonctionnalisation comme étant l'acquisition d'une nouvelle fonction au cours de l'évolution

par l'une des copies du gène issue d'un événement de duplication (Figure 35). Dans cette optique, la fonction du gène ancestral est maintenue par de fortes pressions de sélections purificatrices, alors que l'autre copie du gène évolue de façon indépendante sans pressions de sélection. Cette autre copie peut ainsi acquérir au fil du temps une série de mutations délétères amenant à la pseudogénéisation (non-fonctionnalisation), où dans le cas contraire acquérir des mutations dont la sélection ouvre la porte à de nouvelles fonctions (néo-fonctionnalisation).

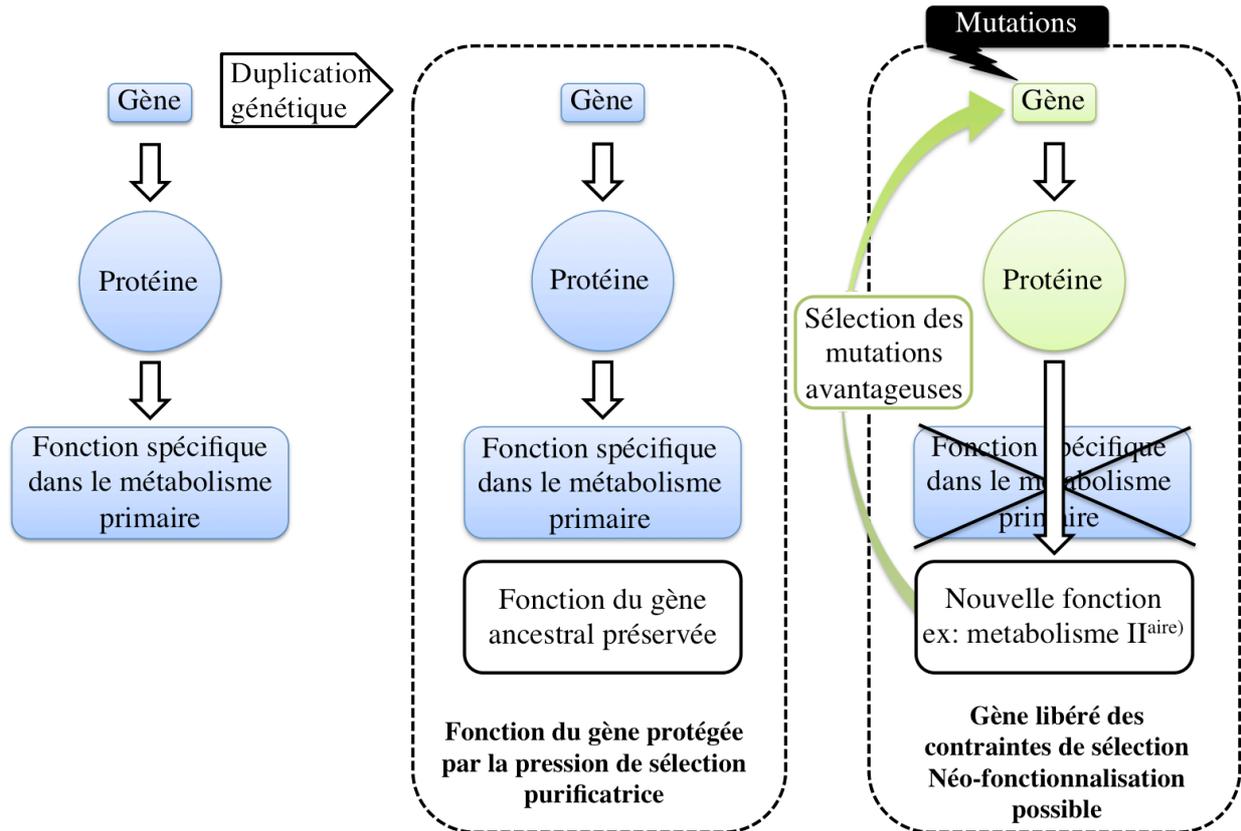


Figure 35 : Modèle de la néo-fonctionnalisation (figure adapté de (Ober, 2010)).

Un cas très intéressant de néo-fonctionnalisation existe par exemple dans la voie de biosynthèse des phénolamides chez *A. thaliana*, où deux cytochromes P450 (*CYP98A8* et *CYP98A9*) sont issus de la rétroposition d'un cytochrome P450 ancestral (*CYP98A3*), suivie d'une sélection positive et d'une duplication génétique, amenant à la création d'une nouvelle voie de biosynthèse (Matsuno et al., 2009). Dans ce cas, plusieurs traces de sélection positive ont été détectées, notamment au niveau du site actif de la protéine mais également au niveau des sites d'interactions avec les partenaires réactionnels. Ces indications, couplées au fait qu'aucun orthologue des ces gènes n'a pu être identifié, ont permis de conclure que *CYP98A8*

et *CYP98A9* ont évolué récemment et rapidement à partir de *CYP98A3*, et cela grâce à des pressions de sélection positives.

Dans le cas des gènes *STS* de vigne, aucune trace de sélection positive n'a été détectée au niveau du site actif, que ce soit par l'analyse restreinte aux *STS* et au *CHS* putatives de *V. vinifera*, ou par l'analyse plus large menée sur les *STS* et les *CHS* de plusieurs espèces végétales (*V. vinifera*, *A. thaliana*, *S. bicolor*, *A. hypogea*, *P. sylvestris*, *P. strobus*, *P. tremuloides*, *P. nodum*). La théorie de la néo-fonctionnalisation n'est donc pas soutenue, et les analyses fonctionnelles réalisées sur les 9 *STS* représentatives de la famille des *STS* ont confirmé que les enzymes correspondant aux différents gènes testés ne montrent pas de différences fonctionnelles.

### 3.2.3 Théorie de l'effet dose

La duplication génique amène à la création de plusieurs copies de gènes issues d'un ancêtre commun. Si la présence de deux copies d'un même gène confère un avantage sélectif, les deux paralogues peuvent être maintenus dans le génome. Par exemple, les gènes des protéines ribosomiques sont présents en plusieurs copies dans le génome des organismes supérieurs, permettant ainsi une grande production de protéines qui ne pourrait pas être assurée par la présence d'un seul gène (Conant and Wolfe, 2008). Dans d'autres cas de figure, la duplication génique peut soulever un problème de dosage lié à un dérèglement entre les différents réseaux géniques (Flagel and Wendel, 2009). Ce dérèglement peut être contre-sélectionné, ce qui aboutit à l'élimination du gène dupliqué.

Dans la voie de biosynthèse du resvératrol et de ses dérivés, le grand nombre de gènes *STS* présent chez la vigne n'a pas pour effet de produire une concentration en stilbènes constitutifs significativement plus élevée que chez d'autres plantes productrices de stilbènes. En effet les racines et les parties ligneuses de la vigne accumulent constitutivement des stilbènes à hauteur de 0,5 % de la masse de matière sèche (Vergara et al., 2012), alors que chez *Pinus*, le bois de cœur accumule constitutivement de la pinosylvine et ses dérivés à des concentrations allant de 0,1 à 4 % de la masse de matière sèche (Hart and Shrimpton, 1979). Enfin, chez la renouée du Japon, les racines contiennent du picéide à des concentrations équivalentes à 1,6 % de la masse de matière sèche (Benová et al., 2008). Cependant il n'existe pas d'étude comparative concernant le dosage des stilbènes en condition de stress chez les différentes espèces productrices de stilbènes ; et au regard du grand nombre de gènes *STS* chez

*V. vinifera*, il est envisageable que le potentiel d'induction des *STS* et la biosynthèse des stilbènes soit plus élevé chez la vigne que chez d'autres espèces productrices de stilbènes.

### 3.2.4 *Hypothèse de la DDC : duplication – dégénérescence – complémentation*

Dans l'hypothèse d'une DDC (sub-fonctionnalisation), les deux gènes issus d'un événement de duplication sont préservés et travaillent de façon complémentaire pour réaliser la fonction ancestrale du gène dupliqué (Figure 36). Dans ce cas de figure, le gène ancestral doit obligatoirement posséder au moins deux fonctions, qui seront ainsi partagées entre les deux gènes dupliqués (Flagel and Wendel, 2009; Lynch and Force, 2000; Lynch and Conery, 2000) ; (Force et al., 1999). Les deux gènes dupliqués restent sous pression de sélection mais accumulent des mutations dégénératives amenant à une perte complémentaire des fonctions ancestrales (Lynch and Force, 2000; Ober, 2010). La sub-fonctionnalisation amène donc à la spécialisation des fonctions qui a pour effet d'augmenter le potentiel adaptatif (« fitness ») des organismes vivants.

Par exemple, une protéine ancestrale possédant deux types d'activités enzymatiques peut voir son gène subir une duplication génique amenant à terme la création de deux gènes codant pour deux protéines filles possédant chacune l'une des deux fonctions de la protéine ancestrale, cette spécialisation étant dépendante d'évènements de mutations dégénératives amenant à la perte de l'une ou l'autre fonction ancestrale. La sub-fonctionnalisation amène fréquemment une paire de gènes dupliqués à évoluer pour obtenir une expression spatiale ou temporelle différentielle, en touchant par exemple aux éléments *cis* en amont du promoteur et qui contrôlent la régulation des gènes dupliqués (Hughes, 2002 ; Haberer et al., 2004). Par exemple, si un gène ancestral est exprimé dans les tissus A et B, l'expression des deux gènes fils pourra être restreinte au tissu A ou au tissu B (Ober, 2010). La sub-fonctionnalisation peut également toucher uniquement les promoteurs des gènes impliqués via des mutations dégénératives, pouvant ainsi amener à diminuer les niveaux d'expression individuels des deux gènes, qui ensemble parviennent à se compléter (Huminiacki and Wolfe, 2004). Il est globalement admis que si les gènes dupliqués montrent un profil d'expression tissu-spécifique plus élaboré et/ou plus adapté à des stress environnementaux particuliers, la sub-fonctionnalisation est l'hypothèse la plus probable (Rutter et al., 2012).

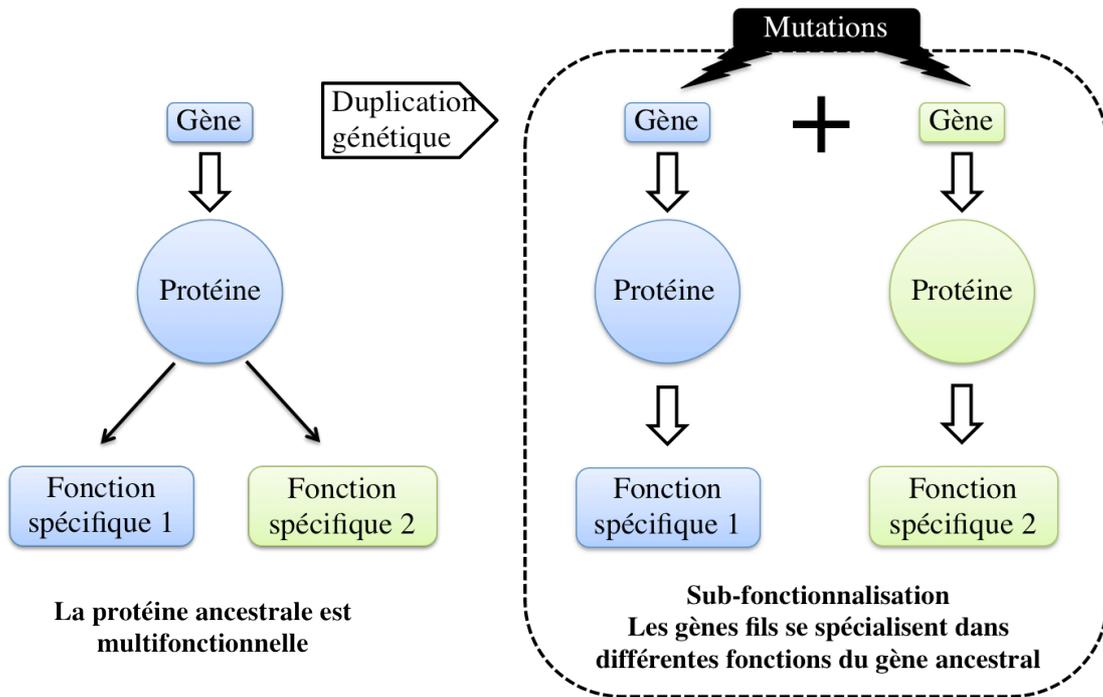


Figure 36 : Modèle de la sub-fonctionnalisation (adapté de Ober, 2010).

En bilan, la sub-fonctionnalisation concerne les gènes à l'origine multifonctionnels qui possèdent au moins deux fonctions biochimiques différentes ou des profils d'expression différents (Lynch and Force, 2000; Ober, 2010). De plus, ce mécanisme semble être dégressif dans la mesure où la complexité génétique diminue avec le nombre de duplications génétiques, ceci étant dû aux mutations dégénératives à l'origine de la spécialisation ; les gènes ayant par exemple une forte complexité dans leurs régions régulatrices seront plus facilement préservés au cours de l'évolution (Force et al., 1999; Lynch and Force, 2000). Or, l'étude évolutive et fonctionnelle menée sur la famille des *STS* ne montre aucune trace d'acquisition de nouvelles fonctions, ni d'expression différentielle dans la mesure où les gènes *STS* semblent être induits uniformément en réponse à un stress abiotique. Aussi, une autre analyse d'expression illustrée dans la Figure 37 montre que les gènes *STS* semblent être exprimés constitutivement de la même manière, avec néanmoins une expression plus forte au niveau des racines. Toutes ces observations nous amènent à penser que la sub-fonctionnalisation est une hypothèse peu probable dans le cas d'une expansion aussi importante que celle observée chez les *STS* de vigne, et dont les différentes copies de gènes montrent une si forte conservation de séquence et de fonction.

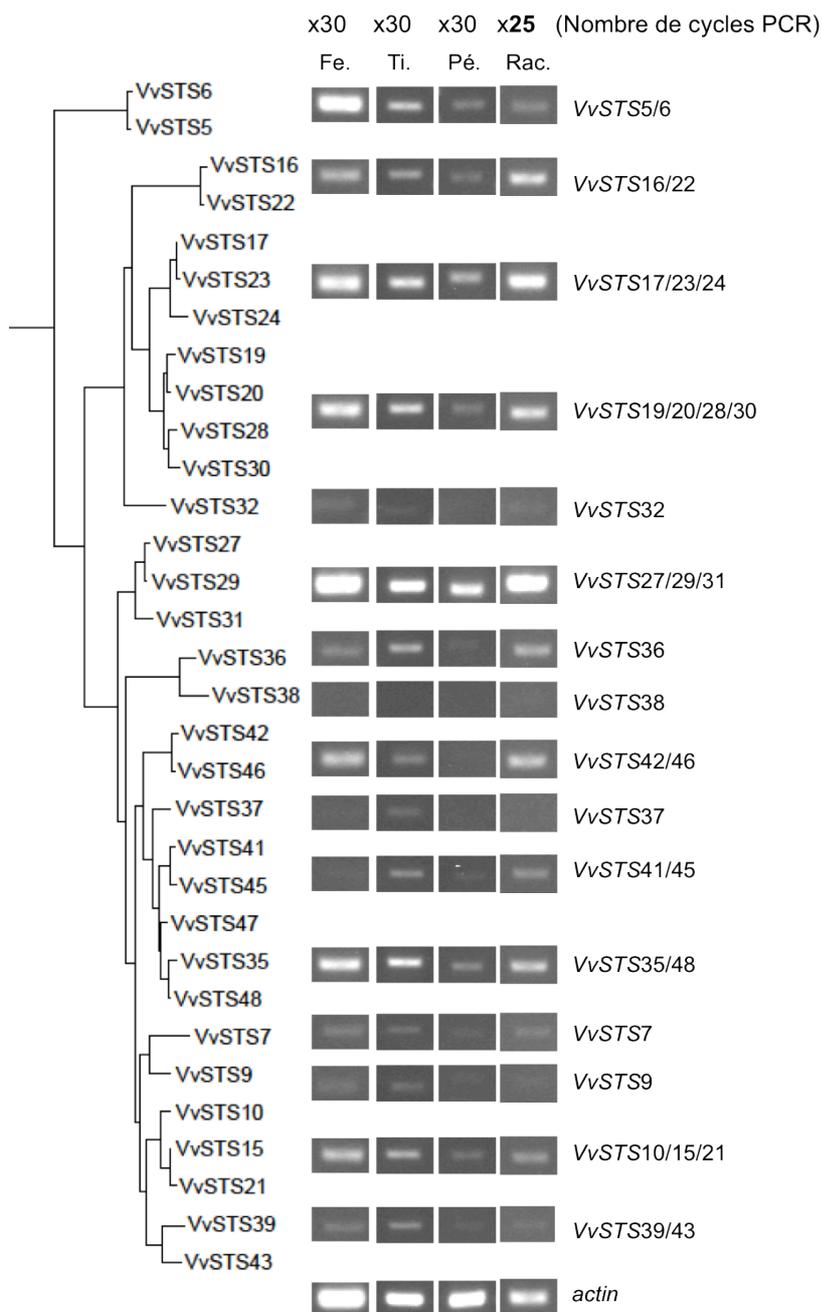


Figure 37 : Expression constitutive des stilbène synthases de vigne.

Fe., Feuille ; Ti. ; Tige ; Pe., Pétiole ; Rac., Racine.

Cependant, l'analyse fine de l'expression des gènes de la famille des *STS*, réalisée en parallèle de notre étude par Vannozzi et ses collaborateurs (Vannozzi et al., 2012), pourrait remettre en cause certaines de ces conclusions par l'apport de données d'expression supplémentaires.

### **3.3 Apport de l'étude de Vannozzi sur la signification biologique de l'amplification des gènes STS**

#### *3.3.1 Expression constitutive de certains membres de la famille des STS*

Les auteurs ont divisé la famille des *STS* en 3 groupes distincts : le groupe A est formé des gènes *STS* localisés sur le chromosome 10 (*VvSTS1-6*) ; les groupes B (22 *STS*) et C (13 *STS*) sont formés des gènes *STS* localisés sur le chromosome 16. L'expression constitutive des gènes *STS* a été étudiée en utilisant une analyse par microarray (puces à ADN) sur différents organes de vigne (cv. Corvina atlas). Les auteurs ont montré que l'expression constitutive des *STS* était assez basse voire inexistante, à l'exception des racines, et au niveau de la pellicule des baies de raisin pendant les phases de séchage après récolte. Leurs résultats vont dans le sens des résultats que j'ai pu obtenir par RT-PCR. De façon plus générale, les auteurs ont mis en évidence que l'expression des gènes *STS* augmentait avec l'âge ou la sénescence de l'organe étudié, que ce soit pour les feuilles ou au niveau de la pellicule des baies de raisin. L'augmentation ontogénétique de l'expression des gènes *STS* est probablement due à l'augmentation de la concentration en phytohormones, incluant l'acide abscissique, l'acide salicylique, l'éthylène et l'acide jasmonique, des phytohormones connues pour réguler la sénescence foliaire mais également capable d'induire la synthèse de stilbènes. Cependant, certains aspects de cette première partie des résultats de Vannozzi et al. sont critiquables, en particulier en regard de l'utilisation de microarrays pour l'analyse de l'expression des gènes *STS*, compte tenu du haut degré d'identité entre ces gènes. En effet, lors de notre propre analyse par RT-PCR de l'expression des gènes *STS*, il n'a pas été possible de dessiner des couples d'oligonucléotides spécifiques pour chaque gène, même en se servant des régions UTR généralement moins conservées. Certains couples d'amorces correspondent potentiellement à 2, 3 ou 4 gènes (Figure 37). En outre, cette analyse ayant été effectuée sur une variété différente du PN40024 à partir duquel les puces à ADN ont été dessinées, des biais ont éventuellement pu être générés en raison de la différence existante entre les deux génomes.

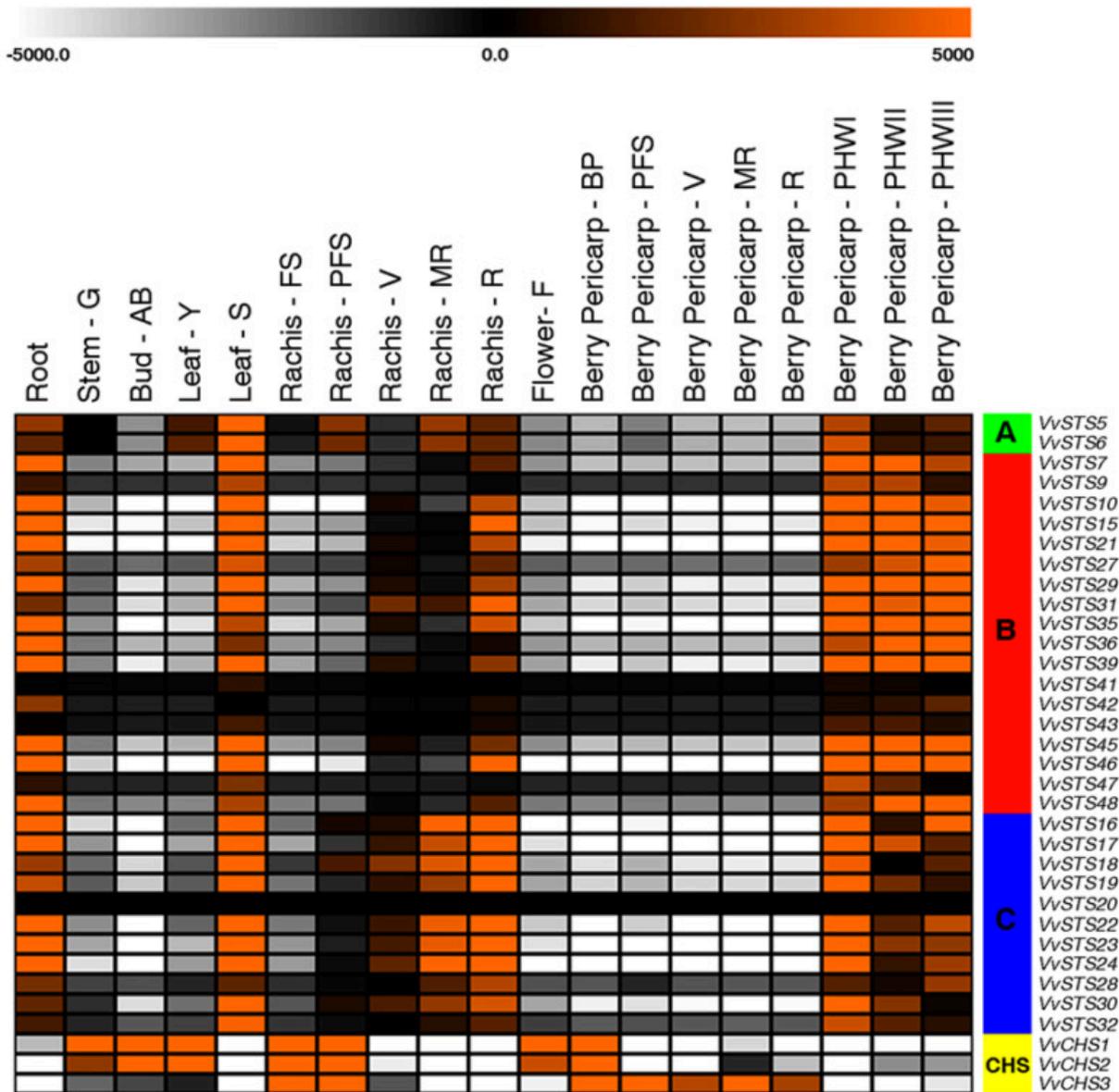


Figure 38 : Expression constitutive de la famille des *STS* de *V. vinifera* cv. Corvina atlas (Vannozzi et al., 2012).

Les données d'expression sont normalisées sur la valeur moyenne d'expression de chaque gène dans tous les tissus/organes analysés. La ligne de couleur à gauche de la liste des gènes *STS* représente les différents groupes de gènes *STS*. Y, young leaf (jeune feuille) ; FS, fruit-set (nouaison) ; S, sénescence ; G, green stem (tige verte) ; AB, bud-burst (débourrement) ; PFS, post fruit-set (post-nouaison) ; V, véraison; MR, mid-ripe (mi-maturité) ; R, ripe (maturité) ; F, flowering (floraison, 50 % *cap-fall*) ; PHWI, post-harvest withering I, 1st month (1 mois après récolte des baies, phase de « flétrissement/séchage » des baies qui permet d'augmenter les caractéristiques qualitatives mais aussi la concentration en sucres simples); PHWII, post-harvest withering II (2nd month); PHWIII, post-harvest withering III (3rd month).

### 3.3.2 Induction de l'expression de la famille des STS

L'étude de l'induction de l'expression des gènes *STS* a été réalisée avec différents stress abiotiques (rayons UV et blessure) et un stress biotique (infection par *P. viticola*), en utilisant une approche d'ARNm-seq couplée à la technologie de séquençage Illumina. Cette seconde approche est plus discriminante que les microarrays pour l'étude de l'expression de famille de gènes très similaires. Les résultats obtenus montrent que les *STS* du groupe A sont les *STS* les plus exprimées de façon constitutive, mais qu'elles ne sont pas induites en réponse à un stress de type blessure, et très faiblement après traitement aux rayons UV. A l'inverse, les *STS* du groupe B sont très fortement induites par les UV, et les *STS* du groupe C montrent une induction intermédiaire aux *STS* des groupes A et B. Ces analyses ont ensuite été confirmées par qPCR, où un gène *STS* représentatif de chaque groupe (*VvSTS6* pour le groupe A, *VvSTS48* pour le groupe B et *VvSTS16* pour le groupe C) a été utilisé. Cette analyse a confirmé que *VvSTS48* (groupe B) est le gène *STS* le plus induit suite à un stress biotique ou abiotique, et que *VvSTS6* (groupe A) et *VvSTS16* (groupe C) possèdent le même profil d'expression, mais que ces deux gènes sont plus faiblement induits en comparaison avec *VvSTS48*.

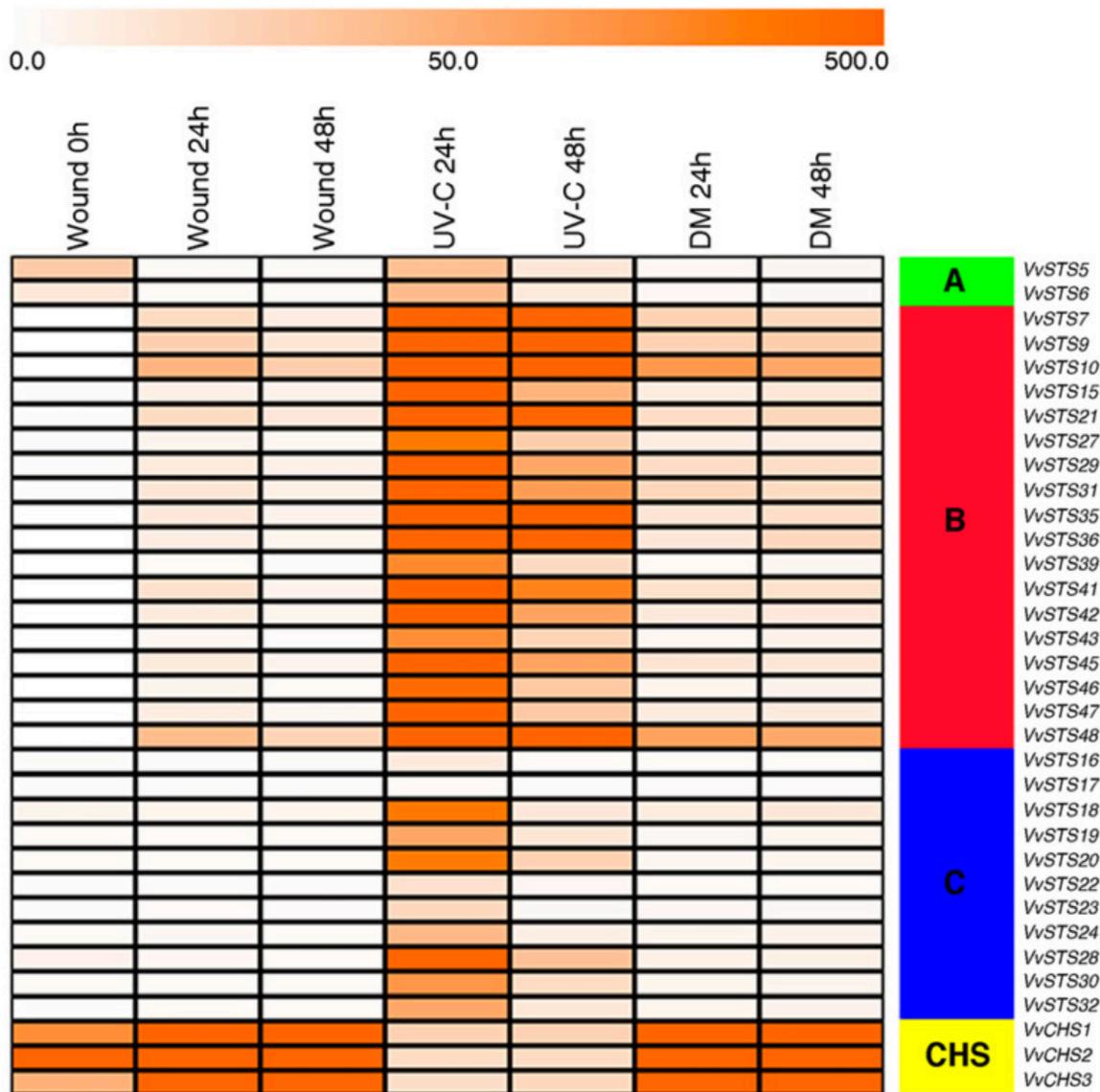


Figure 39 : Expression de la famille des STS de *V. vinifera* var. PN40024 suite à un stress (Vannozzi et al., 2012).

Les traitements sont indiqués au dessus de chaque colonne : wound, blessure ; UV, traitement aux rayons UV ; DM, traitement au mildiou de la vigne (*P. viticola*). L'expression des chalcone synthases (CHS) est également indiquée. L'intensité de la couleur orangée est proportionnelle à l'intensité de l'expression des différents gènes, exprimée en nombre de séquences par kb d'exon et par million de séquences « mappées » (RPKM : number of mapped reads per kb of exon per million mapped reads).

L'un des résultats très intéressants de cette étude est la mise en évidence d'une possible régulation conjointe de la voie de synthèse générale des flavonoïdes et de celle des stilbènes. En effet, les deux analyses d'expression (constitutive et suite à un stress), montrent que le profil

d'expression des CHS est à l'exact opposé de celui des STS. Cette régulation conjointe pourrait viser à diminuer les effets d'une compétition existante entre les enzymes CHS et STS pour leurs deux substrats communs, de manière à optimiser la synthèse de stilbènes ou de flavonoïdes en fonction des besoins de la plante.

### 3.3.3 *Hypothèse concernant l'évolution de la famille des STS et confrontation des conclusions concernant l'expansion de cette famille de gènes.*

Les auteurs supposent que la famille des gènes *STS* provient d'une succession de duplications en tandem et segmentaires, dont les membres auraient été maintenus au cours de l'évolution en temps que « gènes réservoirs », conférant ainsi un grand nombre de gènes ayant un potentiel adaptatif. Pour expliquer le maintien du nombre de copies de gènes *STS*, ils mettent en avant la théorie de la sub-fonctionnalisation transcriptionnelle, à savoir la spécialisation de l'expression des différentes copies des gènes de *STS* au cours de l'évolution.

Dans cette étude, les auteurs ont pu analyser plus finement l'expression constitutive des gènes *STS*, mais également suite à un stress biotique ou abiotique. Selon leurs travaux, les gènes *STS* montrent des différences aussi bien au niveau des profils d'expression, qu'au niveau du temps d'induction des différents gènes :

- Les gènes *STS* du groupe A (chromosome 10) sont exprimés de façon constitutive et répondent de manière limitée au stress
- les gènes *STS* du groupe B (chromosome 16) sont très fortement exprimés suite à un stress (les *STS* du groupe C dans une moindre mesure).
- Les gènes *STS* des groupes A et C possèdent le même profil d'expression suite à un stress biotique ou abiotique, ces profils d'expression étant différents du profil d'expression de *VvSTS48*, représentatif du groupe B. L'expression des gènes *STS* du groupe C montrent une induction plus forte que celle des gènes du groupe A.

