

# Université Bordeaux I

Année 2004

Thèse n° 2839

**THESE**

*pour le*

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 1**

**Mention : Sciences du Vivant, Géosciences, Sciences de l'Environnement**

**Option : Sciences des Aliments**

**Présentée et soutenue publiquement le 12 Juillet 2004**

**par**

**Laurent DELUC**

**Identification et caractérisation fonctionnelle  
de deux gènes régulateurs du métabolisme  
des composés phénoliques de la baie de raisin**

**Membres du Jury :**

**M. Serge DELROT**

**Président**

**M. Mondher BOUZAYEN**

**Rapporteur**

**M. Jean Michel MERILLON**

**Rapporteur**

**M. Bernard GALLOIS**

**Examineur**

**M. François BARRIEU**

**Co-directeur de thèse**

**M. Saïd HAMDI**

**Directeur de thèse**

*A Lisa et Carine.*

## REMERCIEMENTS

*Ce travail a été effectué à l'Unité Mixte de Recherche de Physiologie et Biotechnologie Végétales de l'INRA de Bordeaux dans l'équipe Biologie de la Vigne sous la direction scientifique du professeur Saïd Hamdi.*

*Je remercie vivement Saïd Hamdi pour m'avoir confié ce travail, pour ses encouragements tout au long de ces quatre années de thèses, ses discussions scientifiques ainsi que son soutien permanent dans les moments délicats. Je lui exprime ma plus profonde gratitude.*

*Je remercie chaleureusement Francois Barrieu pour m'avoir initié à la recherche et m'avoir promulgué ses conseils judicieux au cours de mon parcours, aux bons moments passés à parler d'autres choses que de science (Allez le SUA !!!). Encore merci de m'avoir donné la chance de prouver mes compétences. Qu'il trouve ici l'expression de mes plus vifs et sincères remerciements.*

*Je remercie Messieurs Mondher Bouzayen et Jean Michel Mérillon d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je remercie également, messieurs Serge Delrot et Bernard Gallois d'avoir porté un intérêt à mon travail en étant examinateurs de ce manuscrit.*

*Enfin, je voudrais remercier tous les membres de l'équipe biologie de la Vigne. Romain et Chloé, pour leur disponibilité de tous les jours, leur gentillesse. Je leur souhaite bon courage et plein de bonnes choses pour l'avenir. Qu'il trouve en ces mots, mes plus sincères amitiés. Virginie, pour avoir toujours été disponible et m'avoir aidé lors de la rédaction du manuscrit. Claudine, pour sa constante bonne humeur et pour le dernier mais précieux rush des corrections.*

*Rim, qui s'est toujours montrée disponible pour me donner un coup de main. Aux autres membres du laboratoire, je leur adresse un chaleureux coucou.*

*Jean-Pierre Carde pour l'étude cytologique de cette thèse et pour sa patience face à un profane.*

*Linda, pour sa gentillesse et sa disponibilité pendant ces quatre années.*

*Sandrine alias biquette, ta bonne humeur et ton rire me manqueront énormément.*

*Philippe, pour ses conseils scientifiques, qui m'ont permis de prendre un peu de recul par rapport à mon travail.*

*Les autres membres du labo, un grand merci, pour m'avoir supporté.*

*Michel Hernould, qui m'a initié l'hybridation in situ et Isabelle Farbos pour les superbes photos en microscopie à balayage.*

*Philippe Picard pour ses lumières de « structuraliste » en ce qui concerne l'étude du ~~manuscrit~~ de VvMybCs2b.*

*Enfin, tous mes stagiaires, en premier lieu, Mohsen. Qu'il trouve ici, mes plus sincères amitiés.*

*Julie, Mélanie, Caroline, Ivan, qui ont contribué à certains des résultats qui sont présents sur cette thèse.*

*Un grand merci à Pierre Coutos-Thévenot pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et formé à la transgénèse Vigne, et à Christelle Pascal qui après moult péripéties a réussi à régénérer ces fameuses vignes. Qu'il trouve ici mes plus sincères remerciements.*

*J'adresse aussi mes plus vifs remerciements à Alain Decendit pour les études HPLC concernant les anthocyanes et les flavonols ainsi qu'à Laurence Geny qui a contribué aux derniers résultats sur les dosages de tanins.*

*Je tiens enfin à adresser mes plus sincères remerciements au Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux qui a mis à ma disposition les moyens financiers pour réaliser ce travail.*

*Enfin, je ne saurai oublier d'exprimer mon amour et ma reconnaissance à mon épouse qui s'est montrée très compréhensive durant ces quatre années et surtout lors de la rédaction de la thèse, je lui dédie ce mémoire.*

## ABREVIATIONS :

### Unités :

b, pb, kb	base, paires de bases, kilo base
rpm	rotation par minute
cpm	coup par minute
DO	densité optique
°C	degré celsius
nm	nanomètre
µg	microgramme
M	molaire
mM	millimolaire
µM	micromolaire

### Acides nucléiques et nucléotides :

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
T-ADN	Acide désoxyribonucléique transféré
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine 5' triphosphate
DNTP	Désoxynucléoside 5' triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

### Composés chimiques et solution :

KMnO <sub>3</sub>	Permanganate de potassium
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphate, Na <sub>2</sub>
BSA	Sérum Albumine bovine
DEPC	diéthylpyrocarbonate
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
HEPES	Acide N-2 HydroéthylpipérazineN'2 éthane sulfonique sodique
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranoside
LB	milieu de Luria-Bertani
NBT	Nitro-bleu de tétrazolium
PBS	Tampon phosphate salin
PSA	Persulfate d'ammonium
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TBS	Tampon tris salin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'Tétraméthyl-éthylène diamine
Tris	Trihydroxyméthylaminométhane
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D galactoside

Divers :

bHLH	région basique/ Hélice Boucle Hélice
Dnase	Désoxyribonucléase
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
MYB	<b>Myéloblastosis</b> Virus
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
Rnase	Ribonucléase
SDS-PAGE	Electrophorèse SDS en gel de polyacrylamide
UV	Ultra-violet
UFGT	UDP Glucose Flavonoid 3- <i>O</i> -Glucosyltransférase

# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

<i>Partie 1: Situation économique de la Vigne et du Vin.....</i>	<i>1</i>
<i>Partie 2 : Le développement de la baie de raisin. ....</i>	<i>6</i>
<i>Partie 3 : Les flavonoïdes chez les Végétaux.....</i>	<i>15</i>
<i>Partie 4 La régulation transcriptionnelle. ....</i>	<i>25</i>
<i>Partie 5: Les facteurs de transcription de type MYB. ....</i>	<i>34</i>

## RESULTATS

<i>Partie 1 : Identification de clones d'ADNc codant deux facteurs de transcription : VvMybCS1 et VvMybCs2.....</i>	<i>44</i>
<i>Partie 2 : Caractérisation fonctionnelle de VvMybCs1 et VvMybCs2 chez le Tabac. ....</i>	<i>50</i>
<i>Partie 3 : Etude phénotypique de transformants d'Arabidopsis thaliana.....</i>	<i>120</i>
<i>Partie 4 : Analyse d'une série de mutants de Tabac ...</i>	<i>121</i>
<i>Partie 5 : Etude préliminaire d'une éventuelle redondance fonctionnelle entre VvMybCs1 et VvMybCs2.....</i>	<i>127</i>
<i>Partie 6 : Etude de la régulation des gènes VvMybCs1 et VvMybCs2.....</i>	<i>129</i>
<i>Partie 7 : La transgénèse Vigne.....</i>	<i>133</i>

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

<i>Partie 1 : Analyse fonctionnelle de VvMybCs1 et VvMybCs2 .....</i>	<i>134</i>
<i>Partie 2 : Perspectives .....</i>	<i>142</i>

<i>MATERIEL ET METHODES. ....</i>	<i>146</i>
-----------------------------------	------------

<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i>	<i>171</i>
---	------------

# **INTRODUCTION**

## **INTRODUCTION**

<i>Partie 1: Situation économique de la Vigne et du Vin.....</i>	<i>1</i>
<i>1) Quelques données chiffrées.....</i>	<i>1</i>
<i>2) Bénéfices du vin sur la santé.....</i>	<i>2</i>
<i>3) La recherche dans la Vigne.....</i>	<i>3</i>
<i>4) Projet de thèse. ....</i>	<i>4</i>
<i>5) Bilan de la thèse. ....</i>	<i>4</i>
<i>Partie 2 : Le développement de la baie de raisin. ....</i>	<i>6</i>
<i>1) De l'anthèse à la fécondation. ....</i>	<i>6</i>
<i>2) La structure de la baie de raisin. ....</i>	<i>6</i>
<i>3) Croissance et métabolisme de la baie. ....</i>	<i>7</i>
<i>3.a) La phase de développement herbacé. ....</i>	<i>7</i>
<i>3.b) La phase de maturation. ....</i>	<i>8</i>
<i>4) Les composés phénoliques au cours du développement. ....</i>	<i>9</i>
<i>4.a) Un exemple de composés dit non-flavonoïdes, les stilbènes.....</i>	<i>9</i>
<i>4.b) Les composés dit flavonoïdes.....</i>	<i>10</i>
<i>4.b.1) Les anthocyanes.....</i>	<i>10</i>
<i>4.b.1.a) Structure. ....</i>	<i>10</i>
<i>4.b.1.b) Répartition chez la Vigne. ....</i>	<i>11</i>
<i>4.b.2) Les tanins. ....</i>	<i>12</i>
<i>4.b.2.a) Structure. ....</i>	<i>12</i>
<i>4.b.2.b) Répartition chez la Vigne. ....</i>	<i>13</i>
<i>4.b.3) Les flavonols.....</i>	<i>13</i>
<i>4.b.3.a) Structure. ....</i>	<i>13</i>
<i>4.b.3) Répartition chez la Vigne. ....</i>	<i>13</i>
<i>5) Evolution d'autres molécules. ....</i>	<i>14</i>
<i>Partie 3 : Les flavonoïdes chez les Végétaux.....</i>	<i>15</i>
<i>1) Les enzymes majeures de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. ....</i>	<i>15</i>
<i>1.a) Les enzymes communes aux flavonoïdes.....</i>	<i>15</i>
<i>1.b) La Flavonol Synthase (FLS)-enzyme clé de la voie des flavonols. ....</i>	<i>16</i>
<i>1.c) Les enzymes de la voie des anthocyanes. ....</i>	<i>16</i>

1.d) Les enzymes de la voie des tanins condensés. ....	17
1.e) Les Gluthation -S- Transférases. ....	17
2) Rôle global et intérêt des flavonoïdes. ....	18
2.a) Les anthocyanes. ....	18
2.a.1) Fonction biologiques des anthocyanes. ....	18
2.a.2) Métabolisme des anthocyanes. ....	18
2.a.3) Les activités anti-oxydantes des anthocyanes. ....	19
2.a.4) Autres propriétés biologiques. ....	19
2.b) Les flavonols. ....	20
2.b.1) Role biologique. ....	20
2.b.2) Intérêt thérapeutique. ....	20
2.c) Les tanins. ....	21
2.c.1) Rôle biologique. ....	21
2.c.2) Intérêt thérapeutique. ....	21
3) Facteurs influençant la biosynthèse des flavonoïdes chez la baie. ....	22
3.a) La lumière. ....	22
3.b) La température. ....	22
3.c) Les facteurs hydriques. ....	22
3.d) Influence des sucres. ....	22
3.e) Influence des hormones. ....	23
3.f) La nutrition azotée et l'alimentation en phosphate. ....	24
3.g) Accumulation d'anthocyanes suite à un stress biotique ou abiotique. ....	24
Partie 4 La régulation transcriptionnelle. ....	25
1) Généralités. ....	25
2) La chromatine et la régulation transcriptionnelle chez les plantes. ....	26
2.a) L'acétylation des histones. ....	26
2.b) La déacétylation des histones. ....	26
2.c) La méthylation des histones. ....	27
3) Le complexe initiateur de la transcription POL II. ....	27
4) Les facteurs de transcription chez les plantes. ....	28
4.a) Le domaine de fixation à l'ADN. ....	28

4.b) Les domaines d'oligomérisation.....	29
4.c) Le domaine de la régulation transcriptionnelle.....	29
4.d) Le Signal de Localisation Nucléaire (SLN).....	30
4.e) Régulation des facteurs de transcription.....	30
4.e.1) Régulation des facteurs de transcription par des séquences en cis.....	30
4.e.2) L'épissage alternatif.....	30
4.e.3) Répression de la traduction par des cadres de lecture additionnels.....	31
4.f) Régulations post-traductionnelles des facteurs de transcription.....	31
4.f.1) Effet de la translocation sur l'activité du facteur de transcription.....	31
4.f.2) Les modifications post-traductionnelles.....	31
5) Contrôle de la régulation par la combinatoire des facteurs de transcription.....	32
Partie 5: Les facteurs de transcription de type MYB.....	34
1) Généralités.....	34
2) Les facteurs MYB chez les animaux.....	34
3) Les facteurs MYB chez les plantes.....	35
3.a) Les MYB1R.....	35
3.b) Les MYB3R.....	36
3.c) Les MYB2R.....	36
4) Le contrôle du métabolisme secondaire.....	36
4.a) La voie des acides phénoliques et de la lignine.....	36
4.b) La voie des flavonoïdes.....	37
4.b.1) La voie des anthocyanes.....	37
4.b.2) La voie du phlobaphène.....	38
4.b.3) La voie des proanthocyanidols.....	38
4.b.4) La voie des flavonols.....	38
5) Le contrôle de la morphogenèse cellulaire.....	39
6) Induction lors d'un stress abiotique.....	40
7) Implication dans les mécanismes de défenses.....	40
8) Association avec les rythmes circadiens.....	41
10) Relation MYB et hormones.....	42
11) Les MYB et les polyphénols chez la baie de raisin.....	42

# Partie 1 : Situation économique de la Vigne et du Vin.

## 1) Quelques données chiffrées.

La Vigne est de nos jours l'espèce fruitière la plus cultivée dans le monde. D'un point de vue mondial, la superficie d'exploitation a subi de nombreuses fluctuations au cours des vingt dernières années. Après avoir atteint près de 10 millions d'hectares dans les années 1970, sa surface s'est réduite de pratiquement un tiers au milieu des années 1990 avec 7,7 millions d'hectares en 1994 (**Figure 1**). Les surfaces régressent de 30 % en Europe sous l'effet d'une politique communautaire d'arrachage et d'abandon, notamment dans certains pays d'Europe centrale. Le vignoble dans les pays du Nouveau Monde subit le même phénomène avec une réduction de 3% aux Etats-Unis jusqu'à 20 % en Argentine. Ce n'est qu'au milieu des années 1990 que la courbe s'inverse avec une augmentation des surfaces cultivées en 2002 avec un total de 8,3 millions d'hectares. Ainsi le vignoble de l'Union Européenne s'est stabilisé depuis l'année 2000 après vingt ans de baisse ininterrompue. Avec 3,54 millions d'hectares en 2001, il représente encore 45% de la superficie viticole mondiale.

