

THESE
Présentée en vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

Mention : Sciences du Vivant, Géosciences, Sciences de l'Environnement
Option : Sciences des Aliments

**IDENTIFICATION ET CARACTERISATION FONCTIONNELLE D'UN
GENE CODANT UN FACTEUR DE TRANSCRIPTION DE TYPE WRKY
CHEZ LA VIGNE, VvWRKY1.
IMPLICATION DANS LES MECANISMES DE DEFENSE.**

Chloé Marchive

Soutenue publiquement le 9 mars 2006 devant le jury composé de :

P. Coutos-Thévenot, Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
Y. Marco, Directeur de Recherche, INRA, Toulouse	Rapporteur
M. F. Corio-Costet, Directrice de Recherche, INRA, Bordeaux	Examineur
B. Gallois, Directeur de Recherche, CNRS, Université Bordeaux I	Examineur
V. Lauvergeat, MCU, Université Bordeaux I	Co-directrice de thèse
S. Hamdi, Professeur, Université Bordeaux I	Directeur de thèse
M. Barthe, Directrice du service technique du CIVB	Membre invité

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Saïd Hamdi, responsable de l'équipe de "Génomique fonctionnelle et qualité de la baie de raisin" pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je le remercie aussi pour m'avoir confié ce travail de recherche et pour avoir veillé à son bon déroulement tout au long de ces trois années de thèse, toujours avec beaucoup d'intérêt et d'écoute.

Je remercie particulièrement Virginie Lauvergeat pour m'avoir encadrée tout au long de ce travail de thèse. Merci pour le temps qu'elle a consacré à la correction de ce manuscrit et merci pour ses conseils et sa grande disponibilité des derniers moments.

Je remercie chaleureusement Francois Barrieu pour m'avoir encadré au cours de mon DEA et pour avoir su rester présent lors de cette thèse. Merci pour son soutien et ses conseils.

J'adresse mes remerciements à Pierre Coutos-Thévenot et à Yves Marco pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse et d'en être les rapporteurs.

Merci aussi à Marie-France Corio-Costet et à Monsieur Bernard Gallois d'avoir accepté de faire partie du jury.

J'adresse mes remerciements à Murielle Barthe, responsable du service technique du CIVB, pour avoir accepté d'être présente à la soutenance de ma thèse. Je remercie aussi le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux pour leur soutien financier au cours de ces trois ans de thèse.

J'adresse de sincères remerciements tout d'abord aux étudiants du laboratoire, et particulièrement, à Romain, Thilia, et Laurent (déjà loin) pour leur amitié, leur soutien et leur bonne humeur de tous les jours. Merci aussi à Anne, Chloë, Rim et tous les autres thésards ("résidents et intermittents").

Je remercie également les différents membres du laboratoire pour leurs conseils et leur agréable présence et leur soutien quotidien. Je remercie en particulier Céline pour son aide précieuse pour les micro-arrays, Claudine, Linda, Nathalie pour leur gentillesse et leurs conseils, Philippe pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail, et merci à tant d'autres pour leur soutien et leur présence...

Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai travaillé durant ces trois ans, et qui m'ont fait bénéficier de leurs connaissances concernant les interactions plantes/pathogènes : Marie-France Corio-Costet et Jérôme Bouscalt, Frédéric Revers, Dominique Blancard, Harald Keller, Bernard Cailleateau (et l'Institut du Tabac), Pascale Pracros. Merci de votre aide.

Merci à M. Bouzayen et son étudiant Julien Pirello pour m'avoir initiée aux expériences de retard sur gel.

Merci à Nathalie Ollat pour m'avoir régulièrement procuré des boutures de Vigne, à Patricia Coat, Daniel Just, et toutes les autres personnes qui m'ont aidée à résoudre mes problèmes de culture de plantes.

Merci à l'équipe chaleureuse de Poitiers pour leurs conseils, leurs encouragements et leur collaboration à ce travail, tout particulièrement à Pierre, Eric.

Et enfin, je remercie très sincèrement tous mes proches, tout d'abord Eric pour m'avoir supportée et soutenue particulièrement dans les derniers instants, ma soeur et mes parents pour leurs encouragements, les relectures difficiles. Un grand merci à vous quatre, surtout pour tout le reste. Et pour finir, une tendre pensée pour le futur petit gars qui a dû supporter quelques moments d'angoisse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. LA VIGNE	3
A. <i>Le cycle de développement de la Vigne et de la baie de raisin</i>	3
B. <i>Les principales maladies de la Vigne</i>	4
Les champignons pathogènes	5
Les virus de la Vigne.....	6
Les bactéries phytopathogènes	6
Les ravageurs de la Vigne.....	7
C. <i>Les méthodes de lutte contre les agents pathogènes de la Vigne</i>	7
Les pratiques culturales	8
Les méthodes alternatives	9
II. LES INTERACTIONS PLANTE/PATHOGENE	11
A. <i>Peu d'interactions plante-pathogènes aboutissent au développement de la maladie</i>	11
B. <i>La perception de l'interaction plante/pathogène</i>	13
Les éliciteurs généraux.....	13
Le cas particulier de la réaction gène pour gène	14
C. <i>La transduction du signal</i>	14
Les flux ioniques	15
Les espèces réactives d'oxygène	15
La voie de transduction des MAPK.....	16
Les "molécules signal"	17
D. <i>Les molécules de défense</i>	19
Les protéines Pathogenesis Related	19
Les phytoalexines	21
Les autres molécules de défense.....	22
III. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET LA DEFENSE	23
A. <i>Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la défense</i>	23
Les facteurs de transcription répondant à l'éthylène ou ERF.....	24
Les facteurs MYB.....	24
Les protéines TGA bZIP	25
B. <i>Les facteurs de transcription WRKY</i>	25
La structure protéique des trois groupes de protéines WRKY	26
Les caractéristiques de la liaison protéineWRKY/ADN.....	28
Les fonctions biologiques des protéines WRKY	30
MATERIEL ET METHODES	37
I. MATERIEL.....	37
A. <i>Matériel végétal</i>	37
Suspension cellulaires et plants de Vigne	37
Les plants de Tabac	38
<i>Arabidopsis thaliana</i>	38
B. <i>Les souches bactériennes</i>	38
C. <i>Les vecteurs</i>	39
II. METHODES	40
A. <i>Traitement des boutures de Vigne</i>	40
Blessure	41
Traitements chimiques	41
Infection de feuilles détachées par le mildiou	41
B. <i>Techniques classiques de biologie moléculaire</i>	42
Sous-clonage de fragment d'ADN	42
Étude d'expression génique par RT-PCR	45
Southern blot.....	48

C.	<i>Retard sur gel d'électrophorèse</i>	49
	Système d'expression de la protéine : Transcription et traduction <i>in vitro</i>	49
	Contrôle de la synthèse protéique par Western blot.....	50
	Réaction de liaison protéine /ADN.....	51
D.	<i>Analyse de la région promotrice</i>	52
	Clonage de la région promotrice par PCR inverse	52
	Isolement et transformation de protoplastes de Tabac	52
	Dosage de l'activité glucuronidase par fluorimétrie	53
	Isolement de protoplastes de Vigne	54
E.	<i>Transformation stable des plantes</i>	54
	Transformation de la souche d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	54
	Transformation de disques de feuilles de Tabac.....	54
	Transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par immersion des inflorescences	55
	Transformation des cellules embryogènes de Vigne 41B et régénération des plantules de Vigne.....	56
F.	<i>Tests de sensibilité des Tabacs transformés vis-à-vis d'agents pathogènes</i>	57
	<i>Botrytis cinerea</i>	57
	<i>Pythium</i>	57
	Tests réalisées à l'Institut du Tabac de Bergerac	58
G.	<i>Tests de sensibilité des plantes d'A. thaliana transformés vis-à-vis d'agents pathogènes</i>	59
	Virus	59
	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	60
	Bactéries	60
H.	<i>Tests de sensibilité des plantes de Vigne transformés vis-à-vis du mildiou</i>	61
I.	<i>Analyse du transcriptome des Vignes transformées</i>	62
	Les puces à ADN utilisées	62
	Préparation des ARN totaux	62
	Couplage aux fluorophores	62
	Dosage des ADNc marqués	63
	Hybridation des sondes sur les puces à ADN	63
	Révélation	64
	Analyse bioinformatique.....	64

PREMIERE PARTIE : IDENTIFICATION D'UN ADNC CODANT UN FACTEUR DE TRANSCRIPTION DE TYPE WRKY CHEZ LA VIGNE, VVWRKY1 ET CARACTERISATION FONCTIONNELLE DANS DES SYSTEMES HETEROLOGUES 66

I.	IDENTIFICATION D'UN ADNC CODANT UN FACTEUR DE TRANSCRIPTION VvWRKY1 ET ANALYSE FONCTIONNELLE CHEZ LE TABAC.....	68
A.	<i>Article : La sur-expression d'un ADNc codant un facteur de transcription VvWRKY1 induit une plus grande tolérance des Tabacs vis-à-vis des champignons</i>	68
B.	<i>Travaux complémentaires</i>	91
	Expression de VvWRKY1 en réponse à un traitement des boutures de Vigne par l'ergostérol	91
	Détermination du nombre de copies du transgène dans les Tabacs transgéniques par southern blot	92
	Evolution de l'expression des gènes PR dans les Tabacs transgéniques au cours des générations	92
	Tests de sensibilité des Tabacs transgéniques à <i>Botrytis cinerea</i>	93
C.	<i>Discussion</i>	94
II.	ANALYSE FONCTIONNELLE DE VvWRKY1 PAR SUR-EXPRESSION CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA	102
A.	<i>Transformation et sélection des plantes</i>	102
B.	<i>Analyse moléculaire des plantes transformées</i>	102
C.	<i>Tests biologiques</i>	104
D.	<i>Discussion</i>	105
III.	DISCUSSION GENERALE DE LA PREMIERE PARTIE	107

DEUXIEME PARTIE : ANALYSE FONCTIONNELLE DE VVWRKY1 PAR SUR-EXPRESSION CHEZ LA VIGNE..... 110

I.	TRANSFORMATION DE LA VIGNE ET SELECTION DES LIGNEES TRANSGENIQUES.....	111
A.	<i>Transformation à partir de cellules embryogènes</i>	111
B.	<i>Analyses moléculaires des Vignes transformées</i>	111
II.	ETUDE DE LA SENSIBILITE DES VIGNES TRANSGENIQUES VIS-A-VIS DU MILDIU	112
III.	ANALYSE GLOBALE COMPAREE DU TRANSCRIPTOME DES VIGNES TRANSGENIQUES	114

IV.	DISCUSSION	118
TROISIEME PARTIE : IDENTIFICATION ET ETUDE DE LA FONCTIONNALITE DE LA REGION		
PROMOTRICE DE VVWRKYI..... 124		
I.	CLONAGE DU PROMOTEUR PAR PCR INVERSE	124
II.	EXPRESSION TRANSITOIRE DANS DES PROTOPLASTES DE TABAC	126
A.	<i>Constructions plasmidiques utilisées</i>	126
B.	<i>Transformation des protoplastes de Tabacs</i>	127
C.	<i>Mesure d'activité β-glucuronidase</i>	128
III.	EXPRESSION DANS DES PROTOPLASTES DE PERSIL. EFFET D'UNE PREPARATION ELICITRICE PMG	128
IV.	ESSAI PRELIMINAIRE D'EXPRESSION TRANSITOIRE DANS DES PROTOPLASTES DE VIGNE	129
V.	DISCUSSION	130
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 134		
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 138		

LISTE DES ABREVIATIONS

µg	microgramme
µM	micromolaire
°C	degré Celsius
µl	microlitre
AA	acides aminés
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ANA	acide naphtalénique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ATP	adénosine triphosphate
b, pb, kb	base, paires de bases, kilo base
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphate, Na ₂
BEt	bromure d'éthidium
BSA	albumine de sérum bovin
CaMV	virus de la mosaïque du chou-fleur
cpm	coup par minute
CTAB	bromure de cétyltriméthyl d'ammonium
Cv	cultivar
DEPC	diéthylpyrocarbonate
DMF	diméthyl formamide
DNase	désoxyribonucléase
dNTP	désoxynucléoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
GUS	β-D-Glucuronidase
HEPES	acide N-2 Hydroéthylpipérazine N'2 éthane sulfonique sodique
HR	réponse d'hypersensibilité
IAA	alcool isoamylique
IPTG	isopropyl-β-thiogalactopyranoside
j	jour
JA	acide jasmonique
Kan	kanamycine
kD	kilodalton
l, ml, µl	litre, millilitre, microlitre
LAR	résistance locale acquise
LB	milieu de culture Luria Broth
M	molaire
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MilliQ	eau ultrapure
mM	millimolaire
MS	milieu Murashige et Skoog
MU	4-méthyl umbelliférone
MUG	4-méthyl umbelliféryl glucuronide
NBT	nitro-bleu de tétrazolium
nm	nanomètre
NOA	acide oxynaphtalénique
NOS	nopaline synthase
NptII	gène codant la néomycine phosphotransférase II
p/v	poids/volume
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PEG	polyéthylène glycol

Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pmol	picomoles
PR	pathogenesis related protein
PSA	persulfate d'ammonium
RNase	ribonucléase
ROS	espèces réactives d'oxygène
rpm	rotation par minute
s	seconde
SA	acide salicylique
SAR	résistance systémique acquise
SDS	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	électrophorèse dénaturante (SDS) sur gel de polyacrylamide
T-ADN	acide désoxyribonucléique de transfert
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS-T	tris borate sodium tween 20
TE	tris EDTA
TEMED	N, N, N', N' tétraméthyl-éthylène diamine
Tm	température de fusion
TMV	virus de la mosaïque du tabac
Tris	tris-(hydroxyméthyl) aminométhane
U	unités
UV	ultra-violet
v/v	volume/volume
V	volt
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D galactoside

Introduction

La Vigne est l'espèce végétale la plus cultivée dans le monde. Son importance économique considérable se situe au niveau de la production des fruits, le raisin, commercialisé comme raisin de table, jus de fruit, mais surtout utilisé pour la production de vin. La viticulture occupe environ 8 millions d'hectares dans le monde et permet de produire 300 millions d'hectolitres de vin. Il existe également d'autres utilisations des produits issus de la culture de la Vigne : la production de dérivés de la vinification (moûts, alcools de distillation, tartres), de boissons à base de raisin, de dérivés alimentaires (huile de pépins de raisin), des produits cosmétiques, ...

La majorité des Vignes cultivées dans le monde est regroupée en Europe (62,7 % du vignoble mondial) et notamment en France, Italie et en Espagne.

La Vigne en France occupe 3,3 % des surfaces agricoles utilisées mais le vin représente 12% de la valeur de la production agricole, ce qui le place en deuxième position derrière la filière du lait. Sa contribution à la richesse nationale est essentielle.

La Vigne est constamment soumise à de nombreux stress qu'ils soient liés aux conditions climatiques, aux pratiques culturales (puisque'il est important de maîtriser la vigueur de la Vigne pour améliorer sa qualité), à des carences en minéraux ou à des agents pathogènes.

Les contraintes phytosanitaires menacent continuellement les vignobles et conduisent les viticulteurs à utiliser de larges quantités de produits chimiques. Les nombreux traitements préventifs font de cette culture la première consommatrice de produits phytosanitaires en France (environ 48 % de la totalité des produits utilisés pour moins de 4% des surfaces agricoles).

Aussi, les recherches se portent sur l'identification et la mise en œuvre de nouvelles stratégies de lutte contre les pathogènes, alternatives aux traitements phytosanitaires. Malgré le développement grandissant des travaux de recherche concernant la Vigne, ses mécanismes de défense demeurent encore aujourd'hui mal connus. Il faut rappeler que cette espèce ligneuse pérenne est particulièrement difficile à étudier et que son cycle de développement est très lent, ce qui ralentit la progression de la recherche. Toutefois, les techniques tendent à s'adapter de plus en plus rapidement à de nombreux organismes et notamment à la Vigne.

La thématique de mon travail de recherche s'inscrit dans un projet plus large, qui est de mieux comprendre les mécanismes régissant la défense de la Vigne dans le but final d'identifier des marqueurs moléculaires de la résistance à différentes maladies.

Les mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes sont complexes et dépendent souvent de la spécificité de l'interaction plante/pathogène. Cependant, de façon générale, la mise en place de ces défenses fait intervenir trois phases : reconnaissance du pathogène, signalisation et synthèse des molécules de défense.

Les facteurs de transcription constituent une étape-clé entre la fin des voies de signalisation et l'activation des gènes de défense. A ce titre, notre choix s'est donc porté sur l'étude d'une famille de facteurs de transcription, les protéines WRKY. Ces protéines, encore peu étudiées, semblent en effet jouer un rôle important dans la régulation des mécanismes de défense des plantes.

Mon travail de thèse s'est donc focalisé sur l'étude d'un facteur de transcription de type WRKY et son rôle dans la défense de la Vigne.

Après avoir synthétisé les principales données bibliographiques concernant la Vigne et ses maladies, les mécanismes de défense des plantes et les protéines WRKY, une première partie regroupe les travaux d'identification et de caractérisation moléculaire du gène codant la protéine VvWRKY1 ainsi que les analyses fonctionnelles réalisées par sur-expression de cet ADNc dans deux systèmes hétérologues (le Tabac et *Arabidopsis thaliana*). Une partie des résultats de ce chapitre est présentée sous la forme d'un article. La deuxième partie est consacrée à la production et l'analyse de plantes de Vigne sur-exprimant VvWRKY1. Enfin, dans la dernière partie, nous nous attachons à exposer les travaux préliminaires concernant l'étude de la région promotrice de ce gène.

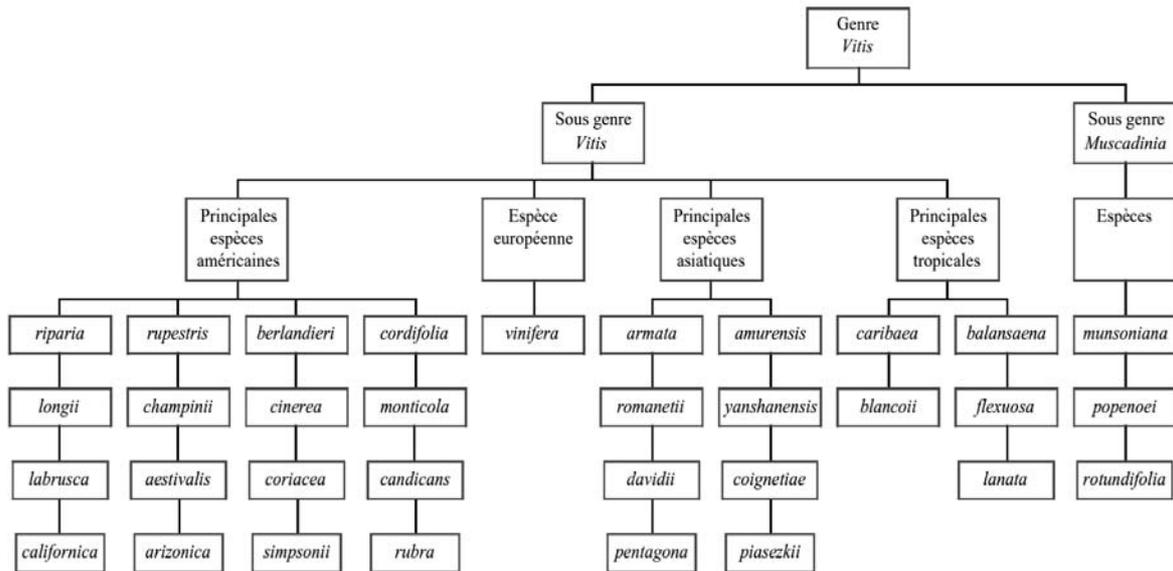


Figure 1 : diagramme représentant la classification systématique de l'espèce *Vitis vinifera* parmi les Vitacées.

La Vigne, organisme appartenant à la famille des Vitacées, de l'ordre des Rhamnales comprend 19 genres dont le genre *Vitis* (Huglin P., 1986, Galet P., 1993). Celui-ci est sous-divisé en 2 sous-genres : *Muscadinia* (2n=40) et *Vitis*, anciennement appelé *EuVitis* (2n=38) (**figure 1**). La plupart des espèces cultivées fait partie des *Vitis* et est répartie en 3 groupes selon leur origine et leur répartition géographique : Asiatique, Américaine et Eurasiatique.

La Vigne Asiatique comprend une dizaine d'espèces (dont *V. amurensis* qui est très résistante au mildiou et au froid mais sensible au Phylloxera).

La Vigne Américaine rassemble une vingtaine d'espèces qui présentent généralement une bonne résistance aux pathogènes, notamment au puceron Phylloxera, mais n'ont que peu d'intérêt d'un point de vue oenologique. Elles sont de ce fait, utilisées comme porte-greffe ou croisées avec *V. vinifera* pour produire des hybrides. On peut citer les espèces *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. rupestris* et *V. berlandieri* pour leur utilisation viticole.

Le groupe Eurasiatique ne comporte qu'une seule espèce *Vitis vinifera* Linné mais qui regroupe des milliers de variétés ou cépages. C'est cette espèce qui constitue la quasi-totalité des vignobles français (*Vitis vinifera* L. sp. *sativa*). Toutefois, depuis l'invasion du Phylloxera (mais aussi du mildiou) au XIX^{ème} siècle, les vignobles d'Europe occidentale ont été entièrement reconstitués par des cépages européens greffés (le greffon) sur des plants américains (le porte-greffe).

La Vigne sauvage est une plante dioïque mais les croisements ont permis de créer des espèces cultivées majoritairement hermaphrodites.

La Vigne est une plante ligneuse grimpante, à souche pérenne.

Le cycle végétatif de la Vigne débute au printemps par le débourrement, lorsque les bourgeons commencent à pousser. Vient ensuite la feuillaison, lors de laquelle les pampres et les feuilles se développent. Cette croissance ralentit à l'apparition des grappes sur les rameaux.

La **floraison** et la **fécondation** ont lieu environ deux mois après le débourrement. La pollinisation est généralement autogame. A partir de l'instant où il est formé (au stade de la

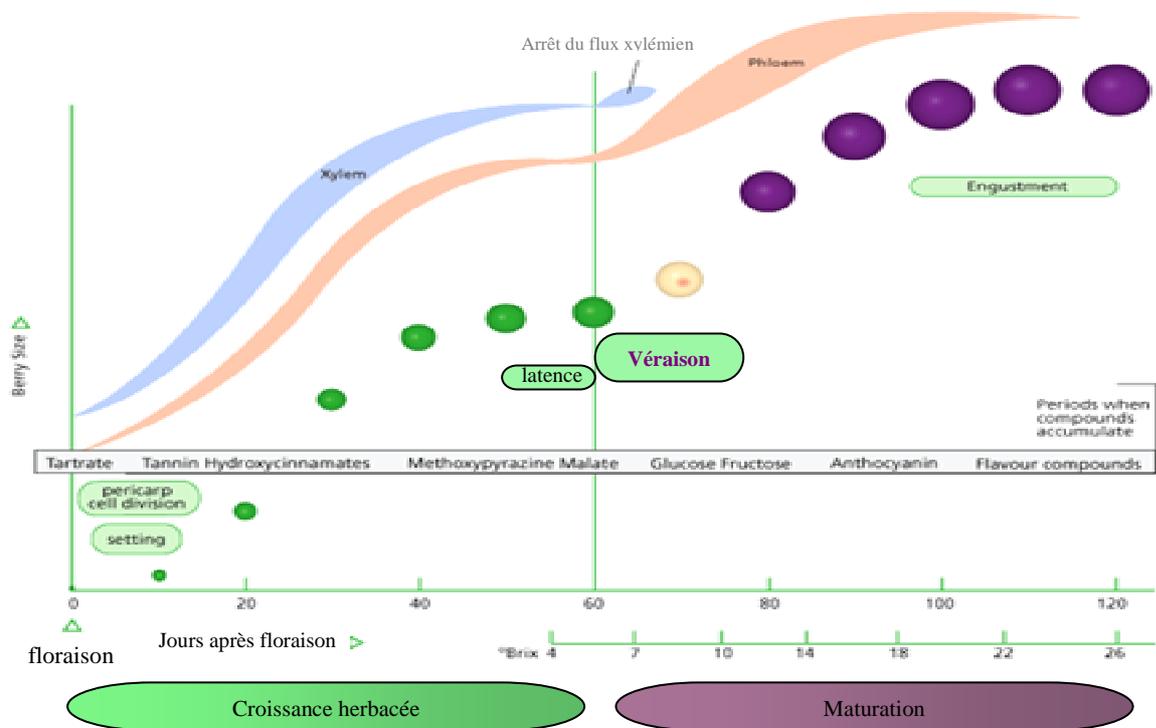


Figure 2 : Schéma représentant le développement de la baie de raisin de la floraison jusqu'à la maturité (d'après le site <http://www.practicalwinery.com/JulyAugust02.julaug02p14.htm>). L'évolution de la taille de la baie de raisin est décrite au cours du temps. L'indice Brix correspond à une évaluation de l'alcool que pourraient produire les baies au cours de leur maturation ; elle est fonction de la concentration en sucres de la baie de raisin. Les différents composés qui s'accumulent au cours du développement de la baie sont indiqués. Les flux xylémien et phloémien sont également représentés.

nouaison), le fruit ne cessera de grossir. La **baie de raisin** est caractérisée par une croissance en double sigmoïde (**figure 2**), divisée en deux phases principales. La première période dite de **croissance herbacée** est due à des phénomènes de divisions et de grandissement cellulaires. Elle s'étale sur environ 60 jours. La baie de raisin subit une très forte augmentation de taille qui est corrélée à une accumulation d'eau et d'acides organiques (notamment des acides tartriques et maliques) dans la vacuole des cellules. La concentration en sucres reste très faible.

Au bout de plusieurs semaines de croissance, un ralentissement est observé ; il correspond à la formation des graines (pépins). Ce phénomène dure quelques jours et précède la **véraison**. C'est ainsi qu'est désignée la courte période pendant laquelle les baies de raisin changent de couleur (phénomène lié à l'accumulation de pigments). Cette période transitoire est occupée par de très nombreux bouleversements métaboliques. En plus du ralentissement de croissance, du changement de couleur, elle s'accompagne également d'un ramollissement de la baie et de multiples modifications au niveau de la constitution et de la physiologie de la baie de raisin (Robinson *et al.*, 2000) qui se poursuivront dans la seconde phase de croissance.

Cette deuxième période, appelée phase de **maturation**, résulte exclusivement de grandissement cellulaire et dure environ 40 jours. Les changements métaboliques engagés à la véraison permettent l'accumulation progressive de sucres, de composés phénoliques (pigments et tanins), de composés aromatiques et de précurseurs aromatiques et de protéines anti-fongiques (notamment de type PR, Pathogenesis Related) (Coombe, 1992). Parallèlement, les acides organiques sont dégradés (Ollat, 1997). De nombreux gènes présentent de nettes modifications de leurs profils d'expression dès la véraison traduisant le plus souvent une accumulation des transcrits (Davies et Robinson, 2000).

Tous ces composés détermineront la qualité finale du fruit et éventuellement du vin.

L'époque de maturité varie en fonction des cépages et des conditions environnementales que la Vigne a subi tout au long de l'année. Viennent alors les vendanges puis la chute des feuilles qui marque le début de la période de repos végétatif de la Vigne.

De nombreux parasites peuvent s'attaquer à la Vigne et peuvent causer de nombreux dégâts. Certaines maladies font peser une menace constante sur les vignobles et font l'objet de très nombreux traitements phytosanitaires (Dubos, 2002).



Botrytis cinerea



Mildiou



Oïdium

Figure 3 : Photos des symptômes sur grappes de raisin provoqués par les principales maladies fongiques de la Vigne : infection par *Botrytis cinerea* (photo de R. Lafon, INRA), par le mildiou de la Vigne (*Plasmopara viticola*), et par l'oïdium de la Vigne (*Erysiphe necator*), photos BASF). D'après le site <http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYP3/index.html>.

Les champignons pathogènes

Ils représentent la majorité des agents pathogènes de la Vigne. Les maladies fongiques peuvent être classées en trois groupes selon les organes infectés. Les principales d'entre elles sont citées ci-après.

Les maladies du feuillage et des grappes

Botrytis cinerea est l'agent pathogène responsable de la pourriture grise de la Vigne. C'est un champignon nécrotrophe très polyphage qui appartient aux Deutéromycota. Ce champignon provoque des pertes qualitatives et quantitatives importantes dans les vignobles. La période de sensibilité des baies à *Botrytis cinerea* se situe de la véraison à la maturité mais les jeunes organes (jeunes feuilles et inflorescences) peuvent être attaqués très précocement (**figure 3**).

Le mildiou de la Vigne, ***Plasmopara viticola***, est un champignon biotrophe appartenant au phylum des Oomycota (*Peronosporaceae*). Cette maladie, présente dans les zones tempérées, a été introduite en France depuis les Etats-Unis en 1878. Elle peut attaquer la face inférieure des feuilles (dès qu'une feuille est étalée) et les grappes (de la floraison à la nouaison) (**figure 3**).

L'oïdium de la Vigne, ***Erysiphe necator***, est également un champignon biotrophe appartenant au phylum des Ascomycota ; c'est un parasite épiphyte, qui ne se développe qu'en surface des cellules épidermiques. C'est la maladie de la Vigne la plus répandue dans le monde, elle est arrivée en Europe en 1845. Tous les organes herbacés sont sensibles à ce champignon et donc les baies, de la nouaison à la véraison (**figure 3**).

L'essentiel des traitements phytosanitaires appliqués au vignoble concerne l'oïdium et le mildiou.

On peut également citer le **Black Rot** dont l'agent causal est *Guignardia bidwelli*. Cette maladie provient elle aussi des Etats-Unis (1885). Elle se développe préférentiellement sur les jeunes organes (jeunes feuilles, rameaux, vrilles et baies au stade petits pois).

Les maladies du bois

Les maladies du bois touchent la charpente de la souche et conduisent à plus ou moins long terme à la mort du cep mais ont des répercussions rapides sur la production, en détruisant les grappe et en dégradant le feuillage.

L'Esca est une maladie très ancienne causée par de nombreux champignons qui interviennent successivement pour dégrader le bois (parmi eux : *Phaemoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Eutypa lata*) (**figure4**).



Esca



Eutypose

Figure 4 : Photos des symptômes provoqués par les principales maladies du bois de la Vigne : l'esca (causée par différents champignons) et l'eutypiose (*Eutypa lata*), (photos I. Tomaz, MA, d'après <http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYP3/index.html>).

L'Eutypiose est une maladie du bois dont l'agent responsable est le champignon *Eutypa lata*, appartenant au phylum des Ascomycota. Elle a été tardivement identifiée (1974) mais est présente dans tous les vignobles du monde (**figure 4**).

Le Black Dead Arm, maladie causée par *Botryosphaeria spp.* touche essentiellement des jeunes Vignes. Elle peut affecter jusqu'à 25 % des ceps d'une parcelle.

Ces maladies peuvent être développées sur une très large proportion de ceps selon les vignobles et les parcelles. La progression des maladies du bois se fait d'autant plus ressentir comme une menace par les viticulteurs que depuis peu de temps, l'utilisation de l'arsénite de sodium est interdite. Ce produit était le seul capable de lutter contre ces maladies. Aujourd'hui, la seule solution est la prophylaxie qui a pour but d'éliminer les sources d'inoculum, donc tous les bois morts (ceps, sarments).

Les maladies des parties souterraines

On peut citer **les pourridiés** (causés par *Dematophora* ou *Armillaria mellea*), qui affectent les parties souterraines de la plupart des plantes ligneuses et la maladie du **piéd noir** (*Cylindrocarpon destructans*) qui affecte les jeunes plantations, provoquant leur dépérissement.

Pour lutter contre ces maladies, on ne dispose que des mesures prophylactiques qui pourront être complétées par une désinfection du sol par des produits chimiques.

Les virus de la Vigne

La maladie du **court-noué** est une des maladies virales les plus dommageables pour la Vigne. L'agent causal majeur est le Grapevine FanLeaf Virus (GFLV) mais en fait une douzaine de virus qui appartiennent au genre des *Nepovirus* sont responsables de la maladie. La transmission peut se faire par greffage mais surtout par les nématodes *Xiphinema index*. Il n'existe pas de méthode de lutte directe contre ce virus, seul la prophylaxie peut être appliquée.

Les bactéries phytopathogènes

La **flavescence dorée** est une maladie liée à un phytoplasme. Cet organisme pathogène est en fait un mollicute (bactérie privée de paroi et non autonome). Cet agent qui se développe dans le phloème de la Vigne est transmis par un insecte, la cicadelle *Scaphoideus titanus* (inféodée à la Vigne). Cette maladie est particulièrement développée dans le sud de la France.

Elle est dite de quarantaine puisque le seul moyen de lutte est d'arracher les plantes infectées, ceci étant obligatoire et soumis à une sévère réglementation.

La bactérie *Xylella fastidiosa* est l'agent responsable de la maladie de Pierce de la Vigne, très développée aux Etats-Unis. Des représentants de cette bactérie infectent également de nombreuses autres espèces (dont de nombreux arbres fruitiers). Les infections sont souvent latentes ; la bactérie est détectée dans le xylème de plantes n'affichant aucun symptôme.

La transmission peut se faire par la greffe ou par l'intermédiaire d'outils contaminés mais principalement par l'insecte vecteur qui est un hémiptère cicadellidé, *Homalodisca coagulata*.

Il n'existe pas de moyen de lutte chimique contre ces deux pathogènes. Seule la technique préventive de thermothérapie consistant en un trempage des bois de greffe dans de l'eau chaude (40-50°C) permet d'éliminer les souches bactériennes responsables de ces deux maladies.

Les ravageurs de la Vigne

Les ravageurs attaquent tous les organes de la plante tout au long de l'année.

Ils peuvent être :

- des nématodes (animal vecteur du court noué) ou des homoptères (puceron, *Phylloxera vastatrix*) qui attaquent les racines et le bois,
- des acariens (les principaux ravageurs) ou des cicadelles qui attaquent les feuilles,
- des lépidoptères dont les tordeuses de la grappe (eudémis et cochylys) qui s'attaquent aux fleurs et aux baies.

L'**Eudémis** (*Lobesia botrana*) est un papillon dont les chenilles se développent dans les vignobles européens principalement. Les morsures causées par ces dernières provoquent des dégâts sur les baies mais favorisent aussi l'installation de *Botrytis cinerea*. Une méthode de lutte par confusion sexuelle a été développée.

La lutte chimique reste le principal moyen de lutte des viticulteurs contre les maladies de la Vigne. Toutefois, l'utilisation de pesticides présente de nombreux risques significatifs:

- sur la santé des viticulteurs et des travailleurs agricoles (la viticulture est le deuxième secteur le plus exposé en France à ce facteur de risque),
- sur la santé des consommateurs (bien que les résidus de pesticides détectés dans les raisins et dans les vins restent faibles),

-sur la qualité des eaux (les eaux souterraines ou superficielles dans lesquelles sont détectées de fortes quantités d'herbicides et de pesticides correspondent toutes à des bassins où la Vigne est fortement représentée),

-l'apparition de souches pathogènes résistantes (Leroux *et al.* 1999; Leroux *et al.* 2002). Effectivement, les champignons peuvent développer des résistances aux fongicides dont les mécanismes peuvent être liés à la réduction de la perméabilité de leur membrane plasmique ou à la mise en place de processus de détoxification du produit actif.

Aussi, l'évolution des pratiques voit se développer des méthodes de lutte chimique raisonnée et intégrée. Le recours à la **lutte chimique raisonnée** permet une certaine limitation des traitements phytosanitaires basée sur le choix de la date du premier traitement, des produits utilisés et de la cadence d'application. **La lutte intégrée** est une approche plus durable qui combine les moyens biologiques, agricoles, physiques et chimiques pour combattre les organismes nuisibles tout en minimisant les risques pour la santé et l'environnement.

De plus, de nombreux efforts doivent être faits par les viticulteurs de manière à maîtriser et gérer les effluents issus de leur activité.

Toutefois, d'autres méthodes complémentaires décrites ci-dessous peuvent être mises en oeuvre pour lutter contre les agents pathogènes de la Vigne.

Les pratiques culturelles

De manière à diminuer les risques d'attaques de la Vigne par des agents pathogènes, une méthode traditionnelle, relativement simple dans son principe et sans danger pour l'environnement ou la santé humaine, consiste à adapter et à bien gérer les pratiques de culture de la Vigne. En effet, la prophylaxie vise à limiter la présence d'inoculum et la réceptivité de la plante aux parasites. Elle implique la gestion du vignoble et de son environnement direct mais aussi la maîtrise de la vigueur de la Vigne :

- par l'élimination totale de tous les bois morts (ceps arrachés, sarments).
- par le contrôle de la fertilisation en azote, des apports minéraux et en pratiquant l'enherbement.
- par la limitation de l'entassement du végétal et l'aération des grappes qui participent aussi à la prévention des maladies.
- par la limitation des plaies de taille qui permet d'éviter la pénétration des champignons par ces portes d'entrée.

Le traitement par la chaleur (40-60°C) des sols, outils, bois de greffe constitue un moyen de prévention et de lutte efficace contre les nématodes, la plupart des champignons et certaines bactéries.

Les méthodes alternatives

Les méthodes de lutte alternative suscitent de plus en plus d'intérêt car elles ont l'avantage de limiter l'utilisation de produits chimiques nocifs pour l'environnement (et de coût très élevé) ainsi que l'apparition de souches de pathogènes résistantes à ces molécules actives.

La lutte biologique

La protection conférée par un agent biologique peut être basée sur un ou plusieurs mécanismes d'action :

- la compétition (pour des éléments nutritifs, au niveau de l'espace)
- le parasitisme, la sécrétion de substances antibiotiques (antibiose) ou la diminution d'agressivité du pathogène
- l'induction de la résistance de la plante.

Quelques exemples sont présentés ci-dessous.

Les typhlodromes sont des acariens prédateurs, capables de rester sur la Vigne toute l'année, qui s'attaquent aux acariens ravageurs. Ils sont très polyphages et donc utilisés sur de nombreuses cultures. Ils permettent d'éviter le recours à des acaricides qui laisseraient vacantes des niches écologiques, rapidement repeuplées par d'autres organismes.

De nombreux micro-organismes ont été mis en évidence pour leur capacité à contrôler l'activité pathogène de *Botrytis cinerea*, [des bactéries du genre *Bacillus* (Paul *et al.*, 1997), des espèces du champignon *Pythium* (Paul, 2003); une levure, *Pichia membranifaciens*, (Masih *et al.*, 2002)]. Des travaux rapportent que le mycoparasite *Trichoderma hazianum*, par son action d'hyperparasitisme, est capable de produire un antibiotique volatile, un fongistatique qui empêche le développement du mycélium et des sclérotés de *Botrytis* mais ne tue pas le champignon (Dubos *et al.*, 1992). C'est un exemple d'antibiose.

Ces méthodes de lutte biologique ne sont utilisées que de façon expérimentale ; elles ne sont pas encore homologuées pour être appliquées dans les vignobles.

Pour lutter contre l'oïdium, il existe un champignon antagoniste *Ampelomyces quisqualis*, dont l'utilisation est actuellement autorisée aux Etats-Unis.

L'efficacité de la lutte biologique reste relative et doit encore être développée mais peut être utile combinée aux autres méthodes.

La confusion sexuelle

La confusion sexuelle des tordeuses de la grappe (notamment de l'Eudémis de la Vigne) est une technique de lutte développée par l'INRA (Stockel, 1977). Son principe est d'empêcher le mâle de trouver la femelle, perturbant ainsi l'accouplement des tordeuses et limitant les pontes. Elle consiste à propager dans tout le vignoble une phéromone synthétique au moyen de simples diffuseurs (Stockel et Lecharpentier, 1993).

La stimulation des défenses naturelles de la plante et biotechnologies

Les stilbènes (dont le resvératrol) sont des composés dérivés de la voie des composés phénoliques qui présentent des activités anti-fongiques (Hoos et Blaich, 1990). Il a été montré que les espèces de *Vitis vinifera* résistantes à *Plasmopara viticola* produisent 5 fois plus de stilbènes que les espèces sensibles (Derck et Creasy, 1989). La production de ces molécules peut être induite par un traitement au méthyljasmonate de suspensions cellulaires de Vigne (Krisa *et al.*, 1999).

Les propriétés de ces composés ont permis de produire des Vignes transgéniques plus résistantes aux attaques de *Botrytis cinerea* (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001). Ces plantes expriment le gène de la stilbène synthase *VstI* placé sous contrôle d'un promoteur inductible par les agents pathogènes (promoteur du gène PR10). Suite à une attaque par *Botrytis cinerea*, ces plantes transformées accumulent beaucoup plus de resvératrol dans les feuilles que les plantes témoins et présentent des niveaux de tolérance vis-à-vis de *Botrytis* également plus élevés : 40 % des feuilles ne semblent pas permettre le développement du mycélium alors que 100 % des feuilles non transformées sont contaminées.

Comme le montre cette étude, la technique de transgénèse pourrait sans doute apporter des solutions contre les maladies de la Vigne, et notamment pour celles dont il n'existe aucun traitement. Elle fait partie des méthodes de lutte alternatives qui permet de limiter l'utilisation d'intrants au vignoble. Mais sans doute par manque de connaissance sur les répercussions possibles sur l'environnement, cette technique n'est pas encore autorisée ni acceptée par l'opinion publique.

Une molécule dite élicitrice, le β -(1,3)-glucane, qui a été homologuée en 2003 et qui est commercialisée par la société Goemar sous le nom de iodus 40, permet une stimulation des

défenses naturelles du blé. Ce composé, extrait à partir d'une algue brune *Laminaria digitata*, possède une forte activité élicitrice. De telles molécules pourraient être également efficaces sur la Vigne contre *Botrytis* et le mildiou et sont actuellement étudiées par plusieurs laboratoires (Aziz *et al.*, 2003, Aziz *et al.*, 2004).

De plus, une autre molécule, analogue de l'acide salicylique, (le benzothiadiazole ou BTH) est commercialisée sous le nom de BION par Syngenta en association avec un fongicide. Elle est utilisée sur les cultures de blé, de salade, d'épinard ou de radis et permet notamment une protection contre le mildiou du Tabac (Perez *et al.*, 2003).

Beaucoup d'espoirs reposent également sur une molécule de synthèse : le BABA (l'acide β -aminobutyrique). Cette molécule stimule les défenses naturelles de la plante en induisant un dépôt de callose (Ton et Mauch-Mani, 2004) et de lignine dans les cellules et permet de limiter l'infection par des champignons comme le mildiou (Cohen *et al.*, 1999).

Des molécules déjà commercialisées pour la Vigne exerce une telle activité d'élicitation. Elles sont vendues comme fongicides ou fertilisants. On peut citer le phosphonate de potassium et le foséthyl d'aluminium utilisés principalement contre les Oomycètes.

Les éliciteurs constituent donc des molécules très intéressantes pour lutter contre les champignons pathogènes ou les bactéries mais de nombreux problèmes restent encore à régler pour parvenir à leur difficile homologation avant la mise sur le marché (problèmes de reproductibilité, activité fongicide partielle, tests très longs et coûteux).

Dans leur environnement, les plantes sont constamment soumises à des attaques par des agents pathogènes très variés (champignon, bactéries, virus,...). Toutefois, la maladie est une situation d'exception. En effet, au cours de leur évolution, et pour faire face à la multiplication des pathogènes, les plantes ont mis en place des réactions de défense permettant à la plupart d'entre elles de lutter contre les infections de très nombreux pathogènes. Ces défenses peuvent être :

- **passives** : barrières physiques limitant l'entrée ou la progression du pathogène dans la plante (cuticule, cutine, parois...) ou molécules toxiques stockées dans la vacuole des cellules cibles [saponines (Bowyer *et al.*, 1995), glucosinolates (Botti *et al.*, 1995)...]. Pour être infectieux, le pathogène doit pouvoir violer ces défenses passives de l'hôte.
- **actives** : déclenchées par l'attaque du pathogène.

Si ces dernières provoquent la mort du pathogène ou empêchent son développement en le confinant au site d'infection, on parle de résistance spécifique (dépendant d'une interaction gène pour gène) ou non spécifique.

Si le pathogène ne déclenche pas les réponses actives de la plante ou s'il réussit à les contourner, deux situations peuvent être observées : les plantes peuvent être sensibles à cet agent pathogène et donc exprimer des symptômes ou alors elles tolèrent le parasite sans que leurs fonctions physiologiques n'en soient perturbées et sont dites tolérantes.

Lors de la résistance de la plante, plusieurs types de réponses peuvent être mis en place. Elles se différencient par les mécanismes mis en jeu mais surtout par la rapidité et la localisation selon lesquelles elles se développent. On peut citer :

-**l'hypersensibilité (ou HR)**, qui est un phénomène de résistance locale aboutissant au confinement rapide de l'agent pathogène (en quelques heures) par déclenchement de nécroses cellulaires sur le site de l'infection (Goodman et Novacky, 1994). La mort cellulaire qui peut être plus ou moins étendue circonscrit le parasite et limite donc sa propagation dans la plante. La réaction hypersensible est très similaire au processus de mort cellulaire programmée (PCD ou apoptose) des animaux (Lam *et al.*, 2001).

-des **résistances induites locales ou systémiques**.

Suite à la mise en place de la réponse d'hypersensibilité, diverses modifications métaboliques se déroulent de façon locale, autour du site d'infection primaire, pour circonscire le pathogène. Cette réponse locale est induite par des signaux provenant des cellules infectées et va induire une résistance dans les cellules proximales non attaquées. Cette réaction constitue la **résistance locale acquise (ou LAR)**.

Lorsque des mécanismes similaires à ceux développés lors de la LAR sont mis en place dans d'autres parties de la plante éloignées du site d'infection primaire, on parle alors de **résistance acquise systémique (ou SAR)**. Ce phénomène d'induction des mécanismes de résistance d'une plante augmente sa capacité à se défendre contre une large palette d'agents pathogènes dans des tissus distants.

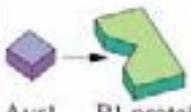
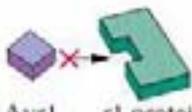
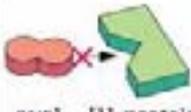
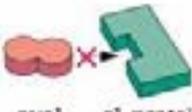
Pathogen genotype	Host plant genotype	
	<i>R1</i>	<i>r1</i>
<i>Avr1</i>	 Avr1 R1 protein No disease (Plant and pathogen are incompatible.)	 Avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible.)
<i>avr1</i>	 avr1 R1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible.)	 avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible.)

Figure 5 : Schéma décrivant les 4 possibilités d'interaction entre les produits des gènes d'avirulence et de résistance selon les génotypes du pathogène et de la plante, intervenant dans le cadre de la réaction gène pour gène. *Avr1* est le gène d'avirulence dominant et *R1* le gène de résistance dominant (Buchanan *et al.*, 2000)

D'autres réponses systémiques sont également décrites comme l'ISR (Induced Systemic Resistance) qui est induite par des rhizobactéries et des micro-organismes non pathogènes, ou l'IWR (Induced Wound Response) déclenchée par des blessures mécaniques ou des insectes herbivores.

Le déclenchement de l'ensemble des réponses de défense se fait selon trois grandes étapes : **perception – signalisation – synthèse de molécules de défense.**

La mise en place des mécanismes de résistance est toujours initiée par la perception d'un signal informant la cellule végétale d'une attaque par un agent pathogène. Ces signaux sont désignés par le terme éliciteur (de l'anglais, to elicit qui signifie provoquer). On parle également d'élicitation pour définir le déclenchement d'un ou plusieurs mécanismes de défense de la plante, généralement la synthèse de phytoalexines (Ebel et Schell, 1997).

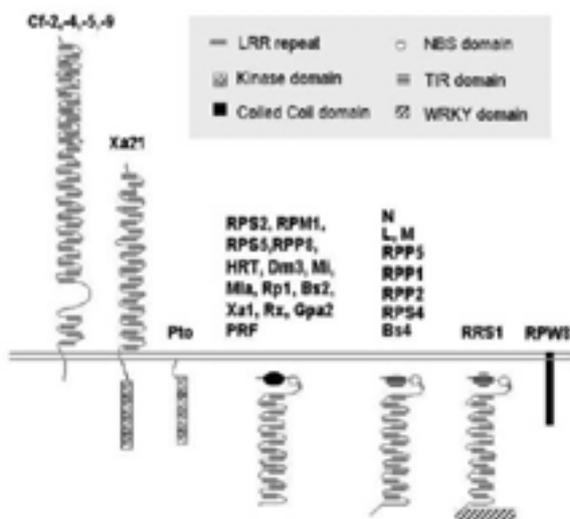
Les éliciteurs généraux

Ces molécules peuvent être d'origine **exogène** (lorsqu'ils proviennent du pathogène) ou d'origine **endogène** (lorsqu'ils sont produits par la plante). La nature de ces molécules est très variée. Ce sont :

-des polysaccharides : d'origine végétale (oligogalacturonides, Farmer *et al.*, 1991), résultant de la dégradation de la paroi par les agents pathogènes ; mais peuvent également provenir de la paroi des champignons (oligomères de chitine, β -glucanes,...) suite à une réponse de la plante qui va synthétiser des chitinases ou β -glucanases. Il s'agit ainsi d'une amplification du signal de défense.

-des protéines : les élicitines (dont la cryptogéine) sécrétées par des Oomycètes (*Phytophthora* et *Pythium*) (Bonnet *et al.*, 1996); les harpines qui sont des éliciteurs bactériens (*Erwinia*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia*) sécrétés au contact du plasmalemmes (Dong *et al.*, 1999) ; la flagelline d'origine bactérienne (Felix *et al.*, 1999).

-des lipides : ergostérol, constituant majoritaire de la membrane plasmique de la plupart des champignons (Kasparovsky *et al.*, 2003), acide arachidonique, libéré par *Phytophthora infestans* (Bostock *et al.*, 1981), sphingolipides (Koga *et al.*, 1998),...



Domaine	Signification	Fonction
LRR	Leucine rich repeat	interactions protéine/protéine, reconnaissance de l'éliciteur,
Kinase	Sérine/thréonine kinase	phosphorylations, transduction du signal
Coiled coil		Multimérisation des protéines
NBS	Nucleotide binding site	fixation et hydrolyse de l'ATP ou du GTP,
TIR	Toll-Interleukine Receptor	transduction du signal
WRKY	Domaine de liaison à l'ADN sur les boîtes W	Régulation de la transcription

Figure 6 : Structure des protéines codées par les gènes de résistance (*R*) (Nimchuck *et al.*, 2003). Au dessus des structures protéiques, sont indiquées quelques protéines représentatives de chaque classe. Tableau récapitulatif de la fonction de chaque domaine constituant les protéines de résistance.

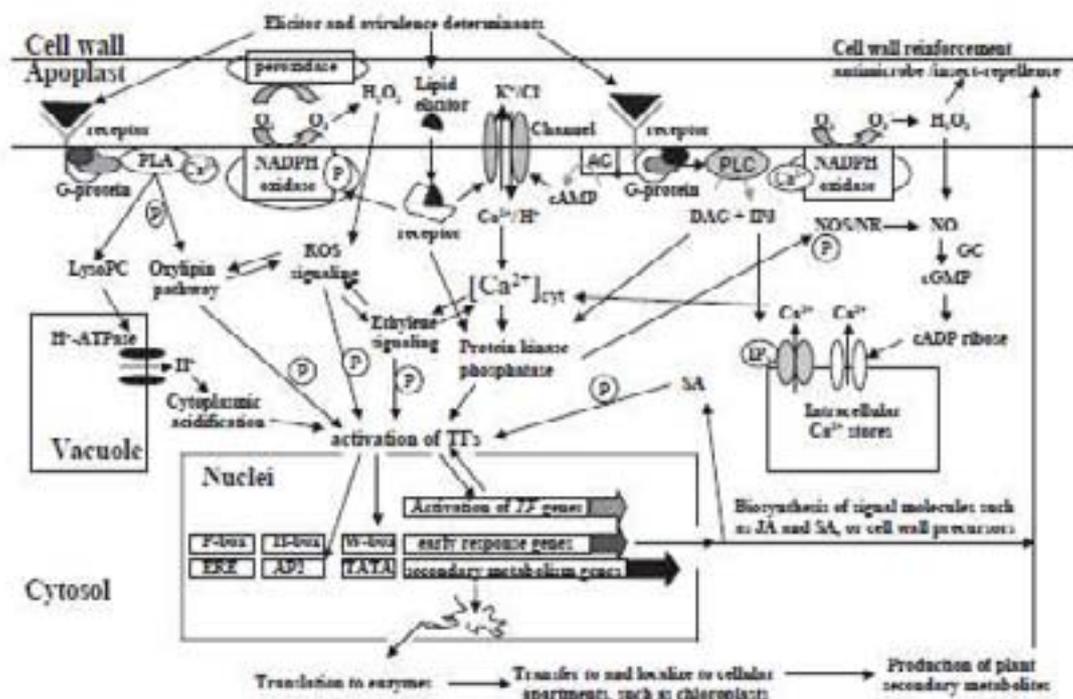


Figure 7 : Schéma regroupant les différentes voies de signalisation mises en œuvre après la perception d'un éliciteur conduisant à la production de molécules de défense de la plante (Zhao *et al.*, 2005).

Le cas particulier de la réaction gène pour gène (Flor H.H., 1956)

La réaction gène pour gène met en jeu une reconnaissance très spécifique d'un biotype de l'agent pathogène par un cultivar de la plante hôte. Elle fait intervenir deux gènes dominants: un gène du pathogène dit d'avirulence (*Avr*) et un gène de la plante dit de résistance (*R*) (**figure 5**). Les produits de ces deux gènes vont interagir selon une relation de type récepteur/ligand. La formation de ce complexe va déclencher une cascade d'évènements qui conduira à la résistance de la plante le plus souvent grâce à la mise en oeuvre de la réaction hypersensible (Heath, 2000, Shirasu et Schulze-Lefert, 2000).

Les produits des gènes d'avirulence sont dans ce cas considérés comme le signal éliciteur. Ils peuvent être d'origine virale (gènes codant des protéines de la capsid, des enzymes virales) ; d'origine bactérienne (beaucoup ont été identifiés chez *Pseudomonas syringae* ou *Xanthomonas campestris*) ; d'origine fongique.

Les gènes de résistance sont très nombreux dans le génome des plantes; chez *Arabidopsis thaliana*, leur nombre a été estimé à environ 125 (Speulmen *et al.*, 1998). Ces gènes sont regroupés sur seulement quelques loci (21 loci de résistance aux maladies, chez *Arabidopsis*, Speulmen *et al.*, 1998). Ces protéines sont généralement composées d'un domaine récepteur et d'un domaine effecteur. Ils sont répartis en plusieurs familles selon les différents domaines protéiques qui les constituent (**figure 6**) (Nimchuck *et al.*, 2003).

Chez la Vigne, la recherche de gènes de résistance ou d'analogues de gènes de résistance (RGA) de type NBS-LRR a été menée notamment par Di Gaspero et Cipriani en 2002 afin de développer des marqueurs moléculaires pour distinguer les génotypes sensibles des résistants. Au moins 29 séquences de RGA ont été clonées et l'une d'elles semble être un bon marqueur RFLP de la tolérance à différentes maladies des espèces de Vigne. Par ailleurs, il a été démontré que la résistance à l'oïdium est contrôlée par un gène dominant unique *Run1* (pour Resistance to *Uncinula necator*) présent chez l'espèce sauvage *Muscadinia rotundifolia* et associé à un locus de résistance (Pauquet *et al.*, 2001, Donald *et al.*, 2002). De telles analyses seront particulièrement utiles pour la sélection d'hybrides.

La perception de ces éliciteurs par les récepteurs concernés (produits des gènes R ou autres protéines membranaires) va déclencher une cascade d'évènements dont l'ordre et les éléments peuvent différer selon l'interaction plante/pathogène ou plante/éliciteur engagée (**figure 7**).

Ces évènements et leur chronologie ont été bien décrits lors de certaines interactions : cryptogéine/Tabac (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999), Pep13/Persil (Kroj *et al.*, 2003, Blume *et al.*, 2000). Les principaux mécanismes sont décrits ci-dessous.

Les flux ioniques

Les réponses les plus précoces des cellules végétales se situent au niveau de la membrane plasmique où des modifications de perméabilité vont provoquer des échanges d'ions entre les milieux intra et extracellulaires. Effectivement, des protons et des ions calcium entrent dans la cellule et des ions potassium et chlorure vont sortir. Des canaux calciques dont l'ouverture est dépendante d'un éliciteur ont été identifiés (Zimmermann *et al.*, 1997). La concentration intracellulaire en ions calcium augmente de façon transitoire en réponse à différents éliciteurs (Chandra *et al.*, 1997). L'addition d'inhibiteurs de canaux calcium empêche le déclenchement du burst oxydatif et la synthèse de phytoalexines, alors que l'ajout d'ionophores provoque l'ensemble de ces réponses (Rajasekhar *et al.*, 1999, Jabs *et al.*, 1997). Le calcium constitue un messager secondaire important pour la transduction du signal de défense notamment par l'activation de kinases dépendantes du calcium, CDPK (Lee et Rudd, 2002, Scholz-Starke *et al.*, 2005).

En amont, les protéines G spécifique ou monomériques liant le GTP interviennent dans la transduction du signal au niveau des toutes premières étapes (Zhao *et al.*, 2005). Elles permettent probablement le couplage de récepteurs membranaires des éliciteurs à des canaux ioniques ou à des phospholipases (Aharon *et al.*, 1998). Ces dernières sont dans certains cas impliquées dans le burst oxydatif et la synthèse d'acide jasmonique (Schaller, 1999 ; Chandra *et al.*, 1996).

Les espèces réactives d'oxygène (ROS)

Le stress oxydatif est également un des évènements les plus rapidement observés dans les réponses de défense des plantes (Adam *et al.*, 1989). Il résulte d'une succession de réactions de réduction de l'oxygène catalysées par une peroxydase pariétale et une NAD(P)H-oxydase membranaire pour former les anions superoxydes O_2^- , puis par une superoxyde dismutase pour la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence d'ions Fe^{2+} , H_2O_2 peut être transformé en radicaux libres hydroxyles (OH^\cdot) par la réaction de Fenton. Ces espèces réactives d'oxygène sont directement toxiques pour les micro-organismes mais aussi pour la cellule végétale. Elles peuvent ainsi jouer un rôle dans la réaction hypersensible en provoquant les nécroses cellulaires mais également comme messager secondaire en activant

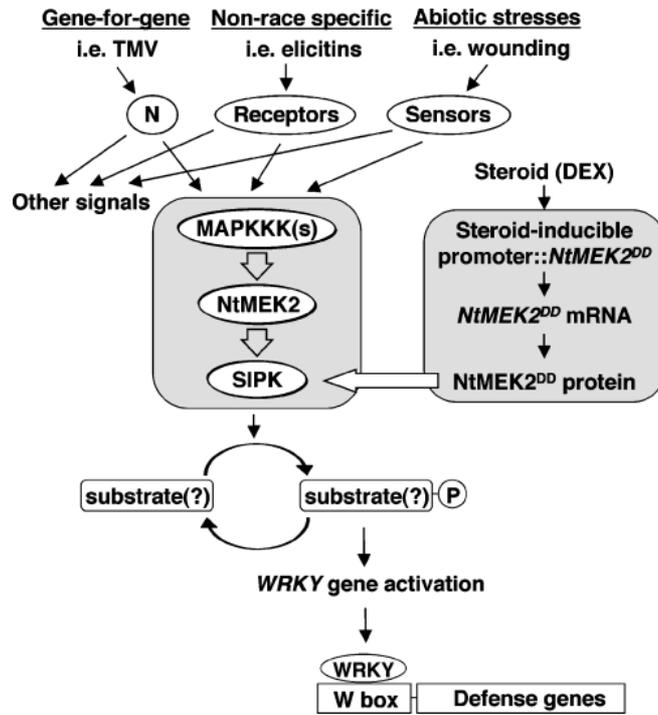


Figure 8 : Diagramme illustrant le rôle potentiel de la cascade des MAPK pour réguler les réponses de défense de la plante, ici chez le Tabac (Kim *et al.*, 2004). Cette voie de signalisation est induite suite à la perception de différents signaux et peut conduire à l'activation des facteurs de transcription de type WRKY dans les dernières étapes.

les gènes de défense et la mise en place de la PCD (Heath, 2000). En parallèle, ces ROS participent au renforcement de la paroi végétale par oxydation et insolubilisation de ses composés structuraux (Tenhaken *et al.*, 1995) ainsi qu'à la transduction du signal de défense indépendamment de la HR (Scholze et Starcke, 2005).

De plus, les ROS sont responsables de la peroxydation des acides gras et pourraient induire l'activation de lipoxgénases (LOX). Ces enzymes catalysent spécifiquement l'acide linoléique et l'acide linoléique, et participent aux premières étapes de la biosynthèse de l'acide jasmonique (molécule-signal).

La formation des espèces réactives d'oxygène est concomitante avec la formation d'oxyde nitrique (ou NO). Cette molécule pourrait interagir avec les radicaux O_2^- pour former une espèce d'oxygène fortement oxydante $ONOO^-$ (peroxynitrite) favorisant l'apoptose (Wendehenne *et al.* 2001). La participation du NO dans les interactions plantes-pathogènes commence à être démontrée. Les facteurs d'avirulence stimulent la production de NO qui va participer à la résistance contre les pathogènes en collaborant avec les ROS lors du choc respiratoire (ou burst oxydatif) (Delledone *et al.*, 1998). L'oxyde nitrique participe également à la production de métabolites secondaires et des protéines PR (Aziz *et al.*, 2003, Hu *et al.*, 2003).

La voie de transduction des MAPK

Des modifications de l'état de phosphorylation de protéines ont été mises en évidence dès les premières minutes après élévation. Des études utilisant des inhibiteurs de kinases ou de phosphatases ont montré leur rôle important dans la mise en place des réactions de défense (Romeis, 2001, Peck, 2003). Plus particulièrement, des cascades de signalisation faisant intervenir des protéines MAPK (mitogen-activated protein kinase) sont activées rapidement après l'application d'éliciteurs ou en réponse à des interactions plante/pathogène (Zhang et Klessig, 2001). Leur participation dans la transduction des signaux de défense de la plante a été largement étudiée. De récents travaux ont permis de disséquer toute la cascade de phosphorylations mettant en jeu des MAPK suite à l'élévation par un peptide issu de la flagelline des eubactéries, flg22 (Asai *et al.*, 2002). Tous les composants de cette voie de signalisation correspondant aux MAPKKK, MAPKK et MAPK ont été identifiés. De cette voie résultent l'activation de deux facteurs de transcription de type WRKY (qui seront décrits plus loin) et finalement la résistance vis-à-vis de *Pseudomonas syringae* et de *Botrytis cinerea* (**figure 8**).

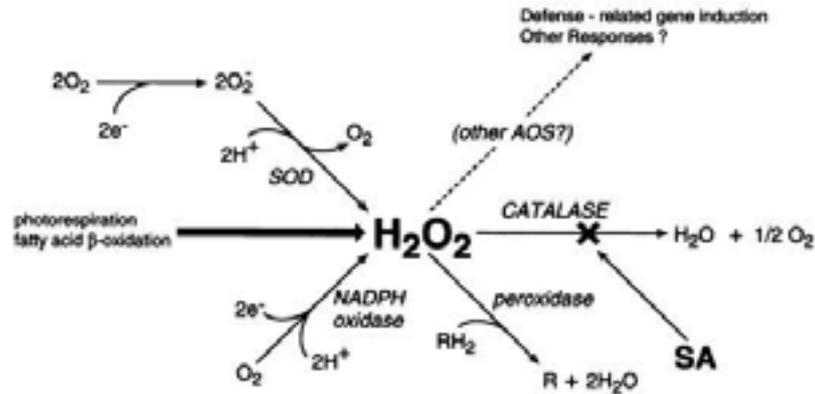


Figure 9 : Métabolisme du peroxyde d'oxygène (H_2O_2). L'acide salicylique joue un effet inhibiteur sur la catalase et provoque l'accumulation de H_2O_2 (Chen *et al.* 1995)

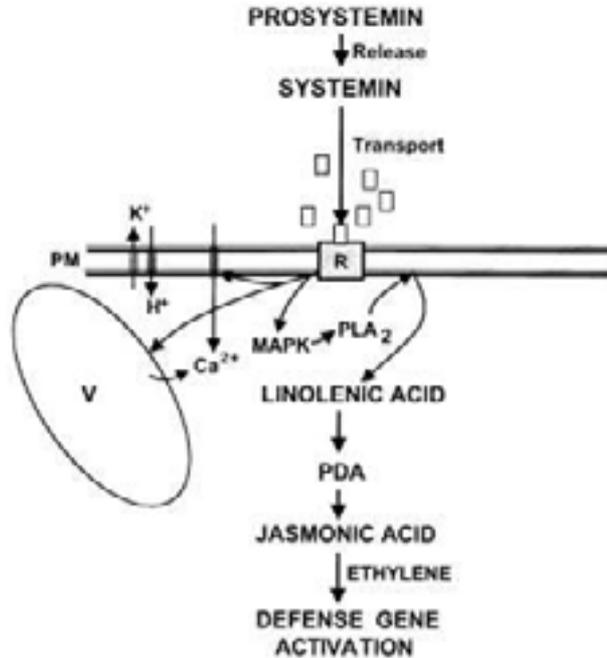


Figure 10 : Schéma modélisant la voie de signalisation systémique menant à l'activation des gènes de défense de la tomate en réponse à l'attaque d'un herbivore (Ryan *et al.*, 2000). L'interaction de la systémine avec un récepteur membranaire initie la cascade de signalisation intracellulaire et provoque la synthèse d'acide jasmonique.

L'activation des MAPK peut alors conduire soit à la résistance de la plante vis-à-vis d'un agent pathogène soit à sa sensibilité : MPK4 est un régulateur négatif des mécanismes de la SAR (Petersen *et al.*, 2000).

Ces trois premiers mécanismes décrits (flux ioniques, production de ROS et activation des kinases) sont activés très rapidement dans les minutes suivant la perception d'un éliciteur dans le but de détruire l'agent pathogène ou de limiter sa progression dans la plante (Dangl et Jones, 2001).