Dans leur analyse évolutive du génome d'*A. thaliana*, Rutter et al. suggèrent que si les gènes dupliqués possèdent un profil d'expression plus tissu-spécifique ou plus adapté à un stress environnemental spécifique, alors ces gènes suivent probablement le modèle de la sub-fonctionnalisation (Rutter et al., 2012). L'exemple des flavonoïde 3',5'-hydroxylases (*F3'5'H*) responsables de la synthèse de précurseurs d'anthocyanines bleues a été utilisé dans l'étude de

Vannozzi et al. pour illustrer ce phénomène. En effet, la famille des *F3'5'H* est composée de 15 membres, qui présentent des variations au niveau des régions promotrices des copies récentes de *F3'5'H*, amenant l'expression différentielle des gènes au niveau des organes, des stades de développement et même des cultivars (Falginella et al., 2010). A la lumière des données obtenues dans l'étude de Vannozzi et al., la sub-fonctionnalisation transcriptionnelle est l'hypothèse la plus probable pour expliquer le maintien d'un grand nombre de copies de gènes *STS* dans le génome de la vigne.

Cependant, si la sub-fonctionnalisation transcriptionnelle est une hypothèse sérieuse concernant le maintien des gènes *STS* au sein du génome de la vigne, elle ne permet pas d'expliquer l'expansion exceptionnelle de cette famille. Par ailleurs, l'inhabituelle expansion des familles de gènes appartenant au métabolisme secondaire de la vigne n'est pas restreinte aux stilbènes, car on peut également l'observer au niveau de la famille des terpène synthases (*TPS*, 89 gènes fonctionnels identifiés chez la vigne par rapport à 30-40 chez *A. thaliana*, le riz ou le peuplier) ou des phénylalanine ammonia-lyases (*PAL*, 13 gènes fonctionnels identifiés chez la vigne par rapport à 4-8 chez *A. thaliana*, le riz ou le peuplier). L'origine de ces amplifications sélectives n'est pas connue.

### 3.4 Interaction des STS avec des partenaires cellulaires

Dans l'exemple des cytochromes P450 *CYP98A8* et *CYP98A9* intervenant tous deux dans la voie de biosynthèse des phénolamides, deux groupes d'acides aminés (respectivement de 3 et de 9 résidus) sous sélection positive ont été identifiés à la surface de la protéine. Le groupe de trois acides aminés étant localisé à proximité de l'extrémité N-terminale de la protéine, les auteurs suggèrent une interaction possible avec des membranes (Matsuno et al., 2009).

Dans le cas des STS de vigne, une position sous sélection positive (Pro-269), située au voisinage du site actif a été détectée à la base du clade des STS et des CHS. Cette position est soumise à des pressions de sélection contrastées car, au sein du clade des STS, Pro-269 est sous sélection purificatrice. Ce type de sélection « contrastée » est attendu pour une position dont l'évolution a joué un rôle important dans la transition de l'activité CHS vers l'activité STS. Des expériences de mutagenèse dirigée permettront de tester cette hypothèse. Un autre constat intéressant réside dans les positions sous sélection purificatrice retrouvées à la périphérie de la

protéine (Lys-14, Ser-231 et Asn-392). Ensembles, ces acides aminés fortement conservés forment une région qui pourrait être impliquée dans des interactions avec d'autres protéines partenaires. De telles interactions sous la forme de complexes macromoléculaires (ou métabolons) au sein des voies de biosynthèse du métabolisme des phénylpropanoïdes ont déjà pu être démontrées (Winkel, 2004), notamment pour la formation des précurseurs de la lignine, ou des flavonoïdes. Par exemple, la PAL et la CHS ont été détectées dans des compartiments subcellulaires sphériques chez *Primula kewensis*. De plus, la CHS et la chalcone isomérase (CHI) ont été co-localisées à l'intérieur de particules denses aux électrons (environ 200 nm de diamètre) dans des cellules de racines d'*A. thaliana* (Winkel, 2004). L'organisation du métabolon amenant à la synthèse des flavonoïdes est illustrée dans la Figure 40.

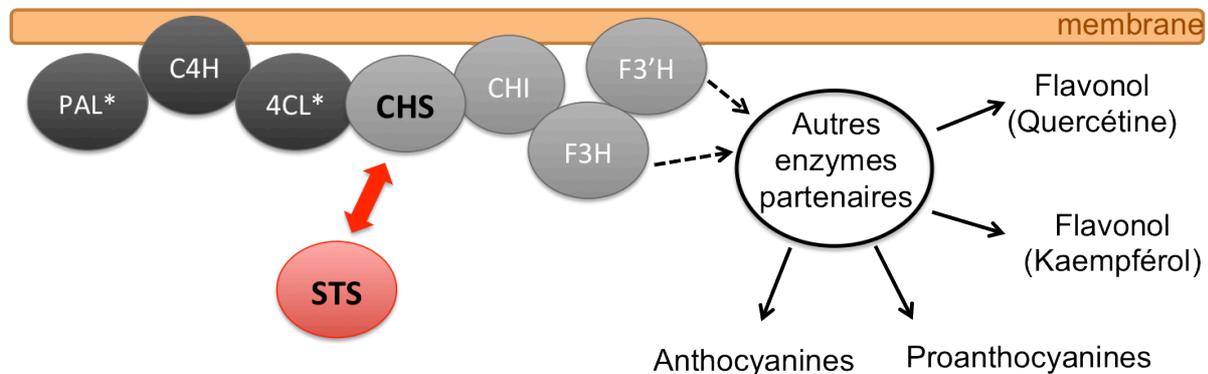


Figure 40 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes organisée en métabolon. (Adapté de Winkel, 2004).

Les enzymes communes à plusieurs métabolons sont colorées en noir, les enzymes spécifiques à une voie de biosynthèse particulière sont illustrées en gris. PAL, phénylalanine amonia-lysa ; C4H, cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL, 4-coumarate : CoA ligase ; CHS, chalcone synthase ; STS, stilbène synthase ; CHI, chalcone isomérase ; F3H, Flavanone 3-hydroxylase ; F3'H, Flavanone 3'-hydroxylase.

Une étude menée sur l'épicéa (*Picea abies*) suggère la participation des STS dans des métabolons pour la synthèse des stilbènes majeurs représentés dans cette espèce : l'astringine et l'isorhapontine (Hammerbacher et al., 2011). Le génome de l'épicéa possède deux gènes de *STS* (*PaSTS1* et *PaSTS2*), permettant la synthèse du resvératrol. Le resvératrol est ensuite hydroxylé par une 3'-hydroxylase, méthylé par une 3'-O-méthyltransférase puis glycosylé par une 3'-glycosyltransférase pour former l'astringine (forme non méthylée) ou l'isorhapontine

(forme méthylée). Chez les individus sauvages de *P. abies*, tout comme dans des lignées transgéniques surexprimant une *STS*, une très faible accumulation de resvératrol (ou sa forme glycosylée) a pu être détectée, suggérant la canalisation du resvératrol dans des complexes multienzymatiques impliquant entre autres des 3'-hydroxylases. La grande similarité structurale existant entre les CHS et les STS laisse supposer que les STS pourraient entrer en compétition avec les CHS au sein de ces complexes multienzymatiques ou métabolons, et nous pouvons ainsi supposer que les acides aminés sous forte pression de sélection et localisés à la surface des STS joueraient un rôle crucial dans l'interaction avec les autres partenaires enzymatiques du métabolon. Des preuves de la compétition entre les CHS et les STS pour leurs substrats (*p*-coumaroyl-CoA et malonyl-CoA) ont déjà été mises en évidence au niveau de lignées transgéniques surexprimant un gène de *STS*. La surexpression d'une *STS* a pour effet d'entraîner un bouleversement du métabolisme des flavonoïdes, conduisant par exemple à une décoloration des fleurs ou encore à une stérilité du pollen chez le tabac (*N. tabacum*) (Fischer et al., 1997).

## 4 Perspectives

Ce travail constitue la première analyse fonctionnelle et évolutive d'une famille de gènes *STS* (toutes plantes confondues) et l'étendue exceptionnelle de cette famille chez la vigne en fait un exemple particulièrement intéressant d'amplification d'une famille de gènes liée au métabolisme secondaire. Les perspectives de ces travaux seront développées dans le paragraphe « Conclusion générale » situé à la fin de ce manuscrit.

*CHAPITRE II :*  
*Analyse fonctionnelle*  
*de la famille des resvératrol*  
*O-méthyltransférases de la vigne*

---



# CHAPITRE II : Analyse fonctionnelle de la famille des resvératrol *O*-méthyltransférases de la vigne

---

## 1 Introduction

La méthylation des groupements hydroxyles par des *O*-méthyltransférase S-adénosyl-L-méthionine (SAM) - dépendantes (OMT) est une modification très courante dans le métabolisme secondaire végétal, qui module les propriétés physiologiques et la réactivité chimique des groupements méthylés (Zhu et al., 1994). Les OMT impliquées dans le métabolisme secondaire sont qualifiées « d'OMT à petites molécules » (small molecule OMTs), par opposition aux enzymes impliquées dans la méthylation de polymères comme l'ADN (Noel et al., 2003). Plusieurs classifications des OMT végétales ont été proposées, sur la base de leur structures ou de leur spécificité de substrat (Joshi and Chiang, 1998; Noel et al., 2003; Lam et al., 2007). Dans la nomenclature proposée par Noel et al. (2003), les OMT de type I se composent d'homodimères avec des tailles de sous-unités d'environ 38-43 kDa, qui ne nécessitent pas de cations divalents pour leur activité. Les membres de cette grande famille d'OMT sont impliqués dans la méthylation de l'acide caféique, de flavonoïdes, de coumarines, et d'alcaloïdes (Dong et al., 2003; Frick and Kutchan, 1999). Les OMT de type II constituent un groupe d'enzymes de poids moléculaire plus faible (23 à 27 kDa), dont l'activité dépend de la présence de cations métalliques. La plupart des membres de cette famille sont impliqués dans la méthylation d'esters de coenzyme A (CoA) (Ye et al., 1994).

A la différence des OMT de type I et II qui méthylent préférentiellement des groupements hydroxyles, les OMT de type III sont généralement impliquées dans la méthylation de groupements carboxyles. Les membres de cette famille sont regroupés sous le nom de « SABATH », qui provient de la contraction des noms de plusieurs membres de cette famille : **S**alicylic Acid methyltransferase, **B**enzoic Acid methyltransferase, **T**heobromin synthase (D'Auria and Pichersky, 2003).

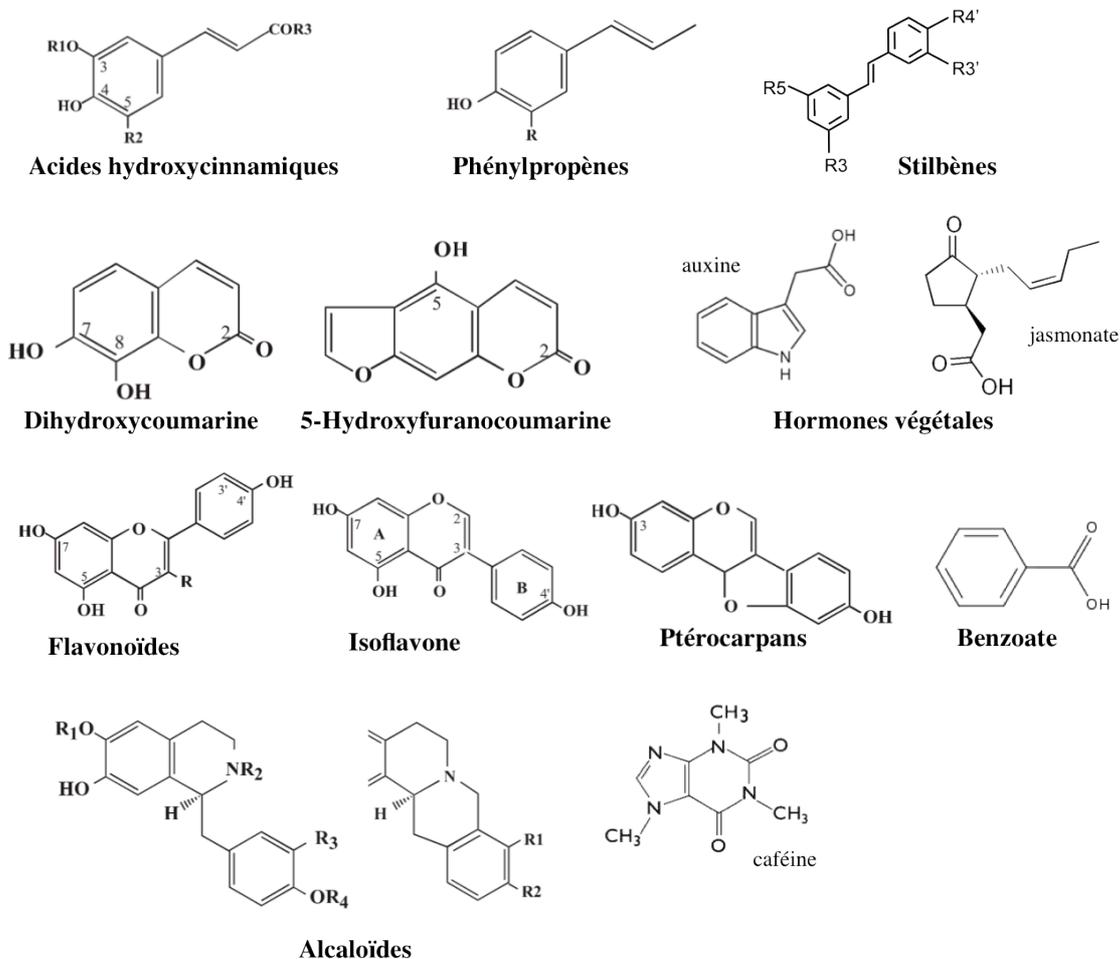


Figure 41 : Exemples de classes de substrat des OMT végétales.

## 1.1 Classification des méthyltransférases (MT)

### 1.1.1. Les *O*-méthyltransférases de type I

Les OMT de type I méthylent les groupements –OH d’une multitude de substrats appartenant au métabolisme secondaire végétal, et plus particulièrement à la voie des phénylpropanoïdes (Figure 42). Ces OMT sont des homodimères dont les sous-unités ont un poids moléculaire de 38 à 43 kDa. Elles ne requièrent pas de cations divalents pour leur activité et représentent la majorité des OMT connues à ce jour. L’archétype de la famille est la « caffeic acid *O*-methyltransferase » (COMT), impliquées dans la biosynthèse des lignines (Dixon et al., 2001)

Plusieurs OMT de type I ont été cristallisées à ce jour, c’est le cas par exemple de l’isoflavone *O*-méthyltransférase (IOMT), de la chalcone *O*-méthyltransférase (ChOMT), de

l'acide caféique/5-hydroxyfêruloïque 3/5-*O*-méthyltransfêrase (COMT) de la luzerne (*Medicago sativa*) (Zubieta et al., 2001; Gang et al., 2002), mais aussi de l'hydroxyisoflavanone 4'-*O*-méthyltransfêrase (HI4'OMT) de *Medicago truncatula* (Liu et al., 2006).

La ChOMT de luzerne catalyse la méthylation en 2'-OH de l'isoliquiritigénine pour former la 4,4'-dihydroxy-2'-méthoxychalcone (Maxwell et al., 1992, 1993), une molécule capable d'activer les gènes de la nodulation et empêchant l'action de la chalcone isomérase, ayant pour effet de stopper le flux métabolique vers la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Jez et al., 2000). Plusieurs OMT impliquées dans la biosynthèse de phytoalexines ont été caractérisées chez les légumineuses, c'est par exemple le cas de l'isoflavone OMT (IOMT) impliquée dans la formation de la médicarpine chez *Medicago sativa* (He and Dixon, 1996), ou encore la 6a-hydroxymaackiain 3-*O*-méthyltransfêrase (HM3OMT) de *Pisum sativum* qui permet de former la pisatine (Wu et al., 1997). D'autres OMT participent à la synthèse de composés volatils aromatiques présents dans les parfums de certaines fleurs et plantes aromatiques. C'est par exemple le cas des orcinol-OMT1 et 2 des roses hybrides (Scalliet et al., 2008), la chavicol et l'eugénol-OMT du basilic (*Ocimum basilicum*) (Gang et al., 2002), ou l'(iso)eugénol *O*-méthyltransfêrase de *Clarkia breweri* (Wang et al., 1997). En 2008, la resvératrol *O*-méthyltransfêrase (ROMT) qui catalyse la double méthylation du resvératrol pour former le ptérostilbène, a été caractérisée dans notre laboratoire, ce qui constitue la première caractérisation de ce type d'activité enzymatique (Schmidlin et al., 2008). Chez le sorgho (*S. bicolor*), la sorgoléone qui possède des propriétés allélopathiques, est synthétisée au niveau des racines et fait intervenir une OMT (Dayan et al., 2010), qui, étonnamment, est également capable de produire du ptérostilbène à partir du resvératrol *in vitro* et *in planta*. Ce gène a d'ailleurs été utilisé récemment pour l'obtention de plantes transgéniques accumulant du ptérostilbène (Rimando et al., 2011).

Les acide caféique *O*-méthyltransfêrases (COMT) sont responsable de la synthèse des substrats méthylés entrant dans la composition de la lignine, et regroupent à la fois les acide caféique 3-*O*-méthyltransfêrases, et les acides 5-hydroxyfêruloïque-*O*-méthyltransfêrases. Les COMT sont des enzymes assez peu spécifiques, puisqu'elles sont capables de méthyler une grande diversité de substrats (Noel et al., 2003). Chez *Pinus*, une pinosylvine méthyltransfêrase (PMT) montre une activité avec un grand nombre de substrats différents, et explique la formation du stilbène pinosylvine 3-méthyléther caractéristique du genre *Pinus*, à partir du resvératrol (Chiron, Drouet, Lieutier, et al., 2000). De part son activité avec plusieurs substrats, dont les acides (-CoA) hydroxycinnamiques et les flavonoïdes, la PMT est considérée comme étant une COMT.

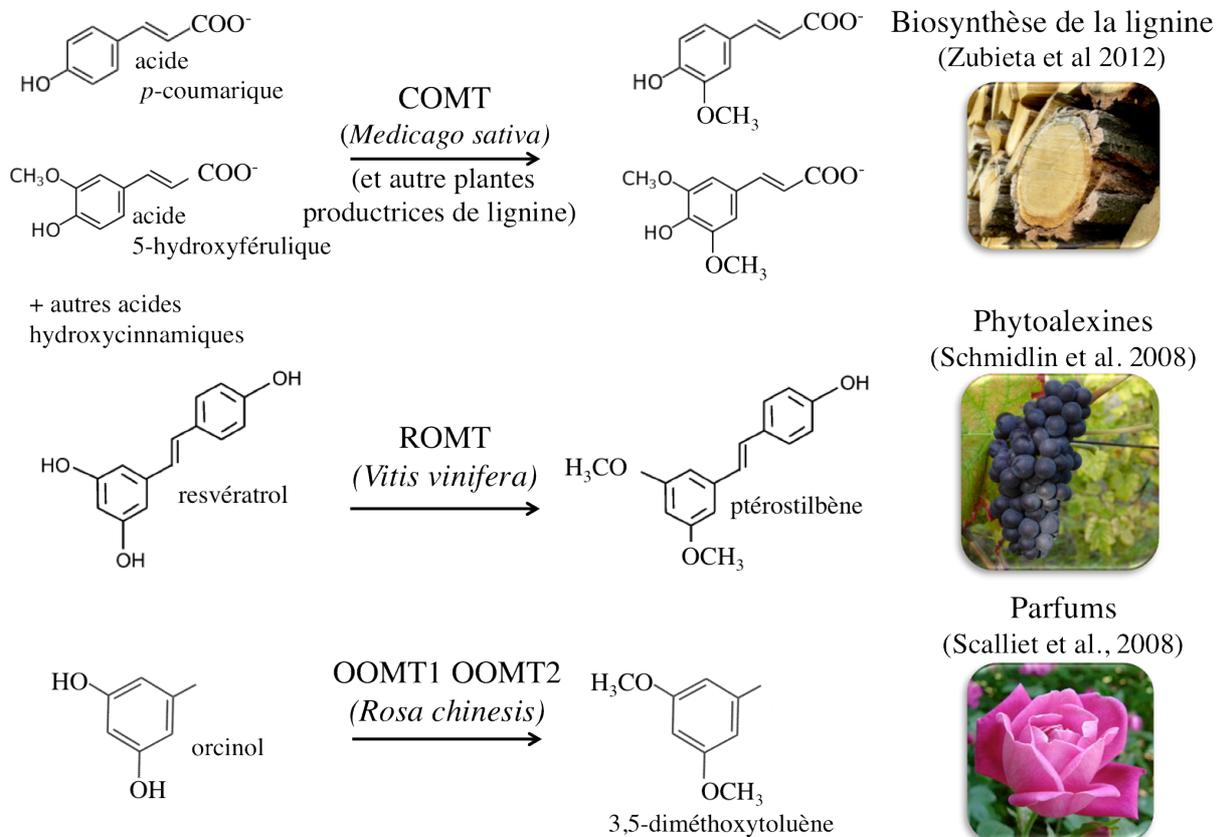


Figure 42: Exemples d'*O*-méthyltransférases de type I.

COMT, acide caféique/acide 5-hydroxyfêruloïque 3/5 *O*-méthyltransférase ; ROMT, resvératrol *O*-méthyltransférase ; OOMT1, OOMT2, orcinol *O*-méthyltransférase 1 et 2.

Certains membres de la famille des OMT de type I ne sont pas de « vraies » OMT, car elles méthylent préférentiellement des atomes d'azote (NMT) ou des groupements sulfhydryles (SMT). Parmi les NMT et les SMT, on peut citer par exemple la SMT de *Catharanthus roseus* (Coiner et al., 2006), la NMT du blé (*Hordeum vulgare*) impliquée dans la voie de biosynthèse de l'alcaloïde gramine, anciennement caractérisée comme étant une COMT (Larsson et al., 2006), l'antranilate N-méthyltransférase (ANMT) de la rue (*Ruta graveolens*) impliquée dans la biosynthèse des alcaloïdes dérivés de la structure acridone (Rohde et al., 2008).

### 1.1.2. Les *O*-méthyltransférases de type II

Les OMT de type II forment un groupe à priori moins diversifié que celui des OMT de type I, et dont l'archétype est la caféoyl-CoA OMT (CCoAOMT) et la 5-hydroxyfêruloïl-CoA OMT, capables de méthyler les esters-CoA d'acides hydroxycinnamiques entrant dans la composition des polymères végétaux tels que la lignine (Figure 43). Dans ce groupe, des OMT capables de méthyler les flavonoïdes ou les phénylpropanoïdes conjugués ont également été caractérisées. Typiquement, les sous-unités de ces OMT ont un poids moléculaire de 28 à 30 kDa, plus faible que celui des OMT de type I, et leur activité nécessite la présence de cations divalents ( $Mg^{2+}$ ) qui permettent de déprotoner le groupement hydroxyle accepteur en vue du transfert du groupement méthyle. La CCoAOMT a été cristallisée (Ferrer et al., 2005), et sa structure possède des similarités avec la catéchol OMT animale (Vidgren et al., 1994). En 2003, une OMT  $Mg^{2+}$ -dépendante de 26,6 kDa capable de méthyler à la fois le caféoyl-CoA et les flavonoïdes a été identifiée pour la première fois chez la ficoïde glaciale (*Mesembryanthemum crystallinum*) (Ibdah et al., 2003). Par la suite, d'autres OMT capable de méthyler les flavonoïdes ont été identifiées, comme la SOMT-2 du soja (*Glycine max*), permettant la biosynthèse de l'isorhamnétine (3'-méthoxyquercétine) à partir de la quercétine, un flavonoïde (Kim et al., 2006), ou encore les ROMT 15 et 17 du riz (*O. sativa*), capables de méthyler à la fois le caféoyl-CoA, les flavonones et les flavonols (Lee et al., 2008). Plus récemment encore, une anthocyanine-OMT (AOMT1) impliquée dans la méthylation des anthocyanines et des flavonols a été caractérisée chez la vigne (Huguéney et al., 2009).

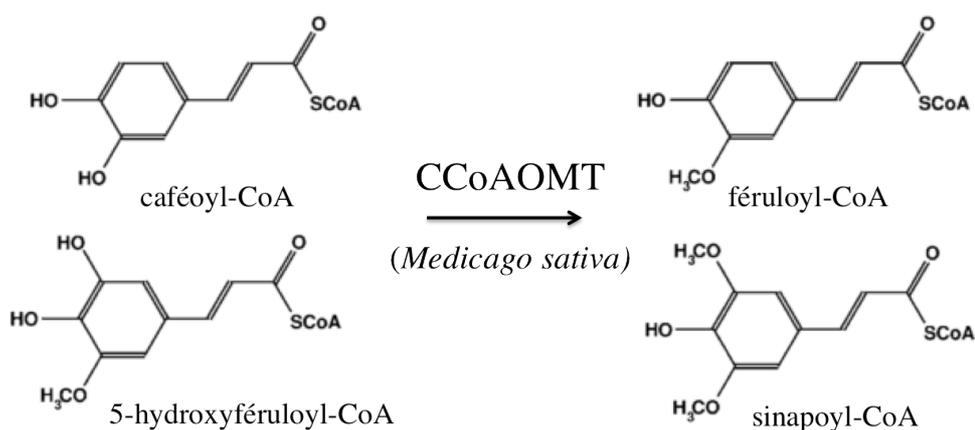


Figure 43: Réactions enzymatiques catalysées par la CCoAOMT (Caféoyl-CoA 3-O-méthyltransférase) de *Medicago sativa*.

### 1.1.3. Les O-méthyltransférases de type III

Les OMT de type III catalysent le transfert de groupement  $-CH_3$  au niveau de groupements carboxyles. Ces enzymes appartiennent à la famille des enzymes SABATH (Acide Salicylique COMT (SAMT), Acide Benzoïque COMT (BAMT) et THéobromine NMT), un terme adopté pour ces enzymes depuis 2003 (D'Auria and Pichersky, 2003). Par exemple, les acides salicylique-méthyltransférases (SAMT) permettent la méthylation à la fois de l'acide benzoïque (AB) et de l'acide salicylique (AS), pour former des molécules aromatiques rentrant dans la composition du bouquet floral de *Clarkia breweri* (Ross et al., 1999) (Figure 44). A partir de la séquence de la SAMT de *Clarkia*, un grand nombre de SAMT-like et de jasmonate méthyltransférases (JMT) ont été identifiées. Pour exemple, citons la BAMT de la gueule de loup (*Anthirrhinum majus*), qui permet de former le benzoate, le composé volatil odorant le plus abondant chez cette plante (Dudareva et al., 2000; Murfitt et al., 2000), la SAMT de *Stephanotis floribunda* ou la BSMT (capable de méthyler l'AS et l'AB) de *Nicotiana suaveolens* (Pott et al., 2004; Verlag et al., 2002). Chez *Arabidopsis thaliana*, la BSMT permet la synthèse de méthylbenzoate et de méthylsalicylate, participant aux mécanismes de défense (Chen et al., 2003). Des enzymes ayant des propriétés similaires ont été caractérisées chez le riz (*O. sativa*) (Xu et al., 2006; Koo et al., 2007). Chez *A. thaliana*, la méthylation de l'acide jasmonique (AJ) par des AJ-méthyltransférases (JMT) pour former le méthyljasmonate, permet la régulation du développement et des mécanismes de défense (Seo et al., 2001). La méthylation des gibbérellines (GA) par les gibbérellines méthyltransférases (GMT) jouerait également un rôle déterminant dans le développement des graines (Varbanova et al., 2007), tout comme la méthylation de l'auxine (IAA) par les IAA méthyltransférases (IAMT) permettent de moduler le développement en régulant les niveaux d'auxine *in planta* (Qin et al., 2005; Zhao et al., 2008, 2007). Chez le basilic, (*Ocimum basilicum*), l'acide cinnamique et l'acide *p*-coumarique peuvent être méthylés par des cinnamate/*p*-coumarate méthyltransférases (CCMT), pour former le méthylcinnamate ou le méthylcoumarate respectivement, deux autres représentants du bouquet floral du basilic (Kapteyn et al., 2007). Chez le thé (*Camellia sinensis*) et le café (*Coffea arabica*), la dernière étape de la biosynthèse de la caféine (1,3,7-triméthylxanthine) est réalisée par la caféine synthase, une NMT qui permet la double méthylation de la 7-méthylxanthine et de la théobromine (Mizuno et al., 2003; Kato et al., 2010; Misako and Kouichi, 2004).

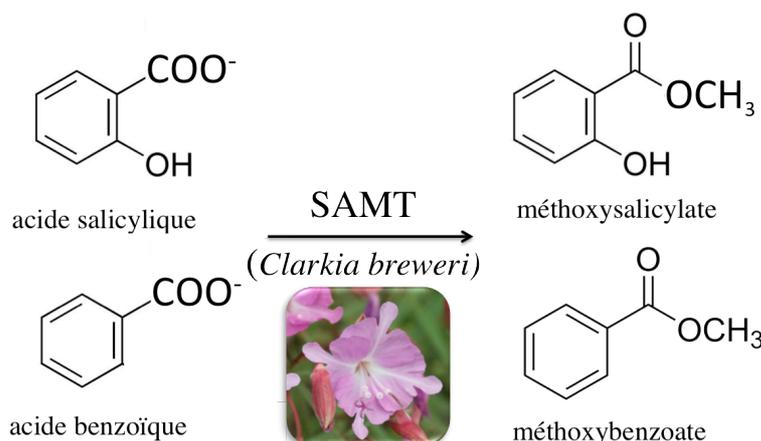


Figure 44: Acide salicylique carboxyl-méthyltransférase (SAMT) de *Clarkia breweri*.

## 1.1 Génomique des O-méthyltransférases

La caractérisation des familles de gènes OMT dans différents génomes végétaux met en évidence une augmentation du nombre d'OMT en fonction du degré de complexité des plantes considérées. Le génome de *Physcomitrella patens* comporte 8 ou 9 gènes OMT (dont 3 SABATH), celui d'*A. thaliana* compte 48 gènes OMT (dont 24 SABATH), tandis que ceux du riz, du peuplier ou de la vigne comptent au moins 80 à 90 gènes OMT, dont une trentaine de SABATH (Sébastien Aubourg, communication personnelle). Si certaines OMT sont présentes dans tous les génomes des plantes supérieures (COMT et CCoAOMT, impliquées dans la synthèse des lignines, par exemples), toutes les sous-familles d'OMT ne sont pas représentées dans les différents génomes cités ci-dessus (Figure 45). En effet, la famille des OMT illustre bien le phénomène d'évolution de familles de gènes particulières chez certaines espèces végétales, en relation avec la diversification du métabolisme secondaire des plantes (Pichersky and Gang, 2000). La famille des resvératrol O-méthyltransférases (ROMT), qui fait l'objet de ce chapitre, est très développée chez la vigne, mais elle n'a pas d'équivalent chez *A. thaliana*. Comme la famille des stilbène synthases, cette famille semble avoir subi une amplification particulière chez la vigne. En complément de l'étude des *STS*, nous avons donc décidé d'aborder la caractérisation des gènes *ROMT*, afin de comprendre le rôle de cette famille et de son amplification dans le métabolisme des stilbènes chez la vigne.

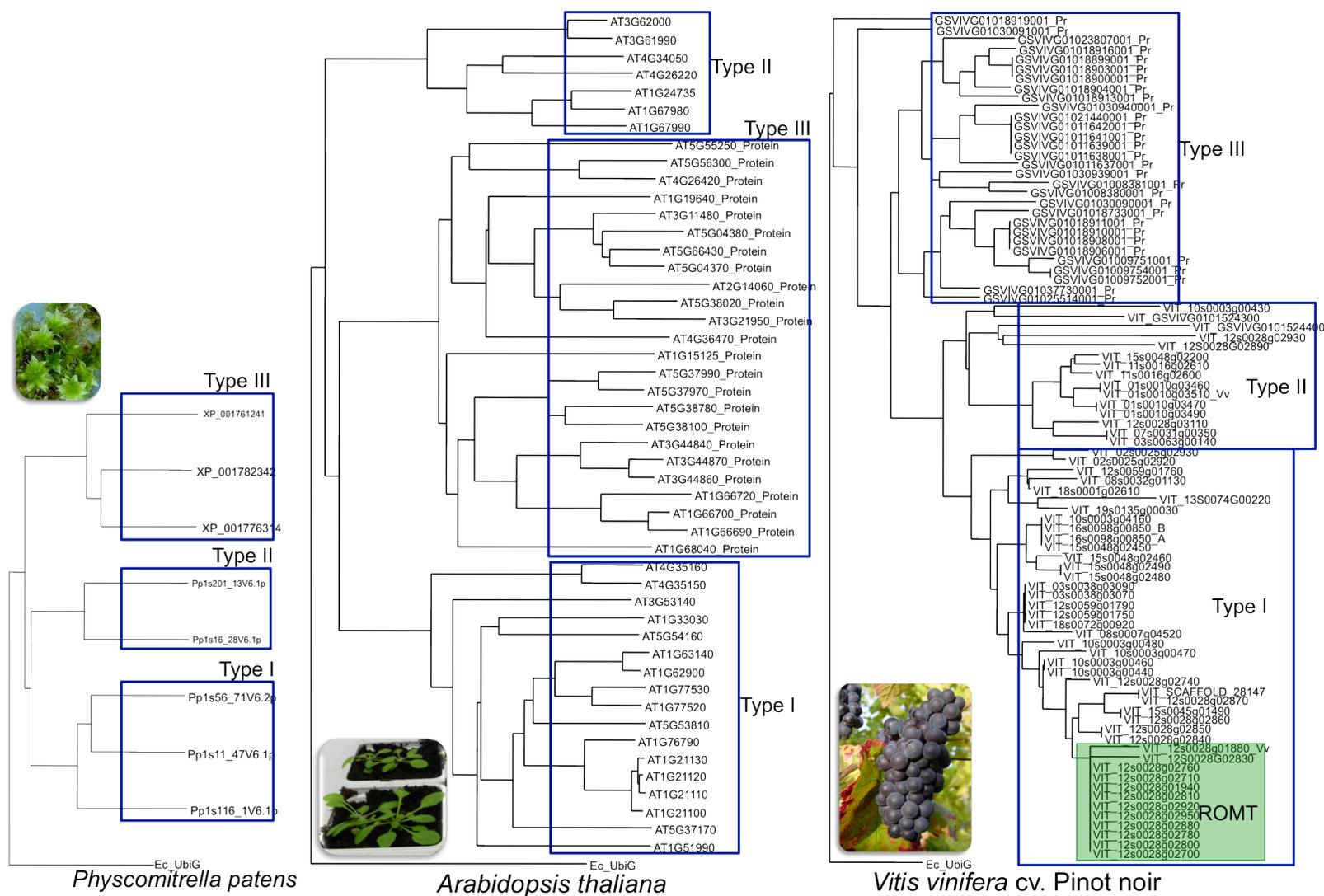


Figure 45 : Arbres phylogénétiques comparés des OMT chez trois espèces végétales : *P. patens* (Mousses), *A. thaliana* (Brassicacées) et *V. vinifera* (Vitacées) var. PN40024.