Mais le phénomène le plus notable dans ces augmentations de surfaces est l'accroissement depuis le milieu des années 1990 des superficies plantées dans les pays du Nouveau Monde, principalement aux Etats-Unis, au Chili, en Argentine, Afrique du Sud et en Australie comme le montre le **tableau 1**. La surface en Vigne de ces nouveaux pays producteurs représente aujourd'hui près de 16% du vignoble mondial contre à peine 8% en 1990. Parallèlement à l'extension du vignoble, l'arrivée de ces nouveaux pays tend à diminuer sensiblement la part Européenne dans la production mondiale de vin avec un chiffre de 74% de la production mondiale en 1999 alors qu'on atteignait les 85% au début des années 80.

De plus, si la production mondiale de vin augmente de manière globale, la tendance générale de la consommation du vin est orientée vers la baisse. Cette diminution s'explique essentiellement par une réduction de la consommation en Europe qui représente à elle seule 80% de la consommation mondiale. Cette diminution globale de la consommation européenne ne doit cependant pas occulter une tendance de fond qui comprend à la fois une baisse relativement élevée de la consommation dans les pays producteurs mais aussi en parallèle une augmentation de cette même consommation dans les pays européens dit non producteurs comme la Grande-Bretagne ou les pays scandinaves (**Figure 2**).

En dehors de l'Europe, la consommation s'est stabilisée dans les pays de l'Amérique. Les nouveaux pays producteurs comme l'Australie, le Chili ou encore l'Afrique du Sud offrent, quant à eux, peu de perspectives de développement de la consommation du fait de la faiblesse de leur marché intérieur. Le marché asiatique (Chine et Japon) génère, par contre, quelques espoirs dans la mesure où le potentiel de consommateurs est énorme. Toutefois, ces premières prédispositions restent à se confirmer.

En conclusion, la tendance à l'heure actuelle est donc à un excédent qui s'est élevé à 56 millions d'hectolitres en 2000. Or cet excédent pèse très lourd sur les prix mondiaux et accentue la concurrence entre les différents pays viticoles et notamment sur le secteur des vins de moyenne gamme. De plus, il est à craindre que cette pression concurrentielle au cours des années ne perdure du fait de la percée des nouveaux pays producteurs regroupant l'Argentine, la Nouvelle-Zélande, l'Afrique du Sud, l'Argentine ou encore le Chili.

Le succès de ces pays auprès des consommateurs dépend d'un certain nombre de paramètres. Tout d'abord, l'attrait des consommateurs pour ces vins tient à leur caractère exotique, mais ils séduisent aussi par leurs qualités intrinsèques, ce sont des vins fruités, légers qui offrent une qualité constante aux consommateurs, garantie par l'existence d'un contrôle systématique des vins à l'exportation. En effet, leurs instances professionnelles dans le domaine viticole ont compris que la réputation de leur vin sur le marché étranger passait par une irréprochabilité de leur produit en termes de qualité et de constance gustative. Bien que la tendance s'inverse en France, ce souci de garantir une constance dans la qualité a fait défaut pendant de nombreuses années dans notre pays. Et si de nombreux progrès se réalisent, ils sont encore insuffisants. L'union Européenne et notamment les pays producteurs comme la France sont donc confrontés à une baisse de la consommation qui d'après les spécialistes n'est pas prête de s'arrêter. L'amélioration du crédit du vin passe par une meilleure accessibilité du produit auprès du consommateur tout en n'oubliant pas que le fait que le vin est histoire de tradition surtout en France où il est ancré dans notre inconscient collectif comme une des grandes valeurs de notre société. Un des moyens de susciter son intérêt auprès du consommateur serait, notamment de diffuser les informations concernant ses vertus thérapeutiques. Depuis plusieurs années, les professionnels du vin ont réalisé qu'il devenait impératif de mettre en avant les bénéfices sur la santé, d'une consommation modérée de vin, dans le cadre d'une alimentation équilibrée. La diffusion d'un tel message apparaît de nos jours, beaucoup plus favorable qu'à une certaine époque.

En effet, le crédit que porte actuellement la société sur ces instances scientifiques fait d'elles un excellent moyen pour diffuser un message concernant les bienfaits du vin sur la santé humaine. Et à ce titre, il semble que les consommateurs apparaissent aujourd'hui beaucoup plus réceptifs à admettre l'idée d'une relation entre le vin et santé qu'auparavant.

## **2) Bénéfices du vin sur la santé.**

Une étude réalisée par l'ONIVINS auprès d'un échantillon de 4000 personnes montre que 44% des personnes interrogées estiment qu'une consommation modérée de vin a des effets bénéfiques sur la santé alors que 34% ne sont pas convaincus de ses vertus thérapeutiques. Depuis, une dizaine d'années, pléthores de travaux scientifiques ont prouvé les bienfaits d'une consommation modérée de vin sur la santé. C'est d'ailleurs à l'occasion d'une émission diffusée sur une chaîne américaine en 1991 qu'est né le terme de « French Paradox ». Ce dernier correspond au taux de mortalité coronarienne et cardiovasculaire, observé en France, qui s'avère être le plus bas des pays industrialisés (Renaud et *al.*, 1992). D'après des études scientifiques, la faiblesse de ce taux serait due à une consommation modérée et régulière de vin dans notre pays.

De plus, le vin comme certaines autres boissons alcoolisées pourrait avoir un effet préventif sur le développement d'autres pathologies, comme le diabète ou la maladie d'Alzheimer. Ces effets bénéfiques multiples constatés auraient plusieurs origines biologiques. La première serait attribuée au rôle de l'éthanol dans la mesure où il a été prouvé qu'il permettait d'augmenter le bon cholestérol et de diminuer le mauvais en favorisant la concentration des lipoprotéines de haute densité (Gronbaeck et *al.*, 1999 ; Johansen et *al.*, 2003). La deuxième, qui à l'heure actuelle est à l'origine d'un nombre certain de publications scientifiques, serait liée à l'action des polyphénols.

Les polyphénols ou composés phénoliques présents dans le vin comme les flavonols (quercétine), les stilbènes (resvératrol), les anthocyanes (Cyanidine et autres) ou encore les tanins (catéchine) issue du métabolisme secondaire auraient des propriétés anti-oxydantes assez conséquentes qui pourraient faire chuter les risques de thromboses et d'athérosclérose dans nos pays (Franckel et *al.*, 1993 ; Zern et *al.*, 2003). Ces polyphénols se trouvent également dans d'autres produits comme les fruits ou certains légumes mais il semble que dans le vin c'est l'alcool qui favorise leurs effets en facilitant leurs absorptions (German et *al.*, 2000 ; Bub et *al.*, 2001).

### 3) La recherche dans la Vigne.

Toutes les instances socio-économiques du vin à travers le monde et la plupart des pays producteurs s'accordent pour dire que l'amélioration de leurs produits, passe par une politique soutenue dans le domaine de la recherche. Plusieurs programmes à grande échelle scientifique mondiale ou européenne comme l'**International Grape Genome Program** (IGGP) ont pour objectif de mieux comprendre les bases moléculaires et génétiques de tous les processus biologiques qui se déroulent dans la Vigne et qui relèvent de l'amélioration de la culture. Ces compréhensions sont cruciales pour permettre une exploitation plus efficace des ressources biologiques du genre *Vitis*, notamment dans le cadre du développement de nouveaux cultivars dont les qualités ont été améliorées et dont les coûts d'exploitations ont été réduits.

Cette connaissance est vitale aussi pour l'émergence de nouveaux outils de diagnostic associés au vin. Les principaux axes d'études à l'heure actuelle concernent les résistances aux pathogènes, aux stress abiotiques, à la qualité du fruit et du vin et aux paramètres de reproductions qui déterminent les rendements. Pour atteindre ces objectifs, des dizaines d'équipes de par le monde contribuent à améliorer nos connaissances sur la Vigne en développant des outils de la biologie moléculaire qui ont fait leur preuve dans d'autres domaines avec d'autres modèles.

Ainsi, tout un programme de cartographie génétique et physique du génome de la Vigne a été lancé afin de pouvoir disposer de toutes les informations génétiques et moléculaires correspondant à cette plante. Des banques BAC sont construites, et des études de profils transcriptionnels (Puces à ADN) voient de plus en plus le jour. En France, plusieurs laboratoires travaillent dans le domaine de la Vigne, trois d'entre eux, dans le cadre d'un projet commun concernant la génomique fonctionnelle de la Vigne, ont lancé une collaboration afin de développer différentes thématiques de recherches complémentaires qui s'attachent à identifier des marqueurs moléculaires associés à la Vigne. Ces trois laboratoires sont composés de l'Unité Mixte de recherche (UMR) ESA CNRS 6161 dirigé par le professeur Serge Delrot à Poitiers, de l'UMR 1083 Sciences pour l'œnologie dirigée par le Docteur Guy Albagnac à Montpellier et l'équipe Biologie de la Vigne dirigée par le Professeur Saïd Hamdi au sein de l'UMR 619 à Bordeaux.

Cette dernière équipe qui est aussi l'équipe d'accueil de cette thèse a été créée en 1999. Elle a pour objectif d'identifier les mécanismes régulateurs mis en place par la plante en relation à la fois avec la qualité phytosanitaire de la baie de raisin et sa qualité organoleptique intrinsèque.

L'identification de *marqueurs moléculaires* associés à ces deux critères serait donc un atout majeur dans l'amélioration des productions viticoles. La recherche de gènes régulateurs de la voie de biosynthèse des polyphénols peut donc nous permettre d'identifier de tels

marqueurs. D'une part, les composés phénoliques interviennent de manière prépondérante dans l'établissement des critères organoleptiques de la baie.

Les anthocyanes et les tanins sont des *déterminants majeurs* de la couleur et de l'astringence d'un vin. D'autre part, ils sont soupçonnés d'intervenir aussi, dans certaines conditions, dans la mise en place des *mécanismes de défenses* suite à l'attaque par des pathogènes. Par ailleurs, de composés phénoliques ont, d'une manière générale, des *vertus nutritionnelles* indéniables pour la santé humaine.

Bien que les gènes structuraux associés à la biosynthèse des polyphénols aient fait l'objet de certaines études (Boss et *al.*, 1996 ; Sparvoli et *al.*, 1994, Gollop et *al.*, 2000), nous disposons de peu d'informations concernant les mécanismes régulateurs responsables du contrôle de l'expression de ces gènes au cours du développement de la baie de raisin.

L'identification de tels mécanismes par une approche moléculaire pourrait nous permettre d'améliorer nos connaissances dans ce domaine et notre compréhension quant aux événements métaboliques liés à l'accumulation de ces composés au cours du mûrissement de la baie de raisin. Mon travail s'est donc inscrit dans le cadre *d'une approche d'identification et d'analyse fonctionnelle de gènes candidats et impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes au cours du mûrissement de la baie.*

#### **4) Projet de thèse.**

Mon projet de recherche s'est inscrit dans une démarche de recherche gènes candidats associés à la qualité organoleptique des baies de raisin, chez la variété Cabernet Sauvignon. Selon les résultats de la littérature concernant la régulation des polyphénols et les connaissances physiologiques et biochimiques connues chez la baie de raisin en ce qui concerne la cinétique d'accumulation des flavonoïdes, nous avons considéré que l'identification de gènes régulateurs de la voie de biosynthèse des polyphénols de type MYB pouvait répondre à ce projet. La recherche de ce type de facteurs de transcription nous a semblé comme un bon moyen d'appréhender les mécanismes régulateurs responsables de la biosynthèse des polyphénols dans la baie de raisin .

#### **5) Bilan de la thèse.**

Ce projet a conduit à :

-l'identification par PCR sur banque ADNc de baies cv Cabernet Sauvignon (stade Véraison) de deux clones codant des facteurs de transcription de type MYB, VvMybCS1 et VvMybCs2

-la validation par transgénèse (sur-expression) de leur implication dans la régulation de la voie de biosynthèse des polyphénols se traduisant par l'induction de la plupart des gènes structuraux de cette même voie et une accumulation accrue dans certains organes floraux (étamines et pétales) des fleurs transgéniques de Cyanidine-3-rhamnoglucoside (Kéracyanine) et d'une légère augmentation de Quercétine-3-glucoside ainsi que l'apparition de tanins condensés de nature épicatechinique dans les pétales pour les Tabacs sur-exprimant VvMybCs1 et dans les deux organes pour les Tabacs sur-exprimant VvMybCs2.

-Nous avons aussi constaté leurs effets pléiotropiques sur d'autres métabolismes se traduisant par des phénotypes nouveaux sur les lignées transgéniques de Tabac comme un retard de

déhiscence des anthères lié à un défaut de lignification d'une assise cellulaire des anthères associée à la déhiscence ou encore la conversion des étamines en structures pétaloïdes.

-la mise en avant du rôle dominant de *VvMybCs2* dans la régulation de l'expression des gènes structuraux des phénylpropanoïdes par la création d'un mutant dominant négatif présentant un phénotype équivalent au sauvage.

-une étude préliminaire sur une éventuelle redondance fonctionnelle de ces deux gènes par des croisements de Tabacs sur-exprimant *VvMybCs1* et *VvMybCs2*.

- une étude moléculaire de la régulation moléculaire de l'expression des gènes *VvmybCs1* et *VvMybCs2* d'une part par des analyses d'expressions de *VvmybCs1* et *VvMybCs2* dans des cultures cellulaires de Vigne en présence de saccharose et d'ABA et d'autre part par l'identification d'une région promotrice du gène *VvMybCs1*.