Les "molécules signal"

La mise en place des mécanismes de la SAR nécessite le mouvement systémique d'un signal des tissus infectés vers les tissus sains mais celui-ci n'a pas encore été clairement identifié. Plusieurs composés de faible poids moléculaire sont pressentis comme des candidats potentiels, de par leur implication dans la transduction du signal.

Des molécules comme l'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'éthylène, la systémine et même H₂O₂ définissent différentes voies de signalisation mises en oeuvre en réponse à une élévation ou une infection. Elles s'accumulent rapidement dans la cellule et vont permettre l'activation de l'expression des gènes de défense. Leur application de façon exogène peut également déclencher les mécanismes de SAR, elles peuvent donc jouer un rôle d'éliciteur.

L'acide salicylique

L'acide salicylique est une phytohormone dérivée de l'acide cinnamique sous l'action de la phénylalanine ammonia lyase (PAL). Sa présence est fortement associée à la mise en place de la SAR. Sa concentration augmente brutalement, de façon locale sur le site d'infection, suite à une attaque par un agent pathogène ou en réponse à un éliciteur, et est corrélée au développement des mécanismes de SAR. De plus, des applications d'acide salicylique ou de ces molécules analogues de façon exogène provoquent la mise en place des mécanismes de la SAR et la résistance à des agents pathogènes (Klessig et Malamy, 1994). Chez des mutants produisant une enzyme bactérienne de dégradation de l'acide salicylique NahG, le déclenchement de la SAR n'est plus possible en réponse à des attaques par différents pathogènes (Gaffney *et al.*, 1993). L'effet de l'acide salicylique sur la SAR implique l'induction de l'expression de certains gènes codant des protéines PR (Pathogenesis Related, qui seront présentées plus loin) (Chen *et al.*, 1995) mais les mécanismes d'action de cette molécule restent mal connus. Toutefois, plusieurs protéines liant l'acide salicylique ont été

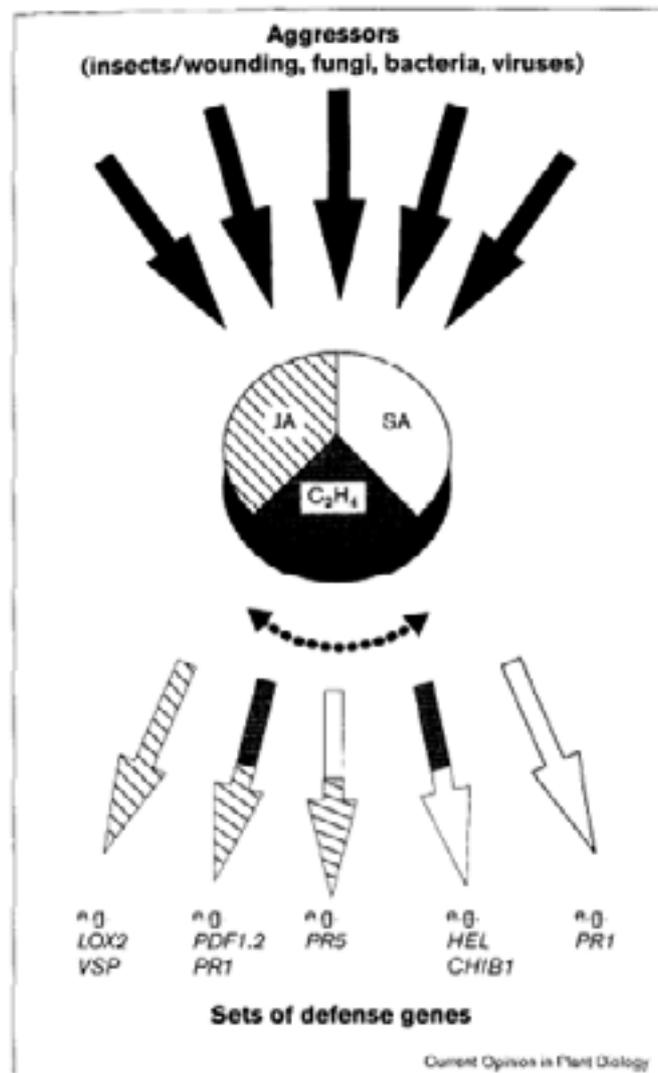


Figure 11 : Diagramme récapitulant les différentes voies de signalisation lors de la défense de la plante, implication de l'acide salicylique, l'acide jasmonique et de l'éthylène (Reymond et Farmer, 1998)

identifiées. La protéine SABP (SA Binding Protein) code une catalase qui participe à la dégradation de H_2O_2 en O_2 et H_2O . Ainsi, l'acide salicylique bloquerait l'activité de la catalase favorisant l'accumulation de H_2O_2 et le déclenchement de la SAR (Chen *et al.*, 1995, **figure 9**). La protéine SABP3, identifiée plus récemment, code une anhydrase carbonique chloroplastique qui possède une activité antioxydante. Les auteurs suggèrent que cette enzyme contrôle le niveau d'accumulation des espèces réactives produites lors du burst oxydatif (Slaymaker *et al.*, 2002). Une lipase a également été identifiée comme SABP (SABP2) (Kumar et Klessig, 2003). De plus, l'activation de plusieurs protéines MAPK a été mise en évidence suite à un traitement par l'acide salicylique (Meskiene et Hirt, 2000).

L'acide salicylique participe donc largement à la mise en place de la résistance systémique acquise mais son rôle comme "messager" de la SAR n'a pas été clairement démontré.

L'acide jasmonique

L'acide jasmonique est une molécule produite à partir d'un acide gras, l'acide linoléique par action de lipoxygénase. Cette molécule, ainsi que son dérivé le méthyljasmonate (MeJA), participent à de multiples processus physiologiques de la plante (Enhyedi *et al.*, 1992). Ils sont responsables de la fermeture des stomates, ils peuvent accélérer la sénescence, l'abscission des feuilles, inhiber la germination. Le méthyljasmonate est capable d'induire la production d'éthylène dans les fruits de tomate (O'Donnell *et al.*, 1996).

Les jasmonates sont également largement impliqués dans la signalisation du signal suite à une blessure (Leon *et al.*, 2001) et en réponse aux pathogènes et aux insectes (Ryan, 1992). Ils agissent aussi comme des éliciteurs, capables d'induire l'accumulation de métabolites secondaires et de protéines de défense (Gundlach *et al.*, 1992, Van Der Fits et Memelink 2000, Devoto et Turner, 2003).

L'éthylène

L'éthylène est une phytohormone jouant un rôle-clé dans la croissance et le développement des plantes. Cette molécule est rapidement produite et accumulée de façon transitoire suite à une blessure, une induction par l'acide jasmonique et à de multiples stress biotiques ou abiotiques et permet la transduction du signal menant à l'activation des défenses des cellules végétales (Chen *et al.*, 2005). De plus, l'éthylène contrôle l'amplitude et le développement des symptômes liés à une bactérie virulente ou un champignon (Lund *et al.*, 1998).

L'acide jasmonique et l'éthylène sont bien connus pour agir en synergie (Xu *et al.*, 1994) et pour constituer une voie de signalisation indépendante de celle de l'acide salicylique (Dong *et al.*, 1998). Cependant, il apparaît de plus en plus que ces deux molécules élicitrices peuvent

Famille	Protéine-type	Fonction
PR1	PR-1a , Tabac	Antifongique, (membrane des champignons)
PR-2	PR-2, Tabac	β -1,3-glucanase, (paroi des champignons)
PR-3	PR-P, PR-Q, Tabac	Chitinase de type I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	PR-R, Tabac	Chitinase de type I, II
PR-5	PR-S, Tabac	Thaumatine-like ou osmotine, (membranes fongiques)
PR-6	Inhibitor I, Tomate	Inhibiteur de protéase (champignons, bactéries, insectes)
PR-7	P ₆₉ Tomate	Endoprotéase
PR-8	Chitinase, Concombre	Chitinase type III, lysozyme (contre les peptidoglycanes bactériens)
PR-9	péroxydase formant la lignine, Tabac	Péroxydase, (renforcent la parois végétales en catalysant les dépôts de lignine)
PR-10	"PR1" Persil	Ribonucléase-like (virus)
PR-11	chitinase de classe V, Tabac	Chitinase de type I
PR-12	Rs-AFP3, Radis	Défensine (peptides riches en Cys ; champignons, bactéries)
PR-13	THI2.1 <i>Arabidopsis</i>	Thionine (peptides riches en Cys, champignons, bactéries)
PR-14	LTP4, Orge	Protéine de transfert des lipides (peptides riches en Cys, champignons, bactéries)
PR-15	OxOa, Orge	Oxalate oxydases
PR-16	OxOLP, Orge	Oxalate oxydases-like
PR-17	NtPRp27, Tabac	Inconnue

Tableau 1 : Classification des protéines PR (pathogenesis-related proteins) (D'après Van Loon et Van Strien, 1999)

contrôler l'expression de différents gènes cibles, voire agir de façon opposée (Overmyer *et al.*, 2000).

La systémine

A ces principales molécules signal peut s'ajouter la systémine, qui est un polypeptide mis en évidence au niveau des sites de blessure (mécanique ou causée par un insecte). Sa synthèse à partir de la prosystémine constitue un signal essentiel pour la défense des plantes contre les herbivores (Orozco-Cardenas *et al.*, 1993). Il semblerait que la systémine agisse en amont de l'acide jasmonique. Effectivement, suite à son transport par le phloème et à sa diffusion dans la plante, un récepteur membranaire percevrait cette molécule et déclencherait une cascade d'évènements intracellulaire menant à la production d'acide jasmonique puis à l'activation des gènes de défense (Ryan, 2000) (**figure 10**).

Les relations entre ces différentes molécules signal sont très complexes ; elles peuvent dans certains cas agir en synergie et parfois avoir des régulations négatives l'une sur l'autre. Une telle complexité peut être présentée sous la forme du diagramme de Reymond et Farmer (1998) (**figure 11**).

Nous venons de voir que la cellule mettrait en jeu de nombreuses voies de signalisation pour transmettre le message d'une infection de la plante par un agent pathogène. Aussi ces différents mécanismes vont aboutir à la synthèse des molécules de défense ayant des activités antimicrobiennes.

Les protéines Pathogenesis Related (PR)

Les protéines PR constituent un grand groupe de protéines très stables en milieu acide et résistantes aux protéases. Elles s'accumulent dans la plante lors d'une infection par un agent pathogène (bactéries, virus, champignon), notamment lors des réactions de type HR et SAR. Cette appellation leur a été donnée dès 1980 alors que leur fonction était inconnue (Antoniw *et al.*, 1980). Les premiers membres avaient été identifiés dès 1970 à la suite d'infection par le virus de la mosaïque du Tabac (TMV, Van Loon et Van Kammen, 1970). Elles ont ensuite été réparties en plusieurs familles selon leur structure et leur fonction. La nouvelle classification de Van Loon et Van Strien de 1999 en répertorie 14, mais aujourd'hui, on compte jusqu'à 17

familles de protéines PR (**tableau 1**). Trois nouvelles familles de protéines PR ont été ajoutées:

- les "oxalate oxydases" et les "oxalate oxydases-like" d'orge qui représentent respectivement les familles de protéines PR15 et PR16. De telles protéines sont induites suite à des infections par *Erysiphe graminis* (Dumas *et al.*, 1995 ; Zhou *et al.*, 1998).

- la famille des protéines PR17, dont la protéine NtPRp27 identifiée lors d'une infection du Tabac par le TMV. Sa nature et sa fonction sont inconnues (Okushima *et al.*, 2000).

La plupart de ces protéines sont absentes des plantes saines mais leur expression peut être induite par un agent pathogène ou un éliciteur mais aussi lors de la sénescence, de la floraison ou par des facteurs de croissance.

Chez la Vigne, plusieurs protéines PR ont été identifiées, dont la plupart à partir de feuilles, mais elles peuvent être retrouvées dans les différents organes de la plante. Certains membres de chaque famille peuvent être exprimés de façon constitutive tout au long du développement de la baie de raisin alors que d'autres sont induits à la véraison. Les protéines exprimées à la véraison ont été appelées GRIP pour Grape Ripening-Induced Protein (Robinson *et al.*, 2000). De tels changements de profils d'expression dès la véraison peuvent être corrélés avec l'accumulation d'hexoses dans la baie de raisin et les modifications de sensibilité de la baie vis-à-vis de certains pathogènes (Robinson *et al.*, 1997, Tattersall *et al.*, 1997, Salzman *et al.*, 1998).

Les chitinases et les β -1,3-glucanases représentent les protéines PR les plus étudiées chez la Vigne (Derckel *et al.*, 1996, 1998, Renault *et al.*, 1996, Robinson *et al.*, 1996, Busam *et al.*, 1997, Robinson *et al.*, 1997, Kreava *et al.*, 1998, Salzman *et al.*, 1998). Il apparaît que les conditions d'induction de ces deux familles sont très variables selon les protéines considérées: certaines sont présentes dans les feuilles saines ou non élicitées, d'autres induites par la blessure ou par l'acide salicylique, et d'autres par une infection par un agent pathogène (*Botrytis cinerea*, *Pseudomonas syringae* ou *Uncinula necator*) (Renault *et al.*, 1996, 2000, Derckel *et al.*, 1998, Jacobs *et al.*, 1999, Robert *et al.*, 2002).

Des protéines de la famille des osmotines ou des thaumatines-like (Salzman *et al.*, 1998, Tattersall *et al.*, 1997, Davies et Robinson, 2000) ont également été identifiées chez la Vigne et leur puissante activité anti-fongique a été démontrée *in vitro*. Ces protéines agissant en synergie sont capables de bloquer la croissance du champignon et du mycélium et d'inhiber la germination des spores et la croissance du tube germinatif (Monteiro *et al.*, 2003).

Des protéines de la famille des LTP ont été identifiées comme étant sécrétées dans le milieu extracellulaire au cours de l'embryogenèse somatique de cellules de Vigne (Coutos-Thévenot *et al.*, 1992). Leur expression peut être fortement induite par des éliciteurs fongiques (Gomes *et al.*, 2003). Certaines d'entre elles possèdent une activité antifongique (Ge *et al.*, 2003).

Robert *et al.* (2001) ont démontré qu'une protéine de la classe des PR10 s'accumule suite à une infection par *Pseudomonas syringae*, interaction incompatible déclenchant une réaction d'hypersensibilité.

Cette multitude de protéines contribue de façon combinée à la lutte contre les parasites des plantes. Toutefois, certaines de ces protéines peuvent avoir un caractère allergénique sur les hommes (Breiteneder *et al.*, 1989). Il faut donc rester prudent quant à leur utilisation ou leur induction dans les stratégies de lutte contre les maladies des plantes.

Les phytoalexines

Les phytoalexines sont des petites molécules lipophiles possédant des activités antimicrobiennes. Elles sont synthétisées en réponse à un éliciteur biotique ou abiotique et s'accumulent rapidement autour des sites de nécrose (Kuc *et al.*, 1995). Ces métabolites secondaires peuvent être issus de la voie de l'acétyl CoA pour les sesquiterpènes (Essenberg, 1990) ou provenir de celle de l'acétyl CoA combinée à celle des shikimates pour les stilbènes, les coumarines ou les flavonoïdes (Stafford, 1990, Heller et Fokmann, 1993).

Deux enzymes jouent un rôle central dans le contrôle de la biosynthèse des stilbènes : celle qui catalyse la première réaction de cette grande voie menant à la synthèse des composés phénoliques, la phénylalanine ammonia lysase (ou PAL) et la dernière enzyme permettant l'aiguillage vers la synthèse des stilbènes, la stilbène synthase.

Chez la Vigne, les stilbènes et particulièrement le resvératrol ont beaucoup été étudiés pour leurs activités antifongiques, dans le but de lutter contre les maladies des vignobles mais aussi pour leurs activités anti-oxydantes et les bénéfices éventuels pour la santé humaine. En réponse à une élévation biotique ou abiotique, les stilbènes qui sont accumulés chez la Vigne sont le trans-resvératrol, les viniférines (α et ϵ), les picéides et le ptérostilbène (Soleas, 1997). Ils peuvent cependant être présents de façon constitutive dans certains organes. Des études ont mis en évidence une corrélation entre la capacité à synthétiser ces molécules par certaines espèces de Vigne et leur sensibilité à différents pathogènes (Derck et Creasy, 1989). L'activité

anti-fongique de ces molécules a été étudiée vis-à-vis de *Botrytis cinerea* et du mildiou (Langcake, 1981, Hoos et Blaich, 1996).

De plus, chez différentes espèces, il a été démontré que des plantes transgéniques exprimant plus fortement le gène codant la stilbène synthase présentaient une résistance accrue vis-à-vis de différents agents pathogènes (Hipskind et Paiva, 2000, Stark-Lorenzen *et al.*, 1997). Ceci a également été démontré chez la Vigne où ce gène a été placé sous le contrôle d'un promoteur de PR10 inductible par une infection ; les Vignes transformées sont plus tolérantes à *B. cinerea* (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001).

De plus, le méthyl jasmonate joue un rôle prépondérant sur l'induction de la biosynthèse des stilbènes (Krisa *et al.*, 1999).

Les autres molécules de défense

Le renforcement des parois pecto-cellulosiques des cellules végétales constitue un élément très important lors de défense des plantes. Il peut se faire :

- par accumulation de protéines pariétales : de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP dont les extensines), de protéines riches en glycine (GRP), riches en proline (PRP),

- par des dépôts de callose (polymère de D-glucose) dont la synthèse est assurée par une enzyme membranaire, la callose synthase. Ces dépôts peuvent également se faire au niveau de plasmodesmes bloquant ainsi la progression des virus,

- par des dépôts de polymères aromatiques comme la lignine qui permet la lignification des papilles et protège d'une infection ultérieure.

Effectivement, ces renforcements des parois peuvent se faire sous la forme d'appositions de papilles, entre la paroi et la membrane de la cellule au contact du pathogène juste à l'interface plante/pathogène (lors des mécanismes de HR) ou de façon plus vaste en encapsidant les structures interfaciales (les suçoirs du champignon) ou encore de façon systémique (par lignification des cellules épidermiques en contact avec le pathogène). Les papilles peuvent être constituées de lignine ou de callose mais aussi de protéines, de matières pectiques, de suber, de silice ou/et de calcium.

De plus, des enzymes de modification des parois pecto-cellulosiques peuvent également jouer un rôle dans la défense des plantes. Les inhibiteurs de polygalacturonases peuvent agir contre les polygalacturonases fongiques mais aussi favoriser la production et la durée de vie d'éliciteurs pectiques endogènes. Des enzymes comme les pectines méthyl estérases ou pectines estérases, xyloglucanes endotransglycosylase, et xyloglucanes hydrolases permettent

le remodelage des parois végétales, notamment lors de la croissance. L'expression de ce type d'enzyme peut être régulée lors d'infection (Robatzek et Somssich, 2002, Hui *et al.*, 2003, Cheong *et al.* 2002, Li *et al.* 2004).

De nombreuses protéines structurales ou des enzymes de modification des parois pectocellulosiques ont été identifiées chez la Vigne (HRGP, protéines riches en proline, pectine méthylestérases, polygalacturonases, cellulase, xyloglucane endotransglycosidases,...) dont un certain nombre sont induites dans la baie de raisin à partir de la véraison pour participer au grandissement des cellules et sont considérées comme des GRIP, grape induced-ripening proteins (Davies et Robinson, 2000, Nunan *et al.*, 2001).

Nous venons de décrire les différentes molécules de défense mobilisées par les cellules végétales pour se défendre contre les attaques des agents pathogènes. Toutefois, l'activation de la synthèse de ces composés sous-entend la régulation transcriptionnelle de leur expression (pour les protéines de défense) ou de celle des enzymes participant à leur biosynthèse (notamment pour les phytoalexines et autres métabolites secondaires). L'expression des gènes répondant aux pathogènes est régulée finement de façon temporelle et spatiale. Les "molécules signal" (SA, JA, éthylène, H₂O₂) ainsi que les protéines MAPK interviennent dans la régulation des facteurs de transcription qui contrôlent ces gènes de défense. Ainsi, les facteurs de transcription occupent à leur tour une place prépondérante dans la résistance des plantes puisqu'ils interviennent juste en amont des gènes de défense, en régulant leur expression.

Quatre grandes familles de facteurs de transcription sont principalement impliquées dans la régulation de la défense des plantes : les protéines WRKY, les ERF ("Ethylene Responsive Factor"), les facteurs MYB, les protéines TGA b-ZIP (Rushton et Somssich, 1998, Singh *et al.*, 2002). Les protéines WRKY seront détaillées dans le paragraphe suivant puisqu'elles constituent l'objet de notre étude.

Les facteurs de transcription répondant à l'éthylène ou ERF

Les protéines ERF constituent une famille de facteurs de transcription spécifique aux plantes (Ohme-Takagi *et al.*, 2000). Leur expression est induite par l'éthylène mais aussi en réponse à une infection par un agent pathogène (Gutterson et Reuber, 2004). Ils se lient à l'ADN au niveau de séquences appelées boîtes GCC (GCCGCC), présentes dans les promoteurs de plusieurs gènes *PR*. Ces protéines peuvent agir comme des régulateurs positifs ou négatifs (Fugimoto *et al.*, 2000).

L'expression de certains membres de cette famille peut également être activée par la blessure, par l'acide salicylique et par l'acide jasmonique (Park *et al.*, 2001, Gu *et al.*, 2002). La sur-expression du facteur ERF Pti4 provoque une activation de plusieurs gènes *PR* et finalement une meilleure tolérance de la plante à une bactérie (*Pseudomonas syringae*) et à un champignon (*Erysiphe orontii*) (Gu *et al.*, 2002).

Les facteurs MYB

Les facteurs de transcription de type MYB constituent une très large famille (plus de 125 gènes chez *Arabidopsis*) dont certains membres peuvent jouer un rôle dans la défense (Kranz *et al.* 1998). Une de leurs fonctions principales est la régulation de la biosynthèse des composés phénoliques (Martin et Paz-Ares 1997, Jin et Martin 1999). Leur rôle dans la défense des plantes se situerait ainsi au niveau du contrôle de la biosynthèse des lignines, des stilbènes (qui sont des phytoalexines) et des flavonoïdes.

Ces protéines peuvent se lier à différentes séquences d'ADN appelées MRE pour "MYB Recognition Elements" (Martin et Paz-Ares, 1997, Jin et Martin, 1999) dont certaines sont présentes dans les promoteurs de gènes *PR*.

Quelques d'études ont validé l'implication de tels facteurs dans la mise en place d'une résistance ou dans l'activation transcriptionnelle de gènes associés à la résistance des plantes. L'expression du gène *NtMyb1* induite par le virus de la mosaïque du Tabac et par l'acide salicylique (Yang et Klessig, 1996) semble être impliquée dans la régulation de la PAL (Yang *et al.* 2001). *NtMyb2* est induit par la blessure et par des éliciteurs et contrôle également la transcription du gène PAL (Sugimoto *et al.* 2000). Récemment, l'étude d'un mutant *Arabidopsis* déficient pour *AtMYB30*, a révélé que cette protéine agissait en tant que régulateur positif des mécanismes de réponse hypersensible de la plante (Vaillau *et al.*, 2002). De plus, Johnson et Dowd (2004) ont montré que la sur-expression d'un facteur MYB augmentait la résistance des plantes d'*Arabidopsis* vis-à-vis d'un insecte.

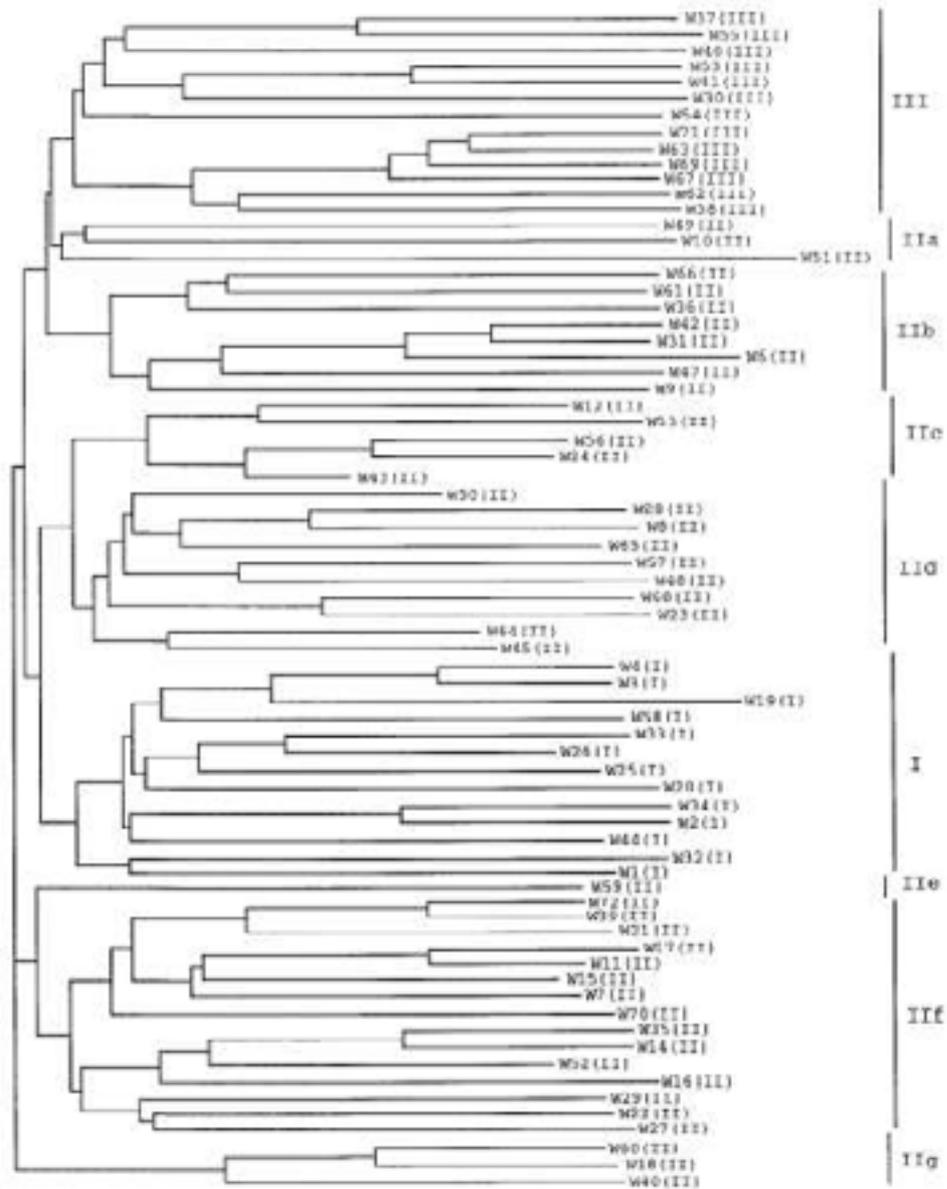


Figure 12 : Arbre phylogénétique de 72 protéines WRKY d'*Arabidopsis thaliana* (Dong *et al.*, 2003). Les trois groupes sont indiqués ainsi que les 7 sous-groupes du groupe II. Les chiffres entre parenthèse correspondent à la classification basée sur le nombre de domaines WRKY et la structure des motifs en doigt à zinc (Eulgem *et al.*, 2000).

Les protéines TGA bZIP

La famille des facteurs de transcription de type bZIP comprend notamment les facteurs TGA qui se fixent à l'ADN sur des séquences nommées *as-1*. Ces éléments *cis* répondent aux "molécules-signal" SA et JA et sont présents dans le promoteur de la glutathione S-transférase et dans le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (Yang *et al.*, 1997). Il a été démontré que certaines protéines TGA interagissaient avec NPR1 (nonexpressor of PR genes 1), régulateur clé de la voie de l'acide salicylique (Despres *et al.* 2000, Fan et Dong, 2002 Johnson *et al.* 2003).

La protéine NPR1 joue un rôle fondamental dans les mécanismes de défense et notamment dans l'établissement de la SAR. Elle participe à la résistance de la plante, par l'intermédiaire de la voie mettant en jeu l'acide salicylique, et contrôle indirectement l'induction de l'expression des gènes codant les protéines PR (Kinkema *et al.*, 2000). Cette protéine a été largement étudiée.

Il semblerait qu'elle nécessite une activation par l'acide salicylique, permettant alors sa translocation dans le noyau où elle interagirait avec des facteurs de transcription de type TGA. Cette interaction est nécessaire à l'activation de la transcription des gènes *PR* (Dong *et al.*, 2004). Il semblerait qu'elle interagisse également avec les facteurs de transcription de type WRKY (Robatzek et Somssich, 2000, Yu *et al.*, 2001).

Cette catégorie de gènes WRKY code des facteurs de transcription appartenant à une grande famille multigénique, longtemps supposée comme étant spécifique du règne Végétal (Eulgem *et al.*, 2000). Mais, très récemment, des gènes codant de telles protéines ont été identifiés chez un eucaryote primitif (*Giardia lamblia*), chez une amibe *Dictyostelium discoideum*, et chez une algue verte unicellulaire (*Chlamidomonas Reinhardtii*) (Zhang et Wang, 2005). *Arabidopsis thaliana* compte 74 membres de cette famille (Dong *et al.*, 2003) et le Riz en compte plus de 100 (Zhang et Wang, 2005).

La dénomination WRKY de ces protéines régulatrices a été attribuée en 1996 par Rushton *et al.* (1996) à cause de la présence de ce motif d'acides aminés invariablement présent dans un domaine très conservé. Le premier facteur de transcription de cette famille a pourtant été identifié dès 1994, par Ishiguro et Nakumara, 1994, sous le nom de SPF1 (Sweet Potato Factor 1), chez la patate douce (*Ipomoea batatas*).

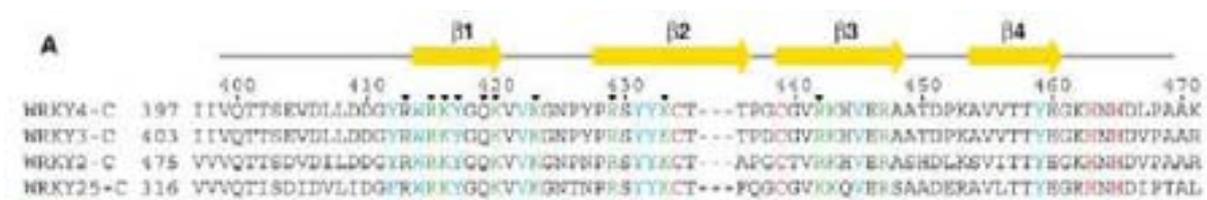


Figure 13 : Structure secondaire du domaine C-terminal de liaison à l'ADN des protéines WRKY (Yamasaki *et al.*, 2005), alignement des domaines C-terminaux de 4 protéines WRKY d'*Arabidopsis*. Les résidus interagissant avec Zn^{2+} (Cys ou His) sont colorés en rouge, les résidus basiques conservés (Arg et Lys) en vert et les résidus aliphatiques (Ile, Leu, Met, et Val) ou aromatiques (His, Phe, Trp, et Tyr) en bleu. Les flèches jaunes indiquent la position des feuillettes β . Les pointeurs noirs indiquent les résidus directement en contact avec l'ADN.

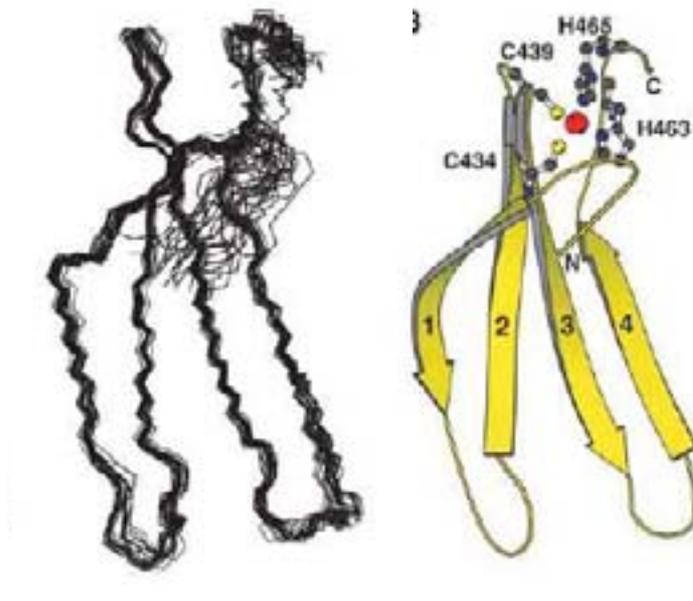


Figure 14 : Deux représentations de la résolution par RMN de la structure tridimensionnelle du domaine C-terminal de liaison à l'ADN des protéines WRKY (Yamasaki *et al.*, 2005) (diagramme en ruban et schématisation tridimensionnelle de la structure secondaire). Les 4 feuillettes β sont numérotés depuis l'extrémité N-terminale, l'ion Zn^{2+} est représenté par une sphère rouge et les résidus avec lesquels il interagit par des bâtonnets et des petites sphères.

La structure protéique des trois groupes de protéines WRKY

La structure protéique des facteurs de transcription WRKY est caractérisée par un large domaine fortement conservé d'une soixantaine d'acides aminés contenant la séquence WRKYGKQ et un motif en doigt à zinc. Ces protéines sont réparties en trois groupes selon leur homologie de séquences (**figure 12**).

Le 1^{er} groupe est caractérisé par deux domaines WRKY contenant chacun un doigt à zinc du type C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₅-H-X-H. Les deuxième et troisième groupes contiennent un seul domaine WRKY mais différent par la structure du doigt à zinc, respectivement C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₅-H-X-H et C-X₇-C-X₂₃-H-X-C.

La plupart des facteurs de transcription possèdent deux principaux domaines : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation. Pour les protéines WRKY, le domaine de liaison à l'ADN (domaine WRKY) a été bien décrit (détaillé ci-dessous) mais il semblerait que le domaine d'activation ne se distingue pas du premier et le recouvre (De Pater *et al.*, 1996).

Le domaine de liaison à l'ADN

Ce large domaine WRKY très conservé correspond au domaine de liaison à l'ADN de ces facteurs de transcription. Il comprend notamment un cœur de 7 acides aminés extrêmement conservés WRKYGQK au sein de cette grande famille protéique.

Chez le Riz, plusieurs variantes de la composition de ce motif ont été remarquées (Zhang et Wang, 2005). Neufs types de séquences présentant des modifications d'un ou deux acides aminés ont été répertoriés à partir de 19 domaines appartenant essentiellement aux groupes 3 et 2c. WRKYGEK et WRKYGKK sont les peptides les plus répandus. Des variations des motifs en doigt à zinc ont également été rapportées.

Récemment, la structure tridimensionnelle du domaine C-terminal de liaison à l'ADN de la protéine AtWRKY4 a été résolue par RMN (Yamasaki *et al.*, 2005) mais aussi celle de AtWRKY1 par diffraction aux rayons X (Duan *et al.*, 2005). Cette structure est constituée de 4 feuillets β avec une cavité liant le zinc, formée par le doigt à zinc (CCHH) (**figure 13 et 14**). Le premier feuillet β en position N-terminale contient les résidus WRKYGQK ; il est responsable de la fixation à l'ADN puisqu'il s'intercale dans le sillon de l'ADN pour interagir avec les bases d'une boîte W. La conformation de ce domaine est dépendante de la présence d'ions Zn^{2+} .

Certains résidus de ce domaine sont indispensables à l'interaction protéine/ADN. La délétion de 4 acides aminés en position N terminal du domaine conservé (de 60 acides aminés) abolit la fixation de la protéine NtWRKY9 à l'ADN (Maeo *et al.* 2001). De plus, des

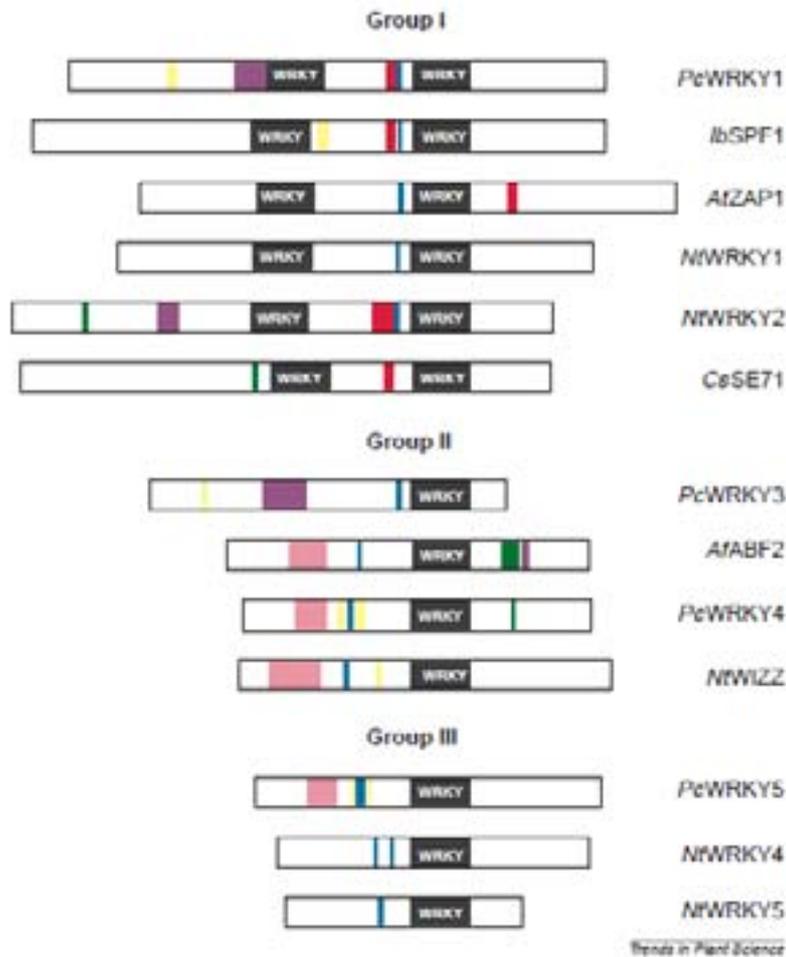


Figure 15 : Représentation schématique des structures protéiques des trois groupes de facteurs de transcription WRKY. Sont indiqués en noir les domaines WRKY, en bleu les signaux potentiels de localisation nucléaire, en rose les domaines leucine-zipper, en jaune les régions riches en sérine et thréonine, en violet les régions riches en glutamine, en vert les régions riches en proline et en rouge, les régions acides (Eulgem *et al.*, 2000).

mutations ponctuelles concernant chacun des acides aminés du doigt à zinc ou les résidus WKYK de l'heptapeptide WRKYGQK abolissent complètement l'interaction protéine/ADN. Des mutations sur les 3 autres acides aminés de ce cœur (RGQ) diminuent très nettement cette liaison.

Dans le cas des protéines du groupe 1 qui possèdent deux domaines WRKY, il semblerait que le domaine en C terminal soit essentiellement responsable de la fixation à l'ADN (Ishiguro et Nakamura, 1994, De Pater *et al.*, 1996, Eulgem *et al.* 1999, Maeo *et al.* 2001). La comparaison de la structure tridimensionnelle des domaines C et N-terminaux révèle effectivement qu'ils sont tous deux capables de lier l'ADN mais le gain énergétique de la formation du complexe protéine/ADN est moins négatif pour le domaine N-terminal (Yamasaki *et al.*, 2005). Ce résultat confirme que le domaine C terminal se lie plus fortement à l'ADN.

Les études phylogénétiques de Zhang et Wang en 2005 suggèrent que la toute première protéine WRKY possédait un domaine unique qui a été dupliqué pour donner les protéines à deux domaines de *G. lamblia*, *D. discoideum* et de l'algue verte et plus tard les protéines WRKY du groupe 1. Ils proposent que le domaine en C terminal ait été l'ancêtre du domaine unique WRKY des groupes 2 et 3 (étant donnée la conservation des séquences) alors que le domaine en N terminal aurait été perdu avant la duplication des gènes de ces deux groupes.

Le motif en doigt à Zn

Au sein du large et très conservé domaine WRKY, se trouve un autre motif qui participe à la classification de ces protéines, le motif en doigt à zinc. Son rôle est resté flou pendant longtemps. Toutefois aujourd'hui, différents travaux suggèrent qu'il est indispensable pour la conformation du facteur de transcription. Lors d'expériences de retard sur gel, plusieurs auteurs montrent que des agents chélateurs d'ions divalents (EDTA ou o-phénatroline) abolissent l'interaction protéine/ADN (Rushton *et al.*, 1995, De Pater, 1996, Hara *et al.* 2000), et seul l'ajout de Zn^{2+} permet de rétablir cette liaison (Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} n'ont aucun effet) (Maeo *et al.* 2001). En outre, Maeo *et al.* (2001) en étudiant le rôle des résidus conservés de ce domaine révèlent que des mutations affectant les cystéines ou histidines du doigt à zinc abolissent également la liaison à l'ADN. Ainsi, ce motif participerait au repliement de la protéine pour moduler le domaine de fixation à l'ADN.

Les autres domaines présents dans les protéines WRKY

La présence de ces domaines additionnels dans les facteurs de transcription WRKY a permis de les répartir en sous-groupes, ainsi le groupe 2 est sub-divisé en 7. Toutefois, la

fonction de plusieurs de ces motifs reste indéterminée (domaines acides, riches en glutamine, en sérine-thréonine, en proline) (**figure 15**).

De nombreuses protéines du groupe 1 et 2 possèdent un des trois signaux de localisation nucléaire (**NLS**) basiques identifiés chez les facteurs WRKY. L'adressage de ces protéines vers le noyau a été validé par des expériences de localisation subcellulaire (transformation transitoire de protoplastes ou de cellules par des constructions fusionnées à la GFP), menées par différentes équipes (Eulgem *et al.* 1999, Hara *et al.* 2000, Robatzek et Somssich, 2000, Asai *et al.*, 2002, Rizhsky *et al.* 2002, Deslandes *et al.*, 2003, Zhang *et al.* 2004). Cependant dans certains cas, le transport dans le noyau dépend de l'interaction avec d'autres protéines. C'est le cas pour RRS1 dont la localisation nucléaire est dépendante de la présence de la protéine d'avirulence de *Ralstonia solanacearum* PopP2 (Deslandes *et al.*, 2003)

Certaines protéines WRKY contiennent des domaines permettant des interactions protéine/protéine comme les motifs **Leucine-Zipper**. Ce type de motif est généralement impliqué dans la dimérisation des protéines. Lors d'expérience de retard sur gel, des traitements par un agent dissociant (le déoxycholate de sodium) entraîne une perte du signal de liaison (Yang *et al.*, 1999). Une deuxième preuve de dimérisation ou d'oligomérisation de certaines protéines est apportée par le fait que des complexes protéines/ADN de tailles différentes sont parfois détectés. La protéine tWRKY3 formerait un à deux complexes de faible mobilité alors que tWRKY4 révèle un complexe supplémentaire de grande mobilité sur gel. Ainsi, seule tWRKY3 aurait la capacité de former des complexes oligomériques. Il faut noter que ces deux protéines ne possèdent qu'un domaine WRKY et appartiennent au groupe III (Chen et Chen 2000).

La fonction du domaine désigné comme **motif C** (VAVNSFKKVISLLGRSR) présent chez les protéines du groupe 2d vient d'être élucidée très récemment comme domaine de liaison à la calmoduline (Park *et al.*, 2005).

De plus, LtWRKY21 possède un domaine, encore non décrit chez les facteurs WRKY, nommé **EAR** (de séquence LDLNLNP), nécessaire à la transactivation de cette protéine sur le gène (Zou *et al.* 2004). Il est habituellement trouvé dans le domaine ERF des deux facteurs de transcription ERF (Ethylene Response Factor) qui agissent comme des répresseurs (Fugimoto *et al.*, 2000).

Les caractéristiques de la liaison protéineWRKY/ADN

La majorité des protéines WRKY se fixent spécifiquement aux boîtes W contenant la séquence TGAC (De Pater *et al.*, 1996, Yang *et al.*, 1999, Chen et Chen, 2000, Du et Chen,

2000, Robatzek et Somssich, 2000, Hara *et al.* 2000, Maeo *et al.*, 2001, Yang et Chen 2001, Cormack *et al.* 2002, Chen et Chen 2002, Huang et Duman, 2002, Kim *et al.* 2000, Marè *et al.*, 2004, Miao *et al.*, 2004, Rocher *et al.*, 2004, Xu *et al.* 2004). Ces boîtes W sont très répandues dans les séquences promotrices des gènes de plantes. Leur fréquence théorique est de 2,1 dans une séquence promotrice de 1,1 kb mais l'étude de 26 promoteurs appartenant à un régulon du gène PR1 induit lors de la réaction de SAR montre qu'ils y apparaissent en moyenne 4,3 fois pour 1,1 kb de séquence (Maleck *et al.*, 2000).

Selon les protéines WRKY, des spécificités de liaison à certaines séquences des boîtes W peuvent exister. Par exemple, la protéine WIZZ voit son activité de liaison à l'ADN diminuer lorsque l'élément W est réduit à 4 nucléotides (TGAC), mais aussi lorsque l'espacement entre les deux boîtes W (TTGAC) est modifié (Hara *et al.*, 2000). Souvent, une combinaison de deux boîtes W favorise l'interaction (Rushton *et al.*, 1996, Yang *et al.*, 1999, Chen et Chen, 2000, Hara *et al.*, 2000).

De façon plus générale, Rushton *et al.* (2002) ont mené une large étude démontrant l'importance du nombre, de l'arrangement et de l'espacement de boîtes W pour l'inductibilité des séquences promotrices qui les contiennent en réponse à des pathogènes ou à la blessure et par conséquent pour la fixation de facteurs de transcription de type WRKY.

Toutefois, il a été montré que certains facteurs WRKY pouvaient se fixer sur d'autres types d'éléments *cis*. La première protéine WRKY identifiée, SPF1, a été isolée pour sa capacité de fixation à deux séquences présentes dans les promoteurs des gènes de la sporamine et de la β -amylase, SP8a (ACTGTGTA) et SP8b (TACTATT) (Ishiguro et Nakamura, 1994). Sa liaison à l'ADN est toutefois beaucoup plus importante sur l'élément SP8a qui contient les nucléotides TGAC. Par ailleurs, la protéine SUSIBA2 est capable de se lier aux éléments SURE (Sugar responsive element), séquence riche en adénosines (de cœur AA/TAA) mais aussi aux boîtes W (Sun *et al.* 2003).

De plus, une recherche aléatoire de séquences sur lesquelles la protéine tWRKY1 peut se fixer a confirmé que les boîtes W, souvent répétées, sont bien les éléments *cis* nécessaires à la fixation de cette protéine (Yang et Chen 2001). Par contre, certains clones qui ne possédaient qu'une séquence TTGACT, possèdent une même séquence de 20 nucléotides, CCGCATAGGCCACTAGTGCA, souvent répétée. Ces éléments (boîte W et les 20 nucléotides) pourraient dériver de la transposition d'éléments mobiles.

De nombreuses protéines WRKY possèdent des sites potentiels de phosphorylation. L'activité de liaison à l'ADN de certaines protéines WRKY peut être dépendante de leur propre état de phosphorylation (Yang *et al.*, 1999, Yamamoto *et al.* 2004) alors que d'autres ne le sont pas, comme AtWRKY22 et 29 (Asai *et al.*, 2002) et les protéines WRKY induites par NtMEK2 (Kim et Zhang, 2004). Ces différents travaux suggèrent une régulation des protéines WRKY de façon directe ou indirecte par la voie de signalisation des protéines MAPK.

Les fonctions biologiques des protéines WRKY

Depuis 10 ans, un grand nombre de ces facteurs de transcription WRKY ont déjà été identifiés, toutefois, leur rôle biologique exact reste encore mal connu. De nombreux travaux indiquent que la plupart de ces protéines sont impliquées dans la défense des plantes mais le rôle de certaines de ces protéines dans d'autres voies métaboliques semble indéniable.

Il ne semble pas qu'il y ait de relation entre l'appartenance phylogénétique à un groupe de protéine WRKY et la fonction biologique de la protéine. Cependant, la découverte du domaine de liaison de la calmoduline chez les membres du groupe 2c suggère leur implication commune dans la perception du signal calcique (Park *et al.*, 2005).

La relation entre les protéines WRKY et la défense des plantes

Les gènes WRKY sont induits par les pathogènes

Un argument important concernant l'implication des facteurs WRKY dans la réponse aux pathogènes est apporté par le fait que leur expression peut être induite suite à des infections par des agents pathogènes fongiques (Eulgem *et al.* 1999, Dellagi *et al.* 2000), bactériens (Dellagi *et al.* 2000, Chen et Chen 2002), ou par des virus (Yang *et al.*, 1999, Chen et Chen 2000). Des éliciteurs d'origine fongique sont également capables d'activer leur transcription (Rushton *et al.*, 1996, Eulgem *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2000, Cormack *et al.*, 2002).

Par ailleurs, beaucoup d'entre eux sont induits par des traitements avec des molécules-signal impliquées dans la réponse aux pathogènes, comme l'acide salicylique (Yang *et al.*, 1999, Chen et Chen 2000, Chen et Chen, 2002, Dong *et al.*, 2003, Li *et al.* 2004, Xu *et al.*, 2004), l'acide jasmonique (Xu *et al.*, 2004), H₂O₂ (Miao *et al.*, 2004, Rizhsky *et al.* 2004), l'éthylène (Li *et al.* 2004). Mais quelques régulations négatives des gènes WRKY sont également observées (AtWRKY70 est réprimé par le méthyl jasmonate, Li *et al.* 2004).

Les protéines WRKY et les voies de signalisation des MAPK

Des relations des protéines WRKY avec les voies de signalisation faisant intervenir les protéines MAPK commencent à être démontrées (Asai *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2004, Kim et Zhang, 2004, Andreasson *et al.*, 2005) (*cf.* **figure 8**).

Les protéines AtWRKY22 et AtWRKY29 ont été identifiées comme des éléments en aval d'une cascade de MAPK chez *Arabidopsis thaliana* conférant une résistance des plantes à des pathogènes fongiques et bactériens (Asai *et al.*, 2002). Par ailleurs, la résistance du Tabac au TMV *via* le gène de résistance *N* nécessite l'expression de *NtMEK1* et *NtNTF6* (respectivement MAPK kinase et MAPK) et de trois gènes *WRKY* (Liu *et al.*, 2004).

Des analyses *in vivo* (double hybride) et *in vitro* (retard sur gel) ont montré que la protéine MSK1, substrat de la MAPK MPK4, interagissait physiquement avec les facteurs de transcription WRKY 25 et 33 chez *Arabidopsis* (Andreasson *et al.*, 2005). Il semblerait que cette protéine MSK1 joue un rôle de régulation de la phosphorylation des protéines WRKY par MPK4. De plus, l'activation de WRKY33 serait responsable de la répression des gènes dépendants de la voie de l'acide salicylique.

Les gènes cibles potentiels des facteurs WRKY

Les premiers candidats potentiels sont les gènes qui contiennent un grand nombre de boîtes W dans leur séquence promotrice. Des analyses bioinformatiques du génome d'*Arabidopsis*, ont montré une abondance particulière de ces éléments régulateurs dans les promoteurs de gènes liés à la défense des plantes mais aussi de gènes codant des protéines de liaison à l'ADN induites par l'éthylène, des produits de gènes de résistance, des transcriptases inverse, des protéines kinases (Maleck *et al.*, 2000, Du et Chen 2000) et notamment les gènes codant les protéines PR.

Le contrôle de la transcription des gènes cibles par les protéines WRKY semble se faire le plus souvent de façon positive. Mais certains facteurs de transcription peuvent être à la fois activateurs et répresseurs selon leurs cibles. Par exemple, la protéine AtWRKY6 régule positivement PR1 mais négativement son propre promoteur (Robatzek et Somssich, 2000).

Toutefois, Maleck *et al.* (2000) proposent que les protéines WRKY co-répriment le régulon PR1 en absence de pathogènes mais que lors d'une infection, une dérépression est alors mise en place (Rowland *et al.*, 2001). AtWRKY 25 et 33 participent directement ou indirectement à la régulation négative des gènes dépendant de l'acide salicylique (Andreasson *et al.*, 2005).

Les gènes *PR*

Outre la fréquence de boîtes W dans leurs promoteurs, plusieurs travaux suggèrent le rôle des protéines WRKY dans la régulation de l'expression des gènes *PR*. L'expression des gènes

WRKY est en effet très souvent co-réglée avec celle de ces gènes de défense, en particulier lors de l'infection par des agents pathogènes ou l'application de molécules élicitrices (Rushton *et al.*, 1996, Eulgem *et al.* 1999, Yang *et al.*, 1999, Dellagi *et al.* 2000, Yamamoto *et al.*, 2004).

Cependant, les résultats les plus marquants proviennent d'expériences de sur-expression de gènes *WRKY* (Robatzek et Somssich, 2002, Chen et Chen 2002, Li *et al.* 2004). Ainsi, la sur-expression de *AtWRKY18* active l'expression des gènes codant les protéines PR1, 2 et 5 chez *Arabidopsis* (Chen et Chen 2002). Li *et al.* 2004 ont également mis en évidence l'activation de *PR2* et *PR5* par *AtWRKY70*, alors qu'il réprime les gènes impliqués dans la voie de l'acide jasmonique (*AtCOR1*, *AtVSP1* et *PDF1.2*).

L'ensemble des travaux cités ci-dessus montre cependant que les mécanismes de régulation sont complexes. Ainsi, la protéine NPR1 semble réguler certains gènes *WRKY* mais peut elle-même être régulée par d'autres protéines *WRKY* ou ne pas avoir de relation avec elles (Yu *et al.* 2001).

Les gènes *RLK*

Les gènes *Receptor Like Kinase (RLK)* semblent être d'autres gènes cibles des facteurs *WRKY* (Du et Chen, 2000, Robatzek et Somssich, 2002, Chen *et al.*, 2003, Rocher *et al.*, 2005).

Les protéines *RLK* sont réparties en trois groupes selon la structure du domaine extracellulaire qui est liée à leur fonction. Elles constituent une très grande famille et interviennent donc dans des processus métaboliques très variés. Toutefois, leur mécanisme d'action reste le même : ces protéines trans-membranaires perçoivent un stimulus externe et le transmettent à travers la membrane en déclenchant des cascades de phosphorylations, conduisant à l'expression de gènes cibles. La classe de protéines *RLK* la plus étudiée est celle caractérisée par un motif *LRR* et présente donc une structure de protéines de résistance. Parmi elles, *Xa21* (Song *et al.*, 1995) ou *FLS2* (Gomez-Gomez et Boller, 2000) peuvent interagir directement avec le produit du gène d'avirulence d'un pathogène bactérien.

Des protéines *RLK* peuvent aussi reconnaître des signaux extracellulaires produits par les cellules végétales lors de réponses de défense.

La sur-expression de *CRK5*, une protéine *RLK*, confère aux plantes d'*Arabidopsis* une résistance accrue à *Pseudomonas syringae* mais provoque également des modifications de croissance des feuilles (Chen *et al.*, 2003).

Lors de la recherche de promoteurs de gènes contenant plusieurs boîtes W, Du et Chen ont identifié en 2000 4 gènes codant des *RLK* (*RLK3*, 4, 5 et 6) dont l'expression est induite par

l'acide salicylique et un agent pathogène. Ils ont démontré que la protéine AtWRKY18 est capable de se fixer à ces séquences régulatrices mais surtout que l'inductibilité par l'acide salicylique dépend de l'intégrité de certaines boîtes W donc de la fixation de facteurs WRKY.

Plus récemment, la présence de deux boîtes W fonctionnelles a été montrée comme indispensable à l'induction de la transcription du gène SFR2 par d'acide salicylique chez *Brassica oleracea* (Rocher *et al.*, 2005).

Les gènes WRKY

Etant donné la présence fréquente de boîtes W dans les promoteurs des gènes WRKY, la régulation de leur expression par des protéines WRKY semble fortement probable, et notamment leur auto-régulation. Effectivement, quelques protéines semblent capables de réguler elles-mêmes leur transcription de façon positive (comme AtWRKY22 et 29, Asai *et al.* 2002) ou négative (comme AtWRKY6, Robatzek et Somssich, 2002, PcWRKY1, Turck *et al.* 2004, et AtWRKY53 qui peut s'auto-réprimer mais aussi réprimer AtWRKY6, Miao *et al.*, 2004). De plus, la fréquence des boîtes W est plus nettement supérieure dans les promoteurs de gènes WRKY régulés par l'acide salicylique ou par une infection (Dong *et al.*, 2003). Ainsi, l'induction des gènes WRKY par de tels stress est sans doute dépendante de la fixation de protéines WRKY sur leur propre promoteur.

Les autres gènes cibles

D'autres gènes impliqués dans les réponses aux stress peuvent être régulés par les protéines WRKY. Parmi eux, nous pouvons citer le gène de la thiorédoxine, AtTRXh5, protéine ayant des propriétés réductrices (Laloi *et al.* 2004), le gène codant la (+)- δ -cadiène synthase (CAD1) participant à la biosynthèse de phytoalexines de type sesquiterpènes (Xu *et al.*, 2004).

Des études globales du transcriptome (puces à ADN, cDNA-AFLP), notamment de plantes qui sur-expriment un facteur WRKY, ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'identification de gènes cibles de ces facteurs de transcription.

Les analyses de cDNA-AFLP sur les plantes sur-exprimant AtWRKY6 révèlent certains gènes différentiellement exprimés impliqués dans le signal calcique, la défense, la sénescence, des kinases (Robatzek et Somssich, 2002). En particulier, le gène *AtSIRK*, Senescence-induced receptor like kinase) a été démontré comme un gène spécifiquement régulé par AtWRKY6.

Les analyses par micro-arrays montrent que AtWRKY70 active l'expression de gènes de défense (WRKY, PR2, thaumatine), de stress oxydatif (GST, peroxydase), des gènes de résistance (protéines LRR), de sénescence ou de modification des parois (Li *et al.* 2004).

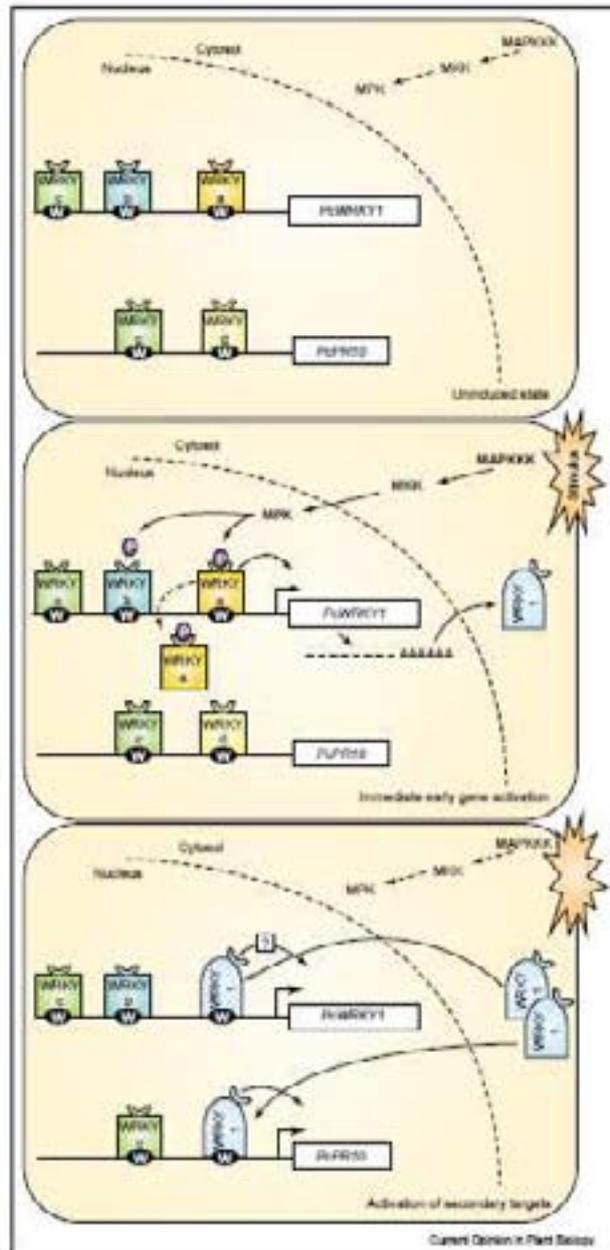


Figure 16 : schéma hypothétique résumant les interactions des protéines WRKY sur les boîtes W et plus particulièrement l'activation de la transcription du gène *PcWRKY1* pour la régulation des gènes *PR*, chez le Persil (Ulker et Somssich, 2004).

AtWRKY70 peut réprimer des gènes de la voie de l'acide jasmonique (VSP1 et 2), des gènes de signalisation, des gènes codant des RLK associées à la paroi ou certains facteurs de transcription.

En parallèle, la technique d'immuno-précipitation de la chromatine à partir de suspension cellulaire permet d'identifier *in vivo*, des complexes protéine/ADN à partir desquels la séquence d'ADN peut être identifiée par amplification par PCR. Turck *et al.* (2004) ont appliqué cette technique afin d'identifier les gènes régulés par la protéine PcWRKY1 en réponse à l'éliciteur fongique Pep25. Ils ont observé une interaction de ce facteur de transcription sur son propre promoteur, sur celui de *PcWRKY3* et de *PcPRI*. De plus, la résolution de l'immuno-précipitation de chromatine permet d'identifier quelle partie d'une région du promoteur est liée par la protéine. Ces auteurs montrent que certaines boîtes W du promoteur de *PcWRKY1* lient préférentiellement cette protéine. Ils ont aussi remarqué, de façon intéressante, que ces boîtes W qui lient préférentiellement PcWRKY1 mais aussi celles du promoteur *PcPRI* étaient occupées de façon constitutive par des protéines WRKY, indépendamment de l'élicitation (**figure 16**).

Une telle technique a été appliquée par Miao *et al.* (2004) pour identifier des cibles de AtWRKY53. Parmi 100 séquences aléatoires régulées par AtWRKY53, cette équipe a pu identifier 8 gènes WRKY et plusieurs gènes codant des facteurs de transcription (MYB, ERF, protéines à homéodomaine).

L'immunoprécipitation de la chromatine présente l'avantage de détecter les gènes cibles dans des cellules où le facteur de transcription est présent à des niveaux endogènes "normaux" et non lorsqu'il est sur-exprimé. C'est cependant une technique délicate à mettre en œuvre.

Les approches de transgénèse et rôles dans la défense

Parmi les nombreux gènes WRKY étudiés, peu d'entre eux ont fait l'objet d'approche par transgénèse, malgré l'utilité de cet ensemble de techniques. Seules 5 équipes ont effectué des expériences de sur-expression, sous-expression, ou d'études de mutants pour mieux appréhender le rôle des facteurs de transcription WRKY *in planta* (Chen et Chen 2002, Robatzek et Somssich, 2002, Li *et al.* 2004, Miao *et al.*, 2004, Rizhsky *et al.* 2004). A cela, peuvent être ajoutées quelques expériences de transformation transitoire par *Agrobacterium tumefaciens* (Rushton *et al.*, 1996, Asai *et al.*, 2002). La plupart des lignées sur-exprimant ces facteurs WRKY présentent des altérations morphologiques des feuilles. Par contre, les lignées mutantes affichent rarement des modifications de phénotype.

La sur-expression de AtWRKY18, 29 et 70 (Chen et Chen 2002, Asai *et al.*, 2002, Li *et al.* 2004) a permis de mettre en évidence une augmentation de la résistance d'*Arabidopsis thaliana* vis-à-vis d'agents bactériens (*Erwina carotovora* et *Pseudomonas syringae*) ou fongiques (*Botrytis cinerea*). De plus, les plantes sous-exprimant AtWRKY70 sont plus sensibles à *E. carotovora*.

En revanche, un gène WRKY identifié chez l'orge, induit lors d'une infection par l'oïdium, joue un rôle de régulateur négatif des mécanismes de résistance vis-à-vis de ce champignon. Effectivement, des plantes sous-exprimant ce gène WRKY (par une expérience d'interférence d'ARN double brin transitoire) révèle une augmentation de la résistance à l'oïdium. C'est ici la première mise en évidence directe d'une protéine WRKY régulant négativement la résistance de la plante (Eckey *et al.*, 2004).

Il est important de souligner les travaux qui ont démontré le rôle d'une protéine WRKY très particulière dans la défense des plantes : RRS1-R. (Lahaye, 2002, Deslandes *et al.*, 2002, 2003). Cette protéine combine la présence des domaines TIRR (Toll Interleukine Receptor), NBS (Nucleotid Binding Site), LRR (Leucine-Rich Repeat) qui caractérisent les protéines de résistance (protéine R) et d'un domaine WRKY. A elle seule, cette protéine semble capable d'interagir avec le produit du gène d'avirulence PopP2 de *Ralstonia solanacearum* et d'être adressée dans le noyau pour contrôler l'expression de gènes par l'intermédiaire des boîtes W. Cette protéine confère aux plantes d'*Arabidopsis thaliana* une résistance vis-à-vis de plusieurs souches de bactéries *Ralstonia solanacearum* (Deslandes *et al.*, 1998, 2002).

Ainsi, les facteurs de transcription WRKY **participent largement à la régulation des réponses de la plante aux infections par des agents pathogènes**. Certaines de ces protéines peuvent jouer un rôle protecteur dans la défense de la plante mais d'autres au contraire, peuvent participer à la sensibilité.

Les autres fonctions des protéines WRKY

Il a également été démontré que les facteurs de transcription WRKY sont impliqués dans d'autres phénomènes biologiques. L'expression de certains gènes est régulée en réponse aux stress abiotiques : par la blessure (Hara *et al.*, 2000); les conditions de température ou/et d'humidité (Huang *et al.*, 2002, Rizhsky *et al.* 2002, Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003, Marè *et al.*, 2004), la dormance (Pnueli *et al.*, 2002)

D'autres implications de ces protéines ont été montrées dans le développement de la plante : dans les processus de sénescence (Hinderhofer et Zentgraf 2001, Robatzek et

Somssich 2001, Robatzek et Somssich, 2002, Miao *et al.*, 2004) et le développement des trichomes (Johnson *et al.* 2002).

Leur rôle dans le métabolisme carboné a été mis en évidence dès les premiers travaux concernant de tels gènes. Effectivement, le premier membre identifié de cette famille, SPF1, a été décrit comme régulateur négatif du métabolisme carboné (Ishiguro et Nakamura, 1994). Par la suite, d'autres auteurs ont confirmé l'implication des protéines WRKY dans cette voie métabolique (Rushton *et al.*, 1995, Sun *et al.* 2003).