## 1.2 Etude de la famille des *ROMT* de vigne

En 2008, la resvératrol *O*-méthyltransférase (ROMT), qui catalyse la double méthylation du resvératrol pour former le ptérostilbène, a été caractérisée dans notre laboratoire, ce qui constitue la première caractérisation de ce type d'activité enzymatique (Schmidlin et al., 2008). Cette ROMT est issue de la variété Cabernet sauvignon (ROMT CS11), et a été identifiée grâce à son homologie de séquence avec une OMT de rose (Orcinol *O*-méthyltransférase) caractérisée précédemment chez la rose (Scalliet et al., 2008). Chez le Cabernet sauvignon, plusieurs allèles *ROMT* ont été clonés et testés pour leur capacité à synthétiser le resvératrol, et seul l'allèle *ROMT CS11* permet la synthèse de ptérostilbène. Les autres allèles n'ont pas fait l'objet d'études supplémentaires, et l'absence de données de séquences génomiques n'a pas permis une étude fine de cette famille de gènes. Avec la disponibilité de la séquence du génome de *V. vinifera* var. *PN40024*, l'étude approfondie des OMT de vigne et, plus particulièrement, de la famille des gènes *ROMT* putatifs, a pu être initiée.

## 2 Résultats

### 2.1 Analyse de la famille des *ROMT* de vigne

#### 2.1.1 Identification des différents gènes

A mon arrivée au laboratoire, 7 gènes *ROMT* avaient été identifiés précédemment dans la séquence 8X du génome de *V. vinifera* var. *PN40024* à partir de la séquence de la ROMT du Cabernet sauvignon. Mon travail s'est inscrit dans la continuité de ces travaux. Dans un premier temps, j'ai poursuivi l'analyse de la famille des gènes *ROMT* en utilisant les nouvelles données de séquençage 12X du génome de *V. vinifera* var. *PN40024*. Par une série de Blast (<http://www.genoscope.cns.fr/blat-server/cgi-bin/vitis/webBlat>), j'ai ainsi identifié 17 gènes *ROMT* potentiels, répartis sur le chromosome 12. Certains gènes *ROMT* avaient déjà été identifiés par l'annotation automatique du Génoscope, mais ce n'est pas systématiquement le cas. Par exemple les gènes *VvROMT3* et *VvROMT4* partageaient la même annotation (GSVIVT01020647001), et le gène *VvROMT16* partiel n'avait pas été annoté. Nous avons donc

décidé d'adopter une nomenclature simplifiée allant de la *VvROMT1* à la *VvROMT17*, suivant l'ordre d'apparition physique des ROMT le long du chromosome 12 (Tableau 18).

Parmi ces 17 gènes, 14 gènes sont complets et potentiellement fonctionnels, deux sont probablement des pseudogènes (*VvROMT3* et *VvROMT8*) et un gène n'est que partiellement séquencé (*ROMT16*). Les gènes sont espacés entre eux d'un intervalle allant de 4 436 à 908 938 pb. La Figure 46 récapitule l'organisation physique de la famille des *ROMT*.

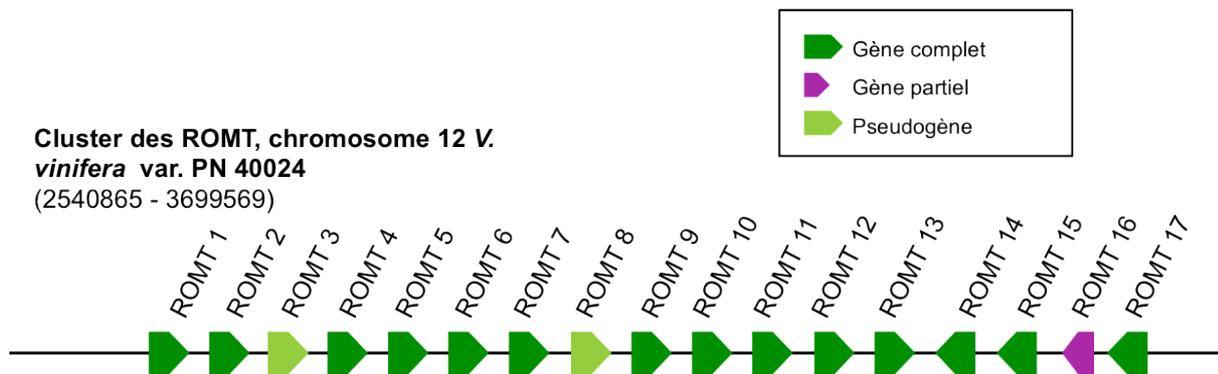


Figure 46 : Organisation physique de la famille des *ROMT* de vigne

L'arbre phylogénétique présenté Figure 47 permet de distinguer quatre sous-familles potentielles au sein des ROMT. La première est formée par les ROMT 1, 2, 5, 7, 10 et 11 ; l'autre est composée des ROMT 4, 6 et 9 ; la suivante est représentée par les ROMT 12 et 13 et enfin la dernière comporte les ROMT 14, 15 et 17. L'arbre a été construit à partir de l'alignement des séquences protéiques des différentes ROMT. Le gène *ROMT CS11* du Cabernet sauvignon qui a permis d'identifier la famille des *ROMT* du PN40024 possède potentiellement deux orthologues: *VvROMT1* et *VvROMT2*, dont les produits partagent respectivement 99,2 % et 98,1 % d'identité de séquence protéique.

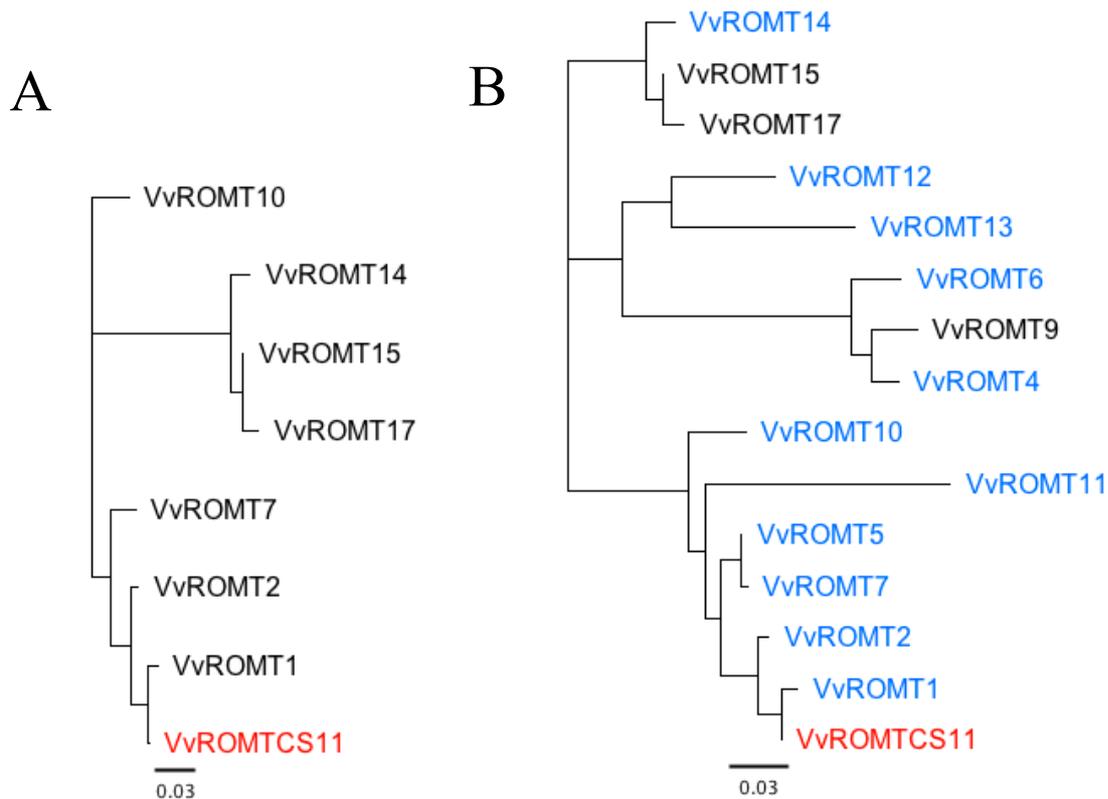


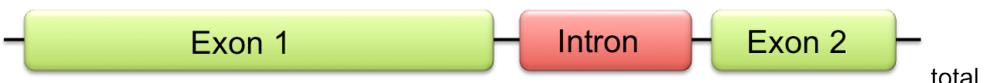
Figure 47 : Arbre phylogénétique de la famille des ROMT de vigne.

Comparaison des ROMT identifiées dans le génome de *V. vinifera* var. PN40024 issu des séquençages 8X (A) et 12X (B). Ces deux arbres ont été obtenus sur la base des séquences protéiques des ROMT ; les ROMT 3 et 8 (issues de pseudogènes) ainsi que ROMT 16 (issu d'un gène partiel) n'ont pas été utilisées pour la construction de l'arbre. La ROMT CS11 du Cabernet sauvignon a été utilisée comme référence et est indiquée en rouge, les ROMT dont les gènes ont été clonés sont indiquées en bleu.

Tableau 18 : Récapitulatif de la famille des gènes *ROMT*. Sens : orientation du gène le long du chromosome.

	Sens	Début	Position sur le chr. 12	annotation	Intervalle entre 2 gènes (pb)	Début	Fin
<b>ROMT17</b>	-	3699540	chr12:3697540..3699740	GSVIVT01020619001	16005	3698249	3699569
<b>ROMT16</b>	-	3683535	chr12:3682035..3685535	Pas d'annotation	4435	3682035	3683674
<b>ROMT15</b>	-	3679100	chr12:3677200..3679200	GSVIVT01020623001	17629	3677671	3679108
<b>ROMT14</b>	-	3661471	chr12:3661571..3659571	GSVIVT01020629001	15669	3660136	3661479
<b>ROMT13</b>	+	3645802	chr12:3645702..3647702	GSVIVT01020632001	9591	3645774	3647115
<b>ROMT12</b>	+	3636211	chr12:3636135..3638544	GSVIVT01020634001	9841	3636182	3638237
<b>ROMT11</b>	+	3626370	chr12:3626190..3628390	GSVIVT01020635001	13007	3626327	3627603
<b>ROMT10</b>	+	3613363	chr12:3613263..3615363	GSVIVT01020636001	17877	3613363	3614811
<b>ROMT09</b>	+	3595486	chr12:3595286..3597486	GSVIVT01020637001	8840	3595486	3596766
<b>ROMT08</b>	+	3586646	chr12:3586546..3588646	GSVIVT01020638001	6538	3586646	3588237
<b>ROMT07</b>	+	3580108	chr12:3580000..3582108	GSVIVT01020640001	16026	3580108	3581563
<b>ROMT06</b>	+	3564082	chr12:3564000..3566082	GSVIVT01020642001	54546	3564082	3565358
<b>ROMT05</b>	+	3509536	chr12:3509436..3511536	GSVIVT01020645001	12780	3509536	3510991
<b>ROMT04</b>	+	3496756	chr12:3496656..3498756	GSVIVT01020647001	13814	3496756	3498036
<b>ROMT03</b>	+	3482942	chr12:3482842..3484942	GSVIVT01020647001	908938	3482942	3484398
<b>ROMT02</b>	+	2574004	chr12:2573904..2576004	GSVIVT01020731001	33139	2574004	2575421
<b>ROMT01</b>	+	2540865	chr12:2540765..2542865	GSVIVT01020734001	/	2540865	2542288

La structure des gènes est similaire et très conservée ; elle comporte deux exons codants, séparés par un intron (Figure 48). La taille du premier exon est de 769 pb (sauf pour *VvROMT11*, 589 pb), la taille de l'intron varie entre 200 et 982 pb (*VvROMT12*), et la taille du deuxième exon est comprise entre 296 et 311 pb. La ROMT11 possède un site d'initiation de la traduction plus en aval des autres ROMT, amenant à la synthèse d'une protéine nettement plus courte (195 acides aminés), ce qui laisse des doutes sur la fonctionnalité de cette protéine.



	Exon 1	Intron	Exon 2	total
<i>VvROMT1</i>	769	350	305	1424
<i>VvROMT2</i>	769	344	305	1418
<i>VvROMT4</i>	769	201	311	1281
<i>VvROMT5</i>	769	382	305	1456
<i>VvROMT6</i>	766	200	311	1277
<i>VvROMT7</i>	769	382	305	1456
<i>VvROMT9</i>	769	201	311	1281
<i>VvROMT10</i>	769	375	305	1449
<i>VvROMT11</i>	589	392	296	1277
<i>VvROMT12</i>	769	982	305	2056
<i>VvROMT13</i>	769	268	305	1342
<i>VvROMT14</i>	769	270	305	1344
<i>VvROMT15</i>	769	364	305	1438
<i>VvROMT17</i>	769	247	305	1321

Figure 48 : Structure des gènes des différentes ROMT.

### 2.1.2 Clonage des gènes ROMT de *V. vinifera* var. PN40024

Tout comme pour le clonage des gènes STS, la grande conservation des séquences nucléotidiques au sein de la famille nécessite le clonage des différents gènes à partir des régions correspondant aux extrémités 5' et 3' non traduites des messagers. Au moins un gène candidat par sous-familles de *ROMT* a été ciblé pour le clonage, et les amorces utilisées sont indiquées Tableau 9 (page 74).

Les *ROMT* amplifiées à partir de l'ADN génomique ont été transférées dans un vecteur d'entrée pJET avant d'être séquencées. Les clones validés ont été utilisés comme matrice pour amplifier le gène *ROMT* à l'aide d'amorces spécifiques rajoutant des séquences de recombinaison en 5' et en 3' du gène (*attB1* et *attB2*, respectivement), qui permettront une intégration site-spécifique et directionnelle du gène dans un vecteur donneur Gateway™ (pDONR207) par recombinaison homologue (Figure 28). Cette étape nécessite une amplification par PCR, aussi les *ROMT* intégrées dans le pDONR207 sont également séquencées afin de vérifier la conformité de la séquence nucléotidique. Une fois la séquence validée, les *ROMT* sont transférées par recombinaison homologue dans un vecteur de destination final Gateway™, ou vecteur d'expression (pMDC32 pour l'expression *in planta*, ou pHNGWA pour l'expression chez *E. coli*).

Les vecteurs issus des clonages pJET™ ou Gateway™ sont transformés dans des bactéries *E. coli* XL1-Blue, dans le but :

- de sélectionner les clones positifs en présence d'antibiotiques sélectifs. Les clones sont par la suite analysés par PCR sur colonies afin de vérifier la présence du gène d'intérêt, et par conséquent du vecteur.
- d'amplifier les clones positifs via une mini-préparation d'ADN plasmidique.

Au total, 9 *ROMT* ont été clonées à partir de l'ADN génomique de *V. vinifera* var. PN40024 et deux *ROMT* (*VvROMT12* et *VvROMT13*) à partir d'ARN extraits de racine de *V. vinifera* var. PN40024 (Figure 49).

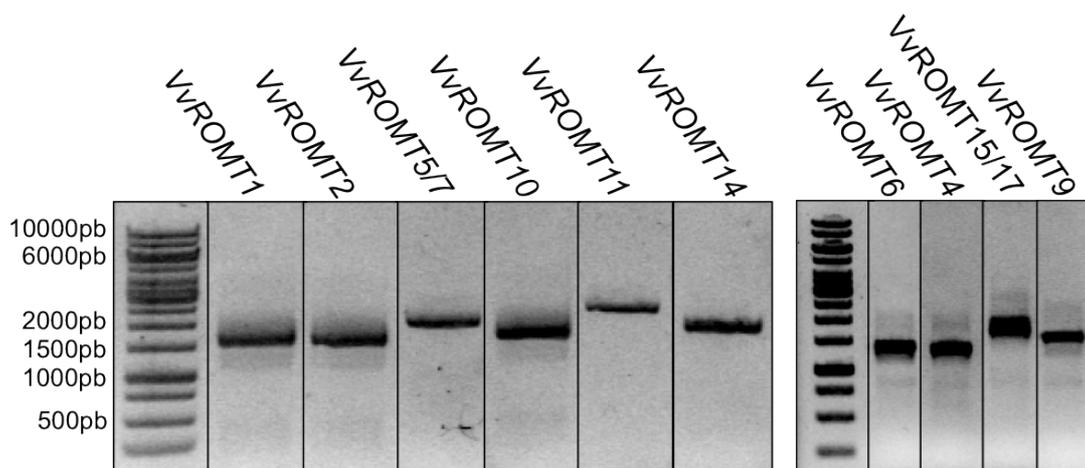


Figure 49: Clonage des ADNc des *ROMT* de vigne.

Amplification de *VvROMT1*, *VvROMT2*, *VvROMT4*, *VvROMT6*, *VvROMT5*, *VvROMT7*, *VvROMT9*, *VvROMT10*, *VvROMT11*, et *VvROMT14*.

Les tests enzymatiques des ROMT nécessitent le clonage des ADNc dans un vecteur d'expression Gateway<sup>TM</sup> spécifiquement utilisé pour l'expression de protéines chez *E. coli* (pHNGWA ou PHGWA). J'ai donc pu obtenir les ADNc des ROMT qui ont été clonées à partir de l'ADN génomique du PN40024. Pour cela j'ai utilisé le système d'expression transitoire chez *N. benthamiana*, afin d'exprimer les différents gènes *ROMT* dans les feuilles, et de profiter de l'épissage des gènes exprimés pour obtenir les ADNc correspondants. Ainsi, après extraction des ARNm des feuilles infiltrées et RT-PCR, les ADNc obtenus ont servi de matrice pour l'amplification des gènes *ROMT* par des primers spécifiques Gateway<sup>TM</sup> et intégration dans le pDONR207. Après avoir validé les clones par séquençage, les différentes ROMT sont transférées dans un vecteur d'expression Gateway<sup>TM</sup> de type pHGWA ou pHNGWA.

## 2.2 Analyse de l'expression des gènes *ROMT*

L'expression de la ROMT CS11 a été étudiée par RT-PCR au niveau de disques foliaires de vigne soumis à différents stress (Schmidlin et al., 2008). Il est apparu que le gène *ROMT CS11* était induit 24 h et 48 h après immersion des disques foliaires dans une suspension de sporanges de *P. viticola* ( $2 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$ ), avec un maximum d'expression 24 h post-infection. De même, suite à un stress abiotique de type stress UV ou métaux lourds ( $\text{AlCl}_3$ ), la ROMT CS11 montre un maximum d'induction 24 h après le traitement. Récemment, l'expression de la ROMT a été caractérisée une nouvelle fois au niveau des baies de *V. vinifera* cv. Marselan 48 h après infection par *B. cinerea*, mais aussi au niveau des feuilles 3 jours post-infection par *P. viticola*, avec un maximum d'expression 7 jours post-infection (Gamm et al., 2011). Par ailleurs, une large étude transcriptomique sur *V. vinifera* a pu mettre en évidence l'expression d'un gène (*VvROMT13*) au niveau des racines de vigne stressées par différents stress abiotiques (stress hydrique, salin, ou exposition au froid) (Tillett et al., 2011).

L'analyse des profils d'expression des gènes de la famille *ROMT* a donc été entreprise chez *V. vinifera* var. PN40024, au niveau de différents organes soumis ou non à un stress (biotique ou abiotique).

2.2.1 Expression des ROMT en l'absence de stress

L'analyse de l'expression des gènes *ROMT* en l'absence de stress a été entreprise par RT-PCR, au niveau des racines, des tiges, des pétioles et des feuilles de *V. vinifera* var. PN40024. Pour cela, les différents organes ont été prélevés, les ARNm ont été extraits puis une RT-PCR a été réalisée à partir des ARNm (protocole 2.3.1). De par la grande ressemblance des séquences nucléotidiques entre les différents gènes *ROMT*, la création d'amorces spécifiques à chaque gène n'était pas possible. Aussi, certaines amorces amplifient plusieurs gènes *ROMT*. Cependant, chaque couple d'amorce non-spécifique à un gène l'est néanmoins pour une sous-famille de gènes *ROMT*. Par exemple le couple d'amorce 1 est spécifique à la sous-famille composée des gènes *VvROMT1*, 2, 5, 7 et 10. Cela permet donc de distinguer l'expression des différentes sous-familles (Figure 50).

Seuls les gènes *VvROMT12* et *VvROMT13* sont exprimés de façon constitutive et uniquement dans les racines (Figure 50), ce qui va dans le même sens que les résultats obtenus par Tillett et al., qui ont pu mettre en évidence l'expression de *VvROMT13* au niveau des racines de vigne stressées (Tillett et al., 2011). Les ROMT 12 et 13 n'ont pas été caractérisées à ce jour, et leur expression constitutive suggère que ces enzymes jouent un rôle dans la méthylation de métabolites secondaires au niveau des racines. Ces ROMT seront étudiées plus en détail afin d'élucider leur fonction.

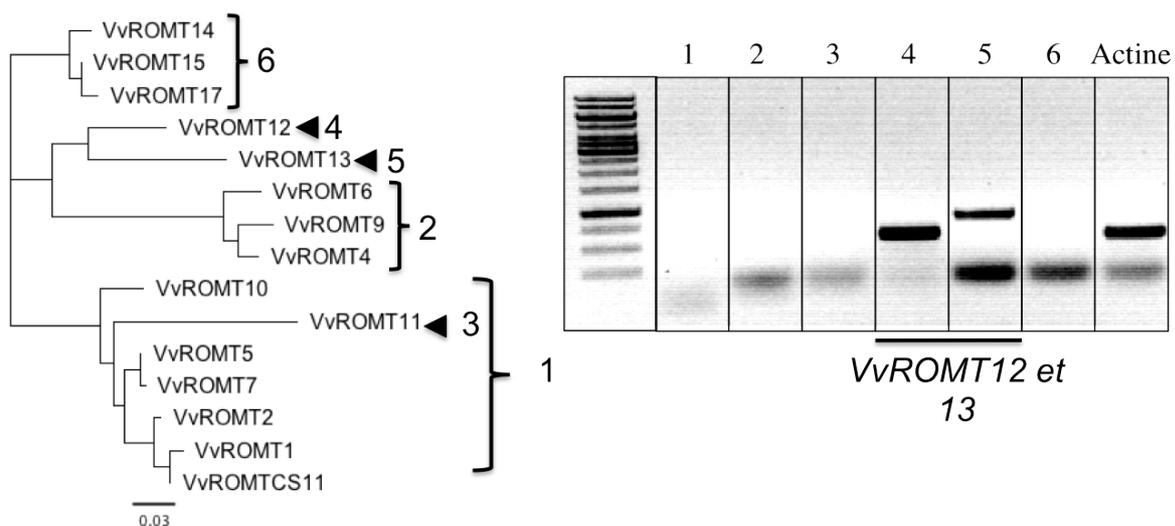


Figure 50 : Profil d'expression des gènes *ROMT* au niveau des racines de plantules de vigne.

### 2.2.2 Profil d'expression des gènes ROMT suite à une infection par *Plasmopara viticola*

Le profil d'expression des gènes ROMT a été analysé suite à une infection par *P. viticola* (cv. Resdur), afin d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans les mécanismes de défense de la vigne contre *P. viticola*.

L'expression des gènes ROMT a été caractérisée par qPCR avec l'aide de Julie Chong (UHA, Colmar) à partir d'ADNc issus de feuilles de *V. vinifera* var. PN40024 infectées par *P. viticola*. La cinétique d'infection a été réalisée à l'INRA de Colmar sur trois jours après inoculation de sporanges de *P. viticola* par immersion (voir protocole 2.3.2.1) ; la sporulation est apparue au bout du troisième jour (Figure 51).

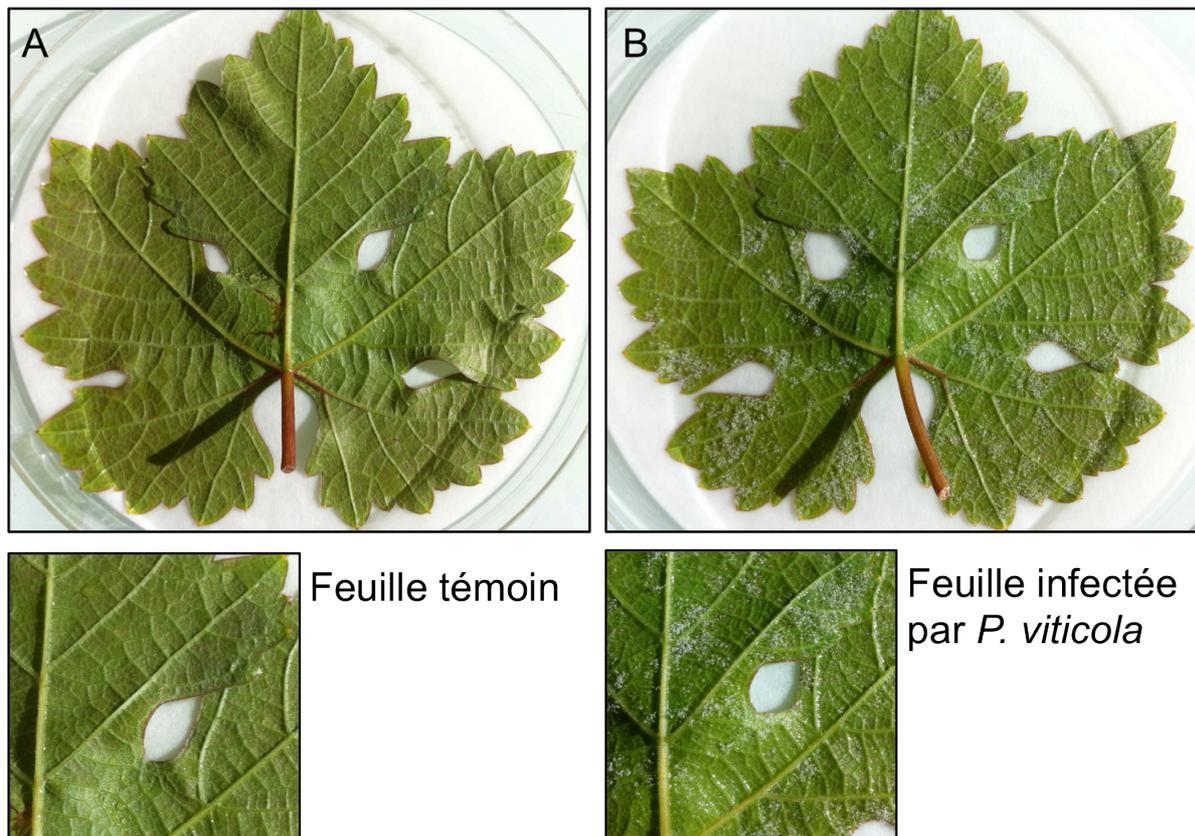


Figure 51 : Test d'inoculation de *P. viticola* sur *V. vinifera* var. PN40024.

(A) Feuille de vigne traitée avec de l'eau, 96 h post-traitement

(B) Feuille de vigne traitée avec des spores de mildiou, 96 h post-traitement

Pour la qPCR, les amorces utilisées ont été dessinées de la façon la plus spécifique possible pour l'ensemble de la famille des ROMT, en tenant compte des séquences des ADNc

mais aussi des régions 3'UTR sur 300 pb maximum. Pour certaines sous-familles, un couple d'amorces amplifie plusieurs *ROMT*, car les séquences des ADNc et des extrémités 3'-UTR sont trop similaires ; c'est le cas par exemple de *VvROMT1* et *VvROMT2*, ou encore *VvROMT5* et *VvROMT7*. Pour chaque couple d'amorces, au moins une amorce a été dessinée pour être spécifique d'un gène *ROMT*, ou les deux lorsque les séquences le permettent (c'est le cas pour les amorces amplifiant *VvROMT1* et 2). La liste des amorces est disponible partie 2.1.6.4 page 75. Les amorces ont préalablement été testées sur l'ADN génomique de *V. vinifera* var. PN40024, afin de vérifier si les fragments obtenus correspondent à la taille attendue. Pour tous les couples d'amorces, une bande correspondant à la taille attendue a été obtenue par PCR. Cependant, dans certains cas, l'amplification est faible (*VvROMT12*), ou le couple d'amorces amplifie un fragment supplémentaire (*VvROMT3*, 12, 4-9, 5-7).

De façon générale, 2 gènes *ROMT* ont été détectés par q-PCR comme étant induits suite à une infection par *P. viticola*, avec une induction maximale pour *VvROMT1* et 2 (Figure 52). L'induction de l'expression des autres gènes *ROMT* n'a pas été observée. *VvROMT1* et 2 sont induits 24 h et 96 h post-inoculation, avec une induction maximale à 24 h post-inoculation, suivie d'une induction progressive 48 h à 96 h post-inoculation. Ces deux gènes sont ceux qui présentent la plus forte identité de séquence avec le gène *ROMT CS11* déjà caractérisée (Schmidlin et al., 2008), qui montre également une induction maximale 24 h post-infection. Nos résultats de qPCR sont donc cohérents, et renforcent l'hypothèse que les gènes *VvROMT1* et *VvROMT2* sont des orthologues du gène *ROMT CS11*, et donc des resvératrol *O*-méthyltransférases. Pour les autres gènes *ROMT*, aucune amplification n'a pu être détectée à l'exception de *VvROMT8* qui est faiblement induit 48 h et 96 h post-inoculation.

### 2.2.1 Profil d'expression des *ROMT* suite à un stress aux rayons UV

Le profil d'expression des gènes *ROMT* suite à un stress aux rayons UV a été analysé avec les mêmes préparations d'ADNc que celles utilisées pour la famille des STS, soit 6 h et 24 h après exposition de jeunes plants de vigne entiers à la lumière UV. De façon générale, les différents gènes *ROMT* ne sont pas induits suite à un stress UV. Au niveau des feuilles et des tiges, on remarque une très légère induction des gènes *ROMT* dans leur ensemble, avec 30 cycles d'amplification PCR. Dans les racines, seuls les gènes *VvSTS12* et *VvSTS13* sont exprimés de façon constitutive, et ne semblent pas être induit ou réprimés suite au stress. Les

stress aux métaux lourds et les stress salin et hydrique n'ont pour le moment pas été testés dans le cadre de l'étude de la famille des *ROMT* de vigne. En revanche, j'ai pu entreprendre la caractérisation fonctionnelle des gènes *ROMT*, tout en mettant l'accent sur les ROMT 12 et 13, qui montrent une expression assez atypique au niveau des racines. Mes recherches se sont donc focalisées sur ces deux enzymes, avec notamment l'obtention de transformants stables d'*A. thaliana* et *N. benthamiana*.