Mais avant de présenter les différents résultats concernant la validation fonctionnelle de ces deux gènes, il est nécessaire de faire un rappel sur les étapes clés du développement de la baie de raisin afin de mieux appréhender le rôle des composés phénoliques dans la baie de raisin au cours de son développement

## Partie 2 : Le développement de la baie de raisin.

### 1) De l'anthèse à la fécondation.

La pollinisation des fleurs de Vigne est principalement autogame, la pollinisation par le vent n'est bien sûr pas à exclure (Huglin, 1986). D'une manière générale, toutes les fleurs d'une inflorescence ne se transforment pas en baie. En effet, quelques jours après la floraison, le pédicelle d'un certain nombre de fleurs, se détache de la rafle au niveau d'une zone d'abscission (Bessis et Fournioux, 1992), dont la formation n'est pas encore bien connue. Cependant, elle pourrait résulter de problèmes de biologie florale ou de phénomènes de compétitions trophiques ou hormonales entre les différentes baies (Carbonneau et Ollat, 1993).

Dans le cas contraire, une fois fécondé au niveau de l'ovule, l'ovaire commence à se développer. Le nombre maximal d'ovules fécondables est de quatre. Toutefois, il est rarement atteint et en général le nombre de pépins obtenus par baie est de deux. Ce défaut de fécondation s'explique par des malformations des ovules (Kassemeyer et Staudt, 1982 ; Benharbit el Amani, 1995) qui, dans les cas extrêmes, vont entraîner un développement parthénocarpique du fruit avec soit la présence d'ébauches de pépins (*apyrénie sténospermique*), soit l'absence totale de pépins (*apyrénie corinthienne*). Dans ce dernier cas, la baie reste beaucoup plus petite que la baie normale au moment de la récolte. On parle alors dans ce cas de baie millerandée.

La période de développement de l'ovaire correspond à l'entrée dans la période dite de *Nouaison*. Cette période permet de déterminer le taux de Nouaison qui correspond au nombre d'ovules fécondés par grappe de raisin. Ce dernier est très variable et dépendra entre autres du nombre de fleurs ayant subi une abscission. Par ailleurs, il variera aussi en fonction des génotypes, des conditions environnementales et d'alimentation de la Vigne. Lorsque ce taux de Nouaison est fortement réduit par rapport à la moyenne, on parle alors de *Coulure*.

### 2) La structure de la baie de raisin.

La baie de raisin est *un fruit charnu issu des tissus constituant la paroi de l'ovaire* (Esau, 1965). La partie charnue du fruit ou péricarpe est composée d'exocarpe ou pellicule constituée de différentes assises cellulaires (cuticule, épiderme et hypoderme), de mésocarpe ou pulpe et enfin d'un endocarpe réduit à une simple paroi appliquée contre le tégument externe de la graine (**Figure 3**). La pulpe est la partie la plus importante de la baie, elle est composée de cellules de grande taille pseudo-sphériques qui peuvent atteindre plusieurs centaines de micromètres de diamètre. Elles sont d'une vacuole qui occupe la majeure partie du volume cellulaire.

Au niveau de la vascularisation de la baie, celle-ci découle de celle de l'ovaire de la fleur (Pratt, 1971). Elle est constituée d'un réseau de petits faisceaux vasculaires périphériques situés à une vingtaine d'assises au-dessous de l'épiderme et d'un faisceau central plus large alimentant les pépins et la columelle. Au début du développement, les faisceaux vasculaires périphériques délimitent l'exocarpe et le mésocarpe. Plus tard, ils sont entourés de cellules du mésocarpe et ne caractérisent plus la frontière exocarpe-mésocarpe (Park, 1995).

L'analyse en détail des faisceaux conducteurs réalisée par Ollat (1997) a montré que ces derniers contiennent quatre à cinq trachéides aux parois épaisses disposées en hélice et un parenchyme vasculaire de faible épaisseur. Le faisceau conducteur central est divisé en deux sous-faisceaux séparés par un tissu parenchymateux aux cellules rectangulaires et très riches en polyphénols.

### 3) Croissance et métabolisme de la baie.

La croissance des baies de raisin suit *une courbe en double sigmoïde* (Figure 4). L'analyse du développement et du métabolisme de la baie de raisin met en évidence une succession de trois phases qui s'étalent sur tout le cycle reproducteur (Floraison –Vendange) (Coombe, 1992). La phase I correspond à *la période de divisions et de grandissement cellulaire* qui suit la fécondation. Elle est suivie par la phase II qui correspond à une *une période de croissance limitée* précédant le début de la maturation. Elle est appelée aussi phase de latence. La dernière phase ou phase III du développement correspond, quant à elle, à *une période de grandissement cellulaire*. Entre la floraison et le début de la maturation, la baie a un fonctionnement de type herbacé. La phase de maturation débute à un moment crucial du développement de la baie connue dans la pratique viticole sous le nom de Véraison. L'entrée dans cette phase de maturation n'est pas homogène pour toutes les baies d'une même rafle ; ce qui explique les hétérogénéités observées en termes de développement (Coombe, 1992). Les composés majeurs produits au cours de la croissance de la baie de raisin sont indiqués sur la figure 4. Les composés phénoliques seront décrits précisément (structure, biosynthèse, production au cours du développement) dans le paragraphe 4) et la partie 3 de l'introduction « Les flavonoïdes parmi les Végétaux ». L'accumulation des sucres et acides au cours du développement est décrite ci-après.

#### 3.a) La phase de développement herbacé.

Pendant cette phase dont la durée varie de 25 à 45 jours selon le cépage et les conditions de l'environnement, la croissance des baies est liée à la fois à *des phénomènes de division et de grandissement cellulaire*. Si la plupart des divisions a lieu avant l'anthèse, le pic des mitoses au niveau de la baie après l'anthèse a lieu au bout d'une semaine (Jona et Bota, 1988). La croissance de la baie, quant à elle, a pour origine un grandissement cellulaire extrêmement important qui va se traduire par la multiplication de la taille des cellules par approximativement 300 à la fin de cette phase (Coombe, 1976).

Dans les derniers temps de cette phase, on observe un fort ralentissement de la croissance. Durant toute cette phase, le pigment majoritaire dans les baies est la chlorophylle. La baie fonctionne comme un organe végétatif. Ainsi, bien que leur nombre est 100 fois plus faible que dans les feuilles, il varie en fonction des variétés, les stomates présents sur la baie sont fonctionnels tout au long de cette période (Swift et al., 1973 ; Blanke and Leyhe, 1987). Cependant, ils ont tendance à évoluer en lenticelles à la fin de cette phase (Bernard, 1977). Le bilan métabolique au cours de cette phase montre que *les baies ont la capacité de photosynthèse*. Mais leur respiration est intense et le bilan de CO<sub>2</sub> est toujours négatif avec un quotient respiratoire proche de 1 (Harris et al., 1971 ; Leyhe et Blanke, 1989). Les baies également des pertes respiratoires constantes au cours de cette phase (Greenspan et al., 1994).

En ce qui concerne les métabolites, la phase de développement herbacée est caractérisée par **une forte accumulation d'acides organiques**, en particulier, d'acides malique et tartrique stockés dans les vacuoles des cellules du péricarpe (**Figure 4**). Le pH du jus de raisin, considéré comme représentatif du pH vacuolaire, est voisin de 2,7 et n'évolue pas au cours de cette phase (Hrazdina et al., 1984). L'acide tartrique s'accumule surtout au tout début du développement alors que l'acide malique s'accumule tout le long de cette période avec une concentration maximale juste avant la Véraison (**Figure 4**) (Ruffner, 1982). À l'inverse, la **concentration des sucres est toujours très faible** pendant cette phase de développement et ne dépasse pas 10 à 20 g /kg de matière fraîche. Les sucres importés quotidiennement des organes sources sont sans doute métabolisés par la baie afin de subvenir aux besoins de développement de la baie mais aussi pour la croissance des pépins. C'est au cours de cette phase que le flux xylémien prend toute son importance dans le développement de la baie. Néanmoins, ce même flux s'interrompt au cours de la phase de latence pour être relayé par un fort flux phloémien au cours de la phase de maturation.

### **3.b) La phase de maturation.**

Après une phase de latence correspondant à la phase II, la croissance des baies reprend brusquement (**Figure 4**). Uniquement **due à des phénomènes de grandissement cellulaire**, cette phase se caractérise par un « ramollissement » des tissus constitutifs de la baie et une diminution de la concentration en composés pectiques (Silacci et Morrison, 1990). Au début de la phase de maturation, les baies **perdent leur couleur verte** et commencent à devenir translucides pour les cépages blancs ou à se colorer pour les cépages rouges.

L'activité photosynthétique, cette fois-ci, diminue fortement et le quotient respiratoire devient supérieur à 1 (Harris et al., 1971 ; Koch et Alleweldt, 1978). Les stomates n'apparaissent plus fonctionnels bien que les baies semblent conserver une activité transpiratoire dont l'intensité varie peu. **L'événement majeur de cette phase est la forte accumulation de sucres réducteurs, glucose et fructose, concomitante à une diminution de la concentration en acides organiques (Figure 4 et 5)** ayant pour conséquence une augmentation du pH du jus qui atteint des valeurs de 3 à 3,5 au cours de cette phase (Champagnol, 1986).

L'évolution de la teneur en sucres pendant cette période est le facteur principal caractérisant le degré de maturité des baies. Les baies sont considérées comme les fruits les plus sucrés avec une concentration qui peut dépasser 1 molaire à maturité (Coombe, 1976). À partir de la Véraison, les sucres sont synthétisés dans les feuilles (organes sources) puis sont transportés par le phloème vers les baies de raisins (organes puits) exclusivement sous forme de saccharose. Cependant, le saccharose ne représente pas le glucide majoritaire dans la baie de raisin. Au contraire, comme nous l'avons plus haut, l'accumulation des sucres correspond essentiellement à l'augmentation du glucose et du fructose.

Trois enzymes sont connues pour leur capacité à hydrolyser le saccharose, l'invertase pariétale localisée dans l'apoplasme, l'invertase vacuolaire, et le saccharose synthétase cytoplasmique. Cependant, la présence de ces enzymes au niveau de la paroi et dans les cellules suggèrent la présence de transporteurs membranaires pour le saccharose, et /ou les hexoses. L'activité de ces enzymes hydrolytiques durant la phase herbacée, avant la forte accumulation des sucres (Davies et Robinson, 1996) suggère que l'augmentation des teneurs en sucres dans les cellules de la baie, pourrait être due à l'activité de ces transporteurs membranaires (Fillion et al., 1999). Certains de ces transporteurs d'hexoses ont été clonés par

Fillion *et al.*, 1997. La forte expression des ARNm codant ces transporteurs dans les baies 5 semaines après la véraison suggère qu'ils pourraient être associés dans la cinétique d'accumulation des hexoses dans la baie après qu'une invertase ait hydrolysé le saccharose importé (**Figure 6**) (Fillion 1997).

À ce titre, un modèle du déchargement des sucres a été proposé. Le saccharose provenant des feuilles pénètre dans la baie par le phloème et les cellules environnantes, soit par des plasmodesmes qui connectent le phloème et les cellules environnantes, soit par des transporteurs spécifiques situés dans la membrane (**Figure 6**). Dans ce dernier cas, il est réabsorbé à partir de la paroi, par des transporteurs situés dans la membrane des cellules receveuses. Une fois dans ces cellules de la pulpe, les glucides (glucose et fructose) sont donc absorbés par un antiport proton/sucre situé dans le tonoplaste qui délimite la vacuole. L'énergie nécessaire à l'antiport est fournie par une pompe à protons vacuolaire (ATPase) et par une pyrophosphatase. Des invertases situées dans la paroi, dans le cytoplasme ou dans la vacuole hydrolysent le saccharose en glucose et en fructose.

Récemment, l'étude structurale du promoteur de gène codant un transporteur d'hexoses *Vvht1* a montré qu'il contenait de nombreux motifs (positifs ou négatifs) répondant aux sucres. L'activation par les sucres du gène GUS fusionné au promoteur du gène *Vvht1* suggère que son expression, dans la baie de raisin, pourrait être fortement corrélée à l'importation des sucres dans la baie de raisin (Atanassova *et al.*, 2003).

Toutefois, l'implication d'une combinaison de la voie apoplastique avec une voie symplastique par l'intermédiaire de plasmodesmes fortement présents dans les cellules de la baie de raisin n'est pas à exclure en ce qui concerne le déchargement des sucres dans la baie. Cette combinaison des deux voies pourrait expliquer alors éventuellement l'hétérogénéité de la répartition des sucres dans les différentes parties de la baie conduisant à une concentration maximale dans la partie médiane par rapport aux autres parties de la baie (Coombe, 1987).

#### **4) Les composés phénoliques au cours du développement.**

Issus de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes qui intervient dans la biosynthèse de plusieurs familles de métabolites secondaires, les composés phénoliques sont synthétisés suite à la condensation d'une molécule de Coumaryl CoA avec trois molécules de malonyl CoA (**Figure 7**). Cette partie de paragraphe décrit les composés phénoliques synthétisés au cours du développement de la baie. Une voie de biosynthèse et leurs différentes propriétés seront décrites plus tard dans le chapitre (Partie 3 de l'introduction). Les composés phénoliques sont des composés importants de la baie de raisin qui englobent à la fois des molécules dites *flavonoïdes* (anthocyanes, flavonols, tanins), caractérisées par un squelette carboné en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> et des molécules dites *non flavonoïdes* comme les stilbènes correspondant à un squelette carboné de type C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>.

##### **4.a) Un exemple de composés dit non-flavonoïdes, les stilbènes.**

Ce sont des composés phénoliques légèrement différents des flavonoïdes car ils présentent un squelette en C<sub>6</sub>C<sub>2</sub>C<sub>6</sub>. Différentes formes existent qui dépendent des substitutions présentes sur ce squelette. On peut en trouver des formes aglycones tel que le *resvératrol*, des formes glycosylées comme les picéïdes ou l'astringine, ou encore des stilbènes spécifiques à la Vigne comme la Viniférine (**Figure 7**).