De plus, des hormones telles que l'acide abscissique ou l'acide gibbérelique sont responsables de la régulation de gènes codant des facteurs de transcription WRKY (Xie *et al.* 2004, Zou *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2004).

Matériels et méthodes

Stade de développement	Stade 1	Stade 2	Stade 3	Stade 4	Stade 5
Jours après anthèse	20 jours	36 jours	71 jours (véraison)	91 jours	107 jours
Date de prélèvement	26/06/00	12/07/00	16/08/00	05/09/00	21/09/00
Poids moyen de la baie	0,137 g/baie	0,615 g/baie	1,4 g/baie	1,57 g/baie	1,7 g/baie

Tableau 2 : Caractéristiques des 5 stades de développement de la baie de raisin étudiés (*Vitis vinifera* cv Cabernet Sauvignon). Les baies ont été prélevées au vignoble de Latresne (33), immédiatement congelées dans l'azote liquide puis stockées à -80°C.

Antibiotiques	Milieu liquide	Milieu solide
Paromomycine	2 µg/ml	1,8 µg/ml
Cefotaxime	200 µg/ml	
Timentin		250 µg/ml

Tableau 3 : Concentration en antibiotiques utilisés dans les différents milieux de culture des Vignes transformées (*Vitis vinifera* cv porte greffe 41B).

Mc Cown woody plant medium	2,46 g/l
Saccharose	30 g/l
ANA	0,2 mg/l
Agar	5 g/l
Charbon actif	2,5 g/l
	pH 5,8

Tableau 4 : Composition du milieu Mac Cown solide utilisé pour l'entretien des plantules de Vignes (*Vitis vinifera* cv porte greffe 41B)

Suspensions cellulaires et plants de Vigne

Les baies de raisin *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon utilisées proviennent des vignobles de l'INRA - Domaine du Grand Parc (parcelle P21), situés à Latresne (33). Les grappes ont été prélevées entre les mois de juin et de septembre 2000 à 5 stades représentatifs du développement du fruit (**tableau 2**). Les baies ont été immédiatement congelées dans de l'azote liquide et stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les boutures de Vigne *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon sont produites à partir de sarments de Vigne à un œil prélevés dans le vignoble du Château Couhins à Léognan (33). Elles ont été régénérées selon la technique décrite par Ollat, 1997. Ces boutures nous ont été aimablement fournies par le Dr N. Ollat (INRA de Bordeaux). Avant les traitements, les boutures sont cultivées en chambre climatisée avec une photopériode de 16 h de jour à 25°C et 8 h d'obscurité à 20°C , sous 75 % d'humidité, arrosées tous les deux jours par une solution nutritive (Pouget et Delas, 1984).

Les cellules de Vigne embryogènes sont issues du porte-greffe 41 B (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri*). Elles ont été préparées selon les techniques décrites précédemment par Mauro *et al.* (1992, 1995) et Coutos-Thévenot *et al.* (1992). Ces cellules nous ont été fournies par le laboratoire des Pr. S. Delrot et P. Coutos-Thévenot de l'Université de Poitiers. Les cellules sont entretenues dans un milieu GM (**tableau 5**) additionné de $5\ \mu\text{M}$ de NOA (acide β -naphthoxyacétique), sous agitation (110 rpm) à 22°C et à l'obscurité. Les antibiotiques de sélection sont additionnés pour les lignées transformées (**tableau 3**). Ce milieu contenant l'auxine NOA est appelé GM+ alors que le milieu privé d'hormone est nommé GM0.

Ces cellules sont capables de générer des embryons (par embryogenèse somatique), dès lors qu'elles sont cultivées sur un milieu dépourvu d'auxine (Coutos-Thévenot *et al.*, 1992), le milieu GM0 privé de NOA (**tableau 5**). Les embryons sont ensuite transférés sur un milieu solide, le milieu "Mc Cown woody plant medium" (**tableau 4**) (Lloyd et McCown, 1980), additionné d'antibiotiques pour les plantes transformées (timentin 250 mg/l, paromomycine

<u>Macroéléments</u>	GM	ME
KNO ₃	950 mg/l	2500 mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	825 mg/l	134 mg/l
CaCl ₂ , 2H ₂ O	220 mg/l	150 mg/l
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	-	150 mg/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	180 mg/l	250 mg/l
KH ₂ PO ₄	85 mg/l	-
<u>Microéléments</u>		
MnSO ₄ , H ₂ O	16,9 mg/l	16,9 mg/l
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	8,5 mg/l	8,6 mg/l
H ₃ BO ₃	6,2 mg/l	6,2 mg/l
KI	0,83 mg/l	0,83 mg/l
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0,25 mg/l	0,25 mg/l
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,025 mg/l	0,025 mg/l
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,025 mg/l	0,025 mg/l
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	27,8 mg/l	27,8 mg/l
EDTA disodique	37,3 mg/l	-
<u>Vitamines</u>		
myo-inositol	100 mg/l	100 mg/l
acide nicotinique	5 mg/l	1 mg/l
D(+)-panthoténate de	-	1 mg/l
(+)-biotine	0,05 mg/l	0,01 mg/l
chlorhydrate de pyridoxal	0,5 mg/l	1 mg/l
dichlorure de thiamine	0,5 mg/l	1 mg/l
<u>Composés organiques</u>		
Saccharose	-	20 g/l
hydrolysate de caséine	1 g/l	0,25 g/l
maltose	18 g/l	-
glycérol	4,6 g/l	
<u>Substances de croissance</u>		
Kinétine	-	0,2 mg/l
acide naphthalène acétique		0,1 mg/l
Acide β-naphtoxyacétique	(5 μM)	
	pH 5,8	pH 5,8

Tableau 5 : Composition des milieux GM et ME utilisés respectivement pour la culture de cellules embryogènes de Vignes (*Vitis vinifera* cv porte greffe 41B) des cellules de *Vitis vinifera* cv Cabernet Sauvignon. Le milieu GM dépourvu de substances de croissance est nommé **GM0** alors qu'après ajout de 5 μM de NOA, il est désigné par **GM+**.

1,8 mg/l). Les plantules sont cultivées *in vitro* en chambre climatisée à 25°C avec une photopériode de 16 h de jour à 25°C et 8 h d'obscurité à 20°C.

Les cultures de suspensions cellulaires de *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon utilisées pour l'isolement de protoplastes ont été préparées au sein du laboratoire de Mycologie et Biotechnologie Végétale de l'Université Bordeaux 2 (Pr. J.-M. Mérillon). Cette souche a été initiée à partir de cellules de la pulpe de jeunes fruits. Les cultures cellulaires liquides sont ensuite obtenues à partir de cals (culture en milieu solide). Elles sont cultivées sur un milieu d'entretien (ME, **tableau 5**) et placées sous agitation (110 rpm) à 25°C, sous une lumière continue (5000 lux). La souche est entretenue dans un nouveau milieu tous les 7 jours.

Les plants de Tabac

Les plants de Tabac *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi sont utilisés pour la transgénèse. Les plantes *in vitro* sont cultivées à 25°C avec une photopériode de 16 h et à 20°C la nuit pendant 8 h, sur milieu nutritif gélosé MS (Murashige et Skoog, 1962) fourni par Duchefa (**tableau 6**). Pour la production de graines, les plantes sont transférées en serre dans des pots contenant un mélange de terreau/vermiculite (3/1, v/v) et acclimatées pendant trois semaines en mini-serre.

Avant les semis, les graines de Tabac sont préalablement stérilisées en surface par une incubation de 10 minutes dans une solution contenant 2,5 % de chlore actif et 0,02 % de Triton X-100 (Sigma). Les graines sont ensuite rincées 5 fois dans de l'eau stérile avant d'être semées sur un milieu gélosé MS.

Arabidopsis thaliana

L'écotype Columbia (Col-O) d'*Arabidopsis thaliana* est utilisé pour la transgénèse. Les germinations des graines se font, après stérilisation en surface (comme décrit chez le Tabac), sur un milieu MS gélosé contenant 15 g/L de saccharose. Les plantules sont alors repiquées dans un mélange de terreau et de vermiculite (3/1) et placées en mini-serre pendant deux semaines dans une chambre de culture. Elles sont ensuite cultivées à 25°C sous une photopériode de 16 h et à 20°C la nuit pendant 8 h.

La souche d'*Escherichia coli* **Easypore** (Eurogentec), dérivée de la souche K12, est utilisée pour la plupart des clonages.

Milieu MS	liquide	gélifié
MS (Duchefa)	4,41 g/l	4,41 g/l
Saccharose	30 g/l	30 g/l
Phytoagar		8 g/l
	pH 5,8	pH 5,8

Tableau 6 : Composition du milieu MS (Murashige and Skoog, 1962) utilisé pour la culture *in vitro* de Tabac et d'*Arabidopsis thaliana*.

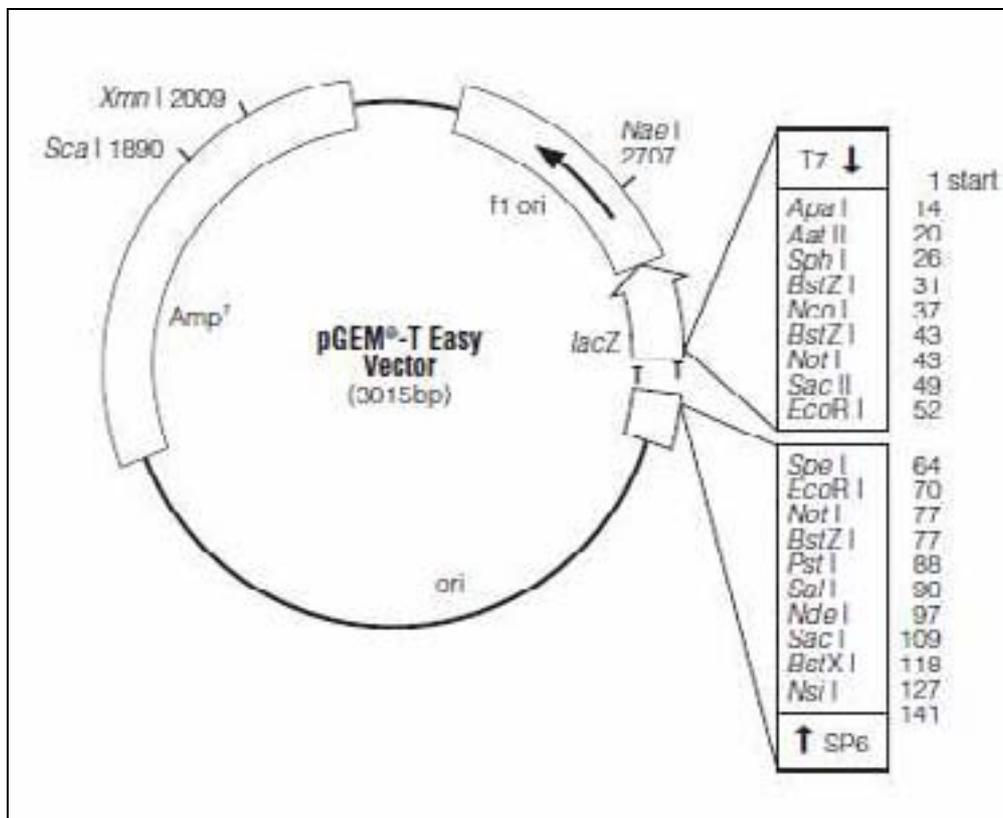


Figure 17 : Structure du vecteur pGEM-T Easy (Promega) avec son site multiple de clonage;

Son génotype est : F', *araD139* (*ara,leu*)7697, *lac X74*, *galU*, -, *mcrA* - (*mrrhsdRMS-mcrBC*), *rpsL*, *dor* (peut être transformée par de grands plasmides), *80dlacZ M15* (sélection blanc/bleu), *endA1*, *nupG*, *recA1* (augmente la stabilité de l'insert).

La souche d'*E. coli* **GM 2163** (aussi nommée K12 ER2925, New England Biolabs) est utilisée pour multiplier les plasmides servant aux transformations de protoplastes lors des expériences d'expression transitoire. Son génotype est : *ara-14*, *leuB6*, *fhuA31*, *lacY1*, *tsx78*, *glnV44*, *galK2*, *galT22*, *mcrA*, *dcm-6*, *hisG4*, *rf(zgb210::Tn10)TetS*, *endA1*, *rpsL136*, *dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2*.

Les souches d'*E. coli* sont cultivées sous agitation à 37°C dans du milieu LB (**annexe 1**).

La souche *Agrobacterium tumefaciens* **LBA 4404** contenant le plasmide Ti à octopine (pTiAch5) a permis la transformation du Tabac et d'*Arabidopsis thaliana*. Elle contient le gène conférant la résistance à la rifampicine (Rif^R).

La souche *Agrobacterium tumefaciens* **EHA 105** est une souche particulièrement virulente dérivée de la souche EHA 101. Elle possède un plasmide Ti à nopaline et leucinopine (Hood *et al.*, 1993). Elle contient le gène conférant la résistance à la rifampicine (Rif^R).

Elle est utilisée pour la transformation des cellules embryogènes de Vigne 41 B.

Les souches d'*A. tumefaciens* sont cultivées à 28°C sous agitation dans du milieu LB (**annexe 1**).

Le vecteur de clonage **pGEM-Teasy** (Promega) est utilisé pour la plupart des clonages (**figure 17**). Ce plasmide est sous forme linéaire et le site de clonage est bordé par une thymidine aux extrémités 3'OH. La présence de ces bases permet la ligation de produit d'amplification par PCR utilisant la *Taq* polymérase (qui ajoute une adénosine en 3').

Les bactéries transformées par le plasmide peuvent être sélectionnées grâce à leur résistance à l'ampicilline (gène de la β -lactamase) et les plasmides contenant l'insert grâce au système "blanc/bleu". En effet, le plasmide contient un gène codant le peptide α de la β -galactosidase qui est interrompu quand un fragment d'ADN y est inséré.

Le produit de ce gène complète le fragment ω de la β -galactosidase dont le gène est porté par l'épisome F' de certaines souches d'*E. coli*. En présence du substrat chromogène, X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D galactoside) et d'IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside, inducteur de l'opéron lactose), les colonies bactériennes contenant un plasmide vide mais ligué sur lui-même seront colorées en bleu (par le fait de l'hydrolyse du X-Gal par

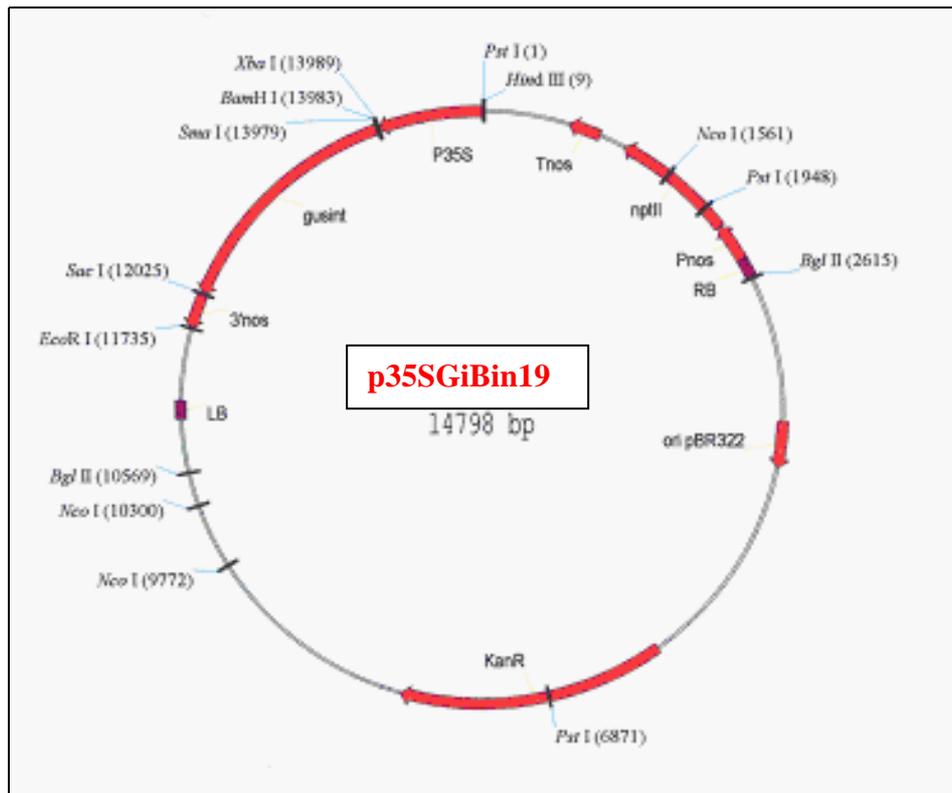


Figure 18 : Structure du vecteur p35SGiBin19 (Karimi et al, 2000)

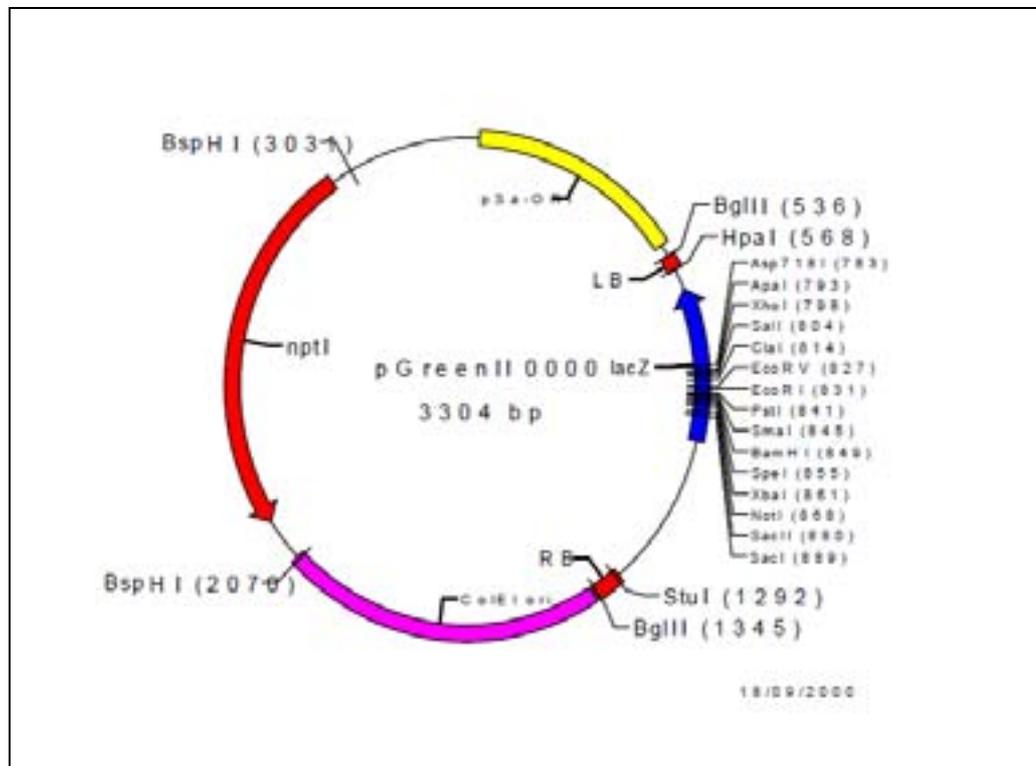


Figure 19 : Structure du squelette du vecteur pGreen II avec son site multiple de clonage.

la β -galactosidase), alors que les colonies transformées par un plasmide recombinant seront blanches.

Le vecteur binaire **p35SGiBin19** (**figure 18**, Karimi *et al.*, 2000) est utilisé pour la transformation des agrobactéries. Il dérive du pBin19 (Bevan, 1984) et possède l'origine de réplication (RK2) dans *E. Coli* et *A. tumefaciens*. Il contient un gène de résistance à la kanamycine capable de s'exprimer dans les bactéries permettant ainsi de les sélectionner. Entre les bordures droite et gauche, sont situés le gène *nptII* (néomycine phosphotransférase) conférant la résistance à la kanamycine aux plantes transformées, le promoteur fort constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (35S CaMV) permettant une expression constitutive du gène placé sous son contrôle, le gène (contenant un intron) codant la β -glucuronidase (GUS) et le terminateur fort de la nopaline synthase.

Le vecteur **pGreen II** (<http://pgreen.ac.uk/pgreenII/pgreenII.htm>, Hellens, 2000) est un vecteur binaire de taille très inférieure au p35SGiBin19 et donc beaucoup plus facile à manipuler (**figure 19**). Il possède les origines de réplication pour *E. coli* mais il ne peut se répliquer dans *A. tumefaciens* que en présence d'un autre plasmide, le pSoup qui est maintenu dans la souche GV3101 d'*A. tumefaciens* (**figure 21**). Il contient également le gène de résistance à la kanamycine dans *E. coli* (*NptI*). Entre ces bordures droite et gauche, se situent un site multiple de clonage dans lequel ont été intégrées différentes cassettes selon les utilisations requises : le promoteur 35S du virus de la mosaïque du Chou-fleur entre les sites de restriction *Apa I* et *Xho I*, le gène codant la glucuronidase, entre les sites *Sma I* et *Xba I* succédé par le terminateur du gène de la nopaline synthase entre les sites *Not I* et *Sac I*, ainsi que le gène de résistance à la kanamycine permettant de sélectionner les plantes transformées (**figure 20**).

Pour chacun des traitements effectués sur des boutures entières, le même protocole est appliqué. Les boutures sont âgées d'environ 2 mois et cultivées en chambre climatisée. A chaque point de la cinétique (de 2 h à 24 h), les feuilles de trois plantes sont prélevées, rassemblées et plongées dans l'azote liquide pour être ensuite conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

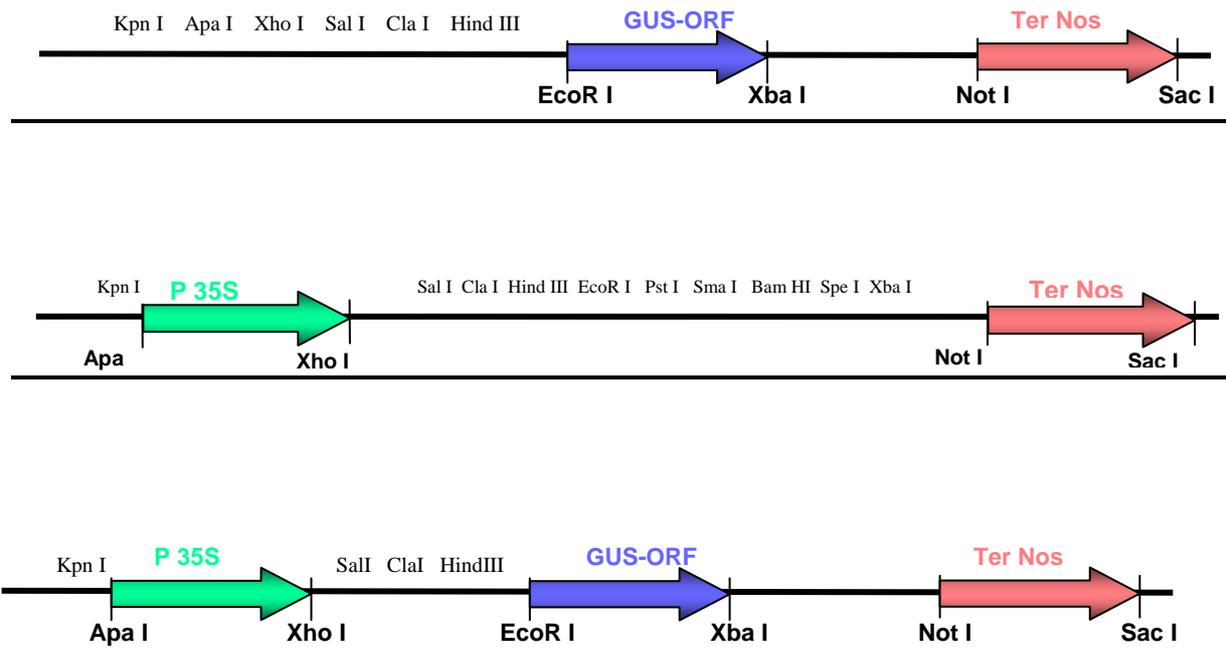


Figure 20 : Structure des trois plasmides générés par intégration de différentes cassettes dans le plasmide pGreen II au niveau du site multiple de clonage.

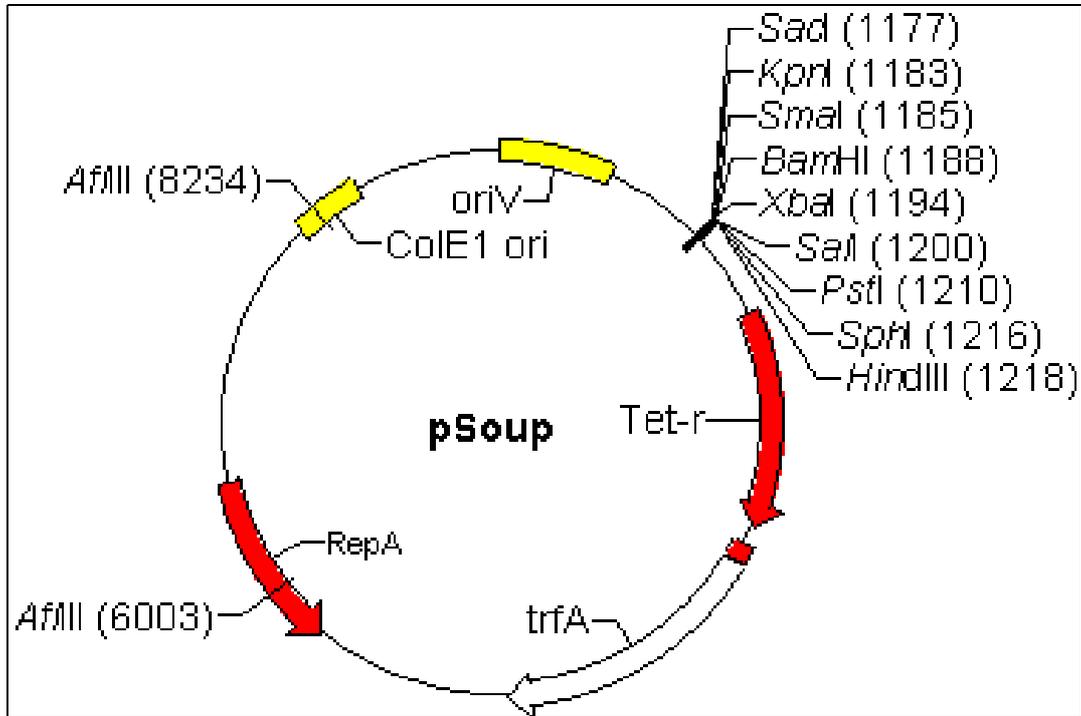


Figure 21 : Structure du plasmide pSoup, indispensable pour la répllication du pGreen dans les bactéries *Agrobacterium tumefaciens*.

Blessure

Les boutures de Vigne sont blessées par des coupures effectuées aux ciseaux. Au temps 0, quatre feuilles (pleinement développées) par plantes sont entaillées chacune quatre fois et laissées sur le plant.

Traitements chimiques

Le **tableau 7** récapitule les concentrations et le solvant utilisé pour chacun des traitements. Environ 1 ml de solution est pulvérisé sur chaque bouture de Vigne.

Une solution stock d'acide salicylique (Sigma) est préparée à 25 mM dans de l'eau. Le traitement est effectué par pulvérisation d'une solution diluée à 5 mM sur les boutures de Vigne.

La solution fille de peroxyde d'oxygène (H₂O₂, Sigma), pulvérisée sur les boutures de Vignes est préparée à 10 mM dans de l'eau à partir d'une solution stock à 30 % (v/v).

L'acide jasmonique (Sigma) est dissous dans l'éthanol absolu chaud à une concentration de 15 mM, son utilisation finale se fait à 150 µM contenant 1 % d'éthanol.

Le traitement par l'éthéphon se fait avec une solution à 10 mM diluée à partir d'une solution mère à 1 M dans de l'eau.

La solution stock d'ergostérol est préparée à 10 mM dans de l'éthanol absolu bouillant dans lequel on ajoute 1 % de triton. La pulvérisation sur boutures de Vigne se fait avec une solution finale à 200 µM dans de l'éthanol 2 % et du triton 0,02 %.

Des traitements contrôles sont effectués par des pulvérisations des différents solvants (eau, éthanol 1 % ou éthanol 2 % et triton 0,02 %)

Infection de feuilles détachées par le mildiou

Le mildiou, *Plasmopara viticola*, est un champignon obligatoire qui est cultivé sur la face inférieure de feuilles de Vigne placées en boîte de Pétri sur un papier filtre humidifié. Sa croissance s'effectue dans une chambre de culture à 22°C ; il est soumis à une photopériode de 16 h de jour et de 8 h de nuit. Il est repiqué sur une nouvelle feuille de Vigne tous les 7 jours.

Pour les inoculations, des feuilles de Vigne pleinement développées sont prélevées sur des boutures cultivées en serre juste avant les infections. Chaque feuille est déposée dans une boîte de Pétri, face supérieure vers le bas contre un papier filtre humidifié de 3 ml d'eau stérile, pour assurer la survie des feuilles.

Solutions	Concentration Stock	Concentration finale
Acide salicylique (SA)	25 mM dans de l'eau	5 mM
Ethéphon	1 M dans de l'eau	10 mM
H ₂ O ₂	30% (v/v) dans de l'eau (9,79 M)	10 mM
Acide jasmonique (JA)	15 mM dans de l'éthanol absolu chaud	150 µM dans de l'éthanol 1%
Ergostérol	10 mM dans de l'éthanol absolu bouillant et du triton 1 %	200 µM dans de l'éthanol 2 % et du triton 0,02 %

Tableau 7 : Composition et préparation des solutions "élicitrices" appliquées sur les boutures de Vignes (cv Cabernet Sauvignon)

Le champignon, ayant poussé durant 7 jours sur une feuille de Vigne, est mis en suspension dans de l'eau stérile, amené à une concentration de 5000 spores par ml. La quantité de spores est évaluée par comptage sur cellule de Malassez.

La suspension est maintenue dans la glace jusqu'au moment de l'inoculation. L'infection se fait par dépôt de gouttes de 15 µl par feuille, sur la face inférieure.

Le prélèvement de 2 feuilles par temps s'effectue de 30 minutes après l'infection jusqu'à 24 h ; ces feuilles sont rassemblées et tout de suite plongées dans l'azote liquide pour être conservées à -80°C.

Sous-clonage de fragment d'ADN

Réaction d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les amorces sont synthétisées par la société Genome Express (France). L'amplification de l'ADN par PCR (Saiki *et al.*, 1985) est réalisée à partir d'une matrice (10 à 100 ng) provenant de banque ADNc, de colonies bactériennes ou ADNc simple brin (RT-PCR).

Les réactions de PCR sont réalisées dans des microtubes de 200 µl en utilisant : 0,4 µmoles d'amorces sens, 0,4 µmoles d'amorces antisens, 0,4 mmoles de dNTP (Promega), 5 µl de tampon 10 X (**annexe 1**), 2,5 U de *Taq* polymérase (produite au laboratoire) pour un volume réactionnel final de 50 µl. Le programme suivant est appliqué sur l'appareil iCycler (Biorad).

Dénaturation	95°C	3 min
25-35 cycles :		
Dénaturation	95°C	30 sec
Hybridation	Tm	45 sec
Élongation	72°C	selon la longueur de l'amplifiat
Elongation	72°C	7 min

Pour certains clonages délicats, où il faut limiter les erreurs de séquence produite par l'ADN polymérase (en vue de l'expression protéique ou de l'étude du promoteur), les amplifications par PCR sont réalisées avec une autre ADN polymérase, beaucoup plus fidèle, la TurboPfu (Stratagen). Les mêmes conditions d'amplifications sont utilisées, excepté pour la

Tampon TAE	Concentrations
Tris HCl Acétate de sodium EDTA	40 mM 5 mM 1 mM pH 8
Solution SSC 20 X	
NaCl Citrates de sodium	3 M 0,3M
Solution de Denhardt 50 X	
Ficoll 400 Polyvinylpyrrolidone BSA	1 % (p/v) 1 % (p/v) 1 % (p/v)

Tableau 8 : Composition des solutions utilisées pour l'analyse des fragments PCR et leur hybridation sur membrane de nitrocellulose : solutions de TAE, de SSC 20 X et de Denhardt 50 X.

température d'hybridation qui doit être abaissée de 5°C. Le tampon de la réaction PCR est fourni avec l'enzyme.

Electrophorèse sur gel d'agarose, purification et dosage des acides nucléiques

L'électrophorèse des acides nucléiques est réalisée dans un gel d'agarose (1,4 % p/v) contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml) et du tampon TAE 0,5 X (**tableau 8**) selon la technique décrite par Sambrook *et al.* (1989). Après migration dans un champ électrique de 100 volts, les fragments d'ADN sont visualisés sous lumière ultraviolette (320 nm) et les gels sont numérisés en utilisant le système «Gel Doc Quantity One » (Biorad). Un marqueur de masse moléculaire (100 pb ou 1 kb Ladder – Promega) permet de déterminer la taille des fragments d'ADN.

Les fragments d'intérêt amplifiés par PCR sont directement purifiés à partir du produit de PCR (si un fragment unique avait été amplifié) ou bien découpés dans le gel d'électrophorèse. Dans les deux cas, les purifications ont été réalisées à l'aide du kit QIAquick (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Les purifications permettent d'éliminer tous les réactifs de la réaction d'amplification par PCR (amorces, nucléotides, polymérase, sels).

Les acides nucléiques sont quantifiés par spectrophotométrie d'absorption (GeneQuant Pro, Amersham) en considérant qu'à 260 nm, une unité de densité optique d'acides nucléiques correspond à une concentration de 40 ng/µl d'acides nucléiques simple brin et de 50 ng/µl d'acides nucléiques double brin.

Les absorbances à 230 et 280 nm sont également mesurées afin d'évaluer respectivement les contaminations en polysaccharides et en protéines. Les rapports de densités optiques 260 nm/230 nm et 260 nm/280 nm permettent d'estimer la pureté des préparations (Sambrook *et al.*, 1989).

Ligation dans le vecteur de clonage

Les fragments purifiés peuvent être clonés dans un plasmide pGEM -T Easy (Promega) en suivant les recommandations du fournisseur. Le rapport molaire vecteur/insert utilisé est en général de 1/3. La ligation de l'insert a été réalisée grâce à la l'ADN ligase T4 (Promega) dans un volume de 10 µL pendant 16 h à 4°C en suivant les recommandations du fournisseur.

Transformation des bactéries compétentes par choc électrique

Pour transformer efficacement des bactéries par électroporation, il est indispensable de précipiter les produits de ligation. Ainsi, 0,1 volume de glycogène (20 mg/ml) et 2,5 volumes

d'éthanol absolu froid sont ajoutés au produit de ligation, et le mélange est incubé 30 minutes à -20°C. Après centrifugation (5 minutes, 16 000 g, centrifugeuse 5415D, Eppendorf), le surnageant a été éliminé. Le culot d'acides nucléiques est lavé par 100 µl d'éthanol absolu, séché et remis en suspension dans de l'eau distillée.

Dans une cuve d'électroporation refroidie dans la glace, 2 µl de produit de ligation sont mélangés à 38 µl de bactéries *Escherichia coli* K12 rendues électrocompétentes (Sambrook *et al.*, 1989). Un choc électrique de 1800 V est alors appliqué au mélange produit de ligation/bactéries à l'aide d'un électroporateur (Electroporator 2510, Eppendorf). Immédiatement après le choc électrique, les bactéries sont reprises dans 960 µl de milieu LB (**annexe 1**) puis transférées dans un tube à hémolyse et placées sous agitation (140 rpm) à 37°C pendant 1 h 30. Deux cents µl de bactéries sont étalées sur un milieu gélosé contenant du LB-agar-IPTG-X-Gal (**annexe 1**) permettant ainsi la détection de l'activité β-galactosidase. Après 16 h d'incubation à 37°C, les colonies positives, blanches, peuvent être sélectionnées. Une réaction de PCR est réalisée directement sur ces colonies, en utilisant des amorces internes au fragment cloné de manière à vérifier que le fragment désiré a bien été cloné. Une colonie bactérienne est prélevée à l'aide d'un embout stérile et directement placée dans le mélange réactionnel de la PCR. Les produits d'amplification sont ensuite analysés par électrophorèse en gel d'agarose.

Mini et midi-préparations d'ADN plasmidique

Les colonies positives retenues après amplification par PCR sont mises en culture dans du milieu liquide LB supplémenté en ampicilline pendant une nuit à 37 °C sous légère agitation (140 rpm). Les plasmides sont alors extraits et purifiés des cellules bactériennes en utilisant le kit "Qiaprep spin Miniprep " (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. L'ADN plasmidique purifié est quantifié par dosage spectrophotométrique avant d'être envoyé à un service de séquençage (Génome Express, France).

Pour obtenir une quantité de plasmides plus importante, notamment pour les transformations de protoplastes, des midi-préparations de plasmides sont effectués à l'aide du kit Pure yield Midi-Prep de Promega en respectant les recommandations de préparation. Ceci permet d'obtenir au moins 100 µg de plasmides purifiés à partir d'une culture bactérienne de 50 à 100 ml.

Digestion d'ADN par des enzymes de restriction

Pour obtenir une hydrolyse totale, l'ADN est mis en présence d'une unité d'enzyme de restriction (Promega) par µg d'ADN. La réaction s'effectue dans le tampon fourni avec

l'enzyme, en présence de BSA à 0,1 mg/ml de 1 h à 16 h selon la quantité d'ADN à digérer. Le tampon et la température sont spécifiques pour chaque enzyme et spécifiés par le fournisseur.

Le produit de la réaction est soit contrôlé directement par électrophorèse sur gel d'agarose soit soumis à une seconde digestion. Dans ce cas, l'échantillon est au préalable purifié par une extraction avec un volume de phénol/chloroforme (1/1) puis avec un volume de chloroforme et ensuite précipité dans de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 3 volumes d'éthanol absolu. Le culot, rincé par de l'éthanol 70 % peut être soumis à une nouvelle digestion.

Étude d'expression génique par RT-PCR

Extraction d'ARN totaux

Chacune des solutions utilisées lors de l'extraction des ARN est au préalable traitée par addition de 0,1 % (v/v) de DEPC (Sigma), placée sous agitation pendant 16 heures puis autoclavée. Seuls, le Tris-HCl, le tampon d'extraction, le phénol, le chloroforme/IAA et l'éthanol ne sont pas soumis à ce traitement.

de Vigne

L'extraction des ARN à partir de baies de raisin, de feuilles, racines ou de cellules de Vigne est assez délicate du fait de la présence importante de polysaccharides et de polyphénols. La méthode d'Asif *et al.* (2000) ici, légèrement modifiée, mise au point sur la banane, s'est révélée très efficace sur notre matériel végétal pour obtenir des ARN de qualité avec un bon rendement.

Les échantillons de baies, feuilles ou racines de Vigne (environ 1 gramme de matière fraîche) sont finement broyés dans de l'azote liquide. La poudre obtenue est ensuite transférée dans un tube Falcon de 50 ml contenant 10 ml de tampon d'extraction [Tris HCl 100 mM pH 8,2 ; EDTA 20 mM pH 8 ; NaCl 1,4 M ; CTAB 2 % (p/v) ; β -mercaptoéthanol 0,1 % (v/v)] préalablement chauffé à 65°C. Le mélange obtenu est incubé pendant une heure à 65°C et agité régulièrement. Deux extractions consécutives au chloroforme/IAA (24/1, v/v) sont réalisées (15 min, 5000 g, centrifugeuse CR3i, Jouan). La phase aqueuse est récupérée et répartie dans des tubes Eppendorf de 2 ml et les ARN sont précipités par 3 M de LiCl pendant 16 heures à 4°C. Après centrifugation (20 min, 4°C, 16000 g, centrifugeuse 5415 R Eppendorf), le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans 500 μ l d'eau. Trois extractions successives au phénol, phénol/chloroforme/IAA (25/24/1, v/v/v) et chloroforme/IAA (24/1, v/v) sont réalisées. Le surnageant récupéré est transféré dans un tube

Eppendorf de 2 ml et additionné de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et de 3 volumes d'éthanol absolu froid puis placé au moins trois heures à -80°C . Après centrifugation (20 minutes, 4°C , 16 000 g), le culot contenant les ARN est lavé avec 500 μl d'éthanol 70 % (v/v) puis resuspendu dans de l'eau traitée au DEPC à raison de 100 μl par gramme de matériel végétal initial. Les ARN sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

des feuilles de Tabac

L'extraction des ARN totaux de feuilles de Tabac est réalisée à partir de 50 à 100 mg de matière fraîche en utilisant le kit TRI Reagent (Molecular Research Center, USA) et en suivant les recommandations du fournisseur. Les ARN sont conservés à -80°C dans de l'eau traitée au DEPC.

d'Arabidopsis thaliana

Les ARN totaux d'*Arabidopsis thaliana* (feuilles, tiges, racines) sont extraits en utilisant le kit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) en suivant le protocole fourni. Les ARN sont conservés à -80°C dans de l'eau traitée au DEPC.

Traitement à la DNase

Dans la majorité des cas, l'observation des ARN sur gel d'électrophorèse ou des produits de PCR effectués sur les ARN totaux a révélé la présence d'ADN génomique. Un traitement à la DNase s'est donc avéré indispensable avant d'utiliser ces échantillons pour des réactions de RT-PCR. Il est effectué en suivant les recommandations du fournisseur de l'enzyme (RQ1 DNase, Promega).

Le traitement des ARN se fait pendant 30 minutes à 37°C . Les ARN sont ensuite purifiés par trois extractions successives [au phénol, au phénol/chloroforme/IAA (25/24/1, v/v/v) et au chloroforme/IAA (24/1, v/v)]. Les ARN contenus dans la phase aqueuse de la dernière extraction sont précipités pendant 2 heures à -80°C après addition de 1/10 volume de NaAc 3 M pH 5,2 et 3 volumes d'éthanol absolu froid. Après centrifugation (25 min, 4°C , 16000 g), le surnageant a été éliminé. Le culot est finalement lavé dans de l'éthanol 70 % (v/v) et remis en suspension dans de l'eau traitée au DEPC. Les ARN sont conservés à -80°C .

Les dosages sont effectués par spectrophotométrie et la qualité des ARN vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose. L'absence d'ADNg est à nouveau contrôlée par amplification par PCR sur les ARN totaux.

Transcription inverse

La transcription inverse (ou RT, reverse transcription) est initiée à partir de 2 μg d'ARN totaux. Les ARN sont incubés à 75°C pendant 10 minutes en présence de 8,3 μM

d'oligonucléotides poly d(T)₁₅ (Eurogentec) dans un volume final de 15 µl. Après refroidissement rapide dans de la glace, la réaction de transcription inverse a été initiée de la façon suivante :

ARN - oligonucléotides poly d(T) ₁₅	15 µl
Tampon de transcriptase inverse 5 X	5 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
DTT (100 mM)	1 µl
Rnasin (40 U/µl)	1 µl
MMLV reverse transcriptase (200 U/µl)	1 µl

Tous les produits excepté l'oligonucléotide d(T)₁₅ proviennent de chez Promega.

La réaction se déroule pendant 60 minutes à 42°C. L'enzyme est ensuite inactivée par une incubation de 10 minutes à 95°C.

Ensuite, l'amplification par PCR est réalisée comme il a été décrit précédemment en utilisant 1 µl de réaction de transcription inverse comme matrice. Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose.

Pour les réactions de RT-PCR, la plupart des amorces sont choisies de manière à amplifier les extrémités 3' non traduites de chaque ADNc. En effet, pour des gènes appartenant à des familles multigéniques dont les régions codantes sont relativement bien conservées, il est nécessaire d'identifier des amorces dans la partie 3' non codante, généralement plus spécifique de chaque gène. Les séquences de chaque amorce sont répertoriées dans l'**annexe 2**. Par ailleurs, le nombre de cycles d'amplification est déterminé spécifiquement pour chaque gène pour garder un signal non saturé de façon à ce que l'amplification reste semi-quantitative. Pour les gènes étudiés, le nombre de cycles d'amplification varie entre 23 et 30 cycles.

RT-PCR semi-quantitative par hybridation avec une
sonde radioactive

Transfert des produits de RT-PCR sur
membrane de nitrocellulose

Les produits PCR sont résolus sur un gel d'agarose à 0,8 % (p/v) (**tableau 8**) par électrophorèse dans un tampon TAE 1X. L'électrophorèse est réalisée à 50 Volts pendant 15 minutes.

Le gel est ensuite équilibré dans une solution de NaOH à 0,4 M pendant 15 minutes sous agitation. Un transfert passif des acides nucléiques sur une membrane de nylon chargée

positivement (Hybond XL, Amersham) est effectué dans cette même solution de NaOH (0,4 M) pendant 2 heures (Sambrook *et al.*, 1989). Les acides nucléiques seront ensuite fixés de façon covalente par émission d'UV (1000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de membrane, appareil Stratalinker, Stratagene).

Marquage radioactif de la sonde

La sonde est préparée à partir d'un fragment d'ADN généré par PCR. 2,5 ng de cet amplifiat sont marqués par amorçage aléatoire grâce au kit Rediprime™ II (Amersham) avec 25 à 50 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (Amersham), en suivant les recommandations du fournisseur. La sonde radioactive est purifiée par filtration à travers une colonne de Sephadex G-50 (ProbeQuant™ G-50, Amersham). La sonde marquée est dénaturée par incubation 5 min à 95°C et immédiatement placée dans la glace.

Hybridation, lavages de la membrane et révélation

Une préhybridation de la membrane est réalisée pendant au moins trente minutes à 65°C dans la solution d'hybridation (SSC 5X, 0,5 % (p/v) SDS, Denhardt's 5X, ADN de sperme de saumon 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (**tableau 8**) sous agitation douce dans un four à hybridation. La sonde radioactive dénaturée est ensuite ajoutée à cette solution et l'hybridation s'effectue pendant 16 heures à 65°C. La membrane est alors lavée une fois à température ambiante dans une solution de SSC 2X, SDS 0,1 % (p/v) brièvement et deux fois 15 minutes à 65°C dans chacune des solutions suivantes : SSC 2X, SDS 0,1 % (p/v), SSC 1X, SDS 0,1 % (p/v) et SSC 0,1X, SDS 0,1 % (m/v). Enfin, les membranes sont enveloppées dans un film plastique de type Saran et exposées contre des écrans (Kodak) adaptés à la lecture par un Phospho-Imager (Biorad). Les temps d'exposition dépendant du niveau d'expression des gènes étudiés varient de 30 minutes à 16 heures.

Southern blot

Extraction d'ADN génomique

Les extractions d'ADN génomique de Vigne, de Tabac et d'*Arabidopsis thaliana* sont réalisées respectivement selon les protocoles décrits par Lodhi *et al.* (1994), Dellaporta *et al.*, (1983) et Edwards *et al.*, (1991).

Des mini-préparations d'ADN génomique des plants de Tabac et d'*A. thaliana* sont réalisées en utilisant le kit d'extraction DNEasy plant mini Kit (Qiagen) en respectant les recommandations du fournisseur.

Digestion d'ADNg, électrophorèse sur gel d'agarose et transfert sur membrane de nitrocellulose

20 µg d'ADN sont digérés par différentes enzymes de restriction (à raison de 2 U/µg d'ADN) pendant 16 h.

Les ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % dans du tampon TAE 0,5X, contenant du BEt (0,15 µg/ml). La migration s'effectue pendant 16 h à 45 V.

Le gel est ensuite incubé pendant 30 min dans une solution de HCl à 0,25 N, rincé trois fois dans de l'eau milliQ stérile, dénaturé trois fois 15 min dans une solution de NaCl 1,5 M et de NaOH 0,5 N, à nouveau rincé trois fois et enfin neutralisé trois fois 15 min dans une solution de Tris 1 M pH 7,4 et NaCl 1,5 M et rincé trois fois dans de l'eau ultrapure stérile.

Le transfert des acides nucléiques sur membrane de nitrocellulose chargée (Hybond XL, Amersham) s'effectue par capillarité dans un tampon SSC 20 X. La membrane est ensuite rincée dans un tampon SSC 6 X et séchée à température ambiante. Les acides nucléiques sont fixés sur la membrane par un traitement aux rayons ultraviolets (1000 µJ/cm² de membrane, Stratalinker, Stratagene).

Hybridation avec une sonde marquée, lavages et révélation

La sonde est marquée radioactivement comme décrit précédemment.

La pré-hybridation s'effectue pendant 4 à 5 heures à 65°C dans la solution d'hybridation (SSC 3X, SDS 0,5 % (p/v), 0,2 % (p/v) de lait écrémé en poudre). Après avoir ajouté la sonde marquée et dénaturée, l'hybridation est réalisée pendant seize heures à 65°C dans un four à hybridation.

La membrane est lavée brièvement à température ambiante dans une solution de SSC 3X et SDS 0,5 % (p/v), 15 minutes dans une solution de SSC 3X et SDS 0,5 % (p/v) et 15 minutes dans une solution de SSC 3X et SDS 0,5 % (p/v). La révélation s'effectue comme décrite précédemment.

Système d'expression de la protéine : Transcription et traduction *in vitro*

La protéine VvWRKY1 est produite grâce à la technique de transcription et traduction *in vitro*, en utilisant le kit TnT T7 quick system for PCR DNA (Promega). La séquence codante (ADNc) contenue dans le pGemT-Easy est amplifiée par PCR, avec la Turbo *Pfu*, grâce à

	Gel de concentration 5%	Gel de séparation 12%
Acrylamide/bisacrylamide (37,5/1) 40 % p/v	450µl	3 ml
Tris HCl 3 M pH 6,8	450 µl	-
Tris HCl 1 M pH 8,8	-	1,25 ml
SDS 10% p/v	40µl	100µl
APS 10% p/v	40µl	100µl
TEMED	4µl	4µl
Volume final	4 ml	10 ml

Tableau 9 : Composition des solutions constituant les gels dénaturants de polyacrylamide (SDS-PAGE) pour séparer les protéines.

deux amorces modifiées (**annexe 2**). L'amorce en sens contient en amont de la région complémentaire de l'ADNc, la séquence du promoteur T7 de l'ARN polymérase (pour la transcription de l'ADN), une séquence consensus Kozak (Kozak, 1987) et un codon méthionine (pour l'initiation de la traduction). En 5' de l'oligonucléotide en antisens, sont ajoutés une série de 15 thymidines et un codon stop. Ainsi, l'ajout d'une queue polyA permet d'optimiser la stabilité de l'ARNm. La réaction s'effectue en respectant le protocole fourni grâce à un lysat de réticulocytes de lapin. L'ajout de Transcend™ biotin-lysyl-tRNA dans le milieu réactionnel permet le marquage de la protéine de façon non radioactive, en incorporant une biotine sur chaque lysine de la protéine synthétisée. La détection se fait ensuite en utilisant le kit Transcend™ non-radioactive translation detection system (Promega). Les protéines seront séparées sur un gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par autoradiographie après couplage à la streptavidine-Horseradish peroxidase (HRP).

Contrôle de la synthèse protéique par Western blot

Deux µl des protéines synthétisées sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) selon la méthode décrite par Laemmli (1970). Le gel est constitué de deux parties : un premier gel de concentration à 5 % de polyacrylamide et d'un gel de séparation à 12 %. La composition des différentes solutions est récapitulée dans le **tableau 9**. L'extrait protéique coloré par ajout d'un tampon de charge 2 X (Tris HCl 125 mM pH 6,8, SDS 6 % p/v, glycérol 20 % v/v, β-mercaptoéthanol 10 % v/v, bleu de bromophénol 0,05 % p/v) est dénaturé à 95°C pendant 5 min et placé dans la glace jusqu'au dépôt. La migration s'effectue sous une tension de 100 V dans un tampon de Tris base 3 g/l, glycine 14,4 g/l, SDS 0,1 % (appareil Miniprotean III, Biorad).

Les protéines sont ensuite transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose (Protran, Schleicher & Schuell) grâce à un champ électrique de 100 V appliqué dans un tampon de transfert (Tris base 3 g/l, glycine 14,4 g/l, méthanol 20 %) pendant une heure. Pour vérifier l'efficacité de transfert, les protéines peuvent être colorées au Rouge Ponceau. La membrane est alors trempée quelques minutes dans une solution contenant 0,01 % de rouge ponceau et 0,1 % d'acide acétique puis rincée avec de l'eau distillée.

La membrane est ensuite saturée par incubation pendant une heure dans une solution de TBS-Tween (TBS-T) (**tableau 10**) sous agitation faible puis une heure dans cette même solution contenant la Streptavidine couplée à la HRP (diluée au 1/10000). La membrane est lavée trois fois dans du TBS-T et trois fois dans l'eau distillée. La révélation se fait grâce au

TBS-Tween	
Tris HCl pH 7,5 NaCl Tween 20	20 mM 150 mM 0,5%
TBE 10 X	
Tris base Acide borique EDTA	10 mM 100 mM 2 mM pH 8
Tampon d'appariement	
Tris-HCl pH 8 NaCl EDTA	10 mM 50 mM 1 mM
Tampon de liaison	
Tris HCl pH 8 NaCl glycérol β -mercaptoéthanol	20 mM 50 mM 10% v/v 7 mM

Tableau 10 : Composition des tampons utilisés pour les analyses de protéines (Western blot, retard sur gel) : TBS-Tween, TBE 10 X, tampon d'appariement des sondes, tampon de liaison protéines/ADN.

Gel non dénaturant à 6 %	
Acrylamide/bisacrylamide (37,5/1) 40 % p/v	7,5 ml
TBE 10X	2,5 ml
APS 10% p/v	100 μ l
TEMED	100 μ l
Volume final	50 ml

Tableau 11 : Composition de la solution formant le gel de polyacrylamide non dénaturant utilisé pour les expériences de retard sur gel.

substrat chimioluminescent fourni dans le kit et selon les instructions préconisées. La visualisation des protéines pourra se faire après autoradiographie.

Réaction de liaison protéine /ADN

Appariement et marquage des sondes double brin

Des oligonucléotides de synthèse d'une trentaine de bases (Eurogentec) sont utilisés comme sondes. Leur séquence correspond à des fragments de région promotrice contenant les cis-éléments susceptibles de fixer les protéines, ici, les boîtes W pour les protéines WRKY. Pour réaliser le retard sur gel, ils doivent être appariés pour former des doubles brins. Deux μg de chaque brin (sens et antisens) sont mélangés dans un tampon d'appariement (**tableau 10**) dans un volume final de 40 μl . La concentration finale des oligonucléotides double brin est alors de 100 ng/ μl . Ce mélange est chauffé à 95°C pendant 5 min puis l'appariement s'effectue par un retour progressif à la température ambiante (45-60 minutes).

Cinq pmoles de sondes sont marqués par la technique de marquage en 5' par la T4 polynucléotide kinase (kit 5' End Labelling, Amersham) avec 30 μCi de [γ -³³P] ATP à 37°C pendant 30 min, selon le protocole fourni. Les sondes double brin marquées sont ensuite séparées des sondes simple brin et des nucléotides radioactifs non incorporés sur un gel de polyacrylamide non dénaturant à 6 % (**tableau 11**) dans un tampon TBE 0,5 X (**tableau 10**) pendant 1 h à 250 V, révélées par autoradiographie puis découpées du gel. Elles seront reprises dans un volume de 200 μl d'eau stérile et stockées à 4°C.

La radioactivité incorporée est quantifiée grâce à un compteur à scintillation (Tri CARB 2000 CA, Packard). Dix μl de sonde est mélangée à 5 ml de liquide à scintillation (Kodak). Le résultat est donné en nombre de coups par minute (cpm). La concentration des sondes est ajustée à 20 000 cpm/ μl dans de l'eau stérile.

Réaction de liaison protéine/ADN

Quatre μl du mélange réactionnel de protéine synthétisée sont incubés avec 6 à 8 μl de sonde double brin marquée (20 000 cpm/ μl), 2 μg de compétiteur aspécifique poly(dI-dC)-poly (dI-dC) (Sigma), du tampon de liaison (**tableau 10**) dans un volume final de 20 μl pendant 30 minutes à température ambiante. Un compétiteur spécifique peut être ajouté à une concentration molaire en excès de 200 fois.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant.

Les complexes protéine/ADN sont séparés sur un gel de polyacrylamide à 6 % non dénaturant (**tableau 11**) dans un tampon de TBE 0,5X. Une électrophorèse préliminaire sans

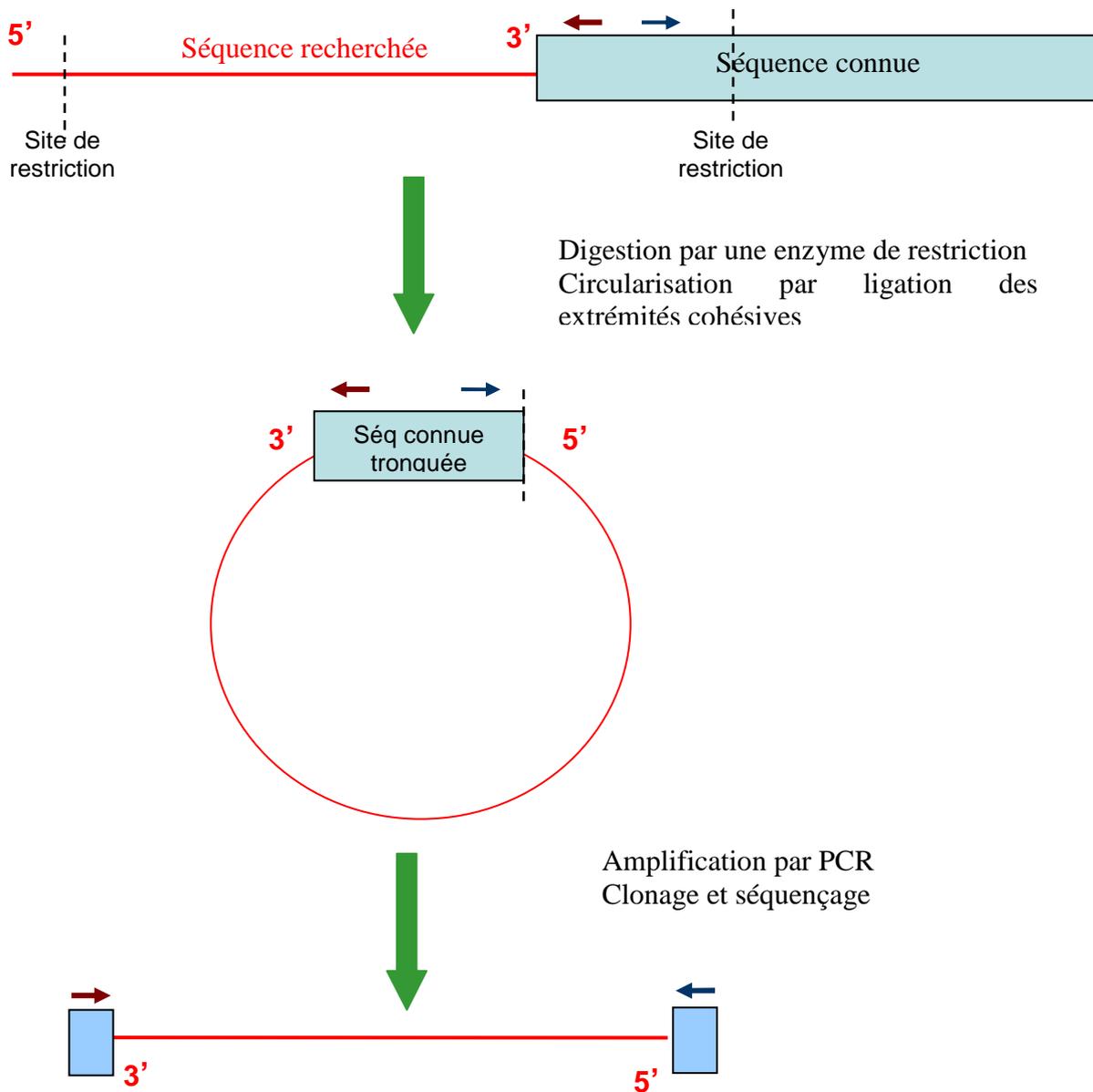


Figure 22 : Principe de la PCR inverse

les échantillons est réalisée pendant trente minutes à 20 Volts. Sous cette même tension, les échantillons sont ensuite déposés dans les puits ; cela leur permet de pénétrer immédiatement dans le gel et de ne pas diffuser. L'électrophorèse est poursuivie à température ambiante sous une tension de 150 volts pendant 2 h.

Séchage du gel et révélation.

Après avoir été incubé 10 min dans un bain d'acide acétique à 0, 1%, le gel est transféré par capillarité sur du papier Whatman, l'autre face étant recouverte de film plastique de type Saran. Il est séché sur un Gel Dryer (Fischer) sous vide pendant 30 min à 80°C. Le gel peut ainsi être exposé pendant 1 à 2 h sur un écran (Kodak) pour ensuite être révélé au phospho-imager (Fujix BAS 2000 system, Fuji photo Film).

Clonage de la région promotrice par PCR inverse

Le principe de la PCR inverse est de convertir une région inconnue flanquante d'une séquence connue en fragment interne bordée de deux séquences nucléotidiques identifiées (**figure 22**).

Pour identifier la région promotrice d'une séquence codante connue, l'ADN génomique est dans un premier temps digéré par une enzyme choisie de la façon suivante. Il faut que cette enzyme coupe la séquence codante du côté 5', de manière à choisir deux amorces entre l'extrémité 5' et le site de restriction. La première amorce située en 5' devra être en antisens et la seconde en sens. Il est nécessaire de faire des essais avec différentes enzymes pour multiplier les chances de réussite.

Ainsi après digestion, le fragment sera ligué sur lui-même grâce à une ligase (cf. ligation, § B-I-c) et une PCR pourra être réalisée avec les deux amorces choisies. Le fragment amplifié sera ensuite cloné dans le pGEM-Teasy puis séquencé.

Les techniques de digestion, ligation et PCR sont les mêmes que celles qui ont été décrites au préalable.

Isolement et transformation de protoplastes de Tabac

Des feuilles de Tabac issues de vitroplants sont placées dans des boîtes de Pétri et lacérées avec une lame de scapel stérile. Dans chaque boîte de Pétri, environ 2 grammes de feuilles sont digérés par 20 ml d'une solution de milieu K4 (**tableau 12**) additionné de 1,2 % p/v de

K4	
milieu Gamborg B5 (Duchefa) saccharose	3,16 g/l 0,4 M pH 5,8
K3	
milieu Gamborg B5 (Duchefa) saccharose	3,16 g/l 0,3 M pH 5,8
W5	
NaCl CaCl ₂ -2H ₂ O KCl Glucose	154 mM 125 mM 5 mM 5 mM pH 5,8
MMM	
Mannitol MgCl ₂ MES	0,5 M 15 mM 0,1 % p/v pH 5,6
Solution de transformation	
PEG 4000 Mannitol Ca(NO ₃) ₂	40 % 0,4 M 0,1 M pH 8

Tableau 12 : Composition des solutions utilisées pour la purification et transformation transitoire des protoplastes.

Tampon d'extraction protéique	
NaH ₂ PO ₄ pH 7 β-mercaptoéthanol Na ₂ EDTA Triton 100 X	50 mM 10 mM 10 mM 0,1 %
Solution de MUG	
MUG dilué dans la solution d'arrêt	6 mM
Solution d'arrêt	
Na ₂ CO ₃	0,2 M

Tableau 13 : Composition des solutions utilisées pour les tests d'activité glucuronidase.

Cellulase Onozuka R10 et 0,4 % p/v de Macérozyme R10, pendant toute une nuit à 25°C et à l'obscurité. Les enzymes de digestion sont fournies par Duchefa.

Une filtration au travers d'un tamis de 100 µm de diamètre permet de retenir les débris des parois végétales tout en laissant passer les protoplastes qui sont récoltés et rassemblés dans un tube à hémolyse. Le volume est éventuellement complété par du milieu K4 jusqu'à 6 ml. Un ml de milieu W5 (**tableau 12**) est déposé délicatement en surface de la solution contenant les protoplastes. Après une centrifugation de 10 min à 80 g (Centrifugeuse CR3i Jouan), les protoplastes intacts se trouveront à l'interface des deux solutions. Ils sont alors récupérés, rassemblés et repris dans 8 ml de W5. Une nouvelle centrifugation va culotter l'ensemble des protoplastes. Un deuxième lavage dans ce même milieu est effectué.

La concentration en protoplastes est ensuite déterminée par comptage sur cellule de Malassez puis ajustée à 2×10^6 protoplastes/ml dans un tampon MMM (**tableau 12**).

La transformation des protoplastes est réalisée par mise en contact de 20 µg de plasmides et de 750 000 protoplastes dans une solution de PEG (**tableau 12**) pendant 5 min, puis 2 ml de K3 (**tableau 12**) sont ajoutés et l'incubation est prolongée pendant 2 h à 26°C, à l'obscurité. L'élimination du PEG se fait par un lavage dans 5 ml de W5. Après centrifugation 5 min à 80 g, le culot de protoplastes est repris dans 2 ml de K3 et incubé toute la nuit 26°C, à l'obscurité.

Dosage de l'activité glucuronidase par fluorimétrie

Deux ml de milieu K3 sont ajoutés aux protoplastes transformés avant d'être culottés par centrifugation (5 min, à 100 g) et finalement repris dans 100 µl de tampon d'extraction protéique (**tableau 13**). L'extraction est achevée par deux séries de congélation/décongélation alternativement dans l'azote liquide et dans un bain à 37°C. Le dosage de l'activité glucuronidase est réalisé sur le surnageant après centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C.

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (1976, Sigma). La réaction enzymatique permettant de doser l'activité GUS se fait par incubation à 37°C de 20 µg de protéines dans 600 µl de tampon d'extraction contenant 1 mM de substrat MUG (Sigma). Des prélèvements de 100 µl sont effectués au temps T0 puis toutes les 30 minutes. La réaction est arrêtée par ajout de 900 µl de solution de Na₂CO₃ 0,2 M (Jefferson *et al.*, 1987).