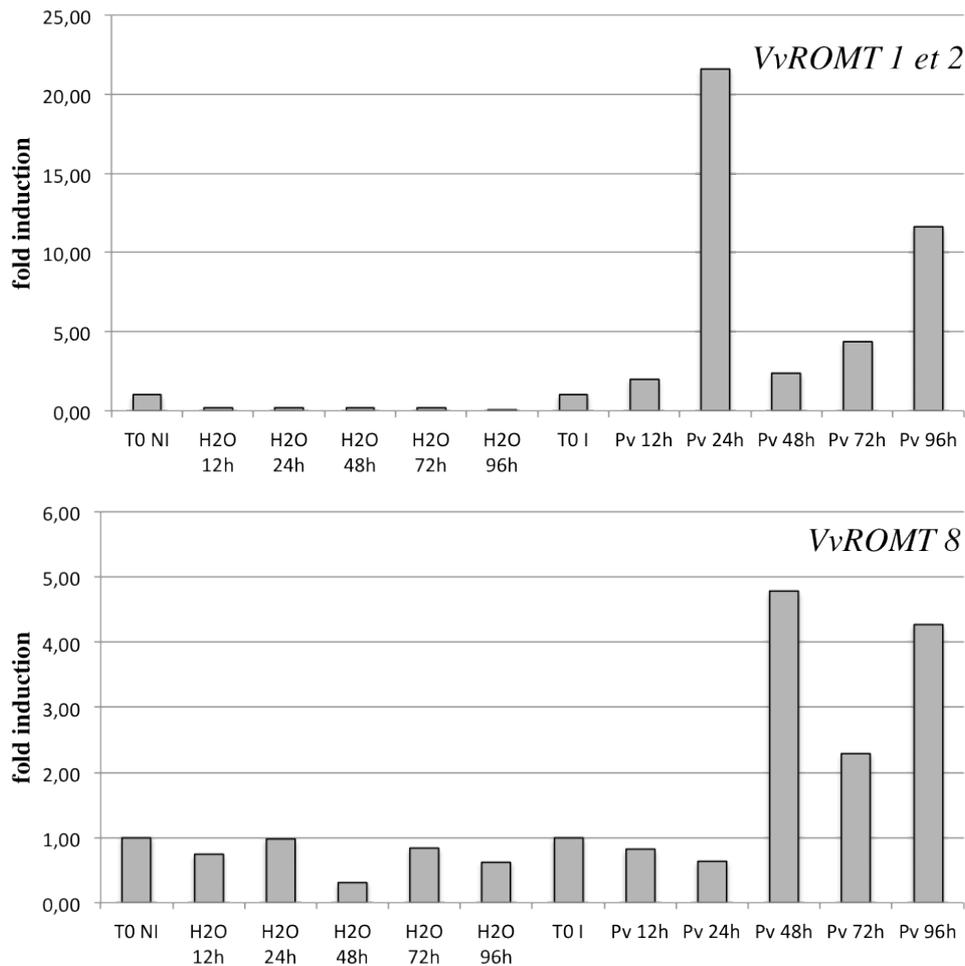


Figure 52 : Gènes *ROMT* induits en réponse à une inoculation des feuilles de *V. vinifera* var. PN40024 par *P. viticola*.

Pv, feuilles inoculées avec *Plasmopara viticola* ; H<sub>2</sub>O, feuilles traitées avec de l'eau ; T0 NI, feuille traitée avec de l'eau au temps 0, T0 I, feuille inoculée avec *P. viticola* au temps 0 ; 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, temps post-inoculation par *P. viticola* auxquels ont été prélevées les feuilles de vigne.

## 2.3 Caractérisation fonctionnelle des ROMT

L'analyse fonctionnelle des gènes *ROMT* a été réalisée par différentes approches. Tout d'abord, les différentes protéines ROMT recombinantes ont été testées *in vitro* pour leur aptitude à méthyler différents substrats potentiels, dont le resvératrol et d'autres stilbènes de structure proche du resvératrol. Parallèlement, la caractérisation fonctionnelle a été réalisée *in planta* par expression transitoire par agro-infiltration chez *N. benthamiana*, mais aussi par la génération de transformants stables d'*A. thaliana* et *N. benthamiana*.

### 2.3.1 Analyses fonctionnelles des ROMT

#### 2.3.1.1 Mise au point de l'expression des protéines

Les différents gènes *ROMT* ont été clonés dans des vecteurs d'expression Gateway™ pHNGWA ou pHGWA (Busso et al., 2005), qui permettent de générer une protéine de fusion constituée de la protéine NusA portant une étiquette de 6 histidines à son extrémité N-terminale, suivie de la protéine ROMT d'intérêt (6His-NusA-ROMT). Le choix du vecteur d'expression utilisé et des conditions de cultures se sont révélés déterminants pour obtenir de bonnes quantités de protéines solubles.

#### *Optimisation du milieu de culture*

L'optimisation du milieu de culture est un point déterminant pour la production des ROMT. Le milieu de culture basé sur un milieu LB est supplémenté en glycérol (0,5 %), qui apporte une source de carbone supplémentaire et qui facilite l'obtention de protéines solubles (Ajikumar et al., 2010). L'induction est réalisée à une  $DO_{600nm}$  de 0,4 à 0,6 par l'ajout de 0,1 mM d'IPTG : une concentration trop élevée d'IPTG empêche totalement la production de protéines, et une densité optique trop importante équivaut à se situer sur la fin ou en dehors de la phase exponentielle de croissance des bactéries, ce qui réduit aussi la quantité de protéines produites après induction. Le milieu de culture doit être mis sous agitation une nuit à 20 °C, afin d'éviter une croissance trop rapide des bactéries, qui aurait pour conséquence de favoriser la formation de corps d'inclusion. Pour une production de protéines optimale, la culture doit être réalisée dans un volume allant de 10 ml à 25 ml maximum, des cultures en plus grands volumes n'ayant pas permis d'obtenir des protéines solubles (Figure 53A).

*Expression et purification des protéines ROMT recombinantes*

La fusion des ROMT avec la protéine NusA est apparue nécessaire pour l'obtention d'une protéine soluble, condition indispensable pour pouvoir réaliser des tests enzymatiques ou des purifications de protéines. Des essais de production via un vecteur d'expression pHGWA permettant la production d'une ROMT native a été tentée. La protéine était produite efficacement mais n'était pas soluble (Figure 53B). A l'inverse, l'utilisation du vecteur pHNGWA permettant la production d'une protéine recombinante de type 6His-NusA-ROMT permet d'obtenir une quantité suffisante de protéine soluble. Cependant, ces protéines de fusion nécessitent une étape de clivage préalable de la protéine NusA pour pouvoir libérer les protéines ROMT natives (40 kDa). Ce clivage est réalisé à l'aide de la thrombine, une enzyme qui reconnaît spécifiquement les sites peptidiques de type Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser. Ce site est ajouté en amont des différentes ROMT, en utilisant des amorces qui ajoutent la séquence « GTTCCGCGTGGATCA ». Pour la ROMT CS11 considérée comme témoin des différentes expériences, la digestion par la thrombine permet d'obtenir la protéine native dans des quantités suffisantes pour les tests enzymatiques (Figure 53C). Pour les autres ROMT, la digestion par la thrombine ne permet pas de cliver les deux protéines (Figure 53D). Les purifications et les tests enzymatiques ont donc été réalisés sur des protéines de fusion. L'absence de clivage pourrait venir d'un problème d'accès de la thrombine au site de clivage, peut-être en raison d'une conformation gênante des protéines de fusion. Une solution pour pallier à ce problème serait d'allonger la région qui sépare les deux domaines de la protéine de fusion. Après essai de deux types de résines d'affinité métallique : Ni-TED (Macherey-Nagel, kit Protino, matrice de silice) et Ni-NTA (Qiagen, matrice d'Agarose), la résine Ni-NTA a été retenue (Figure 53).

Pour les tests enzymatiques, j'ai fait le choix d'utiliser ces différentes protéines de fusion, purifiées, ou directement à partir d'un surnageant de culture d'*E. coli* induit, en faisant l'hypothèse que la protéine NusA ne modifie pas fondamentalement la spécificité de substrat des ROMT (ce qui est le cas pour la ROMT CS11).

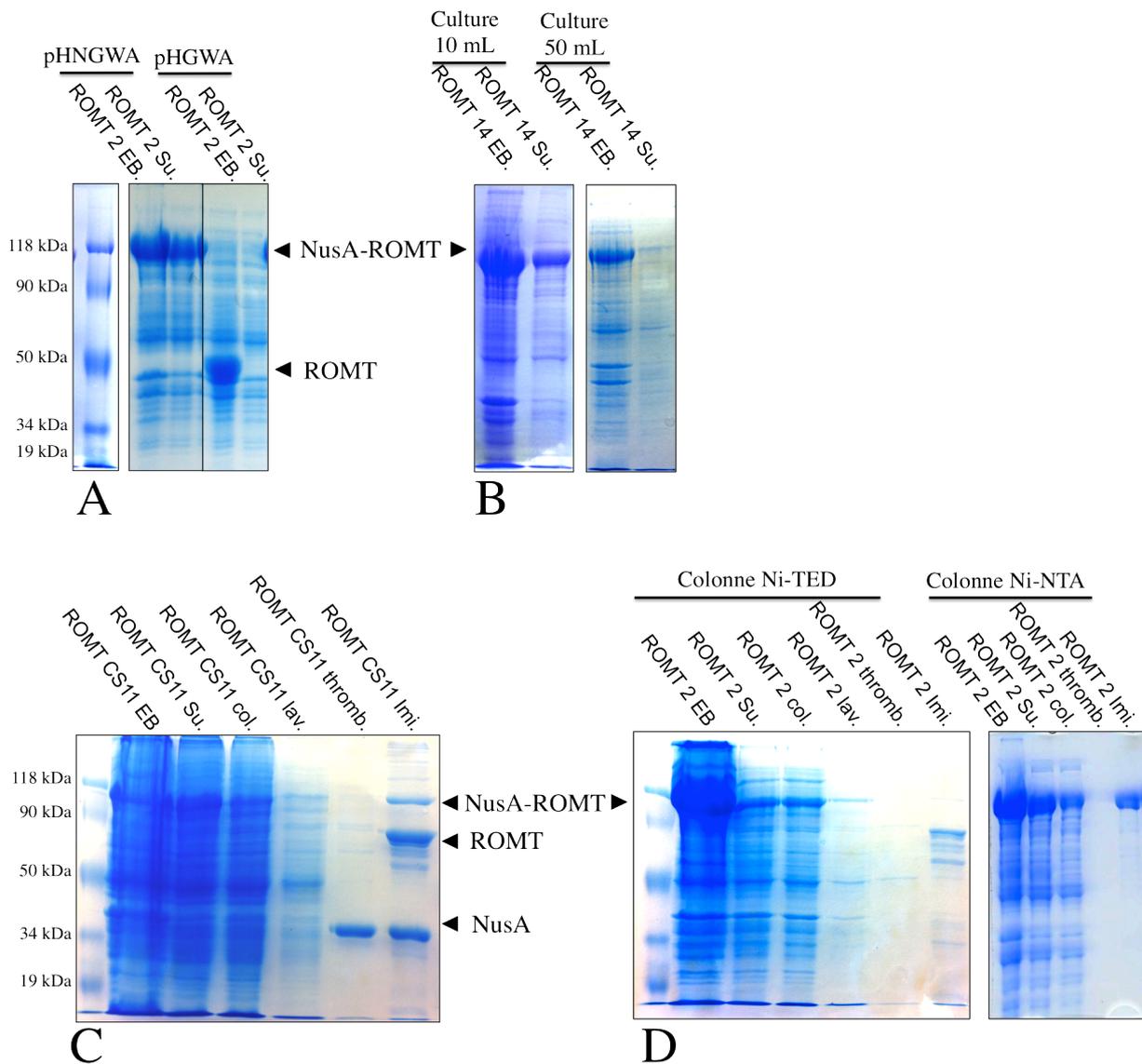


Figure 53 : Optimisation de la production des ROMT.

EB, extrait brut de bactéries ; Su., surnageant de culture bactérienne après sonication ; col., surnageant de culture bactérienne après passage sur colonne ; lav. Surnageant de culture bactérienne après lavage de la colonne ; thromb., éluat après clivage à la thrombine ; Imi., éluat après élution à l'imidazole ; pHNGWA et pHNWA, plasmide d'expression Gateway<sup>TM</sup> utilisé pour la production de protéines chez *E. coli*.

- A) Comparaison des vecteurs pHNGWA et pHGWA pour la production de protéines
- B) Comparaison de la production de protéines en petit volume (10 ml) et gros volume (50 ml)
- C) Purification de la ROMT CS11 sur colonne Ni-TED
- D) Comparaison de la purification de la ROMT 2 sur colonnes Ni-TED ou Ni-NTA

### 2.3.1.2 Analyses préliminaires de l'activité des protéines ROMT recombinantes

Les propriétés fluorescentes des stilbènes rendent leur analyse par chromatographie en couche mince (CCM), particulièrement aisée. Pour les analyses par CCM, j'ai principalement utilisé les surnageants de culture d'*E. coli* induits, mais certaines analyses ont été effectuées à partir des protéines ROMT purifiées (colonne Ni-NTA, élution à l'imidazole 200mM). Les tests de substrat sont optimaux à des concentrations en substrats de 50  $\mu$ M, la réaction enzymatique étant inhibée à des concentrations plus fortes. La Figure 54 récapitule tous les tests ayant été effectués avec les ROMT du PN40024. La ROMT CS11 a été utilisée comme témoin. Une activité méthyltransférase a pu être détectée avec les ROMT 2, 13 et CS11. Comme attendu, la ROMT CS11 est capable de synthétiser du ptérostilbène à partir du resvératrol et de son intermédiaire, le resvératrol monométhyle (RME). Les ROMT 1 et 2 sont les ROMT les plus proches, en terme de séquence protéique, de la ROMT CS11. De plus, elles présentent les mêmes profils d'expression en réponse à une infection par *P. viticola*. Les tests enzymatiques montrent que la ROMT 2 est également capable de synthétiser du ptérostilbène, ce qui va dans le sens des résultats précédents, et fait de la ROMT 2 du PN40024 un orthologue de la ROMT 11 du Cabernet sauvignon. La ROMT 1 vient à peine d'être clonée, suite au séquençage de nombreux clones (en général la ROMT 2 est majoritairement amplifiée et retrouvée dans les clones issus des premières étapes de clonage pJET). Sa forte identité de séquence avec les ROMT 2 et CS11 suggère qu'elle pourrait également être capable de synthétiser du ptérostilbène. Les ROMT 1 et 2 seraient donc les vraies resvératrol *O*-méthyltransférases chez le PN40024.

En dehors de la ROMT 2, seule la ROMT 13, exprimée constitutivement au niveau des racines, est capable de métyler le resvératrol et le RME. A partir du resvératrol, la ROMT 13 forme du RME et du ptérostilbène en quantité moindre, mais surtout l'intermédiaire 2 : du resvératrol méthylé en position *-para* (3,5-dihydroxy, 4'-méthoxystilbène). A partir du RME, la ROMT 13 forme du ptérostilbène, et il est possible qu'un dérivé triméthylé (ptérostilbène méthylé une troisième fois en position *-para*) soit synthétisé, mais la CCM ne permettrait pas de le distinguer. Ces résultats sont étonnants, car aucune méthylation en *-para* n'avait encore été mise en évidence chez la vigne. La ROMT 12 serait capable de métyler le RME pour former du ptérostilbène, mais ces résultats sont à confirmer par UHPLC-MS, en raison de la faible quantité de produit détecté.

Pour les autres ROMT, les tests enzymatiques analysés par CCM n'ont pas pu mettre en évidence une activité enzymatique.

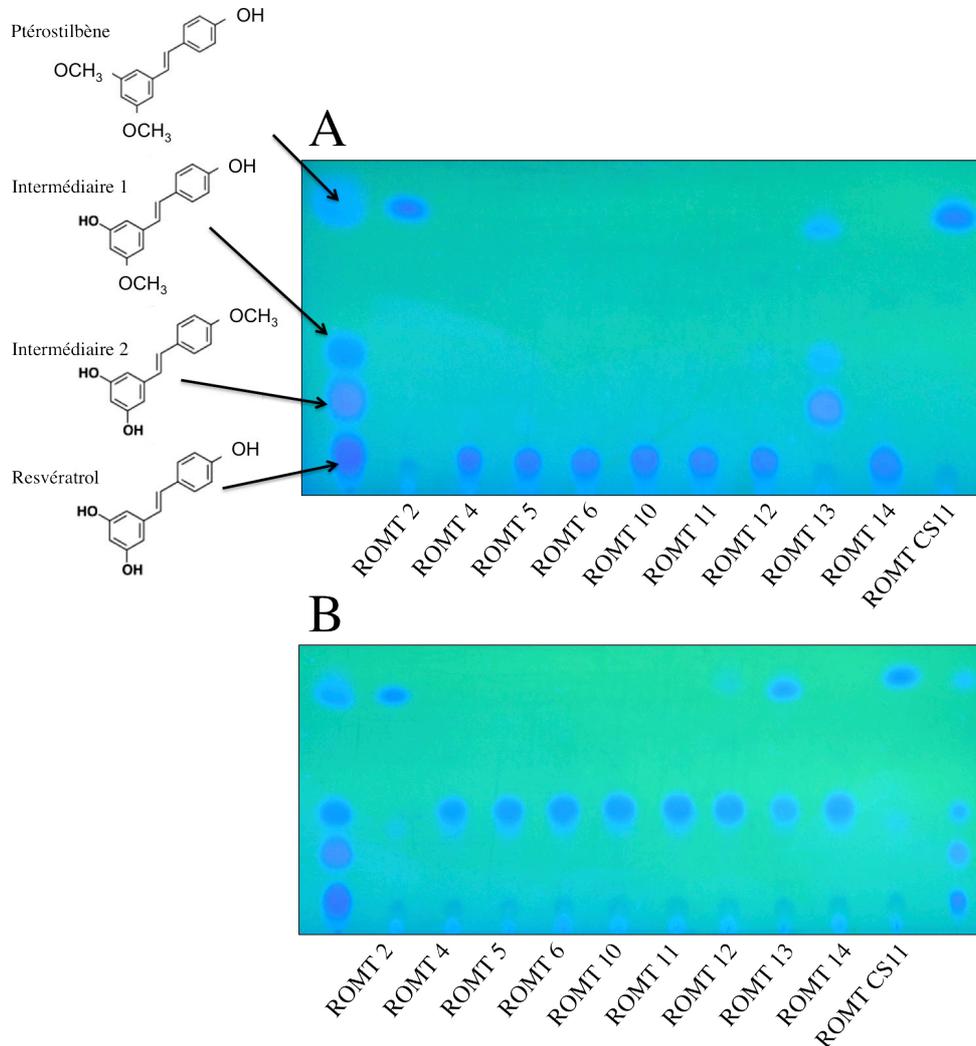


Figure 54 : Tests enzymatiques réalisés sur les ROMT du PN40024, visualisation par chromatographie en couche mince.

Les extraits bruts d'*E. coli* exprimant les différentes ROMT recombinantes sont incubés en présence de deux substrats potentiels :

(A) Tests enzymatiques réalisés avec de 50  $\mu$ M de resvératrol

(B) Test enzymatiques réalisés à partir de 50  $\mu$ M du dérivé monométhyle du resvératrol (intermédiaire 1 : resvératrol monométhyle éther ou RME).

### 2.3.1.3 Tests enzymatiques multi-substrats

#### *Principe des tests enzymatiques multi-substrats*

Les travaux réalisés dans mon laboratoire de recherche portent sur des enzymes du métabolisme secondaire végétal dont la plupart possèdent des fonctions encore inconnues. Il était donc nécessaire de créer un système rapide et efficace permettant de tester un grand nombre de substrats potentiels en un minimum de temps et adaptable aux différentes enzymes étudiées dans le laboratoire. Le test enzymatique multi-substrats est né de ce besoin. Le principe est le suivant : un mélange composé de substrats potentiels des OMT testées est incubé en présence d'extraits bruts d'*E. coli* exprimant les OMT d'intérêt ou de protéines purifiées. L'incubation se fait typiquement pendant une nuit, en présence de deux concentrations différentes du mélange de substrats ou des substrats individuels (10  $\mu$ M et 50  $\mu$ M de chaque composé). Le mélange regroupe un ensemble de substrats utilisés par différents types d'OMT, et contient aussi bien des flavonoïdes (quercétine, myricétine, chalcone, kaempférol, catéchine), une coumarine (hydroxycoumarine aussi appelée esculétine), un stilbène (le resvératrol), deux acides hydroxycinnamiques (l'acide caféique et l'acide chlorogénique), deux composés volatils aromatiques (le dihydroxyanisole, DHA), retrouvé chez *Rosa chinensis* (Wu et al., 2004) et l'hydroxypyrazine retrouvé dans les grappes de raisin ou les poivrons verts (Ryona et al., 2010). Le mélange contient également d'autres composés phénoliques retrouvés chez les plantes tels que l'acide gallique, l'éthyl gallate ou le 3/4-phénylphénol. Ce type de test est purement qualitatif et n'a pas pour but primaire d'identifier le substrat d'une OMT d'intérêt. Il permet en revanche d'obtenir des informations sur le type ou la famille de composés pouvant éventuellement être méthylés *in vitro*, ce qui permet d'orienter les recherches du ou des substrats physiologiques de l'OMT considérée.

Tableau 19 : Composition du mélange de substrats

Nom	Formule et $M_{\text{molaire}}$	Masse exacte	Produits éventuellement formés	Structure
3,5-dihydroxyanisole (DHA)	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> 140 g/mol	M-H: 139.039 M+H: 141.05	3,5-diméthoxy-polyphénol (DMP) Triméthoxy-benzène (TMB)	
3-Phénylphénol	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O 170,21 g/mol	M-H: 169.06 M+H: 171.08	Méthoxy-3-Phénylphénol	
4-Phénylphénol	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O 170.21 g/mol	M-H: 169.06 M+H: 171.08	Méthoxy-4-Phénylphénol	
Acide caféïque	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> 180 g/mol	M-H: 179.03 M+H: 181.05	Acide férulique	
Acide chlorogénique	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> 363.3 g/mol	M-H: 353.087 M+H: 355.102	Acide méthoxy-chlorogénique	
Acide gallique monohydrate	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	M-H: 169.0137 M+H: 171.029	Acide méthoxy-gallique	
catéchine	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> 290,07 g/mol	M-H: 289,079 M+H: 291,079	Méthoxy-catéchine	
Ethyl gallate	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> 198.17 g/mol	M-H: 197.045 M+H: 199.06	Méthoxy-éthyl gallate	
2-isobutyl-3-hydroxypyrazine	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	M-H: 151.087 M+H: 153.102	2-isobutyl-3-hydroxypyrazine (IBMP)	
6,7-Dihydroxycoumarine (esculétine)	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> 178.14 g/mol	M-H: 177.0187 M+H: 179.0344	Méthoxy-hydroxycoumarine (scopolétine), diméthoxy-coumarine	
Resvératrol	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> 228 g/mol	M-H: 227.0708 M+H: 229.086	Resvératrol monométhyle Ptérostilbène	
Olivetol	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> 180.24 g/mol	M-H: 179.107 M+H: 181.123	Méthoxy-olivetol Diméthoxy-olivetol	
chalcone	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> 272.2 g/mol,	M-H: 271.06 M+H: 273.076	Méthoxy-chalcone	
Kaempférol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> 286.24 g/mol	M-H: 285.0399 M+H: 287.055	Méthoxy-kaempférol	
Quercétine dihydrate	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> 338 g/mol	M-H: 301.0348 M+H: 303.0504	Méthoxy-quercétine	
Myricétine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub> 318.24 g/mol	M-H: 317.029 M+H: 319.045	Méthoxy-myricétine Diméthoxy-myricétine	

*Tests enzymatiques multi-substrats : résultats*

Après incubation et précipitation des protéines à l'acétone, les tests enzymatiques sont directement analysés par UHPLC-MS. Les données récoltées sont analysées à l'aide du logiciel ToxID fourni par Thermo Scientific, qui permet de traiter l'ensemble des données très rapidement en détectant pour chaque échantillon les composés recherchés sur la base des formules brutes attendues. Le logiciel scanne les courants d'ions totaux (TIC) pour les masses exactes des composés ionisés recherchés, et détermine une intensité, qui correspond à l'abondance de l'ion détecté dans le TIC. ToxID génère ensuite un tableau récapitulatif des intensités des différents ions détectés, avec les pics de masse correspondants. Pour mes analyses, j'ai autorisé un écart-type de 10 ppm pour les masses recherchées, ce qui permet d'avoir une précision suffisante vis à vis des métabolites détectés. Le seuil de détection pour les ions recherchés est fixé à 6 000, ce qui veut dire que les composés sont relevés par le logiciel uniquement si l'intensité de l'ion retrouvé dans le TIC dépasse le seuil imposé. Pour être quantitatif, il faudrait réaliser une gamme étalon pour chaque métabolite étudié, incluant les produits de réaction. Cependant, pour une approche exploratoire, l'analyse qualitative est suffisante dans un premier temps.

Les résultats de ces tests enzymatiques sont représentés dans la Figure 55. Les tests ont été effectués avec 10 et 50  $\mu\text{M}$  de mix de substrat, et la concentration optimale varie en fonction de chaque OMT. Comme témoin j'ai utilisé la ROMT CS11 ainsi que l'AOMT1 de *V. vinifera* capable de méthyler les flavonoïdes (Huguency et al., 2009).

Comme attendu, la ROMT CS11 permet d'obtenir du pterostilbène, avec une très faible accumulation de RME. Le DMP et le TMB sont faiblement synthétisés par la ROMT CS11 (Figure 55), ce qui confirme sa grande spécificité vis-à-vis du resvératrol. L'AOMT1 catalyse la méthylation des flavonoïdes, dont la quercétine et la myricétine, amenant à la formation de la méthoxy-quercétine ainsi que de la méthoxy-myricétine et la diméthoxy-myricétine (Figure 55). L'AOMT1 permet également de convertir l'hydroxycoumarine en méthoxy-hydroxycoumarine. Les ROMT 4, 5, 6, 10 et 11, en revanche, n'ont pas montré d'activité enzymatique évidente et la ROMT 14 permet de synthétiser de petites quantités de méthoxy-hydroxycoumarine et de DMP. La ROMT 12 synthétise du DMP et du TMP à partir du 3,5-dihydroxyanisole, l'intensité de signal étant plus élevée pour le TMP.

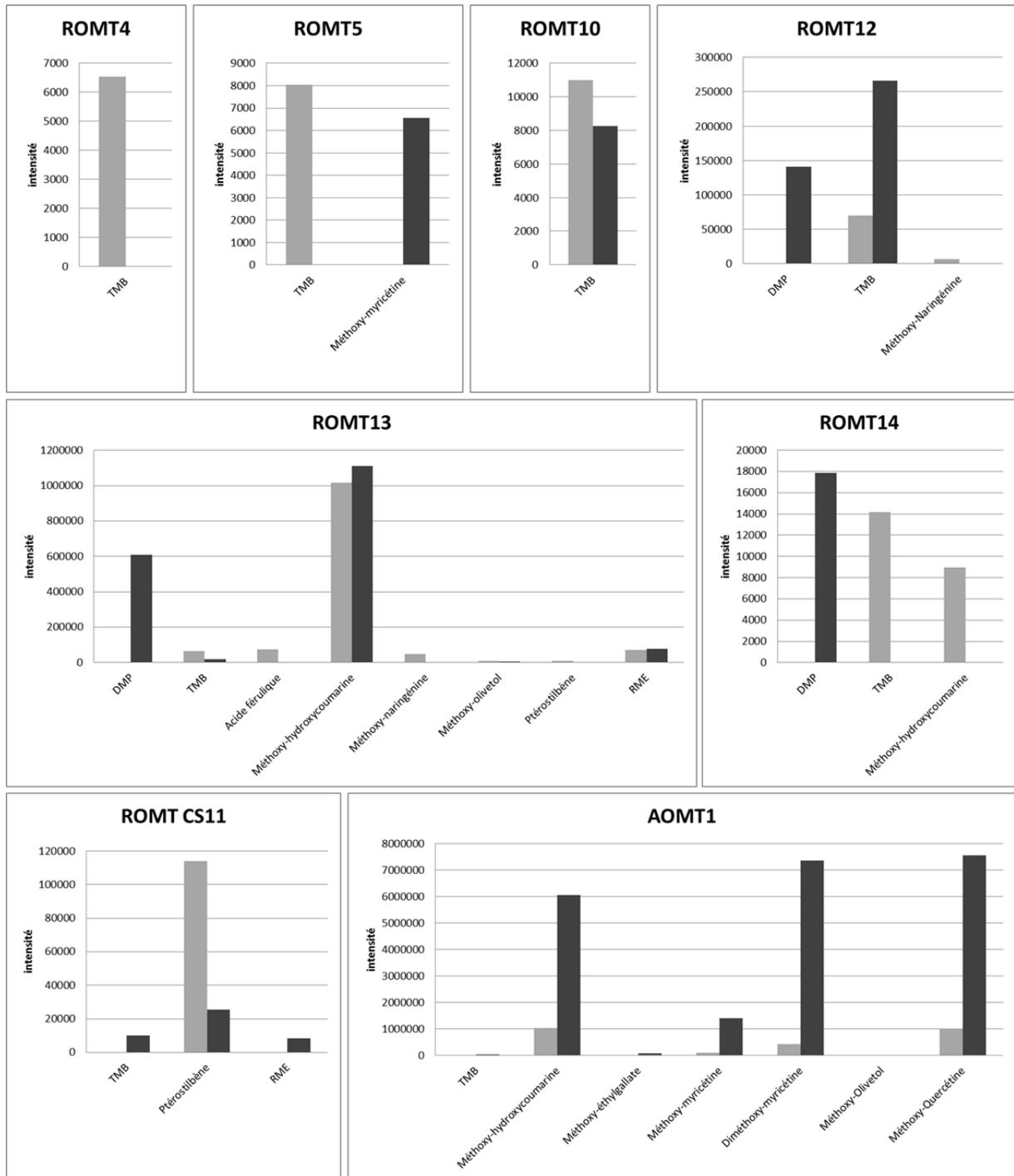


Figure 55 : Résultats des tests enzymatiques multi-substrats.

Les tests ont été effectués à partir d'un mélange à 10 µM pour chaque substrat (barres grises), ou 50 µM (barres noires). Seuls les composés détectés sont représentés.

La ROMT 13 a montré les résultats préliminaires les plus encourageants pour la caractérisation de la fonction enzymatique. En effet, la ROMT 13 est capable de méthyler l'hydroxycoumarine pour former le méthoxy-hydroxycoumarine (scopolétine). La ROMT 13 permet également la synthèse de DMP et de TMB, l'intensité détectée étant plus importante

pour le DMP. Comme attendu, et en accord avec les résultats obtenus par CCM, la ROMT 13 permet également de produire du resvératrol monométhyle ainsi que du ptérostilbène, mais en quantités moindres. Enfin la ROMT13 méthyle aussi la myricétine, la chalcone, et l'olivetol, mais les produits formés sont proches du seuil de détection fixé. Afin de valider les résultats observés, j'ai réalisé une nouvelle incubation à l'aide d'enzymes purifiées, dont les résultats sont présentés Figure 56, qui a permis de valider les observations obtenues par l'incubation du mix de substrats avec des surnageants de culture d'*E. coli* induits.

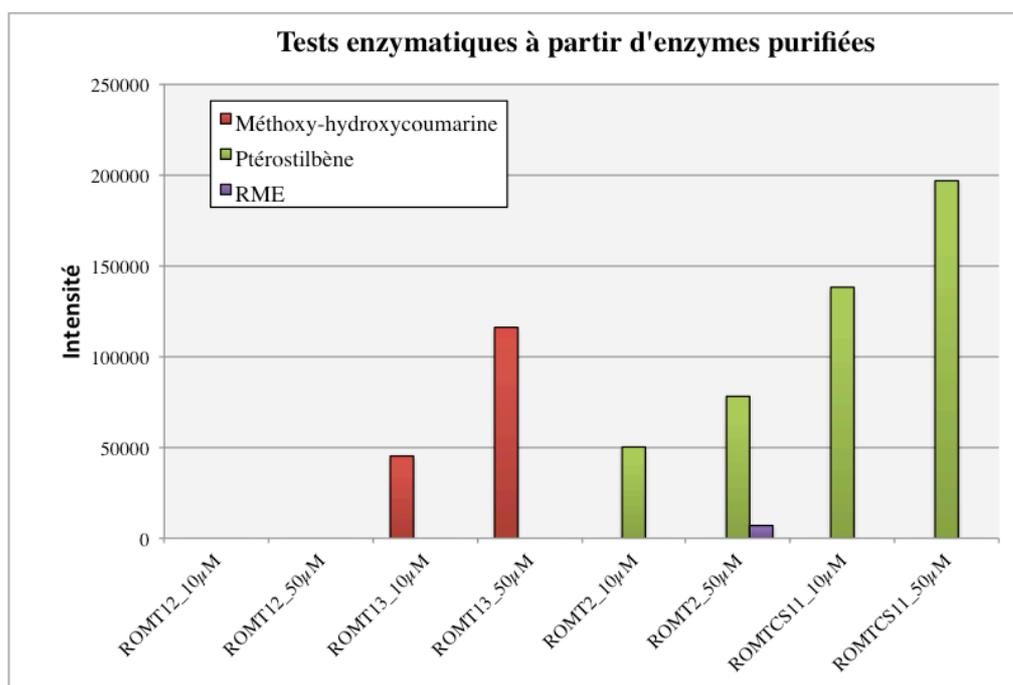


Figure 56 : Test enzymatique à partir d'enzymes purifiées (ROMT 2, 13 et CS11).