Ces composés sont synthétisés dans différentes parties de la plante, baie, rafles et feuilles. Dans la baie, ils se trouvent plus particulièrement au niveau de la pellicule. Leur biosynthèse a lieu principalement **au début du développement du fruit** (phase I) puis diminue fortement au moment de la véraison. Ces composés présentent un intérêt majeur à deux points de vue. D'une part, ils joueraient un rôle dans la défense de la plante vis à vis des agents pathogènes. D'autre part, ils joueraient un rôle dans la santé humaine.

En effet, les stilbènes sont assimilés à des **phytoalexines**, molécules dont les propriétés biocides (antifongiques, antibactériennes ...) ont été démontrées *in vitro* (Aziz et al., 2003). La synthèse de ces composés est induite en réponse à des éliciteurs biotiques dans les feuilles de Vigne. Ainsi, *Botrytis cinerea* (Jeandet et al., 1995b; Bavaresco et al., 1999), *Plasmopora viticola*, agent du mildiou (Derck et Creasy, 1989) favorise la production de stilbènes chez la Vigne. Il faut noter que le resvératrol, un des stilbènes majoritaire de la baie a été démontré comme un des composés majeurs de la défense chez la Vigne (Cichewicz et al., 2000). Plus récemment, la surexpression du gène codant la stilbène synthase dans des Vignes transgéniques a permis d'augmenter la résistance à *Botrytis cinerea* (Coutos-Thévenot et al., 2001). Des analyses *in vitro* et *in vivo* ont démontré le rôle prépondérant du méthyl jasmonate, connu pour être une molécule de signalisation dans le cadre des mécanismes moléculaires d'interaction plante-pathogènes, sur l'induction de la biosynthèse des stilbènes (Krisa et al., 1999).

Les stilbènes, et ceci a été démontré en particulier pour le resvératrol, ont également un impact important sur la santé mais cette fois-ci humaine. Le **resvératrol** a une **action fluidifiante sur le sang** s'opposant l'aggrégabilité plaquettaire qui, dans certains cas, est source de formation de caillot sanguin. Il a, de plus, une puissante action anti-oxydante envers les lipoprotéines de faibles densité (LDL) qui véhiculent le « mauvais cholestérol », réduisant ainsi les risques de dépôt de cholestérol sur les parois des artères (processus initiateur de la formation de plaques d'athéromes à l'origine des infarctus et des accidents vasculaires cérébraux)(Frankel et al., 1993 ; Ferroni et al. 2004).

Comme nous l'avons vu plutôt, la biosynthèse de ces composés n'a lieu que pendant les phases précoces du développement de la baie, or il faut savoir que la chalcone synthase (première enzyme de la voie de biosynthèse des flavonoïdes) et la stilbène synthase utilisent le même substrat. **La compétition en faveur de la synthèse des flavonoïdes** à partir de la véraison pourrait expliquer **la diminution de la production endogène de stilbènes** et par conséquent l'origine de la sensibilité de la Vigne à divers pathogènes (Jeandet et al., 1995a).

## **4.b) Les composés dit flavonoïdes.**

### **4.b.1) Les anthocyanes.**

#### **4.b.1.a) Structure et classification.**

Le terme « anthocyane » a été créé par Marquart (1835) à partir des mots grecs anthos (fleur) et kyanos (bleu) pour désigner certains pigments végétaux. Elles font partie des composés dit **flavonoïdes** avec un squelette carboné de base C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> commun à l'ensemble des flavonoïdes (**Figure 8**).

Les anthocyanes regroupent l'ensemble des *anthocyanidols ou anthocyanes aglycones* et de *leurs hétérosides, les anthocyanines*. Les anthocyanidols sont composés de deux noyaux benzènes A et B qui encadrent un hétérocycle (C3) oxygéné. Ce sont des dérivés du phényl-2-benzopyrylium ou flavylium. Ils ne diffèrent les uns des autres que par la nature des radicaux R1 et R2 du noyau phénolique latéral B (**Figure 9A**).

La couleur des anthocyanes dépend de leurs structures chimiques et des conditions du milieu, notamment du pH (**Figure 9B**). En solution aqueuse, la plupart des anthocyanines sont rouges à de faible pH, mauves à des pH élevés et perd leur couleur pour des pH intermédiaires. La variation de leur structure en fonction du pH est une particularité de ces molécules. Les changements de couleur sont dus à *des équilibres chimiques* entre les différentes formes chimiques prises par ces molécules. Avec le pH, les co-pigmentations intermoléculaires et intramoléculaires sont également des facteurs impliqués dans l'intensité de la coloration des anthocyanines. De plus, la nature des radicaux R1 et R2 du noyau phénolique peut être à l'origine de la variation de couleur des pigments. Ainsi, les formes hydroxylées donneront une couleur bleue alors que les formes méthoxylées donneront une couleur mauve (**Tableau 2**).

Les anthocyanines possèdent au moins une molécule de sucre (rhamnose, glucose..) engagée par une liaison éther avec l'oxygène du radical-OH fixé en position 3, 5 ou 7 du noyau benzopyrylium (Karrer, 1928). Dans certains, les anthocyanes sont acylées au niveau de -OH en position 3 du noyau benzopyrylium avec soit un acide acétique, un acide para couarique ou encore un acide caféique.

Jusqu'à présent, on retrouvait dans la plupart des plantes 17 anthocyanines dites communes et avec un squelette « anthocyanidolique » composé des six molécules les plus communes à toutes les plantes : le cyanidol ou Cy qui représente 50% des anthocyanidols modifiés, le péonidol ou Pn (12%), le pélargonidol ou Pg (12%), le delphinidol ou Dp (12%), le pétunidol ou Pt (7%) et enfin le malvidol ou Mv (7%). Toutefois, en se basant sur plusieurs revues scientifiques, on peut estimer que le nombre d'anthocyanines présent dans la nature serait plus proche de 400. Mazza et Miniati (1993) dans « Anthocyanins in fruits, Vegetables, and grains » en recensent déjà près de 258. Un dernier recensement entre 1995 et 2000 fait état de 135 nouvelles anthocyanines identifiées chez les plantes (Harborne et William, 2001).

#### **4.b.1.b) Répartition chez la Vigne.**

On dénombre à l'heure actuelle, 16 anthocyanines (**Tableau 3**). Leur synthèse a lieu dans les feuilles, les tendrons et la baie. Elles sont responsables du changement de couleur des baies lors de la Véraison et de celui des feuilles à la fin du cycle végétatif. Ainsi dans la baie, la synthèse des anthocyanes se caractérise par *une rapide augmentation de leur teneur à la Véraison* (Somers, 1976 ; Pirie et Mullins, 1976, 1979 ; Guilloux, 1981) suivie d'une phase de stabilisation précédant *une diminution de leur concentration en fin de maturation* (Roggero et al., 1986 ; Darné, 1988).

Dans la plupart des cépages noirs, les anthocyanes sont localisées principalement dans les trois ou quatre premières assises de l'hypoderme de la baie (Hrazdina et Moskowitz, 1982 ; Stafford, 1990), et parfois dans la pulpe (cépages teinturiers).

Dans les cépages blancs, bien que les précurseurs des anthocyanes soient présents, l'*inactivité* de l'expression du gène codant l'UDP glucose-flavonoïde 3-O-glucosyltransférase, dénommée UFGT, et qui est à l'origine de la transformation de leucoanthocyanidols non colorés en anthocyanidols colorés, a pour conséquence qu'aucune coloration n'est détectée dans la baie (Boss et *al.*, 1996b).

D'une manière générale, les anthocyanes sont *stockées dans les vacuoles* (Garcia et *al.*, 1992). La quantité et la composition en anthocyanes présentes dans les raisins noirs ou rouges varient au cours du développement (Darné, 1988 ; Boss et *al.*, 1996) mais également en fonction de certains paramètres comme les conditions climatiques. Elles varient aussi en fonction de la région de production. L'éclaircissement différentiel des grappes a aussi une influence sur les compositions en anthocyanes (Bergqvist et *al.*, 2001; Kliewer, 1977).

Par contre au sein des cépages rouges, les anthocyanes ont des teneurs qui semblent évoluer de la même manière dans les baies au cours du développement du fruit quelque soit le cépage. Les anthocyanes représentent avec les tanins l'un des plus importants groupes de constituants du raisin mais aussi du vin. Elles interviennent de manière prépondérante comme les tanins à l'établissement des *critères organoleptiques* qui déterminent à la fois la qualité d'une baie de raisin mais aussi celle du vin (Glories, 1988).

D'une manière générale, les compositions en anthocyanidols varient d'une espèce à l'autre, dans le genre *Vitis*, le cyanidol et la péonidol étant prédominantes dans les espèces *V. lincecumii*, *V. aestivalis* et *V. coriacea* alors que la cyanidol et la pétunidine sont prédominantes dans *V. riparia* et *rupestris*. Toutefois, dans la plupart des variétés de Vigne à cépage rouge, les cinq anthocyanidols les plus représentés dans le règne Végétal sont retrouvés : le malvidol, le pétunidol, le delphinidol, le cyanidol et le péonidol. Au niveau des cultivars, la principale anthocyanine (anthocyanidol glycosylé) chez le Cabernet Sauvignon, la Syrah, le Pinot noir et le Merlot est le 3- $\beta$  glucoside de malvidol (Souquet et *al.*, 1996).

#### 4.b.2) Les tanins.

##### 4.b.2.a) Structure.

Les tanins sont composés des métabolites polyphénoliques ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 et scindés en deux sous-familles (**Figure 10**) :

- les tanins hydrolysables qui sont des molécules complexes qui sont considérés comme des non flavonoïdes (ellagitanins, gallotanins)
- les tanins condensés qui font partie de la famille des flavanols (**Figure 8**). Seulement, cette dernière famille est présente chez la Vigne. Ils résultent de la polymérisation de molécules élémentaires ( $C_6C_3C_6$ )<sub>n</sub> qui possèdent la structure générale des flavonoïdes dont les plus importants sont les flavanols-3 et les flavanediols 3,4 (**Figure 10**). Les plus connus sont les oligomères appelés procyanidols correspondant à la condensation de deux à cinq unités monomériques de type catéchine, épicatechine, épigallocatechine, etc...., . La nature et le nombre d'unités monomériques vont déterminer à la fois le type de procyanidols (Type A, B) mais aussi la classe de procyanidols au sein d'un type (B1, B2...) (**Figure 11**). La liaison résultant de la condensation de deux ou trois unités de flavan 3-ols liées entre elles est située en position C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> ou C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>. Le nombre d'unités peut varier de 1 à 30 unités. Ce sont des composés qui sont capables de se complexer avec des protéines et avec d'autres polymères végétaux comme les polysaccharides.

#### **4.b.2.b) Répartition dans la Vigne.**

Ces composés sont surtout localisés dans la *pellicule, les pépins mais aussi la rafle*. Dans le pépin, ils se localisent dans les enveloppes externes (Thorngate et Singleton, 1994) alors que dans la pellicule, ils sont localisés dans les couches externes de l'hypoderme (Park et al., 1995). Les tanins sont stockés sous forme d'amas dans les vacuoles (Park, 1995) et dans la paroi des cellules (Amrani-Joutei et al., 1994).

Les principaux flavanols monomères de la baie de raisin sont la catéchine, la gallocatéchine, l'épicatéchine et l'épigallocatéchine (Nambara et Marion Poll, 2003 ; Kennedy et al., 2000) avec une évolution différente au cours du développement de la baie qui sera fonction du tissu. Ainsi, dans la pellicule, la période d'accumulation s'étale sur une période comprise entre le stade petit pois et 1 à 2 semaines après la Véraison (Downey et al., 2003). La période principale d'accumulation des tanins dans les pépins a lieu immédiatement après la formation du fruit avec un maximum observé autour de la Véraison (Downey et al., 2003). Si au niveau des pépins, les différences entre les cépages blancs et noirs sont très atténuées, les compositions en tanins au niveau de la pellicule sont différentes (de Freitas et al., 2000). Bien que fortement étudié pour leur rôle essentiel dans la stabilité du vin, le rôle biologique des tanins auprès de la plante n'a pas fait l'objet de nombreuses études. Toutefois, un certain nombre d'éléments suggèrent qu'ils aient des *propriétés biocides* limitant, dans certains cas, la propagation des pathogènes dans la baie de raisin.

#### **4.b.3) Les flavonols.**

##### **4.b.3.a) Structure.**

Comme les anthocyanes, ces molécules présentent un squelette carboné de type C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Ils se distinguent des anthocyanes par la présence d'un radical cétone en position 4 du noyau C (**Figure 8**). Parmi les trois flavonols les plus présents chez la baie de raisin (quercétine, myricétine et kaempferol), la forme glycosylée en C<sub>3</sub> de la quercétine est majoritaire (**Figure 12**) (Spayd et al., 2002).

##### **4.b.3.b) Répartition chez la Vigne.**

Bien que des traces de 3- β-glucoside de kaempferol aient été détectées dans les fleurs de la Syrah, ce composé a **tendance à disparaître** dans les baies au cours des phases précoces du développement. Aucune présence n'a été observée dans les graines et la pulpe. En ce qui concerne les autres organes, les flavonols sont aussi détectés dans les bourgeons, les tiges, les inflorescences, les anthères et les feuilles (Downey et al., 2003).

D'un point de vue tissulaire, les flavonols sont synthétisés dans l'*épiderme supérieur* de la baie et comme les anthocyanes, elles sont stockées dans les vacuoles (Price et al., 1994). Cependant, les plus fortes teneurs en flavonols sont observées dans les fleurs avec une tendance à la baisse jusqu'à la formation du fruit. Puis les teneurs restent relativement constantes au cours du développement *avant d'augmenter à partir de la véraison* corrélant fortement avec le profil d'expression des gènes structuraux codant deux isoformes de la flavonol synthase, dont les niveaux d'expression sont observés seulement pendant la floraison et après la Véraison (Downey et al., 2003).

En ce qui concerne leur fonction dans la baie de raisin, il semble que ces composés agissent essentiellement en tant *que molécules protectrices des ultraviolets*, permettant ainsi de limiter les dégâts tissulaires et cellulaires engendrés par ce type d'émissions lumineuses.

Un élément qui vient conforter le rôle des flavonols dans la protection de la lumière est la forte corrélation obtenue dans des baies de Pinot Noir entre la teneur de 3- $\beta$ -glucoside de quercétine et le degré d'exposition à la lumière du fruit (Price, 1995).