Le dosage de l'activité GUS s'effectue par spectrofluorimétrie (Versafluor fluorometer, Biorad) sous des longueurs d'onde d'excitation de 365 nm et d'émission de 455 nm mesurant en fait la quantité de MU, produit fluorescent de la réaction enzymatique, formé au cours du

temps, l'appareil étant au préalable étalonné avec des solutions de MU (Sigma) de concentration connue.

Isolement de protoplastes de Vigne

Les protoplastes sont préparés à partir de 20 ml de culture cellulaire de Vigne (cv. Cabernet Sauvignon), 3 à 4 jours après repiquage. Les cellules sont récupérées par une centrifugation de 5 minutes à 1000 g puis incubées pendant 1 h à 25°C et à l'obscurité dans une solution de digestion (10 mM CaCl₂, 5mM MES, 0,5 M mannitol, pH 5,7) contenant 2 % de Cellulase Onozuka R10, 1 % de Macerozyme R1 et 0,05 % de pectolyase. Les cellules sont ensuite centrifugées 3 min à 150 g. Le culot contenant les protoplastes est lavé trois fois par une solution de KCl à 2,5 % et de CaCl₂ à 2% (pH 5,6) puis repris dans 3 ml de solution de mannitol à 0,5 M et de CaCl₂ à 10 mM, pH 5,6). Les protoplastes ainsi purifiés peuvent alors être comptés et leur concentration ajustée dans ce même milieu.

Transformation de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens*

Les souches d'*A. tumefaciens* utilisées sont rendues compétentes pour être transformées par électroporation de la même manière que les souches d'*E. coli*. Seules quelques modifications sont apportées concernant la transformation et la croissance de ces bactéries.

La température optimale de leur croissance est de 28°C. De plus, il leur faut 72 à 96 h pour former des colonies sur boîte de Pétri.

Par ailleurs, la transformation d'*A. tumefaciens* se fait par un choc électrique de 1500 V, les bactéries sont ensuite mises à pousser en milieu liquide, sous agitation, pendant 3 à 4 h avant d'être étalées sur un milieu gélosé LB contenant les antibiotiques adéquats.

Transformation de disques de feuilles de Tabac (Horsch, 1985)

Au préalable, une préculture d'*A. tumefaciens* transformée est mise à pousser dans 3 ml de milieu LB additionné des antibiotiques appropriés à 28°C pendant une nuit.

Les bactéries sont culottées par centrifugation 10 min à 4000 rpm (centrifugeuse Eppendorf 5415D) et remises en culture dans 20 ml de LB en présence d'acétosyringone à 50 µM, composé phénolique qui active les gènes de virulence d'*A. tumefaciens*.

Les disques foliaires sont réalisés à partir de feuilles de Tabac (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi) prélevées sur des vitroplants âgés d'environ 4 semaines. Les feuilles sont découpées

stérilement en fragments de 1 cm² à l'aide d'un scalpel stérile. Les fragments sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant 20 ml de milieu MS supplémenté de 0,1 mg/l d'ANA (acide 1-naphthalène acétique), de 1 mg/l de BAP (benzyl-aminopurine) et de 400 µl de pré-culture d'*A. tumefaciens* traitée à l'acétosyringone. La co-culture se déroule pendant deux jours à 25°C sous une faible luminosité.

Après cette période d'incubation, la culture bactérienne est éliminée par deux rinçages des disques foliaires dans une solution de MS. Les disques sont ensuite séchés dans du papier absorbant stérile. Ils sont transférés sur un milieu MS gélosé contenant de la kanamycine (50 mg/l) pour sélectionner les cellules végétales transformées, et de timentin (acide cluvamique : ticarcilline à 200 mg/l) pour éliminer les *A. tumefaciens*, de l'ANA (0,1 mg/l) et de la BAP (1 mg/l) pour induire la formation de cals. Les disques foliaires sont laissés sur ce milieu durant quinze jours, sous une photopériode de 16 heures de luminosité à 25°C et 8 heures d'obscurité à 21°C. Lorsque des cals commencent à apparaître, les disques foliaires sont transférés sur un nouveau milieu de même composition pour 15 jours supplémentaires. Les cals bien développés sont ensuite transférés sur un milieu gélosé MS additionné de BAP à 2 mg/l afin de favoriser le développement de tiges feuillées.

Finalement, quand les tiges feuillées sont bien développées, chaque clone issu de cal indépendant est disposé dans des boîtes de culture de type Magenta Box (Qbiogen) contenant du milieu MS supplémenté de phytoagar (8 g/l), de kanamycine (100 mg/l), de timentin (150 mg/l) et de saccharose (30 g/l). Les vitroplants sont bouturés toutes les quatre semaines.

Transformation d'*Arabidopsis thaliana* par immersion des inflorescences

La transformation d'*Arabidopsis thaliana* s'effectue selon la méthode décrite par Clough et Bent (1998), par immersion des inflorescences dans une solution d'*Agrobacterium tumefaciens*. Une pré-culture bactérienne d'une nuit est réalisée par inoculation d'une colonie dans 3 ml de milieu LB supplémenté en kanamycine (50 mg/l) et en rifampicine (25 mg/l). Les bactéries sont ensuite remises en culture dans 300 ml de ce même milieu. Après incubation sous agitation durant une nuit à 28°C, la culture est centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes. Le culot bactérien est repris dans une solution contenant 5 % de saccharose (p/v) et d'un agent mouillant, le Silwett L77 (Sigma) à 0,05 % (v/v). Le volume est ajusté de façon à ce que la densité optique à 600 nm soit d'environ 0,8 unité.

Les inflorescences de plantes d'*A. thaliana* âgées de 4 à 5 semaines sont alors mises en contact avec cette solution pendant 30 secondes sous une légère agitation. Les plantes sont

placées sous faible luminosité dans une mini-serre à 22°C pendant 24 h, puis transférées en conditions normales de croissance (photopériode de 16 h de luminosité à 22°C et 8 h d'obscurité à 18°C).

Transformation des cellules embryogènes de Vigne 41B et
régénération des plantules de Vigne (Mauro *et al.*, 1995)

La transformation des cellules embryogènes de Vigne a été réalisée à Poitiers par l'équipe du Pr. P. Coutos-Thévenot en utilisant la souche EHA 105 d'*Agrobacterium tumefaciens* transformée avec le vecteur p35SGiBin19.

Une colonie transformée d'*A. tumefaciens* est mise en pré-culture à 28°C dans 25 ml de YEB (**annexe 1**) pH 7,2 contenant les antibiotiques appropriés pendant 16 heures et sous agitation. Les bactéries sont culottées par centrifugation à 4000 g pendant 15 min et reprises dans 25 ml de YEB pH 5,6 en présence d'acétosyringone (100 µM). Le pH acide du milieu et cette substance phénolique vont induire l'expression des gènes de virulence d'*A. tumefaciens*. L'incubation est maintenue pendant au moins 2 h à 28°C et les bactéries sont à nouveau centrifugées et rincées 2 fois dans du milieu GM+ (**tableau 5**). La densité optique à 600 nm est alors ajustée entre 0,1- 0,15 unité dans ce milieu GM+.

La transformation s'effectue par mise en contact dans un Erlen Meyer de 500 µl de cellules embryogènes (7 j après repiquage) et de 10 ml de la suspension bactérienne pendant 10 minutes à 26°C, sous agitation. Les cellules sont ensuite mises en culture sur une boîte de Pétri contenant un milieu GM+ gélosé pendant 48 heures à 26°C et à l'obscurité. Les cellules sont alors récupérées et lavées dans ce milieu puis cultivées dans 25 ml de milieu GM+ supplémenté de 2 mg/l de paromomycine et de 200 mg/l de céfotaxime. La présence de ces antibiotiques permettra de sélectionner les cellules de Vigne transformées et d'éliminer les agrobactéries.

Un mois après la transformation, les cellules embryogènes peuvent être utilisées pour régénérer des plantules. Cinq cents µl de cellules sont sédimentées, lavées trois fois dans du milieu GM0 (**tableau 5**) et mises en culture dans 80 ml de ce nouveau milieu avec les antibiotiques appropriés. Après 5 à 7 j, des embryons commencent à se différencier, ils sont repiqués tous les 2 j (Coutos-Thévenot *et al.* , 1992).

Après 40 j de culture, ils peuvent être transférés sur un milieu gélosé "Mc Cown Woody plant medium" (Duchefa, **tableau 4**) contenant les antibiotiques de sélection.

Milieu V8 de culture de <i>Botrytis cinerea</i>	
Jus de fruits V8	20 % (v/v)
CaCO ₃	0.25 % (p/v)
agar	17 g/l
Solution d'inoculation	
Malt	15 g/l
Glucose	0,1 M

Tableau 14 : Composition des solutions utilisées pour les infections par *Botrytis cinerea* sur les plants de Tabacs.

Evolution des tâches par rapport à la zone d'inoculation
0 : pas de tâche
2 : 10% à 20 % de la zone d'inoculation
4 : environ 30%
6 : plus de 50 %
8 : environ 75 %
10 : 100 % de la zone d'inoculation
12 : tâche supérieure à la zone d'inoculation

Tableau 15 : Echelle de lecture des symptômes liés à l'infection par *Botrytis cinerea* sur les plants de Tabacs.

Botrytis cinerea

Botrytis cinerea est un champignon nécrotrophe non spécifique du Tabac mais qui peut infecter une très grande variété d'espèces végétales.

La souche de *Botrytis cinerea* Transposa 314 (fournie par le laboratoire du Dr D. Blancard, INRA de Bordeaux) est cultivée sur boîte de Pétri à température ambiante dans un milieu solide V8 (**tableau 14**). Avant l'inoculation des plantes, le champignon est mis en culture sur un nouveau milieu V8 pendant environ 7 j puis placé sous une rampe de sporulation pendant 24 h.

Afin de préparer la suspension de spores, 1 à 2 ml d'une solution d'inoculation (**tableau 14**) est déposé sur la boîte de Pétri pour remettre les spores en suspension. Cette solution est prélevée puis diluée de manière à obtenir une concentration de 2000 spores/ml. Le comptage est effectué sur une cellule de Malassez.

Des plants de Tabacs développés *in vitro* dans des pots en verre (de 1 l) et âgés de 8 semaines sont inoculés par cette solution : 4 gouttes de 10 µl (20 spores) sont déposées par feuille, et ceci est fait pour 4 feuilles par plantes.

Les symptômes sont lus dès le 4^{ème} jour après l'inoculation, puis tous les jours. La taille de la zone du développement du champignon est évaluée visuellement en suivant une échelle de 0 à 12. Plus cet indice est élevé, plus le champignon s'est développé (**tableau 15**).

Pythium

Des germinations âgées d'environ 3 semaines sur un milieu MS sont transférées sur boîtes de Pétri contenant un papier filtre stérile humidifié par 3 ml d'eau stérile. Cinq plantes sont déposées par boîte. Après que la souche de *Pythium* F (00PR201) ait poussé sur milieu V8 gélosé pendant 3 jours, des disques de gélose recouverte de mycélium (3 mm de diamètre) sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce et déposés à la base du collet de la racine de chaque germination. Chaque boîte de Pétri contient quatre plantes par lignée et l'expérience est faite sur 5 réplicats. Les plantes témoins sont traitées par un dépôt de gélose de milieu sans mycélium.

Les observations et des notations visuelles sont réalisées de 5 à 15 jours ; la progression de la nécrose sur la racine est évaluée et éventuellement le jaunissement des organes aériens. L'échelle de notation s'étale de 0 à 12 (**tableau 16**).

Evolution des nécroses racinaires causés par <i>Pythium</i>
0 : pas de symptômes 1 : moins de 20 % des racines sont nécrosées 2 : 20% de racines nécrosées 3 : entre 30 et 40% 4 : 60% 5 : entre 60-80% 7 : plus de 80% 9 : toutes les racines sont nécrosées

Tableau 16 : Echelle de lecture des symptômes liés à l'infection par *Pythium*

Evolution des tâches	Sporulation	Nécroses
0 : pas de tache, 1 : diamètre inférieur à 1 cm, 2 : diamètre compris entre 1 et 2 cm, 3 : diamètre supérieur à 2 cm.	0 : pas de sporulation, 1 : sporangiophores peu abondants, 2 : sporangiophores assez abondants, 3 : sporangiophores abondants.	1: tâche nécrotique de 1 mm 3 : 1-3 mm 5 : 3-5 mm 10 : 5-10 mm 15 : +10 mm

Tableau 17 : Echelles de lecture des symptômes liés à l'infection par *Peronospora tabacina*. Trois échelles différentes ont été mises en place afin d'évaluer le développement des tâches, la sporulation du champignon et l'apparition de nécroses.

Tests réalisées à l'Institut du Tabac de Bergerac (ITB) sous la direction de R. Delon

Le mildiou du Tabac : Peronospora tabacina

La souche "Y1" de *Peronospora tabacina*, agent du mildiou du Tabac, est maintenue à l'ITB en permanence sur des plantes sensibles. Six plantes par lignée, âgées d'environ deux mois et demi (50 cm de hauteur), et cultivées en serre, sont infectées.

L'inoculation se fait par des infiltrations réalisées au moyen d'une seringue sans aiguille dont l'embout est pressé sur la feuille. Un volume de 100 µl d'une solution à 10⁵ spores/ml est infiltré ; ceci s'étale sur environ à 4 cm² de tissu foliaire.

Les plantes sont ensuite placées dans des enceintes en plastique transparent, étanches, et dotées d'un système de brumisation permettant de maintenir une humidité relative élevée, favorable à la croissance et à la sporulation du mildiou. La température est 22°C pendant les 10 h de jour, de 16°C pendant les 14 h de nuit.

Le développement du pathogène se caractérise par un jaunissement du tissu foliaire, en tache concentrique autour du point d'inoculation. Le diamètre de cette tache sera noté, avec une échelle allant de 0 à 3 (**tableau 17**).

A la face inférieure du limbe et au niveau des tâches, apparaissent les sporulations du champignon. L'intensité de la sporulation, selon l'abondance des sporangiophores, sera notée avec une deuxième échelle de 0 à 3 (**tableau 17**).

De plus, l'apparition de nécrose sur les feuilles de Tabac transgénique fut remarquable et une nouvelle échelle de notation traduisant le diamètre de ces tâches nécrotiques a été mise en place avec une notation de 0 à 15 (**tableau 17**).

L'oïdium, Erysiphe cichoracearum

Erysiphe cichoracearum, parasite obligatoire, est maintenu en permanence sur des plantes sensibles dont il colonise les feuilles (souche ITB utilisée pour les tests biologiques d'amélioration variétale du Tabac).

Douze plantes par lignée, au stade 8 feuilles (environ 30 cm de haut, 10 semaines) placées à 16°C avec une photopériode 10 h de jour et 14 h de nuit sont infectées.

Un coton tige est frotté sur une feuille couverte d'un feutrage mycélien d' *E. cichoracearum* en cours de sporulation, puis pressé légèrement sur les feuilles des plantes à inoculer. Quatre dépôts sont ainsi réalisés par feuille, sur 2 feuilles par plante. Après chaque dépôt, le coton tige est rechargé en conidies sur la feuille source d'inoculum. Les zones de dépôt sont entourées d'une marque au feutre noir. Il a été vérifié à la loupe binoculaire que le nombre de conidies déposées était compris entre 200 et 500. La localisation du dépôt de

Surface couverte par l'oïdium
0: 0 %
1 : 1 %
3 : 1 à 2%
5 : 2 à 5%
7 : 5 à 10%
9 : 10 à 20%
11 : 20 à 50%
13 : + 50%

Tableau 18 : Echelle de lecture des symptômes liés à l'infection par *Erysiphe cichoracearum* permettant d'évaluer la surface de chaque feuille recouverte par l'oïdium.



Figure 23 : Echelle de lecture des symptômes liés à l'infection par *Chalara elegans*, à savoir la progression de la nécrose racinaire. Les stades 1 et 3 ne sont pas représentés sur cette photo.

Symptômes liés au PVY
0 : plante saine
3 : léger éclaircissement des nervures , marbrures
5 : éclaircissement marqué des nervures de plusieurs feuilles
7 : quelques symptômes nécrotiques entre les nervures ou sur les nervures d'une feuille
9 : symptômes nécrotiques entre les nervures ou sur les nervures d'au moins 5 feuilles
11 : symptômes nécrotiques entre les nervures ou sur les nervures de toutes les feuilles

Tableau 19 : Echelle de lecture des symptômes liés à l'infection par le virus PVY sur les Tabacs.

conidies étant connue, il est possible de distinguer entre les foyers primaires dus à l'inoculation, et les foyers secondaires apparaissant par la suite.

La lecture des symptômes s'effectue environ 10 jours après l'inoculation par évaluation de la surface par des taches d'oïdium. L'échelle s'étale de 0 à 13 (**tableau 18**).

Chalara elegans (agent de la pourriture noire des racines du Tabac)

Douze plantules au stade 4-5 feuilles (environ 10 cm de haut, 5 semaines) sont placées dans des godets de terreau maintenus dans un bac en plastique. L'inoculation des plantes se fait par l'intermédiaire de l'eau contenue au fond des bacs en plastique, à raison de 100 000 conidies/plante. Les plantes infectées sont soumises à une température constante de 20 °C, 10 h de jour et 14 h de nuit.

Après un lavage, la lecture des symptômes se fait de plante à plante, sur le système racinaire, d'après une échelle de 1 à 11 traduisant la progression de la nécrose racinaire, 23 jours après l'inoculation (**figure 23**).

PVY (Potato Virus Y)

Six plantules par lignée (âgées d'environ 7 semaines) cultivées sur terreau en godets 7 x 7 sont testées. L'inoculum est préparé par broyage d'une feuille infectée par le PVY dans un tampon de phosphate de potassium 50 mM (pH 7), dans lequel sont ajoutés du carborundum et du charbon actif. L'inoculation se fait par application de cette solution sur 2 feuilles/plante.

La souche de PVY inoculée est de type N 00-06.

Les plantes sont placées dans une serre avec une température d'environ 20 à 25°C.

La lecture se fait par une notation, plante à plante, des symptômes foliaires : symptômes nécrotiques et mosaïques, avec une échelle allant de 1 à 11 (**tableau 19**). Deux lectures à différents stades de développement des symptômes sont faites : à 21 et 27 jours après l'inoculation.

Virus

L'équipe du Dr F. Revers (UMR GDPP, INRA de Bordeaux) a effectué des tests de sensibilité des plantes d'*Arabidopsis thaliana* vis-à-vis de deux virus : le CMV (virus de la mosaïque du concombre) et le LMV (Lettuce Mosaic Virus).

Tous les inocula de virus sont préparés en broyant des tissus infectés présentant des symptômes dans un tampon de phosphate de potassium (0,03 M, pH 7,0) selon un rapport tissu/tampon de 1/4 (p/v), avec 0,2 % de diéthylthiocarbamate, 80 mg de charbon actif et 80 mg de carborundum. Les feuilles de la rosette de plantes de 4-5 semaines sont inoculées en utilisant un coton tige. La progression de l'infection est évaluée 10, 15 et 25 jours après l'inoculation par comparaison des symptômes avec les plantes sauvages et confirmée par un test DAS-ELISA (double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay).

Hyaloperonospora parasitica

Des tests de sensibilité des plantes d'*A. thaliana* vis-à-vis d'un champignon, *Hyaloperonospora parasitica* ont été réalisés par l'équipe du Dr H. Keller (INRA d'Antibes). Ce champignon anciennement appelé *Peronospora parasitica* est un agent pathogène biotrophe obligatoire.

Les deux souches de *H. parasitica* utilisées ont des profils de compatibilité différents. Emwa1 et Noco2 sont respectivement compatibles sur Ws-0 et Col-0, et incompatibles sur Col-0 et Ws-0. Les inoculations sont réalisées par vaporisation des spores de *H. parasitica* en solution dans l'eau (40 spores/ μ l) sur des *A. thaliana* âgées de 15 jours, jusqu'à saturation des feuilles. Les plantes infectées sont placées à 16°C avec une photopériode de 12 heures. Pendant les deux premiers jours, les plantes sont cultivées avec une hygrométrie élevée, pour favoriser la germination des spores. Environ sept jours après l'inoculation, la sporulation du mycélium est déclenchée en élevant à nouveau le niveau d'hygrométrie. Les spores sont récupérées par immersion des feuilles infectées.

Pour étudier l'influence de la sur-expression de *VvWRKY1* sur la sporulation du champignon, des expériences de comptages de spores produites par des plantules sauvages et transgéniques ont été entreprises. Dix plantules de chaque interaction ont été récoltées et placées séparément dans 200 μ l d'H₂O. Après un léger vortex, la concentration en spores a été déterminée. Les résultats obtenus ont été soumis au test Student.

Bactéries

L'équipe du Dr Y. Marco (Laboratoire des interactions plantes-microorganismes, Toulouse) a testé la sensibilité des plantes d'*A. thaliana* vis-à-vis d'une bactérie *Ralstonia solanacearum*.

Symptômes liés au mildiou de la Vigne

0 : pas de sporulation visible 1 : sporanges difficilement visibles à l'œil nu, ou visible sous loupe binoculaire 2 : Sporulation faible mais bien visible 3 : Sporulation recouvrant 50% de la goutte déposée 4 : Sporulation recouvrant tout le diamètre de la goutte déposée 5 : Sporulation sur une surface supérieure à la goutte déposée.
--

Tableau 20 : Echelle de lecture des symptômes liés à l'infection par le mildiou de la Vigne, *Plasmopara viticola*.

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* sont cultivées environ 3 semaines en chambre de culture dans des pots Jiffy. Pour l'inoculation, le fond de ces pots est découpé et les racines sont immergées pendant 3 minutes dans une suspension contenant 10^8 bactéries/ml.

La progression de la maladie est évaluée selon le développement des symptômes sur les feuilles, entre 10 et 20 jours après l'inoculation. Une note est attribuée à chaque plante en suivant une échelle visuelle allant de 0 (aucun flétrissement) à 4 (plante entièrement flétrie).

Le mildiou de la Vigne (*Plasmopara viticola*) est un champignon obligatoire. Il est donc cultivé sur des feuilles de Vigne détachées (provenant de boutures de Cabernet sauvignon cultivées en serre) dans des boîtes de Pétri contenant un papier filtre humidifié de 3 ml d'eau stérile. Son repiquage sur une nouvelle feuille est effectué toutes les semaines. La croissance du champignon se fait dans une chambre de culture soumise à une photopériode de 16h de jour et de 8h de nuit à une température constante de 22°C.

La solution d'inoculation est préparée à partir de la souche BR33, 7 j après son repiquage.

Les sporanges sont récupérées à l'aide d'un pinceau et mises en suspension dans de l'eau stérile. La concentration de la solution est ajustée à 5000 ou 15 000 spores/ml et maintenue dans la glace jusqu'à l'inoculation.

Des feuilles de développement maximal sont détachées de plantules de Vigne 41B transformées et sauvages, cultivées *in vitro*. Elles sont placées dans des boîtes de Pétri contenant un papier filtre humidifié, la face supérieure des feuilles étant au contact du papier filtre.

Les spores sont alors déposées sur la face inférieure des feuilles de Vigne, par goutte de 15 μ l (de 3 à 11 gouttes par feuille, le nombre de dépôt dépendant de la taille de la feuille).

Les feuilles sont placées à l'obscurité pendant 16 à 24 h à 22°C (pour faciliter la progression du champignon à travers les stomates) puis soumises à la photopériode de la chambre de culture (décrite ci-dessus).

Sept jours après l'inoculation, la sporulation du champignon est d'abord évaluée visuellement. Une note est attribuée à chaque goutte déposée, selon une échelle allant de 0 à 5 (**tableau 20**). Ces notes sont ensuite ramenées à un pourcentage où une note de 5 correspond à une sporulation maximale du champignon donc à 100 %.

Une deuxième évaluation de la sporulation du champignon est effectuée par comptage des sporanges formés sur les feuilles infectées. Les feuilles sont placées dans un volume donné d'eau stérile, vortexées pendant 30 secondes. La concentration en spores est alors déterminée par comptage sur cellule de Malassez et rapportée au nombre de gouttes déposées sur la feuille.

Les puces à ADN utilisées

Des puces à ADN de deuxième génération, contenant 14 562 EST ont été générées à partir des séquences répertoriées dans la banque de données du TIGR (Genome Research Grape Gene Index (VvGI, release 3), datant du 13 août 2003 (<http://www.biosciencetechnology.com/ShowPR~PUBCODE~090~ACCT~9000009065~ISSUE~0403~RELTYPE~PR~PRODCODE~00005805~PRODLETT~A~CALLFROM~RELPGM.html>). Des oligonucléotides de 70-mères ont été générés par la société Qiagen puis pris en charge par Operon et déposés sur des lames par le génopôle de Montpellier.

Les annotations complètes sont fournies dans la banque de données "QIAGEN Oligo Microarray Database" (OMAD) (<http://omad.operon.com/grape/query.php>).

Préparation des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits par la méthode d'Asif (2000) à partir de feuilles de plantules de Vigne (porte-greffe 41B), non transformées (WT) ou sur-exprimant VvWRKY1 (lignée 19), cultivées *in vitro*. Les feuilles de 3 plantules sont prélevées dans chaque cas et rassemblées pour les extractions. Chaque échantillon est ensuite traité à la DNase RQ1 comme il a été décrit précédemment pour les analyses par RT-PCR (*cf.* §B-2). Vingt µg d'ARN sont alors précipités et repris dans un volume de 6 µl d'eau traitée au DEPC.

Couplage aux fluorophores

Les réactions de transcription inverse et de couplage aux fluorophores ont été menées à l'aide du Kit "CyScribe Post-Labeling kit" (Amersham) selon une méthode de marquage indirect. Nous avons suivi les instructions fournies avec le kit; seules quelques modifications ont été réalisées.

Après la réaction de transcription inverse, une deuxième RT est effectuée en ajoutant 1 µl d'enzyme "Cy Script reverse transcriptase" et en incubant une deuxième fois pendant 1h 30 à

42°C. Lors de ces réactions, des nucléotides modifiés sont incorporés au premier brin d'ADNc synthétisé, les dUTP amino-allyl.

Les ARNs sont ensuite dégradés selon le protocole fourni. Les ADNc sont alors purifiés une première fois en utilisant le kit "CyScribe GFX purification kit" (Amersham).

Les ADNc de chaque échantillon (WT et 19) sont couplés séparément avec chacun des deux fluorophores, qui sont des molécules d'ester NHS des cyanines Cy3 et Cy5. Ainsi, une première hybridation des lames se fera avec l'échantillon 19 couplé à Cy3 et l'échantillon WT couplé à Cy5 et la réaction inverse se fera avec l'échantillon 19 couplé à Cy5 et l'échantillon WT couplé à Cy3. Cette réaction inverse est appelée flip-flop (ou swap).

Ceci permet de limiter les différences de signal liées à la différence d'incorporation des fluorophores et non aux quantités d'ADNc hybridés. Les ADNc sont purifiés une deuxième fois avec le même kit que précédemment.

Dosage des ADNc marqués

La concentration en ADNc et la quantité de fluorophores incorporés sont dosées à l'aide du spectrophotomètre Ultrospec 3100 Pro (Amersham), le fluorophore Cy3 absorbant à 550 nm et le fluorophore Cy5 à 649 nm.

Hybridation des sondes sur les puces à ADN

Le volume de chaque sonde est déterminé de manière à hybrider une même quantité d'ADNc de chaque échantillon sur une même puce à ADN. Chaque sonde est alors concentrée sur des colonnes de filtration Centricon-30 (Amicon). Les sondes des 2 échantillons marquées chacune par un des deux fluorophores sont mélangées et reprises dans un volume de 100 µl de solution d'hybridation (50 % v/v de formamide, solution de Denhardt 5 X, SSC 1 X, SDS 0,05% p/v, 0,1 mg/ml ADN de sperme de saumon dénaturé). Ce mélange des deux sondes est dénaturé par incubation 5 min à 95°C puis immédiatement placé dans la glace pendant 5 minutes. Avant l'hybridation, les sondes sont conservées à 42°C et les 3 solutions de lavages (SSC 2 X, 0,1 % SDS ; SSC 1 X; SSC 0,5 X) sont préchauffées à 30°C. L'hybridation des lames est effectuée dans des chambres à hybridation par un automate (Tecan HS 4800) après injection des 100 µl du mélange de sondes. Le programme est le suivant :

- hybridation : 16 h à 42°C,
- lavages : trois fois 1 minute avec du SSC 2 X, 0,1 % SDS à 30°C
trois fois 1 minute avec du SSC 1 X à 30°C
une fois 30 secondes avec du SSC 0,5 X à 30°C

Les puces sont finalement séchées à l'azote.

Révélation (Scanning)

Chaque lame est scannée sur le scanner Genepix 4000 B (Axon Instruments). Les réglages d'acquisition du signal pour chaque fluorophores sont ajustés de la même manière pour une lame et son hybridation inverse.

Analyse bioinformatique

L'intensité des signaux de chacun des fluorophores est mesurée grâce au logiciel Genepix (Axon Instruments). Des grilles prédéfinies de détection des spots sont tout de même ajustées manuellement pour assurer une reconnaissance optimale des spots (ou signal au niveau d'un dépôt d'oligonucléotides) et éliminer ceux qui sont mal hybridés ou saturés. Le bruit de fond est calculé localement puis est soustrait à la médiane de l'intensité des pixels composant le spot.

Ces données sont alors transformées en logarithme en base 2 du rapport des intensités de chaque fluorophore puis traitées par le logiciel MIDAS (Saeed *et al.*, 2003) de la façon suivante.

-Une normalisation de type Lowess (Quackenbush, 2002) est effectuée de façon locale au niveau de chaque bloc de spots déposés sur la lame.

-Une deuxième normalisation permet d'ajuster l'écart-type de la distribution du logarithme (en base 2) des intensités entre les différents blocs de spots (Quackenbush, 2002).

-La reproductibilité entre une expérience et son hybridation inverse (flip-flop) est testée pour chaque spot. Le produit des rapports d'intensités des deux lames doit être égal à 1. La moyenne et l'écart-type de la distribution de ces produits sont calculés et les spots pour lesquels ce produit n'est pas compris dans un intervalle de plus ou moins deux écart-types de la distribution sont éliminés de l'analyse car les intensités obtenues entre les deux expériences sont considérées comme non reproductibles (Quackenbush, 2002).

Afin de déterminer les gènes présentant une expression différentielle entre les deux conditions, les rapports des intensités des spots sont représentés sur un graphique selon l'équation $\log_2(R/V)=f(\log_{10}(R*V))$, R pour le fluorophore rouge et V pour le vert. Des fenêtres de taille déterminées (50 spots) sont définies le long de l'axe $\log_{10}(R*G)$, et pour chaque fenêtre la moyenne et l'écart-type de la distribution des $\log_2(R/G)$ sont calculés. Les gènes définis comme significativement exprimés sont ceux qui ont un $\log_2(R/G)$ au moins

deux fois supérieur à l'écart-type de la distribution (technique appelée "intensity-dependent Z-score", Quackenbush, 2002).

Cette série d'expérience est ensuite répliquée avec des échantillons d'ARN provenant d'individus différents mais appartenant aux mêmes lignées (19 et WT), produisant ainsi un réplicat biologique.

Finalement, seuls les gènes reproductibles dans chaque essai indépendant et régulés dans le même sens (induits ou réprimés) dans les deux essais seront retenus à la fin de l'analyse.

Le classement des gènes différentiellement régulés en catégories fonctionnelles a été réalisé à partir du catalogue fonctionnel préparé pour les analyses de microarrays d'*Arabidopsis thaliana* (<http://mips.gsf.de/catalogue>).

Première partie

Afin de définir le rôle des facteurs de transcription de type WRKY dans les mécanismes de défense de la Vigne, le clonage de gènes codant ces protéines a été entrepris. Au début de ce travail, aucune séquence issue de Vigne n'était disponible dans les bases de données (GenBank ou TIGR). C'est pourquoi, le clonage de *VvWRKY1* a été entrepris à partir d'une banque d'ADNc produite au laboratoire à partir de baies de raisin saines récoltées au stade véraison (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon). Le choix d'une telle banque était motivé par le fait que l'équipe s'intéresse plus particulièrement aux gènes exprimés dans la baie de raisin. De plus, nous avons choisi de travailler sur le stade de développement de la baie correspondant à la véraison car il représente une étape clé pour la maturation des baies de raisin. C'est à cette période que s'effectuent de multiples modifications métaboliques au niveau de la constitution et de la physiologie de la baie de raisin. Les sucres, les composés phénoliques et aromatiques ainsi que des protéines antifongiques (de type PR) s'accumulent alors que les acides organiques sont dégradés (Coombe, 1992). C'est donc pour tous ces grands changements métaboliques que nous avons débuté notre étude par le criblage de cette banque d'ADNc.

Il eut peut-être été plus judicieux de rechercher de tels gènes impliqués dans la défense à partir d'une banque d'ADNc de baies de raisin infectées par un agent pathogène. Toutefois, le choix du stade de développement de la baie pour réaliser l'infection, du délai après lequel les réponses des gènes WRKY sont mises en place, et le choix du pathogène restent des éléments importants à déterminer. Quoiqu'il en soit, nous ne disposons pas d'un tel outil lorsque le projet a été initié.

Le premier clone complet identifié fut nommé *VvWRKY1*. Dans un premier temps, l'analyse de la séquence en acides aminés déduite de cet ADNc a confirmé que la protéine correspondante présente **les domaines caractéristiques des facteurs de transcription de type WRKY** identifiés chez d'autres espèces. Nous avons ensuite démontré que ce facteur de transcription ***VvWRKY1* est bien fonctionnel** puisqu'il est capable de se fixer à l'ADN au niveau d'éléments régulateurs contenus dans les séquences promotrices, les boîtes W. Ensuite, afin de comprendre dans quelles conditions ce gène pouvait intervenir *in planta*, son

expression au cours du développement de la baie de raisin et des feuilles de Vigne, mais **aussi en réponse à différents stress**, a été suivie par des analyses de RT-PCR semi-quantitative.

Afin d'appréhender le rôle physiologique de VvWRKY1 *in vivo*, nous avons ensuite entrepris de sur-exprimer cette protéine dans des plantes modèles. La Vigne est en effet un organisme difficile à transformer, la régénération des plantules transgéniques étant une étape délicate et longue. C'est pourquoi, l'analyse fonctionnelle de VvWRKY1 a d'abord été effectuée par **sur-expression dans deux systèmes hétérologues, le Tabac et *Arabidopsis thaliana***. Le choix de ces plantes modèles a été motivé non seulement par les techniques de transformation et le cycle de vie rapides mais également par la disponibilité de plusieurs couples plante/pathogène bien définis étudiés par certains laboratoires. De plus, nous avons choisi de transformer deux espèces afin de comparer les résultats obtenus sur chacun d'entre eux.

Dans le but d'évaluer l'implication de cette protéine dans la réponse de la plante à l'infection, des **tests de sensibilité vis-à-vis de différents agents pathogènes** (champignons et virus) ont été réalisés sur les plantes transformées. Par ailleurs, **l'effet de la sur-expression de VvWRKY1 sur les niveaux d'expression de gènes PR**, souvent suggéré dans la bibliographie (cf. Introduction), a également été analysé.

L'article présenté ci-après regroupe les résultats de la caractérisation de l'ADNc VvWRKY1, ainsi que les études d'expression de ce gène chez la Vigne. L'analyse des Tabacs transgéniques sur-exprimant VvWRKY1 est également intégrée dans cet **article** mais des **travaux complémentaires** sont ajoutés dans ce chapitre.

La dernière partie présente l'analyse fonctionnelle de VvWRKY1 dans **le deuxième système hétérologue, *Arabidopsis thaliana***.

Overexpression of a grapevine stress-responsive transcription factor VvWRKY1 confers a multiple tolerance to fungi in tobacco

Chloé Marchive *et al.*, (première version)

Abstract

Pathogen attack represents a major problem for viticulture and for agriculture in general. More particularly, the phytosanitary condition of grape berries is essential to produce a good quality wine. Actually, the use of phytochemicals becomes more and more restrictive. The only way to control disease is a thorough knowledge of the resistance mechanisms. We focused our work on trans-regulatory proteins potentially involved in the control of plant defence response, the WRKY proteins. We have isolated a full-length cDNA from a *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon grape berry library. The cDNA, designated *VvWRKY1*, encodes a polypeptide of 151 amino acids, which has the structure characteristic of the group IIc of WRKY proteins family. The *VvWRKY1* protein is able to bind specifically W boxes in different nucleotidic contexts. This gene appeared to be regulated in a developmental manner in berries and leaves, and by different signal molecules involved in defense. Transgenic tobaccos overexpressing *VvWRKY1* transcription factor under control of 35S promoter exhibit reduced susceptibility to fungi but not to virus. In this work, we provide further evidence that resistance to fungi infection can be engineered by overexpression of WRKY transcription factors.

Introduction

Plants are exposed to various pathogens in nature. To fight microbial pathogens, they are able to protect themselves using multiple and complex processes. Most of these pathogens are overcome by the plant basal defense system that limits the growth of virulent pathogens. Plant disease resistance is induced via host recognition of pathogen elicitors. Bacterial flagellin is an example of an elicitor that induces resistance through interaction with a plasma membrane-localized receptor kinase (Gomez-Gomez and Boller, 2000; Andreasson et al., 2005; Zipfel *et al.*, 2004). This mode of pathogen recognition resembles pathways of innate immunity response. The plant innate immune response is initiated when a plant resistance (R) gene product, directly or indirectly, recognizes specific molecules or proteins produced by pathogen avirulence (Avr) genes (Martin *et al.*, 2003). This recognition triggers a signal transduction in the plant cell, then leads to salicylic acid (SA) accumulation, antimicrobial proteins biosynthesis and then induces systemic acquired resistance (SAR) (Ryals *et al.*, 1996). Following the pathogen recognition and in particular cases of plant resistance, hypersensitive response (HR) can be evolved to segregate rapidly the pathogen after its penetration in plant. This reaction is characterized by localized and programmed cell death at the infection site, preceded by physiological perturbations (ions fluxes, pH changes, membrane depolarization, burst oxidative, Goodman and Novacky, 1994). HR and SAR are accompanied by the accumulation of defense molecules and proteins constituted by cell wall modifications and production of antimicrobial molecules like phytoalexins and a large group of Pathogenesis Related proteins PR proteins, some of which have antimicrobial activity (Van Loon and Van Strien, 1999; Narasimhan *et al.*, 2005).

Several molecules as salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), ethylene, nitric oxide (NO) and H₂O₂ have been implicated in mediating plant defense (Hammond-Kosack and Parker, 2003, Kunkel and Brooks, 2002). They play important roles in signal transduction. SA is a key endogenous secondary signal involved in activation and/or potentiation of plant defense responses (Dempsey, 1999). It is required for the establishment of SAR. H₂O₂ can act in parallel with SA. JA participates in defense response too but using a distinct SA-independent signalling pathway. Ethylene is also a signal molecule independent to SA pathway, which play a role in controlling necrotic lesion formation (Abeles, 1992). But there are many examples of crosstalk between these signalling pathways. These molecules act in a very complex signalling network, which shares several steps or enzymes (Dong, 1998).

Elicitors- or pathogen-activated transcription factors may play an important role in controlling defense gene expression and resistance responses. Five major families of plant transcription factors, bZIP, WRKY, Myb, EREBF, homeodomain proteins, have been shown to participate in the regulation of plant defense responses (Rushton and Somssich, 1998). Transcriptional control is a key role in plant defense responses, particularly, WRKY transcription factors act as major regulatory proteins because of their ability to bind W box, a common promoter element contained in SAR genes promoter. They belong to a large family of transcription factors, mainly present in plants, characterized by their large and well conserved WRKY domain. They are involved in various processes but most of the studies focused on plant senescence, responses to abiotic and biotic stresses and particularly on plant defense. In plants, many WRKY proteins are involved in the defense against attack from pathogenic bacteria (Deslandes *et al.*, 2002, Dellagi *et al.*, 2000, Dong *et al.*, 2003, Du and Chen, 2002), fungi (Beyer *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2002, Kalde *et al.*, 2003), viruses (Wang *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 1999). Furthermore, a role in physiological processes has also been suggested such as embryogenesis, seed coat and trichome development, senescence, regulation of biosynthesis pathways and hormonal signalling (Lagace and Matton, 2004; Johnson *et al.*, 2002; Hinderhofer and Zentgraf, 2001; Robatzek and Somssich, 2001; Sun *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004).

Cultivated grapevines (*Vitis vinifera* L.) are susceptible to many pathogens such as phytoplasmas, viruses, bacteria, fungi. Among them, the most important ones are grey mould (*Botrytis cinerea*), powdery mildew (*Erysiphe necator*) and downy mildew (*Plasmopara viticola*) which cause important loss of quantity and quality in harvested berries. Consequently, wine growing is one of the most important consumers of phytochemicals. In France, for instance, 50% of the total mass of these products are used in vineyards, which represent only 3.7% of farmed surfaces. Intensive use of chemicals has led to the development of micro-organisms resisting to certain types of fungicides, and some products are now prohibited because they are considered to be too toxic. Nowadays, several research strategies are carried out to propose solutions to wine growers to get healthy fruits to maturity reducing treatments.

Here, we focused on a WRKY transcription factor expressed in grape berries because fruit, which are rich in sugar and other nutrients, provide an ideal target for pathogens. Several studies reported an increase expression of PR proteins during grape berry development (Davies and Robinson, 2000; Salzman *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 1997; Tattersall *et al.*, 1997). Furthermore, this up regulation of PR genes seems to be correlated to resistance to

powdery mildew. Indeed, berries are susceptible to this fungus until veraison and become resistant thereafter (Chellemi and Marois, 1992).

In this present study, we investigated the role of a *Vitis vinifera* WRKY protein, VvWRKY1 in resistance of plants against pathogen infection. To this end, we isolated a full-length cDNA, from a veraison grape berry library. The ability of the corresponding protein to bind specifically DNA promoter elements was demonstrated using three different oligonucleotidic probes containing W boxes. Then, we characterized its expression during the development of healthy plants, in berry and leaves but also in stress conditions (after wounding, pathogen infection and chemical treatments). The biological role was assessed by over expression in a heterologous system, *Nicotiana tabacum*. Transgenic plants exhibit a clear resistance towards several fungal pathogens. This study strongly suggest a real involvement of this transcription factor in plant defense.

Materials and methods

Plant materials

During the 2000 growing season, the grape berries from *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon plants were collected from the “Domaine du Grand Parc” (INRA, Latresne, France). Separate seeds and skin/flesh samples were immediately frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C.

Grape cuttings (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) used for wounding and chemical treatments assays were cultivated on a sandy soil in a growth room programmed for 25°C/20°C under a 16/ h 8h light dark photocycle and at 75 % relative humidity (Ollat, 1998). Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) were grown *in vitro* at 25°C on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with kanamycin (100 mg/l) for transgenic lines, or without kanamycin for control plants, under 16 h photocycle at 25°C/20°C. Plantlets were transferred in a greenhouse to produce seeds.

VvWRKY1 cDNA isolation, vector construction and plant transformation

The *VvWRKY1* full-length cDNA was cloned from a grape berry cDNA library (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon Véraison stage) by PCR screening with oligonucleotides designed in the consensus WRKY sequence (5'-TGGMGDAARTAYGGRCGAAR-3' and 5'-YTTCGYCCRTAYTTHCKCCA-3'). These primers were used in combination with T7 and 5' primers located in the pTriplex vector (Smart cDNA library construction kit, Clontech, Palo Alto, CA). After cloning in pGEM-T-easy plasmid (Promega, Charbonnières, France), PCR products were sequenced (Genome Express, Meylan, France) and specific oligonucleotides defined within the 5' and 3' non-coding regions were used to amplify *VvWRKY1* full-length cDNA.

To overexpress *VvWRKY1* in tobacco, *Xba* I and *Sac* I restriction sites were added respectively at the 5' and 3' ends of the cDNA by PCR amplification with modified primers (5'-CTCAATCTAGATCAGTCTCTC-3' and 5'-TCCAAGAGCTCATATGGGTGT-3'). The full-length modified fragment was inserted into a pGEM-T Easy vector and after restriction with *Xba* I and *Sac* I, it was sub-cloned into the same restriction sites of the binary p35SGiBin19 plasmid (Karimi *et al.* 2000). The resulting p35SGiBin19-*VvWRKY1* containing the full coding sequence of *VvWRKY1* in the sense orientation behind the 35S promoter was first introduced into *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 strain (Hoekema *et al.* 1983). Tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) was then transformed using the leaf disc method (Horsch *et al.*, 1985). Transgenic progeny lines were selected on MS medium supplied with kanamycin (200 mg/l) and carried to homozygosity.

In vitro VvWRKY1 protein synthesis and electrophoretic mobility shift assay

The *VvWRKY1* protein was produced by *in vitro* transcription and translation method with the TnT T7 quick system for PCR DNA system (Promega) according to the manufacturer's instructions. The coding sequence was first amplified with Turbo-Pfu (Stratagene) using the following primers pairs : 5'-AGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGCCACCAUGGAAGGCCACCAAATACTT-3' and 5'-(T)₃₂GGTGAAATGGAAACATTCAT-3' and PCR product was used as template. Protein detection was performed using TranscendTM non-radioactive translation detection

system (Promega). Double-strands probes were labeled with [γ - ^{33}P] ATP using 5' end labeling kit (Amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, UK) and purified on a 6 % non denaturing polyacrylamide gel. The resultant 120,000 cpm labeled DNA probe was incubated with 4 μl of protein reaction mixture, 2 μg of poly(dI-dC)-poly (dI-dC) and the binding buffer (20mM Tris, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 7 mM β -mercaptoethanol) in a 20 μl reaction volume. In competition experiments, specific competitor was added in 200-fold molar excess prior to the addition of the protein. The mixture was incubated for 30 minutes at room temperature and analysed on a non-denaturing 6 % polyacrylamide gel in 0,5X TBE buffer at 150 V. The gel was then dried and autoradiographed using a Fujix BAS 2000 system (Fuji Photofilm, Tokyo, Japan).

Wounding and chemical treatments

Two months old grape cuttings cultivated in growth room were used for treatments. For wounding experiments, 4 fully developed leaves were cut on 4 sites with scissors and pooled for each timepoint. For chemical treatments, plants were sprayed with 5 mM salicylic acid (SA, in water), 10 mM ethephon (2-chloroethylphosphonic acid, in water), 150 μM jasmonic acid (JA, in 1 % ethanol) or 10 mM H_2O_2 (in water). Mock treatments were performed by spraying plants with water or with 1% ethanol solution for JA treatment control. Leaves from 3 plants were pooled for each timepoint, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before RNA extraction. All experiments were conducted at least twice. All the chemicals were purchased by Sigma, St Louis, USA.

Grapevine infection with *Plasmopara viticola*

Plasmopara viticola (strain BR 33, INRA, Bordeaux, France) was maintained on grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) leaves placed upside down in Petri dish on a humidified filter at 21°C , 80% humidity under a 16h/8h photocycle. After 7 days, fresh sporangia were harvested with a paint brush and suspended in sterile water from these leaves to inoculate the test units. The concentration of inoculum was adjusted to 5×10^3 sporangia per mL. Detached leaves from *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon cuttings were inoculated on the lower side with this sporangia suspension (15 droplets of 15 μl per leaf). After 16h of incubation at 21°C in the dark, the droplets were gently removed. Control leaves

were treated equally but not infected with fungal spores but water droplets were placed on. At different time points after inoculation, two infected or non-infected (control) leaves were frozen in liquid nitrogen.

RNA isolation and RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from grapevine by LiCl precipitation method (Asif *et al.*, 2000) and from *Nicotiana tabacum* using the TriReagent method (Molecular Research Center, Cincinnati, USA), according to the manufacturer's instructions. The first strand cDNA was synthesized from 2 µg of DNase-treated RNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI). PCR amplifications on grape templates were performed using primers specific of *VvWRKY1* gene (5'-GAGAATGATATGGAAAGAGTGG-3' and 5'-CATTCGTTCTCAGACACAATA-3') and of the constitutively expressed EF1γ gene (5'-GCGGGCAAGAGATACCTCAA-3' and 5'-TCAATCTGTCTAGGAAAGGAAG-3'). The number of PCR cycles was respectively 30 and 27 cycles for *VvWRKY1* and EF1γ. The tobacco transgene was amplified using specific primers (forward, 5'-CCTTTTCCACCAAACATG-3' and reverse, 5'-TCATCGCAAGACCGGCAACA-3') with 30 PCR cycles. The ubiquitin gene was amplified as tobacco constitutive control (forward, 5'-TCCAGGACAAGGAGGGTAT-3' and reverse, 5'-GAGACCTCAGTAGACAAAGC-3') with 23 cycles. Preliminary experiments verified for each gene that PCR conditions were not saturated. RT-PCR products were separated on 1,6 % agarose gels. To confirm RT-PCR specificity, the products were inserted into pGEM-T easy vector (Promega) and subsequently sequenced. For grape downy mildew infection, PCR products were electrophoresed on a 0,8 % agarose gel in a 1X Tris-borate EDTA buffer and blotted onto a charged nylon membrane (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany) by capillarity transfer under denaturing conditions (0,4 M NaOH). Transferred DNA were hybridized to ³²P-labelled purified DNA fragment corresponding to the PCR product and were visualized by autoradiography.

Pathogen challenge of transgenic tobaccos

For *Pythium* F (strain 00PR201, from INRA Bordeaux, France) susceptibility studies, mycelium gelose discs from a 3 days culture at 20°C on V8 medium, (V8 vegetable juice 20 (v/v), CaCO₃ 0.25 % (w/v) and agar 17 g.l⁻¹) were placed in the crown area of 20 seedlings (3

weeks-old) per line. Infected plants were grown in a growth room at 20°C under a 16h photoperiod. Symptoms evaluation was done 5, 7, 10 and 15 days after inoculation according to a visual scale from 0 to 12 depending on necrosis and chlorosis development : 0 (no symptoms) to 12 (dead plant).

For disease susceptibility studies with *Chalara elegans*, *Peronospora tabacina*, *Erysiphe cichoracearum* and Potato Virus Y (PVY), strains and inoculum preparations were provided by the Institut du Tabac de Bergerac (ITB, France). For each assay, symptoms development was observed on cultivars with different levels of sensibility (provided by ITB) to validate the progress of the disease. T2 progenies of transgenic lines were analysed and untransformed *Nicotiana tabacum* cv Xanthi line was used as control. Seeds were germinated on blotting paper and transferred after 7 days (2 cotyledons stage) in greenhouse before inoculation.

For inoculation assays with *Chalara elegans*, the soil of seedlings (5 weeks old) was infected with the fungus (10^5 conidia/plant). 12 plants per line were infected and then incubated at 20°C in a growth room under a 10 h photoperiod. Three weeks after inoculation, the roots of the plants were washed and root necrosis levels were evaluated following a scale from 1 to 11.

For the downy mildew (*Peronospora tabacina*) infections, 6 plants (10 weeks-old) per line were transferred in growth room (10/14 h light/dark cycle at 22/16°C). Two leaves per plants were infiltrated on 2 sites with 100 µl of a sporangia suspension (100 000 spores/ml) using a needleless syringe. Disease intensity was measured 6 and 9 days post inoculation by evaluating the leaf area covered by mycelia (diameter of chlorotic zone), the fungus sporulation with a visual scale from 0 to 3 and also development of necrotic spots (following a scale from 0 to 15).

To analyse susceptibility to the powdery mildew agent (*Erysiphe cichoracearum*), 200 to 500 conidies (as controlled using microscope) were applied with a cotton tip on 2 sites of the upper side of 2 leaves per plant. 12 plants per line (10 weeks-old) were inoculated and maintained in a growth chamber at 16 °C under a 10 h photoperiod. After 10 and 13 days, the surface covered by powdery mildew was scored from 1 to 13.

Tobacco plants (7 weeks-old) were inoculated with PVY by rubbing fully expanded leaves with wet carborundum plus PVY in a 50 mM phosphate buffer, pH 7.0.. 2 leaves per plant and 6 plants per line were infected. Plants were maintained in a greenhouse at 20-25°C. Symptoms were observed 21 and 27 days after infection and noted according to a scale from 1 to 11 depending on the necrotic and mosaic leaves symptoms.

Data were statistically analysed by ANOVA test (p-value<0,05).

CA AGC CTG TTT
ATT CAT CTT CTT CGT AAA ATC CGT CTG TTT TAA TCT CAA TCT CTC TCA GTC TCT CTA

1/1 31/11
 ATG GAA GGC CAC CAA ATA CTT TTT CCC GGT TCA TCA AAA TCA CCC GCA AAT CCT TTT CCA
 M E G H Q I L F P G S S K S P A N P F P

61/21 91/31
 CCA AAC ATG GCA AAT TTT CAT GCT ATG AAC ATT TAT AAG AGT GCT GGT TTT GAT GCC TCT
 P N M A N F H A M N I Y K S A G F D A S

121/41 151/51
 GAG ACC AAG GAA AAA CCA GGT AAA AAG GAA GGT CAA AAG AAG ATT AGA AAG CAC AGA TTT
 E T K E K P G K K E G Q K K I **R K H R** F

181/61 211/71
 GCG TTT CAA ACG AGG AGC CAT GTT GAT ATC CTT GAT GAT GGG TAT CGA TGG AGG AAA TAT
 A F Q T R S H V D I L D D G Y R **W R K Y**

241/81 271/91
 GGG CAG AAA GCA GTC AAG AAC AAC AAA TTT CCC AGA AGC TAC TAC CGG TGC ACG TAT AAA
G Q K A V K N N K F P R S Y Y R **C** T Y K

301/101 331/111
 GAC TGC AAT GTG AAG AAG CAG GTC CAA CGC CTC TCA AAA GAT GAA GAG ATT GTA GTC ACA
 D **C** N V K K Q V Q R L S K D E E I V V T

361/121 391/131
 ACC TAT GAA GGC ATT CAT ACA CAC CCT GTG GAG AAG CCC ACC GAG AAC TTT GAA CAC ATC
 T Y E G I **H** T **H** P V E K P T E N F E H I

421/141 451/151
 TTG AGG CAG ATG CAA TCA TAT TTT CCC ATC TCA TGA GTA TTT CCA TTT CAC CAA AAT GTG
 L R Q M Q S Y F P I S *

TTT TTG TAT ATA AAT AAT ATG AGA ATG ATA TGG AAA GAG TGG TGG ACA CCC ATA TCA TCT CTT
 GGA AAG TGA TTT TCC TGT GGA GAA AGT TGA AAC CAG TAC TGT CCT TCA TTT TGG AGG ATC TTG
 TGA TAT GAT CAC TGT ATG AAG ATT GAA AAT CAA TTT TAG GTT TTT GGT ATT TGG ACT GAA AAC
 CAT TCT TTG TGG TGT GTA AGG ATG AAT TCT TTT AAG CAT TTG AGT CAA GGG TTC GGG CAG AAA
 TAA AAA TAT TGT GTC TGA GAA CGA ATG TTC TAA AAA AAA AAA AAA AAA

Figure 1. Sequence of *VvWRKY1* cDNA and the deduced amino-acid sequence of the corresponding protein. The 5' and 3'UTR regions are written in italic letters. The WRKY motif is shown in bold letters, the two cysteines and the two histidines of the zinc –finger motif are circled and the putative nuclear localisation signal (RKHR) is labelled with a rectangle. The first number written on the top of the sequence corresponds to the nucleotids number from the initiator ATG and the second one to amino-acids number. The sequence has been deposited in the Genbank database under accession number AY585679.

Results

Cloning of a grapevine cDNA encoding a WRKY transcription factor belonging to the group IIc

Degenerate oligonucleotide primers were designed to correspond to the conserved sequence of WRKY proteins (WRKYGQK). These primers were used to screen a cDNA library, prepared from grape berries harvested at “Véraison” stage (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon). One of the overlapping sequences obtained after cloning and sequencing the amplified products corresponded to a full-length cDNA of 849 bp and was designated *VvWRKY 1*. It contains a 68 bp 5'untranslated sequence and a 298 bp 3'UTR region with a poly (A) tail (Figure 1). The predicted open reading frame encodes a protein of 151 residues, with a predicted molecular mass of 17,7 kDa. The deduced protein has a single WRKY domain with a C₂H₂ zinc-finger motif at its C terminus, which characterizes a group II member of the WRKY superfamily (Eulgem *et al.*, 2000). Moreover, the analysis of the *VvWRKY 1* protein sequence using the PSORT program (Nakai and Kanehisa, 1992, <http://psort.nibb.ac.jp>) reveals the presence of a putative nuclear localization signal, RKHR between the positions 56 to 59 of the amino acid sequence (Figure 1).

WRKY proteins are divided in 3 main classes based on sequence similarity. Database searches reveals that predicted *VvWRKY1* polypeptide is highly similar to group II WRKY proteins, containing only one WRKY domain with a Cys₂/His₂ type zinc-finger motif. As shown in Figure 2, different sub-groups are distinguished within that group II on the basis of the features of additional structural motifs (Eulgem *et al.*, 2000) and *VvWRKY1* shows a high degree of similarity to the sub-group IIc. *VvWRKY1* is closely related to *AtWRKY75*, *AtWRKY45* (Eulgem *et al.*, 2000 and *Solanum tuberosum* *StWRKY1* (Dellagi *et al.*, 2000) which share respectively 59, 54,5 and 53,9 % of identity of their amino acids sequence.

Otherwise, a comparison of *VvWRKY1* sequence with EST published in Grape TIGR database indicates that it corresponds to the TC50592 sequence identified from an abiotic stressed grapeberry library (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). The two others related TC also come from abiotic stressed berry or leaves library (TC41321 and TC46341) and they exhibit a very high sequence identity with *VvWRKY1*. Unfortunately, this TIGR database doesn't contain any EST from pathogen-infected grapevine library to identify expressed genes during biotic stress.

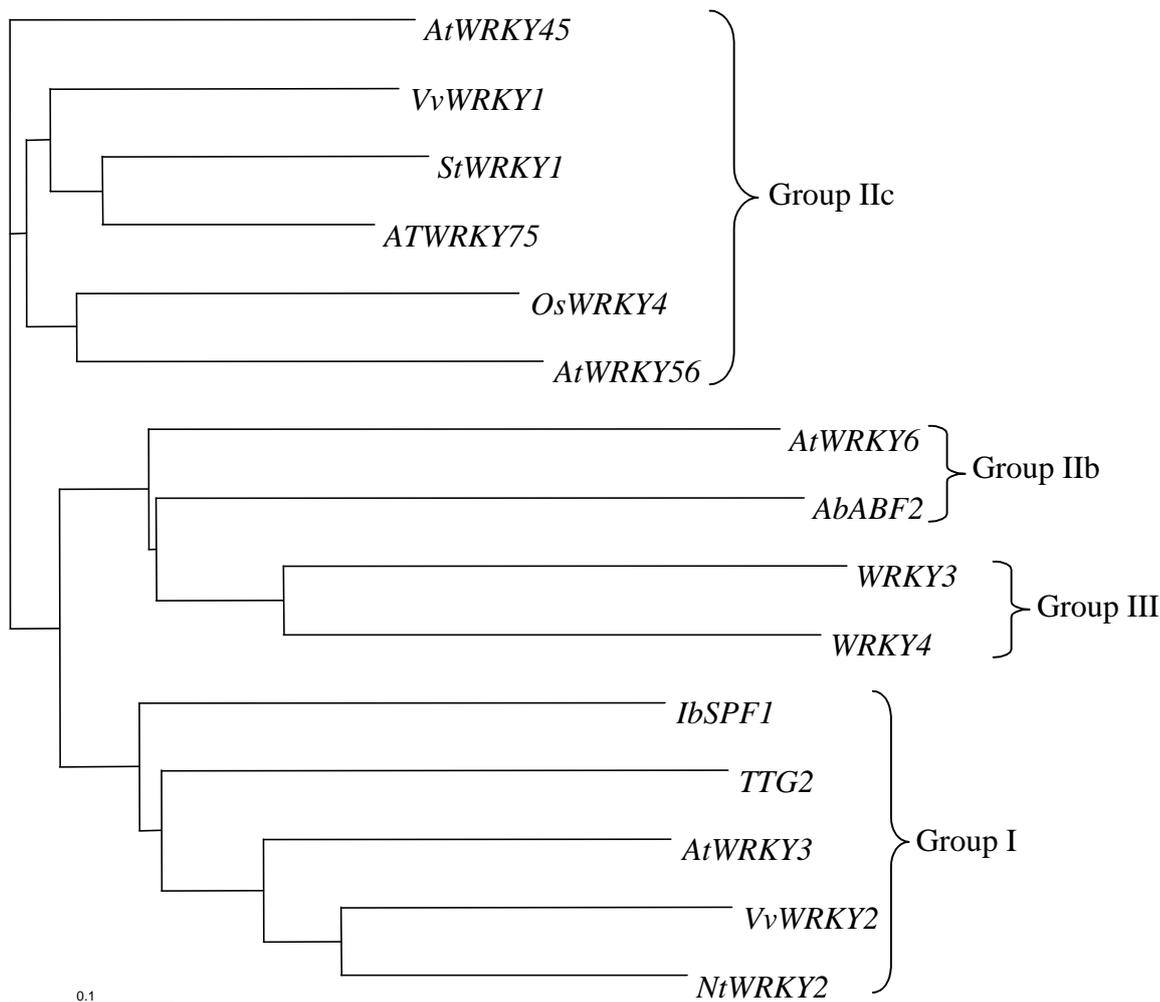


Figure 2. VvWRKY1 belongs to the group II of WRKY protein family. Phylogenetic tree of a selection of WRKY proteins. The VvWRKY1 deduced amino-acid sequence was aligned with those encoded by 14 genes in GeneBank using the CLUSTALX program (Thomson *et al.*, 1997). The phylogenetic tree was created using the TreeView program (Page, 1996). Accession numbers: AfABF2: S61414, AtWRKY3: AF224701, AtWRKY6: AAK28312, AtWRKY45: AF426251, AtTTG2 (WRKY44): AF404852, AtWRKY56: AY088461, AtWRKY75: AF452174, IbSPF1: S51529, NtWRKY2: AF096299, WRKY3: AF193770, WRKY4: AF193771, OsWRKY4: AYQ20904, StWRKY1: AJ258707, VvWRKY2: AY596466. The scale bar in the bottom left corner displays a distance corresponding to 0,1 amino acid substitutions per site.

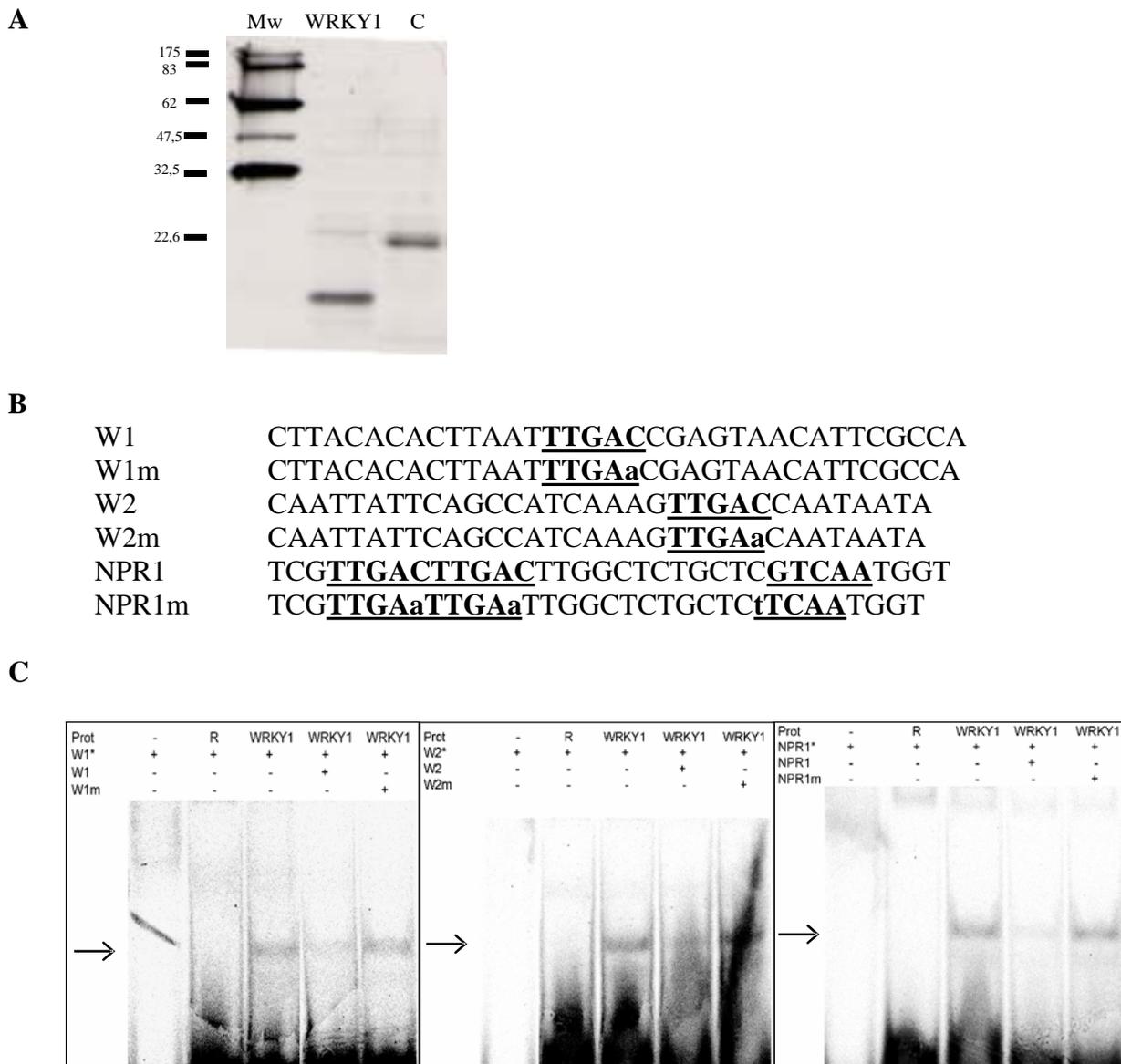


Figure 3. The specific W-box binding activity of VvWRKY1. (A). Detection of the *in vitro* synthesized VvWRKY1 protein. Two μ l of the reactant was used for SDS-PAGE. Separated proteins were transferred onto nitrocellulose membrane and detected using colorimetric method. MW corresponds to the molecular ladder, WRKY1 to the VvWRKY1 protein, C is an *in vitro* synthesized control protein of 22.6kD. (B). Nucleotidic sequences and their mutant versions used as probes and specific competitors in EMSA. W1 and W2 come from the *PcPRI* promoter (Rushton *et al.*, 1996) and NPR1 from the *NtNPR1* promoter (Yu *et al.*, 2000). The W boxes (TGAC core) are underlined. The mutated nucleotides were in lower cases. . (C). Binding activity of VvWRKY1 to the W-box element was determined by gel-mobility shift assay. Probes (W1, W2, NPR1) were incubated with VvWRKY1 protein (WRKY1). Competitors were added in 200-fold molar excess. The second lane represents DNA binding incubation with the rabbit reticulocytes lysate (R). Arrows indicate DNA-protein complexes.