Parmi tous les substrats testés, l'hydroxycoumarine est le substrat préférentiel de la ROMT13. Les coumarines sont distribuées chez de nombreuses familles végétales, cependant, les coumarines telles que l'esculétine et la scopolétine ne font pas partie des composés couramment décrits chez la vigne, ce qui a été confirmé par nos propres analyses d'extraits de racines de vigne, qui n'ont pas permis de détecter ces composés. Cette observation suggère que l'hydroxycoumarine n'est pas le substrat naturel utilisé par la ROMT 13, mais que sa structure pourrait s'en rapprocher, ce qui permettra d'orienter les futures recherches de substrats.

### 2.3.2 *Analyses fonctionnelles in planta*

#### 2.3.2.1 *Analyses fonctionnelles par agro-infiltration*

L'agro-infiltration chez *N. benthamiana* est un outil performant pour l'analyse de l'activité des OMT, outil qui a été utilisé précédemment pour la caractérisation de la ROMT CS11 (Schmidlin et al., 2008). Dans le cas de l'étude de la famille des ROMT, j'ai réalisé des double-transformations transitoires en infiltrant à la fois une agrobactérie portant le gène *STS* (*VvSTS15* du var. PN40024) et une agrobactérie portant le gène *ROMT*. L'infiltration de *VvSTS15* seule permet de reconstituer la voie des stilbènes chez *N. benthamiana* et de produire du resvératrol. Ainsi, ce système permet d'évaluer l'activité éventuelle des différentes protéines ROMT sur les stilbènes. Après infiltration des agrobactéries dans les feuilles de *N. benthamiana*, les plants sont laissés au repos 4 jours puis les feuilles sont extraites à chaud dans du méthanol. Les différents gènes sont toujours infiltrés avec le suppresseur de silencing P19, qui permet d'obtenir une meilleure expression des transgènes. Les échantillons obtenus sont analysés par UHPLC-MS, les stilbènes sont détectés via le détecteur UV à la longueur d'onde de 307 nm, et l'ensembles des masses comprises entre 100 et 700 m/z sont détectées par le spectromètre de masse Thermo Exactive. Les stilbènes détectés en UV sont toujours identifiés sur la base des données obtenues par le spectromètre de masse.

La co-expression transitoire de la STS15 et de la ROMT CS11 (Témoin positif) conduit, comme prévu, à l'accumulation de ptérostilbène. C'est également le cas pour la ROMT 2 (PN40024). La Figure 57 montre les chromatogrammes issus d'une détection UV (DAD) à la longueur d'onde d'absorption des stilbènes : 307 nm, pour les ROMT CS11, 2 et 5 en co-infiltration avec STS 15.

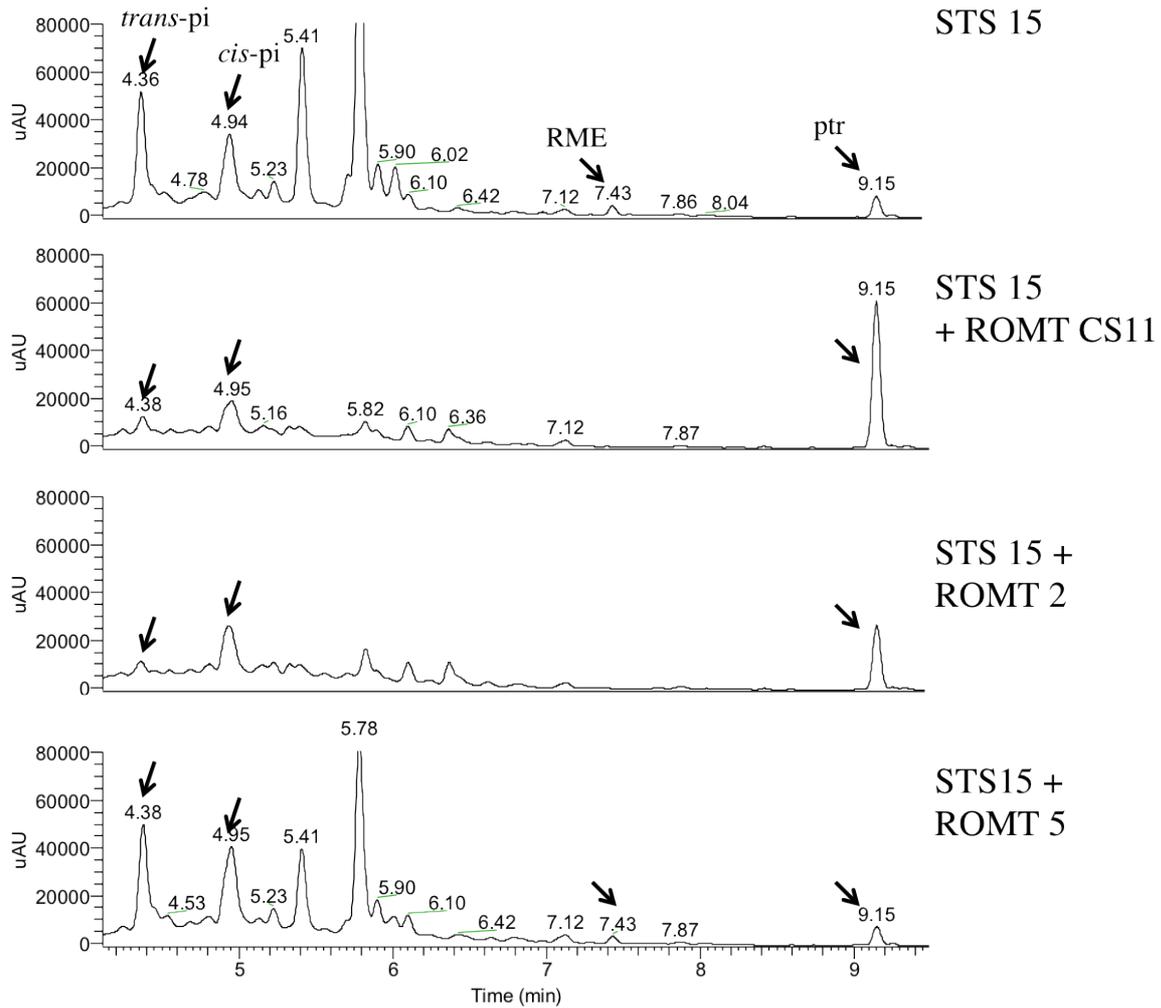


Figure 57 : Comparaison des ROMT CS11, 2 et 5 pour la biosynthèse de resvératrol dans des feuilles de *N. benthamiana* agro-infiltrées.

*trans-pi*, *trans*-picéide ; *cis-pi*, *cis*-picéide, resvératrol monométhyle éther ; ptr., ptérostilbène.

Les chromatogrammes révèlent que seules les ROMT 2 et CS11 permettent de produire du ptérostilbène en co-infiltration avec la STS 15. La ROMT 5 ne produit que du resvératrol et ses dérivés glycosylés (picéides), ce qui reflète l'activité de la STS 15. *N. benthamiana* possède également des méthyltransférases qui sont capables de méthyler aspécifiquement le resvératrol. C'est probablement pour cette raison qu'une quantité très faible de ptérostilbène et de resvératrol monométhyle sont détectés dans les échantillons témoins (STS 15 seule) ou en présence d'une ROMT ne produisant pas de ptérostilbène (ROMT 5 par exemple). Pour les ROMT 4, 6, 10, 11, 12, 13 et 14, les chromatogrammes obtenus sont comparables à ceux obtenus avec la ROMT 5. A l'exception de la ROMT13, ces résultats confirment les résultats obtenus par l'analyse en CCM, à savoir que seules les ROMT 2 et CS11 permettent la synthèse de ptérostilbène à partir du resvératrol. Les ROMT

4, 5, 6, 10, 11, 12 et 14 ne sont donc pas des vraies ROMT, mais des ROMT-like dont les substrats ne sont pas encore connus à l'heure actuelle.

Concernant la ROMT13, les résultats ne sont pas en accord avec ceux observés *in vitro* en CCM. Plus particulièrement, l'intermédiaire méthylé en position *-para* du deuxième cycle aromatique (3,5-dihydroxy, 4'-méthoxystilbène) n'a pas été retrouvé dans les extraits (Figure 58). Les profils obtenus ne sont pas significativement différents de ceux des ROMT4, 5 et 6, ce qui indique que la ROMT13 ne présente pas d'activité de méthylation des stilbènes *in planta*, après expression transitoire chez *N. benthamiana*.

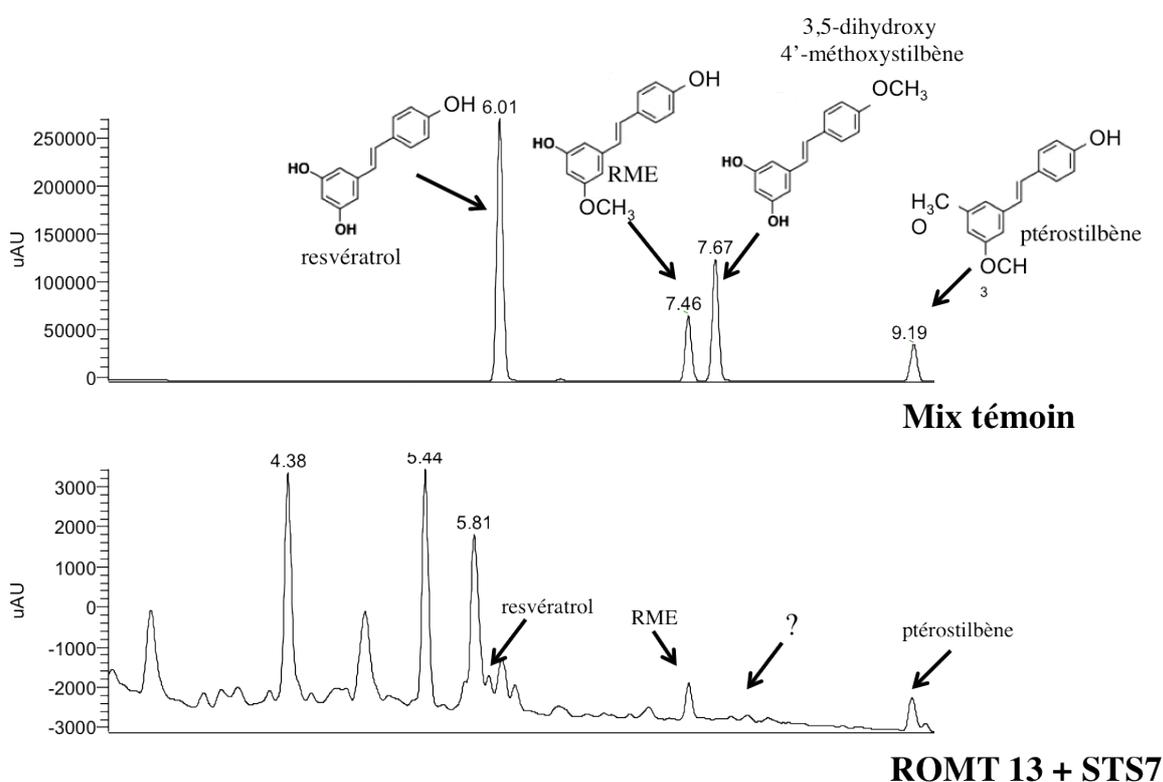


Figure 58 : Profil chromatographique obtenu suite à la co-infiltration de STS 15 et de ROMT13 dans des feuilles de *N. benthamiana*.

**2.3.2.2 Analyses fonctionnelles par transformation stable  
d'*Arabidopsis thaliana***

Afin d'explorer le rôle des ROMT-like de vigne, j'ai entrepris la création de plantes transgéniques chez *A. thaliana* et *N. benthamiana*. Cette stratégie repose sur l'hypothèse que certaines protéines ROMT pourraient méthyler des composés naturellement présents chez *A. thaliana* et *N. benthamiana*, ce qui permettrait d'obtenir des informations sur leurs substrats potentiels chez la vigne. Chez *N. benthamiana*, j'ai réalisé des plantes transgéniques pour les ROMT 12 et 13, mais également des racines transgéniques par l'utilisation d'*A. rhizogenes*. Toutes les plantes transgéniques ont été transformées à l'aide du vecteur pMDC32 portant les différentes ROMT sous contrôle du promoteur 35S du CaMV, afin de permettre une expression forte et constitutive des différentes ROMT.

*Obtention de lignées transgéniques exprimant les différents gènes de la famille des ROMT de vigne.*

La transformation d'*A. thaliana* est relativement simple à réaliser. J'ai donc pu entreprendre la création de lignées stables pour toutes les ROMT clonées. Ce travail a été réalisé en troisième année de thèse, aussi l'obtention de lignées pures, et l'analyse des plantes transgéniques est actuellement en cours de réalisation. La sélection *in vitro* des plantules transgéniques pour les ROMT 2, 5, 6, 10, 11 et 14 a été facile à obtenir, mais la sélection des plantules transformées avec les ROMT 12 et 13 n'a pas pu aboutir. De façon générale, les plantules transformées avec ces ROMT montraient le même phénotype que les plantules non transformées, à savoir des plantules de petite taille ne développant pas de racines dans le milieu de sélection, et ce malgré l'utilisation de différentes concentrations d'hygromycine (résistance portée par le vecteur pMDC32).

Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Premièrement, il est possible que la transformation d'*A. thaliana* ait échoué dans le cas de ces constructions, ou que le rendement de transformation soit très faible. Alternativement, il est possible que les ROMT 12 et 13 synthétisent un produit toxique, ou interfèrent avec une voie de biosynthèse importante pour le développement des plantules.

L'obtention des lignées pures d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisée en parallèle de l'obtention de lignées transgéniques de *N. benthamiana*, et de racines transgéniques. Il semblait plus pertinent de réaliser les plantes transgéniques à partir de *N. benthamiana*, dans

la mesure ou le métabolisme secondaire végétal y est plus riche. On y retrouve par exemple une grande diversité d'alcaloïdes.

### 2.3.2.3 Transformation stable de *N. benthamiana*

La transformation stable de *N. benthamiana* a été réalisée selon le protocole de Sparkes et al. (Sparkes et al., 2006), qui utilise à l'origine *N. tabacum*. Aussi, j'ai dû adapter ce protocole à *N. benthamiana*. La Figure 59 représente les différentes étapes de la formation stable de *N. benthamiana*, avec les temps de culture entre chaque étape.

Après l'acclimatation en serre, les plantes ont été analysées par PCR afin de confirmer l'insertion des gènes *VvROMT12* et *VvROMT13* dans le génome. J'ai vérifié la présence du gène conférant la résistance à l'hygromycine (gène *hph*), et le gène de l'actine comme contrôle. Sur 22 plantes analysées, 19 possèdent le gène *hph* et sont donc considérées comme transgéniques. Des extraits de feuilles de ces plantes ont été analysés par UHPLC-MS. La sélection de la génération F1 *in vitro* est actuellement en cours. Cette sélection est indispensable dans la mesure où les plantes parentales sont hémizygotes. Le gène inséré ségrégera ainsi selon la deuxième loi de Mendel, et la génération F1 contiendra 1/4 d'homozygotes pour le gène inséré, 1/2 d'hétérozygotes pour le gène inséré et 1/4 de plantes sauvages, si un seul événement d'insertion d'ADN-T a eu lieu lors de la transformation de la plante parentale. Il est donc indispensable de sélectionner les plantes de la génération F1 pour la résistance à l'hygromycine.

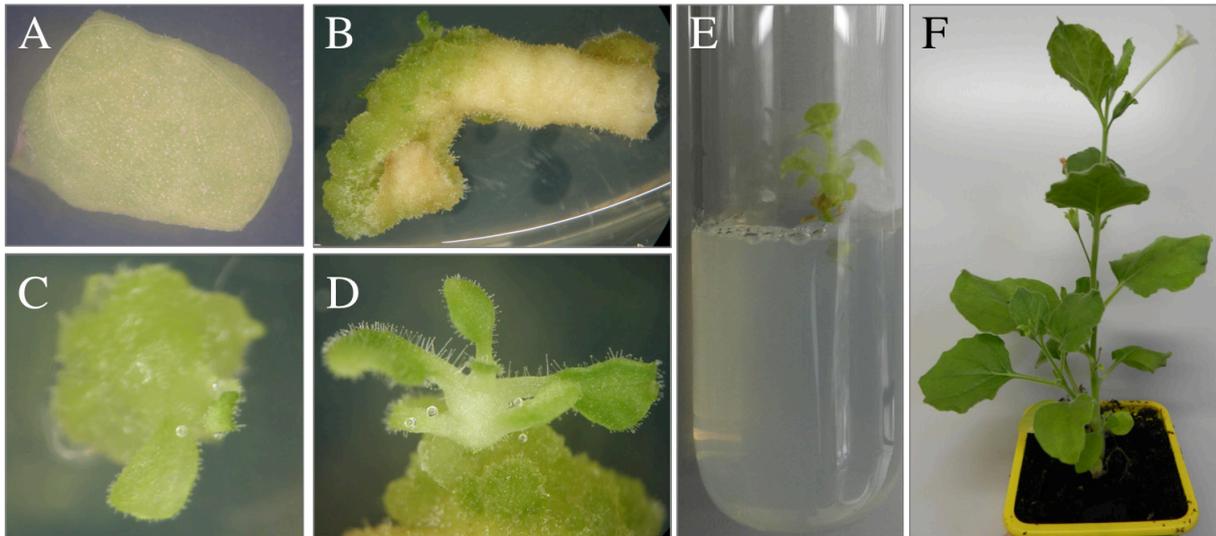


Figure 59 : Etapes de la transformation de *N. benthamiana*.

(A) Vue inférieure des feuilles infiltrées 1 semaine après mise en culture *in vitro* (CIV) (B) Vue supérieure d'une feuille infiltrée environ 4 semaines après mise en CIV (C) Vue supérieure d'un cal âgé de 6 semaines après mise en CIV, avec l'apparition d'une plantule (D) Vue supérieure d'une plantule 8 semaines après mise en CIV (E) Plantule transférée dans un tube de culture *in vitro* contenant du milieu de culture favorisant l'enracinement (environ 10 semaines après mise en CIV) (F) Plante acclimatée puis transférée en terre pour la formation des graines, environ 4 mois après mise en CIV.

Dans un deuxième temps, il sera particulièrement intéressant de réaliser des extraits de racines sur ces plantes et de comparer ces extraits à une plante sauvage afin de voir si les ROMT 12 et 13 sont capables de métaboliser un substrat spécifique aux racines. Ces analyses de racines n'ont pas été effectuées sur les plantes obtenues par CIV, puisqu'un prélèvement de racines à ce stade aurait pu compromettre l'obtention de graines. Aussi, j'ai pris le parti d'utiliser plutôt la première génération F1 issue de ces lignées parentales ; qui est en cours de sélection.

En parallèle des transformations stables obtenues grâce à *A. tumefaciens*, j'ai obtenu des racines transgéniques (hairy roots) de *N. benthamiana*, en m'inspirant de plusieurs protocoles de transformations de racines de vigne et d'arachide (Cutanda-Perez et al., 2009; Medina-Bolivar et al., 2007; Cutanda-Perez et al., 2009; Torregrosa and Bouquet, 1997). Deux techniques ont été utilisées en parallèle, à savoir via régénération de racines à partir de feuilles de *N. benthamiana* agro-infiltrées par *A. rhizogenes* en CIV (Figure 60D), ou à partir

de segments de tiges de *N. benthamiana* dont l'extrémité est inoculée avec *A. rhizogenes*. Les vecteurs utilisés pour cette expérience sont les mêmes que ceux utilisés pour les expériences de transformation stable (pMDC32).

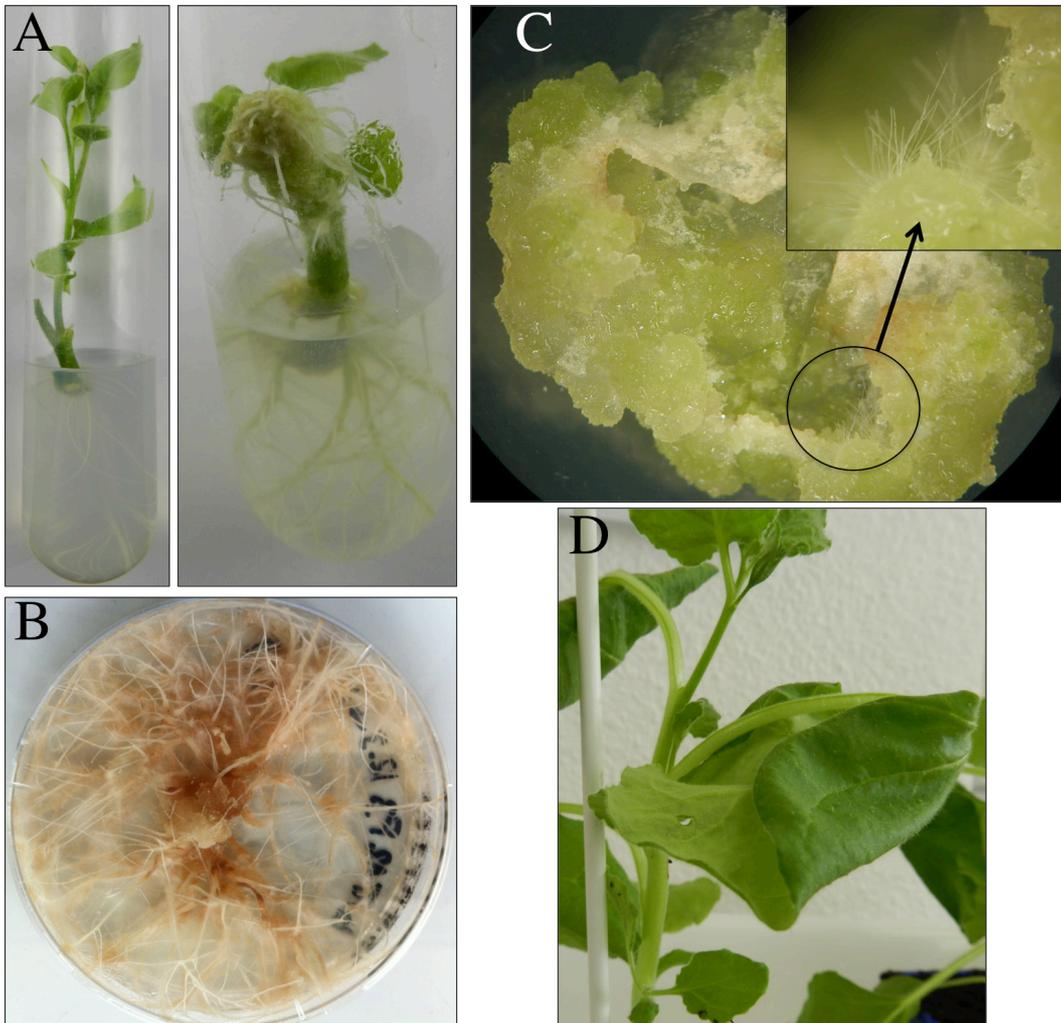


Figure 60 : Transformation de racines de *N. benthamiana* par *A. rhizogenes*.

(A) Comparaison d'une tige dont l'extrémité a été traitée avec de l'eau (image gauche), ou traitée avec une solution d'*A. rhizogenes* contenant la construction pMDC32-ROMT12, 2 à 3 semaines après traitement (image de droite) (B) Racines transgéniques 6 à 8 semaines après transfert des racines naissantes sur boîte de Petri (C) Vue supérieure d'un cal obtenu après mise en CIV d'une section de feuille de *N. benthamiana*, on peut remarquer les racines qui apparaissent au niveau de ces cals au bout de 6 semaines de culture (D) Photo d'une feuille repliée de *N. benthamiana* infiltrée avec *A. rhizogenes*.

La régénération de racines a été bien plus rapide via inoculation des agrobactéries au niveau des tiges de *N. benthamiana* qu'à partir de feuilles infiltrées. Avec les feuilles infiltrées, les tissus végétaux avaient tendance à former de gros amas de cals, malgré l'absence d'hormone dans les milieux de culture, et les racines finissaient par apparaître au bout de 6 semaines de culture (Figure 60C). Avec l'inoculation sur tige, les racines apparaissent au bout de 2 semaines et peuvent être transférées sur boîtes de Petri sélectives au bout de 4 semaines (Figure 60A). De façon générale, les racines colonisent les boîtes de Petri en au moins 6 semaines (Figure 60B). L'observation de racines fluorescentes, transformées avec le gène codant pour la GFP, nous prouve que cette technique fonctionne bien (Figure 61). La culture de racines en milieu liquide a été tentée, mais cela nécessite encore quelques mises au point pour obtenir une croissance optimale. Ces racines font actuellement l'objet d'une analyse par UHPLC-MS exploratoire, en vue de caractériser les substrats des ROMT 12 et 13.

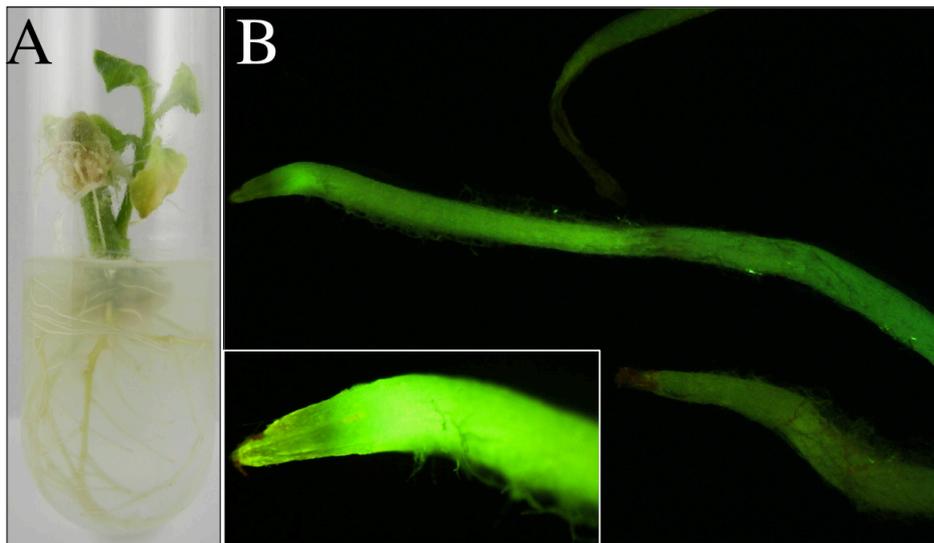


Figure 61 : Expression de la GFP dans les racines de *N. benthamiana*

(A) Tige dont l'extrémité a été traitée avec une solution d'*A. rhizogenes* contenant la construction GFP-pB2 (plasmide binaire utilisé pour la transformation végétale), on y voit la formation de racines (B) Fluorescence de la GFP observée au niveau des racines, à la loupe binoculaire.

### 2.3.3 A la recherche de substrats potentiels chez *Vitis vinifera*

Compte tenu de l'expression spécifique et constitutive des ROMT12 et 13 dans les racines, nous avons réalisé des analyses métabolomiques non ciblées de racines de vigne, dans l'espoir de détecter des composés méthylés potentiellement issus de l'activité de ces ROMT. J'ai ainsi réalisé plusieurs extraits de racines de vigne en utilisant des solvants plus ou moins polaires : le méthanol pour l'extraction des composés polaires ou le dichlorométhane pour l'extraction des composés peu polaire ou apolaires. La Figure 62 représente un extrait de racine injecté directement par infusion dans le spectromètre de masse. Cette technique, appliquée à un mélange complexe, ne permet d'envisager que l'identification de composés majeurs. Certains composés ont néanmoins pu être identifiés, comme par exemple la catéchine ou le méthyl-gallate. Cependant, les tests enzymatiques n'ont pas permis de mettre en évidence la méthylation de ces composés par l'une des ROMT-like. La recherche d'autres candidats reste donc à poursuivre, en particulier grâce à des analyses plus fines après séparation des extraits par UHPLC. L'analyse des transformants d'*A. thaliana* et *N. benthamiana*, notamment au niveau des racines, nous permettra peut être d'envisager de nouveaux candidats.

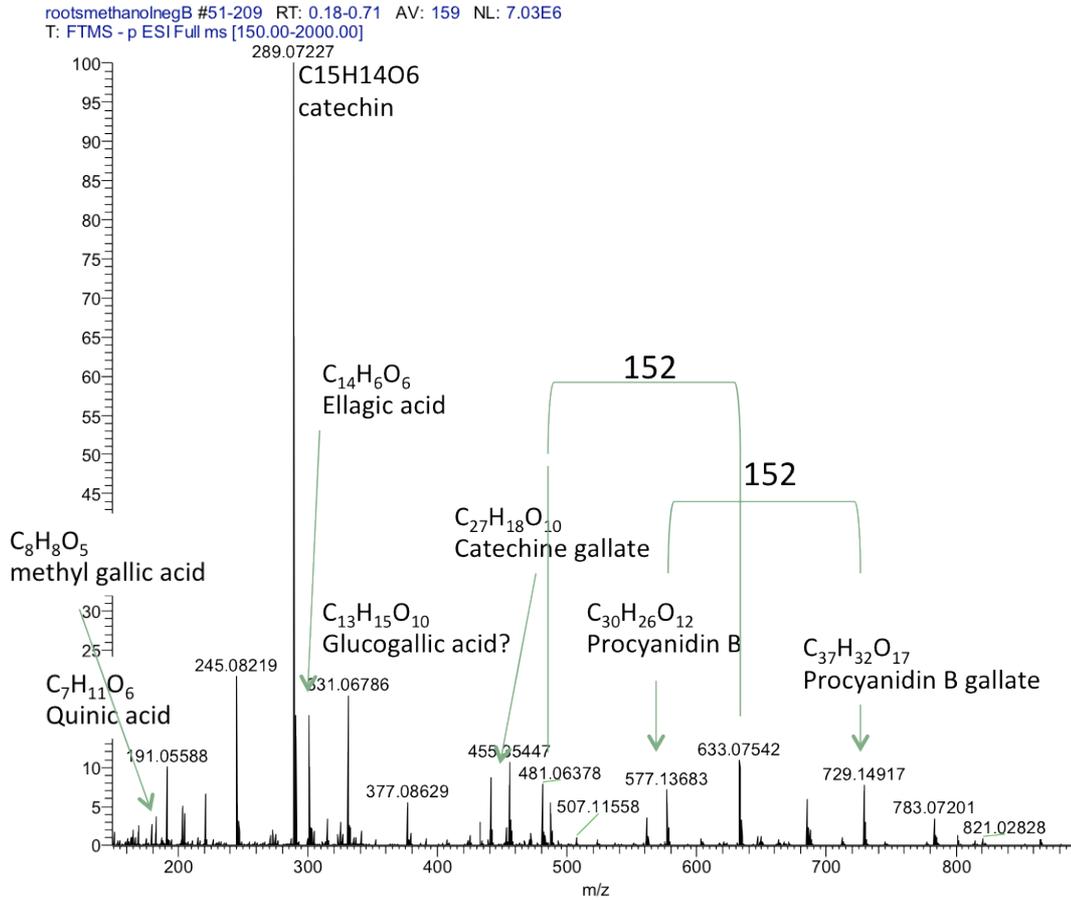


Figure 62 : FTMS (full time MS), ou total des ions détectés d'un extrait de racine de vigne, en mode négatif.

### 2.3.1 Analyse structurale des ROMT

La structure tridimensionnelle de la ROMT CS11 a été modélisée sur la base des données structurales de l'IOMT de luzerne (*Medicago sativa*) (Zubieta et al., 2001) par Stéphane Réty, du laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques de l'Université Paris Descartes (Figure 63). L'analyse des structures des enzymes du métabolisme secondaire, telles que les *O*-méthyltransférases, peuvent aider à expliquer les changements de spécificité de substrats lorsque ceux-ci sont connus. Si les substrats des ROMT-like sont déterminés, les données structurales présentées ci-dessous pourront être exploitées en vue de comprendre les changements structuraux potentiels ayant aboutis à la création de nouvelles fonctions.

A l'exception de la ROMT11 et des ROMT12 et 13, les séquences protéiques des membres de la famille des ROMT sont relativement similaires. Les protéines comptent entre

358 et 360 acides aminés pour un poids de 38 à 42 kDa environ. Les ROMT possèdent une structure tridimensionnelle en dimère, constituée de deux monomères identiques.