## **5) Evolution d'autres molécules.**

D'autres pigments colorés sont présents dans les baies de raisin. Plusieurs études ont montré la présence de caroténoïdes (Curl, 1964 ; Bottril et Hawker, 1970 ; Gross, 1984). Dans une baie mature, ces caroténoïdes, localisés dans l'épiderme (Bottril et Hawker, 1970), voient leur concentration diminuée au cours du mûrissement. *Une compétition de précurseurs* communs (Acétate et Mévalonate) *entre les flavonoïdes et les caroténoïdes* pourraient être à l'origine de la disparition de ces derniers au cours de la maturation (Wong, 1976).

D'autres composés comme les isoprénoïdes (monoterpènes et damascenone) sont également présents et joueraient un rôle dans l'établissement des *arômes et des flaveurs* du vin. Ces composés sont présents au cours du mûrissement dans les plastes du péricarpe (Hardie et *al.*, 1996). L'accumulation de ces molécules, contribuant à l'arôme de la baie, est caractérisée une augmentation très forte de composés aromatiques libres et glycosylés au cours des stades avancés du mûrissement quand les glucides augmentent dans la baie (Coombe et *al.*, 1997).

## Partie 3 : Les flavonoïdes chez les Végétaux.

Pour appréhender la régulation de la biosynthèse des polyphénols chez la baie de raisin, il est nécessaire de faire un rappel concernant les voies métaboliques qui sont à l'origine de cette branche. Les précurseurs des flavonoïdes font partie de la voie générale des phénylpropanoïdes commune à la synthèse de nombreux composés intervenant dans différents aspects du développement des plantes ou dans les réactions de défense (Dixon et Paiva, 1995). Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces précurseurs des flavonoïdes sont la phénylalanine ammonia lyase (PAL), la cinnamate hydroxylase (C4H), et l'hydroxycinnamate CoA ligase (4CL). La combinaison de l'activité de ces enzymes sera à l'origine de la biosynthèse des composés aussi divers que *les lignines, les lignanes, les subérines, les stilbènes et ce qui nous intéresse les flavonoïdes* (Figure 13).

### 1) Les enzymes majeures de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.

#### 1.a) Les enzymes communes aux flavonoïdes.

Aujourd'hui, la majeure partie de la voie de biosynthèse des flavonoïdes est bien connue chez les plantes par l'intermédiaire de l'étude approfondie de l'une des classes de flavonoïdes, les anthocyanes. Trois espèces végétales, le Maïs (*Zea Mays*), le Mufler (*Antirrhinum Majus*) et le Pétunia (Dooner et *al.*, 1991), ont servi *de modèles pour décrire les différentes étapes enzymatiques* qui aboutissent à la synthèse des pigments anthocyaniques et ont conduit à l'identification des gènes structuraux codant les enzymes responsables de la production de ces métabolites secondaires (Holton et Cornish, 1995). Les séquences codantes de ces enzymes ont aussi été clonées aussi chez la Vigne (Sparvoli et *al.*, 1994). Les trois grandes classes des flavonoïdes énumérées par la suite sont issues de l'activité d'enzymes communes (Figure 14). La première de ces enzymes est la chalcone synthase ou CHS et permet la *condensation de trois molécules de malonyl CoA avec une molécule de p-coumaryl CoA*. Isolée chez plusieurs espèces comme le Mufler (Sommer et Sandler, 1986), le Pétunia (Reif et *al.*, 1985), le Maïs (Dooner et *al.*, 1993), elle fut l'objet de nombreuses études dans la mesure où elle représente la voie d'entrée dans le métabolisme des flavonoïdes.

La chalcone ainsi générée, s'accumule rarement dans les plantes, mais est convertie en naringénine par la chalcone isomérase ou CHI identifiée dans la plupart des plantes modèles existant (Van Tunen et *al.*, 1988 ; Martin et *al.*, 1991 ; Grotewold and Peterson, 1994).

La troisième enzyme est la flavanone 3 hydroxylase ou (F3H). Cette dernière catalyse *l'hydroxylation de la naringénine* et du dihydrokaempferol en position 3' du noyau B dont l'activité fut mise en évidence pour la première fois dans des extraits de fleurs de Pétunia (Stotz et *al.*, 1985). Elle fut aussi isolée chez le Maïs (Coe et *al.*, 1988).

La quatrième et dernière enzyme commune à la plupart des classes de flavonoïdes est la dihydroflavonol 4 réductase (DFR) qui catalyse *la réduction* de dihydroflavonols (dihydrokaempférol, dihydromyricétine, dihydroquercétine) en flavan-3,4-cis diols ou leucoanthocyanidols. Des ADNcs codant des DFR ont été clonés chez plusieurs espèces, on peut trouver plusieurs copies par génome dans une espèce comme c'est le cas dans le génome du Pétunia qui en compte trois (A,B,C) mais seulement dfrA est transcrit dans les tissus floraux. Ceci suggère que la DFR pourrait être à l'origine de la biosynthèse de composés autres que les flavonoïdes (Huits et *al.*, 1994).

## 1.b) La Flavonol Synthase (FLS) enzyme clé de la voie des flavonols.

La production de flavonols (kaempferol, quercétine, myricétine) correspond à la conversion des composés dihydroflavonols en flavonols dont la réaction est catalysée par la *flavonol synthase* (**Figure 15**) (Britsch et *al.*, 1981). Par la suite, ces flavonols sont glycosylés par des glucosyl transférases (GT). L'addition du sucre peut se faire en position 7 du noyau A ou au niveau du radical hydroxyle du carbone 3 du noyau C. À ce jour, plusieurs ADNc codant des flavonol synthases ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Pelletier et *al.*, 1997), le Pétunia (Holton et *al.*, 1993), la Pomme de terre ( Van Eldik et *al.*, 1997) ou encore le Citron (Moriguchi et *al.*, 2002) ou encore chez la Vigne (Sparvoli et *al.*, 1994).

## 1.c) Les enzymes de la voie des anthocyanes.

La première enzyme qui engage ces composés vers la production d'anthocyanes est l'*anthocyanidine synthase* (ANS) encore appelée leucoanthocyanidine di-oxygénase (Ldox) (**Figure 16**). L'étape enzymatique qui catalyse la conversion de leucoanthocyanidols en anthocyanidols implique une étape d'oxydation et une étape de déshydratation (Heller and Forkmann, 1988, 1993). Chez le Maïs et le Muflier, le clonage du gène A2 et Candi (Menssen et *al.*, 1990 ; Martin et *al.*, 1991) permet d'obtenir la séquence de deux protéines qui présentaient de fortes similarités de séquences avec des enzymes du type dioxygénase 2-oxoglutarate-dépendante comme la flavanone 3 hydroxylase ou la flavonol synthase ou encore la 1 aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase. Depuis, d'autres enzymes codant des ANS ont été clonées chez *Arabidopsis* (Murray-Abrahams et *al.*, 2003), chez la Vigne (Sparvoli et *al.*, 1994).

Chez les plantes, les anthocyanidols sont des métabolites *très instables*. De ce fait, ce type de molécules subit des glycosylations pour stabiliser sa structure. Plusieurs types de sucres peuvent être ajoutés. Cependant, les plus courants sont le glucose et/ou le rhamnose. Ces réactions sont catalysées par des **glucoses transférases** (GT) dont un certain nombre a été isolé chez les plantes modèles comme le Muflier (Martin et *al.*, 1991, le Pétunia (Tanaka et *al.*, 1995) ou encore la Vigne (Ford et *al.*, 1998).

Dans certains cas, les anthocyanidols subissent le transfert d'un radical méthyle en position 3' du noyau B catalysé par une O méthyle transférase (OMT). Quattrocchio et *al.* (1993) a reporté, chez le Pétunia, le clonage d'un ADNc codant une anthocyanine O méthyle transférase.

Par ailleurs, il est intéressant de parler d'une enzyme très peu étudiée mais dont l'activité s'avère déterminante en ce qui concerne la composition en anthocyanes dans les espèces comme la Vigne. Cette enzyme est la flavonoïde 3'5' hydroxylase qui comme son nom l'indique, permet l'*hydroxylation* en position 5' du noyau B de donner à partir du dihydrokaempférol, de la dihydromyricétine. Puis, après l'action des enzymes classiques de la voie de biosynthèse des anthocyanes, on aboutit aux composés classiques de type pétunidol, malvidol et delphinidol. À ce jour, un nombre réduit d'ADNc codant cette enzyme a été isolé. Deux loci génétiques identifiés chez le Pétunia (hf1 et hf2) contrôlent l'activité F3'5'H dans les fleurs. Hf1 agit dans les corolles, le pollen et le stigmate alors Hf2 intervient seulement au niveau des pétales. Les F3'5'H appartiennent à la super famille des enzymes à cytochrome P450 (Holton et *al.*, 1993a). Récemment, un ADNc codant une F3'5'H a été isolé chez *cataranthus roseus* (Kaltenbach et *al.* 1999). Chez la Vigne, nous possédons à l'heure actuelle dans nos banques EST, un clone ADNc codant ce type d'enzyme.

### 1.d) Les enzymes de la voie des tanins condensés.

La voie de biosynthèse débute avec la naringénine chalcone qui est modifiée par la chalcone isomérase pour former une variété de flavanone, la naringénine et l'ériodictyol (**Figure 17**). Ces flavanones peuvent suivre deux trajets métaboliques distincts. Le premier les emmène vers la production de dihydroflavonols comme la dihydromyricétine, la dihydroquercétine et la dihydrokaempférol par l'action de la flavanone 3  $\beta$  hydroxylase. Ces derniers serviront de substrats à la formation de flavonols comme la quercétine ou le kaempférol. Le second trajet métabolique fait intervenir la dihydroflavanone réductase qui va réduire les composés flavanones afin de former des molécules de 2R3S4S-leucoanthocyanidol comme le pélargonidol, le leucocyanidol ou encore le leucodelphinidol.

Ces molécules sont considérées comme les substrats directs de la *leucoanthocyanidine réductase* (Tanner et al., 2002) qui catalyse la formation des flavan-3-ols qui sont (+) *catéchine* et la (+)*gallocatéchine*, considérés comme les isomères 2R,3S,4S des proanthocyanidines. L'autre voie métabolique, à l'origine de la biosynthèse de *épicatechines*, *épigalocatechines*, *épiarzeléchines*, n'a été que très récemment découverte par le biais d'un mutant chez *Arabidopsis thaliana* dénommé *Banyuls* (Devic et al., 1999) et dont un ADNc identifié chez *Medicago trunculata* code une *anthocyanidine réductase*.

La sur-expression chez le Tabac et *Arabidopsis thaliana* de l'ADNc codant cette enzyme a permis d'accumuler des dérivés épicatechiques dans les fleurs et les feuilles de ces deux modèles végétaux (Xhie et al., 2003). Si à ce jour, les réactions enzymatiques qui aboutissent à la formation des composés primaires sont bien connues, il n'en est pas de même pour tout ce qui concerne la condensation et la polymérisation de ces précurseurs en 2R,3R,4S proanthocyanidines ou connues sous d'autres formes stéréochimiques.

### 1.e) Les Gluthation -S- Transférases.

Les tanins et les anthocyanes étant des composés, dont l'accumulation peut s'avérer néfaste pour la cellule, vont être stockés dans les vacuoles des cellules. Bien que l'on connaisse très bien les enzymes impliquées dans la synthèse des principaux intermédiaires des flavonoïdes, les étapes qui impliquent le transfert de ces composés ne sont pas bien connues.

Trois modèles ont été proposés :

- i) un transport direct des anthocyanes non modifiées,
- ii) un transport après leur modification
- iii) un transport modulé par une protéine transporteur (Mueller et Walbot, 2001).

Pour le modèle 1, Klein et al. (1996) ont démontré que certains flavonoïdes, dans l'orge, sont délocalisés dans la vacuole sans modification structurale. Pour le modèle 2, dans certaines conditions, l'acylation de la molécule semble être le moyen nécessaire pour stocker les anthocyanes (Hopp et Seitz, 1987). De plus, l'expression de gènes chez le Maïs (BZ2) et chez le Pétunia (AN9) codant des *glutathions S transférases* (GST) dans les tissus accumulant les anthocyanes, et formant des conjugués avec les anthocyanes (Marrs et al., 1995 ; Alfenito et al., 1998) confirment bien que ces protéines sont capables aussi de fixer des anthocyanes afin de les maintenir dans les vacuoles opérant ainsi plus comme une sorte protéine transporteur qu'un agent de détoxification. Récemment, un nouvel ADNc codant une GST a été identifié chez *Arabidopsis thaliana*, *tt19*, suite à une étude sur un mutant de coloration des graines. Cette protéine est impliquée à la fois dans le transport des anthocyanes mais aussi dans celui des proanthocyanidines correspondant aux tanins condensés (Kitamura et al., 2004).

## 2) Rôle global et intérêt des flavonoïdes.

Chez les plantes, le rôle biologique des flavonoïdes revêt différents aspects. Le plus reconnu est sa fonction écologique puisque les propriétés d'émission de la lumière de certains favorisent *l'attraction des pollinisateurs* liée aux motifs colorés des fleurs. Il en est de même pour les fruits (raisin, prune, cerise, fraise) qui accumulent des pigments de type flavonoïdes avec pour seul objectif d'attirer des agents disséminateurs comme les oiseaux ou les rongeurs. Par ailleurs, ce type de molécules a suscité un intérêt croissant auprès de la communauté scientifique du fait qu'elles présentent des propriétés nutritionnelles in déniabes pour la santé humaine. À ce jour, des centaines de travaux scientifiques ont été réalisés sur leurs propriétés antioxydantes ou anticancéreuses notamment dans le traitement de certains cancers.

### 2.a) Les anthocyanes.

#### 2.a.1) Fonctions biologiques des anthocyanes.

La fonction la plus significative des anthocyanes est leur capacité, du fait de leurs propriétés optiques, de fournir à la plante ou au produit de la plante une couleur. Cette dernière dépendra de la nature et de la quantité de pigments présents qui sera susceptible d'attirer les animaux pour la pollinisation et la dispersion des graines. Par conséquent, leur valeur est considérable dans la co-évolution des interactions plantes-animaux. Cependant, les anthocyanes ne jouent pas qu'un rôle favorisant la pollinisation, elles peuvent intervenir en tant que phytoalexines ou agents antibactériens. Certains auteurs considèrent d'ailleurs que les anthocyanes peuvent jouer avec d'autres flavonoïdes un rôle dans la mise en place *des mécanismes de résistances* suite à l'attaque par un pathogène. La cyanidine-3-glucoside est connue pour protéger les feuilles de coton contre le virus du Tabac (Hedin et *al.*, 1983).