VvWRKY1 is able to bind W box in several nucleotidic environments

WRKY proteins have been identified as transcription factors that bind DNA sequences containing W boxes (TGAC). In order to validate this protein/DNA interaction between VvWRKY1 and the W box, electrophoretic mobility shift assay was performed. Production of recombinant VvWRKY1 in bacterial (*E. coli*) and yeast (*S. cerevisiae*) systems was unsuccessful, as its expression seemed to be toxic for these organisms (data not shown). Finally, the protein was synthesized by *in vitro* transcription and translation assay. The biotinylated protein band of VvWRKY1 translated *in vitro* was detected by colorimetric method, as in Figure 3A.

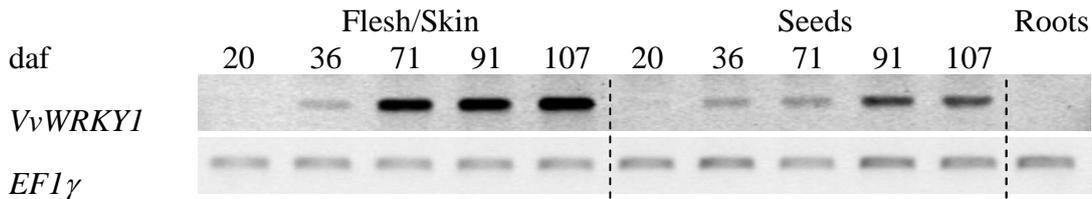
In absence of known grape target genes, EMSA was performed with three oligonucleotides probes previously used for WRKY proteins described in other species. These sequences contain W boxes in different arrangements and with different surrounding sequences. Two sequences of the Parsley PR1 promoter, W1 and W2, containing a single W-box TTGAC (Figure 3B; Rushton *et al.*, 1996) were used. A third sequence comes from *Arabidopsis thaliana* NPR1 gene promoter (Yu *et al.*, 2001) and is composed by three W-box sequences (TTGAC) within 28 bp (2 W-boxes in tandem and a third W-box in reverse orientation) (Figure 3B).

In EMSA experiment, a shift band was observed when each probe was incubated separately with the *in vitro* transcribed and translated protein (figure 3C). To verify the specificity of the VvWRKY1 binding, competition experiments were conducted by addition of specific unlabelled competitors in 200-fold molar excess to the binding assay. Competition with the unlabelled probe strongly reduced the binding signal whereas addition of an unlabelled W-box-mutated probe (changing TTGAC to TTGAA) in the reaction volume had no effect. The same binding specificity on the TTGAC sequence were seen with the three promoter probes. These results indicate that the TTGAC core sequence is necessary for the binding of VvWRKY1 protein to these DNA probes.

VvWRKY1 expression is developmentally regulated

RNA was isolated from different *V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon tissues and the expression of VvWRKY1 was investigated by RT-PCR using primers designed in 3'UTR (Figure 4). The VvWRKY1 is not expressed in roots but is expressed in other parts of the plant

(A)



(B)

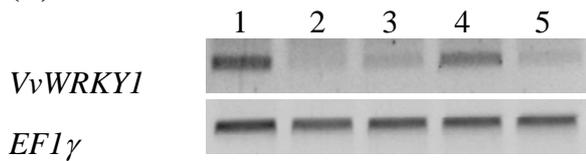


Figure 4. *VvWRKY 1* expression during grape berry and leaves development. (A) Berries were harvested 20, 36, 71, 91 and 107 days after flowering (daf). Flesh and skin were separated to seeds. RT-PCR analyses were performed on total RNA prepared from these samples for 30 cycles for *VvWRKY1* expression. *EF1γ* was used as control (for 27 cycles). (B) Grape cuttings leaves were harvested at different stages of their development. Numbers above the lines correspond to: 1: apex and very young leaves, 2: young leaves of about 2-3 cm wide, 3: 4-5 cm wide leaves, 4: 6-7 cm wide leaves, 5: mature and well-developed leaves about 9-10 cm wide.

tested, fruit and leaves. In these both organs, RT-PCR analysis revealed that expression of this transcription factor is dependent on development. *VvWRKY1* RNA level was very weak in berries before the véraison (about 60 days after flowering), but there was a significant increase after this stage that continued through ripening (Figure 4A). This increase seemed to be more important in flesh/skin than in seeds.

In leaves, accumulation of *VvWRKY1* transcripts was very important in very young leaves and apex and in well-developed leaves (Figure 4B). In contrast, in young leaves and in mature leaves, a slighter signal was observed by RT-PCR.

These results pointed that expression of *VvWRKY1* is not fruit specific and is strongly regulated by development in these two grapevine organs, fruit and leaves.

VvWRKY 1 expression is regulated by defense signals

During stress responses, signal transduction is mediated by several molecules participating in different pathways such as SA, JA, ethylene and H₂O₂. To determine whether these endogenous messengers regulate *VvWRKY1* expression, wounding and chemical treatments were performed onto grapevine cuttings and *VvWRKY1* expression was analyzed by RT-PCR during a time course from 0 to 24 hours post treatments.

Compared to the control treatment, expression of *VvWRKY1* was induced by wounding, SA, ethephon and H₂O₂ but not by JA (Figure 5). Moreover, although mock treatment with 1 % ethanol increase level of *VvWRKY1* transcripts since 2 h post treatment, this accumulation of *VvWRKY1* mRNA was repressed by addition of JA (Figure 5A). In the case of wounding, the transcripts level increased obviously but progressively from 2 h with a maximum 8 hours after the stress (figure 5A). This activation persisted 24 hours post treatment.

After SA treatment, transcripts accumulation was detected at 2 hpt (hours post treatment) and was highest at 4 and 8 hpt before decreasing at 24 hpt. A similar pattern was observed after H₂O₂ treatment but with a slight delay, transcripts starting to accumulate 4 hpt. After spraying the plants by ethephon, an ethylene releasing compound, mRNA level started to increase 2 hpt and peaked 8 hpt. In each case, the activation of *VvWRKY1* expression was transient, the *VvWRKY1* mRNA level decreasing after 24 hours after treatments,

Finally, to evaluate the effect of a pathogen infection on *VvWRKY1* expression, inoculation by downy mildew was performed on detached leaves of grapevine and *VvWRKY1* transcripts accumulation was analysed by RT-PCR (Figure 6). In control leaves (i.e. treated with water) a

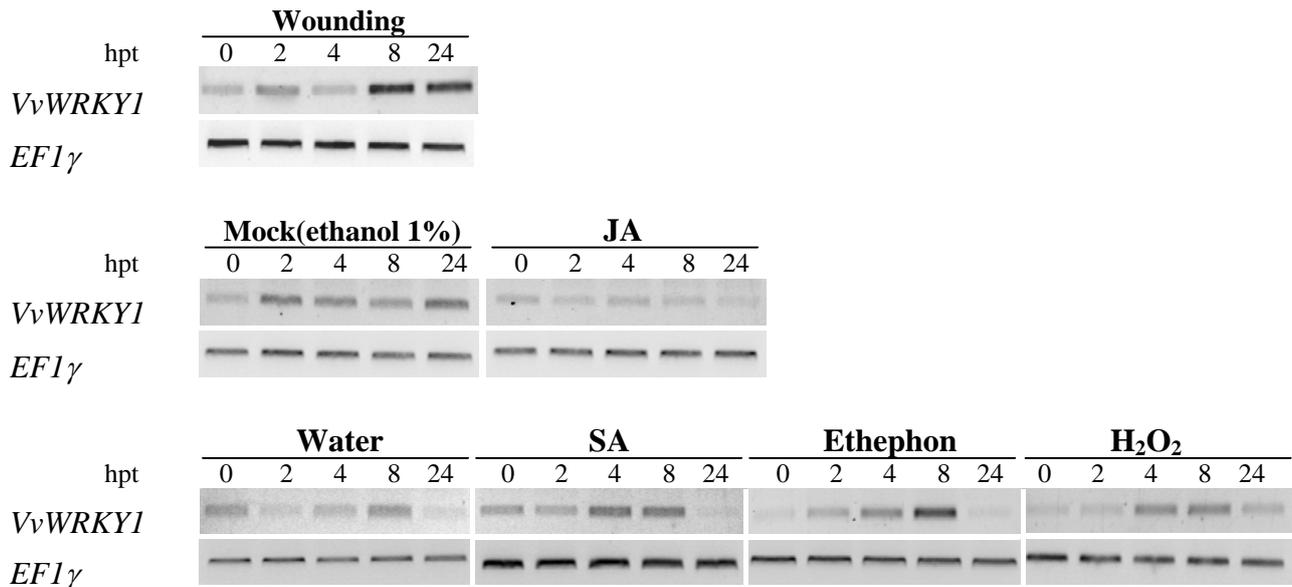


Figure 5. Expression of *VvWRKY1* in response to wounding and defense signals. Accumulation of transcripts after treatments was monitored by RT-PCR. Grape cuttings were wounded by scissors or sprayed with 5 mM SA, 10 mM ethephon, 150 μM JA, 10 mM H₂O₂. Control plants were sprayed by water or 0.1% ethanol (for JA treatment control). Leaves were harvested at the indicated times after treatment for preparation of total RNA. *EF1γ* amplification was used as constitutive control. (Hpt: hours post treatment).

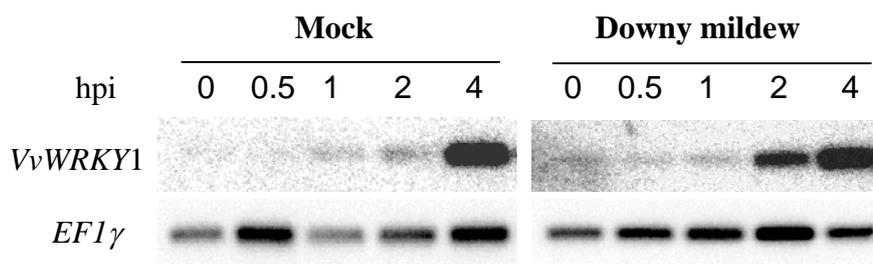


Figure 6. Activation of *VvWRKY1* in grape leaves after *Plasmopara viticola* infection. RT-PCR were performed using primers specific for *VvWRKY1* and for *EF1γ* as control, on total RNA isolated from leaves infected by downy mildew or not infected. Leaves were harvested during the indicated time course, from 30 minutes to 4 hours post inoculation (hpi). After gel electrophoresis, PCR products were transferred on nylon membrane and hybridized with radiolabeled probes.

significant increase of the VvWRKY1 gene transcription was detected after 4 hours, indicating that this induction may have been due to the wounding caused by detaching the leaves. However, the fungus infection induces an earlier accumulation of VvWRKY1 transcripts at 2 hours post inoculation compared to control. These results indicate that VvWRKY1 expression is regulated by several defense signals, in a positive way by wounding, SA, ethephon, H₂O₂ and a fungus pathogen but it is down-regulated by JA. We can note the antagonist effect of SA and JA.

Transgenic tobaccos over expressing VvWRKY1 showed reduced fungi susceptibility

To order to elucidate the putative role of VvWRKY1 in plant defense, we attempted to over-express its cDNA in heterologous system, grapevine transformation still presenting some difficulties. After transformation using *Agrobacterium tumefaciens*, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi plants containing the VvWRKY1 coding sequence under control of the 35S promoter of the cauliflower mosaic virus were obtained. None of them showed phenotypical changes compared to control plants. Expression level of the transgene was evaluated for ten independent lines by RT-PCR using specific primers. Three lines were chosen based on different accumulation levels of VvWRKY1 transcripts, two lines sharing a high level (lines 10 and 18) and one line (17) with a weak level of transgene expression (Figure 7A). Southern blot analysis revealed one copy of the transgene for the line 10 and at least 3 copies for the lines 17 and 18 (data not shown).

Because many WRKY transcription factors are been shown to be involved in activation of transcription of defense genes transcription, and particularly Pathogenesis Related (PR) genes (Yu *et al.*, 2001, we investigated PR genes expression in VvWRKY1 overexpressing plants under normal growth conditions. Molecular analysis by RT-PCR revealed that expression of some of the PR genes was weakly increased only for the line 17 compared control plants (data not shown). These results suggested that the VvWRKY1 protein doesn't act directly on PR genes regulation in tobacco.

Susceptibility tests were performed on these three transgenic lines (T2 progenies) towards several types of fungi and one virus, the PVY (Potato Virus Y). Fungi with particular agronomic interest for tobacco were chosen: two damping off fungi such as *Pythium* and *Chalara elegans* and two biotrophic fungi, the downy and the powdery mildew of tobacco. Most of the corresponding fungi could also be pathogenic for grapevine. Tolerance was

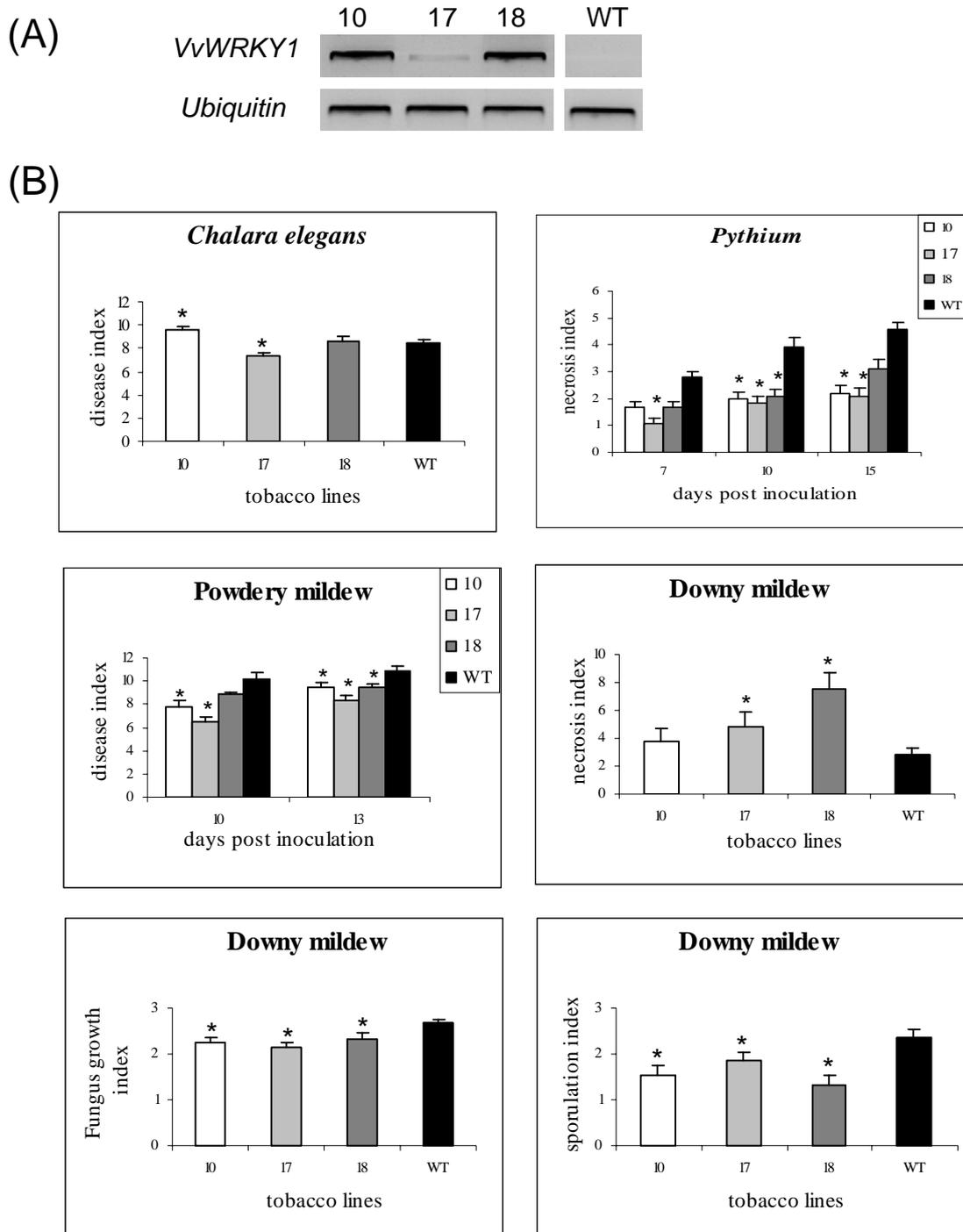


Figure 7. : Disease tolerance analysis of *VvWRKY1* overexpressing tobaccos. (A) Expression levels of the transgene in the three lines of transgenic and wild type tobaccos were evaluated by RT-PCR using total RNA prepared from 4 leaves from 3 *in vitro* grown T2 plants for each line. Ubiquitin amplification was used as constitutive control. WT indicates the wild-type tobacco line. (B) Transgenic tobaccos sensitivity to different fungi pathogens. The three selected transgenic tobacco lines (10, 17, 18) and wild type plants (WT) were inoculated with *Pythium*, *Chalara elegans*, the downy mildew and the powdery mildew. Disease indexes were estimated as described in the methods at different time points after inoculation for each pathogen. For downy mildew, three types of symptoms were evaluated. The fungus growth and the necrosis size were estimated 6 days post inoculation, and the sporulation of the fungus was reported 9 days post inoculation. Data represent means and bars indicate standard errors. Data were statistically analyzed by Anova and asterisks indicate values that are significantly different from WT ($p < 0,05$).

evaluated by visual notation according to a severity-scale for each disease at different time points post infection (Figures 7B and 8). Results were submitted to statistical analyses to reveal their significance.

Disease symptoms (root necrosis) caused by *Chalara elegans* were evaluated 21 days post inoculation and reported on Figure 7B. Interestingly, the line 17 was the only one that showed a lower disease index compared to control plants. This first result appeared to be consistent to the enhanced expression level of *PR* genes in that line. This line also showed a better marked tolerance to *Pythium*, powdery mildew and downy mildew than the two other transgenic lines. However, in *Chalara* resistance tests, the three lines were less susceptible than the control plants for these three fungi. *Pythium* disease symptoms were estimated at different time points post inoculation, and for each observation, the three transgenic lines were less affected than control one. Similar results were observed for powdery mildew resistance assays, as evaluated 10 and 13 days post inoculation. Concerning downy mildew infection experiments, three types of symptoms were reported on Figure 7B. First, overexpression of *VvWRKY1* in transgenic lines appeared to slightly reduced fungus growth compared to control line, as measured 6 dpi. Moreover, the presence of necrosis symptoms at infection sites was observed at a significant higher level than in control plants and reported (Figure 7B). This type of response to infection was very weak in control plants and in transgenic plants, it appeared to be similar to HR dependent symptoms. This infection response was particularly important in plants from the line 18. Certainly as a consequence of a limitation of the fungus growth and the presence of necrosis sites, the sporulation of the fungus evaluated 9 days post inoculation was significantly reduced in the transgenic plants.

We also studied the disease resistance against a virus, the PVY. As shown in Figure 8, no difference was seen between wild type and transgenic plants.

Taken together, these data suggest an involvement of *VvWRKY1* transcription factor in defense mechanisms toward fungi pathogens in tobacco.

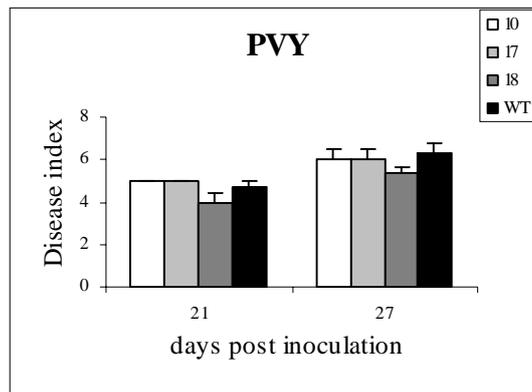


Figure 8. Susceptibility levels of transgenic tobaccos infected by Potato Virus Y. Three transgenic tobacco lines (10, 17, 18) and wild type plants (WT) were inoculated with PVY. Necrotic and mosaic symptoms on infected leaves were evaluated 21 and 27 days after infection according to a visual scale from 1 to 11. Data represent means and bars indicate standard errors. Data were not statistically different from wild type plants (by Anova analysis with $p < 0,05$).

Discussion

In the present study, we attempted to analyze the biological function of transcription factors from WRKY family in Grapevine. We identified a cDNA, designated *VvWRKY1*, which encodes a polypeptide of 151 amino acids, which has the structure characteristic of the group IIc of WRKY proteins family, characterized by one conserved DNA-binding domain WRKYGQK at its N-terminal end followed by a Cys₂His₂ zinc-finger motif. Phylogenetic analysis showed that *VvWRKY1* belongs to the sub-group IIc (Eulgem *et al.*, 2000), with *StWRKY1*, *AtWRKY75* (corresponding to *AtWRKY64* in Dong *et al.*, 2003) and *AtWRKY45* as closest homologues. *StWRKY1* has been shown to be induced by infection with *Phytophthora infestans* in potato but no induction was detected after treatment with SA and wounding. In grapevine, numerous partial sequences from EST databases showing significant homologies with WRKY genes have been sequenced from library constructed after abiotic stresses or from different stages of flowers and fruits development. But no functional analyses of genes encoding these sequences have been published.

Consistent with its putative role as transcription factor, the *VvWRKY1* protein contains a nucleus targeting sequence. Moreover, knowing that phosphorylation of WRKY proteins has been suggested to play a role in their activation (Yang *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2004), we have searched for presence of phosphorylation sites in the *VvWRKY1* deduced protein sequence. Effectively, numerous putative phosphorylation sites have been found using PSORT program (Nakai and Kanehisa, 1992, <http://psort.nibb.ac.jp>) (data not shown). This indicates a possible regulation of *VvWRKY1* activity by phosphorylation via different protein kinases.

WRKY proteins have been first defined as transcription factors able to bind W-box containing sequences (Eulgem *et al.*, 2000) that are presents in the promoter region of a large number of defense genes such as *PR* genes. Gel retardation assays have shown that the *in vitro* produced *VvWRKY1* protein bound specifically to the W box cis-elements. Different probes previously described in literature (Rushton *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2001) have been used in this study with an apparent same binding efficacy, demonstrating that *VvWRKY1* can bind this core sequence in different nucleotidic environment. This result suggests that *VvWRKY1* might regulate, positively or negatively, the expression of the W box containing genes in their promoter.

WRKY genes have been duplicated many times during evolution in plants, resulting a large gene family involved in the regulation a large set of genes by directing expression of target genes, thereby, ensuring proper cellular responses to physiological processes, internal and external stimuli. For example, the expression of several *Arabidopsis* WRKY genes is strongly up-regulated during plant senescence (Chen *et al.*, 2002 ; Robatzek and Somssich, 2001, Hindehofer and Zentgraf, 2001; Guo *et al.*, 2004). In our study, we showed that the *VvWRKY1* is strongly up-regulated in grape berry. *VvWRKY1* expression was very weak in berries before Véraison (during about 60 days after flowering), but there was a significant increase at Véraison stage that continued through ripening (Figure 4A). This increase seemed to be more important in flesh/skin than in seeds. This result suggested that *VvWRKY1* gene expression depend on developmental stages in berries. Moreover, this result is in concordance with a previous work on *CaWRKY1* gene in pepper. *CaWRKY1* expression is strongly up-regulated in red fruit and may play an important role in pepper fruit maturation (Ulker and Somssich, 2004). During ripening, berry tissues are likely to become highly susceptible to pathogens. Pattern of expression for some PR like, class IV chitinase, thaumatin-like protein, lipid-transfer protein or metallothionein are differentially expressed during ripening, some of them with a peak after Véraison stage (Davies and Robinson, 2000; Salzman *et al.* 1998; Robinson *et al.* 1997; Tattersall *et al.* 1997. Furthermore, this activation of *VvWRKY1* expression at Véraison can be correlated to resistance of grape berry to powdery mildew (Chellemi and Marois, 1992).

WRKY transcription factors play a central role in plant disease resistance response (Eulgem *et al.*, 2002). Plant response to pathogens, is regulated by multiple signal transduction pathways, in which SA, JA, and ethylene function as key signalling molecules (Glazebrook, 2001). To elucidate the potential involvement of *VvWRKY1* in plant defense, we characterized its expression by semi quantitative RT-PCR in grapevine in response to the wounding and exogenous signal molecules SA, JA, ethephon (ethylen releasing compound) and H₂O₂. All these molecules were sprayed in whole plant to prevent changes expression due to wounding stress of leaves detachment. This experiment could provide insights of *VvWRKY1* involvement in these signaling pathways. The transcription of *VvWRKY1* is up-regulated in response to SA, H₂O₂ and ethephon, and repressed by JA. These results are in accordance to the effect of SA and JA on *AtWRKY70* (Li *et al.*, 2004). Furthermore, the closest homologues

of *VvWRKY1*, *StWRKY1* and *AtWRKY75* have been shown to be induced by elicitors, SA treatment and pathogen infection (Dellagi *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2003).

In order to elucidate the potential involvement of *VvWRKY1* in plant defense, we characterized its expression in grapevine in response to pathogen infections. Inoculation by downy mildew was performed on detached leaves of grapevine and *VvWRKY1* transcripts accumulation was analysed by RT-PCR. In this study, we showed that the transcription of *VvWRKY1* is rapidly induced by downy mildew inoculation, at 2 hours post inoculation compared to control and wounding effect. These results suggested that the induction of many WRKY genes during the activation of plant defense response is conserved among different plant species and support the idea that *VvWRKY1* may play a role in plant defense.

Although WRKY transcription factors play a central role in plant disease resistance response (Eulgem *et al.*, 2002), direct evidence for the involvement of WRKY proteins in this process remains limited. To date, two *Arabidopsis* WRKY factors (*AtWRKY22* and *AtWRKY29*) have been identified as important down-stream compounds of MAPK pathway that confers resistance to both bacterial and fungal pathogens (Asai *et al.*, 2002). Expression of *AtWRKY29* in transiently transformed *Arabidopsis* leaves led to reduced disease symptoms, supporting the importance of *AtWRKY29* in this signalling event. Overexpression of *AtWRKY70* increased resistance to virulent pathogens (Li *et al.*, 2004). *Arabidopsis* plants that expressed *AtWRKY18* showed elevated levels of resistance towards a bacterial pathogen, albeit in a development-dependent manner (Chen and Chen, 2002). Nearly all such lines showed altered leaf morphologies and changes in flowering time (Robatzek and Somssich, 2002 ; Li *et al.*, 2004 ; Chen and Chen, 2002). In the present study, we have attempted to analyse the biological impact of constitutive expression of a grapevine stress-responsive transcription factor gene, *VvWRKY1*. Among 3 independent transgenic tobacco lines, with none phenotypic changes compared to control plants, we showed that over-expression of *VvWRKY1* confers increased tolerance of transgenic plants towards four types of fungi (*Chalara elegans*, *Pythium*, downy mildew and powdery mildew) and weakly increased expression of some PR genes in the line 17. This observed enhancement of only some PR genes expression in some transgenic lines is an intriguing question about the mode of action of this transcription factor in transgenic plants. It appears that constitutive expression of *VvWRKY1* is not systematically sufficient to activate PR gene expression. Similarly results showed that *AtWRKY18* alone is not able to activate PR gene expression in transgenic plants

during the younger stages development (Chen and Chen, 2002). Like many other complex biological processes, plant defense responses upon pathogen infection involve transcriptional regulation of a large number of plant host genes (Rushton and Somssich, 1998). These results suggest that the VvWRKY1 transcription factor may require coordination with developmentally regulated components and /or other transcription factors induced by plant-pathogen interaction to activate plant defense responses.

To conclude, in this study, we isolated a new grape WRKY gene, VvWRKY1, strongly regulated during berry and leaves development bu also in stress conditions. We provided evidence that this transcription factor, play an important role in plant defense response against fungal pathogens. Overexpression of VvWRKY1 in tobacco plants confers enhanced tolerance towards four types of fungi (*Chalara elegans*, *Pythium*, the downy mildew and the powdery mildew). Further investigations using an homologous expression system are in progress and might give us new insights into the biological function of WRKY genes in grapevine and their role in enhancing protection against different fungi.

References

- Abeles, F.B. 1992. Ethylene in plant biology. 2nd edition, New York, Academic press.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H., Zhu, S., Qiu, J.L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M.A., Bjorn, Nielsen H., Hirt, H., Somssich, I., Mattsson, O., Mundy, J., 2005. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.* 24:2579-2589.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M. and Sheen, J. 2002. Map kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977-983.
- Beyer, K., Binder, A., Boller, T. and Collinge, M. 2001. Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathol.* 2: 125-134.
- Chellemi, D.O. and Marois, J.J. 1992. Influence of leaf removal, fungicide applications and fruit maturity on incidence and severity of grape powdery mildew. *Amer. J. Enol. Vitic.* 43 : 53-57.
- Chen, C. and Chen, Z. 2002. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by *AtWRKY 18*, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol.* 129: 706-716.
- Chen, W., Provar, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H-S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G. and Whitham, S.A. 2002. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14: 559-574.
- Davies, C. and Robinson, SP. 2000. Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol.* 122: 803-12.
- Dellagi, A., Heilbronn, J., Avrova, A.O., Montesano, M., Palva, E.T., Stewart, H.E., Toth, I.K., Cooke, D.E.L., Lyon, G.D. and Birch, P.R.J. 2000. A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora subsp atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 1092-1101.
- Dempsey, D.A., Klessig, D.F., 1994. Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends Cell Biol.* 4: 334-8.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J. and Marco, Y. 2002. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *PNAS* 99 :2404-2409.
- Dong, X., 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 316-23.
- Dong, J., Chen, C.H. and Chen, Z.X. 2003. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol. Biol.* 51: 21-37.
- Du, L.Q. and Chen, Z.X. 2000. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24: 837-847.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S. and Somssich, I.E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5: 199-206.
- Glazebrook, J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 301-8.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T. 2000. FLS2 : an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5:1033-1011.

- Goodman, R.N. and Novacky, A.J., 1994. The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens, A Resistance Phenomenon. St.Paul, MN: APS Press.
- Guo, Y., Cai, Z. and Gan, S. 2004. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Cell Environ.* 27:521-549.
- Hammond-Kosack, K.E. and Parker, J.E., 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol.* 14: 177-93.
- Hinderhofer, K. and Zentgraf, U. 2001. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* 213:469-473.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of the vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Eichlotz, D., Rogers, S.G. and Frakey, R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- Johnson, C.S., Kolevski, B. and Smyth, D.R. 2002. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* 14: 1359-1375.
- Kalde, M., Barth, M., Somssich, I.E. and Lippok, B. 2003. Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signalling pathways. *Plant Mol Microbe Interact.* 16: 295-305.
- Karimi, M., Van Montagu, M. and Gheysen, G., 2000. Nematodes as vectors to introduce *Agrobacterium* into plant roots. *Mol Plant Pathol.* 1: 383-387.
- Kunkel, B.N. and Brooks, D.M., 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol.* 5: 325-31.
- Lagace, M. and Matton, D.P. 2004. Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*. *Planta.* 219: 185-189.
- Li, J., Brader, G. and Palva, E.T. 2004. The WRKY70 transcription factor : a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16: 319-331.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J., Sessa G., 2003. Understanding the functions of plant disease resistance. *Annu Rev Plant Biol.* 54 : 23-61.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-477.
- Nakai, K. and Kanehisa, M. 1992. A knowledge base for predicting protein localisation sites in eukaryotic cells. *Genomics* 14: 897-911.
- Narasimhan, M.L., Coca, M.A., Jin, J., Yamauchi, T., Ito, Y., Kadowaki, T., Kim, K.K., Pardo, J.M., Damsz, B., Hasegawa, P.M., Yun, D.J. and Bressan, R.A. 2005. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. *Mol. Cell* 17: 171-180.
- Ollat, N., Geny, L. and Soyer, J.P., 1998. Les boutures fructifères de Vigne : validation d'un modèle d'étude de la physiologie de la Vigne. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 32 : 1-9.
- Page, R.D. 1996. TreeView : an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosc.* 12: 357-358.
- Robatzek, S. and Somssich, I.E. 2001. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, *AtWRKY6*, is associated with both senescence- and defense-related processes. *Plant J.* 28: 123-133.
- Robatzek, S. and Somssich, I.E. 2002. Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* 16:1139-1149.
- Robinson, S.P., Jacobs A.K. and Dry I.B. 1997. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiol.* 114: 771-8.

- Rushton, P.J. and Somssich, I.E. 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr Opin Plant Biol.* 1: 311-5
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E., 1996. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *Embo J* 15 15: 5690-700.
- Ryals, J., Lawton, K.A., Delaney, T.P., Friedrich, L., Kessmann, H., Neuenschwander, U., Uknes, S., Vernooij, B., Weymann, K., 1995. Signal transduction in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9; 92: 4202-5.
- Salzman, R.A. and Tikhonova, I. 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol* 117: 465-72.
- Sun, C., Palmqvist, S., Olsson, H., Boren, M., Ahlandsberg, S. and Jansson, C. 2003. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in Barley by Binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell* 15: 2076-2092.
- Tattersall, D.B., Van Heeswijck, R. and Hoj, P.B. 1997. Identification and characterization of a fruit-specific thaumatin-like protein that accumulates at very high level in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiol* 114: 759–769.
- Thomson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. CLUSTAL_X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Ülker, B. and Somssich, I.E. 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:491-498.
- Van Loon, L.C. and Van Strien E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Wang, Z.P., Yang, P.Z., Fan, B.F. and Chen, Z.X. 1998. An oligo selection procedure for identification of sequence-specific DNA-binding activities associated with the plant defense response. *Plant J.* 16: 515-522.
- Xu, Y.H., Wang, J.W., Wang, S., Wang, J.Y., Chen, X.Y., 2004. Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)-y-cadinene synthase-A. *Plant Physiol* 135 : 507– 15.
- Yamamoto, S., Nakano, T., Suzuki, K. and Shinshi, H. 2004. Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Structure and Expression* 1679: 279-287.
- Yang, P.Z., Chen, C.H., Wang, Z.P., Fan, B.F. and Chen Z.X. 1999. A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element to the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant J.* 18:141-149.
- Yu, D., Chen, C. and Chen, Z. 2001. Evidence for an Important Role of WRKY DNA Binding Proteins in the Regulation of *NPR1* Gene Expression. *The Plant Cell* Vol. 13, 1527–1539.
- Zhang, Z.L., Xie, Z., Zou, X., Casaretto, J., Ho, T.D. and Shen, Q.J. 2004. A Rice WRKY Gene Encodes a Transcriptional Repressor of the Gibberellin Signaling Pathway in Aleurone Cells. *Plant Physiol.* 134: 1500-1513.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G. and Boller, T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428: 764-767.

Zou, X., Seemann, J.R., Neuman, D. and Shen, Q.J. 2004. A WRKY gene from creosote bbush encodes an activator of the abscisic acid signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 279: 55770-55779.

Les travaux présentés dans cet article démontrent que l'ADNc *VvWRKY1* code une protéine appartenant au groupe 2c de la famille des facteurs de transcription de type WRKY. Ce groupe est caractérisé par un domaine unique de liaison à l'ADN contenant un motif en doigt à zinc de type CCHH (**figure 1 et 2 de l'article**). La protéine *VvWRKY1* synthétisée *in vitro* est capable de se fixer spécifiquement aux séquences TTGAC ou "boîtes W", disposées dans au moins trois contextes nucléotidiques différents (**figure 3 de l'article**).

Par ailleurs, l'expression de ce gène est fortement régulée en fonction du développement des fruits mais également des feuilles de Vigne (**figure 4 de l'article**). Nous avons aussi observé que les transcrits *VvWRKY1* s'accumulent de façon importante suite à des traitements par des molécules élicitrices comme l'acide salicylique, l'éthéphon et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ainsi que suite à une blessure. Par contre, la transcription de ce gène semble réprimée en réponse à l'acide jasmonique (**figure 5 de l'article**). L'infection de feuilles de Vigne par le mildiou révèlent une accumulation des transcrits *VvWRKY1* plus précoce que dans les feuilles témoins (**figure 6 de l'article**). Ce facteur de transcription est donc probablement impliqué dans les réponses aux stress et aux infections par les champignons.

Finalement, les Tabacs transformés avec la construction *35S::VvWRKY1* ont permis de démontrer clairement un rôle de ce facteur de transcription dans les mécanismes de défense de la plante suite à des attaques d'agents pathogènes fongiques mais pas par des virus (**figures 7 et 8 de l'article**). Effectivement, les plantes sur-exprimant *VvWRKY1* révèlent une plus grande tolérance que les plantes sauvages envers les champignons testés, mais on ne retrouve pas ces différences lorsqu'il s'agit d'une infection par le virus PVY, Potato Virus Y.

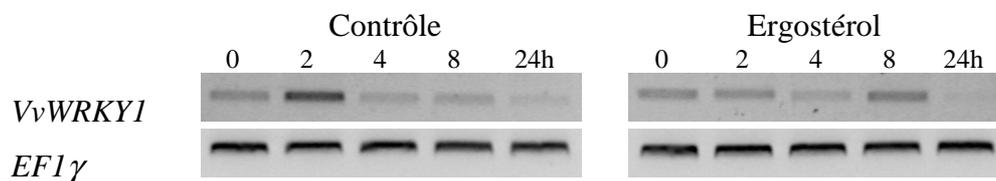


Figure 24 : Analyse par RT-PCR de l'expression de *VvWRKY1* en réponse à l'ergostérol. Les boutures de Vigne ont été pulvérisées par une solution d'ergostérol (200 μ M) diluée dans 2 % d'éthanol et 0,02 % de Triton 100X. Le traitement contrôle correspond à une pulvérisation par la solution de dilution (éthanol et triton). Les feuilles de 3 plantes sont récoltées pour chaque temps après traitement (de 0 h à 24 h). Les réactions de PCR sont effectuées pendant 30 cycles pour *VvWRKY1* et 27 cycles pour *EF1γ*.

Expression de *VvWRKY1* en réponse à un traitement des boutures
de Vigne par l'ergostérol

Des boutures de Vigne ont également été traitées par un éliciteur fongique, l'ergostérol. Cette molécule élicitrice est le principal composé de la membrane plasmique de la plupart des champignons (excepté les oïdiums et les rouilles). Une solution contenant de l'ergostérol à une concentration de 200 μ M diluée dans 2 % d'éthanol et 0,02 % de triton a été pulvérisée sur les boutures de Vigne. Les feuilles de 3 plantes ont été prélevées à différents temps après le traitement et les ARN totaux sont extraits pour réaliser les analyses d'expression par RT-PCR (**figure 24**). Cette expérience a été réalisée deux fois et a montré des résultats comparables.

Comme nous l'avons déjà observé lors des traitements détaillés dans l'article, le traitement par la solution contrôle (éthanol et triton) provoque une nette activation de l'expression de *VvWRKY1* (**figure 24**). Dans ce cas, nous remarquons une accumulation des transcrits 2 h après le traitement. Lorsque l'ergostérol est appliqué, cette réponse est masquée et nous voyons apparaître une accumulation transitoire des transcrits *VvWRKY1* 8 h après l'élicitation des plantes. Cette réponse est transitoire puisque le signal diminue nettement à 24 h. Ces résultats sont relativement cohérents avec les observations faites suite aux différents traitements par les éliciteurs abiotiques. L'induction de l'expression de *VvWRKY1* est toujours mise en évidence entre 4 et 8 heures après l'élicitation ou le stress. Ce résultat corrobore l'implication de ce gène dans la défense vis-à-vis des champignons mis en évidence avec les Tabacs transgéniques.

Par ailleurs, ce type d'expérience a également été réalisé par l'équipe du Pr. P. Coutos-Thévenot (Université de Poitiers) (communication personnelle, Eric Gomez). Dans le cadre de l'étude des gènes codant des protéines LTP (Lipid Transfert Protein) chez la Vigne, des pulvérisations d'ergostérol ont été appliquées sur des plantules de Vigne de cépage Ugni blanc cultivées *in vitro*. Les mêmes conditions de préparation ont été utilisées. Des analyses d'expression de l'ADNc *VvWRKY1* par northern blot, révèlent un pic d'accumulation de ces transcrits 5 h après le traitement. Ces résultats confirment bien nos observations effectuées à partir de boutures de Vignes de Cabernet Sauvignon.

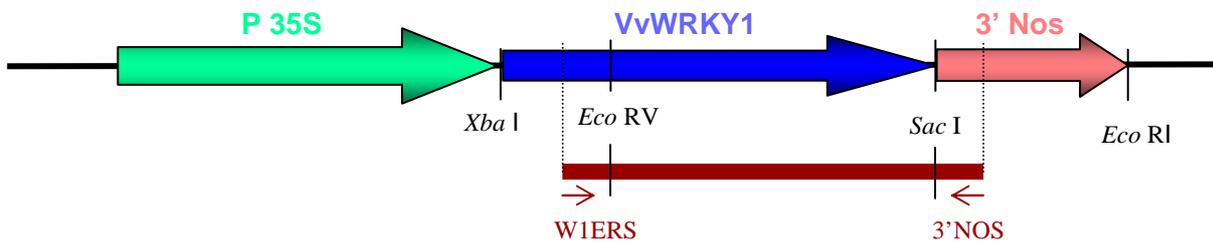


Figure 25 : Schéma de la sonde choisie pour effectuer le Southern blot afin d'évaluer le nombre de copies du transgène présentes dans les plantes transgéniques (Tabacs et *Arabidopsis thaliana*). La sonde est représentée en rouge, elle est amplifiée par PCR grâce à deux amorces, W1ERS et 3'NOS (cf annexe 2). Les sites de restriction utilisés et présents sur la sonde sont indiqués.

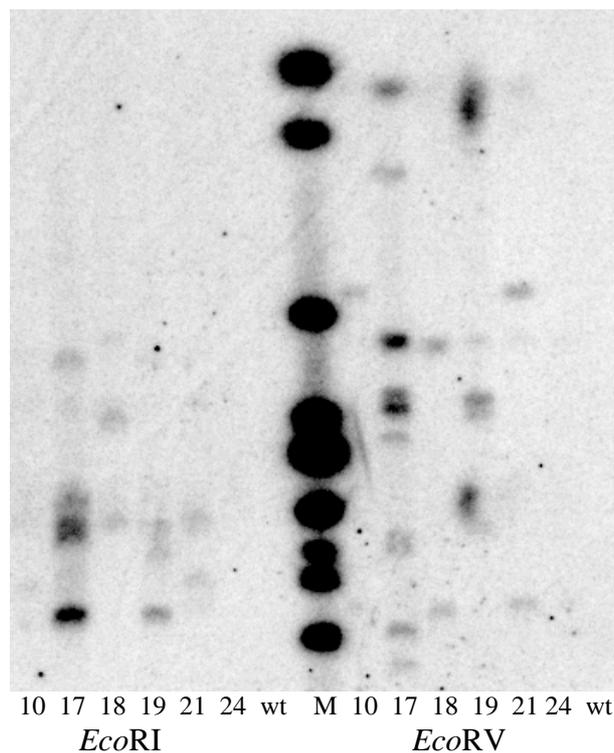


Figure n° 26 : Analyse par Southern blot du nombre d'insertions du transgène dans le génome de 6 lignées de Tabac transformées (10, 17, 18, 19, 21, 24) et de la lignée sauvage (wt). M : marqueur de taille.

Détermination du nombre de copies du transgène dans les Tabacs transgéniques par southern blot

Dans le but de connaître le nombre d'insertions du transgène dans les Tabacs transformés avec la construction 35S::VvWRKY1, nous avons analysé le génome des plantes par southern blot sur 6 lignées (10, 17, 18, 19, 21 et 24) ainsi que sur le Tabac sauvage (contrôle).

Etant donné que les facteurs WRKY appartiennent à une grande famille multigénique, caractérisée par leur large domaine très conservé, la sonde utilisée correspond à un fragment d'ADN recouvrant une partie de la séquence codante de VvWRKY1 et du 3' non codant du gène NOS. L'ADN génomique est extrait à partir de feuilles prélevées sur les transformants primaires puis digéré en parallèle par les enzymes suivantes : *Eco* RI et *Eco* RV. Comme le montre la **figure 25**, *Eco* RI ne coupe pas la séquence de la sonde choisie alors que *Eco* RV la coupe une fois.

Les résultats traduisent la présence d'au moins trois copies du transgène pour les lignées 17, 18, 19, 21 et au moins une copie pour la lignée 10 (**figure 26**). Par contre, pour la lignée 24, aucun signal n'est visible. Des vérifications par PCR sur l'ADN génomique ont confirmé que l'ADNc VvWRKY1 est absent. Cette lignée étant résistante à la kanamycine, ceci suggère que le transgène n'a pas été intégré dans sa totalité pour cette lignée. Ces plantes ont donc été écartées de la suite du travail.

Il est relativement fréquent d'observer plusieurs insertions de l'ADN-T dans le génome des plantes transformées par *A. tumefaciens* (Tinland, 1996, Cheng *et al.*, 1997). Afin de travailler sur une population la plus homogène possible, les analyses présentées dans l'article ont été effectuées pour chaque lignée sur une génération T2 présentant 100 % de résistance à la kanamycine.

Evolution de l'expression des gènes PR dans les Tabacs transgéniques au cours des générations

L'expression du transgène a été suivie par RT-PCR semi-quantitative chez les plantes transformées, au cours des générations (T0, T1 et T2), ainsi que celle de plusieurs gènes codant des protéines PR : PR1, 2, 3 (P et Q), 4, et 8. Ce travail a été effectué sur 5 lignées transgéniques : 10, 17, 18, 19 et 21. Les ARN totaux ont été extraits à partir de deux à trois feuilles prélevées sur deux plants de Tabac cultivés *in vitro*. Les expériences de RT-PCR ont ensuite été réalisées en utilisant les amorces répertoriées dans l'annexe 2.

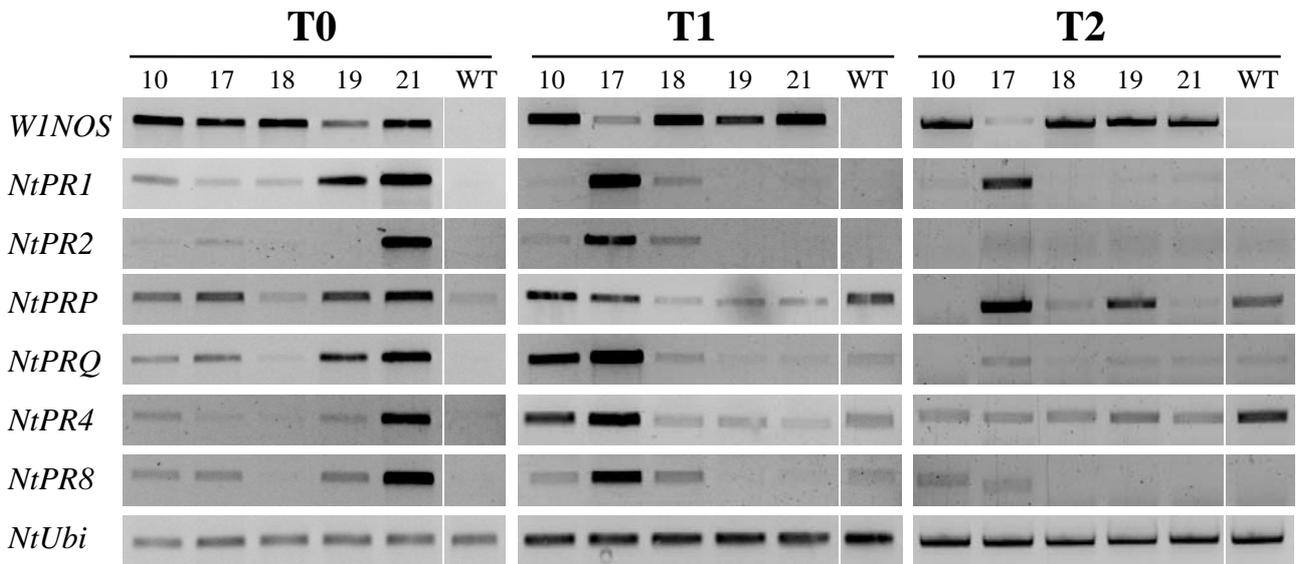


Figure 27 : Analyse de l'expression du transgène et de plusieurs gènes codant des protéines PR par RT-PCR semiquantitative dans les Tabacs transformés (10, 17, 18, 19, 21) et dans les plantes sauvages (WT) au cours des trois générations étudiées (T0, T1 et T2). Les amplifications se sont déroulées pendant 30 cycles, exceptés pour les ADNc *Ubiquitine* amplifiés pendant 28 cycles et *WINOS* pendant 33 cycles.

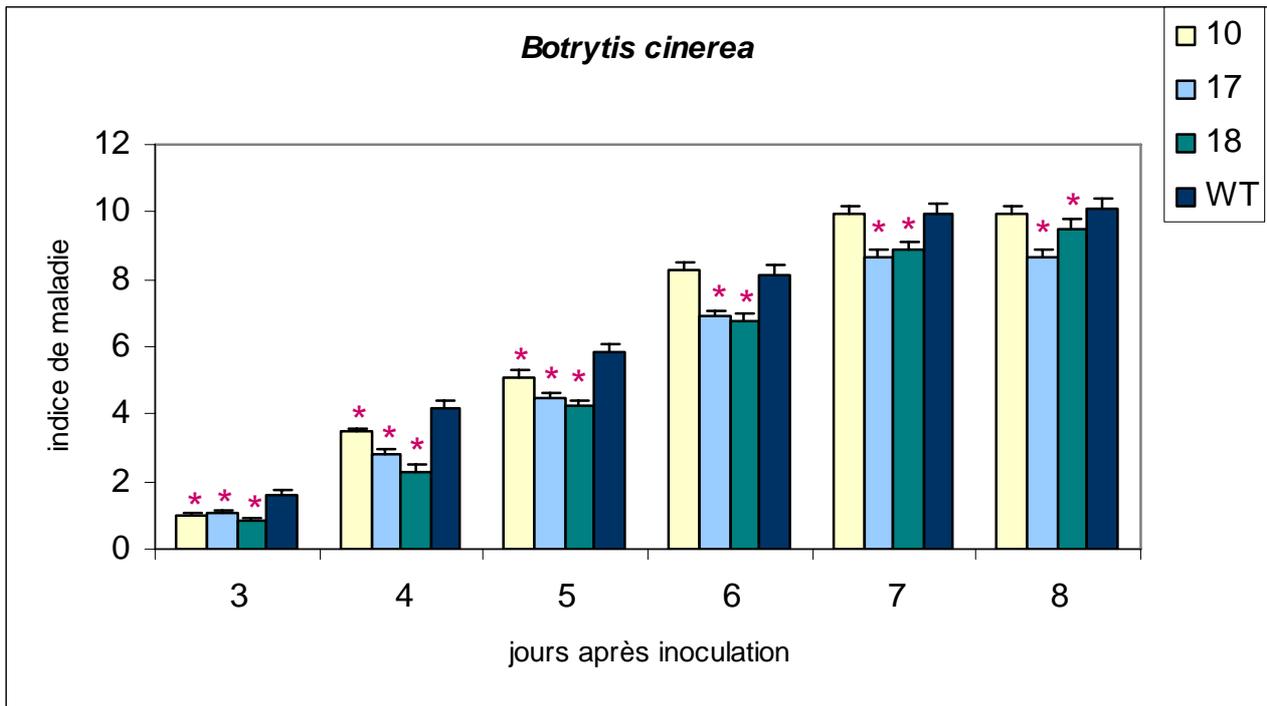


Figure 28 : Infection des Tabacs sur-exprimant *VvWRKY1* (3 lignées de génération T1 : 10, 17, 18) et des tabacs sauvages (WT) par le champignon *Botrytis cinerea*. Les plantes sont infectées par dépôt de gouttes d'une suspension de spores (5000 spores/ml) sur des plantes cultivées *in vitro*. Les symptômes sont évalués par une notation visuelle correspondant au développement du champignon par rapport à la zone d'inoculation. Les astérisques représentent des valeurs significativement différentes des plantes sauvages (ANOVA, $p < 0,05$).

Les résultats sont présentés dans la **figure 27**. Dans un premier temps, on remarque que le niveau d'expression du transgène (*WINOS*) de chaque lignée ne varie pas d'une génération à l'autre sauf pour la lignée 17. Il semble en effet que dans cette dernière, le niveau d'expression de *VvWRKY1* baisse progressivement au cours des générations.

L'analyse globale du taux d'expression des gènes *PR* semble montrer que la sur-expression de *VvWRKY1* chez le Tabac induit l'expression des gènes *PR*. Cependant, l'accumulation des transcrits *PR* se fait de façon très différente entre les lignées, sans corrélation avec le niveau d'expression du transgène, et de plus, elle varie très nettement d'une génération à l'autre. Seule la lignée 17 semble montrer au cours de ces trois générations un niveau supérieur d'accumulation des transcrits de plusieurs gènes *PR*.

Ces résultats montrent que la protéine *VvWRKY1* ne joue pas de rôle direct sur l'expression des gènes codant les protéines *PR* testés au cours de ce travail. Toutefois, il n'est pas impossible qu'elle soit capable de réguler l'expression de gènes non analysés ici, de nombreuses protéines *PR* ayant été mises en évidence chez le Tabac (Van Loon et Van Strien, 1999).

Tests de sensibilité des Tabacs transgéniques à *Botrytis cinerea*

Avant de réaliser les tests d'infection des Tabacs sur-exprimant *VvWRKY1* (de génération T2) présentés dans l'article précédent, des expériences préliminaires ont été menées sur les Tabacs de génération T1. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. D. Blancard (INRA, Bordeaux). Des plantes des trois lignées transformées (10, 17, 18) et des plantes sauvages cultivées *in vitro* ont été infectées par *Botrytis cinerea*, champignon nécrotrophe s'attaquant à de nombreuses espèces dont la Vigne et le Tabac. Les plantes ont été inoculées par dépôt de gouttes contenant une suspension de sporanges de ce champignon. L'évolution des symptômes est évaluée par notation visuelle en suivant une échelle décrivant la surface de croissance du champignon par rapport au site d'infection. Les résultats des notations effectuées de 3 à 8 jours après l'inoculation sont présentés dans la **figure 28**.

Les trois lignées transgéniques testées présentent un niveau de tolérance vis-à-vis de *Botrytis cinerea* significativement différent des plantes sauvages. Cette sensibilité moindre persiste dans le temps pour les deux lignées 17 et 18, mais s'atténue progressivement pour la lignée 10. Effectivement, après le 6^{ème} jour, les différences entre cette lignée et les plantes sauvages ne sont plus significatives puis s'estompent complètement lors des observations ultérieures. Cette expérience a été répétée une deuxième fois et des résultats comparables ont été observés.

Bien que ces analyses aient été réalisées sur des plantes de génération T1 (mêlant des plantes ayant des contextes génétiques différents), les différences de sensibilité observées entre plantes transformées et non transformées sont significatives. Ces premiers résultats suggérant que le facteur de transcription VvWRKY1 confère aux Tabacs un effet protecteur vis-à-vis des champignons nous ont encouragés à poursuivre les tests d'infection sur la génération de Tabacs suivante (article précédent).

Discussion

Identification d'un nouveau facteur de transcription de type WRKY chez la Vigne, VvWRKY1

L'ADNc *VvWRKY1* code une protéine présentant les caractéristiques du groupe 2c de cette famille de facteurs de transcription : elle contient un domaine unique de liaison à l'ADN comprenant notamment un motif en doigt à zinc CC/HH. Les protéines WRKY présentant les plus grandes similarités de séquences avec VvWRKY1 sont AtWRKY75, AtWRKY45 et StWRKY1. Seul le gène *StWRKY1* a été étudié de façon approfondie (Dellagi *et al.* 2000). La séquence codante a été isolée chez la pomme de terre par hybridation soustractive suite à une infection par une bactérie (*Erwinia carotovora*). Les auteurs ont montré que l'expression de ce gène pouvait être induite par une infection par une bactérie (*E. carotovora*), un champignon (*P. infestans*) et l'application d'un éliciteur (filtrat d'*E. carotovora*) mais pas par l'acide salicylique, le méthyljasmonate ni la blessure.

AtWRKY45 et *AtWRKY75* ont été inclus, sous les noms respectifs de W45 et W64, dans l'étude globale de profils d'expression des gènes WRKY d'*Arabidopsis thaliana* suite à un traitement par l'acide salicylique ou à une infection par la bactérie *Pseudomonas syringae* (Dong *et al.*, 2003). Ces deux gènes présentent un fort pic d'accumulation de leurs transcrits 8 h après les traitements, le niveau d'expression de W64 étant toutefois plus faible que celui de W45. Ces deux gènes sont exprimés dans les racines et dans les plantes en fleurs.

Ainsi, les plus proches homologues de VvWRKY1, bien que impliqués vraisemblablement tous deux dans les réactions de défense, n'interviennent pas dans les mêmes voies de signalisation car ils présentent des profils d'expression différents lors de traitements par l'acide salicylique.

De façon générale, aucune fonction physiologique commune n'a pu être affectée aux membres d'un même groupe de protéines WRKY basé sur l'homologie de séquence (Ulker et Somssich, 2004). Cependant, le fait que les protéines du groupe 2d possèdent toutes un motif

Sequence	Description
TC40428	<i>homologue to UP WR23_ARATH (O22900) Probable WRKY transcription factor 23 (WRKY DNA-binding protein 23), partial (25%)</i>
TC40931	<i>homologue to UP WR71_ARATH (Q93WV4) Probable WRKY transcription factor 71 (WRKY DNA-binding protein 71), partial (32%)</i>
TC41321	<i>similar to UP Q8H9D7 (Q8H9D7) WRKY-type DNA binding protein, partial (35%)</i>
TC41855	<i>similar to UP WR32_ARATH (P59583) Probable WRKY transcription factor 32 (WRKY DNA-binding protein 32), partial (30%)</i>
TC43091	<i>similar to UP Q7XAA6 (Q7XAA6) WRKY10 (WRKY transcription factor 35), partial (3%)</i>
TC43241	<i>homologue to UP Q7XAA4 (Q7XAA4) WRKY12, partial (21%)</i>
TC44267	<i>weakly similar to UP WR19_ARATH (Q9SZ67) Probable WRKY transcription factor 19 (WRKY DNA-binding protein 19), partial (4%)</i>
TC45601	<i>similar to UP Q9SXP5 (Q9SXP5) Transcription factor NtWRKY2, partial (13%)</i>
TC46341	<i>similar to UP WR48_ARATH (Q9FGZ4) Probable WRKY transcription factor 48 (WRKY DNA-binding protein 48), partial (27%)</i>
TC46594	<i>weakly similar to UP Q6IEL2 (Q6IEL2) WRKY transcription factor 69, partial (26%)</i>
TC46595	<i>weakly similar to UP Q6IER6 (Q6IER6) WRKY transcription factor 15, partial (19%)</i>
TC46952	<i>similar to UP Q9FXS1 (Q9FXS1) WRKY transcription factor NtEIG-D48, partial (43%)</i>
TC47383	<i>similar to UP WR65_ARATH (Q9LP56) Probable WRKY transcription factor 65 (WRKY DNA-binding protein 65), partial (47%)</i>
TC47384	<i>similar to UP WR65_ARATH (Q9LP56) Probable WRKY transcription factor 65 (WRKY DNA-binding protein 65), partial (54%)</i>
TC49418	<i>similar to UP Q6VR10 (Q6VR10) WRKY 13 (Fragment), partial (39%)</i>
TC49475	<i>similar to UP Q6IEL3 (Q6IEL3) WRKY transcription factor 68, partial (5%)</i>
TC49651	<i>similar to UP WR57_ARATH (Q9C983) Probable WRKY transcription factor 57 (WRKY DNA-binding protein 57), partial (34%)</i>
TC49694	<i>similar to UP Q6IEP2 (Q6IEP2) WRKY transcription factor 39, partial (26%)</i>
TC49754	<i>similar to UP Q8W1M6 (Q8W1M6) WRKY-like drought-induced protein, partial (19%)</i>
TC50091	<i>similar to GB AAL35291.1 17064168 AF442398 WRKY transcription factor 74 {Arabidopsis thaliana;} , partial (49%)</i>
TC50592	<i>similar to UP Q8H9D7 (Q8H9D7) WRKY-type DNA binding protein, partial (55%)</i>
TC51312	<i>similar to UP Q7XAA5 (Q7XAA5) WRKY11, partial (7%)</i>
BQ795624	<i>similar to GP 10798760 dbj WRKY transcription factor Nt-SubD48 {Nicotiana tabacum}, partial (24%)</i>
CA808131	<i>similar to GP 4894963 gb DNA-binding protein WRKY3 {Avena sativa}, partial (34%)</i>
CA809190	<i>similar to GP 4894963 gb A DNA-binding protein WRKY3 {Avena sativa}, partial (27%)</i>
CA809370	<i>similar to GP 10798760 dbj WRKY transcription factor Nt-SubD48 {Nicotiana tabacum}, partial (22%)</i>

Tableau 21 : Énumération de toutes les séquences TC correspondant à des gènes WRKY, répertoriées dans les bases de données de Vigne du TIGR, (release 4, http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?specie=grape) suivies de leur annotation (provenant de la banque du TIGR) en terme d'homologie avec les séquences répertoriées dans les bases de données disponibles.

C qui permet la liaison à la calmoduline suggère qu'elles sont impliquées dans les mécanismes de régulation liés au signal calcium et la calmoduline (Park *et al.*, 2005).

Au moment où ce travail a été initié, aucune séquence que ce soit pleine longueur ou partielle codant des protéines WRKY n'était disponible chez la Vigne dans les bases de données. Aujourd'hui, de nombreuses séquences EST (Expressed Sequences Tag) correspondant à des gènes *WRKY* sont répertoriées. Effectivement, dans la banque du TIGR (http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=grape), on peut dénombrer jusqu'à 26 séquences TC (Tentative Consensus sequence) présentant des homologies avec des gènes *WRKY* (**tableau 21**). Les données répertoriées sur ce site proviennent de différentes banques EST (différents organes, cultivars, stades de développement) mais seules deux banques ont été générées à partir de plantes stressées et uniquement de façon abiotique : une banque de feuilles de Vigne et une autre de baie de raisin, toutes deux issues du cépage Chardonnay (Laboratoire de JC Cushman, University of Nevada, Reno, USA). Il n'existe donc pas de séquences EST disponibles correspondant à des plantes de Vignes infectées par un pathogène ou élicitées.

Des alignements de séquences ont montré que l'ADNc *VvWRKY1* correspond à l'EST annoté TC50592. Le **tableau 22** regroupe les séquences des EST de Vigne répertoriées (TIGR) présentant le plus d'homologie avec *VvWRKY1*. Les TC41321 et TC46341 présentent les plus fortes homologies de séquences. Toutes les trois sont issues de banques EST réalisées à partir de baies stressées de façon abiotique.

VvWRKY1 ne présente pas d'homologie importante avec les deux séquences d'ADNc, *WRKY4* et *WRKY30*, issues d'une espèce américaine résistante à plusieurs maladies, *Vitis aestivalis* cv. Norton, actuellement dans la base de données de Genbank. On y trouve également la séquence de l'ADNc *VvWRKY2* isolé au laboratoire dans les mêmes conditions que *VvWRKY1*, qui appartient au groupe I (Mzid *et al.*, soumis).

Interaction de la protéine VvWRKY1 avec des séquences nucléotidiques contenant des boîtes W

Nous avons mis en évidence que la protéine VvWRKY1 est capable de se fixer *in vitro* sur au moins trois séquences différentes de régions promotrices contenant une ou plusieurs boîtes W (TTGAC).

Dans un premier temps, cette interaction permet de valider la fonctionnalité de VvWRKY1 comme facteur de transcription potentiel capable de se fixer sur les séquences cibles des

TC	Annotation	E-value	Banque d'EST
TC50592	similar to UP Q8H9D7 (Q8H9D7) WRKY-type DNA binding protein, partial (55%)	6.3e-153	baie, stress abiotique (Chardonnay) baie, stade ripening (Shiraz)
TC41321	similar to UP Q8H9D7 (Q8H9D7) WRKY-type DNA binding protein, partial (35%)	5.3e-24	feuille stress abiotique (Chardonnay) baie, stade véraison (Ugni blanc)
TC46341	similar to UP WR48_ARATH (Q9FGZ4) Probable WRKY transcription factor 48 (WRKY DNA-binding protein 48), partial (27%)	5.4e-20	baie vertes, turning, véraison (Shiraz), baie, véraison (C. sauvignon) baie, stress abiotique(Chardonnay)
CF605507	Pas d'homologie identifiée	2.4e-19	jeunes racines (Pinot noir)
TC49651	similar to UP WR57_ARATH (Q9C983) Probable WRKY transcription factor 57 (WRKY DNA-binding protein 57), partial (34%)	3.6e-18	baie, véraison (Pinot noir) baie, pré-véraison st 28 (C. sauvignon) baie, post-véraison st 36 (C. sauvignon)
TC40428	homologue to UP WR23_ARATH (O22900) Probable WRKY transcription factor 23 (WRKY DNA-binding protein 23), partial (25%)	1.4e-13	baie, stress abiotique (Chardonnay) baie mûre (Shiraz)
TC40931	homologue to UP WR71_ARATH (Q93WV4) Probable WRKY transcription factor 71 (WRKY DNA-binding protein 71), partial (32%)	2.5e-13	feuille, stress abiotique (Chardonnay)
TC45602	similar to UP Q40090 (Q40090) SPF1 protein, partial (66%)	3.5e-13	jeunes racines (pinot noir) feuille et baie, stress abiotique (Chardonnay) feuille (C. Sauvignon)

Tableau 22 : Séquences TC répertoriées dans la base de données du TIGR présentant le plus d'homologie de séquence nucléotidique avec *VvWRKY1*, avec leur annotation (provenant de la banque du TIGR). La première référence notée en violet correspond à la séquence de *VvWRKY1* ; cette séquence de 708 nucléotides s'aligne parfaitement avec l'ADNc de *VvWRKY1*. La colonne E value correspond aux identités de séquences entre *VvWRKY1* et les TC.

protéines WRKY. La spécificité de liaison à l'ADN dépend de l'intégrité du cœur TTGAC, des compétitions avec des sondes mutées (TTGAa) diminuant le signal observé lors des expériences de retard sur gel.