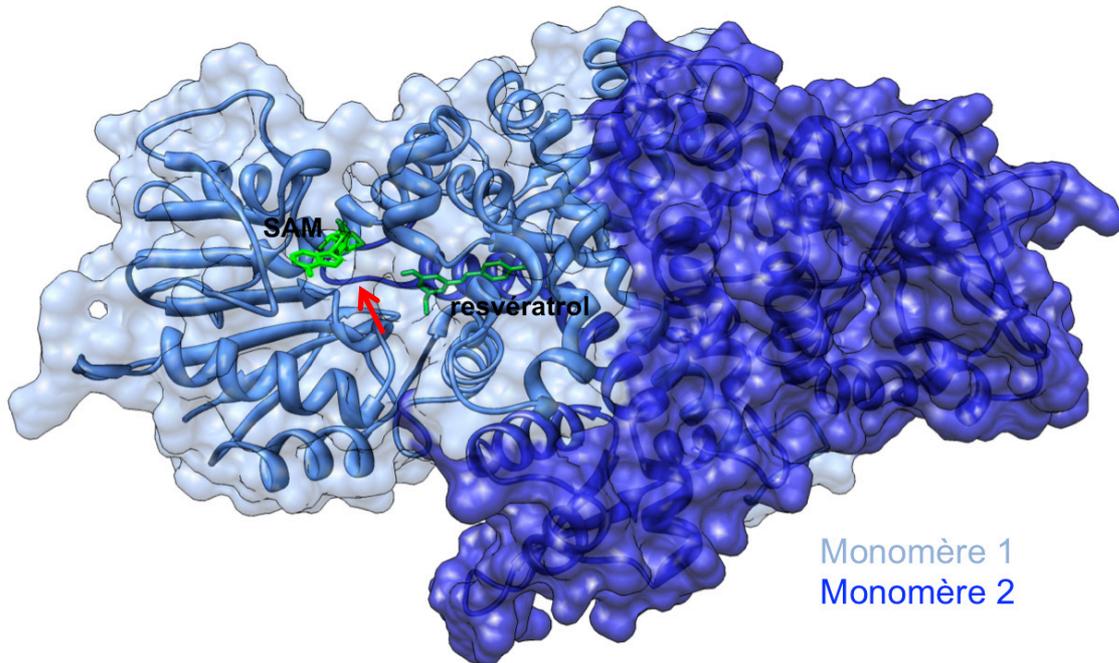


Figure 63 : Représentation tridimensionnelle de la ROMT du Cabernet sauvignon (ROMT CS11).

Les deux monomères de la ROMT sont indiqués en bleu ciel et bleu foncé ; les deux substrats de l'enzyme : la S-adénosyl-L-méthionine (SAM, sur la gauche) et le resvératrol (sur la droite) sont représentés en vert. La vue tridimensionnelle représente la structure secondaire de la protéine et la vue de surface ; elle met également en évidence le tunnel par lequel les substrats rentrent au niveau du site actif (indiqué par une flèche rouge).

Les OMT végétales possèdent cinq régions consensus riches en glycine, dans une zone de 36 acides aminés dans le troisième tiers de la séquence polypeptidique. Ces cinq régions ont été mises en évidence grâce aux données de séquence de 27 OMT végétales incluant des monocotylédones, des dicotylédones et des conifères (Ibrahim, 1997). Ces cinq régions sont très conservées chez les OMT, et peuvent être retrouvées chez les ROMT de vigne (Figure 64 et Figure 65). Les régions I et IV sont impliquées dans la fixation de la S-adénosyl-L-méthionine et les métaux respectivement. Les OMT de bactéries et champignons possèdent également la région I et certains résidus des autres régions.

## CHAPITRE II - Analyse fonctionnelle de la famille des ROMT de la vigne

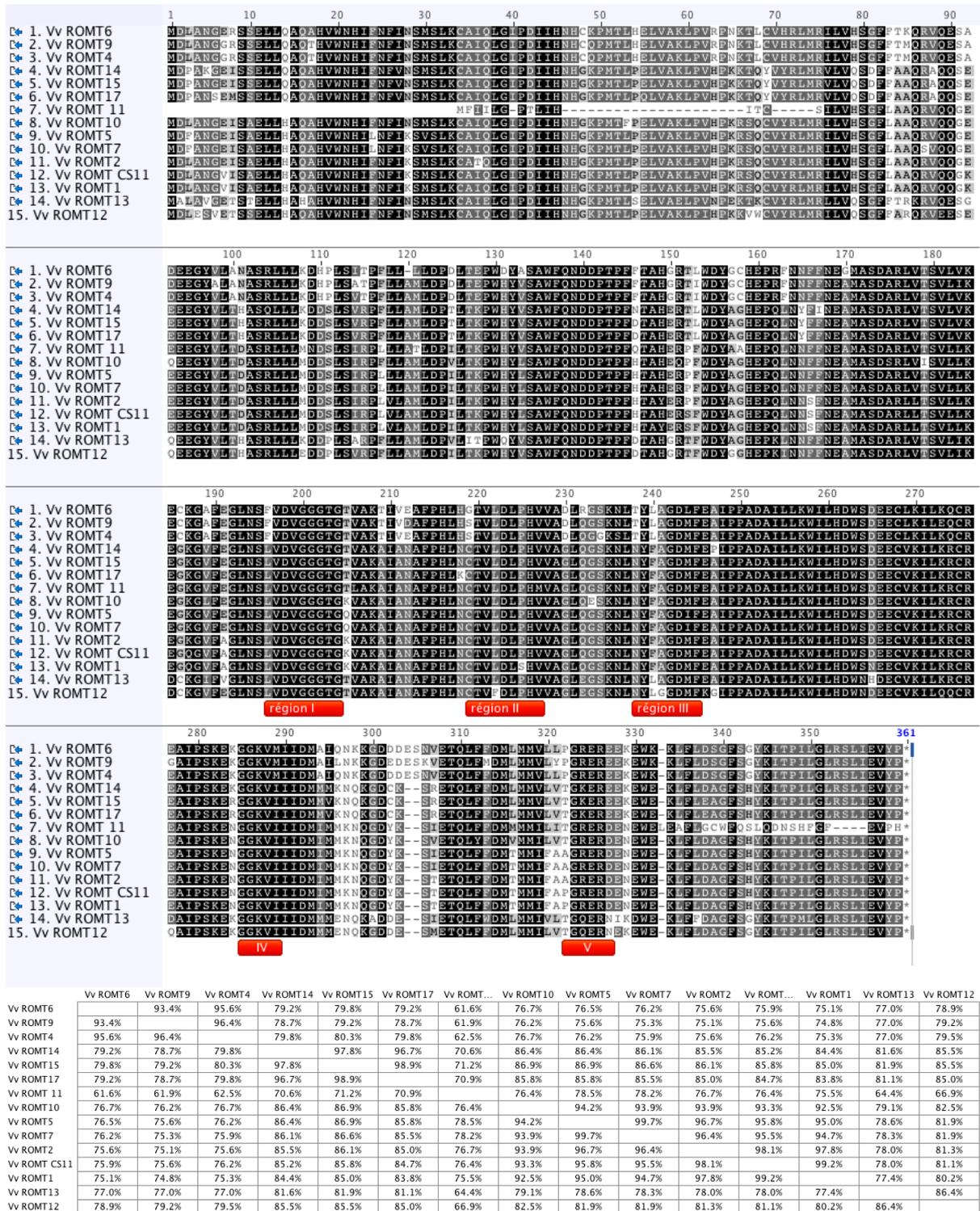


Figure 64 : Alignement des séquences protéiques des différentes ROMT du PN40024 et de la ROMTCS11, et pourcentages d'identité correspondants. Les régions consensus riches en glycine des OMT sont représentées en rouge.

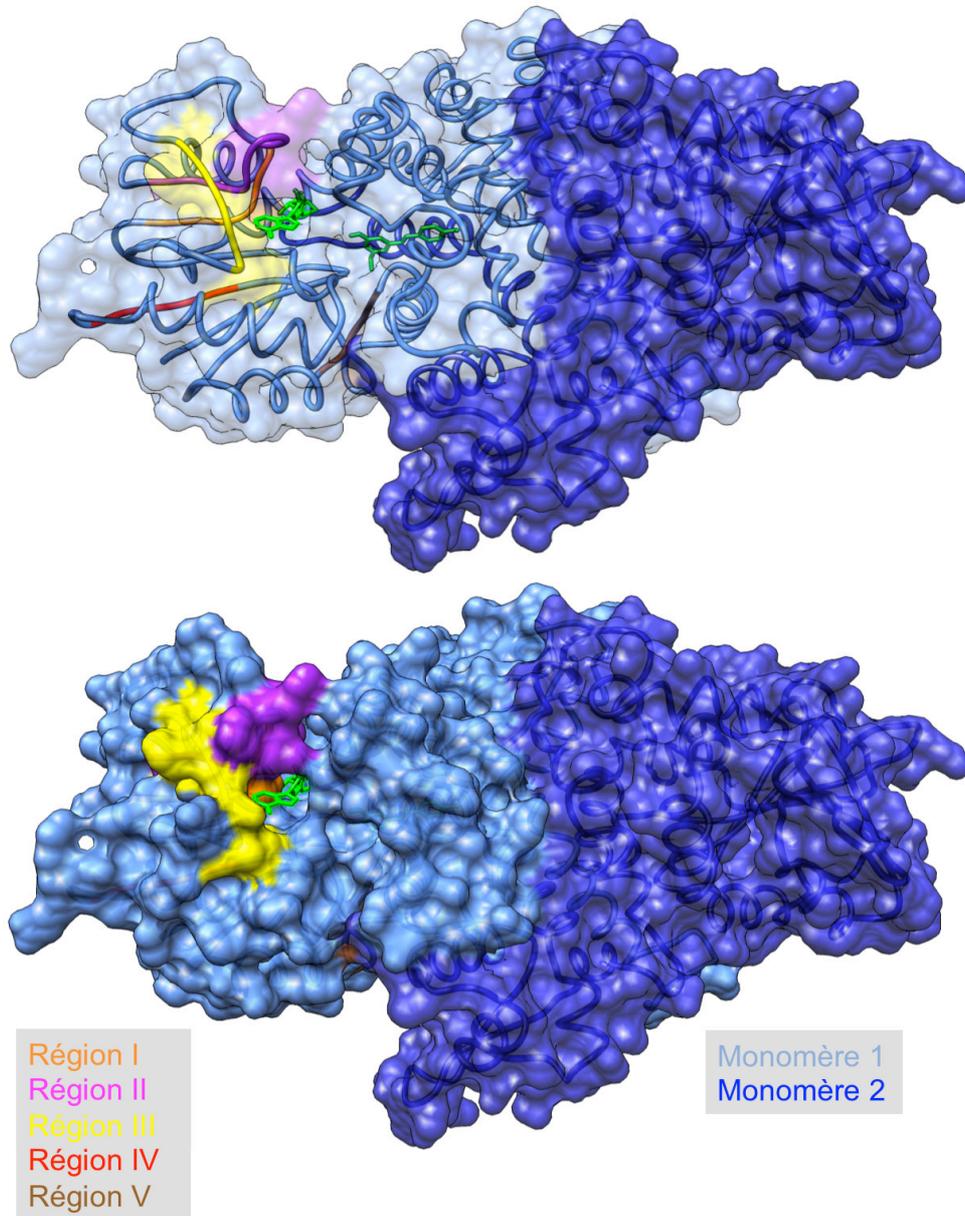


Figure 65 : Représentation tridimensionnelle des régions consensus riches en glycine de la ROMT du Cabernet sauvignon.

## 2.4 Etude de la fongitoxicité du ptérostilbène *in planta*

Différentes études ont montré les propriétés fongitoxiques du ptérostilbène *in vitro* (Pezet and Pont, 1990, 1995; Pezet, Gindro, Viret, and Richter, 2004). De part ses propriétés, le ptérostilbène pourrait jouer un rôle important dans les défenses de la vigne. Cependant, la fongitoxicité réelle du ptérostilbène n'a jamais été évaluée *in planta*. Lors de la caractérisation de la ROMT CS11, la co-expression transitoire d'une stilbène synthase et de la ROMT CS11 chez *N. benthamiana* a conduit à l'accumulation de quantités importantes de ptérostilbène dans les feuilles transformées. Cependant, la technique d'expression transitoire se prête mal à l'étude de l'impact éventuel du ptérostilbène sur des pathogènes, en raison des réactions provoquées par l'infiltration d'une culture d'*A. tumefaciens*. Aussi, l'obtention de transformants stables co-exprimant une stilbène synthase et la ROMT CS11 a été entreprise. Après l'échec d'une tentative chez le tabac en raison de phénomènes de stérilité induite par les stilbènes, des lignées d'*A. thaliana* exprimant d'une part, la stilbène synthase Vst1 et, d'autre part, la ROMT CS11 ont été générées par Julie Chong (UHA, Colmar). Des lignées co-exprimant les deux gènes ont ensuite été obtenues par croisement de deux lignées pures surexprimant Vst1 et la ROMT CS11, avant mon arrivée au laboratoire). Ces lignées avaient fait l'objet d'analyse par HPLC pour leur production en ptérostilbène, en vue de réaliser des tests pour évaluer l'action du ptérostilbène *in planta*. Le ptérostilbène n'avait pas été détecté lors des premières analyses. Aussi, j'ai entrepris une nouvelle caractérisation de ces lignées pour leur production de ptérostilbène. Les lignées ont été re-semées, puis environ 100 mg de jeunes feuilles ont fait l'objet d'une extraction puis d'une analyse par UHPLC-MS. Les plantes produisant le plus de ptérostilbène ont été sélectionnées, montées à graines puis re-semées afin de pouvoir réaliser les tests de pathogénicité. Ces tests ont également été réalisés avec la lignée parentale. Les lignées productrices parentales produisent plus de ptérostilbène que leurs descendants, avec un maximum de 4,5 µg/g de matière fraîche (Figure 66), ce qui est inférieur aux quantités obtenues par Rimando et al. (2011), de l'ordre de 8 à 16 µg/g de matière fraîche. Le resvératrol produit dans nos lignées varie entre 9 et 636 µg/g de matière fraîche, à titre comparatif Rimando et al. (2011) ont obtenus des concentrations comprises entre 22 et 52 µg/g de matière fraîche. Les lignées parentales qui produisent le plus de ptérostilbène, synthétisent également beaucoup de picéide : entre 0,1 et 7 mg/g de matière fraîche, ce qui peut expliquer les faibles concentrations en ptérostilbène obtenues.

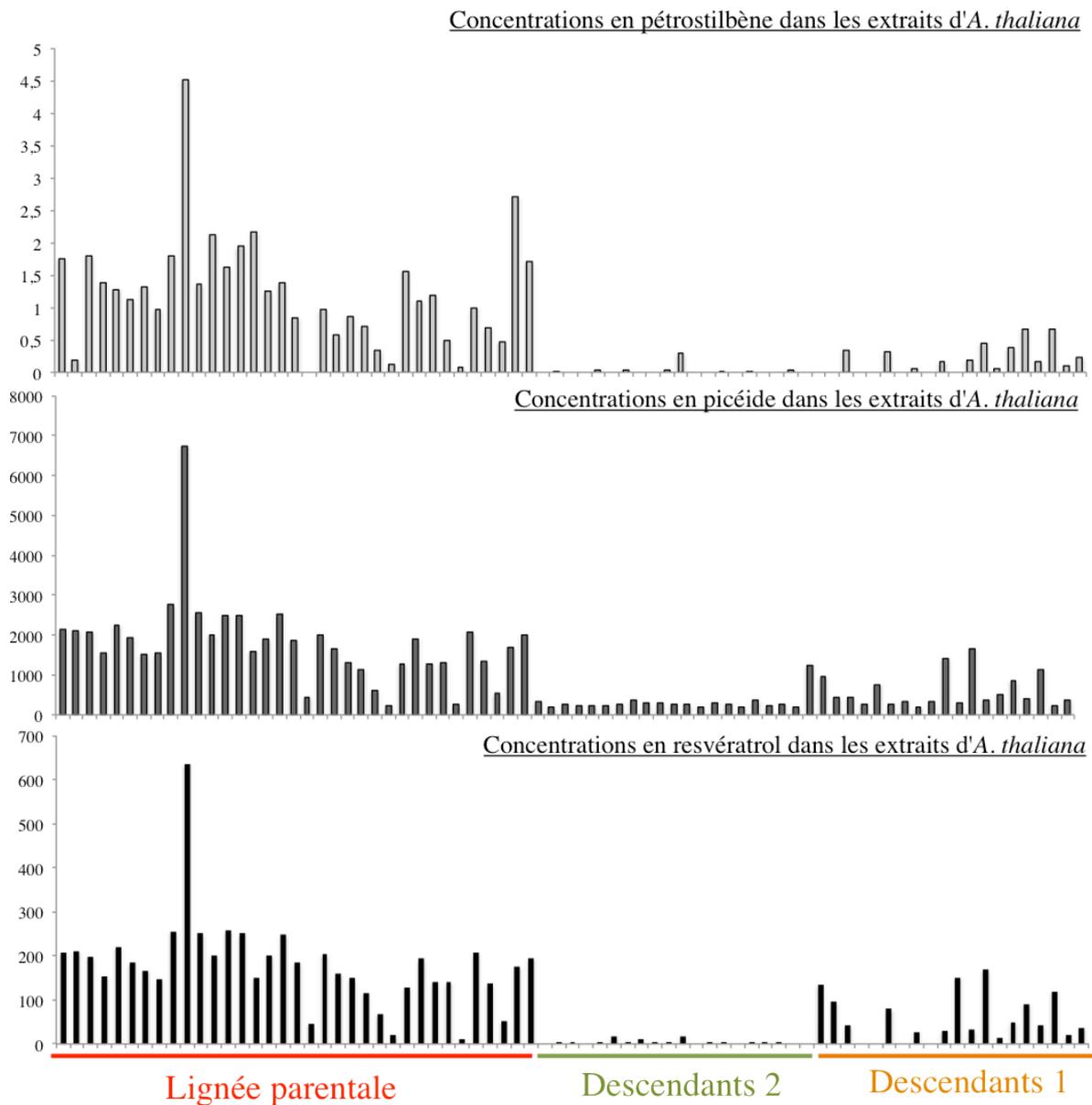


Figure 66 : Analyse des lignées transgéniques Vst1-ROMT CS11 d'*A. thaliana*.

Ces lignées ont été utilisées pour réaliser des tests d'inoculation par *B. cinerea*, en vue de déterminer si les concentrations en pterostilbène ont un impact sur le développement du pathogène. Les lignées parentales seront comparées aux plantes produisant uniquement du resvératrol et du picéide, afin de dissocier l'effet du pterostilbène de l'effet du resvératrol sur la résistance à *B. cinerea*. Les analyses sont actuellement en cours.

### 3 Discussion

#### 3.1 Analyse de l'expression des gènes ROMT

L'expression des gènes de la famille des ROMT a été étudiée dans différents organes et différentes conditions, en particulier en réponse à des stress (infection par *P. viticola* et stress aux rayons UV). Suite à une infection par *P. viticola*, seules les gènes *VvROMT1* et *VvROMT2* sont fortement induits 48 et 96 h post-infection. *VvROMT8* est également induit, mais dans une moindre mesure : l'induction est 4 fois moins forte que l'induction des gènes *VvROMT1* et *VvROMT2*. Ces résultats sont en accord avec les résultats d'expression précédemment obtenus par Schmidlin et al., (2008), qui montraient l'induction de l'expression du gène *ROMT CS11* 24 h et 48 h après immersion des disques foliaires dans une suspension de sporanges de *P. viticola*, avec un maximum d'expression 24 h post-infection. Suite à un stress aux rayons UV, l'ensemble de la famille des ROMT ne semble pas induit 24 et 48 h après traitement, alors qu'une induction 24 h post-traitement avait été observée précédemment (Schmidlin et al., 2008). Une autre étude plus récente a pu montrer l'expression d'une ROMT au niveau des baies de *V. vinifera* cv. Marselan 48 h après infection par *B. cinerea*, mais aussi au niveau des feuilles 3 jours post-infection par *P. viticola*, avec un maximum d'expression 7 jours post-infection (Gamm et al., 2011). Ensembles, ces résultats semblent démontrer que les « vraies » ROMT, telles que les ROMT CS11, *VvROMT1* et *VvROMT2*, impliquées dans la synthèse de ptérostilbène, seraient induites préférentiellement en réponse à un stress biotique de type pathogène fongique. Compte tenu de la toxicité du ptérostilbène sur les spores de *B. cinerea* et *P. viticola* (Pezet and Pont, 1988b, 1990, 1995; Pezet, Gindro, Viret, and Richter, 2004), les ROMT pourraient donc jouer un rôle important dans les mécanismes de défense de la vigne contre les champignons phytopathogènes. Le rôle du ptérostilbène comme composé antifongique *in planta* reste néanmoins à démontrer.

Les autres ROMT putatives ne semblent pas répondre aux stress biotiques ou abiotiques, et leur implication dans les mécanismes de défense de la vigne semble peu probable. Une analyse non-exhaustive sur différents organes de vigne a permis de constater l'expression constitutive des ROMT 12 et 13 au niveau des racines, ce qui avait déjà été observé au niveau des racines de vigne soumises à différents stress abiotiques (stress hydrique, salin ou exposition au froid) (Tillett et al., 2011). L'expression des gènes

*VvROMT4*, *VvROMT5*, *VvROM6*, *VvROM10*, *VvROM11* et *VvROM14* n'a pas pu être détectée par cette méthode. Néanmoins, une étude récente et exhaustive menée par Fasoli et al., (2012), a permis d'analyser l'expression d'environ 91 % des gènes de vigne par microarray, sur 54 échantillons représentant les différents tissus et organes de vigne à différents stades de développement : les feuilles, les sarments, les bourgeons, les vrilles, les fruits (rachis, graines, pulpe et peau), les inflorescences (entières et fleurs) et le pollen (Figure 67). D'après les résultats de cette étude (Fasoli et al., 2012) :

- le gène *VvROMT11* tronqué que j'ai cloné, et qui coderait pour une protéine plus courte, n'est pas exprimé dans les conditions testées. Ce gène est donc probablement un pseudogène.
- Les gènes *VvROMT12* et *VvROM13* sont exprimés dans les racines et les graines, et j'ai pu vérifier l'expression constitutive de ces gènes au niveau des racines.
- Le gène *VvROMT4* est exprimé spécifiquement dans les étamines
- Les gènes *ROMT* d'une même sous-famille semblent montrer des profils d'expression relativement similaires.

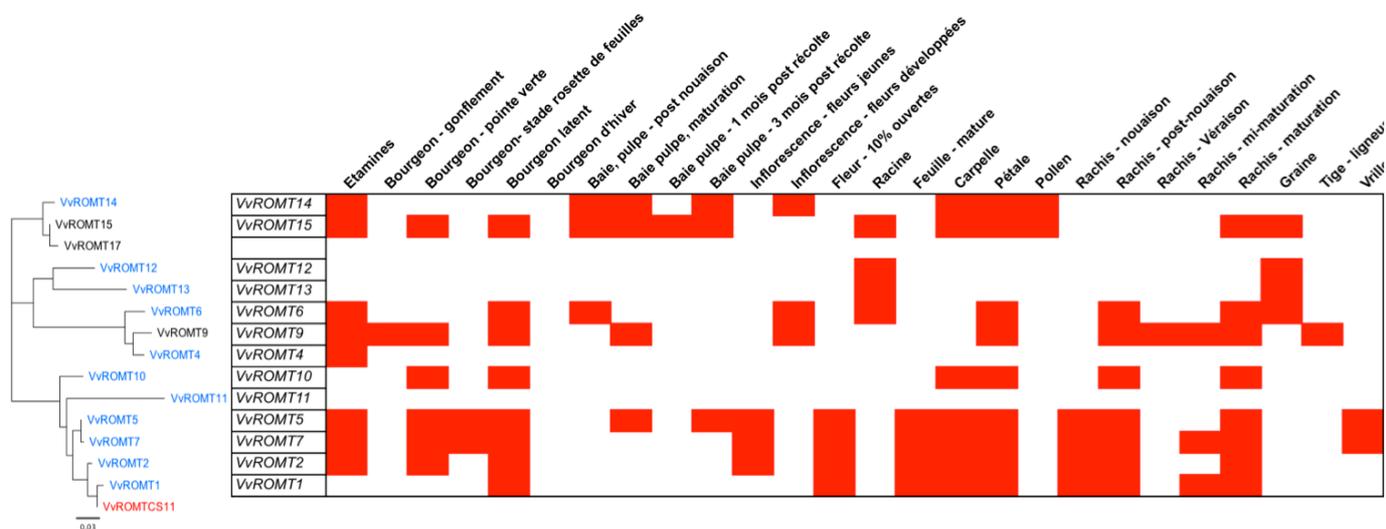


Figure 67 : Profils d'expression de la famille des ROMT (d'après Fasoli et al., 2012).

### 3.2 Etude fonctionnelle de la famille des ROMT

Les études visant à déterminer la fonction des ROMT ont été conduites à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'analyse *in vivo* par expression transitoire chez *N. benthamiana* via agro-

infiltration a permis de démontrer l'implication de la ROMT 2 du Pinot noir dans la synthèse du ptérostilbène. Aucune production de ptérostilbène n'a pu être détectée par cette méthode avec les autres ROMT putatives, ce qui a été confirmé par les tests réalisés *in vitro* avec les protéines recombinantes correspondantes. Ces ROMT ne sont donc pas capable de méthyler le resvératrol, et sont donc considérées comme des ROMT-like.

Afin d'identifier les substrats potentiels des ROMT-like, celles-ci ont été incubés en présence de différents substrats « classiques » des *O*-méthyltransférases végétales. Comme attendu, les ROMT 2 et CS11 catalysent la synthèse du ptérostilbène *in vitro*. L'analyse multi-substrats a permis de montrer que la ROMT 13 est capable de méthyler différents substrats, dont l'esculétine (hydroxycoumarine), une coumarine retrouvée chez plusieurs familles végétales incluant les Apiacées, les Rutacées, les Solanacées, les Lamiacées, les Astéracées ou encore les Rosacées (Keating and O'Kennedy, 1997). La scopolétine, forme méthylée de l'esculétine, et la scopoline (7- $\beta$ -glycoside de la scopolétine) sont décrites chez plusieurs espèces dont le tabac (Maier et al., 2000). Chez *A. thaliana*, la synthèse de la scopolétine au niveau des racines implique une CCoAOMT (OMT de type II) (Kai et al., 2006). Cependant, la vigne n'est pas une plante réputée pour sa richesse en coumarines (esculétine, scopolétine et leurs formes glycosylées) et des analyses d'extraits de racines de vigne n'ont pas permis d'en détecter. En ce sens, l'esculétine n'est probablement pas le substrat naturel de la ROMT 13, mais sa structure peut donner une indication sur le type de substrat utilisé par la ROMT 13. La ROMT 13 est aussi la seule ROMT capable de méthyler l'olivétol.

La ROMT 12, qui est la ROMT-like possédant la plus grande identité de séquence protéique avec la ROMT 13, est capable de méthyler le 3,5-dihydroxyanisole (DHA) pour former le 3,5-diméthoxypolyphénol (DMP) et le triméthoxybenzène (TMB). Des OMT capables de méthyler le DHA et le DMP ont déjà été caractérisée chez *Rosa chinensis* (OOMT1 et OOMT2) (Scalliet et al., 2002). Ces OMT sont spécifiquement exprimées dans les pétales de rose, et sont impliquées dans la production de composés phénoliques volatils comme le diméthoxytoluène (DMT) et le triméthoxytoluène (TMB). Ces composés sont une particularité des roses chinoises et participent au bouquet floral typique de ces roses. Les roses possèdent également des OMT spécifiquement exprimées dans les racines et l'une d'entre elles a été analysée au laboratoire comme étant capable de méthyler le 3,5-dihydroxyanisole pour former du DMP et surtout du TMP à partir du DHA. La ROMT 13 et les OMT de rose exprimées dans les racines sont également capables de produire du DMP *in vitro*, ce qui traduit probablement une grande similitude dans le fonctionnement de ces

enzymes. Néanmoins, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que le DHA est bien le substrat naturel de ces OMT, et de plus amples analyses devront être faites pour le prouver, comme par exemple l'obtention de plantes transgéniques surexprimant la ROMT 13.

En complément des analyses réalisées *in vitro*, une seconde stratégie a été adoptée pour tenter d'identifier le(s) substrat(s) des protéines ROMT-like. Cette stratégie repose sur leur expression hétérologue chez *N. benthamiana* et *A. thaliana*, de manière à étudier leur impact éventuel sur le métabolisme de ces deux plantes.

Des analyses préliminaires des métabolites présents après l'expression transitoire des ROMT-like dans les feuilles de *N. benthamiana* n'a pas permis de détecter de différences majeures, en comparaison avec un témoin exprimant la GFP de façon transitoire. Il est également possible que le substrat de ces enzymes ne soit pas présent dans les feuilles de *N. benthamiana*, ou que les produits ne soient pas extraits par les protocoles d'extraction utilisés. Par exemple, il est envisageable que les produits de réaction soient (très) apolaires, et qu'ils ne soient pas extraits par le méthanol. Ces analyses pourront donc être complétées par des analyses des fractions apolaires.

Parmi toutes les ROMT-like, les ROMT 12 et 13 se sont révélées les plus intéressantes, car nous avons pu mettre en évidence leur activité OMT sur différents substrats, ainsi que l'expression des gènes *ROMT12* et *ROMT13* au niveau des racines de vigne. J'ai donc entrepris la création de lignées transgéniques de *N. benthamiana* et d'*Arabidopsis thaliana*, transformées avec les ROMT 12 et 13 de vigne sous contrôle du promoteur 35S du CaMV, permettant une expression constitutive forte de ces gènes. L'obtention de lignées transgéniques de *N. benthamiana* est un processus assez long, c'est pourquoi l'analyse des plantes n'a pas encore été achevée. Une analyse préliminaire des feuilles des générations transgéniques parentales a pu montrer des différences notables dans les profils métaboliques, et l'identification des pics correspondants est actuellement en cours. Les descendants des générations parentales sont en cours de sélection, et l'analyse des racines pourra être amorcée rapidement. En parallèle, j'ai obtenu des transformants stables d'*Arabidopsis thaliana* qui surexpriment les différents gènes de la famille des ROMT. Pour certains de ces gènes, les lignées pures sont en cours d'obtention, mais pour les ROMT 12 et 13, la transformation n'a pas fonctionné. En effet, je ne suis pas parvenue à sélectionner les plantules transformées pour leur résistance à l'antibiotique sélectif : les plantes transformées avec les ROMT 12 et 13 montraient le même phénotype que les plantules non transformées, à savoir des plantules de petite taille ne développant pas de racines dans le milieu de sélection. Deux hypothèses

peuvent expliquer ces résultats. Premièrement, il est possible que la transformation d'*A. thaliana* ait échoué dans le cas de ces constructions, ou que le rendement de transformation soit très faible. Cependant, pour les ROMT 12 et 13, deux transformations indépendantes ont été réalisées, et pour chacune d'elles j'ai réalisé plusieurs sélections *in vitro*, à différentes concentrations d'hygromycine. Cette hypothèse semble donc peu probable. Deuxièmement, il est probable que les ROMT 12 et 13 synthétisent un produit toxique pour les plantules, freinant ainsi leur développement aux stades précoces. En effet, l'étude de Fasoli et al., (2012) a montré que les gènes *VvROMT12* et *VvROMT13* étaient exprimés dans les graines, et leur surexpression pourrait donc inhiber le développement des plantules dans les stades précoces de leur développement. On peut aussi imaginer que ces deux enzymes entrent en compétition avec une voie de biosynthèse importante pour le développement des plantules, comme c'est par exemple le cas des doubles transformants STS-ROMT produisant du ptérostilbène chez le tabac (*Nicotiana tabacum*) (Rimando et al., 2011). Pour sélectionner les plantules exprimant les ROMT 12 et 13, une alternative serait de semer les graines transgéniques directement en terre, et de sélectionner par la suite les plantes sur la base de la présence des gènes *ROMT 12* ou *13*, en réalisant des PCR à partir d'extraits d'ADN génomique de feuilles. Le travail serait certes plus long, mais il n'est pas exclu que les plantes transgéniques présentent un phénotype particulier en comparaison avec les plantes sauvages.

En parallèle de ces plantes transgéniques, j'ai pu mettre au point un protocole pour obtenir des racines transgéniques (ou « hairy roots ») chez *N. benthamiana*, surexprimant de façon constitutive les gènes *VvROMT12* et *VvROMI3* grâce au promoteur 35S. L'expression de ces ROMT dans les racines est plus pertinente pour l'étude de leur fonction, étant donné qu'elles sont constitutivement exprimées dans les racines de vigne. Les chances de trouver un substrat potentiel pour ces deux enzymes sont donc potentiellement plus élevées dans les racines, que lorsque ces ROMT sont exprimées de façon transitoire dans les feuilles, par agro-infiltration. L'analyse des racines transgéniques est actuellement en cours.