#### 2.a.2) Métabolisme des anthocyanes.

Les anthocyanes ont depuis une vingtaine d'années suscité des études cliniques concernant *leurs effets bénéfiques* sur la santé humaine (Kuhnau et *al.*, 1976; Bohm et *al.*, 1998 ; Burns et *al.*, 2000). La plupart des travaux a été réalisé jusqu'à présent sur les dérivés de la Cyanidine, considérée comme l'anthocyanine la plus répandue dans le règne végétal.

Cette dernière est largement distribuée dans la nourriture humaine à travers les cultures fruitières et en particulier les oranges sanguines cultivées en Europe méridionale et en Floride, ou encore de certains légumes ou bien de la Vigne.

Néanmoins, pendant très longtemps et malgré leurs potentialités antioxydantes démontrées *in vitro* (Wang et *al.*, 1997 ; Proteggente et *al.*, 2002), on a cru que seuls les anthocyanidines, c'est à dire les anthocyanines aglycones étaient absorbées par les cellules intestinales et véhiculées à travers le flux sanguin. Ce dogme a été remis en question par diverses études qui ont prouvé l'absorption de flavonoïdes glycosylés et notamment des 3- $\beta$ -glucoside de cyanidol ou C3G (**Figure 18**) et par conséquent leur présence dans le plasma humain et du rat (Youdim et *al.*, 2000 ; Tsuda et *al.*, 1999 ). Il semble en fait que les anthocyanines soit partiellement hydrolysées suite à une réaction de  $\beta$ -glycosidation dans les intestins expliquant alors la détection dans le jejunum de la forme aglycone (Tsuda et *al.*, 2000). Néanmoins, l'hydrolyse partielle des C3G suggère la présence d'un récepteur de ce type de composés impliqué lors de l'absorption dans les intestins (Cao et *al.*, 2001).

### 2.a.3) Les activités anti-oxydantes des anthocyanes.

La déficience naturelle en électron des anthocyanes en fait de bons candidats comme *pièges de radicaux libres*. En dépit de leur instabilité à un pH physiologique, les anthocyanes sont considérées comme des molécules présentant **un fort pouvoir antioxydant** (SatueGarcia et al., 1997 ; Wang et al., 1997). Leurs potentialités antioxydantes sont **modulées** par la **variabilité de leurs structures chimiques** et notamment de la variabilité électronique de leurs noyaux aromatiques qui jouera un rôle clé dans l'acceptation des électrons libres des molécules radicalaires (Wang et al., 1997).

Ces capacités antioxydantes ont été validées à la fois *in vitro* mais aussi *in vivo*. Ainsi, **l'inhibition de l'oxydation des lipides** dans un système de liposomes a été observée suite à l'ajout de différents composés de type anthocyanes (Wang et al., 1999). Toutefois, le **nombre de résidus glucides** présents sur le squelette anthocyanique s'avère être **un élément limitant de l'activité antioxydante** (Tsuda et al., 1996). Des anthocyanes extraites de Cassis contenant en majorité des glucosides de cyanidol incubées avec des cellules sanguines permet d'augmenter la résistance des cellules au stress oxydatif (Youdim et al., 2000) (**Figure 19**). Auparavant, Tsuda et al., (1994) avaient démontré que les capacités antioxydantes de la C3G ainsi que son aglycone correspondant avec d'autres modèles biologiques comme les cellules membranaires de foie de rat.

Un autre aspect de l'intérêt des anthocyanes concerne leurs activités inhibitrices dans **l'oxydation des LDL** (Low Density Lipoprotéines) (Kondo et al., 1994). Il a été démontré, en effet, que la consommation modérée pendant deux semaines de vin rouge augmentait de quatre fois la quantité de polyphénols dans la fraction LDL de plasma se traduisant par une **diminution significative** de leur oxydation (Fuhrman et al., 1996). Des variations d'inhibition de l'oxydation de LDL ont été observées selon l'origine des vins. Ainsi, cette inhibition pouvait varier de 37% à 65% dans les vins rouges alors que pour les vins blancs les pourcentages d'inhibition varient de 27 à 46% (Frankel et al., 1995).

### 2.a.4) Autres propriétés biologiques.

Un autre effet important des anthocyanes sur d'autres molécules cibles concerne **leur rôle protecteur de l'ADN** avec la formation de complexe ADN-Anthocyane (Sarma et Sharma, 1999) rendant l'ensemble moléculaire plus stable. La C3G issue d'un extrait aqueux de Vigne permet de stabiliser de manière significative le clivage d'une molécule d'ADN suite à une dénaturation thermique (Mas et al., 2000). Un autre effet des anthocyanes concerne leurs propriétés inhérentes à leurs structures physico-chimiques. Ainsi, elles sont capables de protéger des dommages causés par les émissions de lumières UV. Tsuda et al., (1996) a démontré le rôle des anthocyanes extrait des téguments graines de *Phaseo vulgaris* dans la protection des liposomes suite à une émission de lumières UV.

De nombreuses molécules présentes dans notre nourriture ont des effets mutagènes irréversibles qui sont à l'origine de nombreux mécanismes cancéreux. Toutefois, l'effet de telles molécules peut être **atténué par l'addition de composés phénoliques comme les anthocyanes** (Yoshimoto et al., 1999 a,b; Hagiwara et al., 2001). L'administration de jus de raisin à des rats inhibe les dommages de l'ADN causés au niveau du colon par le 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo (4,5-b) pyridine, qui est considéré comme l'un des agents mutagènes les plus prépondérants dans la formation des cancers du colon (Miyata et al., 2000). Les **propriétés anti-cancéreuses** des cyanidines ont été récemment prouvées par diverses études sur des lignées carcinogènes humaines (Meiers et al., 2001) où la cyanidine

***inhibait fortement l'activité*** du récepteur à l'EGF (Epithelium Growth Factor). De plus des propriétés anti-inflammatoires ont été prêtées aux anthocyanes car elles diminuent les réactions d'arthrose et de goutte. Enfin, un effet gastro-protecteur a été rapporté dans plusieurs études chez l'homme suite à l'administration d'une anthocyane IdB1027 (Barzaghi et al., 1991 ; Cristoni et al., 1989 ; Mertz-Nielsen et al., 1990) ainsi qu'un effet bénéfique sur la vision chez des patients qui souffraient de désordres oculaires tels que la myopie ou encore des glaucomes. La Cyanidine 3 Rhamno 6 Glucoside nommée aussi Kéracyanine présente des potentialités antivirales importantes notamment contre les virus A et B de type influenza ou encore le virus de l'herpes (Knox et al., 2001).

## **2.b) Les flavonols.**

### **2.b.1) Rôle biologique.**

Les flavonols comme les anthocyanes sont des pigments qui interviennent dans l'attraction des agents pollinisateurs (Holton et Cornish, 1995). Mais d'autres propriétés leur sont attribuées. Ainsi, il apparaît de plus en plus évident que certains flavonols jouent un rôle protecteur vis à vis des UV pour limiter les dommages causés par ce type d'irradiation chez la baie de raisin par exemple (Winkel et Shirley, 2001).

Par ailleurs, ils joueraient aussi un rôle clé dans les ***interactions plantes-insectes*** en modifiant le comportement de certains insectes vis-à-vis de certaines fleurs ou graines. Ainsi, la rutine s'avère être un bon phagostimulant pour *Heliothis virescens*, un insecte dont le comportement alimentaire sera stimulé pour des concentrations de rutine comprise entre  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ M. Par contre à des concentrations supérieures, on observe un effet inverse contre les insectes (Blaney et Simmonds, 1983).

### **2.b.2) Intérêt thérapeutique.**

La plupart des études relatant les effets thérapeutiques des flavonols l'a été fait en prenant comme molécule modèle la quercétine ou 3,3',4',5,4-pentahydroxyflavone considéré comme le flavonol type le plus répandu dans les fruits et les légumes. De nombreuses études *in vitro* ont montré les effets biologiques de la quercétine comme l'induction de l'apoptose sur des cellules tumorales, l'inhibition de protéine kinase, la modulation du cycle cellulaire ou l'inhibition de l'angiogenèse (Formica et Regelson, 1995).

En plus de ces effets physiologiques, leurs structures biochimiques en font de ***puissants antioxydants***. Les groupements hydroxyles des noyaux phénoliques qui agissent en tant que donneurs d'électrons sont responsables de la neutralisation des radicaux libres (Bors et al., 1994). De plus, la structure catéchol qui possède de deux groupes hydroxyles proches sur les noyaux phénoliques favorise énormément la capacité de la molécule à servir de donneur d'électrons (Brown et al., 1998) garantissant ainsi à ce type de composé un fort pouvoir anti-radicalaire (Rice-Evans et al., 1996).

Ces effets antioxydants ont été validés aussi sur la ***peroxydation des lipoprotéines*** avec une diminution de la production d'esters cholestériques (CE-OOH) en présence de métabolites de quercétine (**Figure 20**) (Yamamoto et al., 1999) Toutefois, il ne faut pas oublier que la quercétine, présente dans les aliments, se trouve le plus fréquemment sous forme glycosylée, modifiant considérablement ses propriétés antioxydantes.

En effet, il a été démontré qu'un glucose lié à *une quercétine en position 4'* privant ainsi la molécule d'une structure catéchol avait *un pouvoir antioxydant beaucoup plus faible* qu'une quercétine-3-glucoside qui conserve une structure catéchol malgré l'addition d'un sucre (Yamamoto et *al.*, 1999).

Néanmoins, comme pour les anthocyanes, de récentes études ont démontré que ces composés avaient la capacité d'être absorbés sous forme active. En effet, les quercétines glycosylées ont la capacité d'interagir avec des récepteurs sodium-dépendants localisés au niveau de l'épithélium intestinal (Gee et *al.*, 2000). Deux mécanismes potentiels (**Figure 21**) ont été proposés pour le transport des quercétines glycosylées, soit par un transporteur de glucose, **SGLT1** (Walgren et *al.*, 2000 a,b ; Wolfram et *al.*, 2002), soit par une hydrolyse extracellulaire suite à l'action d'une lipase, la **LPH** suivie par la diffusion passive de l'aglycone au niveau de l'épithélium intestinal.

## 2.c) Les tanins.

### 2.c.1) Rôle biologique.

Si leurs rôles dans la vinification et leurs propriétés thérapeutiques ont été démontrés à plusieurs reprises. Peu de choses sont connues concernant leur rôle biologique sur la plante. Toutefois, l'augmentation de la production de tanins est souvent associée à l'apparition de maladies (Heil et *al.*, 2002). Par conséquent, un rôle protecteur contre les infections, les insectes ou encore les herbivores leur a été attribué (Haslam, 1989 ; Porter, 1988). La localisation tissulaire définira leur rôle ainsi dans les tissus comme les bourgeons où ils auront un rôle *de protection contre le froid*. Sur les feuilles, les tanins, localisés dans les assises supérieures de l'épiderme, protègent contre les prédateurs. Au niveau des racines, présents dans l'hypoderme, ils jouent probablement un rôle de *barrière chimique à l'encontre de pathogènes* cherchant à pénétrer et coloniser par les racines. Dans les graines, localisés au niveau du tégument et dans l'aleurone, ils sont associés au maintien de la dormance. On leur prête aussi, à ce niveau, des propriétés biocides.

### 2.c.2) Intérêt thérapeutique.

Les tanins condensés appartiennent à un groupe de polyphénols dont les propriétés biologiques sont nombreuses. Les extraits de pépins de raisin ont d'ailleurs concentré, depuis quelques années, la plupart des études cliniques qui ont été réalisées sur des extraits proanthocyanidiques d'origine végétale. Dans les très nombreuses propriétés des tanins, une d'entre elles concerne leurs capacités *anti-cholestérolémiantes* et *anti-oxydantes* au niveau cellulaire. Ainsi, les GSPE pour « Grape Seed Proanthocyanidins Extracts » en combinaison avec d'autres molécules sont connus pour être de puissants inhibiteurs de l'augmentation du taux de taux de cholestérol total et de taux de LDL oxydés chez des sujets atteints d'hypercholestérolémie.

Une étude récente a démontré que le composé dénommé IH636 qui est un GSPE possède des propriétés antioxydantes supérieures à la vitamine C, E et la bêta-carotène (Bagchi et *al.*, 2003). De plus, une étude a démontré qu'un régime de 50 à 100 mg/kg avec du GSPE pendant 10 semaines, *réduit le risque de développement* athérosclérotique chez le Hamster de plus de 50 % (Vinson et *al.*, 2002). Dans un autre domaine, des extraits à base de pépins de raisin induit l'apoptose sur des lignées DU145 cancéreuses humaines (Agarwal et *al.*, 2002).

Récemment, il a été démontré que ces mêmes extraits à base de pépins et de pellicules de raisin contenant de forte teneur en tanins avaient un effet antiplaquettaire supérieur quand ils étaient consommés de manière combinée (Shanmuganayagam *et al.*, 2002) (**Figure 22**). Ces résultats avaient déjà été appréhendés par une étude qui démontrait l'effet anti-plaquettaire du jus de raisin administré chez le chien et le singe alors que le jus d'orange n'avait aucun effet (Osman *et al.*, 1998).

### **3) Facteurs influençant la biosynthèse des flavonoïdes chez la baie de raisin.**

La plupart des études concernant l'effet de facteurs biotiques ou abiotiques sur la biosynthèse des flavonoïdes concerne l'effet sur la biosynthèse des anthocyanes. Mais on peut imaginer que des effets similaires sont observés sur les autres classes des flavonoïdes comme les flavonols ou les tanins dans la mesure où un certain nombre d'enzymes sont communes entre ces deux voies et celle qui conduit aux anthocyanes.