Par ailleurs, ces résultats suggèrent une large palette de gènes cibles potentiels puisque les sondes testées contiennent des boîtes W arrangées différemment et proviennent de différents promoteurs [*PcPRI*, (Rushton *et al.*, 1996) ; *AtNPR1*, (Yu *et al.*, 2001)]. Toutefois, ces résultats sont le reflet d'une expérience en système *in vitro* où seule la protéine WRKY et la séquence contenant les boîtes W sont mises en présence, aucune protéine compétitrice n'étant ajoutée dans le système expérimental.

Des résultats similaires ont été mis en évidence pour les protéines tWRKY3 et tWRKY4 (Chen *et al.*, 2000). Des expériences de retard sur gel ont montré que ces deux protéines étaient capables de se fixer sur deux types de sondes contenant des boîtes W arrangées différemment. Les deux sondes testées contiennent une boîte W (TTGAC) ou 2 répétitions directes TGAC séparées de 4 nucléotides.

Par contre, d'autres protéines WRKY montrent une spécificité de liaison pour certains arrangements des boîtes W. Ainsi, Hara *et al.* (2000) montrent, par des expériences de retard sur gel, la fixation de la protéine NtWIZZ sur deux types de sondes contenant deux séquences TTGAC séparées par 5 et 6 nucléotides. Lorsque la boîte W est réduite à la séquence TGAC, ou lorsque l'espacement entre les deux boîtes W est modifié, l'interaction protéine/ADN ne se fait plus ou avec une très faible affinité.

Marè *et al.* (2004) ont testé la spécificité de fixation de HvWRKY38 sur de nombreuses sondes, par retard sur gel, et ont mis en évidence que les séquences nucléotidiques bordant les éléments W participent également à cette spécificité d'interaction.

Dans les cellules végétales, de nombreux facteurs supplémentaires participent au choix des cibles des facteurs de transcription car ces boîtes W sont très répandues dans les séquences promotrices des gènes de plantes (Maleck *et al.*, 2000). Ainsi, le nombre, la disposition, l'espacement de ces éléments régulateurs semblent conditionner aussi des promoteurs (Rushton *et al.*, 2002) et donc certainement la spécificité de reconnaissance par tel ou tel facteur de transcription WRKY.

Les séquences régulatrices environnant les boîtes W sont également importantes pour la liaison d'éventuels partenaires protéiques des protéines WRKY. Certains travaux montrent en effet que la fixation de protéines WRKY sur des boîtes W dépend de complexes multiprotéiques (Yang *et al.*, 1999, Yamamoto *et al.*, 2004).

Gène	stress	(+/-)	délai	système expérimental	Référence
<i>ABF1 et 2</i>	GA	0		graines	Rushton <i>et al.</i> , 1995
<i>AtWRKY</i>	SA, pseudomonas	+	variable		Dong <i>et al.</i> , 2003
<i>AtWRKY6</i>	blessure abscission sénescence	+ + +	de 1h à 6h	feuilles	Robatzek <i>et al.</i> , 2001
<i>AtWRKY18</i>	SA	+	3 h	plantes	Chen et Chen, 2002
<i>AtWRKY25</i>	H2O2, paraquat blessure chaleur (38°C)	+ + +	30-120 min 1h 1h	feuilles	Rizhsky <i>et al.</i> , 2004
<i>AtWRKY53</i>	H2O2 développement	+ +	2-6 h 7 semaines	plantes	Miao <i>et al.</i> , 2004
<i>AtWRKY70</i>	éliciteur bactérien SA MeJA ACC	+ + + +	5-24h 2-24h 2h 8h	feuilles	Li <i>et al.</i> , 2004
<i>GaWRKY1</i>	Vde, éliciteur fongique SA MeJA H2O2	+ 0 + 0	30 min 30 min 30 min 30 min	cellules	Xu <i>et al.</i> , 2004
<i>HvWRKY38</i>	froid froid poussé : gel sécheresse ABA	+ + + 0	2h 2-48h	feuilles	Mare <i>et al.</i> , 2004
<i>IbSPF1</i>	Sucrose PGA (éliciteur)	- -	12h 12h	pétioles	Ishiguro <i>et al.</i> , 1994
<i>NtWIZZ</i>	blessure	+	5-30 min	feuilles	Hara <i>et al.</i> , 2000
<i>NtWRKY1,2</i>	éliciteur fongique	+	30 min -6h	cellules	Yamamoto <i>et al.</i> , 2004
<i>NtWRKY4</i>	éliciteur fongique	-	3-6h		Yamamoto <i>et al.</i> , 2004
<i>Pc WRKY1</i>	pep25 (éliciteur fongique)	+	15 min-2h	cellules	Rushton <i>et al.</i> , 1996
<i>Pc WRKY2</i>		-	0-1h		
<i>Pc WRKY3</i>		+	30 min-1h30		
<i>OsWRKY71</i>	GA ABA	- 0	24 h	aleurone	Zhang <i>et al.</i> , 2004
<i>OsWRKY77</i>	GA, ABA	0			
<i>tWRKY1,2</i>	SA TMV	+fixation +fixation	4-6h 6-9h	gelshift	Yang <i>et al.</i> , 1999
<i>tWRKY1</i>	TMV	+	6-9h	northern	Yang <i>et al.</i> , 1999
<i>tWRKY2</i>	TMV	0		northern	Yang <i>et al.</i> , 1999
<i>tWRKY3,4</i>	TMV	+	6-12h		Chen <i>et al.</i> , 2000
<i>tWRKY3</i>	SA	+	2-8h		
<i>tWRKY4</i>	SA	+	2h		
<i>RrWRKY</i>	froid dormance	+ +	48h	germination	
<i>StWRKY1</i>	éliciteur bactérien SA blessure MeJA	+ 0 0 0	de 8 à 24h	feuilles	Dellagi <i>et al.</i> , 2000

Tableau 23 : Récapitulatif des résultats de modification d'expression des gènes WRKY en réponse à différents stress. Ce tableau regroupe des données bibliographiques publiées. Cette liste n'est pas exhaustive. (+/-) indique s'il s'agit d'une activation ou d'une répression, (0) indique qu'il n'y a aucun effet.

Par ailleurs, des essais d'expression transitoire sur des cellules d'aleurone d'orge, ont mis en évidence que la protéine OsWRKY71 est capable, en se fixant sur les boîtes W, de bloquer l'activation du promoteur *Amy32* par la protéine OsGAMYB (Zhang *et al.*, 2004). Il y a donc une interférence fonctionnelle entre l'activateur OsGAMYB et le répresseur OsWRKY70 mais le mécanisme reste indéterminé. Pourtant, une hypothèse est soulevée par ces auteurs. Ces 2 protéines pourraient entrer en compétition avec un 3^{ème} facteur de transcription. En observant la structure du promoteur *Amy32*, on remarque qu'entre les éléments de fixation respectifs de ces deux protéines (boîtes W et GARE) se trouve une boîte Pyr, sur laquelle peut se lier un facteur DOF (et notamment OsDOF3). Cette protéine a déjà été montrée comme interagissant physiquement avec OsGAMYB pour l'activer. Ainsi, cette nouvelle protéine permettrait d'expliquer que OsWRKY70 interfère avec l'interaction DOF/GAMYB pour bloquer l'activation du promoteur *Amy32*.

Implication de *VvWRKY1* dans les différentes voies de transduction des réponses aux stress

Des traitements ont été effectués sur des boutures de Vigne, afin de mettre en évidence la réponse de *VvWRKY1* à divers stress. En particulier, des molécules (acide salicylique, éthéphon, H₂O₂, acide jasmonique et ergostérol) faisant intervenir différentes voies de signalisation intracellulaire ont été appliquées. Les résultats montrent, dans tous les cas, une régulation de la transcription du gène *VvWRKY1* en réponse à ces traitements ; elle est positive pour la blessure, SA, l'éthéphon, H₂O₂ et le mildiou mais négative pour l'acide jasmonique.

Plusieurs travaux ont montré des inductions des gènes *WRKY* par de tels stress. Ces résultats bibliographiques (non exhaustifs) sont récapitulés dans le **tableau 23**.

Les effets de traitements par l'acide salicylique (SA) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) peuvent être associés car ces deux composés agissent généralement de concert. Lors de la réaction d'hypersensibilité, les ROS, H₂O₂ et O₂⁻, vont déclencher de nombreuses réactions constituant le burst oxydatif, pouvant entraîner la mort cellulaire. L'accumulation de H₂O₂ dans le cytosol va induire l'expression des gènes de détoxification, la production d'acide salicylique et de phytoalexines (Tenhaken *et al.*, 1995). De plus, l'acide salicylique empêche la dégradation de H₂O₂, en fixant la catalase et en l'inhibant (Chen *et al.*, 1995). Il favorise ainsi la production des ROS.

Il apparaît donc cohérent d'obtenir le même type de régulation de *VvWRKY1* suite à des traitements par SA ou H₂O₂. De nombreux autres gènes *WRKY* ont été montrés comme induits

par l'acide salicylique dans différentes espèces (Yang *et al.*, 1999, Chen et Chen, 2000, Chen et Chen, 2002, Dong *et al.*, 2003, Li *et al.* 2004) mais beaucoup moins par H₂O₂ (Miao *et al.*, 2004, Rizhsky *et al.* 2004). Par contre, l'activation par l'acide salicylique et H₂O₂ a rarement été testée en parallèle. Seule l'équipe de Xu *et al.* (2004) a montré que l'expression de *GaWRKY1* n'était pas modifiée par ces deux éliciteurs, alors qu'elle était induite par un éliciteur fongique et par le méthyljasmonate.

Le rôle de l'acide jasmonique (JA) a largement été décrit comme molécule signal intervenant dans les mécanismes de défense des plantes (Gundlach *et al.* 1992). Cette molécule de petite taille s'accumule rapidement dans les cellules végétales suite à une attaque par un agent pathogène ou à une élicitation. En déclenchant des cascades de signalisation, l'acide jasmonique contribue à l'accumulation de métabolites secondaires pour défendre la plante de ses agresseurs (van der Fits et Memelink, 2001).

La voie de signalisation faisant intervenir l'acide jasmonique semble avoir un effet opposé et agir de façon indépendante de la voie de l'acide salicylique (Xu *et al.*, 1994 ; Reymond et Farmer, 1998 ; Thomma *et al.*, 2001). Pourtant, certaines protéines peuvent être des points de connexion entre ces deux voies de signalisation. Par exemple, *AtWRKY70* est, comme *VvWRKY1*, induit par SA et réprimé par JA. L'analyse de plantes sur- ou sous-exprimant ce gène montre qu'il joue un rôle de régulation positive sur les gènes de la voie de signalisation de l'acide salicylique alors qu'il réprime ceux de la voie de l'acide jasmonique (Li *et al.* 2004).

L'éthylène, phytohormone régulant la croissance et le développement de la plante, participe également au contrôle des mécanismes de défense locale et à distance. Cette molécule semble être responsable du contrôle de la taille des lésions nécrotiques tissulaires et donc de la mort cellulaire (Abeles, 1992). Il est souvent admis que les voies de signalisation faisant intervenir l'acide jasmonique et l'éthylène agissent dans le même sens (Dong *et al.*, 1998). Toutefois, Overmeyer *et al.* (2000) décrivent des actions antagonistes de ces deux molécules dans le contrôle de la propagation des lésions causées par un traitement à l'ozone, lors de l'étude d'un mutant d'*Arabidopsis rcd1*. L'éthylène induit le développement de ces lésions alors que le méthyljasmonate participe au confinement de ces lésions.

La démonstration de l'action opposée de ces deux molécules vient conforter nos résultats qui montrent une régulation positive de *VvWRKY1* par l'éthylène mais négative par l'acide jasmonique.

D'autre part, la blessure, stress mécanique de la plante, est souvent associée à la voie de signalisation à laquelle participe l'acide jasmonique mais d'autres "molécules signal" comme la systémine, les oligosaccharides, l'acide abscissique ou l'éthylène peuvent être mise en jeu dans la signalisation de la blessure (Leon *et al.*, 2001). En effet, tous ces composés ainsi que des ROS s'accumulent en réponse à une blessure. Lors des tests de blessure effectués sur les boutures de Vigne, nous avons mis en évidence une accumulation des transcrits *VvWRKY1* dès 2 h après la blessure. En ce qui concerne les gènes *WRKY* dont l'expression a été étudiée suite à la blessure, la plupart d'entre eux montre une rapide accumulation de leurs transcrits (**tableau 23**) dès 5 minutes pour *NtWIZZ* (Hara *et al.*, 2000) et vers 1 h pour *AtWRKY6* (Robatzek et Somssich 2001) et *AtWRKY25* (Rizhsky *et al.*, 2004). Seul *StWRKY1* n'est pas induit en réponse à une blessure (Dellagi *et al.*, 2000).

Régulation transcriptionnelle ou/et post-traductionnelle de *VvWRKY1* en condition de stress

Les réponses transcriptionnelles des gènes *WRKY* ont souvent lieu au cours des 12 heures suivant la stimulation (**tableau 23**). Des réactions précoces ont été observées dans certains cas dès 30 min ou 1h après l'élicitation. Les traitements sur suspensions cellulaires font apparaître les réponses les plus rapides, dès 30 minutes.

Dans le cas du gène *VvWRKY1*, l'induction est visible environ 4 h après les traitements. Ce délai suggère des mécanismes indirects d'activation de l'expression de *VvWRKY1*, et notamment des synthèses protéiques *de novo*. Ainsi, la régulation de *VvWRKY1* nécessite probablement la synthèse de facteurs de transcription contrôlant en amont son expression. L'analyse des éléments régulateurs présents dans les promoteurs des protéines *WRKY* suggère que leur régulation peut être assurée par différents facteurs de transcription. En premier lieu, les protéines *WRKY* pourraient elles-mêmes contrôler leur expression puisque ils contiennent de nombreuses boîtes W. Effectivement, il a été démontré que *AtWRKY22* et *AtWRKY29* pouvaient s'auto-activer (Asai *et al.*, 2002) et que la protéine *AtWRKY6* pouvait s'auto-réprimer (Robatzek et Somssich, 2002). De plus, la présence de boîte GCC dans plusieurs promoteurs de gènes *WRKY* évoque une régulation par les facteurs de transcription ERF mais cela n'a pas été démontré.

Il ne faut pas oublier de préciser que les protéines MAPK peuvent aussi jouer un rôle important dans la régulation des facteurs *WRKY*. Elles peuvent les phosphoryler directement ou bien phosphoryler des partenaires protéiques ou des protéines régulant en aval les facteurs *WRKY*. Des articles récents étudient les relations entre les protéines MAPK et *WRKY*. Asai

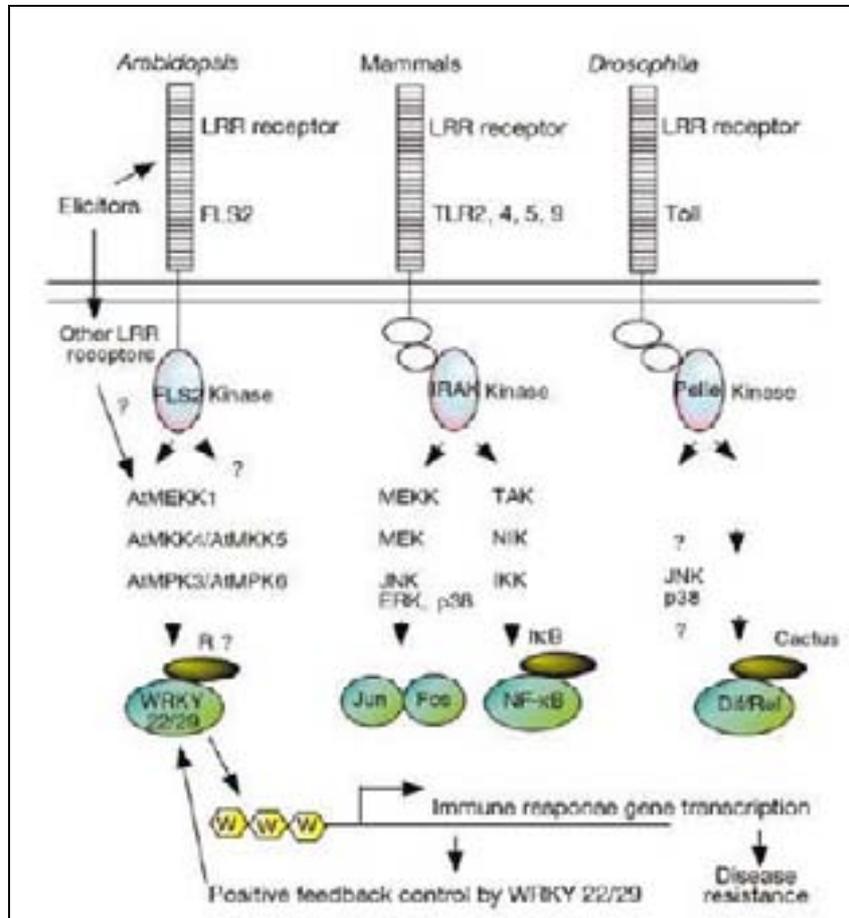


Figure 29 : Schéma proposant un modèle d'activation de la voie des protéines MAPK, aboutissant à la régulation des protéines WRKY en réponse à un éliciteur, la flagelline.

Modèle de la voie de signalisation d'immunité innée activée par les récepteurs LRR chez *Arabidopsis*, les mammifères et la drosophile. Un répresseur putatif peut contrôler l'activité de WRKY22 et 29 puisque leur sur-expression outrepassa l'action des éliciteurs. Les voies de signalisation conservées pour les réponses d'immunité innée chez les animaux sont résumées sur la base de récentes revues concernant les mammifères et la drosophile (Asai *et al*, 2002)

et al. (2002) ont mis en évidence l'ensemble de la voie de signalisation déclenchée par la fixation de la flagelline, composé de flagelle bactérien, sur le récepteur FLS2, dans des protoplastes de mésophylle d'*A. thaliana*. Cette voie fait intervenir une cascade de MAPK, dont chaque protéine a été identifiée, menant à la phosphorylation et l'activation d'un répresseur (non identifié) capable de bloquer l'activité des protéines WRKY22 et 29 (**figure 29**). Des résultats similaires mais aboutissant cette fois à l'activation de plusieurs gènes WRKY (*NtWIZZ*, *NtDBP3*, *NtWRKY3* et *NtSubD48*) ont été mis en évidence chez le Tabac (Kim et Zhang, 2004). Plus récemment, Andreasson *et al.* (2005) ont identifié une protéine, MKS1, intermédiaire chez *A. thaliana* entre une MAPK et deux facteurs WRKY, WRKY25 et WRKY33 participant à l'induction de gènes de défense dépendant de l'acide salicylique.

Ces travaux semblent indiquer que certains facteurs WRKY peuvent être contrôlés par des MAPK mais sans être directement phosphorylés par ces protéines.

Toutefois, il a été démontré que d'autres protéines WRKY doivent au contraire être phosphorylées pour se fixer sur les boîtes W de leurs gènes-cibles ou nécessitent des phosphorylations en amont pour être actives. Des traitements par la phosphatase alcaline ou par des inhibiteurs de kinases (comme la staurosporine) peuvent ainsi abolir l'activité des protéines WRKY (Yang *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2004).

Ce travail ouvre donc de nouvelles pistes de recherche pour identifier et décoder tous les intermédiaires menant à l'implication des protéines WRKY dans la transduction des réponses de défense de la plante.

Pas de corrélation entre les niveaux d'expression du transgène et des gènes *PR* dans les Tabacs sur-exprimant *VvWRKY1*

Afin de comprendre le rôle du facteur de transcription *VvWRKY1 in planta* et notamment son rôle dans la défense des plantes suite à des attaques par des agents pathogènes, nous avons généré des plantes sur-exprimant ce facteur de transcription.

En s'appuyant sur les données de la bibliographie qui font souvent état de la présence de nombreuses boîtes W dans les promoteurs des gènes PR (Rushton et Somssich, 1998) et du fait que les protéines WRKY peuvent induire l'expression de ces gènes de défense (Rushton *et al.* 1996, Yang *et al.*, 1999, Chen et Chen, 2002, Miao *et al.*, 2002, Robatzek *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2004), nous avons dans un premier temps suivi l'expression de ces gènes dans les plantes transformées. Les résultats de ces expériences n'ont pas révélé de corrélation nette entre le niveau d'expression du transgène et celui des gènes PR étudiés bien qu'il semble que

les transcrits PR s'accumulent globalement de façon plus importante dans les plantes transformées.

Deux hypothèses peuvent être avancées :

-Cette modification d'expression des gènes PR pourrait être la conséquence d'un effet indirect de la sur-expression de *VvWRKY1*, mettant en jeu d'autres facteurs de transcription.

-L'expression des gènes PR est fortement dépendante de l'état de stress des plantes. La culture *in vitro* garantit un bon état sanitaire des plantules des Vignes mais rien concernant leur état physiologique et leur niveau de stress éventuellement lié à la lumière, à l'humidité ou à d'autres facteurs environnementaux. Ainsi, les niveaux d'expression des gènes PR observés pourraient être biaisés par de telles contraintes.

La sur-expression de *VvWRKY1* confère une tolérance accrue des Tabacs vis-à-vis des champignons pathogènes

De façon à observer les effets de *VvWRKY1* sur la défense des plantes, nous avons réalisés des tests d'infections sur 3 lignées de Tabacs sur-exprimant ce facteur de transcription avec plusieurs champignons et un virus. En ce qui concerne l'infection du Tabac par le virus PVY, nous n'avons pas remarqué de différences significatives de réponses des plantes transformées et des plantes sauvages. Par contre, avec la grande majorité des champignons testés, une nette différence de tolérance des plantes liée à la sur-expression de *VvWRKY1* a été mise en évidence par rapport aux plantes non transformées. Ceci suggère que le rôle de *VvWRKY1* dans la défense ne dépend pas d'un mécanisme particulier d'infection. Les trois lignées (10, 17, 18) et la lignée sauvage (WT) ont été inoculées par : un champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea* (sur les Tabacs de génération T1), deux champignons responsables de la fonte des semis (*Pythium F* et *Chalara elegans*), deux champignons biotrophes obligatoires (*Peronospora tabacina* et *Erysiphe cichoracearum*). Les trois lignées transgéniques ont développé des symptômes moins marqués que les plantes témoins, de manière significative. Seuls les résultats d'infection par *Chalara elegans* se sont avérés plus mitigés.

Ces expériences ont permis de démontrer que le facteur de transcription *VvWRKY1* peut induire la résistance des plantes contre des attaques par des agents pathogènes.

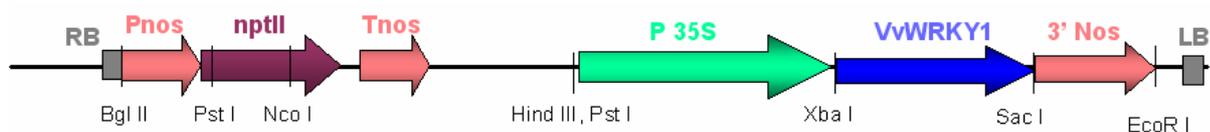


Figure 30 : Schéma de la construction plasmidique utilisée pour sur-exprimer *VvWRKY1* dans les plantes de Tabac, d'*Arabidopsis* et de Vigne. La séquence codante de *VvWRKY1* est placée sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur.

Lignée	kan-	kan+(50mg/l)	% germination
T11	45	31	68,88
T13	50	34	68
T19	50	27	54
T21	46	40	86,95
T28	44	35	79,54
T29	35	16	45,71
T30	46	38	82,60
WT	50	0	0

Tableau 24 : Pourcentage de germinations des graines d'*Arabidopsis thaliana* issues des primo-transformants. La première colonne représente le nom de la lignée testée ; la deuxième, le nombre de graines ayant germées sur un milieu MS sans kanamycine (kan-) ; la troisième, le nombre de graines ayant germées sur un milieu MS contenant 50 mg/l de kanamycine (kan+), 50 graines ont été semées pour chaque lignée. La dernière colonne correspond au pourcentage de germination des graines sur kanamycine.

Les cellules notées en violet et en gras correspondent aux 3 lignées sélectionnées pour la suite du travail.

Nous avons étudié l'effet de la sur-expression de ce gène dans un deuxième système hétérologue afin de compléter et éventuellement valider les observations faites sur les Tabacs transgéniques. Notre choix s'est porté sur *Arabidopsis thaliana*, de nombreux outils moléculaires mais également des modèles bien définis d'interaction plante/pathogène étant disponibles.

La même construction plasmidique dans laquelle *VvWRKY1* est placée sous le contrôle du promoteur constitutif *35S* (**figure 30**) a été utilisée pour transformer des plantes par incubation des boutons floraux d'*Arabidopsis thaliana* (Columbia-O) dans une solution d'*A. tumefaciens*. 24 lignées indépendantes ont été obtenues.

Les plantes ont alors été sélectionnées en fonction du taux de germination des graines issues des primo-transformants (génération T1) sur un milieu MS contenant 50 mg/l de kanamycine, de manière à travailler sur des plantes contenant une, voire deux copies du transgène. Les lignées présentant un taux de germination proche de 75 % seront ensuite retenues (**tableau 24**). La suite du travail a été effectuée sur trois lignées : 11-3, 13-8, 28-4.

Aucune des plantes transformées ne présente de phénotype particulier.

Les plantes ont ensuite été autofécondées et sélectionnées de façon à travailler sur des plantes homozygotes pour l'insertion du transgène. Les analyses suivantes ont donc été effectuées sur des plantes de génération T3.

Le nombre d'insertions dans ces 3 lignées a ensuite été vérifié par Southern blot en utilisant la même démarche que celle décrite pour les Tabacs (cf. I.B2). Les résultats présentés dans la **figure 31** montrent que la lignée 13-8 contient une insertion, la lignée 28-4: 1 à 2 et la lignée 11-3 deux copies du transgène.

Pour étudier l'impact de *VvWRKY1* sur la transcription de gènes de défense, de la même manière que cela a été effectué sur les Tabacs transgéniques, des comparaisons du niveau

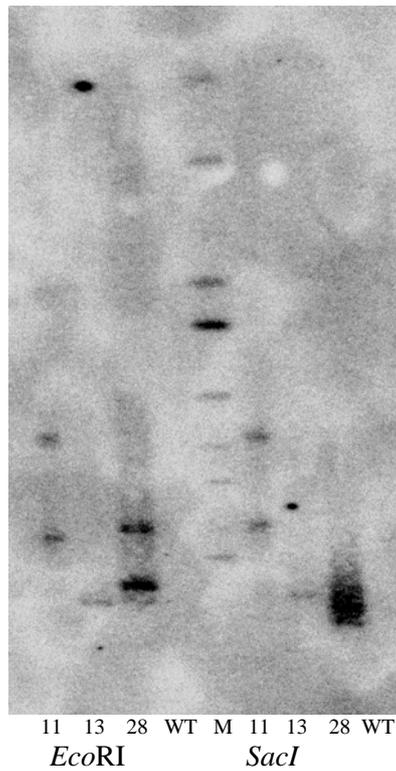


Figure 31: Analyse par Southern blot du nombre d'insertions du transgène dans le génome des 3 lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* (11, 13, 28). La lignée sauvage (WT) sert de contrôle négatif. La sonde ne contient pas de site de restriction pour l'enzyme *Eco* RI. Par contre, *Sac*I coupe une fois la sonde utilisée.

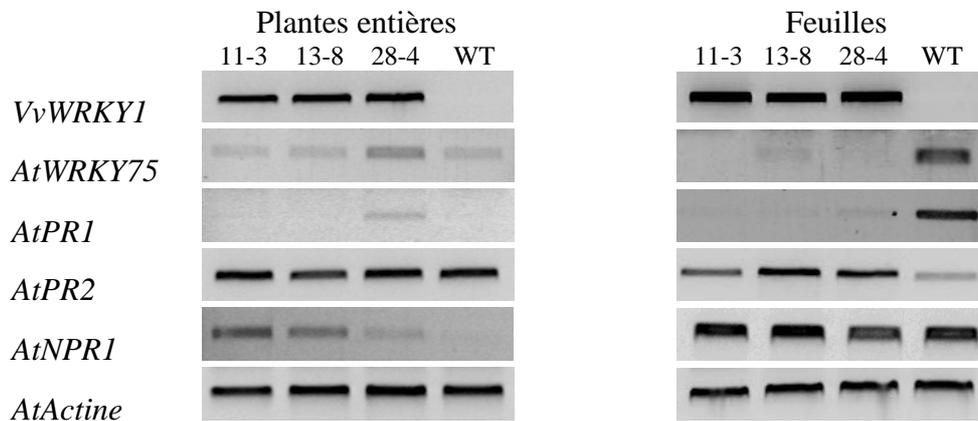


Figure 32 : Analyse du niveau d'expression de plusieurs gènes par RT-PCR semi-quantitative dans les plantes d'*Arabidopsis thaliana* transformées (11-3, 13-8, 28-4) (génération T3) et dans les plantes sauvages (WT). La quantité des transcrits des gènes *VvWRKY1*, *AtPR1*, *AtPR2*, *AtPR3*, *AtAct4* et *AtWRKY75* a été évaluée d'une part sur les feuilles (toutes les feuilles d'une même plante) et d'autre part sur la plante entière (3 plantes/lignée). L'amplification s'est déroulée durant 30 cycles pour chaque ADNc.

d'expression de gènes *PR* ont été menées entre les lignées transgéniques et des plantes non transformées. Nous avons ainsi contrôlé les taux d'expression de 3 gènes (*AtPR1*, *AtPR2*, et *AtNPR1*) par RT-PCR semi-quantitative à partir d'ARN totaux extraits soit de plantes entières et soit de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (**figure 32**). Nous avons également comparé le profil d'expression du gène présentant le plus de similarité avec *VvWRKY1*, *AtWRKY75* (70 % de similarité entre les séquences protéiques). Toutes les amorces utilisées et les numéros d'accession des gènes sont répertoriés dans l'annexe 2.

Dans les trois lignées, nous avons tout d'abord vérifié le niveau d'expression du transgène *VvWRKY1* sur ces plantes homozygotes T3. Un profil semblable à celui de la génération T1 a été révélé, à savoir une forte expression du transgène dans les 3 lignées, au niveau des feuilles et des plantes entières. Par contre, les analyses d'expression des gènes *PR* présentent des profils totalement différents entre les plantes entières et les feuilles (**figure 32**).

Le résultat le plus marquant est la grande différence entre les profils d'expression des *Arabidopsis* sauvages dans les feuilles et dans la plante entière. En effet, dans les feuilles, le niveau d'expression de *AtWRKY75* est assez important, et corrélé avec une expression de *AtPR1* et *AtNPR1*, alors que *AtPR2* est faiblement exprimé. Au contraire, dans la plante entière, *AtWRKY75* est faiblement exprimé en relation avec une faible expression de *AtPR1* et *AtNPR1* et une forte expression d'*AtPR2*. Ainsi, on peut noter qu'il existe une corrélation positive du niveau d'expression entre *AtWRKY75* et *AtPR1* et *AtNPR1* mais négative entre *AtWRKY75* et *AtPR2*. Ceci peut suggérer que *AtWRKY75* régule de façon plus ou moins directe l'expression de ces différents gènes.

Très peu de modifications d'expression des gènes étudiés sont à noter entre les plantes transformées et les plantes sauvages à partir des prélèvements de plantes entières. Seul, *AtNPR1* est activé plus ou moins fortement pour les trois lignées contrairement aux plantes sauvages où ces transcrits ne sont pratiquement pas détectables.

Par contre, les analyses faites sur les feuilles d'*A. thaliana* montrent, pour les trois lignées, une nette répression de *AtWRKY75* et *AtPR1* mais une activation de *AtPR2*. Les modifications d'expression de ces deux gènes *PR* sont peut-être la conséquence de la répression d'*AtWRKY75*, comme si la protéine *VvWRKY1* limitait l'expression d'*AtWRKY75* et par le fait son activité régulatrice sur les gènes *PR*. Par contre, l'expression de *AtNPR1* n'est pas perturbée dans les plantes transformées. Cela semble suggérer que *AtWRKY75* ne régule pas la transcription de *AtNPR1*.

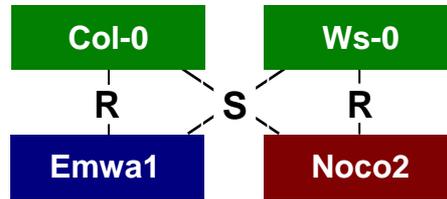


Figure 33 : Relation de sensibilité (S) ou de résistance (R) entre les deux écotypes d'*Arabidopsis thaliana* (Columbia 0 : Col-0 et Wuschel : WS-0) et les deux souches de *Hyaloperonospora parasitica* (Emwa et Noco2).

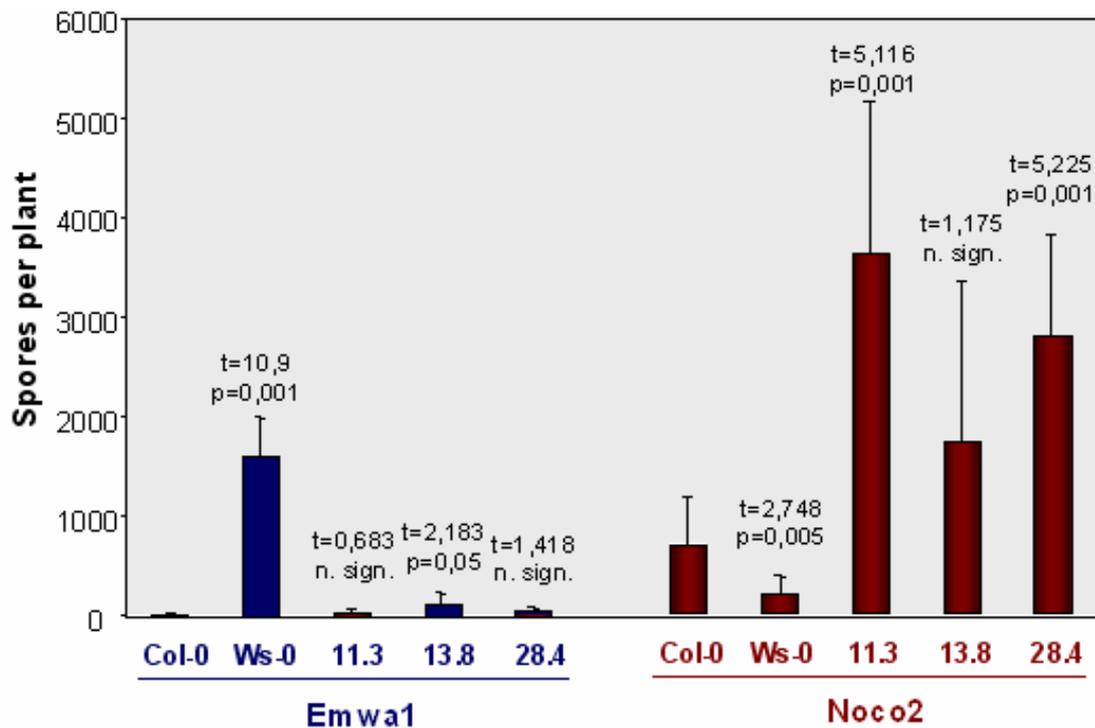


Figure 34 : Test de sensibilité des plantes d'*Arabidopsis thaliana* vis-à-vis de deux souches du champignon *Hyaloperonospora parasitica* (Emwa1 et Noco2). Deux écotypes sauvages (Col-0, Columbia 0 et Ws-0, Wuschel 0) et trois lignées (11.3, 13.8 et 28.4) ont été infectés. Les symptômes sont évalués par comptage des spores apparues sur les feuilles 8 jours après l'inoculation.

(t : valeur du test de Student ; P : probabilité de faire une erreur en concluant qu'il existe une différence significative entre Col-0 et les autres lignées.)

Pour conclure, il semblerait que dans les feuilles, la protéine VvWRKY1 soit capable de contrôler et même d'éteindre l'expression de *AtWRKY75*. Les conséquences seraient alors répercutées sur l'expression des gènes potentiellement contrôlés par *AtWRKY75* : *AtPR1* est éteint et *AtPR2* est, au contraire, activé.

Les observations différentes que nous avons pu réaliser sur les feuilles et sur les plantes entières permettent d'exclure la possibilité d'une régulation directe de *AtPR1* et *AtPR2* par VvWRKY1.

Afin de savoir si le facteur de transcription VvWRKY1 est impliqué dans la réponse de la plante à une attaque par un agent pathogène, nous avons souhaité réaliser différents tests de sensibilité des plantes sur-exprimant cet ADNc. Pour cela, nous avons collaboré avec différents laboratoires qui maîtrisent déjà les interactions entre différents pathogènes et *Arabidopsis thaliana*.

Ainsi, l'équipe du Dr. F. Revers (INRA de Bordeaux) a testé deux virus : CMV (Cucumber Mosaic virus) et LMV (Lettuce Mosaic Virus). L'équipe du Dr. Y. Marco (INRA de Toulouse) a infecté ces plantes par une bactérie : *Ralstonia solanacearum* et l'équipe du Dr. H. Keller (INRA d'Antibes) a testé l'effet d'un champignon : *Hyaloperonospora parasitica*.

Les résultats concernant les infections par les virus et la bactérie n'ont pas révélé de différences significatives de sensibilité entre les plantes transformées et les plantes sauvages.

Toutefois, les infections par le champignon, *Hyaloperonospora parasitica*, ont mis en évidence un impact de la sur-expression de VvWRKY1 mais pas dans le sens attendu. Deux souches de *H. parasitica* ont été inoculées sur les plantes d'*A. thaliana* : Emwa pour laquelle l'écotype Columbia 0 est résistant (et Wuschel est sensible) et Noco2 pour laquelle l'écotype Columbia 0 est sensible (et Wuschel est résistant). Le schéma de la **figure 33** récapitule ces relations entre écotype et souche de pathogène. La progression de la maladie a été évaluée par comptage des spores remises en suspension, 8 jours après l'infection.

Les plantes sur-exprimant VvWRKY1 comme les plantes sauvages, de fond génétique Columbia 0, présentent toutes une nette résistance à l'infection par la souche Emwa,

empêchant donc la sporulation du champignon (**figure 34**). Toutefois, les plantes de la lignée 13-8 montrent une légère sporulation du champignon mais significativement différente des plantes sauvages. Cette légère sensibilité n'est tout de même pas aussi grande que celle de l'écotype sensible Wuschel.

Par contre, lorsque ces plantes sont infectées par la souche Noco2, les plantes sauvages Columbia 0 sont effectivement sensibles alors que les plantes Wuschel limitent l'apparition de spores. Lorsqu'on observe les lignées transformées, de façon inattendue, on note une sensibilité nettement accrue des trois lignées par rapport aux plantes Col-0 non transformées. Les résultats sont très significatifs, excepté pour la lignée 13-8. Ce résultat était surprenant étant donné les observations des Tabacs transgéniques infectés par différents champignons. Effectivement, les trois lignées de Tabacs sur-exprimant *VvWRKY1* révélaient un niveau de tolérance plus important vis-à-vis de différents agents pathogènes fongiques. Nous nous attendions effectivement à observer de tels résultats sur cet autre modèle de plantes sur-exprimant le même ADNc. Pourtant, nous venons de mettre en évidence un comportement opposé dans ces plantes d'*Arabidopsis*.

La sur-expression de *VvWRKY1* chez *Arabidopsis thaliana* réprime la transcription du gène endogène homologue *AtWRKY75* dans les feuilles

Chez *Arabidopsis thaliana*, nous avons pu suivre l'expression du gène homologue, contrairement au Tabac où le génome n'est pas séquencé et où seuls quelques gènes WRKY sont répertoriés dans les banques de données. Les résultats montrent que *AtWRKY75*, présentant 59 % d'identité de séquence protéique avec *VvWRKY1*, est fortement réprimé dans les feuilles lorsque *VvWRKY1* est sur-exprimé.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

-Présence d'un phénomène de compétition de ces deux protéines. Lorsque la protéine *VvWRKY1* est présente à un certain niveau dans la cellule, des mécanismes de régulation transcriptionnelle vont venir limiter l'expression de *AtWRKY75*. Celui-ci étant plus fortement exprimé dans les feuilles, cet effet serait localisé.

-Régulation négative d'*AtWRKY75* par *VvWRKY1*. Ceci n'est observé que dans les échantillons prélevés à partir de feuilles. Il ne faut pas exclure un effet possible de l'âge des plantes. *AtWRKY18*, lorsqu'il est sur-exprimé chez *Arabidopsis*, induit la transcription de

gènes *PR* mais cette induction n'est détectable que 5 semaines après germination (Chen et Chen, 2002).

La régulation négative de *AtWRKY75* serait alors dépendante :

i) de partenaires protéiques s'alliant à *VvWRKY1*, le complexe formé pouvant inhiber la transcription de *AtWRKY75*. Ces protéines seraient présentes plus spécifiquement dans les feuilles ou régulées de façon développementale au cours du temps. L'expression du gène *AtWRKY75* serait ainsi régulée de façon spatio-temporelle.

ii) de la modification d'expression d'un autre facteur par *VvWRKY1*. Celui-ci réprimerait un activateur ou induirait un répresseur de la transcription d'*AtWRKY75*.

Les variations de profils d'expression des gènes *PR* sont-elles dues à *VvWRKY1* ou à *AtWRKY75* ?

Nous avons montré que *VvWRKY1* semble capable de réguler et même d'éteindre l'expression de *AtWRKY75*, notamment dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Cette régulation rend plus complexe l'interprétation des variations d'expression de certains gènes *PR* observées chez les lignées transgéniques. Ces variations peuvent être la conséquence directe de la sur-expression de *VvWRKY1*, ou une conséquence indirecte, *via* la régulation de la transcription de *AtWRKY75*. L'étude des profils d'expression de ces gènes *PR* dans les plantes entières et dans les feuilles donne plutôt des arguments dans le sens de cette dernière hypothèse c'est-à-dire d'un effet indirect. L'expression des gènes *AtPR1* et *AtPR2* semble en effet étroitement corrélée avec celle de *AtWRKY75*, mais de façon positive pour *AtPR1* et négative pour *AtPR2*.

VvWRKY1 confère une plus grande sensibilité aux plantes d'*A. thaliana* vis-à-vis de *H. parasitica*

Les tests d'infection par la bactérie, *Ralstonia solanacearum*, et par les virus (LMV et CMV) n'ont révélé aucune différence de symptômes entre les plantes transformées et les plantes sauvages. Par contre, les plantes transgéniques inoculées par *Hyaloperonospora parasitica* présentent un niveau de sensibilité significativement plus élevé que la lignée WT.

Ces résultats, à l'opposé de ceux obtenus chez le Tabac, s'expliquent probablement par un effet indirect de la sur-expression de *VvWRKY1*, cette augmentation de la sensibilité étant corrélée avec une diminution de la transcription de *AtWRKY75*. Il apparaît donc vraisemblable

que nous ayons ainsi mis en évidence plus l'effet de cette diminution sur la résistance aux champignons que celui de VvWRKY1.

Cependant, comme sur les Tabacs transgéniques, ces travaux n'ont pas révélé de corrélation claire entre l'expression des gènes *PR* étudiés et les modifications de résistance aux champignons pathogènes. Il semblerait que ces protéines *PR* participent largement à la défense de la plante vis-à-vis de plusieurs pathogènes mais la tolérance des plantes aux microorganismes peut également mettre en jeu d'autres protéines ou molécules de défense.

Effectivement, ces protéines pouvaient apparaître pendant longtemps comme indispensables à la mise en place de résistance des plantes. Aussi, chez *Arabidopsis*, Mauch-Mani *et al.* (1994) et Lawton *et al.* (1995) démontraient que l'accumulation des transcrits *PR1*, *PR2* et *PR5*, gènes marqueurs de la SAR, était liée à l'accumulation d'acide salicylique dans les tissus en réponse à une première infection par *Fusarium oxysporum* ou *Pseudomonas syringae* et permettaient la mise en place d'une résistance accrue contre *Peronospora parasitica* en deuxième infection.

Mais, une publication plus récente de Clarke *et al.* (2000) vient de démontrer dans une analyse épistatique de doubles mutants que, l'expression des gènes *PR1*, *PR2*, *PR5* et *PDF1.2* pouvait être affectée alors que les plantes maintenaient leur résistance à *Pseudomonas syringae* et *Peronospora parasitica*. A l'inverse, certains doubles mutants affectés dans la résistance à ces agents pathogènes peuvent tout de même présenter une expression constitutive de ces gènes. Ces résultats suggèrent que l'expression de ces gènes *PR* n'est pas suffisante pour conférer une résistance à ces deux pathogènes. Cependant, ces protéines doivent sans doute contribuer à la mise en place de la résistance.

L'ADNc VvWRKY1 code un nouveau facteur de transcription de type WRKY. **Chez la Vigne, l'expression de VvWRKY1 est régulée de façon spatio-temporelle, au cours du développement de la plante, mais également en réponse à de multiples stress** (blessure, éliciteurs abiotiques, infection), montrant son **implication dans les réponses de défense** de la plante.

Afin de comprendre le rôle de cette protéine *in planta*, nous avons obtenu par transgénèse des **lignées de Tabacs et d'Arabidopsis thaliana sur-exprimant VvWRKY1**. La comparaison de ces deux systèmes d'étude a permis de valider certaines observations :

-La sur-expression de *VvWRKY1* ne provoque **pas de phénotype particulier**. Il ne semble donc pas y avoir d'effet pleiotropique de *VvWRKY1* sur le développement des plantes. En revanche, des perturbations de la croissance ont déjà été mis en évidence dans des plantes sur-exprimant d'autres facteurs WRKY (Chen et Chen, 2002, Robatzek et Somssich, 2002) et ont ainsi gêné l'interprétation des résultats, ce qui ne semble pas être le cas pour *VvWRKY1*.

-Il n'y a **pas de corrélation apparente entre le niveau d'expression du transgène et des variations d'expression des gènes PR analysés**. De nombreux éléments sont en faveur de la régulation de l'expression des gènes *PR* par les facteurs WRKY (Ulker et Somssich, 2004, introduction de ce manuscrit), et la sur-expression de certains d'entre eux chez *Arabidopsis* induit la transcription de gènes *PR* (Li *et al.*, 2004; Chen et Chen, 2002 ; Robatzek et Somssich, 2002). Cependant, d'autres cibles ont également été suggérées, comme les protéines récepteur-like kinase (RLK) (Du et Chen, 2000, Asai *et al.*, 2002, Chen et Chen, 2002, Robatzek et Somssich, 2002, Chen *et al.*, 2003). Les résultats obtenus chez les Tabacs et les *Arabidopsis* transgéniques dans notre cas tendent à montrer que les gènes *PR* étudiés ne sont pas des cibles de *VvWRKY1*.

Cependant, des travaux complémentaires pourraient être réalisés de manière à suivre le niveau d'expression des gènes *PR* lors de l'infection par des agents pathogènes. La régulation des gènes *PR* par les protéines WRKY peut en effet nécessiter la présence de partenaires protéiques eux-mêmes régulés de façon spatio-temporelle par l'infection et/ou de protéines régulatrices (comme des MAPK) dont l'expression, la localisation ou l'activation dépendrait aussi l'infection.

En outre, une recherche plus large des gènes cibles pourrait être entreprise avec l'étude de l'expression de gènes impliqués dans des voies de signalisation comme celle faisant intervenir l'acide jasmonique, l'éthylène ou même des gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

-**La sur-expression de *VvWRKY1* induit une différence de sensibilité vis-à-vis de champignons pathogènes** entre les plantes transgéniques et les plantes sauvages (Tabac et *Arabidopsis*). De telles variations de réponses aux infections n'ont été observées ni pour les virus dans les deux espèces et ni pour les bactéries chez *Arabidopsis*. Il sera toutefois nécessaire de multiplier les modèles plante/pathogène afin de confirmer ces premières analyses. Effectivement, les différentes classes d'agents pathogènes (champignons, bactéries,

virus) ne font pas intervenir les mêmes mécanismes quant à la détection, au déclenchement de la réponse (signalisation intracellulaire) et à la mobilisation et production des molécules de défense. Cependant, ces premiers résultats suggèrent que VvWRKY1 est un facteur de transcription intervenant dans la réponse suite à une infection par un agent pathogène de type fongique.

Toutefois, nous avons mis en évidence que **VvWRKY1 confère une résistance chez Tabac mais une sensibilité chez *A. thaliana* vis-à-vis de champignons pathogènes.**

Si les travaux réalisés n'apportent pas d'explications claires, plusieurs hypothèses peuvent cependant être avancées.

Il est possible que les modifications post-traductionnelles subies par VvWRKY1 soient différentes dans les deux systèmes, en particulier lors de l'infection par un pathogène. En effet, différentes voies de transduction du signal peuvent être déclenchées suite à en fonction de l'interaction plante/pathogène et conduire notamment à l'activation de MAPK. Or il a été montré précédemment que la liaison à l'ADN des protéines WRKY peut être modulée par des phosphorylations (Yang *et al.*, 1999, Yamamoto *et al.*, 2004).

D'autre part, VvWRKY1 a été sur-exprimé dans des systèmes hétérologues. Cette protéine ne trouve peut-être pas les homologues de ses partenaires protéiques et sa fonction s'en trouve ainsi modifiée. Sont-ils les mêmes ou ont-ils le même rôle dans ces organismes? Existe-t-il des compétiteurs? Les gènes cibles possèdent des régions promotrices différentes selon les organismes, alors les protéines VvWRKY1 sont-elles toujours capables de s'y lier ?

Peu de travaux rapportent l'effet d'une protéine WRKY sur la résistance ou la sensibilité des plantes vis-à-vis d'un agent pathogène. La sur-expression d'*AtWRKY70* et *AtWRKY18* chez *Arabidopsis* augmente la résistance à *Erwinia carotovora* et à *Pseudomonas syringae* pour le premier (Li *et al.* 2004), et à *Pseudomonas syringae* pour le second (Chen et Chen 2002). De même l'expression transitoire d'*AtWRKY29* confère une plus grande résistance à *Pseudomonas syringae* et *Botrytis cinerea*.

Par contre, Eckey *et al.* (2004) montrent qu'une transformation transitoire par une construction RNAi (interférence d'ARN double brin) contre un facteur WRKY de l'orge (TDF N9-10) augmente la résistance des cellules épidermiques de cette plante contre un champignon (*Blumeria graminis* qui correspond à l'oïdium de l'orge). Cette protéine WRKY semble donc jouer un rôle régulateur négatif dans la défense de la plante.

Il apparaît donc difficile d'extrapoler ces résultats quant au rôle de VvWRKY1 chez la Vigne étant donné la complexité des mécanismes mis en jeu. Il est sera alors nécessaire de réaliser le même type d'expériences dans le système homologue, chez la Vigne.

Deuxième partie

La partie 1 de ce manuscrit présente l'analyse fonctionnelle de VvWRKY1 dans deux systèmes hétérologues, le Tabac et *Arabidopsis thaliana*. Les résultats obtenus tendent à mettre en évidence le **rôle de ce facteur de transcription dans la défense vis à vis** d'agents pathogènes et plus particulièrement des **champignons phytopathogènes**. Cependant, les deux espèces présentent des résultats apparemment contradictoires qui rendent leur interprétation difficile. Par ailleurs, afin de déterminer le **rôle endogène** de ce facteur de transcription, il est indispensable de travailler dans le système homologue, la **Vigne**.

Nous avons donc généré des plants de Vigne sur-exprimant VvWRKY1 de façon constitutive. Les Vignes transgéniques obtenues constituent un outil très important pour comprendre la fonction de la protéine VvWRKY1 et notamment son implication dans la défense de la Vigne vis-à-vis des champignons. La transformation de la Vigne demeure une technique délicate. Toutefois, l'intérêt grandissant de la recherche pour cet organisme végétal permet une rapide évolution des techniques expérimentales (Mauro *et al.*, 1995, Mezetti *et al.*, 2002, Vallat *et al.*, 2003, Vidal *et al.*, 2003).

Le cultivar transformé est le porte-greffe 41B dont la transformation à partir de cellules embryogènes est bien maîtrisée par le laboratoire du Pr S. Delrot (Université de Poitiers). Des analyses moléculaires ainsi que des expériences de résistance vis à vis du mildiou ont été réalisées sur certaines lignées sur-exprimant VvWRKY1, afin de savoir si cette protéine régulatrice joue un rôle protecteur contre les attaques des agents pathogènes pour la plante ou, au contraire, si son expression induit une sensibilisation de la Vigne.

Par ailleurs, dans le but d'identifier les gènes cibles de VvWRKY1, nous avons réalisé des expériences d'hybridation sur des puces à ADN de manière à comparer les gènes exprimés dans les plantes transformées et les plantes sauvages. Effectivement, des lames de deuxième génération sur lesquelles sont déposées plus de 14 500 oligonucléotides correspondant à des EST sont à présent disponibles. Cette approche sans *a priori* devrait permettre d'apporter des éléments nouveaux quand aux gènes cibles des protéines WRKY en général.

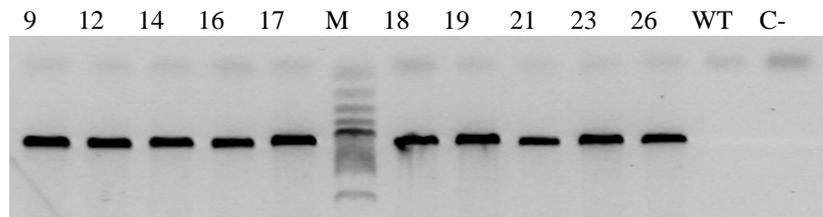


Figure 35: Amplification du transgène réalisée par PCR à partir de l'ADNg de 10 lignées de Vigne transformées et de la lignée sauvage WT. La séquence de ces amorces est répertoriée en annexe 2. Les nombres correspondent aux noms des lignées, M : au marqueur de taille (100 pb ladder, Promega), WT à la lignée sauvage et C- au contrôle négatif (sans ADN).

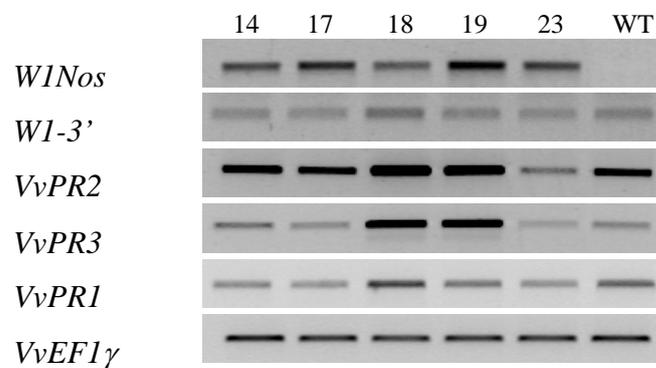


Figure 36 : RT-PCR semi-quantitative réalisées à partir des ARN totaux extraits des feuilles de Vigne (41B) transgéniques et des plantes sauvages (WT) cultivées *in vitro*. *WINos* correspond à l'amplification du transgène, *WI-3'* à celle du gène endogène. Des amorces spécifiques ont été utilisées pour chaque gène, elles sont répertoriées en annexe 2.

La transformation des Vignes a été effectuée par l'équipe du Pr. P. Coutos-Thévenot, à Poitiers. La même construction plasmidique que celle utilisée pour la transformation du Tabac (cf. article partie 1) a été intégrée, le *p35SGiBin19-VvWRKY1* contenant la séquence codante en orientation sens sous contrôle du promoteur 35S. Ce vecteur a été introduit dans la souche EHA 105 (Hood *et al.*, 1993) d'*Agrobacterium tumefaciens* qui est plus virulente que la souche LBA 4404 et facilite la transformation d'espèces récalcitrantes comme la Vigne. La transgénèse se fait à partir de cellules embryogènes de Vigne du cultivar 41B, qui sont capables de régénérer des plantes entières par embryogenèse somatique (Mauro *et al.*, 1995, Coutos-Thévenot *et al.*, 1992). Une vingtaine d'individus provenant d'évènements indépendants de transformation a été obtenue et multipliée *in vitro*.

Les premières analyses moléculaires ont été effectuées sur 10 lignées de manière à vérifier l'insertion du transgène dans le génome de ces plantes. Elles consistent à faire des amplifications du transgène par PCR à partir de l'ADN génomique. Afin de ne pas risquer d'amplifier les séquences dues à la présence du gène *VvWRKY1* endogène, les amorces ont été choisies dans la région 3' de la séquence codante pour l'amorce sens (W1ERS) et dans la partie du 3'UTR du gène *NOS* pour l'amorce antisens (NOS, les deux amorces sont décrites dans l'**annexe 2**). L'analyse des produits de PCR révèle que les 10 lignées contiennent toutes le transgène (**figure 35**). L'absence d'amplification à partir de l'ADN génomique des plantes sauvages valide la spécificité des amorces.

Afin d'évaluer le niveau d'expression du transgène, des analyses par RT-PCR semi-quantitative ont été effectuées à partir des ARN totaux de ces 10 lignées en utilisant le même couple d'amorces (W1ERS/NOS). Toutes les lignées testées expriment le transgène (non présenté). Cinq lignées présentant des niveaux variables d'expression de *VvWRKY1* ont été sélectionnées pour la suite du travail : deux lignées l'exprimant assez fortement (lignées 17 et 19) et trois autres plus faiblement (14, 18, 23) (**figure 36**). En parallèle, le niveau de transcription du gène endogène *VvWRKY1* est suivi grâce à deux amorces choisies dans la partie 3'UTR du gène, séquence absente du transgène (W1-3'S et W1-3'AS, cf. annexe 2). Aucun changement d'expression entre la lignée non transformée

et les 5 lignées transgéniques n'a été mis en évidence ; les transcrits de ce gène sont détectables dans toutes les lignées (sauvage et transformées) (**figure 36**).

De la même façon que pour les Tabacs ou les *Arabidopsis* sur-exprimant VvWRKY1, l'accumulation des transcrits de plusieurs gènes codant des protéines PR (*VvPR1*, *VvPR2* codant une beta-1,3 glucanase et *VvPR3* codant une endochitinase de classe IV) a été suivie par RT-PCR. Les séquences des amorces sont répertoriées en annexe 2. On remarque que parmi les plantes transformées, seules deux lignées (18 et 19) présentent une nette activation de *VvPR2* et 3 et dans une moindre mesure pour *VvPR1* (**figure 36**). Les autres lignées montrent un même niveau d'expression de ces gènes *PR* que la lignée sauvage. Cette fois-ci encore, il ne semble pas y avoir de corrélation entre le niveau d'expression du transgène et l'activation de ces gènes *PR*. Ces observations confirment les résultats obtenus dans les deux systèmes hétérologues, le Tabac et *A. thaliana*, suggérant que les gènes *PR* dont nous suivons l'expression ne sont sans doute pas régulés directement par VvWRKY1.

Pour la suite de l'étude de ces plantes transgéniques (tests d'infection et puces à ADN), nous nous sommes focalisés sur une seule lignée, la lignée 19. Effectivement, pour les analyses globales de transcriptome, nous avons choisi de travailler sur une seule lignée de manière à bien voir les effets de la sur-expression par rapport aux plantes sauvages plutôt que de rassembler plusieurs lignées et éventuellement diluer l'effet de la sur-expression.

La lignée 19 exprime fortement le transgène et montre également une activation de l'expression de plusieurs gènes *PR*. Donc, la suite des travaux concerne cette lignée comparée aux Vignes non transformées 41B.

De manière à recueillir des informations concernant le rôle du facteur de transcription VvWRKY1 dans la défense de la Vigne, nous avons entrepris des tests d'infection des Vignes transgéniques sur-exprimant cet ADNc afin de les comparer aux plantes sauvages. Ce modèle d'étude présente l'avantage de pouvoir étudier cette protéine dans son système homologue mais également quelques inconvénients, la difficulté majeure étant de rassembler des quantités satisfaisantes de matériel végétal dans un bon état physiologique. Effectivement, la culture *in vitro* de ces plantes est plutôt délicate ; leur développement est lent et difficilement synchronisable. De plus, pour avoir des résultats statistiquement fiables, il est préférable de travailler sur un grand nombre d'individus ayant un stade de développement comparable. C'est pourquoi, nous avons choisi

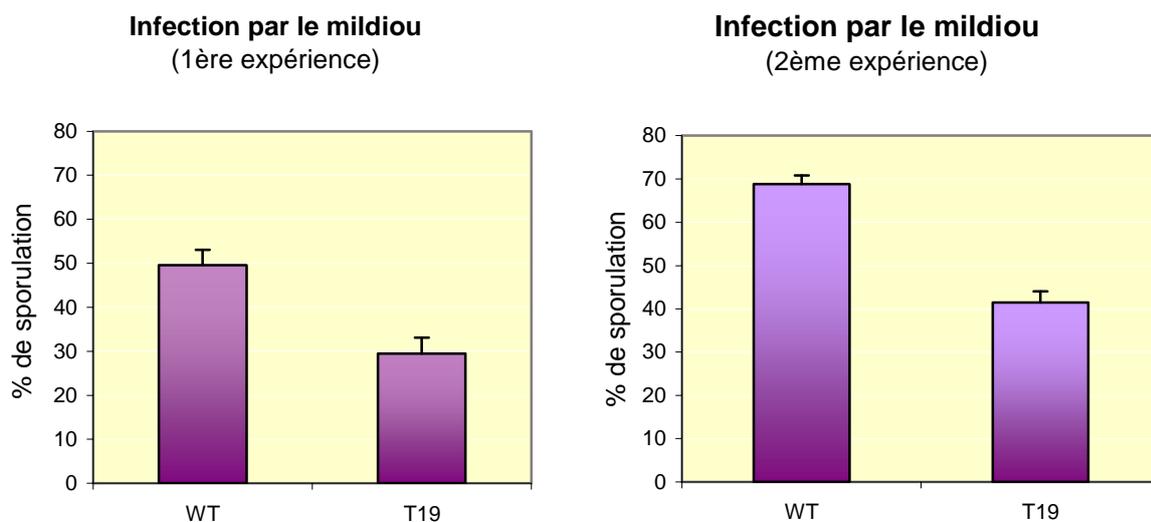


Figure 37 : Infection des feuilles de Vignes de la lignée sauvage 41B (WT) et de la lignée transformée 19 (sur-exprimant *VvWRKY1*) par le mildiou, *Plasmopara viticola*. L'inoculation du champignon est réalisée pour la 1^{ère} expérience par une suspension de 5 000 sporanges/ml sur 101 sites d'inoculation pour la lignée WT et 119 pour la lignée 19. Pour la deuxième expérience une solution de 15 000 sporanges/ml est déposée sur 194 sites pour la lignée WT et 207 sites d'inoculation pour la lignée 19. Des gouttes de 15 µl de suspension fongique sont déposées sur la face inférieure des feuilles de Vigne.

Chaque histogramme représente une évaluation visuelle du pourcentage de sporulation et les barres d'erreurs correspondent aux erreurs-type.

	1 ^{ère} expérience		2 ^{ème} expérience	
	Nb sp/goutte déposée	Nb sp/sp déposée*	Nb sp/goutte déposée	Nb sp/sp déposée*
WT	437,16	5,83	1 390,80	6,18
19	200,49	2,67	907,59	4,03

Tableau 25 : Comptage de la sporulation suite aux inoculations des feuilles de Vigne des lignées transgénique 19 et sauvage WT par *Plasmopara viticola*. Les sporanges sont comptés sur cellule de Malassez sept jours après l'infection. * Cette colonne représente le nombre de spores comptées 7 jours après inoculation et rapporté à la quantité de spores déposées au départ sachant que une goutte d'inoculum représente 75 spores pour la 1^{ère} expérience mais 225 pour la seconde.

de travailler sur un modèle de feuilles prélevées sur des Vignes cultivées *in vitro* et déposées dans des boîtes de Pétri sur un papier filtre humidifié.

Les premiers tests de sensibilité ont été effectués en inoculant des feuilles issues de la lignée 19 et d'une lignée sauvage par une suspension de sporanges de mildiou (*Plasmopara viticola*). Le mildiou est un champignon biotrophe faisant partie des principaux agents pathogènes de la Vigne et pour lequel de nombreux traitements phytosanitaires sont administrés aux vignobles. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. M.F. Corio-Costet (INRA de Bordeaux)

Deux expériences indépendantes d'infection ont été réalisées ; les feuilles sont inoculées par dépôt de gouttes d'une suspension de spores (de 5000 et 15 000 spores/ml respectivement pour la 1^{ère} et la 2^{ème} expérience). Le nombre de gouttes varie selon la taille des feuilles. Le nombre de feuilles inoculées a été nettement augmenté lors de la deuxième expérience (environ deux fois plus). Deux types de notation permettent de mesurer les symptômes, 7 jours après l'inoculation. Dans le cadre de la mise au point de l'expérimentation, les deux mesures de la sporulation du champignon, l'une visuelle, l'autre par comptage sous microscope, ont été reportées dans la **figure 37** et le **tableau 25**.

Tout d'abord, la croissance du champignon et la quantité de spores sont évaluées visuellement. Une note est attribuée à chaque site d'inoculation puis ramenée à un pourcentage en considérant que les zones les plus développées représentent 100% de sporulation. Les résultats des deux expériences présentés dans la **figure 37** montrent des profils comparables.

Lors du premier essai, les feuilles témoins non transformées ont révélé une faible croissance du mildiou (environ 50 %). Ceci est certainement dû à une sensibilité moindre de ce cultivar (41B) par rapport au Cabernet Sauvignon, sur lequel le laboratoire du Dr M. F. Corio-Costet travaille habituellement. Ainsi, lors de la deuxième expérience, la concentration de l'inoculum a été nettement augmentée; nous sommes passés de 5000 à 15000 sporanges/ml. Ceci a permis d'homogénéiser la croissance du champignon sur les plantes sauvages qui se rapproche à présent de 70 %. De ce fait, le pourcentage de croissance de la lignée 19 est également légèrement augmenté mais la différence observée entre les deux lignées est maintenue. Effectivement, nous pouvons noter clairement que le niveau de croissance du champignon est beaucoup moins élevé pour la lignée qui sur-exprime *VvWRKY1* par rapport à la lignée sauvage. Pour les deux essais, la croissance du mildiou sur les feuilles de la lignée 19 ne représente que 60 % de la croissance évaluée sur la lignée sauvage. Une analyse de variance des deux expériences révèle que cette différence est significative à plus de 95%.