## 4 Perspectives

L'analyse que j'ai réalisée sur la famille des ROMT peut être considérée comme une analyse préliminaire à une étude plus poussée des différents gènes appartenant à cette famille. Dans un premier temps, il serait très intéressant de poursuivre la caractérisation fonctionnelle des ROMT-like, et plus particulièrement des ROMT 12 et 13. D'autres substrats pourraient

être testés, comme par exemple d'autres acides hydroxycinnamiques, des précurseurs de composés volatils tel que l'orcinol ou l'(iso)eugénol, ou encore des alcools résorcinoliques. En effet, la sorgoléone est un alkyle résorcinolique méthylé sécrété par les racines de sorgho (*Sorghum bicolor*), et faisant intervenir l'*O*-méthyltransférases SbOMT3 (Baerson et al., 2008). Cette enzyme permet également de méthyler l'olivétol, tout comme la ROMT 13. Il serait donc pertinent de réaliser des tests avec des alkyle résorcinoliques possédants des longueurs différentes de chaîne hydrocarbonée (alkyle).

Dans un deuxième temps, il faudrait poursuivre la caractérisation des plantes transgéniques de *N. benthamiana*, notamment par l'analyse fine du métabolome au niveau des racines pour les ROMT 12 et 13. La sélection des plantes transgéniques d'*A. thaliana* pourrait également être poursuivie, en utilisant par exemple d'autres méthodes de sélection des plantes. On pourrait par exemple envisager de transformer les plantes avec d'autres vecteurs Gateway<sup>TM</sup> conférant une résistance à herbicide BASTA (pMDC123), ce qui permettra d'effectuer une sélection des plantes sans passer par une sélection *in vitro*. Enfin, il serait très intéressant de poursuivre les études des ROMT 12 et 13 dans les racines transgéniques. Dans le cadre de ma thèse, j'ai réalisé des « hairy roots » chez *N. benthamiana* en adaptant un protocole utilisé pour la vigne (Torregrosa and Bouquet, 1997), et il serait possible d'obtenir ces racines chez la vigne. Il serait donc très intéressant d'observer l'effet d'une surexpression des ROMT 12 et 13 dans des racines de vigne transgéniques, et il serait aussi envisageable d'éteindre l'expression de ces gènes. Une autre approche à envisager serait le silencing des ROMT en transformant les racines avec une construction permettant de générer une structure « hairpin » conduisant à la production de siRNA ciblant les ROMT 12 et 13 spécifiquement. Les séquences nucléotidiques des ROMT 12 et 13 sont suffisamment divergentes pour les dissocier entre elles, et des autres ROMT. Cependant, les ROMT 12 et 13 étant les seules ROMT-like exprimées dans les racines, une approche plus globale par siRNA ciblant indifféremment toutes les ROMT pourraient également convenir. Le silencing des ROMT exprimées dans les feuilles (ROMT 1, 2, 5 et 7) pourrait également être envisageable, puisqu'un protocole de silencing par expression transitoire de siRNA dans les feuilles de vigne a récemment été mis au point avec succès (Bertazzon et al., 2012).

Dans un troisième temps, à la lumière des résultats de Fasoli et al., (2012), il faudrait poursuivre les travaux sur l'expression des gènes de la famille des ROMT afin de quantifier les niveaux d'expression des différents gènes dans les différents organes de la plante et à différents stades de développement. Il serait particulièrement intéressant d'étudier les ROMT

exprimées dans les pétales (potentiellement les ROMT 5, 6, 7, 9, 10, 14 et 15), afin de voir si elles sont capables de synthétiser des molécules aromatiques volatiles, mais aussi la ROMT 4, qui a la particularité d'être uniquement exprimée au niveau des étamines.

Finalement, les travaux sur les doubles transformants *d'A. thaliana STS-ROMT* produisant du ptérostilbène seront poursuivis, afin d'évaluer la fongitoxicité du ptérostilbène *in planta*. Un projet commun avec l'équipe de virologie de la vigne de l'INRA de Colmar a pour but de créer des lignées transgéniques de vigne surexprimant la ROMT CS11 du Cabernet sauvignon. Le but est d'obtenir des vignes transgéniques accumulant des quantités importantes de ptérostilbène pour évaluer sa toxicité face aux champignons phytopathogènes et son rôle dans les défenses de la vigne.



## *Conclusion générale*

---



## Conclusion générale

---

Les gènes *STS* sont dix fois plus nombreux chez la vigne que chez les autres espèces végétales productrices de stilbènes, ce qui pose la question de la signification biologique de la taille très inhabituelle de cette famille de gènes. Ceci a motivé la première partie de ma thèse, qui consiste en l'étude structurale, fonctionnelle et évolutive de la famille des gènes *STS* chez la vigne, var. PN40024. Les résultats majeurs de cette étude montrent que :

- Le génome de PN40024 contient une cinquantaine de gènes *STS*, dont au moins 32 sont potentiellement fonctionnels. L'expression de 31 de ces 32 gènes est induite en réponse à un stress abiotique (UV), ce qui indique qu'ils sont très majoritairement exprimés.
- La caractérisation fonctionnelle d'une sélection de gènes représentatifs de la diversité de la famille suggère que l'ensemble des 32 gènes *STS* codent pour des protéines ayant réellement une activité stilbène synthase, ce qui représente une redondance fonctionnelle unique.
- L'analyse évolutive des gènes *STS* montre que cette famille est extrêmement contrainte, ce qui indique que l'évolution tend à conserver un grand nombre de gènes *STS* fonctionnels chez la vigne.

La famille des gènes *STS* de la vigne possède des caractéristiques uniques chez les végétaux. Il n'y a pas d'autre exemple, à notre connaissance, de famille de plus de 30 gènes fonctionnels et exprimés, codant pour des protéines ayant la même activité enzymatique. Si nous n'avons pas pu conclure sur la signification biologique de l'amplification cette famille chez la vigne, ce travail constitue une base pour de futures études sur la génomique de la biosynthèse des stilbènes. En effet, le projet GrapeReSeq (Plant-KBBE 2008) a permis le séquençage d'une trentaine de cépages de vigne et d'espèces sauvages du genre *Vitis*, incluant *V. sylvestris*, qui est l'ancêtre sauvage de la vigne cultivée *V. vinifera*. La disponibilité de ces données permet maintenant d'envisager l'étude des familles *STS* à l'échelle du genre *Vitis*, de comparer les caractéristiques des familles *STS* chez différents cépages de vigne cultivés et chez différentes espèces de *Vitis* sauvages, et de s'interroger, par exemple, sur l'impact éventuel de la domestication de la vigne sur ces familles de gènes.

Dans une seconde partie de ma thèse, je me suis attachée à l'analyse de la famille des ROMT putatives du PN40024, définie à partir de la ROMT du Cabernet sauvignon (ROMT

CS11) caractérisée par Schmidlin et al., (2008). Cette analyse a permis d'identifier une famille de gènes dont l'évolution est à priori plus complexe. Contrairement à la famille *STS*, la famille *ROMT* ne constitue pas un ensemble de gènes fonctionnellement homogènes. Parmi les 14 gènes complets identifiés à partir du séquençage 12X du génome du PN40024, seul un gène (*VvROMT2*) et potentiellement deux (*VvROMT1*, en cours de caractérisation fonctionnelle), sont capables de synthétiser du ptérostilbène à partir du resvératrol, et sont donc considérés comme des « vraies » resvératrol *O*-méthyltransférases. Les analyses entreprises n'ont pas permis de déterminer les fonctions des autres gènes de la famille *ROMT*. Néanmoins, j'ai mis en place différents outils qui permettront de poursuivre les analyses fonctionnelles des gènes « ROMT-like ». L'étude de deux gènes exprimés spécifiquement au niveau des racines (*VvROM12* et *VvROM13*), a constitué la majorité des travaux menés durant ma troisième année de thèse, avec des résultats prometteurs. En particulier, les lignées transgéniques de *N. benthamiana* et d'*A. thaliana* exprimant ces différents gènes pourront être utilisées dans des études de métabolomique non ciblées, afin d'étudier la présence éventuelle de métabolites issus de l'activité de ces enzymes. Ces analyses effectuées sur des plantes modèles permettront de préciser les hypothèses concernant le rôle de ces gènes chez la vigne et, peut-être, de déterminer leur fonction.

Au delà de l'intérêt fondamental de l'analyse des familles de gènes liés à la biosynthèse des stilbènes chez la vigne, une meilleure connaissance de ce métabolisme est nécessaire à sa prise en compte dans de futurs programmes de création variétale. La combinaison raisonnée de gènes de résistance et de défenses métaboliques permettra de développer de nouvelles variétés possédant des résistances plus durables aux principales maladies fongiques de la vigne.

# *Bibliographie*

---



---

# Bibliographie

---

- Abu-Mellal, A., Koolaji, N., Duke, R.K., Tran, V.H., and Duke, C.C.** (2012). Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. *Phytochemistry* **77**: 251–9.
- Adrian, M., Jeandet, P., R., B., and Joubert, J.M.** (1996). Induction of Phytoalexin (Resveratrol) Synthesis in Grapevine Leaves Treated with Aluminum Chloride (AlCl<sub>3</sub>). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **8561**: 1979–1981.
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L. a., and Bessis, R.** (1997). Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, Against *Botrytis cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold. *Journal of Chemical Ecology* **23**: 1689–1702.
- Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., and Takada, Y.** (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer research* **24**: 2783–840.
- Ajikumar, P.K., Xiao, W.-H., Tyo, K.E.J., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., Mucha, O., Phon, T.H., Pfeifer, B., and Stephanopoulos, G.** (2010). Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)* **330**: 70–4.
- Anderson, R.M., Bitterman, K.J., Wood, J.G., Medvedik, O., and Sinclair, D.A.** (2003). Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **423**: 181–5.
- Assia, B., Nadège, T., Stéphanie, C., Jérôme, B., Marie-France, C.-C., and Jean-Michel, M.** (2008). Ethephon Elicits Protection Against *Erysiphe necator*. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**: 5781–5787.
- Aumont, V., Larronde, F., Richard, T., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., Krisa, S., and Méryllon, J.-M.** (2004). Production of highly <sup>13</sup>C-labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Journal of biotechnology* **109**: 287–94.
- Austin, M.B., Bowman, M.E., Ferrer, J., Schro, J., Noel, J.P., Jolla, L., and Cedex, G.** (2004). An Aldol Switch Discovered in Stilbene Synthases Mediates Cyclization Specificity of Type III Polyketide Synthases. *Chemistry and Biology* **11**: 1179–1194.
- Baerson, S.R., Dayan, F.E., Rimando, A.M., Nanayakkara, N.P.D., Liu, C.-J., Schröder, J., Fishbein, M., Pan, Z., Kagan, I. a, Pratt, L.H., Cordonnier-Pratt, M.-M., and Duke, S.O.** (2008). A functional genomics investigation of allelochemical biosynthesis in *Sorghum bicolor* root hairs. *The Journal of biological chemistry* **283**: 3231–47.
- Bauer, J.H., Goupil, S., Garber, G.B., and Helfand, S.L.** (2004). An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 12980–5.

- Baumgarten, A., Cannon, S., Spangler, R., and May, G.** (2003). Genome-level evolution of resistance genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **165**: 309–19.
- Baur, J. a and Sinclair, D. a** (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nature reviews. Drug discovery* **5**: 493–506.
- Becker, J., Armstrong, G., Vandermerwe, M., Lambrechts, M., Vivier, M., and Pretorius, I.** (2003). Metabolic engineering of for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Research* **4**: 79–85.
- Beekwilder, J., Wolswinkel, R., Jonker, H., Hall, R., de Vos, C.H.R., and Bovy, A.** (2006). Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Applied and environmental microbiology* **72**: 5670–2.
- Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscalt, J., Corio-Costet, M.-F., and Mérillon, J.-M.** (2006). Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**: 9119–25.
- Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., and Mérillon, J.-M.** (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* **46**: 493–9.
- Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A.-F., Cipriani, G., Morgante, M., Testolin, R., and Di Gaspero, G.** (2009). Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine “Bianca” is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *TAG. Theoretical and applied genetics* **120**: 163–76.
- Bellow, S., Latouche, G., Brown, S.C., Poutaraud, A., and Cerovic, Z.G.** (2012). *In vivo* localization at the cellular level of stilbene fluorescence induced by *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. *Journal of experimental botany* **63**: 3697–707.
- Benová, B., Adam, M., Onderková, K., Královský, J., and Krajíček, M.** (2008). Analysis of selected stilbenes in *Polygonum cuspidatum* by HPLC coupled with CoulArray detection. *Journal of separation science* **31**: 2404–9.
- Bergmans, H., Vandie, I., and Hoekstra, W.** (1981). Transformation in *Escherichia coli* - stages in the process. *Journal of bacteriology* **146**: 564–570.
- Bertazon, N., Raiola, A., Castiglioni, C., Gardiman, M., Angelini, E., Borgo, M., and Ferrari, S.** (2012). Transient silencing of the grapevine gene VvPGIP1 by agroinfiltration with a construct for RNA interference. *Plant cell reports* **31**: 133–43.
- Bertelli, A.A., Giovannini, L., Giannesi, D., Migliori, M., Bernini, W., Fregoni, M., and Bertelli, A.** (1995). Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *International journal of tissue reactions* **17**: 1–3.
- Blanc, G. and Wolfe, K.H.** (2004). Functional Divergence of Duplicated Genes Formed by Polyploidy during *Arabidopsis* Evolution. *The Plant Cell* **16**: 1679–1691.

- Borie, B., Jeandet, P., Parize, A., Bessis, R., and Adrian, M. (2004)** Resveratrol and stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *American journal of enology and viticulture* **55**: 60–64.
- Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E.-K., and Poppenberger, B. (2005).** Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Current opinion in plant biology* **8**: 254–63.
- Breuil, a C., Jeandet, P., Adrian, M., Chopin, F., Pirio, N., Meunier, P., and Bessis, R. (1999).** Characterization of a Pterostilbene Dehydrodimer Produced by Laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **89**: 298–302.
- Bronner, A. and Oliveira, J. (1990).** Creation and study of the Pinot noir variety lineage. In In: Proceeding of the 5th International Symposium on Grape Breeding, p.69. (Special Issue of Vitis) St Martin, Pfalz, Germany.
- Bru, M. and Pedreno, G. (2006).** Method for the production of resveratrol in cell cultures. US 2006/0205049 A1 65.
- Bryant, J.P., Wieland, G.D., Reichardt, P.B., Lewis, V.E., and McCarthy, M.C. (1983).** Pinosylvin methyl ether deters snowshoe hare feeding on green alder. *Science (New York, N.Y.)* **222**: 1023–5.
- Busso, D., Delagoutte-Busso, B., and Moras, D. (2005).** Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Analytical biochemistry* **343**: 313–21.
- Calderón, A.A., Zapata, J.M., Pedrefio, M.A., Muñoz, R., and Barcel, A.R. (1992).** Levels of 4-hydroxystilbene-oxidizing isoperoxidases related to constitutive disease resistance *in vitro*-cultured grapevine. 63–70.
- Calderón AA, Pedreño MA, Ros-Barceló A, M.R. (1990).** Zymographic screening of plant peroxidase isoenzyme oxidizing 4-hydroxystilbenes. *Electrophoresis*. **11**: 507–508.
- Camont, L., Cottart, C.-H., Rhayem, Y., Nivet-Antoine, V., Djelidi, R., Collin, F., Beaudoux, J.-L., and Bonnefont-Rousselot, D. (2009).** Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Analytica chimica acta* **634**: 121–8.
- Cao, Z. and Li, Y. (2004).** Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *European journal of pharmacology* **489**: 39–48.
- Chang, X., Heene, E., Qiao, F., and Nick, P. (2011).** The phytoalexin resveratrol regulates the initiation of hypersensitive cell death in *Vitis* cell. *PloS one* **6**: e26405.
- Chen, F., D’Auria, J.C., Tholl, D., Ross, J.R., Gershenzon, J., Noel, J.P., and Pichersky, E. (2003).** An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **36**: 577–88.
- Chen, J., Hall, D.E., Murata, J., and De Luca, V. (2006).** L-Alanine induces programmed cell death in *V. labrusca* cell suspension cultures. *Plant Science* **171**: 734–744.

- Chiron, H., Drouet, a, Claudot, a C., Eckerskorn, C., Trost, M., Heller, W., Ernst, D., and Sandermann, H.** (2000). Molecular cloning and functional expression of a stress-induced multifunctional O-methyltransferase with pinosylvin methyltransferase activity from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant molecular biology* **44**: 733–45.
- Chiron, H., Drouet, a, Lieutier, F., Payer, H.D., Ernst, D., and Sandermann, H.** (2000). Gene induction of stilbene biosynthesis in Scots pine in response to ozone treatment, wounding, and fungal infection. *Plant physiology* **124**: 865–72.
- Chong, J., Poutaraud, A., and Huguency, P.** (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* **177**: 143–155.
- Coiner, H., Schröder, G., Wehinger, E., Liu, C.-J., Noel, J.P., Schwab, W., and Schröder, J.** (2006). Methylation of sulfhydryl groups: a new function for a family of small molecule plant O-methyltransferases. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **46**: 193–205.
- Conant, G.C. and Wolfe, K.H.** (2008). Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nature reviews. Genetics* **9**: 938–50.
- Counet, C., Callemien, D., and Collin, S.** (2006). Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry* **98**: 649–657.
- Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, a, Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R., and Boulay, M.** (2001). In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase Vst1 gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *Journal of experimental botany* **52**: 901–10.
- Creasy, L.L. and Coffee, M.** (1988). Phytoalexin production potential of grape berries. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **113**: 230–234.
- Curtis, M.D. and Grossniklaus, U.** (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant physiology*. **133**: 462–469.
- Cutanda-Perez, M.-C., Ageorges, A., Gomez, C., Vialet, S., Terrier, N., Romieu, C., and Torregrosa, L.** (2009). Ectopic expression of VlmbyA1 in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport. *Plant molecular biology* **69**: 633–48.
- Dayan, F.E., Rimando, A.M., Pan, Z., Baerson, S.R., Gimsing, A.L., and Duke, S.O.** (2010). Sorgoleone. *Phytochemistry* **71**: 1032–9.
- Delaunois, B., Cordelier, S., Conreux, A., Clément, C., and Jeandet, P.** (2009). Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant biotechnology journal* **7**: 2–12.
- Demrow, H.S., Slane, P.R., and Folts, J.D.** (1995). Administration of wine and grape juice inhibits *in vivo* platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* **91**: 1182–8.
- Dereks, W. and Creasy, L.L.** (1989). The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiological and molecular plant pathology* **34**: 189–202.

- Dixon, R. a. and Paiva, N.L.** (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant cell* **7**: 1085–1097.
- Dixon, R.A., Chen, F., Guo, D., and Parvathi, K.** (2001). The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry* **57**: 1069–84.
- Dong, C.N., Anzellotti, D., Ibrahim, R.K., Huner, N.P.A., and Sarhan, F.** (2003). Daphnetin methylation by a novel O-methyltransferase is associated with cold acclimation and photosystem II excitation pressure in rye. *The Journal of biological chemistry* **278**: 6854–61.
- Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., and Courot, E.** (2009). Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends in biotechnology* **27**: 706–13.
- Douillet-Breuil, A.-C., Jeandet, P., Adrian, M., and Bessis, R.** (1999). Changes in the Phytoalexin Content of Various *Vitis* Spp. in Response to Ultraviolet C Elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 4456–4461.
- Dubrovina, A.S., Manyakhin, A.Y., Zhuravlev, Y.N., and Kiselev, K.V.** (2010). Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in rolC transgenic cell cultures of *Vitis amurensis*. *Applied microbiology and biotechnology* **88**: 727–36.
- Dudareva, N., Murfitt, L.M., Mann, C.J., Gorenstein, N., Kolosova, N., Kish, C.M., Bonham, C., and Wood, K.** (2000). Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *The Plant cell* **12**: 949–61.
- Dudareva, N. and Pichersky, E.** (2008). Metabolic engineering of plant volatiles. *Current opinion in biotechnology* **19**: 181–9.
- Díaz, E., Ferrández, A., Píetro, M., and García, J.** (2001). Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**: 523–569.
- D’Auria, J. and Pichersky, E.** (2003). The SABATH family of methyltransferases in *Arabidopsis thaliana* and other plant species. *Recent Advances in Phytochemistry* **37**: 253–283.
- D’Introno, A., Paradiso, A., Scoditti, E., D’Amico, L., De Paolis, A., Carluccio, M.A., Nicoletti, I., DeGara, L., Santino, A., and Giovinazzo, G.** (2009). Antioxidant and anti-inflammatory properties of tomato fruits synthesizing different amounts of stilbenes. *Plant biotechnology journal* **7**: 422–9.
- Eckermann, C., Schröder, G., Eckermann, S., Strack, D., Schmidt, J., Schneider, B., and Schröder, J.** (2003). Stilbenecarboxylate biosynthesis: a new function in the family of chalcone synthase-related proteins. *Phytochemistry* **62**: 271–86.
- Falginella, L., Castellarin, S.D., Testolin, R., Gambetta, G. a, Morgante, M., and Di Gaspero, G.** (2010). Expansion and subfunctionalisation of flavonoid 3’,5’-hydroxylases in the grapevine lineage. *BMC genomics* **11**: 562.
- Fasoli, M., Dal Santo, S., Zenoni, S., Tornielli, G.B., Farina, L., Zamboni, A., Porceddu, A., Venturini, L., Bicego, M., Murino, V., Ferrarini, A., Delledonne, M., and Pezzotti, M.** (2012). The Grapevine

- Expression Atlas Reveals a Deep Transcriptome Shift Driving the Entire Plant into a Maturation Program. *The Plant cell* **24**: 3489–505.
- Ferrer, J.-L., Austin, M.B., Stewart, C., and Noel, J.P.** (2008). Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* **46**: 356–70.
- Ferrer, J.-L., Zubieta, C., Dixon, R.A., and Noel, J.P.** (2005). Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Plant physiology* **137**: 1009–17.
- Ferri, M., Tassoni, A., Franceschetti, M., Righetti, L., Naldrett, M.J., and Bagni, N.** (2009). Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics* **9**: 610–24.
- Fischer, R., Budde, I., and Hain, R.** (1997). Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco. **11**: 489–498.
- Fischer, R. and Hain, R.** (1994). Plant disease resistance resulting from the expression of foreign phytoalexins. *Current Opinion in Biotechnology* **5**: 125–130.
- Flagel, L.E. and Wendel, J.F.** (2009). Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *The New phytologist* **183**: 557–64.
- Fliegmann, J., Schröder, G., Schanz, S., Britsch, L., Schröder, J., Li, B., Pflanz, B.D., Freiburg, U., and Freiburg, D.** (1992). Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Molecular Biology* **18**: 489–503.
- Floreani, M., Napoli, E., Quintieri, L., and Palatini, P.** (2003). Oral administration of trans-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity. *Life sciences* **72**: 2741–50.
- Flores-Sanchez, I. and Verpoorte, R.** (2009). Plant polyketide synthases: a fascinating group of enzymes. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* **47**: 167–74.
- Force, a, Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, a, Yan, Y.L., and Postlethwait, J.** (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**: 1531–45.
- Frankel, E.** (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet* **341**: 1103–1104.
- Frick, S. and Kutchan, T.M.** (1999). Molecular cloning and functional expression of O-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **17**: 329–39.
- Fuhrman, B., Lavy, A., and Aviram, M.** (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *The American journal of clinical nutrition* **61**: 549–54.

- Fung, R.W.M., Gonzalo, M., Fekete, C., Kovacs, L.G., He, Y., Marsh, E., McIntyre, L.M., Schachtman, D.P., and Qiu, W.** (2008). Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant physiology* **146**: 236–49.
- Gachon, C.M.M., Langlois-Meurinne, M., and Saindrenan, P.** (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in plant science* **10**: 542–9.
- Gamm, M., Héloir, M.-C., Kelloniemi, J., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Adrian, M.** (2011). Identification of reference genes suitable for qRT-PCR in grapevine and application for the study of the expression of genes involved in pterostilbene synthesis. *Molecular genetics and genomics : MGG* **285**: 273–85.
- Gang, D.R., Lavid, N., Zubieta, C., Chen, F., Beuerle, T., Lewinsohn, E., Noel, J.P., and Pichersky, E.** (2002). Characterization of Phenylpropene O -Methyltransferases from Sweet Basil : Facile Change of Substrate Specificity and Convergent Evolution within a Plant O -Methyltransferase Family. *The Plant Cell* **14**: 505–519.
- Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F., Velasco, R., Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., et al.** (2008). Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**: 11773–11785.
- Gindro, K., Alonso-villaverde, V., Voinesco, F., Spring, J., and Viret, O.** (2001). Rôle déterminant des stilbènes dans la résistance au mildiou de la vigne. *Revue Suisse Viticulture* **42**: 352–357.
- Giorelli, A., Sparvoli, F., Mattivi, F., Tava, A., Balestrazzi, A., Vrhovsek, U., Calligari, P., Bollini, R., and Confalonieri, M.** (2004). Expression of the stilbene synthase (StSy) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides. *Transgenic research* **13**: 203–14.
- Giovinazzo, G., D'Amico, L., Paradiso, A., Bollini, R., Sparvoli, F., and DeGara, L.** (2005). Antioxidant metabolite profiles in tomato fruit constitutively expressing the grapevine stilbene synthase gene. *Plant biotechnology journal* **3**: 57–69.
- Gorham, J. and Coughlan, S.J.** (1980). Inhibition of photosynthesis by stilbenoids. *Phytochemistry* **19**: 2059–2064.
- Grotewold, E.** (2006). The science of flavonoids.
- Haberer, G., Hindemitt, T., Meyers, B.C., and Mayer, K.F.X.** (2004). Transcriptional Similarities , Dissimilarities , and Conservation of cis-Elements in Duplicated Genes of *Arabidopsis*. *Plant physiology* **136**: 3009–3022.
- Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1989). Biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* **40**: 347–369.

- Hain, R., Reif, H.-J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stöcker, R.H., and Stenzel, K.** (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**: 153 – 156.
- Halbwirth, H., Puhl, I., Haas, U., Jezik, K., Treutter, D., and Stich, K.** (2006). Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**: 1479–85.
- Hall, D. and De Luca, V.** (2007). Mesocarp localization of a bi-functional resveratrol/hydroxycinnamic acid glucosyltransferase of Concord grape (*Vitis labrusca*). *The Plant journal : for cell and molecular biology* **49**: 579–91.
- Hamm, G., Carré, V., Poutaraud, A., Maunit, B., Frache, G., Merdinoglu, D., and Muller, J.-F.** (2010). Determination and imaging of metabolites from *Vitis vinifera* leaves by laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **24**: 335–42.
- Hammerbacher, A., Ralph, S.G., Bohlmann, J., Fenning, T.M., Gershenzon, J., and Schmidt, A.** (2011). Biosynthesis of the major tetrahydroxystilbenes in spruce, astringin and isorhapontin, proceeds via resveratrol and is enhanced by fungal infection. *Plant physiology* **157**: 876–90.
- Hammerschmidt, R.** (2004). The Metabolic Fate of Resveratrol: Key to Resistance in Grape? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**: 269–270.
- Hanhineva, K., Kokko, H., Siljanen, H., Rogachev, I., Aharoni, A., and Kärenlampi, S.O.** (2009). Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Journal of experimental botany* **60**: 2093–106.
- Hart, J. and Shrimpton, D.** (1979). Role of Stilbenes in Resistance of Wood to Decay. *Phytopathology* **69**: 1138–1143.
- Hart, J.H.** (1981). Role of Phytostilbenes in Decay and Disease Resistance. *Annual review of Phytopathology* **19**: 437–58.
- He, X.Z. and Dixon, R.A.** (1996). Affinity chromatography, substrate/product specificity, and amino acid sequence analysis of an isoflavone O-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Archives of biochemistry and biophysics* **336**: 121–9.
- Hipskind, J.D. and Paiva, N.L.** (2000). Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **13**: 551–62.
- Ho, C. and Kuo, H.** (2008). In vitro resveratrol rich callus tissues derived from *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc. and method for producing the same. United State Patent Application 2008/0160560 A1.
- Holsters, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inzé, D., Engler, G., and Villarroel, R.** (1980). The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid* **3**: 212–230.

- Howitz, K., Bitterman, K., Cohen, H., Lamming, D., Lavu, S., Wood, J., RE, Z., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L., Scherer, B., and Sinclair, D.** (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**: 191–196.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.-L., Scherer, B., and Sinclair, D.A.** (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**: 191–6.
- Huang, L.L., Xue, Z., and Zhu, Q.Q.** (2006). Method for the production of resveratrol in a recombinant oleaginous microorganism. World Patent WO 2006125000 A2.
- Hughes, A.L.** (2002). Adaptive evolution after gene duplication Antisense RNA in imprinting : spreading silence. **18**: 433–434.
- Hugueney, P., Provenzano, S., Verriès, C., Ferrandino, A., Meudec, E., Batelli, G., Merdinoglu, D., Cheynier, V., Schubert, A., and Ageorges, A.** (2009). A novel cation-dependent O-methyltransferase involved in anthocyanin methylation in grapevine. *Plant physiology* **150**: 2057–70.
- Hukkanen, A.T., Kokko, H.I., Buchala, A.J., McDougall, G.J., Stewart, D., Kärenlampi, S.O., and Karjalainen, R.O.** (2007). Benzothiadiazole induces the accumulation of phenolics and improves resistance to powdery mildew in strawberries. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**: 1862–70.
- Huminiecki, L. and Wolfe, K.H.** (2004). Divergence of Spatial Gene Expression Profiles Following Species-Specific Gene Duplications in Human and Mouse. 1870–1879.
- Ibdah, M., Zhang, X.-H., Schmidt, J., and Vogt, T.** (2003). A novel Mg<sup>2+</sup>-dependent O-methyltransferase in the phenylpropanoid metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum*. *The Journal of biological chemistry* **278**: 43961–72.
- Ibrahim, R.K.** (1997). Plant O-methyl-transferase signatures. *Trends in plant science* **2**: 249–250.
- Ingham, J.L.** (1976). 3,5,4'-trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry* **15**: 1791–1793.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H.** (1990). High-efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23–28.
- Ioset, J.R., Marston, a, Gupta, M.P., and Hostettmann, K.** (2001). Five new prenylated stilbenes from the root bark of *Lonchocarpus chiricanus*. *Journal of natural products* **64**: 710–5.
- Ito, T., Tanaka, T., Iinuma, M., Nakaya, K., Takahashi, Y., Sawa, R., Naganawa, H., and Chelladurai, V.** (2003). Two new oligostilbenes with dihydrobenzofuran from the stem bark of *Vateria indica*. *Tetrahedron* **59**: 1255–1264.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choise, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., et al.** (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**: 463–7.

- Jang, M.** (1997). Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science* **275**: 218–220.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., and Pezzuto, J.M.** (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science (New York, N.Y.)* **275**: 218–20.
- Jeandet, P., Bessis, R., and Gautheron, B.** (1991). The Production of Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by Grape Berries in Different Developmental Stages. *American Journal of Enology and Viticulture* **42**: 41–46.
- Jeandet, P., Delaunoy, B., Aziz, A., Donnez, D., Vasserot, Y., Cordelier, S., and Courot, E.** (2012). Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2012**: 579089.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., and Adrian, M.** (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of agricultural and food chemistry* **50**: 2731–41.
- Jeandet, P., Jacquot, C., Conreux, A., Adrian, M., and Waffo-Téguo, P.** (2007). Role of stilbene oligomers ( $\epsilon$ - and  $\delta$ -viniferins) in the *Botrytis cinerea*/grapevine interaction. In *Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wine*, Intercept, Lavoisier, Paris, London, New York, pp. 105–110.
- Jez, J.M., Bowman, M.E., Dixon, R.A., and Noel, J.P.** (2000). Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nature structural biology* **7**: 786–91.
- Joshi, C.P. and Chiang, V.L.** (1998). Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant molecular biology* **37**: 663–74.
- Jäger, U. and Nguyen-Duong, H.** (1999). Relaxant effect of trans-resveratrol on isolated porcine coronary arteries. *Arzneimittel-Forschung* **49**: 207–11.
- Kaga, S., Zhan, L., Matsumoto, M., and Maulik, N.** (2005). Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor. *Journal of molecular and cellular cardiology* **39**: 813–22.
- Kai, K., Shimizu, B., Mizutani, M., Watanabe, K., and Sakata, K.** (2006). Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **67**: 379–86.
- Kapteyn, J., Qualley, A.V., Xie, Z., Fridman, E., Dudareva, N., and Gang, D.R.** (2007). Evolution of cinnamate/p-coumarate carboxyl methyltransferases and their role in the biosynthesis of methylcinnamate. *The Plant cell* **19**: 3212–29.
- Kato, M., Kitao, N., Ishida, M., Morimoto, H., Irino, F., and Mizuno, K.** (2010). Expression for caffeine biosynthesis and related enzymes in *Camellia sinensis*. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* **65**: 245–56.