#### **3.a) La lumière.**

L'intervention de la lumière dans la formation des anthocyanes est connue depuis un certain nombre d'années. Ainsi, les teneurs en anthocyanes produites pendant la maturation de la baie peuvent diminuer autant par la diminution de l'éclairement que par un éclairement artificiel nocturne ou encore par un ombrage des plantes, réalisé à la fin de la Véraison (Ribereau-Gayon, 1958, 1959) (Pirie, 1977). Une alternance de périodes lumineuses et de périodes sombres est nécessaire à la production des anthocyanes. L'égalité des jours et des nuits, pour des températures comprises entre 20 et 25°C, est considérée comme une condition optimale pour permettre la production maximale de pigments (Siegelman et Hendricks, 1957, 1958 ; Rabino et Mancinelli, 1986).

#### **3.b) La température.**

Des températures supérieures à 35°C ou inférieures à 15°C diminuent fortement l'accumulation de ces pigments (Liewer, 1977; Tomana *et al.*, 1979, Haselgrove *et al.*, 2000 ; Bergqvist *et al.*, 2001). Dans certains cas, un stress induit par de faibles températures peut induire, à la fois, l'expression des gènes structuraux correspondant aux anthocyanes et une pigmentation anthocyanique accrue des baies (Christie *et al.*, 1994).

#### **3.c) Les facteurs hydriques.**

L'influence des facteurs hydriques sur l'accumulation des anthocyanes des baies a été étudiée sous des aspects aussi divers que la pluviométrie, l'arrosage, l'irrigation et l'état hydrique du sol. D'une manière générale, un *excès d'humidité ou d'irrigation* entraînent une diminution de la concentration en anthocyanes (Rankine, 1964, Madero-Tarmago, 1979 ; Guilloux, 1981). De même, un régime hydrique trop déficitaire conduit au même résultat (Guilloux, 1981). Récemment, des essais de stress hydriques opérés sur des boutures fructifères ont confirmé l'augmentation de la teneur en anthocyanes dans les baies (Hilbert, 2002).

#### **3.d) Influence des sucres.**

De nombreux résultats semblent indiquer une réelle corrélation entre la production des anthocyanes et l'accumulation des sucres dans le péricarpe et dans les cellules de la pellicule pendant la maturation de la baie (Pirie et Mullins, 1977; Pirie, 1979). De nombreux travaux ont porté sur le rôle des sucres et en particulier du saccharose sur la production des anthocyanes dans des cultures cellulaires de certaines espèces végétales (Nozue *et al.*, 1987,

Sakamoto et *al.*, 1994 ; Meyer et *al.*, 1995) mais aussi de la Vigne (Cormier et *al.*, 1990 ; Do et Cormier, 1991 ; Larronde et *al.*, 1998). Ainsi, l'administration de 0,15 M de Saccharose dans des cultures cellulaires de Vigne (*Vitis vinifera*) multiplie **par douze la production basale** d'anthocyanes (**Figure 23**) (Larronde et *al.*, 1998). Il faut aussi noter que chez *Pétunia hybrida*, des éléments de régulation en cis sensibles à plusieurs concentrations de divers sucres (**Figure 24**) ont été identifiés sur le promoteur du gène codant la chalcone synthase, la première enzyme de la chaîne de biosynthèse des flavonoïdes (Tsukaya et *al.*, 1991) suggérant que le sucre pourrait être un élément régulateur clé de l'expression de ces gènes structuraux.

### 3.e) Influence des hormones.

Depuis quelques années, des études ont montré que l'apport cytokinine exogène permettait d'augmenter l'accumulation des anthocyanes chez les plantes avec en parallèle une augmentation du taux de transcrits codant la PAL, la CHS, la CHI et la DFR (Deikman et Hammer, 1995).

De même, l'ajout d'auxine synthétique (AOBT pour acide oxyacétique - benzothiazole-2) induit aussi une augmentation de la production en anthocyanes dans des cultures de cellules de fraises (Mori et *al.*, 1994). En 1997, Davies et *al.* prouvaient l'effet direct de **l'auxine** sur l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des anthocyanes chez la baie de raisin se traduisant par un décalage de quatre semaines dans l'expression de gènes codant la CHS et celui de l'UFGT se traduisant par un décalage de l'accumulation des anthocyanes dans la baie de raisin (**Figure 25**).

Ce retard, dans l'expression des deux gènes, était, en fait, associé à un retard dans l'accumulation de l'acide abscissique dans les baies après le traitement à l'auxine (**Figure 26**). Une autre hormone a suscité l'intérêt des chercheurs en ce qui concerne son éventuel rôle dans la production d'anthocyanes. Il s'agit de l'acide abscissique (ABA). L'ABA présente deux pics d'accumulations dans la baie au début du développement du fruit et à la Véraison. La baie se comporte comme un pôle attractif vis à vis de cette hormone, en particulier au moment de la Véraison où de grandes quantités d'ABA sont mesurées (Broquedis, 1987 ; Koussa et *al.*, 1993).

Divers auteurs ont déjà suggéré que l'acide abscissique pourrait jouer un rôle dans **le contrôle hormonal de la maturation** de la baie de raisin et notamment dans la production de composés phénoliques comme les anthocyanes ou d'autres composés phénoliques (Hale et Coombe, 1974 ; Coombe, 1976). Son action sur la production d'anthocyanes serait en étroite liaison avec la production endogène d'éthylène ayant lieu chez la baie de raisin au cours de son développement.

En effet, bien que le raisin soit considéré comme un fruit non-climactérique, plusieurs analyses biochimiques ont démontré la présence d'éthylène au cours du développement de la baie (Coombe et Hale, 1973 ; Alleweldt et Koch, 1977 ; Mac Glasson, 1985). Ce pic d'éthylène dans la baie se situe au début de la diminution de l'acidité et de l'accumulation des sucres (Koch et Alleweldt, 1978).

Hale et *al.* (1970) ont même montré que le traitement du raisin avec de l'éthylène ou l'acide 2-chloroethylphosphonique (2-CEPA), générateur d'une synthèse d'éthylène endogène, appliqué 8 semaines après la floraison avançait la maturation avec en contre-partie une **diminution de la taille** des baies.

À l'opposé, ce même traitement administré plutôt au cours du développement (4, 5, 6 et 7 semaines) retarde la maturation. Récemment, El-Kereamy et *al.* (2003) ont montré qu'un ajout d'éthylène exogène stimulait l'expression de certains gènes structuraux liés à la biosynthèse des anthocyanes dans la baie comme l'*ANS* et l'*UFGT*. Ceci confirme donc le rôle prépondérant de l'éthylène sur la régulation de la biosynthèse des polyphénols avec des différences de « comportement » de l'éthylène selon le stade de développement.

En conclusion, il semble que l'effet de l'éthylène dépend de la présence ou non d'un autre composé de la baie qui va modifier son action régulatrice, au cours du développement. Ce composé semble être l'ABA. En 1973, Coombe et Hale proposent que le déclenchement de la maturation et l'effet de l'éthylène seraient dus à une augmentation en parallèle de la concentration en ABA dans la baie de raisin.

Le déclenchement de la maturation pourrait être dû en fait à un **changement de sensibilité à l'éthylène** par la plante induit par l'ABA. Ce changement de sensibilité serait provoqué par une interaction entre l'ABA et l'éthylène, l'accumulation de l'ABA jusqu'à un certain niveau permettant à l'éthylène de réagir avec l'ABA « pour initier » la maturation.

### **3.f) La nutrition azotée et l'alimentation en phosphate.**

D'après la **figure 27**, des études en champ expérimental sur des boutures fructifères ont montré une **forte corrélation positive entre la nutrition azotée** et la production d'anthocyanes (Hilbert et *al.*, 2002). L'alimentation à des concentrations décroissantes de phosphate inorganique de cultures cellulaires de Vignes se traduit aussi par une élévation de l'accumulation en anthocyanes au bout de cinq jours, corrélée à une activation de l'activité de la Dihydroflavonol Reductase dans ces mêmes cellules (Dedaldechamp et *al.*, 1995).

### **3.g) Accumulation d'anthocyanes suite à un stress biotique ou abiotique.**

Certaines études montrent que l'accumulation d'anthocyanes a été observée in vitro suite à des expériences d'élicitations. Ainsi, on a pu observer une diminution de la production d'anthocyanes dans des cultures ayant été mis en présence de l'Euypine qui est une toxine produite par *Eutypia lata* dans des cellules de Vigne souche Gamay. Cette diminution est en fait due à l'inhibition de la transcription du gène codant l'UFGT (Afifi et *al.*, 2003). Des traitements UV sur des cellules de carotte, *daucus carotta*, ainsi que des élicitations de type fongique par *Pythium aphanidermatum* semblent aussi augmenter fortement la production d'anthocyanes, en parallèle à une augmentation de l'expression des gènes structuraux associés à la biosynthèse des anthocyanes (Glassgen et *al.*, 1998).

En conclusion, si les résultats présentés ci dessus ont été observés sur la production d'anthocyanes, le caractère commun d'un certain nombre d'enzymes entre les différentes classes de flavonoïdes suggère que l'ensemble de la voie des flavonoïdes est sous l'influence de ces nombreux paramètres cités dessus. On peut donc émettre l'hypothèse d'une régulation génique au niveau transcriptionnelle. Mais avant d'aborder le rôle prépondérant des facteurs de transcription sur la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes, nous allons faire un rappel bibliographique concernant la régulation transcriptionnelle chez les végétaux et les différentes classes de facteurs de transcription connues.

## Partie 4 La régulation transcriptionnelle.

### 1) Généralités.

Les plantes, à la différence des animaux pourvus de mobilité, ont besoin de mettre en place *des stratégies* pour répondre rapidement aux changements des conditions environnementales des milieux dans lesquelles elles se développent. Au cours de leur vie, les plantes intègrent un nombre croissant des signaux internes et/ou externes et déclenchent des mécanismes de régulation génique répondant ainsi de manière appropriée à ces signaux. ***L'évènement de transcription apparaît donc comme un élément primordial dans les mécanismes développementaux et d'adaptations nécessaires à la pérennité de la plante.*** La régulation de l'expression des gènes codant des protéines de réserves, ayant lieu seulement au cours des stades spécifiques du développement de la graine et nulle part ailleurs dans la plante, est un exemple frappant du contrôle génique qui peut se dérouler au sein des différents tissus d'une plante. Dans un même registre, les différents stress biotiques ou abiotiques que peut subir une plante sont à l'origine de l'activation d'une batterie de gènes impliqués dans la réponse de la plante face à ces modifications soudaines.

Quand la lumière frappe une feuille étiolée, l'expression de nombreux gènes codant des protéines chloroplastiques, mitochondriales, péroxysomales ou encore cytosoliques est activée. Dans les différentes étapes clés qui aboutissent à la production d'une protéine en réponse à un signal cellulaire ou extérieur, l'initiation de la transcription est considérée comme une étape majeure. Le séquençage global du Génome d'*Arabidopsis Thaliana* a d'ailleurs confirmé l'importance de la transcription en tant que mécanisme cellulaire primordial pour le bon fonctionnement des plantes. En effet, 6 % des gènes d'*Arabidopsis thaliana* codent des facteurs de transcription, soit environ **1700** (Riechmann et Ratcliffe, 2000).

Chez les plantes, les facteurs de transcription peuvent être divisés en quatre classes. Une première classe, considérée comme majeure du fait de leur nombre, est composée ***d'activateurs ou de répresseurs de la transcription***. Leur objectif est de se fixer sur des séquences spécifiques de l'ADN localisées sur les promoteurs des gènes. Cette spécificité de séquence sera à l'origine de la spécificité de la régulation génique. Une deuxième classe comprenant des facteurs de transcription dit ***co-activateurs ou co-répresseurs*** a tendance à ***moduler l'expression*** des ***activateurs-répresseurs*** de la première classe en interagissant avec ces derniers sans pour autant se fixer sur les séquences nucléotidiques. Leurs interactions avec des facteurs de la première classe leur permettent d'acquérir une certaine spécificité qui sera fonction du promoteur du gène cible. La troisième classe de facteur concerne ***les facteurs de transcription généraux*** qui sont des composants essentiels du complexe Pol II initiateur de la transcription. Une quatrième classe a été identifiée depuis une dizaine d'années, il s'agit de ***facteurs de transcription dit architecturaux*** qui sont impliqués dans la conformation chromatinienne de l'ADN.

L'efficacité de la transcription dépendra de la bonne accessibilité du complexe d'initiation à la transcription à l'ADN. La régulation de l'organisation de l'ADN, l'intégrité des octamères dans les nucléosomes et le niveau élevé de condensation chromatinienne sont autant de paramètres qui ont un impact sur l'activation et/ou la répression transcriptionnelle des gènes et par conséquent sur des phénomènes comme la différenciation cellulaire ou encore le silencing (Horn et Peterson, 2002).

En conclusion, la conformation chromatinienne de l'ADN et la transcription elle-même sont deux éléments majeurs intimement et chronologiquement liés à l'expression des gènes.

## 2) La chromatine et la régulation transcriptionnelle chez les plantes.

Depuis quelques années, des études sur la conformation chromatinienne ont permis d'identifier et de caractériser de manière biochimique et moléculaire plusieurs familles de protéines appartenant à la classe IV des facteurs de transcription, qui sont associées à la chromatine et qui modifient de manière conséquente sa structure (Francis et Kingston, 2001; Yadegari et *al.*, 2000; Goodrich et *al.*, 2002). *La dynamique chromatinienne* est un pré-requis à une bonne transcription.

La position des nucléosomes sur la chromatine, unités basiques comprenant 146 bases nucléiques et un octamère d'histone de différentes catégories (H3, H4, H8), est un élément déterminant dans la régulation transcriptionnelle et dans la mise en place sur l'ADN du complexe de l'initiation de la transcription RNAPol II. Le contrôle de la position et de la conformation du nucléosome par des complexes protéiques de type SWI/SNF et ISWI (Imitation Switch) permettra, par la suite, de réguler la transcription de manière localisée en favorisant l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle (Narlikar et *al.*, 2002 ; Simpson et *al.*, 2002) (**Figure 28**). Plusieurs niveaux de régulation existent au niveau de la chromatine, mais celui qui fait l'objet de nombreuses études depuis quelques années, concerne les modifications structurales ayant lieu au niveau des histones.

En effet, les octamères d'histones sont sujets à des modifications post-traductionnelles comprenant des acétylations, des phosphorylations et des méthylations qui vont modifier leur charge ionique ou leur caractère hydrophobe avec une répercussion sur leur accessibilité envers la machinerie transcriptionnelle.