D'autre part, la deuxième notation est représentée par une quantification des spores développées sur les feuilles 7 jours après l'inoculation. Les spores recueillies par remise en suspension à partir de plusieurs feuilles sont rassemblées afin d'effectuer un comptage sous microscope au moyen d'une cellule de Malassez.

Les feuilles de Vigne transformées montrent clairement une sporulation limitée du mildiou en comparaison à celle observée sur les feuilles sauvages (**tableau 25**). Lors du 1^{er} essai, elle ne représente que de 45 % de la sporulation totale des feuilles non transformées et lors du second, elle augmente un peu pour être de 65 %. Ce dernier résultat peut s'expliquer par un inoculum beaucoup plus fort.

Ces résultats valident les notations faites par évaluation visuelle même s'ils ne sont pas statistiquement significatifs au seuil de 95 %. En effet, le nombre de répétitions de ce deuxième système de notation est ici trop faible puisqu'il faut rassembler plusieurs feuilles pour pouvoir effectuer un comptage.

Ce dernier mode de notation n'ayant pu apporter de résultat statistique correct, nous avons donc choisi de présenter les deux types d'analyse. Toutefois, on peut noter que les observations faites dans les deux cas vont dans le même sens et montrent que la sur-expression de *VvWRKY1* limite fortement la croissance et la sporulation de ce champignon.

Afin d'apporter de nouvelles pistes de réflexion concernant les mécanismes régulés par *VvWRKY1*, protéine capable de conférer une tolérance des plantes vis-à-vis des champignons, nous avons souhaité comparer les transcriptomes d'une lignée sur-exprimant *VvWRKY1* et d'une lignée sauvage, en utilisant des puces à ADN.

L'analyse est faite à partir d'ARN extraits de feuilles de Vignes cultivées *in vitro*. Les puces à ADN utilisées sont des lames de deuxième génération contenant 14562 oligonucléotides de 70-mères issus d'EST répertoriées dans la base de données du TIGR. Chaque puce combine l'hybridation des deux lots d'ADNc (issus des plantes sauvages et des plantes transformées) couplés chacun à un fluorophore différent. Pour chaque expérience, un flip-flop est réalisé, ceci correspond à une hybridation inverse dans laquelle chaque lot d'ADNc est couplé avec le second fluorophore. De plus, cette série d'expériences a été répétée avec un lot d'ARN issus d'un deuxième prélèvement de feuilles de Vigne, constituant un réplicat biologique.

	1^{er} essai	2^{ème} essai	Bilan commun
Nombre total de gènes	14 562	14 562	
Nombre de gènes exprimés différentiellement	668	690	56
Nombre de gènes induits	361	241	16
Nombre de gènes réprimés	307	449	40

Tableau 26 : Récapitulatif des gènes différentiellement exprimés dans la lignée transgénique (19) comparée à la lignée sauvage. Ce tableau compare les résultats obtenus pour chacune des deux expériences des hybridations sur puces à ADN des ADNc issus des 2 lignées. Le nombre de gènes induits ou réprimés signifie toujours des modifications d'expression dans la lignée transformée par rapport à la lignée sauvage.

L'ensemble des gènes régulés de façon différentielle entre ces deux lignées est inventorié dans le **tableau 27**. Seuls sont répertoriés les gènes dont l'expression varie dans le même sens lors des deux expériences réalisées. Les gènes sont classés en fonction de leurs rôles physiologiques potentiels.

Seuls 56 gènes présentent une expression différentielle

Dans un premier temps, nous pouvons noter que peu de gènes voient leur expression modifiée dans les plantes transformées sur-exprimant *VvWRKY1* par rapport aux Vignes sauvages. Sur les 14562 oligonucléotides déposés sur les lames, 16 gènes sont induits et 40 sont réprimés dans les plantes transformées.

Si on analyse séparément les deux expériences (**tableau 26**), le 1^{er} essai révèle 668 gènes régulés différentiellement dont 361 positivement et 307 négativement. Sur le second essai, presque autant de gènes montrent un niveau d'expression différent : 690 gènes dont 241 régulés de façon positive et 449 de façon négative. Le nombre de gènes rejetés car mal hybridés ou pas détectables est relativement faible. Globalement, sur les 14562 dépôts d'oligonucléotides d'une lame (correspondant aux unigènes et aux contrôles), environ 1/10 est éliminé (de 1300 à 2200 dépôts selon les hybridations).

Par contre, en combinant tous ces résultats, l'expression de 56 gènes seulement varie dans le même sens et de façon significative dans les plantes transformées par rapport aux plantes sauvages. Parmi les gènes non conservés, 64 gènes affichent des expressions régulées de façon opposée entre les deux expériences. Mais la très grande majorité des gènes écartés de l'analyse sont ceux qui ne sont induits ou réprimés de façon significative que dans une des deux expériences.

Les gènes exprimés différentiellement ont été classés par grande fonction physiologique. Cependant, 14 gènes n'ont pas de fonction connue chez les plantes.

Gènes les plus fortement régulés

Dans chaque essai, le gène le plus fortement activé dans la lignée 19 code une lipoxigénase (TC14970 et CD007835). Ce type d'enzyme est connu pour intervenir dans les premières étapes de la biosynthèse de l'acide jasmonique, molécule élicitrice.

Le gène le plus réprimé de chacun des essais appartient à la catégorie fonctionnelle des protéines des parois cellulaires. Pour le 1^{er} essai, il s'agit d'un gène codant une glycoprotéine riche en hydroxyproline (HRGP), constituant majeur des parois primaires végétales et pour le second, une pectine estérase, enzyme participant aux modifications des parois végétales.

Par contre, la pectine méthylestérase est une enzyme qui participe au remaniement des parois cellulaires, préparant l'action des polygalacturonases. Sa répression pourrait ainsi limiter les modifications structurales et la dégradation des parois végétales.

ID	Fonction	TC	log2(19/WT)A	log2(19/WT)B
Métabolisme des lipides				
Vv_10012267	triacylglycerol lipase	TC17664	1,11	0,64
Vv_10000951	lipoxygenase	TC14970	2,35	0,84
Vv_10010838	lipoxygenase	CD007835	1,10	1,39
Vv_10004135	acyl carrier protein	TC20021	-0,85	-0,64
Métabolisme des phénylpropanoïdes				
Vv_10008197	UDP-glucose glucosyltransferase	CF209611	0,88	0,72
Vv_10011253	caffeic acid O-methyltransferase	TC14227	1,97	0,88
Photosynthèse				
Vv_10014326	cytochrome b	TC24341	0,84	0,93
Vv_10003713	carbonic anhydrase	TC19398	-1,41	-2,51
Vv_10003695	carbonic anhydrase	TC19366	-1,47	-2,37
Vv_10009170	chlorophyll a/b-binding protein	TC22222	-1,89	-1,88
Vv_10009064	light-harvesting complex protein	TC22064	-1,22	-1,42
Vv_10000285	photosystem I reaction center subunit V	TC14072	-1,43	-0,99
Vv_10004084	photosystem I reaction center subunit III	TC19955	-1,22	-0,97
Vv_10003952	Chlorophyll a/b-binding protein CP24	TC19780	-1,58	-0,92
Vv_10004431	protochlorophyllide oxidoreductase	TC20405	-1,27	-0,74
Vv_10005761	violaxanthin de-epoxidase	CA817814	-1,01	-0,45
Facteurs de transcription				
Vv_10010344	Myb transcription factor	TC24310	-1,51	-1,13
Vv_10010563	Atmyb103	TC24708	-0,79	-0,82
Traduction, protéines ribosomiques				
Vv_10010943	30 S ribosomal protein S13	CB341195	-0,98	-1,15
Vv_10003913	50 S ribosomal protein L12-1a	TC19734	-0,94	-1,14
Vv_10001078	plastid ribosomal protein	TC15138	-0,69	-1,08
Vv_10006214	translation initiation factor IF1	CB343723	-1,00	-0,70
Protéines de stress, défense				
Vv_10002796	hsp 70	TC17757	1,04	0,85
Vv_10001052	din protein	TC15104	-0,93	-1,34
Vv_10011058	ERF	TC14279	-1,27	-0,83
Vv_10012356	RAPD marker linked to powder mildew resistance gene	TC17891	-0,79	-0,95
Vv_10009990	Cytochrome P450	TC23665	-1,14	-0,76
Modification des parois cellulaires				
Vv_10010712	xyloglucan endotransglycosylase 1	TC14438	1,97	0,76
Vv_10008543	pectinesterase	TC21319	-1,85	-2,98
Vv_10004152	hydroxyproline-rich glycoprotein	TC20041	-2,30	-2,29
Vv_10002495	beta-xylosidase	TC17239	-0,95	-1,89
Vv_10001257	pectin methylesterase	TC15388	-0,82	-1,22
Vv_10009506	extensin	TC22763	-1,06	-0,84

Tableau 27 : Liste de toutes les séquences TC régulées de façon différentielle et significative entre les deux lignées de Vigne : la lignée 19 sur-exprimant VvWRKY1 et la lignée sauvage WT (suite du tableau et de la légende sur la page suivante).

Beaucoup de gènes réprimés sont liés à la photosynthèse

La catégorie la plus représentée est la photosynthèse. Elle comprend 10 gènes dont un seul est induit dans les plantes transformées, un gène codant le cytochrome b. Parmi les gènes réprimés, deux codent des protéines des photosystèmes, deux des protéines fixant la chlorophylle, et deux autres des anhydrases carboniques.

Fonctions diverses

Les modifications métaboliques mises en place dans la lignée transgénique nécessitent une augmentation des échanges d'ATP et d'ADP entre le cytosol et la mitochondrie. C'est sans doute pourquoi, le gène codant une translocase d'adénine mitochondriale (mitochondrial adenine nucleotide translocator) est activé dans la lignée 19. Ce type de protéine est essentiel pour la formation de pores au niveau de la membrane interne mitochondriale participant ainsi à sa perméabilité.

On remarque que 2 gènes du métabolisme des acides gras sont régulés de façon opposée dans la lignée 19. Cette modification va, dans les deux cas, dans le sens de la dégradation des acides gras. Effectivement un gène codant une lipase, enzyme de dégradation des acides gras, est activé alors que un gène codant une protéine transporteur d'acyl (acyl carrier protein), participant à la biosynthèse des acides gras est réprimé. Toutefois, il faut noter que certaines lipases peuvent également être impliquées dans la biosynthèse d'acide jasmonique, en amont des lipoxygénases.

Par ailleurs, trois gènes codant des protéines ribosomiques et un codant un facteur de traduction sont régulés négativement dans les plantes transformées.

Gènes liés à la défense

Parmi les différentes catégories fonctionnelles, 22 gènes régulés différemment peuvent être rassemblés au sein d'un plus grand groupe lié aux mécanismes de défense des plantes. Afin de faciliter la lecture des résultats, ces gènes sont regroupés dans le **tableau 28**.

Parmi les gènes exprimés plus fortement dans les plantes transgéniques par rapport aux plantes sauvages, on retrouve les deux gènes codant des lipoxygénases, et deux gènes codant des protéines qui participent au métabolisme des composés phénoliques ; l'UDP-glucose glucosyltransférase qui catalyse une des dernières étapes de la biosynthèse des anthocyanes et l'acide cafféique-O-méthyl transférase (COMT) participant à la biosynthèse des lignines. Les composés phénoliques sont largement impliqués dans la défense de la plante.

La majorité des gènes de défense répertoriés ici codent des protéines structurales des parois cellulaires (HRGP, extensine) ou participant à leur modification (xyloglucan endotransglycosylase,

ID	Fonction	TC	log2(19/WT)A	log2(19/WT)B
Fonctions diverses				
Vv_10001128	mitochondrial Adenine nucleotide translocator	TC15211	0,75	0,70
Vv_10009557	NADPH dependant reductase	TC22845	-1,11	-0,93
Vv_10000679	nuclease	TC14613	-1,22	-0,76
Vv_10013654	chaperone	TC22699	-1,12	-1,22
Vv_10008294	peptidase en C-ter	CF211246	-1,16	-1,00
Vv_10012584	legumin	TC18422	-1,75	-0,63
Vv_10008800	Auxin influx carrier protein	TC21679	-1,15	-1,12
Vv_10013178	inorganic carbon transport protein	TC21043	-1,43	-0,94
Vv_10010934	inositol phosphatase-like protein	CB009272	-0,79	-1,02
Fonction inconnue				
Vv_10012782		TC18950	1,52	0,61
Vv_10001322		TC15479	0,72	0,69
Vv_10011347		TC14110	1,26	0,75
Vv_10010724		TC15499	1,13	0,82
Vv_10011539		TC15276	3,68	0,83
Vv_10011583		TC15480	1,02	0,83
Vv_10011280	GASA gibberellin regulated	TC19682	1,57	0,86
Vv_10012369		TC17924	-0,64	-1,97
Vv_10012039		TC17045	-1,09	-1,22
Vv_10013339		TC21681	-1,15	-1,00
Vv_10012292		TC17718	-0,66	-0,97
Vv_10009626	GCN5-like protein 1	TC22962	-0,59	-0,81
Vv_10002170		TC16719	-0,68	-0,66
Vv_10001529	SOUL-like protein (heme binding)	TC15757	-0,98	-1,05

Tableau 27 (suite) : Liste de toutes les séquences TC régulées de façon différentielle et significative entre les deux lignées de Vigne : la lignée 19 sur-exprimant *VvWRKY1* et la lignée sauvage WT. La colonne **ID** représente les annotations de chaque oligonucléotide déposé sur les puces à ADN, la colonne **TC** celles des séquences TC correspondantes répertoriées dans les bases de données du TIGR. La colonne **Fonction** indique les fonctions potentielles de ces séquences déterminées par recherche dans les bases de données du TIGR ou par comparaison de séquences par le programme BLAST de NCBI. Les valeurs **log2(19/WT)A et B** correspondent au logarithme en base 2 des intensités de la lignée transgéniques 19 par rapport à celles de la lignée sauvage respectivement pour la première (A) et la deuxième (B) expériences. Chacune de ces valeurs correspond elle même à la moyenne du logarithme des intensités d'une hybridation et de son swap.

En rouge, sont représentées les gènes dont l'expression est activée dans la lignée 19 par rapport à la lignée sauvage et en vert les gènes réprimés.

beta-xylosidase, pectine estérase, pectine méthylestérase). Tous sont réprimés dans la lignée sur-exprimant *VvWRKY1* sauf le gène codant l'endotransglycosylase. Cette catégorie fonctionnelle de protéines est essentielle dans les mécanismes de défense de la plante puisqu'elles participent à l'élaboration et au renforcement des barrières physiques.

De plus, un gène codant une protéine HSP (heat shock protein 70) est activée dans les plantes sur-exprimant *VvWRKY1*. Ce type de protéines chaperones joue un rôle essentiel dans la transduction du signal de défense des plantes. La production de telles protéines peut être induite par plusieurs éliciteurs (Hamilton et Coleman, 2001, Cheong *et al.*, 2002). Elles sont également fortement exprimée en conditions de différents stress (Lee et Vierling, 2000, Hui *et al.*, 2003). Chez les animaux, elles sont connues pour être particulièrement impliquées dans l'apoptose (Beere, 2001).

Parmi les gènes régulés négativement dans les Vignes transformées, on trouve :

-Deux facteurs de transcription de type MYB. Il faut savoir que la plupart d'entre eux sont impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse des composés phénoliques.

-Un gène codant un facteur de transcription ERF (Ethylene Responsive Factor). L'expression de ces gènes, spécifiques aux plantes, est induite par des infections par des agents pathogènes et par l'éthylène. Ces protéines participent à la défense des plantes en se liant aux boîtes GCC des promoteurs ; elles peuvent agir comme régulateurs positifs ou négatifs (Ohme-Takagi et Shinshi, 1995 ; Ohta *et al.*, 2000, 2001).

-Il est également important de noter la répression d'un gène qui correspond à la séquence d'un marqueur RAPD des gènes de résistance au mildiou chez une espèce de Vigne sauvage chinoise (*Vitis pseudoreticulata*). Ces résultats n'ont pas été publiés ; seule la séquence a été déposée dans la base de données Genbank.

-Par ailleurs, on trouve un gène de détoxification codant un cytochrome P450 (monooxygénase) et le gène codant une protéine din. La protéine de Tabac Ntdin est localisée dans les chloroplastes, son expression est activée dans les tissus sénescents. Il semblerait que cette protéine participe au métabolisme du soufre et la l'azote et notamment à la biosynthèse d'un cofacteur du molybdène (Yang *et al.*, 2003).

Finalement, il est intéressant de remarquer que la majorité des gènes régulés différemment par la sur-expression de *VvWRKY1* appartient à un groupe lié aux mécanismes de défense des plantes.

ID	Fonction	TC	log2(19/WT)A	log2(19/WT)B
Voie de l'acide jasmonique				
Vv_10012267	triacylglycerol lipase	TC17664	1,11	0,64
Vv_10000951	lipoxygenase	TC14970	2,35	0,84
Vv_10010838	lipoxygenase	CD007835	1,10	1,39
Vv_10004135	acyl carrier protein	TC20021	-0,85	-0,64
Métabolisme des phénylpropanoïdes				
Vv_10008197	UDP-glucose glucosyltransferase	CF209611	0,88	0,72
Vv_10011253	caffeic acid O-methyltransferase	TC14227	1,97	0,88
Vv_10010344	Myb transcription factor	TC24310	-1,51	-1,13
Vv_10010563	Atmyb103	TC24708	-0,79	-0,82
Protéines de défense				
Vv_10002796	hsp 70	TC17757	1,04	0,85
Vv_10001052	din protein	TC15104	-0,93	-1,34
Vv_10012356	RAPD marker linked to powder mildew resistance gene	TC17891	-0,79	-0,95
Facteur de transcription lié à la défense				
Vv_10011058	ERF	TC14279	-1,27	-0,83
Détoxification				
Vv_10009990	Cytochrome P450	TC23665	-1,14	-0,76
Modification de la paroi cellulaire				
Vv_10010712	xyloglucan endotransglycosylase 1	TC14438	1,97	0,76
Vv_10008543	pectinesterase	TC21319	-1,85	-2,98
Vv_10004152	hydroxyproline-rich glycoprotein	TC20041	-2,30	-2,29
Vv_10002495	beta-xylosidase	TC17239	-0,95	-1,89
Vv_10001257	pectin methylesterase	TC15388	-0,82	-1,22
Vv_10009506	extensin	TC22763	-1,06	-0,84
Autres fonctions				
Vv_10000679	nuclease	TC14613	-1,22	-0,76
Vv_10013654	chaperone	TC22699	-1,12	-1,22
Vv_10008294	peptidase en C-ter	CF211246	-1,16	-1,00

Tableau 28 : Liste des séquences TC correspondant à des gènes potentiellement impliqués dans les mécanismes de défense ou de réponse au stress qui sont exprimées différemment dans les deux conditions testées lors des expériences d'hybridation sur les puces à ADN.

Les valeurs **log2(19/WT)A et B** correspondent au logarithme en base 2 des intensités de la lignée transgéniques 19 par rapport à celles de la lignée sauvage pour la première (A) et la deuxième (B) expériences. Chacune de ces valeurs correspond elle même à la moyenne du log des intensités d'une hybridation et de son swap.

En rouge, sont représentées les gènes dont l'expression est activée dans la lignée 19 par rapport à la lignée sauvage et en vert les gènes réprimés.

Dans l'objectif de compléter les résultats obtenus précédemment concernant l'implication de VvWRKY1 dans les mécanismes de défense de la Vigne, la **transformation de cellules embryogènes de Vigne de manière sur-exprimer ce facteur de transcription** a été entreprise. Cinq lignées présentant des niveaux variables d'expression du transgène ont été sélectionnées. L'effet de cette sur-expression sur la transcription de gènes codant des protéines PR a été évalué par RT-PCR semi-quantitative. Pour deux lignées seulement, des accumulations des transcrits VvPR2 et VvPR3 ont été observés. Par la suite, des expériences d'infections et des analyses globales du transcriptome ont été menées sur une lignée, la lignée 19.

Effet protecteur de VvWRKY1 vis-à-vis du mildiou de la Vigne

Les résultats d'analyse d'expression de VvWRKY1 sur des boutures de Vigne en réponse à des molécules de stress (Article partie 1) suggéraient l'implication de ce facteur de transcription dans la défense de la plante. Nous avons donc testé **la résistance d'une des lignées transgéniques à un champignon pathogène, le mildiou de la Vigne (*Plasmopara viticola*)**. Cette analyse a démontré une **sensibilité moindre de cette lignée par comparaison au génotype sauvage**. Ces résultats bien que très intéressants restent toutefois préliminaires. En effet, des améliorations des conditions de ces tests d'infections restent encore à apporter. D'importantes variations de croissance du champignon et de réponse des feuilles suite à l'infection persistent au sein de chacune des lignées. Aussi, nous devons travailler avec un très grand nombre de répétitions pour atténuer les effets liés aux stades de développement et à l'état physiologique des feuilles de Vigne. La première série de lecture (par notation visuelle) a permis d'obtenir des résultats statistiquement significatifs car le nombre de répétitions pour chaque lignée était d'une centaine pour la première expérience et de 200 pour la seconde. Toutefois, pour le comptage des sporanges, toutes les feuilles de Vigne disposées dans une même boîte de Pétri devaient être rassemblées de manière à obtenir une suspension de spores suffisamment concentrée pour être dosée sur cellule de Malassez. Aussi, le nombre de ces nouveaux échantillons n'était que de 2 pour la première expérience (où les feuilles de deux boîtes de Pétri étaient mélangées) et de 8 pour la seconde (un dosage pour toutes les feuilles d'une boîte de Pétri). Les analyses statistiques ne sont donc pas satisfaisantes. Un autre système plus performant de comptage des sporanges permettrait d'améliorer ce mode opératoire, comme par exemple un compteur à particules.

Par ailleurs, il sera bien évidemment nécessaire d'effectuer ces tests de résistance sur les autres lignées transgéniques afin de confirmer ces premiers résultats obtenus sur la lignée 19. La difficulté d'obtenir suffisamment de matériel végétal ne nous a pas permis, dans un premier temps, de réaliser cette expérience avec d'autres lignées.

Malgré tout, ces tests nous auront permis de démontrer un réel effet protecteur du facteur de transcription VvWRKY1 vis-à-vis des infections par un agent pathogène de type fongique, ici, le mildiou de la Vigne. Les plantes sur-exprimant cet ADNc présentent une limitation de la croissance et de la sporulation de ce champignon par rapport à des plantes sauvages. C'est à notre connaissance la première fois que l'on met directement en évidence le rôle d'un gène WRKY dans la résistance aux pathogènes, dans une plante ligneuse pérenne. De telles analyses n'ont jusqu'à présent été effectuées que chez *Arabidopsis thaliana*. Toutefois, les mécanismes sous-jacents de cette tolérance restent indéterminés.

Recherche de gènes cibles

Les analyses par RT-PCR de la transcription de plusieurs gènes *PR* dans les plantes transgéniques n'ont pas permis de mettre en évidence de façon claire un rôle de VvWRKY1 sur la régulation de l'expression de ces gènes. Leur expression semble modifiée dans certaines lignées transgéniques mais sans corrélation nette avec le niveau d'expression du transgène. Ces résultats corroborent ceux observés précédemment dans les deux systèmes hétérologues.

Par ailleurs, dans l'équipe du Pr P. Coutos-Thévenot de l'Université de Poitiers, Laurent Laquittaine au cours de son travail de recherche de thèse a étudié la région promotrice du gène codant la protéine UblTP1, qui appartient à la grande famille des PR protéines (groupe PR14). Il a ainsi remarqué la présence des plusieurs boîtes W dans cette séquence régulatrice et souhaité voir l'effet d'une protéine WRKY sur la régulation de ce gène. Aussi une solution d'*Agrobacterium tumefaciens* transformée par le plasmide *p35SGibin19-VvWRKY1* a été infiltrée dans des feuilles de Tabacs transformés de façon stable par différentes constructions du promoteur LTP fusionné au gène Gus. Des résultats intéressants ont été obtenus avec le promoteur LTP de 250 pb pour lesquels les feuilles infiltrées par l'ADNc *VvWRKY1* montre une très nette activation de l'activité GUS (d'environ 14 fois) par rapport aux plantes non infiltrées. Ceci suggère un effet régulateur de VvWRKY1 sur la transcription du gène *UblTP1*.

Dans le but d'apporter de plus amples informations sur les gènes cibles de ce facteur de transcription VvWRKY1, nous avons envisagé une approche globale de l'analyse du transcriptome des plantes transgéniques de la lignée 19 afin de le comparer aux plants de Vigne sauvages.

Peu de gènes sont régulés différenciellement par VvWRKY1 dans les plantes transgéniques

Les résultats obtenus après analyse des puces à ADN montre dans un premier temps une reproductibilité relative entre les deux répétitions avec au final un nombre assez restreint de gènes différenciellement exprimés entre lignée sauvage et lignée transgénique.

De telles divergences entre deux séries d'expérimentation sont attribuables au fait qu'il s'agit de deux échantillons totalement indépendants (matériel végétal et extraction d'ARN) ; nous travaillons donc avec deux réplicats biologiques. Si nous avions fait un troisième réplicat, nous aurions certainement pu identifier des gènes supplémentaires dont l'expression varie dans les deux conditions étudiées. Puisque nous avons rejeté tous ceux pour lesquels nous avons qu'une seule valeur significative.

Toutefois, de telles analyses en conditions non infectées ou non élicitées mettent également en évidence un nombre restreint de gènes dont l'expression est modifiée par la sur-expression d'un facteur de transcription WRKY. Par exemple, la sur-expression de AtWRKY6 modifie de significativement l'expression de 154 gènes sur 12 000 dans les racines et seulement 63 sur 12 000 dans les parties aériennes (Robatzek et Somssich, 2002).

Régulation de gènes liés à la défense

La majorité des gènes dont l'expression est modifiée par la sur-expression de VvWRKY1 peut intervenir dans les mécanismes de défense de la plante. Effectivement, dans cette catégorie, nous avons pu rassembler 22 gènes parmi les 56 régulés différenciellement (dont 14 de fonction inconnue). Ils représentent donc environ la moitié des gènes identifiés avec une fonction potentielle.

Parmi eux, une large proportion des protéines codées par ces gènes, participe soit à la constitution des parois pectocellulosiques soit à ses modifications. La plupart d'entre eux sont régulés négativement par VvWRKY1.

La plupart des enzymes de modification des parois présentent une activité de clivage des xyloglucanes, réduisant ainsi la longueur des fibres des parois cellulaires et donc leur résistance physique. Toutefois, ces protéines peuvent jouer un second rôle ; elles peuvent permettre la libération d'éliciteurs de nature polysaccharidique du fait de leur activité lytique et participer ainsi à l'activation des mécanismes de signalisation dans la cellule végétale. Ces enzymes de modification des parois ont donc des actions variées : elles participent au remodelage des parois, à leur fragilisation ou à la production d'éliciteurs endogènes. Il est donc délicat d'interpréter des résultats traduisant des variations d'expression.

Dans la baie de raisin, de nombreuses protéines de parois s'accumulent à partir de la véraison (les Hydroxyproline-Rich GlycoProtéines, pectine méthylestérases, xyloglucane endotransglycosylases

(Davies et Robinson, 1996, Dunan *et al.*, 2001). Certaines protéines participeraient au renforcement de la paroi pendant l'expansion cellulaire mais surtout à son remaniement au cours de la maturation. Les protéines structurales peuvent donc intervenir dans la limitation des invasions par les agents pathogènes.

Plusieurs gènes identifiés par ces analyses de puces à ADN concernent le métabolisme des composés phénoliques. Deux gènes codant des facteurs de transcription MYB sont réprimés alors que deux gènes codant des enzymes de cette voie de biosynthèse sont activés dans les plantes transgéniques (UDP-glucose glucosyltransférase et l'acide cafféique-O-méthyl transférase).

Les composés phénoliques constituent une grande famille de métabolites secondaires qui peuvent intervenir dans la protection des végétaux à différents niveaux : les anthocyanes (flavones, flavonols) absorbent les rayons ultra-violets (Price, 1995), les stilbènes et certains flavonoïdes sont considérées comme des phytoalexines (Aziz *et al.*, 2003) car elles présentent des propriétés antifongiques et les dépôts de lignines constituent une barrière physique contre les pathogènes. Ces molécules peuvent également jouer un rôle d'antioxydants.

Par ailleurs, de nombreux facteurs de transcription de type MYB sont connus pour être impliqués dans la régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes (Martin et Paz-Ares, 1997, Jin et Martin, 1999). Certaines de ces protéines peuvent réguler de façon négative des gènes de la biosynthèse des composés phénoliques ; c'est notamment le cas de AmMyb308 et AmMyb330 identifiées chez le muflier (Tamagnone *et al.*, 1998). Aussi, la régulation négative de ces facteurs de transcription par VvWRKY1 pourraient-elle être responsable de l'induction de l'UDP glucose glucosyltransférase et la COM-transférase dans les plantes transgéniques?

Les protéines MYB apparaissent comme des cibles potentielles des facteurs de transcription WRKY. La sur-expression d'*AtWRKY70* réprime aussi l'expression d'un gène MYB chez *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2004) et des expériences de « pull-down assays » ont montré qu'*AtWRKY53* a pour cible le promoteur d'un gène *MYB* (Miao *et al.*, 2004).

Il est également intéressant de noter qu'un autre facteur de transcription, de type ERF, est réprimé chez les Vignes transgéniques. Ce résultat tend à confirmer un rôle de VvWRKY1 dans la voie de transduction de l'éthylène, comme le suggérait son activation par l'éthéphon (cf. article partie 1). Un facteur ERF semble aussi être une cible pour *AtWRKY53* (Miao *et al.*, 2004).

Ceci illustre bien la complexité des mécanismes de régulation de la transcription chez les plantes.

Par ailleurs, l'activation de deux lipoxygénases dans les plantes transformées sous-entend l'activation de la voie de signalisation mettant en jeu l'acide jasmonique et l'expression des gènes de défense contrôlés par celle-ci. Cet éliciteur peut effectivement induire l'accumulation de métabolites

secondaires et de protéines de défense (Gundlach *et al.*, 1992, Van Der Fits et Memelink 2000, Devoto et Turner, 2003). De plus, l'application d'un tel éliciteur sur des cellules de Vignes provoque la synthèse de stilbènes (Krisa *et al.*, 1999).

Toutefois, il faut rapprocher ce résultat des analyses d'expression de VvWRKY1 dans les boutures de Vignes traitées par l'acide jasmonique. Nous observons alors une répression de VvWRKY1 quelques heures après l'élicitation. On peut donc penser à un mécanisme complexe de régulation faisant intervenir la voie de l'acide jasmonique et VvWRKY1. Il serait intéressant de doser l'acide jasmonique présent dans les plantes transgéniques.

En parallèle, plusieurs gènes identifiés codent des protéines qui peuvent intervenir dans les mécanismes de détoxification ou dans la réaction de mort cellulaire : deux protéines chaperones, (dont la protéine HSP70), un cytochrome P450, mais également une protéase et une nucléase. Tous sont exprimés plus faiblement dans les plantes sur-exprimant VvWRKY1 que dans les plantes sauvages, excepté le gène codant la protéine HSP70.

Régulation de gènes impliqués dans la perception de la lumière

Les résultats des micro-arrays ont mis en évidence 10 gènes intervenant dans la photosynthèse régulés de façon différentielle dans les plantes sur-exprimant VvWRKY1. Tous sont réprimés excepté un gène codant un cytochrome b. Plusieurs travaux suggèrent un lien étroit entre la perception de la lumière et les mécanismes de défense des plantes.

Les mécanismes de défense dépendant de l'acide salicylique peuvent impliquer différentes protéines de la photosynthèse. Effectivement, la perception de l'acide salicylique et l'activation des gènes *PR* dépendent des conditions de lumière et de la perception et transduction du signal par les phytochromes. Genoud *et al.* (2002) montrent que chez un double mutant d'*Arabidopsis thaliana* *phyA-phyB*, la bactérie *P. syringae* présente une croissance accrue, lors d'une réaction d'incompatibilité.

De plus, une protéine fixant l'acide salicylique (SABP3, SA binding protein 3, Slaymaker *et al.*, 2002) a été caractérisée comme anhydrase carbonique chloroplastique. Ces auteurs démontrent que cette protéine est nécessaire pour la mise en place de la réaction d'hypersensibilité médiée par le gène de résistance *Pto*, chez le Tabac. Son activité antioxydante lui confère son rôle dans la défense en contrôlant le niveau de production des espèces réactives d'oxygène (ROS) lors du burst oxydatif. Ces travaux reflètent donc le lien étroit qu'il existe entre les mécanismes de défense et ceux de la photosynthèse.

En réponse à une attaque par un agent pathogène, il a plusieurs fois été démontré que des gènes de photosynthèse pouvait être réprimés. Par exemple, Hui *et al.* (2003) ont montré par des analyses

de transcriptome que lors d'une interaction entre un lépidoptère (*Manduca sexta*) et son hôte le Tabac, plusieurs gènes codant des protéines notamment des photosystèmes étaient régulés négativement. Ils émettent l'hypothèse que la répression de gènes liés à la photosynthèse permettait aux plantes infectées de réinvestir leurs ressources dans d'autres processus métaboliques.

Sur-expression de protéines WRKY et analyses de transcriptome

En ce qui concerne les facteurs de transcription WRKY, des études comparables d'analyse globale du transcriptome ont été réalisées et montrent des résultats similaires pour certains gènes. On peut notamment citer les travaux de Li *et al.* (2004) qui ont produit des plantes d'*Arabidopsis* sur- et sous-exprimant *AtWRKY70* et réalisés des expériences de micro-arrays afin de comparer ces deux lignées à la lignée sauvage. Parmi les gènes de défense différentiellement exprimés, certains semblent régulés dans le même sens par *AtWRKY70* et *VvWRKY1* : une xyloglucane endotransglycosylase est activée, alors qu'une pectinestérase et un facteur Myb sont réprimés par ces deux facteurs de transcription.

De plus, Robatzek et Somssich (2002) qui ont réalisé des analyses de transcriptome (par cDNA-AFLP) sur des plantes d'*Arabidopsis* sur-exprimant *AtWRKY6* voient également l'expression activée de gènes codant une xyloglucane endotransglycosylase et une lipase, de la même manière que pour *VvWRKY1*. Par contre, deux gènes codant une pectine estérase et une glucosidase semblent être régulés par *AtWRKY6* mais de façon positive.

En conclusion, il apparaît donc que **la sur-expression de *VvWRKY1* provoque dans la plante une reconfiguration du métabolisme qui, en réduisant l'activité photosynthétique, va notamment activer la voie de signalisation de l'acide jasmonique, remodeler la structure des parois cellulaires et favoriser la biosynthèse de composés phénoliques.**

Aucun gène codant des protéines PR ne voit son profil d'expression varier significativement dans les plantes transgéniques lors des analyses de micro-arrays, ce qui confirme bien que ces gènes n'apparaissent pas comme des cibles de *VvWRKY1*.

On peut cependant se demander pourquoi la plupart des gènes "de défense" identifiés par les analyses de puces à ADN sont réprimés dans les plantes transgéniques qui présentent pourtant une plus grande tolérance vis-à-vis du mildiou. Il serait intéressant de comparer ces profils d'expression dans des conditions saines et dans des conditions où les plantes sont infectées par un champignon. Ceci sera discuté dans les perspectives de ce travail.

Troisième partie

Afin de mieux cerner les mécanismes mis en jeu dans la régulation transcriptionnelle de *VvWRKY1*, nous avons initié l'étude de la région promotrice de ce gène. Les résultats sont présentés dans cette 3^{ème} partie.

Le clonage du promoteur a été réalisé par la technique de PCR inverse, et a permis d'identifier une séquence de 671 pb. L'analyse informatique de la séquence par un logiciel de recherche de boîtes régulatrices a été effectuée et montre la présence d'éléments *cis*-régulateurs potentiels.

En parallèle, nous avons testé la capacité de cette séquence à activer la transcription d'un gène rapporteur dans des protoplastes de Tabac, système choisi par sa simplicité de mise en œuvre. La validation de la fonctionnalité de ce promoteur dans les protoplastes nous permettra d'envisager une analyse plus détaillée dans d'autres systèmes.

Dans un premier temps, nous avons souhaité tester le rôle de différentes molécules ajoutées dans les protoplastes de Tabac. Plus particulièrement, nous présentons les premières analyses d'une éventuelle auto-régulation de *VvWRKY1* en co-transformant les protoplastes de Tabac avec le promoteur fusionné au gène rapporteur GUS et une construction permettant de sur-exprimer *VvWRKY1*.

Nous avons également initié l'étude du promoteur en système homologue, dans des protoplastes de Vigne. Les premiers résultats seront discutés.

Par ailleurs, dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Dr I. Somssich (Institut Max Planck de Cologne, Allemagne), nous avons souhaité bénéficier de leur maîtrise de l'utilisation de protoplastes de Persil pour réaliser l'étude de aussi du promoteur par un éléciteur. Les résultats obtenus seront présentés.

Dans l'optique d'étudier la régulation de ce gène et d'identifier les éléments régulateurs, le clonage de la région promotrice de *VvWRKY1* a été réalisé par la technique de PCR inverse à partir d'ADN génomique isolé de feuilles de Vigne (cv. Cabernet Sauvignon).

Le principe de cette technique est décrit sur la **figure 22** (cf Matériel et Méthodes). L'ADN génomique a été digéré par plusieurs enzymes de restriction choisies de façon à couper la séquence codante de *VvWRKY1* du côté 5' tout en laissant l'espace nécessaire pour désigner deux amorces

-671 GCATTATGGGTGGTAATTCACGTAGGTGAGTCGGAGTCGGAGTTGAGCCGTATTCGTGTC

-611 GCGCCAAAACATAAATAATAATTATGTCAAAAATATAAATTTAGATATTATCTTATATAA
Boîte W

-551 GCTTATATGATTAATATCTCAATCAGGTAAAATTCATTTAAAAATTATTTATTTATTAA

-491 ACAGGAAAAACAAGTCATATAAAATTTTGATGAAAGTCAATTATATTCCATCCAACTAT
Boîte W Boîte W

-431 TGAACAGCATGCTGAATTTAAATCGTATAGACAAGCTGGTGGGAATCATATCGAGCTTTG
Boîte W

-371 ACATGGATAGCACCTATTATTATATGTACTGTGTTCCGAATCGGAACTTCTTCCCATCAA

-311 AGACGTCTCTTGTGATTGTAATCGTGGGACTTCAAATCTTGTACATATATTTGCAGTTTG

-251 CGTGCCGTCCACGACACCTTTGACTATGCAGGAAAGGGACGGGTGTGTGATATTGCAGGA
Boîte W

-191 CTCAATTTTCTCTGCAGAGAAAAGTGAATTTGGACGCTAGCCATTAGGCCGCCCTTCTTT
Initiateur Boîte GCC

-131 TTCTGTGTTCTGCCTTTTACCATCGCATAAACTTCTTCCTCCCATCCCCTCTTTTCCCAC

-71 CACAAAGCCTGTTTATTCATCTTCTTCGTAAAATCCGTCTGTTTAAATCTCAATCTCTCTC
Elément TCA

-11 AGTCTCTCTAAATG

Figure 38: Séquence nucléotidique de la région promotrice de *VvWRKY1* (671 pb). La numérotation est effectuée à partir de l'adénine du codon ATG initiateur de la traduction qui est souligné et marqué en gras. Sont représentées les 5 boîtes W (de fixation des protéines WRKY), une boîte GCC (de régulation par l'éthylène et l'acide jasmonique), une boîte TCA (de régulation par l'acide salicylique) et un élément initiateur de la transcription avec le site potentiel d'initiation de transcription surligné en rose. Le nucléotide surligné en jaune correspond à la dernière base (en 5') de l'ARNm identifié lors du clonage de *VvWRKY1*.

(une en sens et l'autre en antisens) entre l'ATG initiateur et le site de restriction. Les enzymes qui ont été utilisées sont *TaqI*, *BamHI*, *ClaI*, *EcoRI* et *EcoRV*. Il est en effet préférable de multiplier les enzymes de restriction pour augmenter les chances de réussite. Les amorces utilisées sont décrites dans l'annexe 2. Les fragments amplifiés ont été clonés dans le vecteur pGem-T easy afin d'être séquencés.

La digestion de l'ADNg par *EcoRV* a permis d'isoler un fragment de 874 pb, contenant la séquence 5' de l'ADNc et 671 pb en amont de l'ATG (**figure 38**). L'analyse de cette séquence a permis grâce au site Internet PLACE (Plant cis-acting regulatory DNA elements, Higo *et al.*, 1999) d'identifier différents éléments régulateurs qui suggèrent des régulations potentielles par divers stimuli.

Tout d'abord, l'analyse de cette région promotrice ne révèle aucune boîte TATA proche de l'extrémité 3' de cette séquence. En revanche, des motifs correspondant à des initiateurs de la transcription ont été détectés par le programme PLACE. Il semblerait que l'initiateur en position -191 (depuis le codon initiateur de la traduction) puisse jouer ce rôle d'initiation de la transcription. Ainsi, le site +1 se situerait en position -188. Toutefois, il est important de préciser que ce point +1 potentiel ne correspond pas à l'extrémité 3' de l'ARNm identifié lors du clonage de l'ADNc, situé en position -69 (*cf.* Article Partie 1). Il sera donc nécessaire d'effectuer des expériences de 5'RACE ou d'extension d'amorce afin de déterminer exactement la position du site d'initiation de la transcription du gène *VvWRKY1*.

La plupart des boîtes régulatrices, leur séquence et leur rôle potentiel sont regroupés dans le **tableau 29**. Elles suggèrent des régulations de *VvWRKY1* en réponse :

Aux stress environnementaux

-à la lumière : 6 boîtes GATA, 8 motifs de liaison des facteurs de transcription GT1 (core ou consensus), et 2 autres boîtes (HDZIPATATHB2, boîte I). La présence d'un initiateur est souvent associée à des gènes liés à la photosynthèse ou régulés par la lumière

-à la déshydratation, l'étiollement (ABRELATERD1, ACGTATERD1), au froid (LTRECOREATCOR15)

Aux conditions physiologiques de la plante

- à une régulation négative par les sucres : un motif Amybox2, un motif pyrimidine-box, un motif TATCCAY. Ces 3 différentes boîtes ont été étudiées à partir du promoteur de l' α -amylase de Riz (Morita *et al.*, 1998). De plus, 9 motifs de liaison aux facteurs de transcription DOF ont été trouvés dans la séquence promotrice. Ces facteurs de transcription à doigt à zinc, spécifiques aux plantes, participent au métabolisme carboné.

Élément régulateur	Séquence	Position	Régulation d'expression
ABRELATERD1	ACGTG	-653(-)	Déshydratation senescence, étiolement
ACGTATERD1	ACGT	-652(+)(-), -309(+)(-)	Déshydratation senescence, étiolement
ACGT,C Box	GACGTC	-310(+)(-)	Liaison des b-ZIP FT
AMYBOX2	TATCCAT	-369(-)	a-amylase, stockage sucre
ARR1AT	NGATT	-544(+), -299(+), -531(-), - 411(-), -388(-), -333(-), - 292(-), -637(-), -41(-), -27(-), -21(-)	Cytokinines
CAATBOX1	CAAT	-532(+), -454(+), -189(+), - 22(+), -433(-), -297(-), - 200(-)	Graine
CACTFTPPCA1	YACT	-345(+), -169(-)	mésophylle
CANBNNAPA	CNAACAC	-341(-)	Embryon, endoderme
CAREOSREP1	CAACTC	-632(-)	Gibbéreline
CARGCW8GAT	CWWWWWWWWG	-560(+)(-), -268(+)(-),	Liaison des FT à MADS domaine
DOFCOREZM	AAAG	-459(+), -313(+), -219(+), - 171(+), -376(-), -366(-), - 135(-), -118(-), -81(-)	Liaison des FT DOF
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	-212(-)	Liaison des b-ZIP FT (ABA)
GATABOX	GATA	-568(+), -366(+), -203(+), -563(-), -537(-), -383(-)	Liaison des FT GATA, (forte expression, lumière, nitrate)
GCCORE	GCCGCC	-144(+)	Liaison des FT ERF (Ethylene, jasmonate)
GT1CONSENSUS	GRWAAW	-660(+), -488(+), -487(+), - 565(-), -187(-), -134(-), - 116(-), -80(-)	Liaison des FT GT1, (lumière, stabilise complexe transc , SA , pathogènes, sels)
GT1CORE	GGTTAA	-526(+)	Liaison des FT GT (lumière, type cellulaire)
GTGANTG10	GTGA	-646(+), -300(+), -205(+), - 168(+), -654(-)	pollen
HDZIP2ATATHB2	TAATMATTA	-596(+)	Liaison des protéines homéobox (autorégul négative/ lumière)
IBOXCORE	GATAA	-564(-)	Lumière
INRNTPSADB	YTCANTYY	-191(+), -24(+), -14(+), - 171(-)	Initiateur, lumière
LTRECOREATCOR15	CCGAC	-642(-), -636(-)	ABA, froid , sécheresse
MYBST1	GGATA	-367(+)	Liaison de MybSt1
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	-305(+), -83(+)	Nodule racinaire
PALBOXAPC	CCGTCC	-247(+), -215(-)	Promoteur du gène PAL
POLLENILELAT52	AGAAA	-174(+), -185(-), -132(-)	Pollen
PYRIMIDINEBOXOSR AMY1A	CCTTTT	-119(+)	Répression /sucres a-amylase

Tableau 29 : Récapitulatif des séquences régulatrices potentielles de la région promotrice de VvWRKY1 identifiées par le programme PLACE (Higo *et al.*, 1999). Les éléments qui semblent les plus intéressants ont été marqués de différentes couleurs. (+) et (-) indiquent respectivement si les séquences sont en position sens ou antisens. La suite du tableau se trouve sur la page suivante.

-aux hormones : acide gibbérellique (CAREOSREP1), cytokinines (ARR1AT), acide abscissique (DPBFCOREDCDC3, site de liaison des protéines b-ZIP et LTRECOREATCOR15)

Aux stress biotiques ou aux éliciteurs

-une boîte GCC de régulation par l'éthylène et l'acide jasmonique et par des agents pathogènes a été identifiée.

- 5 boîtes W sont présentes dans cette séquence promotrice sous différentes formes. Le cœur TGAC est indispensable et peut être suffisant pour la fixation de certaines protéines WRKY, comme SPF1 ou tWRKY1 (Ishiguro et Nakamura, 1994, Yang *et al.*, 1999). Mais très souvent, une séquence plus large est requise pour l'interaction protéine/ADN. Aussi, parmi ces 5 boîtes W, nous trouvons une séquence TTTGACT, quatre séquences TTGAC, trois séquences TGACT/Y (dont 2 sont redondantes avec la séquence TTGAC) et une seule qui ne contient que le cœur TGAC.

Cette analyse informatique indique uniquement la présence de ces séquences régulatrices. Toutefois, il faut rester prudent car la fonctionnalité de ces boîtes ne sera validée qu'après des analyses plus poussées du promoteur. Effectivement, certains de ces éléments, de petite taille notamment, ont une forte probabilité de se trouver dans n'importe quelle séquence nucléotidique. Ainsi, leur nombre, leur disposition et les séquences environnantes détermineront s'ils participent à la régulation de ce gène *VvWRKY1*.

Dans un premier temps, il était nécessaire de valider la fonctionnalité de cette séquence promotrice. Pour cela, nous avons donc choisi de cloner ce promoteur en amont du gène rapporteur codant la β -glucuronidase (gène *GUS*), et de réaliser des expériences d'expression transitoire dans des protoplastes de mésophylle de Tabac. Ces protoplastes présentent l'avantage d'être un système souvent utilisé et dont le fonctionnement est bien connu. Nous les avons donc utilisés comme étape préliminaire à l'utilisation de cette construction dans d'autres expériences.

Le fragment d'ADN de 671 pb a été cloné en amont du gène rapporteur *GUS* dans le vecteur pGreenII. Cette construction sera nommée *ProW1::GUS*. Pour cela, le fragment d'ADN correspondant à la région promotrice de *VvWRKY1* a été amplifié par PCR en utilisant l'enzyme TurboPfu (Stratagene) comme ADN polymérase et grâce à deux amorces modifiées intégrant un

ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	-567 (+), -449 (+), -265 (+), -202 (+), -580 (-), -539 (-)	Racine
S1FBOXSORPS1L21	ATGGTA	-114 (-)	Régulation négative, plastes
SEF4MOTIFGM7S	RTTTTTR	-584 (-), -512 (-)	Graine
TATCCAYMOTIFOSR AMY3D	TATCCAY	-369 (-)	Répression /sucres, a-amylase
TCA1MOTIF	TCATCTTCTT	-56 (+)	Liaison de TCA-1, SA,
WBOXPCWRKY1	TTTGACT	-233 (+)	W-box, PcWRKY1
WBOXATNPR1	TTGAC	-374 (+), -232 (+), -586 (-), -456 (-)	W-box, AtNPR1
WBOXHVISOI	TGACT	-231 (+), -479 (-), -457 (-)	W-box, Liaison de SUSIBA2 (répression /sucres)
WBOXNTERF3	TGACY	-231 (+)-479 (-)-457 (-)	W-box, NtERF3 (blessure)
WRKY71OS	TGAC	-373 (+), -231 (+), -586 (-), -478 (-), -456 (-)	W-box, Osamy32 (répresseur de voie GA)

Tableau 29 (suite) : Récapitulatif des séquences régulatrices potentielles de la région promotrice de VvWRKY1 identifiées par le programme PLACE (Higo *et al.*, 1999). Les éléments qui semblent les plus intéressants ont été marqués de différentes couleurs. (+) et (-) indiquent respectivement si les séquences sont en position sens ou antisens.

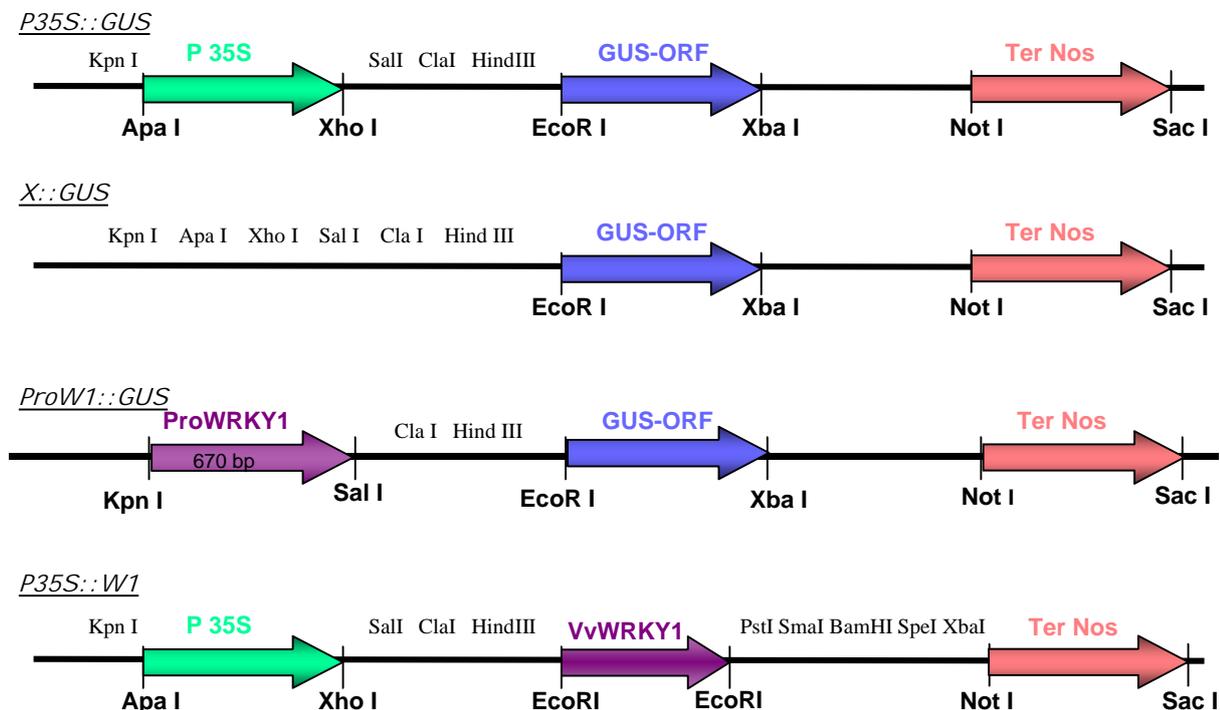


Figure 39 : Structure des constructions plasmidiques utilisées au cours des tests d'expression transitoire. Chacune de ces constructions dérive du vecteur pGreenII.

site de restriction à chaque extrémité, le site *KpnI* en 5' et le site *SalI* en 3' (amorces ProKpnS et ProSalAS décrites dans l'**annexe 1**). Cet amplifiat est d'abord intégré dans un vecteur de clonage, le pGem-T Easy afin d'y être séquencé. En parallèle, le vecteur *P35S::GUS* est digéré par les mêmes enzymes de restriction (*KpnI* et *SalI*) et purifié sur gel d'électrophorèse de manière à éliminer la séquence correspondant au promoteur 35S. Une ligation entre ce plasmide ouvert et l'insert purifié du pGem-T Easy permettra d'obtenir le nouveau vecteur *ProW1::GUS* (**figure 39**).

Trois autres constructions plasmidiques, issues du vecteur pGreenII, seront utilisées au cours de ces tests d'activité GUS, le schéma de chacune de ces constructions étant présenté dans la **figure 39**:

- le vecteur *P35S::GUS*, dans lequel le gène codant la glucuronidase est placé sous contrôle du promoteur fort 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Il servira de contrôle positif à cette expérience.

- le vecteur *X::GUS* contenant le gène *GUS* privé de séquence promotrice, qui servira de contrôle négatif.

- le vecteur *P35S::W1*, qui correspond au vecteur *P35S::NOS* dans lequel la séquence codante de *VvWRKY1* a été intégrée entre le promoteur 35S et le terminateur NOS. Pour cela, lors de l'identification de *VvWRKY1*, la totalité de sa séquence codante avait été clonée dans le pGem-T Easy et séquencée. Ce plasmide a été digéré par l'enzyme *EcoRI* et l'insert a été purifié après électrophorèse sur gel d'agarose. En parallèle, le vecteur *P35S::NOS* (cf. **figure 20**, Matériel et Méthodes) est spécifique par cette même enzyme puis ligué en présence de l'insert *VvWRKY1*. Des amplifications par PCR sur colonies bactériennes permettent de sélectionner les clones contenant le plasmide pGreenII dans lequel la séquence *VvWRKY1* est dans la bonne orientation permettant ainsi le contrôle de sa transcription par le promoteur fort 35S.

Pour la transformation des protoplastes de mésophylle de Tabac, des quantités relativement importantes de plasmides sont utilisées. Afin de réaliser des midi-préparations d'ADN plasmidique, la souche de bactérie d'*Escherichia coli* GM2163 (ou ER2925, Biolabs New England) a été choisie pour produire les plasmides. Elle contient des mutations pour les gènes *DAM* et *DCM* et est donc déficiente pour les réactions de méthylation de l'ADN. Effectivement, Tovar-Torres *et al.* (1993) ont montré que des expériences d'expression transitoire réalisées avec des plasmides multipliés grâce à cette souche bactérienne permettaient d'obtenir un niveau basal d'expression plus faible et donc une aussi de l'expression plus importante. Ils suggèrent que les méthylations de l'ADN peuvent être responsables de la dérégulation de l'activité des promoteurs dans de tels systèmes d'expression transitoire.

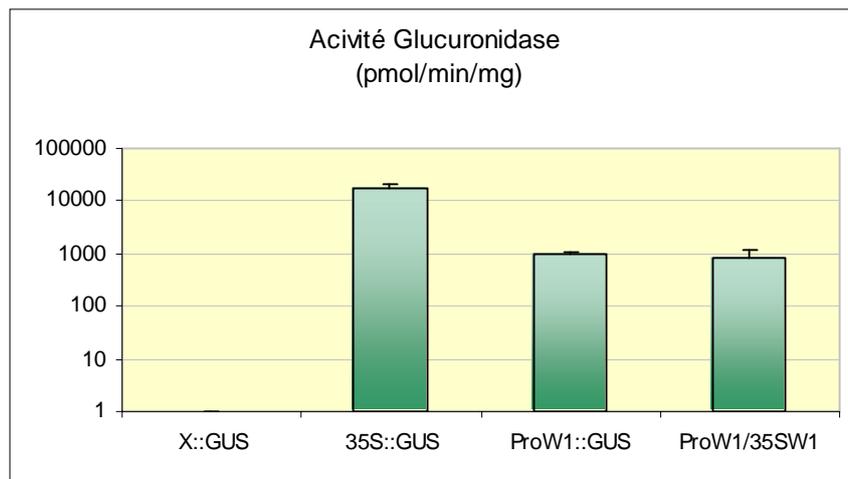


Figure 40 : Mesure d'activité glucuronidase (exprimée en pmol de MU produit/minute/mg de protéine) dans des protoplastes de tabacs transformés de façon transitoire par différentes constructions plasmidiques. *ProW1/35SW1* correspond à une expérience de co-transformation des protoplastes avec les deux constructions *ProW1::GUS* et *35S::GUS*. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne de l'activité GUS mesurée à partir de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types. L'échelle des ordonnées est en représentation logarithmique.

Cette souche est donc transformée avec chaque construction. Les plasmides récupérés par midi-préparations sont intégrés dans les protoplastes de mésophylle issus de Tabacs cultivés *in vitro* (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi) grâce à un traitement par le PEG.

β

Après la préparation et le dosage des extraits protéiques, un test quantitatif d'activité GUS est mis en place, mesurant, au cours du temps, l'apparition du produit 4-méthylumbelliférone (MU) par action de l'enzyme β-glucuronidase sur le substrat 4-méthylumbelliféryl glucuronide (MUG). Elle traduit donc l'activité du promoteur contrôlant le gène *GUS* dans les différentes conditions testées. Ces résultats sont exprimés en pmoles de MU formé par minute, rapportées à la quantité de protéine (en mg) ; ils sont présentés sur la **figure 40**. Cette analyse a été renouvelée trois fois et montre des valeurs bien reproductibles.

Sur les trois essais, les contrôles sont validés puisque l'on retrouve dans chaque cas une absence d'activité GUS pour les protoplastes transformés par *X::GUS* (contrôle négatif) ainsi qu'une très forte activité pour la constructions *P35S::GUS* (contrôle positif).

Les résultats concernant l'étude du promoteur de *VvWRKY1* montrent tout d'abord que cette région promotrice est bien fonctionnelle puisqu'une activité glucuronidase supérieure au témoin négatif a été mesurée. Elle est toutefois beaucoup moins élevée que celle du promoteur fort *35S*, environ 10 fois inférieure.

Une co-transformation des protoplastes par les vecteurs *P35S::WI* et *ProWI::GUS* a été réalisée dans l'objectif de mettre en évidence une éventuelle auto-régulation du promoteur de ce gène par sa propre protéine. Cette transformation est notée *ProWI/35SWI* (**figure 40**).

Aucune différence significative d'activité enzymatique n'a été mise en évidence par rapport à la simple transformation avec *ProWI::GUS*. Ce résultat suggère que la protéine *VvWRKY1* ne peut contrôler directement son propre promoteur. Néanmoins, la présence des 5 boîtes W dans cette région promotrice permet de penser que d'autres protéines WRKY peuvent se fixer sur cette séquence et ainsi réguler l'activité transcriptionnelle de ce gène.

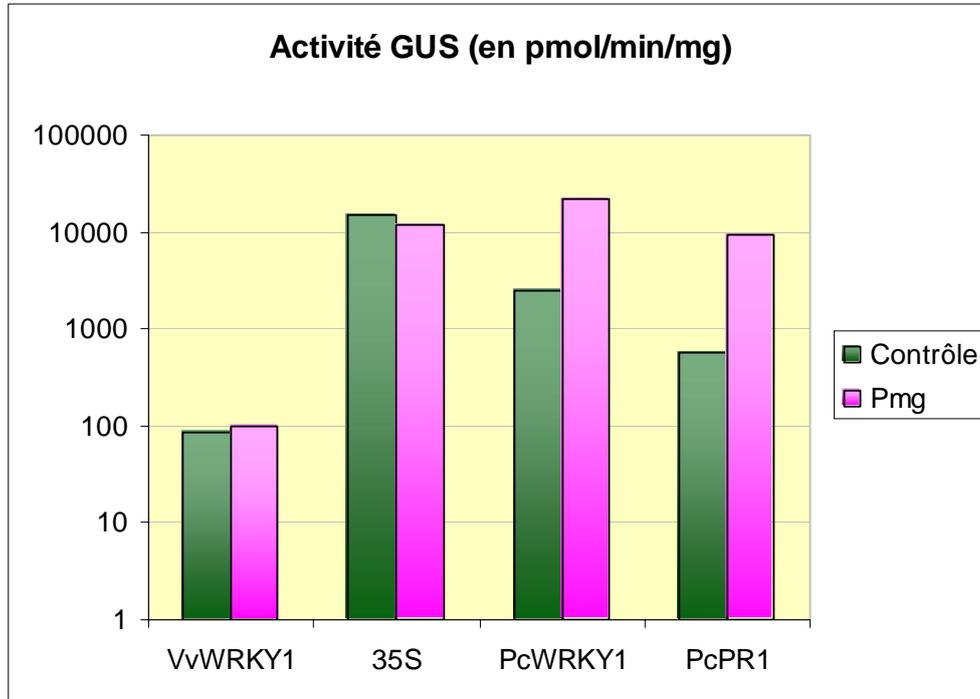


Figure 41 : Mesure d'activité glucuronidase (exprimée en pmol de MU produit/minute/mg de protéine) dans des protoplastes de Persil transformés de façon transitoire par différentes constructions plasmidiques et élicitées par un extrait brut contenant un mélange d'éliciteurs fongiques appelé Pmg. L'échelle des ordonnées est en représentation logarithmique. En jaune, sont représentées les activités GUS sans élicitation et en bleu, les activités GUS lorsque les protoplastes sont élicités par Pmg. Les étiquettes des abscisses correspondent à la construction fusionnant le promoteur du gène indiqué à la séquence codante du gène GUS. Les valeurs correspondent à la moyenne de deux ou trois mesures.

Afin d'étudier l'effet d'éliciteurs sur la régulation d'un gène rapporteur contrôlé par la région promotrice de *VvWRKY1*, nous avons collaboré avec le laboratoire du Dr. I. Somssich (Institut Max Planck de Cologne, Allemagne). Cette équipe travaille depuis longtemps sur les protéines WRKY du Persil mais aussi sur leur induction par un éliciteur fongique de nature peptidique Pep 25, et maîtrise les expériences d'expression transitoire sur protoplastes de Persil (Rushton *et al.*, 1996, Eugelm *et al.*, 1999, Rushton *et al.*, 2002, Cormack *et al.*, 2002, Turck *et al.*, 2004).

L'éliciteur utilisé dans notre cas est issu d'une préparation de paroi de mycélium du champignon pathogène du Soja, *Phytophthora megasperma f.sp. glycinea* (Pmg) qui possède une forte activité élicitrice sur les cellules de Persil (Hahlbrock *et al.*, 1995).

Les différentes constructions plasmidiques ont donc été testées dans leur système expérimental de manière à observer l'effet de ce mélange d'éliciteurs appelé Pmg. Des transformations avec des témoins positifs ont été réalisées en parallèle pour vérifier le réel effet inducteur de l'éliciteur. Ainsi, les promoteurs des gènes *PcPRI* et *PcWRKY1* ont servi de contrôles positifs pour l'élicitation ; la construction *P35S::GUS* a été utilisée comme contrôle de la transformation. Les résultats sont présentés dans la **figure 41**.

Les résultats concernant le promoteur de *VvWRKY1* n'ont pas été très encourageants. Tout d'abord, l'activité GUS régulée par cette construction est très faible dans les protoplastes de Persil, elle est de l'ordre de 60 à 100 pmol/min/mg alors que pour *PcWRKY1*, elle est d'environ 570 pmol/min/mg.

En réponse à un traitement par l'éliciteur Pmg, *PcWRKY1* voit son expression augmenter de 14 à 18 fois, *PcPRI* de 7 à 10 fois alors que *VvWRKY1* ne présente quasiment pas de variations du niveau d'expression de son promoteur et montre une activité GUS constante ou augmentée de 1,1 fois ou 1,3 fois selon les essais.

En parallèle, et dans le souci permanent d'étudier ces gènes dans leur système homologue, à savoir chez la Vigne, des expériences sur protoplastes de Vigne ont été initiées. Toutefois, ce type d'essai semble peu développé (Commun *et al.*, 2003) et il faut mettre au point les techniques d'isolement de protoplastes ainsi que leur transformation. Nous sommes parvenus à isoler des protoplastes de Vigne à partir de cultures cellulaires (cv. Cabernet Sauvignon) viables, mais leur transformation reste encore problématique. Les premiers essais révélaient une très faible activité β -glucuronidase même lorsque le gène *GUS* est contrôlé par le promoteur *35S*.

Cette troisième partie de mon travail de thèse, bien que préliminaire, concerne **la première caractérisation d'un promoteur de gène WRKY chez la Vigne**.

L'analyse informatique de la séquence de ce promoteur a montré la présence de nombreux éléments *cis*-régulateurs potentiels. Ces informations sont à prendre avec précaution car, comme nous l'avons précisé précédemment, la présence de ces boîtes, généralement de petite taille, peut être très fréquente. De plus, il faut considérer d'autres éléments qui rentrent en jeu dans la régulation de la transcription (organisation des différentes boîtes, séquences flanquantes, combinaisons de facteurs de transcription, Rushton *et al.*, 2002).