- Katsuyama, Y., Funa, N., Miyahisa, I., and Horinouchi, S.** (2007). Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *Chemistry & biology* **14**: 613–21.
- Katz, M., Förster, J., and David, H.** (2008). Metabolically engineered cells for the production of resveratrol or an oligomeric or glycosidically-bound derivative thereof. US Patent US 2008:0286844A1.
- Keating, G. and O’Kennedy, R.** (1997). The chemistry and occurrence of coumarins. In *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action*, pp. 23–66.
- Keen, N.T. and Ingham, J.L.** (1976). New stilbene phytoalexins from American cultivars of *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry* **15**: 1794–1795.
- Kim, B.G., Lee, H.J., Park, Y., Lim, Y., and Ahn, J.-H.** (2006). Characterization of an O-methyltransferase from soybean. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* **44**: 236–41.
- Kim, J., Lee, S., and Park, S.** (2010). Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *African Journal of Biotechnology* **7**: 3788–3790.
- Kimura, Y. and Okuda, H.** (2001). Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *The Journal of nutrition* **131**: 1844–9.
- Kiselev, K.V., Dubrovina, A.S., Veselova, M.V., Bulgakov, V.P., Fedoreyev, S.A., and Zhuravlev, Y.N.** (2007). The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of biotechnology* **128**: 681–92.
- Kiselev, K.V., Tyunin, A.P., Manyakhin, A.Y., and Zhuravlev, Y.N.** (2010). Resveratrol content and expression patterns of stilbene synthase genes in *Vitis amurensis* cells treated with 5-azacytidine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **105**: 65–72.
- Kobayashi, S., Ding, C., Nakamura, Y., Nakajima, I., and Matsumoto, R.** (2006). Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). *Plant cell reports* **19**: 904–910.
- Kodan, A., Kuroda, H., and Sakai, F.** (2002). A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 3335–9.
- Koo, Y.J., Kim, M.A., Kim, E.H., Song, J.T., Jung, C., Moon, J.-K., Kim, J.-H., Seo, H.S., Song, S.I., Kim, J.-K., Lee, J.S., Cheong, J.-J., and Choi, Y.D.** (2007). Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* **64**: 1–15.

- Kopp, P.** (1998). Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the “French paradox”? *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **138**: 619–20.
- Kouakou, T.H., Teguo, P.W., Valls, J., Kouadio, Y.J., Decendit, A., and Merillon, J.-M.** (2006). First evidence of trans- resveratrol production in cell suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant cell, tissue and organ culture* **86**: 405–409.
- Krisa, S., Larronde, F., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., and Mérillon, J.-M.** (1999). Stilbene Production by *Vitis vinifera* Cell Suspension Cultures: Methyl Jasmonate Induction and <sup>13</sup>C Biolabeling. *Journal of Natural Products* **62**: 1688–1690.
- Ku, K., Chang, P., Cheng, Y., and Lien, C.** (2005). Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea* : a novel source of the anticancer compound piceatannol. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**: 3877–3881.
- Lam, K.C., Ibrahim, R.K., Behdad, B., and Dayanandan, S.** (2007). Structure , function , and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome* **1013**: 1001–1013.
- Landy, A.** (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda-Site-Specific Recombination. *Annual review of Biochemistry* **58**: 913–949.
- Langcake, P.** (1981). Disease resistance of *Vitis* spp and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon-viniferine, alpha-viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* **18**: 213–226.
- Langcake, P. and Mc Carthy, W.** (1979). The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* **18**: 244–253.
- Langcake, P. and Pryce, R.J.** (1977a). A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* **33**: 151–2.
- Langcake, P. and Pryce, R.J.** (1977b). Oxidative dimerization of 4-hydroxy-stilbenes *in vitro*: Production of a grapevine phytoalexin mimic. *Journal Cover: J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 208–210.
- Langcake, P. and Pryce, R.J.** (1977c). The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* **16**: 1193–1196.
- Langcake, P. and Pryce, R.J.** (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology* **9**: 77–86.
- Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Chèze, C., Deffieux, G., and Mérillon, J.M.** (1998). Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Reports* **17**: 946–950.
- Larsson, K. a E., Zetterlund, I., Delp, G., and Jonsson, L.M.V.** (2006). N-Methyltransferase involved in gramine biosynthesis in barley: cloning and characterization. *Phytochemistry* **67**: 2002–8.
- Lee, Y.J., Kim, B.G., Chong, Y., Lim, Y., and Ahn, J.-H.** (2008). Cation dependent O-methyltransferases from rice. *Planta* **227**: 641–7.

- Lieutier, F., Sauvard, D., Brignolas, F., Picron, V., Yart, a., Bastien, C., and Jay-Allemand, C.** (1996). Changes in phenolic metabolites of Scots-pine phloem induced by *Ophiostoma brunneo-ciliatum*, a bark-beetle-associated fungus. *Forest Pathology* **26**: 145–158.
- Lijavetzky, D., Almagro, L., Belchi-Navarro, S., Martínez-Zapater, J.M., Bru, R., and Pedreño, M.A.** (2008). Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC research notes* **1**: 132.
- Lim, C.G., Fowler, Z.L., Hueller, T., Schaffer, S., and Koffas, M. a G.** (2011). High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* **77**: 3451–60.
- Liu, C.-J., Deavours, B.E., Richard, S.B., Ferrer, J.-L., Blount, J.W., Huhman, D., Dixon, R. a, and Noel, J.P.** (2006). Structural basis for dual functionality of isoflavonoid O-methyltransferases in the evolution of plant defense responses. *The Plant cell* **18**: 3656–69.
- Liu, Z., Zhuang, C., Sheng, S., Shao, L., Zhao, W., and Zhao, S.** (2011). Overexpression of a resveratrol synthase gene (PcRS) from *Polygonum cuspidatum* in transgenic *Arabidopsis* causes the accumulation of trans-piceid with antifungal activity. *Plant cell reports* **30**: 2027–36.
- Losa, G.A.** (2003). Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *European journal of clinical investigation* **33**: 818–23.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, I., López-Nicolás, J.M., and Núñez-Delicado, E.** (2007). Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chemistry* **104**: 39–44.
- Lynch, M. and Conery, J.** (2000). The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science* **290**: 1151–1155.
- Lynch, M. and Force, a** (2000). The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* **154**: 459–73.
- Maier, W., Schmidt, J., Nimtz, M., Wray, V., and Strack, D.** (2000). Secondary products in mycorrhizal roots of tobacco and tomato. *Phytochemistry* **54**: 473–9.
- Malacarne, G., Vrhovsek, U., Zulini, L., Cestaro, A., Stefanini, M., Mattivi, F., Delledonne, M., Velasco, R., and Moser, C.** (2011). Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC plant biology* **11**: 114.
- Martinez, J. and Moreno, J.J.** (2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical pharmacology* **59**: 865–70.
- Matsuno, M., Compagnon, V., Schoch, G., Schmitt, M., Debayle, D., Bassard, J., Pollet, B., A, H., D, H., P, U., C, L., F, B., J, E., and D., W.-R.** (2009). Evolution of a novel phenolic pathway for pollen development. *Science* **325**: 1688–92.
- Mattivi, F., Vrhovsek, U., Malacarne, G., Masuero, D., Zulini, L., Stefanini, M., Moser, C., Velasco, R., and Guella, G.** (2011). Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in

- the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling × Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. Journal of agricultural and food chemistry **59**: 5364–75.
- Maxwell, C.A., Edwards, R., and Dixon, R.A.** (1992). Identification, purification, and characterization of S-adenosyl-L-methionine: isoliquiritigenin 2'-O-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). Archives of biochemistry and biophysics **293**: 158–66.
- Maxwell, C.A., Harrison, M.J., and Dixon, R.A.** (1993). Molecular characterization and expression of alfalfa isoliquiritigenin 2'-O-methyltransferase, an enzyme specifically involved in the biosynthesis of an inducer of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. The Plant journal : for cell and molecular biology **4**: 971–81.
- Medina-Bolivar, F., Condori, J., Rimando, A.M., Hubstenberger, J., Shelton, K., O'Keefe, S.F., Bennett, S., and Dolan, M.C.** (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. Phytochemistry **68**: 1992–2003.
- Misako, K. and Kouichi, M.** (2004). Caffeine synthase and related methyltransferases in plants. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library **9**: 1833–42.
- Mizuno, K., Kato, M., Irino, F., Yoneyama, N., Fujimura, T., and Ashihara, H.** The first committed step reaction of caffeine biosynthesis: 7-methylxanthosine synthase is closely homologous to caffeine synthases in coffee (*Coffea arabica* L.). FEBS Letters **547**: 56–60.
- Mizuno, K., Okuda, A., Kato, M., Yoneyama, N., Tanaka, Hiromi, Ashihara, H., and Fujimura, T.** (2003). Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). FEBS **534**: 75–81.
- Moore, L., Warren, G., and Strobel, G.** (1979). Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. Plasmid **2**: 617–626.
- Morales, M., And, J.A., and Barceló, A.R.** (1997). Oxidation of trans-Resveratrol by a Hypodermal Peroxidase Isoenzyme from Gamay rouge Grape (*Vitis vinifera*) Berries. American Journal of Enology and Viticulture **48**: 33–38.
- Morales, M. and Barcel, A.R.** (1997). Basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *Vitis vinifera*. **45**: 229–232.
- Moreno-Labanda, J.F., Mallavia, R., Pérez-Fons, L., Lizama, V., Saura, D., and Micol, V.** (2004). Determination of piceid and resveratrol in Spanish wines deriving from Monastrell (*Vitis vinifera* L.) grape variety. Journal of agricultural and food chemistry **52**: 5396–403.
- Morris, B.J.** (2012). Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. Free radical biology & medicine.
- Murfitt, L.M., Kolosova, N., Mann, C.J., and Dudareva, N.** (2000). Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methyl benzoate in flowers of *Antirrhinum majus*. Archives of biochemistry and biophysics **382**: 145–51.

- Mérillon, J.-M., Fauconneau, B., Waffo Teguo, P., Barrier, L., Vercauteren, J., and Huguet, F.** (1997). Antioxidant Activity of the Stilbene Astringin, Newly Extracted from *Vitis vinifera* Cell Cultures. *Clinical chemistry* **43**: 1092–1093.
- Naderali, E.K., Doyle, P.J., and Williams, G.** (2000). Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. *Clinical science (London, England : 1979)* **98**: 537–43.
- Noel, J.P., Dixon, R.A., Pickersky, E., Zubieta, C., and Ferrer, J.-L.** (2003). Structural, Functional, and Evolutionary Basis for Methylation of Plant Small Molecules. *Recent Advances in Phytochemistry* **37**: 37–58.
- Ober, D.** (2010). Gene duplications and the time thereafter - examples from plant secondary metabolism. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **12**: 570–7.
- Ohno, S.** (1970). *Evolution by gene duplicatin* Springer. (Berlin, Germany).
- Pandey, R., Müller, A., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pikaard, C.S., Richards, E.J., Bender, J., Mount, D.W., and Jorgensen, R.A.** (2002). Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic acids research* **30**: 5036–55.
- Parage, C., Tavares, R., Réty, S., Baltenweck-Guyot, R., Poutaraud, A., Renault, L., Heintz, D., Lugan, R., Marais, G., Aubourg, S., and Huguency, P.** (2012). Structural, functional and evolutionary analysis of the unusually large stilbene synthase gene family in grapevine (*Vitis vinifera*). *Plant physiology*.
- Park, S.R., Yoon, J. a, Paik, J.H., Park, J.W., Jung, W.S., Ban, Y.-H., Kim, E.J., Yoo, Y.J., Han, A.R., and Yoon, Y.J.** (2009). Engineering of plant-specific phenylpropanoids biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. *Journal of biotechnology* **141**: 181–8.
- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hellsten, U., Mitros, T., Poliakov, A., Schmutz, J., Spannagl, M., Tang, H., Wang, X., Wicker, T., Bharti, A.K., Chapman, J., Feltus, F.A., Gowik, U., Grigoriev, I.V., et al.** (2009). The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* **457**: 551–6.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., and Richter, H.** (2004). Effects of resveratrol , viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* **43**: 145–148.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., and Spring, J.** (2004). Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**: 297–303.
- Pezet, R. and Pont, V.** (1988a). Activité antifongique dans les baies de *Vitis vinifera*: effets d'acides organiques et du pterostilbène. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* **20**: 303–309.
- Pezet, R. and Pont, V.** (1988b). Identification of pterostilbene in grape berries of *Vitis vinifera*. *Plant physiology and biochemistry* **26**: 603–607.
- Pezet, R. and Pont, V.** (1995). Mode of toxic action of Vitaceae stilbenes on fungal cellls. In: Daniel M and Puurkayasha RP (eds) *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*, pp. 317–331.

- Pezet, R. and Pont, V.** (1990). Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea* pers. *Journal of Phytopathology* **129**: 19–30.
- Pfaffl, MW.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR **29**: 2002–2007.
- Pichersky, E. and Gang, D.R.** (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science* **5**: 439–45.
- Pott, M.B., Hippauf, F., Saschenbrecker, S., Chen, F., Ross, J., Kiefer, I., Slusarenko, A., Noel, J.P., Pichersky, E., Effmert, U., and Piechulla, B.** (2004). Biochemical and structural characterization of benzenoid carboxyl methyltransferases involved in floral scent production in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens*. *Plant physiology* **135**: 1946–55.
- Poutaraud, A., Latouche, G., Martins, S., Meyer, S., Merdinoglu, D., and Cerovic, Z.G.** (2007). Fast and local assessment of stilbene content in grapevine leaf by in vivo fluorometry. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**: 4913–20.
- Preisig-Müller, R., Gnau, P., and Kindl, H.** (1995). The inducible 9, 10-dihydrophenanthrene pathway: characterization and expression of bibenzyl synthase and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Archives of biochemistry and biophysics* **317**: 201–7.
- Preisig-Müller, R., Schwekendiek, a, Brehm, I., Reif, H.J., and Kindl, H.** (1999). Characterization of a pine multigene family containing elicitor-responsive stilbene synthase genes. *Plant molecular biology* **39**: 221–9.
- Qin, G., Gu, H., Zhao, Y., Shi, G., Yang, Y., Pichersky, E., Chen, H., Liu, M., Chen, Z., and Qu, L.** (2005). An Indole-3-Acetic Acid Carboxyl Methyltransferase Regulates *Arabidopsis* Leaf Development. **17**: 2693–2704.
- Quandt, H.-J., Pühler, A., and Broer, I.** (1993). Transgenic Root Nodules of *Vivia hirsuta*: A Fast and Efficient System for the Study of Gene Expression in Indeterminate-Type Nodules. *The American Phytopathological Society* **6**: 699–706.
- Raiber, S., Schröder, G., and Schröder, J.** (1995). Molecular and enzymatic characterization of two stilbene synthases from Eastern white pine (*Pinus strobus*). A single Arg/His difference determines the activity and the pH dependence of the enzymes. *FEBS letters* **361**: 299–302.
- Rayne, S.** (2008). Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and trans-viniferin: high-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Industrial crops and products* **27**: 335–340.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., and Ahmad, N.** (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**: 659–61.
- Reinecke, T. and Kindl, H.** (1994). Characterization of bibenzyl synthase catalysing the biosynthesis of phytoalexins of orchids. *Phytochemistry* **35**: 63–66.

- Renaud, S. and De Lorgeril, M.** (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* **339**: 1523–1526.
- Rimando, A.M., Pan, Z., Polashock, J.J., Dayan, F.E., Mizuno, C.S., Snook, M.E., Liu, C.-J., and Baerson, S.R.** (2011). In planta production of the highly potent resveratrol analogue pterostilbene via stilbene synthase and O-methyltransferase co-expression. *Plant biotechnology journal* **10**: 269–83.
- Rodin, S.N. and Riggs, A.D.** (2003). Epigenetic silencing may aid evolution by gene duplication. *Journal of molecular evolution* **56**: 718–29.
- Rohde, B., Hans, J., Martens, S., Baumert, A., Hunziker, P., and Matern, U.** (2008). Anthranilate N-methyltransferase, a branch-point enzyme of acridone biosynthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **53**: 541–53.
- Rosemann, D., Heller, W., and Sandermann, H.** (1991). Biochemical Plant Responses to Ozone : II. Induction of Stilbene Biosynthesis in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Seedlings. *Plant physiology* **97**: 1280–6.
- Ross, J.R., Nam, K.H., D'Auria, J.C., and Pichersky, E.** (1999). S-Adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. *Archives of biochemistry and biophysics* **367**: 9–16.
- Rutter, M.T., Cross, K.V., and Van Woert, P. a** (2012). Birth, death and subfunctionalization in the *Arabidopsis* genome. *Trends in plant science* **17**: 204–12.
- Ryona, I., Leclerc, S., and Sacks, G.L.** (2010). Correlation of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine to 3-isobutyl-2-hydroxypyrazine during maturation of bell pepper (*Capsicum annuum*) and wine grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of agricultural and food chemistry* **58**: 9723–30.
- Rühmann, S., Treutter, D., Fritsche, S., Briviba, K., and Szankowski, I.** (2006). Piceid (resveratrol glucoside) synthesis in stilbene synthase transgenic apple fruit. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**: 4633–40.
- Samappito, S., Page, J.E., Schmidt, J., De-Eknamkul, W., and Kutchan, T.M.** (2003). Aromatic and pyrone polyketides synthesized by a stilbene synthase from *Rheum tataricum*. *Phytochemistry* **62**: 313–23.
- Sanger, F. and Nicklen, S.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating. **74**: 5463–5467.
- Scalliet, G., Journot, N., Jullien, F., Baudino, S., Magnard, J.L., Channelière, S., Vergne, P., Dumas, C., Bendahmane, M., Cock, J.M., and Hugueney, P.** (2002). Biosynthesis of the major scent components 3,5-dimethoxytoluene and 1,3,5-trimethoxybenzene by novel rose O-methyltransferases. *FEBS letters* **523**: 113–8.
- Scalliet, G., Piola, F., Douady, C.J., Réty, S., Raymond, O., Baudino, S., Bordji, K., Bendahmane, M., Dumas, C., Cock, J.M., and Hugueney, P.** (2008). Scent evolution in Chinese roses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 5927–32.
- Schanz, S., Schröder, G., and Schröder, J.** (1992). Stilbene synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*). *FEBS letters* **313**: 71–4.

- Schemies, J., Sippl, W., and Jung, M.** (2009). Histone deacetylase inhibitors that target tubulin. *Cancer letters* **280**: 222–32.
- Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., van Tunen, A.J., and Bovy, A.G.** (2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* **65**: 2631–48.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D., and Lohmann, J.U.** (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature genetics* **37**: 501–6.
- Schmidlin, L., Poutaraud, A., Claudel, P., Mestre, P., Prado, E., Santos-Rosa, M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Karst, F., Merdinoglu, D., and Huguency, P.** (2008). A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant physiology* **148**: 1630–9.
- Schnee, S., Viret, O., and Gindro, K.** (2008). Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **72**: 128–133.
- Schröder, G., Brown, J.W., and Schröder, J.** (1988). Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *European journal of biochemistry / FEBS* **172**: 161–9.
- Schöppner, a and Kindl, H.** (1984). Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *The Journal of biological chemistry* **259**: 6806–11.
- Seigneur, M., Bonnet, J., Dorian, B., Benchimol, D., Drouillet, F., Gouverneur, G., Larrue, J., Crockett, R., Boisseau, M.R., Ribereau-Gayon, P., and Bricaud, H.** (1990). Effect of the consumption of alcohol, white wine, and red wine on platelet function and serum lipids. *Journal of Applied Cardiology* **5**: 215–222.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y.D.** (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4788–93.
- Seshadri, T.R.** (1972). Polyphenols of *Pterocarpus* and *Dalbergia* woods. *Phytochemistry* **11**: 881–898.
- Shen, T., Wang, X.-N., and Lou, H.-X.** (2009). Natural stilbenes: an overview. *Natural product reports* **26**: 916–35.
- Siemann, E.H. and Creasy, L.L.** (1992). Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**: 49–52.
- Smith, L., Sanders, J., Kaiser, R., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C., Heiner, C., Kent, S., and Hood, L.** (1986). Fluorescence detection in automated DNA-Sequence analysis. *Nature* **321**: 674–679.
- Sobolev, V.S., Potter, T.L., and Horn, B.W.** (2006). Prenylated stilbenes from peanut root mucilage. *Phytochemical Analysis* **17**: 312–322.
- Soltis, S.** (2005). An emerging focus on plant ecological development. *The New phytologist* **166**: 1–5.

- Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A., and Hawes, C.** (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols* **1**: 2019–25.
- Suga, T., Ohta, S., Ide, N., Kurokawa, M., Shimizu, M., and Ohta, E.M.I.** (1993). Endogenous pine wood nematocidal substances in pines, **33**.
- Sydor, T., Schaffer, S., and Boles, E.** (2010). Considerable increase in resveratrol production by recombinant industrial yeast strains with use of rich medium. *Applied and environmental microbiology* **76**: 3361–3.
- Takaya, Y., Yan, K., Terashima, K., He, Y., and Niwa, M.** (2002). Biogenetic reactions on stilbenetetramers from Vitaceaeous plants. **58**: 9265–9271.
- Tassoni, A., Fornalè, S., Franceschetti, M., Musiani, F., Michael, A.J., Perry, B., and Bagni, N.** (2005). Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *The New phytologist* **166**: 895–905.
- Terry, L.A., Joyce, D.C., Adikaram, N.K., and Khambay, B.P.** (2004). Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. *Postharvest Biology and Technology* **31**: 201–212.
- Tillett, R.L., Ergül, A., Albion, R.L., Schlauch, K. a, Cramer, G.R., and Cushman, J.C.** (2011). Identification of tissue-specific, abiotic stress-responsive gene expression patterns in wine grape (*Vitis vinifera* L.) based on curation and mining of large-scale EST data sets. *BMC plant biology* **11**: 86.
- Torregrosa, L. and Bouquet, A.** (1997). *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens* co-transformation to obtain grapevine hairy roots producing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **49**: 53–62.
- Torres, P., Guillermo Avila, J., Romo de Vivar, A., García, A.M., Marín, J.C., Aranda, E., and Céspedes, C.L.** (2003). Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochemistry* **64**: 463–473.
- Trantas, E., Panopoulos, N., and Ververidis, F.** (2009). Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering* **11**: 355–66.
- Tropf, S., Lanz, T., and Rensing, S.A.** (1994). Evidence That Stilbene Synthases Have Developed from Chalcone Synthases Several Times in the Course of Evolution. *Journal of Molecular Evolution* **38**: 610–618.
- Tseng, S.-H., Lin, S.-M., Chen, J.-C., Su, Y.-H., Huang, H.-Y., Chen, C.-K., Lin, P.-Y., and Chen, Y.** (2004). Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 2190–202.
- Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., and Cellerino, A.** (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current biology : CB* **16**: 296–300.

- Vannozzi, A., Dry, I.B., Fasoli, M., Zenoni, S., and Lucchin, M.** (2012). Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *BMC plant biology* **12**: 130.
- Varbanova, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochoy, R., Yu, F., Jikumaru, Y., Ross, J., Cortes, D., Ma, C.J., Noel, J.P., Mander, L., Shulaev, V., Kamiya, Y., Rodermel, S., Weiss, D., and Pichersky, E.** (2007). Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *The Plant cell* **19**: 32–45.
- Vergara, C., von Baer, D., Mardones, C., Wilkens, A., Wernekinck, K., Damm, A., Macke, S., Gorena, T., and Winterhalter, P.** (2012). Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *Journal of agricultural and food chemistry* **60**: 929–33.
- Verlag, F., Pott, M.B., Pichersky, E., and Piechulla, B.** (2002). Evening specific oscillations of scent emission, SAMT enzyme activity, and SAMT mRNA in flowers of *Stephanotis floribunda*. **934**.
- Versari, a, Parpinello, G.P., Tornielli, G.B., Ferrarini, R., and Giulivo, C.** (2001). Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *Journal of agricultural and food chemistry* **49**: 5531–6.
- Vidgren, J., Svensson, L.A., and Liljas, A.** (1994). Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature* **368**: 354–8.
- Viswanathan, M., Kim, S.K., Berdichevsky, A., and Guarente, L.** (2005). A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Developmental cell* **9**: 605–15.
- Vitrac, X., Krisa, S., Decendit, A., Vercauteren, J., Nühlich, A., Monti, J.-P., Deffieux, G., and Mérillon, J.-M.** (2002). Carbon-14 biolabelling of wine polyphenols in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Journal of biotechnology* **95**: 49–56.
- Vogt, T.** (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant* **3**: 2–20.
- Wang, J., Dudareva, N., Bhakta, S., Raguso, R., and Pichersky, E.** (1997). Floral Scent Production in *Clarkia breweri* (Onagraceae). *Plant physiology* **114**: 213–221.
- Wang, Y., Halls, C., Zhang, J., Matsuno, M., Zhang, Y., and Yu, O.** (2011). Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *Metabolic engineering* **13**: 455–63.
- Wang, Y. and Yu, O.** (2012). Synthetic scaffolds increased resveratrol biosynthesis in engineered yeast cells. *Journal of biotechnology* **157**: 258–60.
- Wang, Z., Zou, J., Cao, K., Hsieh, T.-C., Huang, Y., and Wu, J.M.** (2005). Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *International journal of molecular medicine* **16**: 533–40.
- Watts, K.T., Lee, P.C., and Schmidt-Dannert, C.** (2006). Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *BMC biotechnology* **6**: 22.

- Weigel, D. and Glazebrook, J.** (2006). Transformation of agrobacterium using electroporation. CSH protocols **2006**.
- Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R.** (2000). Protein family review Cytochromes P450 : a success story. 1–9.
- White, F.F., Taylor, B.H., Huffman, G. a, Gordon, M.P., and Nester, E.W.** (1985). Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. Journal of bacteriology **164**: 33–44.
- Winkel, B.S.J.** (2004). Metabolic channeling in plants. Annual review of plant biology **55**: 85–107.
- Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M., and Sinclair, D.** (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. Nature **430**: 686–9.
- Wu, Q., Preisig, C.L., and VanEtten, H.D.** (1997). Isolation of the cDNAs encoding (+)6a-hydroxymaackiain 3-O-methyltransferase, the terminal step for the synthesis of the phytoalexin pisatin in *Pisum sativum*. Plant molecular biology **35**: 551–60.
- Wu, S., Watanabe, N., Mita, S., Dohra, H., Ueda, Y., Shibuya, M., Ebizuka, Y., and Science, F.** (2004). The Key Role of Phloroglucinol O-Methyltransferase in the Biosynthesis of *Rosa chinensis*. Plant physiology **135**: 95–102.
- Xu, R., Song, F., and Zheng, Z.** (2006). OsBISAMT1, a gene encoding S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase, is differentially expressed in rice defense responses. Molecular biology reports **33**: 223–31.
- Yamazaki, Y., Suh, D.-Y., Sitthithaworn, W., Ishiguro, K., Kobayashi, Y., Shibuya, M., Ebizuka, Y., and Sankawa, U.** (2001). Diverse chalcone synthase superfamily enzymes from the most primitive vascular plant, *Psilotum nudum*. Planta **214**: 75–84.
- Ye, Z.H., Kneusel, R.E., Matern, U., and Varner, J.E.** (1994). An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. The Plant cell **6**: 1427–39.
- Yu, C.K.Y., Springob, K., Schmidt, J., Nicholson, R.L., Chu, I.K., Yip, W.K., and Lo, C.** (2005). A Stilbene Synthase Gene ( SbSTS1 ) Is Involved in Host and Nonhost Defense Responses in Sorghum. Plant physiology **138**: 393–401.
- Zhang, Y., Li, S.-Z., Li, J., Pan, X., Cahoon, R.E., Jaworski, J.G., Wang, X., Jez, J.M., Chen, F., and Yu, O.** (2006). Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and Mammalian cells. Journal of the American Chemical Society **128**: 13030–1.
- Zhao, N., Ferrer, J.-L., Ross, J., Guan, J., Yang, Y., Pichersky, E., Noel, J.P., and Chen, F.** (2008). Structural, biochemical, and phylogenetic analyses suggest that indole-3-acetic acid methyltransferase is an evolutionarily ancient member of the SABATH family. Plant physiology **146**: 455–67.
- Zhao, N., Guan, J., Lin, H., and Chen, F.** (2007). Molecular cloning and biochemical characterization of indole-3-acetic acid methyltransferase from poplar. Phytochemistry **68**: 1537–44.

- Zhu, B.T., Ezell, E.L., and Liehr, J.G.** (1994). Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *The Journal of biological chemistry* **269**: 292–9.
- Zhu, Y.J., Agbayani, R., Jackson, M.C., Tang, C.S., and Moore, P.H.** (2004). Expression of the grapevine stilbene synthase gene VST1 in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora*. *Planta* **220**: 241–50.
- Zubieta, C., He, X.Z., Dixon, R. a, and Noel, J.P.** (2001). Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases. *Nature structural biology* **8**: 271–9.



## Résumé

Les stilbènes sont les métabolites de défense majeurs de la vigne, qui sont également connus pour leurs nombreuses propriétés pharmacologiques. Tirant parti du récent séquençage du génome de la vigne, l'objectif de ce travail est de caractériser les familles de gènes impliqués dans la biosynthèse des stilbènes chez la vigne, et de préciser leur rôle dans les défenses contre le mildiou (*Plasmopara viticola*).

La première étape de la biosynthèse des stilbènes est catalysée par la stilbène synthase (STS), pour former le resvératrol. L'analyse détaillée du génome de la vigne a permis d'identifier 48 gènes *STS*, dont 32 gènes potentiellement fonctionnels. La caractérisation fonctionnelle d'une sélection de gènes représentatifs de la diversité de la famille suggère que l'ensemble des 32 gènes *STS* code pour des protéines ayant réellement une activité stilbène synthase. L'analyse évolutive des gènes *STS* montre que la famille est très contrainte, sans trace de néo-fonctionnalisation. La famille des *STS* de la vigne représente donc un exemple unique d'une famille de plus de 30 gènes codant pour des protéines de fonction identique, et la signification biologique de cette expansion est discutée.

Une seconde enzyme importante du métabolisme des stilbènes est la resvératrol O-méthyltransférase (ROMT). La ROMT est impliquée dans la méthylation du resvératrol pour former le ptérostilbène, un composé hautement fongitoxique qui pourrait jouer un rôle important dans les mécanismes de défenses de la vigne. Notre analyse de la famille *ROMT* montre qu'elle est constituée de 17 gènes, dont deux seulement (*VvROMT1* et *VvROMT2*) semblent impliqués dans la synthèse de ptérostilbène. L'expression de ces deux gènes est induite suite à une infection par *P. viticola* au niveau des feuilles de vigne. Deux autres gènes de la famille, *VvROMT12* et *VvROMT13*, sont exprimés constitutivement au niveau des racines, et ne semblent pas répondre au stress. Des analyses métabolomiques sur des plants de *Nicotiana benthamiana* transgéniques exprimant ces deux *ROMT* ainsi que des tests enzymatiques *in vitro* ont été réalisés afin de déterminer la fonction des gènes *ROMT12* et *13*.

L'ensemble de ces résultats fait apparaître une amplification remarquable des gènes impliqués dans la synthèse des stilbènes chez la vigne et ouvrent la voie à l'étude détaillée de la régulation de cette voie importante du métabolisme de défense de la vigne.

Mots clefs : stilbène synthase, resvératrol O-méthyltransférase, ptérostilbène, *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*.

## Abstract

Stilbenes are major defense metabolites in grapevine (*Vitis vinifera*), which are known for their many pharmacological properties. Taking advantage of the recent sequencing of the grapevine genome, the aim of this work is to characterize genes families involved in stilbene biosynthesis, in order to clarify the role of these defense compounds in the interaction with downy mildew (*Plasmopara viticola*).

The first step of stilbene biosynthesis is catalyzed by stilbene synthase (STS), to yield resveratrol. Our annotation of the *STS* gene family identified 48 *STS* genes, including at least 32 potentially functional ones. This unusual expansion of the STS family is original, since it is not found in other stilbene-producing plants. Functional characterization of a selection of STS proteins indicates that all *STS* genes are likely to encode enzymes with STS activity. Evolutionary analysis of the *STS* gene family revealed that *STS* evolution is dominated by purifying selection, with no evidence for neofunctionalization. STS family then represents a unique example a family of more than 30 genes encoding proteins with identical function, and the biological significance of this amplification is discussed.

A second important enzyme in stilbene metabolism is resveratrol O-methyltransferase (ROMT), involved in the methylation of resveratrol to yield pterostilbene. This highly fungitoxic compound is believed to play an important role in grapevine defense metabolism. Our analysis of the *ROMT* family identified 17 genes, two of them only (*VvROMT1* and *VvROMT2*) being involved in pterostilbene biosynthesis. qPCR analyses have shown an induction of the expression of these two genes after an inoculation of *P. viticola* on grapevine leaves. Two others genes, *VvROMT12* and *VvROMT13*, are constitutively expressed in grapevine roots, and do not seem to respond to stress. Metabolomic analysis on transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing these two ROMT genes, together with *in vitro* enzymatic assays, have been performed in order to determine the function of ROMT12 and ROMT 13.

All together, these results show a remarkable amplification of genes involved in stilbene biosynthesis in grapevine. This work paves the way for detailed analyses of the regulation of this important pathway of grapevine defense metabolism.

Keywords: stilbene synthase, resveratrol O-methyltransferase, pterostilbene, *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*.