Présence de différents éléments régulateurs

Ainsi, la présence de **boîtes de répression par les sucres** est relativement surprenante étant donné que la transcription de *VvWRKY1* augmente après la véraison en même temps que le contenu en sucres de la baie. Toutefois, le premier gène identifié codant une protéine WRKY SPF1 montrait une expression régulée de façon négative dans des pétioles traités par du saccharose. D'après les auteurs, cette diminution d'expression serait responsable de l'accumulation de transcrits de la sporamine et de l' α -amylase (Ishiguro et Nakamura, 1994).

De nombreuses boîtes de **régulation par la lumière** ont été détectées. Il est intéressant de rappeler que d'après les analyses des puces à ADN, plusieurs gènes réprimés dans les Vignes sur-exprimant *VvWRKY1* sont impliqués dans la photosynthèse. Ces résultats laissent supposer un rôle de *VvWRKY1* dans la régulation de ces processus liés à la lumière.

L'identification de boîtes de régulation par des **hormones**, mais également par certains **stress environnementaux** (déshydratation, froid, étiolement), n'est pas particulièrement surprenante. *VvWRKY1* est un gène qui est exprimé différenciellement au cours du développement mais également lors de stress (cf. Article Partie 1). Par ailleurs, de nombreux gènes WRKY sont régulés par la température, la déshydratation, l'ABA ou l'acide gibbérellique (Huang *et al.*, 2002, Rizhsky *et al.* 2002, Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003, Marè *et al.*, 2004, Xie *et al.* 2004, Zou *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2004).

Le nombre de séquences correspondant à des boîtes W est relativement élevé dans cette région promotrice puisqu'on en trouve 5 dans cette séquence de moins de 700 paires de bases correspondant à une partie de la région promotrice et à la séquence 5'UTR.

Comme nous l'avons décrit dans l'analyse bibliographique qui introduit ce manuscrit, les boîtes W sont relativement fréquentes, avec une distribution théorique de 2,1 boîtes par séquence de 1,1 kb (Maleck *et al.*, 2000). Cependant leur proportion est bien plus élevée dans les promoteurs des gènes liés à la défense. Ainsi, dans le régulon du gène *PRI*, qui contient 31 gènes présentant un même profil d'expression lors de la SAR (quelque soit l'inducteur), la recherche d'éléments *cis* communs parmi les 26 promoteurs disponibles montre une forte représentation des boîtes W, en moyenne 4,3 boîtes W pour 1,1 kb. De plus, bien qu'une seule boîte W puisse suffire pour la fixation d'une protéine WRKY, ces éléments sont souvent arrangés sous forme de petits groupes, nombreuses et plutôt rapprochées (Robatzek et Somssich, 2002). Ainsi, les mécanismes de la résistance systémique acquise sont dépendants de la régulation de gènes contenant dans leurs promoteurs de nombreuses boîtes W.

La présence de ces 5 boîtes W dans le promoteur de *VvWRKY1* constitue un argument supplémentaire quant à l'implication potentielle de ce facteur de transcription WRKY dans les défenses de la plante, mais elle suggère surtout une régulation de ce gène par des protéines WRKY.

Peu d'études ont été menées sur les promoteurs de gènes codant des protéines WRKY. On retrouve ainsi la présence de plusieurs boîtes W dans les promoteurs des gènes *PcWRKY1*, *AtWRKY54* et *AtWRKY6* (Eulgem *et al.*, 1999, Robatzek et Somssich, 2001, Robatzek et Somssich, 2002, Kalde *et al.*, 2003). L'analyse de délétions de ces promoteurs ont montré que ces boîtes sont nécessaires et indispensables à l'induction de la transcription par les pathogènes ou des éliciteurs. *AtWRKY6* présente un cas un peu particulier. Son promoteur contient deux boîtes W relativement distantes (-834 et -1114 pb en amont du site d'initiation de la transcription), mais ce sont 3 boîtes *as-1*, contenant un "cœur" TGAC, situées dans les 175 paires de bases avant le point +1, qui sont responsables de l'induction de ce gène par des souches virulentes et avirulentes de *P. syringae* (Robatzek et Somssich, 2001). Ces boîtes *as-1* sont généralement considérées comme les séquences de fixation des facteurs TGA (Zhang *et al.*, 1999).

De plus, Dong *et al.* 2003 ont montré que la fréquence des boîtes W dans les promoteurs de gènes *WRKY* est nettement plus élevée dans ceux qui sont eux-mêmes régulés par des protéines WRKY : en moyenne 5,11 boîtes W de type TTGAC et 2,92 boîtes TTGACC/T pour les 49 gènes régulés par des protéines WRKY dans cette étude contre respectivement 3,04 et 1,27 pour les non régulés par les protéines WRKY. Par contre, en ce qui concerne les séquences *as-1*, leur fréquence

dans les promoteurs régulés ou non par les protéines WRKY est plus faible que la fréquence statistique théorique.

Toutefois, dans le promoteur de *VvWRKY1*, nous ne retrouvons pas d'arrangements particuliers de ces boîtes W comme cela a pu être décrit : séquences répétées et relativement proches (séquences en tandem dans le même sens ou inversées et espacées de 4 à 7 bases). La présence de ces boîtes W va cependant bien dans le sens d'une régulation de l'expression de *VvWRKY1* lors de réponses de défense, comme nous l'avons mis en évidence dans la partie 1.

Dans la séquence promotrice de *VvWRKY1*, nous avons remarqué la **présence d'une boîte GCC** qui permet la fixation de facteurs de transcription de type ERF impliqués dans la régulation par l'éthylène. Cette observation est à rapprocher des résultats d'étude d'expression du gène *VvWRKY1* effectuée à partir de feuilles de Vigne traitées par l'éthéphon (précurseur de l'éthylène) (cf. Article Partie 1) montrant une accumulation des transcrits de *VvWRKY1*. Ces deux résultats vont dans le même sens et suggèrent la régulation de *VvWRKY1* par un facteur ERF potentiellement grâce à cette boîte GCC.

Une séquence régulatrice GCC est également présente dans le promoteur du gène *PcWRKY1* en position -134, avant le site initiateur de la transcription (Eugelm *et al.*, 1999). Ce promoteur de *PcWRKY1* est aussi activé en présence d'éthylène dans des plantes d'*Arabidopsis* transformées avec une construction promoteur::GUS (Robatzek et Somssich, 2001).

L'expression transitoire dans des protoplastes de Tabac révèle la fonctionnalité de cette séquence promotrice de *VvWRKY1*.

Les expériences d'expression transitoire ont montré que cette séquence isolée de 671 pb présente tous les éléments nécessaires à l'activation de la transcription d'un gène rapporteur dans des protoplastes de Tabac.

Cependant, **nous n'avons pas mis en évidence, dans ce système, de phénomène d'auto-régulation de la transcription de *VvWRKY1***. La présence de boîtes W dans ce promoteur suggérait pourtant un tel mécanisme. Le processus d'auto-régulation des gènes WRKY a déjà été mis en évidence. Il peut s'agir d'une auto-régulation positive comme cela a été démontré pour *AtWRKY29* (Asai *et al.*, 2002) ou négative pour *AtWRKY6* et *AtWRKY53* (Robatzek et Somssich, 2002, Miao *et al.*, 2004).

Par ailleurs, la mise en œuvre de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine a permis à Turck *et al.* (2004) de mettre en évidence la fixation *in vivo* de *PcWRKY1* sur son propre promoteur après élicitation de cellules de persil. Ils ont également montré la présence constitutive de protéines WRKY sur ce promoteur. D'autres résultats tendent également à montrer la régulation

de certains gènes *WRKY* par des protéines de la même famille. Ainsi, *AtWRKY53* est capable de réguler sa propre expression mais également celle de *AtWRKY6* (Miao *et al.*, 2004), *AtWRKY22* peut activer la transcription de *AtWRKY29* (Asai *et al.*, 2002).

Ainsi, bien que la protéine *VvWRKY1* ne semble pas capable de contrôler la transcription de son propre gène dans les protoplastes de Tabac, les résultats de Turck *et al.* (2004) décrivant que l'autorégulation de *PcWRKY1* n'a lieu qu'en présence d'un éliciteur fongique, nous permettent d'envisager un tel mécanisme pour *VvWRKY1*. Dans tous les cas, la présence des 5 boîtes W suggère un contrôle de la transcription de *VvWRKY1* par d'autres protéines *WRKY*.

La région promotrice de *VvWRKY1* n'est pas fonctionnelle dans les protoplastes de Persil

Afin d'étudier l'éventuelle aussi de cette séquence promotrice par un éliciteur, des expériences d'expression transitoire ont été réalisées dans des protoplastes de Persil soumis à une élicitation par un mélange d'éliciteurs fongiques Pmg. Les résultats ont révélé **une très faible activité glucuronidase dans les protoplastes de Persil qu'ils soient ou non traités par l'éliciteur**. Il semblerait que ce modèle ne convienne pas à l'étude de séquence régulatrice de Vigne, puisque ni le promoteur de *VvWRKY1* ni celui de *VvWRKY2* (autre gène *WRKY* identifié chez la Vigne par notre équipe) ne permettent l'expression du gène *GUS*. Ces résultats seraient sans doute dus à l'utilisation d'un système hétérologue très éloigné de la Vigne.

Toutefois, une autre hypothèse peut être avancée. Il se peut que le promoteur de *VvWRKY1* puisse être fonctionnel dans ce système mais qu'en conditions non élicitées, il présente un niveau d'expression basal très faible. D'autre part, cet éliciteur Pmg n'est peut-être pas capable d'activer cette séquence promotrice bien qu'il active fortement celle de *PcPRI* et de *PcWRKY1*. Ce système n'est donc pas adapté pour étudier les différents éléments régulateurs de *VvWRKY1*.

Conclusion générale et perspectives

Le laboratoire "Génomique fonctionnelle et qualité de la baie de raisin" qui m'a accueillie pour effectuer mon travail de recherche s'intéresse aux gènes exprimés lors du développement de la baie de raisin et plus particulièrement aux facteurs de transcription. L'une des thématiques du laboratoire concerne l'identification et la caractérisation fonctionnelle de protéines régulatrices des mécanismes de défense de la Vigne.

Dans une approche gène-candidat, le laboratoire s'est intéressé aux protéines de type WRKY. Aucun travail à notre connaissance n'avait encore jamais été réalisé sur les facteurs de transcription de type WRKY chez la Vigne. Aussi, le clonage d'ADNc codant des facteurs de transcription WRKY a été initié à partir d'une banque d'ADNc de baie de raisin au stade véraison. Une séquence, nommée *VvWRKY1*, codant une protéine présentant de fortes homologies avec les membres de cette famille a été identifiée. Les travaux de recherche de ma thèse ont eu pour objectif la caractérisation fonctionnelle de cet ADNc.

Dans un premier temps, après avoir vérifié la fonctionnalité de la protéine, traduite par sa capacité à se lier à l'ADN spécifiquement au niveau des boîtes W, l'étude de l'expression de ce gène chez la Vigne a été réalisée au cours du développement de la baie de raisin et des feuilles, et en conditions de stress. Les résultats ont révélé que *VvWRKY1* est fortement régulé au cours du développement de la Vigne. De plus, des molécules de stress comme l'acide salicylique, l'éthylène, le peroxyde d'hydrogène induisent son expression dans les feuilles de Vigne alors que l'acide jasmonique la réprime.

Dans le but de compléter l'analyse des processus mettant en jeu l'activation transcriptionnelle de *VvWRKY1*, nous avons identifié une partie de la séquence promotrice de *VvWRKY1*. Des analyses préliminaires ont permis de valider la fonctionnalité de cette séquence et de montrer que dans des protoplastes de Tabac non élicités, la protéine *VvWRKY1* n'est pas capable de réguler la transcription de son propre gène.

D'autre part, l'analyse fonctionnelle de *VvWRKY1* a été entreprise par sur-expression dans deux systèmes hétérologues (Tabac et *Arabidopsis thaliana*) puis chez la Vigne. L'ensemble des résultats observés dans ces trois organismes suggère une réelle implication de ce facteur de transcription dans les mécanismes de défense de la plante vis-à-vis des champignons pathogènes. Effectivement, dans ces trois modèles, une sensibilité différentielle est observée en réponse à une attaque par un champignon ; pour les Tabacs et les Vignes transformées, il s'agit une tolérance accrue alors que

pour *Arabidopsis*, on note une sensibilité plus forte des lignées transgéniques. Cette différence de comportement pourrait être expliquée par le fait que le gène homologue de *VvWRKY1* chez *Arabidopsis* est fortement réprimé dans les plantes transformées. Quoi qu'il en soit, la sur-expression de *VvWRKY1* modifie les défenses mises en place par la plante pour se défendre contre les infections par des champignons.

Cependant, les mécanismes sous-jacents n'ont pas encore été identifiés. Dans ces plantes transformées, l'expression de plusieurs gènes *PR* est parfois modifiée mais jamais de façon corrélée au niveau d'expression du transgène. Des expériences d'hybridation sur puces à ADN comparant les Vignes transgéniques et les Vignes sauvages ont notamment permis d'identifier deux gènes codant des lipoxygénases, ce qui suggère une relation de *VvWRKY1* avec la voie de signalisation de l'acide jasmonique. Toutefois, la plupart des gènes régulés par *VvWRKY1* montrent une répression de leur expression dans les Vignes transformées.

Ainsi, *VvWRKY1* apparaît comme un gène impliqué dans la mise en place des mécanismes de défense de la Vigne contre les attaques par des champignons phytopathogènes.

Ces travaux de recherche ont également permis de mettre en place les différents outils nécessaires à l'étude précise du facteur de transcription *VvWRKY1* (construction de vecteurs, identification d'une partie de la région promotrice de ce gène, plantes sur-exprimant *VvWRKY1*). Des analyses complémentaires restent encore nécessaires pour mieux appréhender le mode d'action de cette protéine.

Analyses des plantes sur-exprimant VvWRKY1

La sur-expression de gènes codant des lipoxygénases, enzymes intervenant dans la synthèse de l'acide jasmonique, chez les Vignes transgéniques, ouvre une piste intéressante. Le rôle de ces enzymes dans la résistance à *Phytophthora parasitica* a en effet été précédemment démontré chez le Tabac (Rancé *et al.*, 1998). La mesure des teneurs endogènes en acide jasmonique mais également en autres "molécules signal" permettra d'apporter des éléments complémentaires quant au rôle de *VvWRKY1* dans ces différentes voies de signalisation.

Les concentrations en SA (libre et conjugué), JA et éthylène ont été mesurées dans des plantes d'*A. thaliana* sur- ou sous-exprimant *AtWRKY70* (Li *et al.*, 2004). Aucune différence significative du niveau basal de ces 3 composés n'a été mise en évidence. Seul, le contenu en glycoside de salicylate conjugué est clairement réduit dans les plantes surexprimant *AtWRKY70*. Les auteurs suggèrent que la résistance aux pathogènes n'est donc pas liée à une modification de l'équilibre hormonal SA/JA/éthylène. La surexpression d'*AtWRKY18* (Chen *et Chen*, 2002) ne révèle pas non

plus de modification d'accumulation de l'acide salicylique entre les plantes transformées et les plantes sauvages. Toutefois, le dosage de ces composés en condition d'infection pourrait éventuellement révéler des comportements différents chez les plantes transgéniques.

Cependant, si les résultats confirmaient l'implication de VvWRKY1 dans la voie de signalisation de l'acide jasmonique, il sera intéressant de suivre le niveau d'expression des gènes de défense dépendant cette voie dans les plantes transgéniques.

En parallèle, afin de compléter les analyses de transcriptome des Vignes transformées, il sera nécessaire de réaliser de nouvelles hybridations d'ADNc sur puces à ADN à partir des Vignes transgéniques et des Vignes sauvages infectées par un agent pathogène.

Il est en effet établi que la régulation de la transcription des gènes fait intervenir une combinatoire complexe de facteurs de transcription. Ainsi, le rôle de protéines régulatrices partenaires de VvWRKY1 induites lors du processus de réponse à l'infection ne pourra être pris en compte que dans ce cadre. De plus, la régulation de l'activité des WRKY peut, dans certains cas, nécessiter l'intervention de phénomènes de phosphorylation eux-mêmes activés lors de la réponse de la plante.

Les gènes-cibles de VvWRKY1 ne pourront donc probablement être identifiés qu'en condition d'infection.

En parallèle, les résultats intéressants apportés par les puces à ADN devront être validés par des expériences de RT-PCR ou de Northern blot.

Par ailleurs, dans le but de valider ou d'infirmer le fait que VvWRKY1 n'est vraisemblablement impliqué que dans les réponses aux pathogènes fongiques, des infections par d'autres agents pathogènes que le mildiou devront être réalisées sur ces Vignes transformées (par d'autres champignons mais aussi des agents bactériens et viraux).

Finalement, une étude concernant la protéine VvWRKY1 pourra être envisagée de manière à comprendre comment ce facteur de transcription agit lors de la régulation de la transcription de gènes cibles. Cela permettra de savoir si elle est activée par des phosphorylations directes, si elle interagit avec des partenaires protéiques, si elle se dimérise,...

Perspectives concernant l'étude du promoteur de VvWRKY1

Pour la suite du travail concernant l'étude du promoteur de VvWRKY1, il sera intéressant dans un premier temps, de mettre au point un protocole complet de transformation transitoire des protoplastes de Vigne de façon à effectuer une étude en système homologue. Ce système

d'expression transitoire permettra d'étudier la régulation de *VvWRKY1* en réponse à différents stress biotiques, abiotiques, à différentes molécules ou hormones. On s'affranchit ici des nombreuses variations d'expression que nous avons observées dans la plante notamment en fonction de son développement. Ce système est sans doute plus homogène même s'il ne traduit pas tout à fait la réalité physiologique de la plante. Il permet également d'aborder l'effet régulateur de différentes protéines grâce à la co-transformation de différentes constructions plasmidiques dans les protoplastes. Ce type d'expériences réalisées *in vivo* fournira des informations très importantes concernant les protéines régulatrices des gènes *WRKY*.

Par ailleurs, l'étude du promoteur de *VvWRKY1* pourra également se faire de manière complémentaire par transformation stable chez la Vigne. Les plantes exprimant un gène rapporteur sous contrôle du promoteur *VvWRKY1* seront des outils importants pour connaître la localisation de l'expression au cours du temps et en réponse à un stress : développement de la plante, blessure, infection par des agents pathogènes ou stress abiotiques (sécheresse, froid, sels,...).

L'effet de délétions en 5' sur l'activation ou de la répression de l'activité du promoteur selon les stress subis par la plante permettra d'identifier les différents éléments *cis* régulateurs. Effectivement, Kalde et al. (2003) ont démontré que la régulation d'*AtWRKY54* par l'acide salicylique ou par *Peronospora parasitica* s'effectue grâce à différentes régions du promoteur de ce gène bien qu'au niveau de boîtes W (TGAC ou TTGACC/T). Les auteurs suggèrent donc que aussi par l'acide salicylique et par un agent pathogène est liée à la fixation de facteurs *WRKY* distincts sur des boîtes W particulières.

Au-delà de l'intérêt fondamental pour la compréhension de mécanismes de défense, cette étude s'inscrit également dans une optique plus large qui est la lutte au vignoble contre les maladies de la Vigne. L'intérêt des gènes *WRKY* comme marqueurs moléculaires vient récemment d'être rapporté par Borrone *et al.* (2004). Il note que cette famille de gènes possède deux caractéristiques intéressantes : la première est qu'ils contiennent un grand domaine très conservé et qu'un couple d'amorces dégénérées peut amplifier différents gènes *WRKY* ; la seconde raison est que leurs différents allèles comportent de multiples SNP (single nucleotid polymorphisms). Aussi, les recherches doivent être développées sur ces facteurs de transcription pour éventuellement contribuer au travail des sélectionneurs. Par ailleurs, la recherche de molécules élicitrices pouvant activer la transcription de gènes *WRKY* capables de contrôler la résistance des plantes présente un intérêt certain et les travaux devront être poursuivis dans ce sens.

Références bibliographiques

-
- Abeles FB**, 1992. Ethylene in plant biology. 2nd edition, New York, Academic press.
- Adam A, Farkas T, Hevesi M, Kiraly Z**, 1989. Consequences of O₂⁻ generation during bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco : deterioration of membrane lipids. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 34: 13-26.
- Aharon GS, Gelli A, Snedden WA, Blumwald E**, 1998. Activation of a plant plasma membrane Ca²⁺ channel by TGa1, a heterotrimeric G protein alpha-subunit homologue. *FEBS Lett* 424 : 17-21.
- Andreasson E, Jenkins T, Brodersen P, Thorgrimsen S, Petersen NH, Zhu S, Qiu JL, Micheelsen P, Rocher A, Petersen M, Newman MA, Bjorn Nielsen H, Hirt H, Somssich I, Mattsson O, Mundy J**, 2005. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J* 24(14) : 2579-89.
- Antoniw JF, Dunkley AM, White RF, Wood J**, 1980. Soluble leaf proteins of virus-infected tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultivars. *Biochem Soc Trans.* 8(1) : 70-1.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen** 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415 : 977-83
- Asif MH, Dhawan P, Nath P**. 2000. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Mol Biol Rep* 18: 109-115
- Aziz A, Heyraud A, Lambert B**, 2004. Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*. 218 (5): 767-74.
- Aziz A, Poinssot, B, Daire X, Adrian M, Bezier A, Lambert B, Joubert J.M, and Pugin, A**, 2003. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol Plant Microbe Interact.* 16 : 1118-1128.
- Beere HM**, 2001. Stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. *Sci STKE*. 31 : 2001(93).
- Bevan M.W**, 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acid Res.* 12 : 22.
- Blume B, Nurnberger T, Nass N, Scheel D**, 2000. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*. 12(8):1425-40.
- Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Blein J.P, Ricci P**, 1996. Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 102 : 181-192.
- Borrone JW, Kuhn DN, Schnell RJ**, 2004. Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. *Theor Appl Genet.* 109(3) : 495-507.
- Bostock RM, Ku C JA, and Laine RA**, 1981. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science* 212 : 67-69.
- Botti MG, Taylor MG, Botting NP**, 1995. Studies on the mechanism of myrosinase. Investigation of the effect of glycosyl acceptors on enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 270: 20530-20535.
- Bowyer P, Clarke BR, Lunness P, Daniels MJ, Osbourn AE**, 1995. Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science* 267: 371-374
- Bradford M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

- protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Breiteneder H, Pettenburger K, Bito A, Valenta R, Kraft D, Rumpold H, Scheiner O, Breitenbach M**, 1989. The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* 8(7) : 1935-8.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL**, 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants.* American Society of Plant Biologists, , Rockville, USA.
- Busam G, Kassemeyer H-H and Matern U**, 1997. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiology* 115: 1029–1038
- Chakravarthy S, Tuori RP, D'Ascenzo MD, Fobert PR, Despres C, and Martin GB**, 2003. The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell* 15 : 3033-3050.
- Chandra S, Heinsteint PF, Low PS**, 1996. Activation of Phospholipase A by Plant Defense Elicitors. *Plant Physiol.* 110(3):979-986.
- Chandra S, Stennis M, Low PS**, 1997. Measurement of Ca²⁺ fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J Biol Chem.* 7;272(45) : 28274-80.
- Chen C and Chen Z**, 2000. Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol Biol* 42(2) : 387-96.
- Chen K, Du L, Chen Z**, 2003. Sensitization of defense responses and activation of programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinase in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 53(1-2) : 61-74.
- Chen W, Provart N, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Zou G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z**, 2002. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell.* 14 : 559–574.
- Chen Z, Klessig D**, 1991. Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease-resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 8179–83.
- Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sanchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J, Klessig DK**, 1995. Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9;92(10) : 4134-7.
- Chen Z, Silva H, Klessig DF**, 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science.* 262(5141) : 1883-6.
- Chen C and Chen Z**, 2002. Potentiation of Developmentally Regulated Plant Defense Response by AtWRKY18, a Pathogen-Induced *Arabidopsis* Transcription Factor. *Plant Physiol.* 129(2) : 706-716.
- Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, and Wan Y**, 1997. Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* *Plant Physiol.* 115: 971-980.
- Cheong YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S**, 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129(2) : 661-77.
- Clarke JD, Volko SM, Ledford H, Ausubel FM, Dong X**, 2000. Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in *cpr*-induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12 : 2175–90
- Clough SJ, and Bent AF**, 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16 : 735-743.

- Cohen Y, Reuveni M, Baider A**, 1999. Local and systemic activity of BABA (DL-3-aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevine. *European journal of plant pathology* 105 : 351-361.
- Commun K, Mauro MC, Chupeau Y, Boulay M., Burrus M, Jeandet P**, 2003. Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiology and Biochemistry* 41 : 317–323.
- Coombe BG**, 1992. Research on development of the grape berry. *Am. J. Vit.* 43 : 101-110.
- Cormack RS, Eulgem T, Rushton PJ, Kochner P, Hahlbrock K, Somssich IE**, 2002. Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochim. Biophys. Acta* 1576 : 92–100
- Coutos-Thévenot P, Goebel-Tourand I, Mauro MC, Jouanneau JP, Boulay M, Deloire A, Guern J**, 1992. Somatic embryogenesis from grapevine cells. I. Improvement of embryo development by changes in culture conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29 : 125-133.
- Coutos-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 PR10 promoter. *J. Exp. Bot.* 52 : 901-910.
- Creasy LL, and Coffe M**, 1988. Phytoalexin production potential of grape berries. *Journal of American Society of Horticultural Science* 113 : 230-234.
- Dangl JL and Jones JDG**, 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to pathogens, *Nature* 411 : 826-833.
- Davies C and Robinson SP**, 2000. Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol* 122(3) : 803-12.
- Dellagi A., Helibronn J, Avrova AO, Montesano M, Palva ET, Stewart HE, Toth IK, Cooke DE, Lyon GD, Birch PR**, 2000. A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Mol Plant Microbe Interact.* 13(10) : 1092-101.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB**, 1983. A plant DNA mini-preparation: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1 : 19–21.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C**, 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 8 : 394-585.
- Derck W and Creasy LL**, 1989. The significance of stilbene of phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Biol.* 34 : 189-202.
- Derkel JP, Legendre L, Audran JC, Hays B and Lambert B**, 1996. Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Sci* 119 : 31–37.
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounloham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y**, 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(13) : 8024-9.
- Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y**, 2002. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(4) : 2404-9.

- Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Can C, Williams K, Holub E, Beynon J, Arlat M, Marco Y**, 1998. Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 11(7) : 659-67.
- Després C, DeLong C, Glaze S, Liu E and Fobert PR**, 2000. The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12 : 279–290.
- Devoto A et Turner JG**, 2003. Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Annals of Botany* 92 : 329-337.
- Di Gaspero G and Cipriani G**, 2002. Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). *Theor Appl Genet* 106 : 163–172.
- Donald TM, Pellerone F, Adam-Blondon A-F, Bouquet A, Thomas MR, Dry I**, 2002. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theor Appl Genet* 104 : 610 –618.
- Dong H, Delaney TP, Bauer SV**, 1999. Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. *Plant J.* 20 : 207-215.
- Dong J, Chen C, Chen Z**, 2003. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol* 51 : 21-37.
- Dong X**, 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 : 316–23.
- Dong X**, 2004. NPR1, all things considered *Curr Opin Plant Biol.* 7(5) : 547-52.
- Du H and Klessig DF**, 1997. Identification of a soluble high-affinity salicylic acid binding protein in tobacco. *Plant Physiol.* 113 : 1319–27.
- Du L and Chen Z**, 2000. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA- binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J* 24(6) : 837-47.
- Dubos B**, 1992. Biological control of *Botrytis*: state of the art. pp. 169-178 in Verhoeff, K., Malathrakis, N.E. and Williamson, B. (eds), *Recent advances in Botrytis research*. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen.
- Dubos B**, 2002. *Les maladies cryptogamiques de la Vigne*. Feret Ed.
- Dumas B, Freyssinet G, Pallett KE**, 1995. Tissue-Specific Expression of Germin-Like Oxalate Oxidase during Development and Fungal Infection of Barley Seedlings. *Plant Physiol.* 107(4): 1091-1096.
- Ebel J and Scheel D**, 1997. Signals in host-parasite interactions. In *The Mycota-Vol V, plant relationships*, Part A. Ed. Carrol GC, Berlin, Springer Verlag, 85-105.
- Eckey C, Korell M, Leib K, Biedenkopf D, Jansen C, Langen G, Kogel KH**, 2004. Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Mol Biol.* 55(1) : 1-15.
- Edwards K, Johnstone C, and Thompson C**, 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acid Res* 19 : 1349.
- Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P, Raskin I**, 1992. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell.* 70(6) : 879-86. Review.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE**, 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5 : 199–206.
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE**, 1999. Early nuclear events in plant defence signalling rapid activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* 18 :

- 4689–99.
- Fan W, Dong X**, 2002. In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14 : 1377–89.
- Farmer E, Moloshok TD, Saxton MJ and Ryan CA**, 1991. Oligosaccharide signaling in plants. Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation J.
- Felix G, Duran J, Volko S, Boller T**, 1999. Plants have a sensitive perception for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18 : 265-276.
- Flor H H**, 1956. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8:29-54.
- Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H and Ohme-Takagi M**, 2000. *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* 12 : 393–404.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessman H, Ryals J**, 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261 : 754-756.
- Galet P**, 1993. Précis de viticulture. Imprimerie Dehan, Montpellier, 582 p.
- Ge X, Chen J, Li N, Lin Y, Sun C, Cao K**, 2003. Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. *J Biochem Mol Biol.* 36(6): 603-7.
- Genoud T, Buchala AJ, Chua NH, Metraux JP**, 2002. Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 31 : 87–95.
- Gomes E, Sagot E, Gaillard C, Laquitaine L, Poinssot B, Sanejouand YH, Delrot S, Coutos-Thevenot P.**, 2003. Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cells in response to fungal elicitor treatments. *Mol Plant Microbe Interact.* 16(5): 456-64.
- Gomez-Gomez L, Boller T**, 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell.* 5(6): 1003-11.
- Goodman RN, Novacky AJ**, 1994. The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens, A Resistance Phenomenon. St.Paul, MN: APS Press.
- Gu YQ, Wildermuth MC, Chakravarthy S, Loh YT, Yang C, He X, Han Y, Martin GB**, 2002. Tomato transcription factors *pti4*, *pti5*, and *pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 14(4) : 817-31.
- Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH**, 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci* 89(6) : 2389-93.
- Gutterson N and Reuber TL**, 2004. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(4) : 465-71.
- Hahlbrock K, Scheel D, Logemann E, Nurnberger T, Parniske M, Reinold S, Sacks WR, Schmelzer E**, 1995. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(10) : 4150-7. Review.
- Hamilton EW, Coleman JS**, 2001. Heat-shock proteins are induced in unstressed leaves of *Nicotiana attenuata* (Solanaceae) when distant leaves are stressed. *Am J Bot.* 88 : 950–955.
- Hara K, Yagi M, Kusano T, Sano H**, 2000. Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Mol Gen Genet* 263(1) : 30-7.
- Hellens R, Edwards EA, Leyland NR, Bean S and Mullineaux PM**, 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation, *Plant Mol. Bio.* 42 : 819-832.
- Heller W and Forkmann G**, 1993. Biosynthesis, in *The Flavonoids. Advances in Research since 1986* (Harborne JB ed) pp 499-535, Chapman and Hall Ltd., London.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M and Korenaga T**, 1999. Plant cis-acting regulatory DNA

- elements (PLACE) database. Nucl Acid Res. 27 : 297-300.
- Hinderhofer K and Zentgraf U**, 2001. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* 213(3) : 469-73.
- Hipskind JD, Paiva NL**, 2000. Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 13(5) : 551-62.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA**, 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-Plasmid. *Nature* 303 : 179-180.
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS and Hoekema A**, 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgen. Res.* 2 : 208-218.
- Hoos G and Blaich R**, 1990. Influence of resveratrol on germination of conidia and myceliagrowth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *Phytopathol.* 129 : 102-110.
- Horsch RB, Fry JE, Eichlotz D, Rogers SG, and Frakey RT**, 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227 : 1229-1231.
- Hu X, Neill SJ, Cai W, Tang Z**, 2003. Nitric oxide mediates elicitor-induced saponin synthesis in cell cultures of *Panax ginseng*. *Funct Plant Biol* 30 : 901– 7.
- Huang T and Duman JG**, 2002. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Mol Biol.* 48(4) : 339-50.
- Huglin P**, 1986. *Biologie et Ecologie de la Vigne*, Ed Payot Lausanne. Paris. 371 p.
- Hui D, Iqbal J, Lehmann K, Gase K, Saluz HP, Baldwin IT**, 2003. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (lepidoptera, sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. *Plant Physiol.* 131(4) : 1877-93.
- Ishiguro S and Nakamura K**, 1994. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. *Mol Gen Genet.* 244(6) : 563-71.
- Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D**, 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(9):4800-5.
- Jacobs AK, Dry IB and Robinson SP**, 1999. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathol.* 48 : 325-336.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW**, 1987. GUS fusions : b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBOJ.* 6 : 3901-3907.
- Jin H and Martin C**, 1999. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* 41 : 577–585.
- Johnson C, Boden E and Arias J**, 2003. Salicylic Acid and NPR1 Induce the Recruitment of trans-Activating TGA Factors to a Defense Gene Promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(8) : 1846-1858.
- Johnson CS, Kolevski B and Smyth DR**, 2002. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a Trichome and Seed Coat Development Gene of *Arabidopsis*, Encodes a WRKY Transcription Factor. *Plant Cell.* 14(6) : 1359-1375.
- Johnson ET and Dowd PF**, 2004. Differentially enhanced insect resistance, at a cost, in *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing a transcription factor of defensive metabolites. *J Agric Food Chem.* 52(16) : 5135-8.

- Kader JC**, 1996. Lipid-Transfer Proteins in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 : 627-654.
- Kalde M, Barth M, Somssich IE, Lippok B.** 2003. Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signalling pathways. *Plant Mol Microbe Interact.* 16 :295-305.
- Karimi M, Van Montagu M, Gheysen G,** 2000. Nematodes as vectors to introduce *Agrobacterium* into plant roots. *Mol Plant Pathol.* 1(6) : 383-387.
- Kasparovsky T, Blein JP, Mikes V,** 2004. Ergosterol elicits oxidative burst in tobacco cells via phospholipase A2 and protein kinase C signal pathway. *Plant Physiol Biochem.* 42(5) : 429-35.
- Kim CY and Zhang S,** 2004. Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J.* 38 : 142-151.
- Kim CY, Lee SH, Park HC, Bae CG, Cheong YH, Choi YJ, Han C, Lee SY, Lim CO and Cho MJ,** 2000. Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. *Mol Plant Microbe Interact* 13(4) : 470-4.
- Kinkema M, Fan W and Dong X,** 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell* 12 ; 2339–2350.
- Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H.,** 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(16) : 8849-55. Review.
- Klessig DF, Malamy J,** 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol.* 26(5) : 1439-58.
- Koga J, Yamauchi T, Shimura M, Ogawa N, Oshima K, Umemura K, Kikuchi M, and Ogasawara N,** 1991. Cerebrosides a and c, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice. *Plants J. Biol. Chem.* 273 : 31985-93.
- Kosak M,** 1987. At least 6 nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 196, 947-50.
- Kraeva E, Tesniere C, Terrier N, Romieu C, Sauvage F, Bierre J and Deloire A,** 1998. Transcription of a β -1,3-glucanase gene in grape berries in a late developmental period, or earlier after wounding treatment. *Vitis* 37 : 107–111.
- Kranz HD, Denekamp M, Greco R, Jin H, Leyva A, Meissner RC, Petroni K, Urzainqui A, Bevan M, Martin C, Smeekens S, Tonelli C, Paz-Ares J and Weisshaar B,** 1998. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16(2) : 263-76.
- Krisa S, Larronde F, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, Merillon JM,** 1999. Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures : Methyljasmonate induction and ¹³C labelling. *J Nat Prod.* 62 : 1688-1690.
- Kroj T, Rudd JJ, Nurnberger T, Gabler Y, Lee J, Scheel D,** 2003. Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J Biol Chem.* 278(4):2256-64.
- Kuc J, Rush JS,** 1985. Phytoalexins. *Arch Biochem Biophys.* 236(2) : 455-72. Review.
- Kumar D and Klessig DF,** 2003. The high-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity, *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 16101–16106.
- Laemmli UK,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- Lahaye T,** 2002. The *Arabidopsis* RRS1-R disease resistance gene-uncovering the plant's

- nucleus as the new battlefield of plant defense. *Trends Plant Sci.* 7 : 425–27.
- Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y and Reichheld JP**, 2004. The *Arabidopsis* Cytosolic Thioredoxin h5 Gene Induction by Oxidative Stress and Its W-Box-Mediated Response to Pathogen Elicitor. *Plant Physiol.* 134(3) : 1006-1016.
- Lam E, Kato N, Lawton M**, 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411 : 848-852.
- Langcake P**, 1981. Disease resistance of *Vitis spp* and the production of resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiol Mol Plant Pathol* 18 : 213–226.
- Laquitaine L**, 2004. Etude de la régulation et du rôle physiologique du gène Ub-LTP1 : analyse fonctionnelle du promoteur et mise en évidence de facteurs inducteurs. Thèse de doctorat de l'Université de Poitiers.
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals J**, 1995. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8 : 863–70.
- Lebel E, Heifetz P, Thorne L, Uknes S, Ryals J and Ward E**, 1998. Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J* 16 : 223-233.
- Lebrun-Garcia A, Bourque S, Binet MN, Ouaked F, Wendehenne D, Chiltz A, Schaffner A, Pugin A**, 1999. Involvement of plasma membrane proteins in plant defense responses. Analysis of the cryptogein signal transduction in tobacco. *Biochimie.* 81(6):663-8. Review.
- Lee GJ and Vierling E**, 2000. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* 122 : 189–197.
- Lee J and Rudd JJ**, 2002. Calcium-dependent protein kinases: versatile plant signalling components necessary for pathogen defence. *Trends in Plant Science Volume 7, Issue 3* : 97-98.
- Leon J, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ**, 2001. Wound signalling in plants. *J Exp Bot.* 52(354) : 1-9. Review.
- Leroux P, Chapeland F, Desbrosses D, and Gredt M**, 1999. Patterns of cross resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop. Prot.* 18 : 687-697.
- Leroux P, Fritz R, Debieu D, Albertini C, Bach J, Gredt M and Chapeland F**, 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest. Manag. Sci.* 58 : 876-888.
- Li J, Brader G and Palva ET**, 2004. The WRKY70 Transcription Factor: A Node of Convergence for Jasmonate-Mediated and Salicylate-Mediated Signals in Plant Defense. *Plant Cell* 16(2) : 319-331.
- Liu Y, Jin H, Yang KY, Kim CY, Baker B, Zhang S**, 2003. Interaction between two mitogen-activated protein kinases during tobacco defense signaling. *Plant J.* 34 : 149–60.
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP**, 2004. Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* 38(5) : 800-9.
- Lloyd G and Mac Cown B**, 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined proceed-Int. Plant Prop. Soc.* 30 : 421-427.
- Lodhi MA, Ye G, Weeden, NF and Reisch BI**, 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12 : 6-13.

- Lund ST, Stall RE, Klee HJ**, 1998. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell*, 10 : 371 -382.
- Maeo K, Hayashi S, Kojima-Suzuki H, Morikami A and Nakamura K**, 2001. Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(11) : 2428-36.
- Malamy J, Klessig DF**, 1992. Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant J.* 2 : 643-654.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL and Dietrich RA**, 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance, *Nat Genet* 26 : 403-410.
- Mare C, Mazzucotelli E, Crosatti C, Francia E, Stanca AM, Cattivelli L**, 2004. Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. *Plant Mol Biol.* 55(3) : 399-416.
- Martin C and Paz-Ares J**, 1997. MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* 13(2) : 67-73.
- Masih EI, Paul B.**, 2002. Secretion of beta-1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. *Curr Microbiol.* 44(6) : 391-5.
- Mauch-Mani B and Slusarenko AJ**, 1994. Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis thaliana* Induced by a Predisposing Infection with a Pathogenic Isolate of *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7 : 378-383.
- Mauro MC, Deloire A, Coutos-Thévenot P**, 1992. Culture stabilisée d'agrégats cellulaires et procédé de développement d'embryons à partir d'une souche pro-embryogène destinée à la régénération de la Vigne. Brevet Ref: 233627D. 14 156 FT: Dépôt : 12-05-1992/Numéro 92 05724.
- Mauro MC, Toutain S, Walter B, Pinck L, Otten L, Coutos-thevenot P, Deloire A, Barbier P**, 1995. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Science* 112 : 97-106.
- Memelink J, Verpporte R, Kijne JW**, 2001. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci.* 6 : 212-219.
- Meskiene I, Hirt H**, 2000, MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol Biol.* 42(6) : 791-806. Review.
- Mezzetti B, Pandolfini T, Navacchi O, Landi L**, 2002. Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. *BMC Biotechnol.* 2 : 18.
- Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U**, 2004. Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 55(6) : 853-67.
- Monteiro S, Barakat M, Picarra-Pereira MA, Teixeira AR, and Ferreira RB**, 2003. Osmotin and thaumatin from grape: A putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology* 93:1505-1512.
- Morita A, Umemura T, Kuroyanagi M, Futsuhara Y, Perata P, Yamaguchi J**, 1998. Functional dissection of a sugar-repressed alpha-amylase gene (RAmy1 A) promoter in rice embryos. *FEBS Lett.* 423(1) : 81-5.
- Murashige T and Skoog F**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473-477.
- Nimchuk Z, Eulgem T, Holt III BF and Dangl JL**, 2003. Recognition and Response in the Plant Immune System. *Annu. Rev. Genet.* 37 : 579-609.
- Nimchuka Z, Eulgem T, Holt BF and JL Dangl**, 2003. Recognition And Response In The Plant Immune System, *Annu. Rev. Genet.* 37 : 579-609.

- Nitsch JP and Nitsch C**, 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163, 85-87
- Nunan KJ, Davies C, Robinson SP, Fincher GB**, 2001. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta* 214 : 257-264.
- Nurnberger T, Scheel D**, 2001. Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* 6 : 372–379.
- ODonnell P, Calvert C, Atzom R, Wasternack C, Leyser HMO, Bowles DJ**, 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274 : 1914-1917.
- Ohme-Takagi M, Suzuki K, and Shinshi H**, 2000. Regulation of Ethylene-Induced Transcription of Defense Genes *Plant Cell Physiol.* 41 : 1187-1192.
- Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H, Ohme-Takagi M**, 2001. Repression Domains of Class II ERF Transcriptional Repressors Share an Essential Motif for Active Repression. *Plant Cell*, 13: 1959-1968.
- Ohta M, Ohme-Takagi M, Shinshi H**. 2000. Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *Plant J.* 22(1):29-38.
- Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H**, 2000. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol.* 42(3) : 479-88.
- Ollat N**, 1997. Bases physiologiques et anatomiques de la croissance des baies de *Vitis vinifera* cv Cabernet Sauvignon. Thèse de l'École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. 131p.
- Ollat N, Geny L And Soyer JP**, 1998. Les boutures fructifères de Vigne : validation d'un modèle d'étude de la physiologie de la Vigne. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 32 : 1-9.
- Orozco-Cardenas M, McGurl B, Ryan CA**, 1993. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(17) : 8273-6.
- Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H and Kangasjärvi J and Jr**, 2000. The ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell*, 12 : 1849-1862.
- Park CY, Lee JH, Yoo JH, Moon BC, Choi MS, Kang YH, Lee SM, Kim HS, Kang KY, Chung WS, Lim CO, Cho MJ**. 2005. WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Lett.* 28;579(6):1545-50.
- Park JM, Park CJ, Lee SB, Ham BK, Shin R, Paek KH**, 2001. Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell.* 13(5) : 1035-46.
- Pater S, Greco V, Pham K, Memelink J, Kijne J**, 1996. Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* : 24(23) : 4624-31.
- Paul B, Girard I, Bhatnagar T, Boucher P**, 1997. Suppression of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine (*Vitis vinifera*) and its pectinolytic activities by a spoil bacterium. *Microbiol. Res.* 152 : 413-420.
- Paul B**, 2003. Characterisation of a new species of *Pythium* isolated from a wheat field in northern France and its antagonism towards *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of the grapevine. *FEMS Microbiol Lett.* 224(2) : 215-23.
- Pauquet J, Bouquet A, This P, Adam-Blondon A-F**, 2001. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theor Appl Genet* 103 : 1201-1210.

- Peck SC**, 2003. Early phosphorylation events in biotic stress. *Current Opinion in Plant Biology*, Volume 6, Issue 4 : 334-338.
- Perez L, Rodriguez ME, Rodrigo F and Roson C**, 2003. Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora Hyoscyani* f. sp. *tabacina*. *Crop protection* 22 : 405-413.
- Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U**, 2000. *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103 : 1111-20.
- Pnueli L, Hallak-Herr E, Rozenberg M, Cohen M, Goloubinoff P, Kaplan A, Mittler R**, 2002. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J.* 31(3) : 319-30.
- Pouget R et Delas J**, 1984. Action de la concentration de la solution nutritive sur quelques caractéristiques physiologiques et technologiques chez *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. I. Vigueur, rendement, qualité du moût et du vin. *Agronomie* 4 : 436-442.
- Price SF, Breen PJ, Valladao M, and Watson BT**, 1995. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wines. *Am. J. Enol. Vit.* 46 : 187-194.
- Quackenbush J**, 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics supplement* 32 : 496-501.
- Rajasekhar VK, Lamb C, Dixon RA**, 1999. Early events in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. *Plant Physiol.* 120(4):1137-46.
- Renault AS, Deloire A and Bierne J**, 1996. Pathogenesis-related proteins in grapevine induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Vitis* 35 : 49-52.
- Renault A, Deloire A, Letinois I, Kraeva E, Tesniere C, Ageorges A, Redon C, Bierne J. B**, 2000. -1,3-glucanase gene expression in grapevine leaves as a response to infection with *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and Viticulture.* 51(1) : 81-87.
- Reymond P, Farmer EE**, 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol.* 1 : 404-411.
- Rizhsky L, Liang H and Mittler R**, 2002. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiol.* 130(3) : 1143-1151.
- Rizhsky, L, Davletova S, Liang H and Mittler R**, 2004. The Zinc Finger Protein Zat12 Is Required for Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Expression during Oxidative Stress in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 279(12) : 11736-11743.
- Robatzek S, Somssich IE**, 2001. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defense-related processes. *Plant J.* 28 : 123-133.
- Robatzek S, Somssich IE**, 2002. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* 16 : 1139-1149.
- Robert N, Ferran J, Breda C, Coutos-Thévenot P, Boulay M, Buffard D, Esnault R**, 2001. Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *pti* : expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *Eur J Plant Pathol* 107 : 249-261.
- Robert N, Roche K, Lebeau Y, Breda C, Boulay M, Esnault R, Buffard D**, 2002. Expression of grapevine chitinase gene in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Sci* 162 : 389-400.
- Robinson SP, Davies C**, 2000. Molecular biology of grape berry ripening. *Aust J grape Wine research* 6 : 175-188.

- Robinson SP, Jacobs AK and Dry IB**, 1997. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiol* 114(3) : 771-8.
- Rocher A, Dumas C, Cock JM**, 2005. A W-box is required for full expression of the SA-responsive gene SFR2. *Gene*. 344 : 181-92.
- Romeis T**, 2001. Protein kinases in the plant defence response. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol 4, Issue 5 : 407-414.
- Ross AF** 1966. Systemic effects of local lesion formation. *In* ABR Beemster, J Dijkstra, eds, *Viruses of Plants*. North-Holland, Amsterdam, 127–150.
- Rowland O and Jones JDG**, 2001. Unraveling regulatory networks in plant defense using microarrays. *Genome Biol.* 2(1) : 1001.1-3.
- Rushton PJ and Somssich IE**, 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 1 : 311-315.
- Rushton PJ, Macdonald H, Huttly AK, Lazarus CM, Hooley R**, 1995. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of alpha-Amy2 genes. *Plant Mol Biol.* 29(4) : 691-702.
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE**, 1996. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PRI* genes. *Embo J.* 15(20) : 5690-700.
- Rushton, PJ, Reinstadler A, Lipka V, Lippok B and Somssich IE**, 2002. Synthetic Plant Promoters Containing Defined Regulatory Elements Provide Novel Insights into Pathogen- and Wound-Induced Signaling. *Plant Cell* 14(4) : 749-762.
- Ryan CA**, 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta.* 7 1477 (1-2) : 112-21. Review.
- Saeed, AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J**, 2003. TM4 : a free, open-source system for micorarrays data management and analysis. *Biotechniques* 34(2) : 374-8.
- Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Relich HA and Arnheim N**, 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of dickle cell anemia. *Science* 230 : 1350-1354.
- Salzman RA, Tikhonova I**, 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol* 117(2) : 465-72.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T**, 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez-Ballesta MT, Lluch Y, Gosalbes MJ, Zacarias L, Granell A, Lafuente MT**, 2003. A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta.* 218(1) : 65-70.
- Schaller A**, 1999. Oligopeptide signalling and the action of systemin. *Plant Mol Biol.* Jul;40(5):763-9. Review.
- Scholz-Starke J, Gambale F, and Carpaneto A**, 2005. Modulation of plant ion channels by oxidizing and reducing agents. 434, 43-50.
- Shirasu K, and Schulze-Lefert P**, 2000. Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44: 371-385.
- Shulaev V, Leon J and Raskin I**, 1995. Is Salicylic Acid a Translocated Signal of Systemic Acquired Resistance in Tobacco. *Plant Cell.* 7(10) : 1691-1701.
- Simon P Robinson, Andrew K Jacobs, and Ian B Dry**, 1997. A class iv chitinase is highly

- expressed in crape berries during ripening. *Plant Physiol.* 114 : 771-778.
- Singh KB, Foley RC and Onate-Sanchez L**, 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 5(5) : 430-436.
- Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, Del Pozo O, Martin GB, Klessig DF**, 2002. The tobacco salicylic acid-binding protein3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 : 11640–45.
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM**, 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem.* 30(2) : 91-113. Review.
- Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai WX, Zhu LH, Fauquet C, Ronald P**, 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science.* 270(5243) : 1804-6.
- Speulman E, Bouchez D, Holub EB, Beynon JL**, 1998. Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 14(4) : 467-74.
- Stafford, H**, 1990. Flavonoid metabolism. (CRC Press).
- Stark-Lorenzen P, Nelke B, Hänssler G, Mühlbach HP, Thomzik JE** 1997. Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L). *Plant Cell Rep* 16:668-673.
- Stockel J**, 1977. Mise au point d'un type de piège sexuel "INRA" pour insectes, 12-14. "Les phéromones de lépidoptères". C.R. Réunion Bordeaux, 13-16 octobre 1977, Publ INRA, 217
- Stockel J, Le charpentier P**, 1993. Amélioration du piégeage sexuel de l'Eudémis. Vers l'emploi de capsules minidosées en Aquitaine. U.G.V.B, 878 : 16.
- Sugimoto K, Takeda S and Hirochika H**, 2000. MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes. *Plant Cell* 12(12) : 2511-2528.
- Sun C, Palmqvist S, Olsson H, Boren M, Ahlandsberg S and Jansson C**, 2003. A Novel WRKY Transcription Factor, SUSIBA2, Participates in Sugar Signaling in Barley by Binding to the Sugar-Responsive Elements of the iso1 Promoter. *Plant Cell* 15(9) : 2076-2092.
- Tamagnone L, Merida A, Parr A, Mackay S, Culianez-Macia FA, Roberts K, and Martin C**, 1998. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* 10 : 135-154.
- Tattersall DB, van Heeswijck R and Hoj PB**, 1997. Identification and characterization of a fruit-specific thaumatin-like protein that accumulates at very high level in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiol* 114 : 759–769.
- Tenhaken R, Levine A, Brisson L, Dixon RA, Lamb C**, 1995. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *P. N. A. S.* 92 : 4158-4163.
- Thomma BP, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP**, 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol.* 13(1) : 63-8. Review.
- Tinland B**, 1996. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci* 1: 178-184.
- Ton P and Mauch-Mani B**, 2004. Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* 38-1 : 119-130.
- Tovar Torres J, Block A, Hahlbrock K and Somssich I E** (1993). Influence of bacterial strain genotype on transient expression of plasmid dna in plant-protoplasts. *Plant J.* 4, 587-592.
- Turck F, Zhou A and Somssich IE**, 2004. Stimulus-Dependent, Promoter-Specific Binding of Transcription Factor WRKY1 to Its Native Promoter and the Defense-Related Gene PcPR1-1 in Parsley. *Plant Cell*: tpc.104.024810.

- Ulker B, Somssich IE**, 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol.* 7(5) : 491-8. Review.
- Vailleau F, Daniel X, Tronchet M, Montillet JL, Triantaphylides C, Roby D**, 2002. A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(15) : 10179-84.
- Valat L, Mode F, Mauro MC, Burrus M**, 2003. Preliminary attempts to biolistic inoculation of grapevine fanleaf virus.: *J Virol Methods.* 108(1) : 29-40.
- Van der Fits L, Memelink J**, 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289 : 295– 7.
- Van Loon LC, Van Kammen A**, 1970. Polyacrilamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun NN II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40:199-211.
- Van Loon LC and Van Strien EA**, 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55 : 85-97.
- Vidal JR, Kikkert JR, Wallace PG, Reisch BI**, 2003. High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) containing npt-II and antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Rep.* 22(4) : 252-60.
- Wendehenne, D, Pugin A, Klessig DF and Durner J**, 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* 6(4) : 177-83.
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D and Shen QJ**, 2004. Annotations and Functional Analyses of the Rice WRKY Gene Superfamily Reveal Positive and Negative Regulators of Abscisic Acid Signaling in Aleurone Cells. *Plant Physiol.* : 104.054312.
- Xu Y, Chang PFL, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM, et al.**, 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6 : 1077–85.
- Xu YH, Wang JW, Wang S, Wang JY, Chen XY**, 2004. Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)- γ -cadinene synthase-A. *Plant Physiol* 135 : 507– 15.
- Yamamoto S, Nakano T, Suzuki K and Shinshi H**, 2004. Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1679(3) : 279-287.
- Yang SH, Berberich T, Miyazaki A, Sano H, Kusano T**, 2003. Ntdin, a tobacco senescence-associated gene, is involved in molybdenum cofactor biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 44(10):1037-44.
- Yang Y, Shah J, and Klessig DF** (1997). Signal perception and transduction in plant disease responses. *Genes Dev.* 11, 1621–1639.
- Yang P and Z Chen**, 2001. A family of dispersed repetitive DNA sequences in tobacco contain clusters of W-box elements recognized by pathogen-induced WRKY DNA-binding proteins. *Plant Science* 161(4) : 655-664.
- Yang P, Chen C, Wang Z, Fan B and Chen Z**, 1999. A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant J* 18 (2) : 141-149.
- Yang S, Sweetman JP, Amirsadeghi S, Barghchi M, Huttly AK, Chung WI and Twell D**, 2001. Novel anther-specific myb genes from tobacco as putative regulators of phenylalanine ammonia-lyase expression. *Plant Physiol* 126(4) : 1738-53.

- Zhang S, Klessig DF**, 2000. Pathogen-induced MAP kinases in tobacco. *Results Probl Cell Differ.* 27 : 65-84. Review.
- Zhang S, Klessig DF**, 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 6(11) : 520-7. Review.
- Zhang Y, Fan W, Kinkema M, Li X and Dong X**, 1999. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 6523–6528.
- Zhang Y, Wang L**, 2005. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol Biol.* 5(1) : 1.
- Zhang ZL, Xie Z, Zou X, Casaretto J, Ho ThD and Shen QJ**, 2004. A Rice WRKY Gene Encodes a Transcriptional Repressor of the Gibberellin Signaling Pathway in Aleurone Cells. *Plant Physiol.* 134(4) : 1500-1513.
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R**, 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv.* 23(4) : 283-333. Review.
- Zhou F, Zhang Z, Gregersen PL, Mikkelsen JD, de Neergaard E, Collinge DB, Thordal-Christensen H**, 1998. Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiol.* 117(1) : 33-41.
- Zimmermann S, Nurnberger T, Frachisse JM, Wirtz W, Guern J, Hedrich R, Scheel D**, 1997. Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(6) : 2751-2755.
- Zou X, Seemann JR, Neuman D and Shen QJ**, 2004. A WRKY Gene from Creosote Bush Encodes an Activator of the Abscisic Acid Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 279(53) : 55770-55779.

Annexes

ANNEXE 1

Milieux de culture bactérienne

Milieu LB (Luria Bertani) liquide :

10 g/l NaCl
10 g/l tryptone
5 g/l extrait de levure

Milieu LB/agar/IPTG/X-Gal :

10 g/l NaCl
10 g/l Bacto-tryptone
5 g/l extrait de levure
15 g/l agar

Après stérilisation par autoclavage, sont ajoutés :

0,5 mM IPTG (solution-stock à 0,1 mM)
80 µg/ml X-Gal (solution-stock à 50 mg/ml dans du DMF)
100 µg/ml Ampicilline (solution-stock à 100 mg/ml)

Milieu YEB :

Saccharose	5 g/l
Bacto-peptone	5 g/l
Extrait de bœuf	5 g/l
Extrait de levure	1 g/l
MgSO ₄	10 mM

Ajuster le pH à 7,2

Composition des solutions

Tampon PCR 10 X:

500 mM Tris-HCl pH 8,3
5 mg/ml BSA
5 % Ficoll
10 % saccharose
300 mM KCl
30 mM MgCl₂
10mM tartrazine

Tampon de stockage de la Taq ADN polymérase :

50 mM Tris HCl pH 7,9
50 mM KCl
0,1 mM EDTA
1 mM DTT
0,5 mM PMSF
50 % glycérol

ANNEXE 2

Séquences des amorces utilisées

Nom	Séquence (5'-3')
W1-3'AS	CATTCGTTCTCAGACACAATA
W1-3'S	GAGAATGATATGGAAAGAGTGG
W1ERS	CCTTTTCCACCAGACATG
W1ERAS	CACATTGCAGTCTTTATACGT
VvEF1-S	GCGGGCAAGAGATACCTCAA
VvEF1-AS	TCAATCTGTCTAGGAAAGGAAG
VvPR1S	CGTCTTGGGTGCGCTAGGGTT
VvPR1AS	AGGTACACATTTATTAGACTTGG
VvPR2S	GCACTCGCATCAGCAGGC
VvPR2AS	GTCACTCTTGAGGGATTC
VvPR3S	AACTATGGCGCTGCTGGAAACA
VvPR3AS	CCACATAACTCTTTCTTCCC
NtUbiS	TCCAGGACAAGGAGGGTAT
NtUbiAS	GAGACCTCAGTAGACAAAGC
NtPR1S	CATAACACAGCTCGTGCAGATGTA
NtPR1AS	TGGAGGATCATAGTTGCAAGAGAC
NtPR2S	GCTGATGTCCCACTTTCTTAT
NtPR2AS	TAGCAGTTCTACTTCTCCT
NtPRPS	GTTCTGGATGACACCACAGGAT
NtPRPAS	CGTTTTCACTCGAAGCACCAG
NtPROS	GGAActGCAATTGGACAAGAGCTA
NtPROAS	CGCCTCATATATAGGAGCTATTGG
NtPR4S	AGAGCGCCACAAACGTGAGAT
NtPR4AS	CTAGCTCAGCCCCTTCTTATTC
NtPR8S	GGGGCACTTTCCACTGGCTTATTT
NtPR8AS	TAGCAGAGCTATAACCATTGTC
AtPR1S	CTTGTGGGTGCTCTTGTTGTT
AtPR1AS	TCACGTCCTTTGTGCAGGTCC
AtPR2S	ACGGGAAACATGCGAGACATC
AtPR2AS	CAAGTCATTTATCTCATATCGC
AtNPR1S	AGAGTTGCACTTGCTCAACGT
AtNPR1AS	CACTAAGAGGCAAGAGTCTCA
AtACT4S	TGGCATCACACTTTCTACAATG
AtACT4AS	CTAATATCCACATCACATTTTCAT
AtWRKY75S	CA AAC AAA AAG AGA GGA AC
AtWRKY75AS	CTTCACATTGCATCCTCCATA
35S	GGAAAGGCCATCGTTGAAGA
Nos	TCATCGCAAGACCGGCAACA
ProKpnS	TTAGGTACCGCATTATGGGTGGTA
ProSalAS	TTAGTCGACGAGAGACTGAGAGAGATTG

Numéros d'Accession des gènes étudiés

<u>Gène</u>	<u>Numéro d'accession</u>
<i>VvWRKY1</i>	AY585679
<i>VvEF1γ</i>	AF176496
<i>VvPR1</i>	AY298726
<i>VvPR2</i>	AF239617
<i>VvPR3</i>	VVU97521
<i>NtPR1</i>	X12737
<i>NtPR2</i>	M60460
<i>NtPRP</i>	M29869
<i>NtPRQ</i>	M29868
<i>NtPR4</i>	AF061329
<i>NtPR8</i>	Z11563
<i>NtUbi</i>	U66264
<i>AtPR1</i>	NM127021
<i>AtPR2</i>	M58464
<i>AtNPR1</i>	U76707
<i>AtACT4</i>	U27980
<i>AtWRKY75S</i>	AF452174

RESUME

Afin de résister aux multiples attaques d'agents pathogènes subies par les plantes, celles-ci ont mis en place des mécanismes complexes de défense. Suite à la reconnaissance de l'agent potentiellement infectieux, le déclenchement de voies de signalisation va aboutir à l'activation des facteurs de transcription de manière à réguler l'expression de gènes de défense. Les facteurs de transcription de type WRKY semblent jouer un rôle important dans de nombreuses interactions plantes/pathogènes en activant plus particulièrement la transcription de gènes codant des protéines PR (Pathogenesis Related).

Dans l'objectif de comprendre le rôle de tels facteurs dans les réactions de défense de la Vigne (*Vitis vinifera*) vis-à-vis des agents pathogènes, nous avons identifié un ADNc, *VvWRKY1*, codant une protéine présentant de fortes homologies avec les membres du groupe IIc de cette famille multigénique.

Dans un premier temps, après avoir vérifié la fonctionnalité de la protéine, traduite par sa capacité à se lier à l'ADN spécifiquement au niveau des boîtes W, l'étude de l'expression de ce gène chez la Vigne a été réalisée. Les résultats ont révélé que *VvWRKY1* est fortement régulé au cours du développement de la baie de raisin et des feuilles de Vigne. De plus, des molécules de stress intervenant dans les voies de signalisation comme l'acide salicylique, l'éthylène, le peroxyde d'hydrogène induisent son expression dans les feuilles de Vigne alors que l'acide jasmonique la réprime.

Dans le but de compléter l'analyse des processus mettant en jeu l'activation transcriptionnelle de *VvWRKY1*, nous avons identifié une partie de la séquence promotrice de *VvWRKY1*. Des analyses préliminaires ont permis de valider la fonctionnalité de cette séquence et de montrer que dans des protoplastes de Tabac non élicités, la protéine *VvWRKY1* n'est pas capable de réguler la transcription de son propre gène.

D'autre part, l'analyse fonctionnelle de *VvWRKY1* a été entreprise par sur-expression dans deux systèmes hétérologues (Tabac et *Arabidopsis thaliana*) puis chez la Vigne. L'ensemble des résultats observés suggère une réelle implication de ce facteur de transcription dans les mécanismes de défense de la plante vis-à-vis des champignons pathogènes. Effectivement, dans ces trois modèles, une sensibilité différentielle est observée dans les plantes transgéniques par rapport aux plantes sauvages en réponse à une infection par un champignon. La sur-expression de *VvWRKY1* modifie donc les défenses mises en place par la plante pour se défendre contre les champignons.

Cependant, les mécanismes sous-jacents n'ont pas encore été identifiés. Dans les plantes transformées, l'expression de plusieurs gènes *PR* est parfois modifiée mais jamais de façon corrélée au niveau d'expression du transgène. Des expériences d'hybridation sur puces à ADN comparant les Vignes transgéniques et les Vignes sauvages ont notamment permis d'identifier des gènes potentiellement régulés par *VvWRKY1*.

RESUME

Afin de comprendre le rôle des facteurs de transcription WRKY dans les réactions de défense de la Vigne (*Vitis vinifera*) contre des agents pathogènes, nous avons identifié un ADNc, VvWRKY1, codant une protéine présentant de fortes homologies avec les membres de cette famille multigénique.

Après avoir vérifié la fonctionnalité de la protéine, traduite par sa capacité à se lier à l'ADN spécifiquement au niveau des boîtes W, l'étude de l'expression de ce gène chez la Vigne a été réalisée. *VvWRKY1* est ainsi fortement régulé au cours du développement des feuilles et des baies de raisin. La blessure et des molécules de stress comme l'acide salicylique, l'éthylène, le peroxyde d'hydrogène induisent son expression dans les feuilles de Vigne alors que l'acide jasmonique la réprime.

L'analyse fonctionnelle de VvWRKY1 a été entreprise par sur-expression chez le Tabac, *Arabidopsis thaliana* et la Vigne. Les résultats suggèrent une réelle implication de cette protéine dans la défense contre des champignons pathogènes. Effectivement, une sensibilité différente est observée dans les plantes transgéniques par rapport aux plantes sauvages vis-à-vis de différents champignons. Toutefois, les mécanismes sous-jacents n'ont pas encore été identifiés mais des expériences d'hybridation sur puces à ADN comparant les Vignes transgéniques et les Vignes sauvages ont permis d'identifier des gènes potentiellement régulés par VvWRKY1 dont deux gènes codant des lipoxygénases.

Mots-clés : Facteur de transcription, Défense, Vigne.

In order to understand the function of WRKY transcription factor in defense mechanisms in Grapevine towards pathogens, we identified a full-length cDNA encoding a protein which shares high homology with members of this multigenic family.

After checking the ability of the protein to bind DNA on W boxes, gene expression was studied on grape. *VvWRKY1* gene is regulated during grapeberry and leaves development. Wounding and stress molecules such as salicylic acid, ethylene and hydrogen peroxyde induce its expression in leaves whereas jasmonic acid repress it.

Functional analysis of VvWRKY1 protein was performed by overexpression in tobacco, *Arabidopsis thaliana* and grapevine. Results suggested its real involvement in defense mechanisms against fungal pathogens. Indeed, different susceptibility towards several fungi was observed in transgenic plants compared to wild type plants. Mechanisms underlying its response stay unclear but microarrays experiments comparing transformed grapevines to wild type plants revealed potential target genes of VvWRKY1 transcription factor and particularly two genes encoding lipoxygenases.

Key-words: Transcription factor, defense, Grapevine.