### 2.a) L'acétylation des histones.

Un certain nombre d'études a montré que les histones non acétylés auraient tendance à interagir avec des nucléosomes voisins, diminuant ainsi l'accessibilité du complexe de la transcription (Luger et *al.*, 1997). *L'acétylation des histones* correspondrait donc à une phase dite première de la régulation transcriptionnelle en augmentant l'accessibilité du complexe de transcription Pol II. Ce mécanisme réalisé par une classe de protéines appelées histone acétyl transférase ou HAT permet l'ajout d'un radical acétyle sur des résidus lysines au niveau de l'extrémité amino-terminale des histones H3 préférentiellement (Waterborg et *al.*, 1990). Il a été constaté que des niveaux élevés d'acétylation étaient souvent corrélés à une augmentation de l'activité transcriptionnelle (Wu et Grunstein, 2000). Chez les plantes, deux types de HATs semblent exister (Stockinger et *al.*, 2001 ; Bordoli et *al.*, 2001a,b), mais leur caractérisation fonctionnelle reste à définir à ce jour.

### 2.b) La déacétylation des Histones.

Afin de *contrebalancer les effets activateurs des HAT*, des Histones Déacétylases ou HDAC interviennent dans la répression transcriptionnelle ou le « gene silencing ». Parmi les quatre types de HDACs identifiées chez les plantes (Lusser et *al.*, 2001; Graessle et *al.*, 2001), trois sont présentes chez les autres organismes eucaryotes.

Par contre, une est spécifique aux plantes, il s'agit de la classe des HDA, identifiée pour la première fois chez le Maïs avec le gène HD2 (Lusser et al., 1997).

Plusieurs études de génomiques fonctionnelles chez *Arabidopsis thaliana* ont montré leur implication dans la régulation de mécanismes aussi variés que *la sénescence* (Wu et al., 2000), *l'identité florale* (Tian et Chen, 2001) ou encore *le développement des graines* (Wu et al., 2000).

### 2.c) La méthylation des histones.

En parallèle à ces mécanismes d'acétylation et de déacétylation, d'autres modifications de la structure chromatinienne ont lieu comme la méthylation qui va, dans la majorité des cas, favoriser une répression transcriptionnelle. Cette méthylation affectera, à la fois, les histones et l'ADN. Trois types de méthyltransférases ont été décrites chez les plantes (Finnegan et Kovac, 2000). Leurs contrôles épigénétiques semblent affecter différents groupes de gènes tels que celui *de la défense* (Cao et al., 2002a), celui de *contrôle du temps de la floraison* (Soppe et al., 2000) ou encore celui *du régulateur floral SUP* (Cao et al., 2002b). Si les mécanismes de méthylation à l'ADN et ceux de méthylation aux histones sont intimement liés, il existe des exceptions où la répression des gènes par méthylation des histones ne nécessite pas obligatoirement celle de l'ADN (Amadeo et al., 2000).

Récemment, plusieurs protéines présentant des similarités avec les Polycomb protéines de la Drosophile ont été recensés chez les plantes comme des régulateurs du développement. Ces facteurs bloquent l'accès de l'ADN aux régulateurs transcriptionnels et/ou à la machinerie centrale de l'initiation de la transcription en favorisant une configuration répressive de l'ADN au niveau d'un promoteur donné (Francis et Kingston, 2001). Le premier facteur, identifié chez les plantes, est le facteur Curly Leaf (CLF) qui maintient la répression transcriptionnelle de gènes homéotiques (Goodrich et al., 1997 ; Meyerowitz et al., 2002).

**En résumé, il apparaît qu'en amont de la régulation transcriptionnelle des gènes par la machinerie classique, la dynamique chromatinienne est un élément clé des régulations qui ont lieu à posteriori et que son rôle sera déterminant dans la transcription des gènes par le complexe initiateur de la transcription POLII.**

### 3) Le complexe initiateur de la transcription POL II.

Le complexe de l'initiation de la transcription RNA Pol II, composé de 14 sous unités, a pour fonction unique de catalyser la synthèse du brin d'ARN à partir de l'ADN. En parallèle à ce complexe, viennent se greffer des facteurs de transcription généraux (TFIIA, IIB, IID, IIE, IIF et IIH) essentiels à la reconnaissance de séquences promotrices par la Pol II et à la mise en route de l'initiation de la transcription (**Figure 29**). Il semble donc que la fonction majeure des facteurs de transcription généraux est de faciliter l'assemblage du complexe Pol II. D'autres facteurs, dits accessoires, vont se fixer au complexe Pol II et peuvent exercer un rôle de co-activation. Il se pourrait qu'ils jouent aussi un rôle dans la conformation de la chromatine afin de faciliter l'accès au complexe d'initiation de la transcription. En 1996, un modèle, basé sur des études *in vitro* concernant le rôle de chacune des protéines impliquées dans ce complexe, a été validé (Roeder et al., 1996).

Toutefois, la majeure partie de la régulation transcriptionnelle dépend de l'activité de protéines modulatrices ou facteurs de transcription qui peuvent agir seul ou en coopération venir se fixer en amont des séquences relatives à la transcription (TATA, CAAT box).

#### 4) Les facteurs de transcription chez les plantes.

L'intérêt scientifique des facteurs de transcription semblait, jusqu'à peu de temps, relativement peu développé dans le règne végétal en comparaison aux études du même genre réalisées sur le modèle animal ou sur la Levure. Toutefois, depuis une dizaine d'année, de plus en plus d'études de caractérisation fonctionnelle de facteurs de transcription voient le jour. La cartographie génétique de l'ensemble du génome d'*Arabidopsis thaliana* en 2000 a d'ailleurs provoqué une véritable explosion des études consacrées à ce type de protéines.

D'un point de vue structural, les études de domaines fonctionnels par mutation ou analyses fonctionnelles ont démontré qu'un facteur de transcription classique était composé *d'une région fixatrice à l'ADN, d'un site d'oligomérisation, d'un domaine de régulation de la transcription et d'un signal de localisation nucléaire* bien que certains semblent manquer soit de domaine de régulation de la transcription (Goff et al., 1992), de région fixatrice à l'ADN (Washburn et al., 1997 ; De Vetten et Ferl, 1995, Hill et al., 1996) ou encore de signal de localisation nucléaire.

Le classement des facteurs de transcription dépend de données structurales inhérentes, la plupart du temps, *à la séquence primaire en acide aminé* de la protéine. La distinction entre différents facteurs se fait donc en fonction ou non de la présence et de *l'espacement de résidus conservés* (Guilfoyle et al., 1998; Takatsuji, 1998 ; Riechmann et Meyerowitz, 1997; Martin et Paz-Ares, 1997; Sakamoto et al., 1993). Ainsi, en fonction du nombre et de l'arrangement des résidus cystéine (C) et Histidine (H), les facteurs contenant des doigts de zinc se divisent en cinq classes (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>H, C<sub>2</sub>C<sub>2</sub> ou Gata Finger), C<sub>3</sub>H<sub>4</sub> ou Ring Finger et C<sub>2</sub>HC<sub>5</sub> ou LIM finger (Li et al., 1998). Par contre, les facteurs de transcription, se composant d'un grand nombre d'éléments, se classent en fonction d'un ou plusieurs domaines spécifiques localisés sur la séquence primaire en dehors des régions conservées. C'est le cas, par exemple, pour les facteurs de type « **MYB, WRKY** » ou encore les facteurs à homéodomains. Nous allons essayer de mieux comprendre le rôle de ces facteurs en définissant chacun des domaines qui le composent.

##### 4.a) Le domaine de fixation à l'ADN.

Il comprend des résidus d'acides aminés qui vont interagir avec les bases présentes dans l'hélice d'ADN permettant la formation de liaisons hydrogènes (non covalentes) qui va *stabiliser l'interaction ADN-protéine*. La position, la nature à la fois des acides aminés de la protéine et des acides nucléiques de la séquence double brin d'ADN détermineront la spécificité du facteur de transcription (Huang et al., 1996 ; Aukerman et al., 1991). D'autres types de résidus peuvent améliorer la fixation de la protéine en engageant des interactions dites non spécifiques avec soit le phosphate ou le squelette déoxyribose des bases nucléotidiques (Huang et al., 1996). De plus, les résidus impliqués dans la reconnaissance sont, la plupart du temps, fortement conservés.

Ainsi, chez les facteurs de types bZIP, *un résidu arginine* est impliqué systématiquement dans la fixation de la protéine à l'ADN (Aukerman et al., 1991) alors que chez les facteurs de type doigt de zinc, un ou deux résidus cystéine et histidine sont associés à la reconnaissance des éléments cis-régulateurs (**Figure 30**). Du fait de la forte conservation du domaine de fixation chez les facteurs de type MYB et de l'identification des résidus interagissant avec l'ADN sur ce même type de facteur d'origine animale (Ogata et al., 1994),

il a été suggéré que les mêmes résidus étaient impliqués dans la reconnaissance de l'ADN chez les plantes pour cette classe de protéines régulatrices.

Cependant, **une plus grande flexibilité**, à la fois, dans les séquences cibles et les interactions ADN/protéines, pourraient être à l'origine du plus grand nombre de gènes cibles régulés par les facteurs MYB chez les végétaux et donc l'implication d'autres résidus (Solano et *al.*, 1997).

Un autre élément doit être pris en compte dans la spécificité de la fixation à l'ADN, il s'agit de l'arrangement spatial de ces acides aminés impliqués dans la fixation. Ainsi, chez les facteurs de transcription de type doigt de zinc, les régions contenant les cystéines forme des motifs en doigt de zinc dont la structure spatiale changera selon le nombre de résidus impliqués dans sa formation (Sakamoto et *al.*, 1996). Chacun des motifs aura ainsi un comportement de fixation à l'ADN différent, ce qui permettra au facteur d'interagir de manière fine avec la séquence régulatrice en *cis* (Schindler et *al.*, 1993; Christiansen et *al.*, 1996). Par ailleurs, pour la plupart des facteurs de transcription, la présence de résidus neutre de type **proline ou glycine** semble essentielle dans la stabilité de la structure secondaire du domaine de fixation, une perte d'un de ces résidus pourrait aboutir à la perte de l'activité (Ni et *al.*, 1996 ; Kosugi et Oshashi, 1997).

Un autre point important qui caractérise le domaine de fixation à l'ADN est que sur un facteur de transcription quelconque, on ne trouve qu'un seul type de domaine d'interaction à l'ADN qui peut être répété une fois (Baranowskij et *al.*, 1994), deux fois comme c'est le cas chez les facteurs MYB. Toutefois, certains facteurs de type MYB d'origine végétale voient leur nombre de domaines de fixation monter à 3 (Ito et *al.*, 2001) voire quatre (Stracke et *al.*, 2001) bien qu'un **seul domaine** soit validé pour l'interaction directe ADN/protéine. Les mêmes particularités ont été rapportées avec d'autres familles de facteurs comme les facteurs en doigt de zinc (Dietrich et *al.*, 1997).

#### **4.b) Les domaines d'oligomérisation.**

Beaucoup de facteurs de transcription forment **des hétéro et/ou des homo-oligomères**, affectant leur spécificité de fixation à l'ADN et donc leur affinité avec les éléments promoteurs des gènes (Katagiri et *al.*, 1992 ; Guiltinan et *al.*, 1994) ainsi que leur localisation nucléaire (Sainz et *al.*, 1997). Les oligomères sont stabilisés par des **interactions hydrophobes** entre des feuillettes et des coudes ou par des réactions entre résidus hydrophiles. Les séquences des acides aminés de ces domaines sont fortement conservées mais présentent néanmoins, quelques spécificités qui dépendront de la famille de facteurs de transcription.

#### **4.c) Le domaine de la régulation transcriptionnelle.**

Les facteurs de transcription d'une même famille ont généralement des actions différentes dont l'origine est probablement due à des différences dans leur région de régulation transcriptionnelle se distinguant de celle impliquée dans la fixation à l'ADN. Au contraire des autres régions qui sont fortement conservées, cette dernière semble **spécifique du facteur** (Yanagisawa et *al.*, 1998) et va déterminer la fonction régulatrice du facteur (activateur ou répresseur).

Dans le cas d'une fonction répressive, il s'agit, la plupart du temps, d'une exclusion d'activateurs des promoteurs cibles par compétition sur les sites de fixations des gènes cibles entre différents facteurs qui interagissent avec des éléments en *cis* similaires (**Figure 31A**). Mais dans certains cas, la fonction répressive d'un facteur s'expliquerait par des interactions entre différents facteurs qui pourraient être à l'origine du masquage des domaines de régulation favorisant ainsi une répression au lieu de l'activation (**Figure 31B**).

Plusieurs études de double hybride ont essayé par mutations des expériences de substitutions de localiser ces domaines de régulations, voire de les identifier chez certaines familles de facteurs (Okanami et al., 1996; Nakayama et al., 1997). Il a été d'ailleurs rapporté que des domaines de régulations étaient souvent enrichis en résidu de type proline et glutamine (Schwechheimer et al., 1998). De la mutagenèse dirigée sur des résidus supposés appartenir au domaine d'activation du facteur de transcription C1 démontre qu'un seul des onze résidus acides, l'aspartate en position 256, présent dans la région et la leucine en position 253 sont essentiels à l'activation du facteur (Sainz et al., 1997).

#### **4.d) Le Signal de Localisation Nucléaire (SLN).**

Comme la plupart des protéines qui entrent de manière sélective dans le noyau, les facteurs de transcription contiennent un signal de localisation nucléaire caractérisé par une séquence enrichie en *arginine (R) et en lysine (K)* (Lyck et al., 1997 ; Michael et al., 1997). Au sein des facteurs de transcription, les SLNs varient en séquence, en organisation et en nombre (**Tableau 4**). Certaines classes de facteurs de transcription ne possèdent pas de SLN et, en fait, sont importés dans le noyau par dimérisation avec des protéines qui le possède (Goldfarb et Lewandowska, 1994).

#### **4.e) Régulation des facteurs de transcription.**

Les gènes codant les facteurs de transcription peuvent être exprimés de manière constitutive ou tissu-spécifique (Steiner Lange et al., 2003), suite à un stimulus (Wang et al., 1997 ; Johnson et al., 2001 ; Schmid et al., 2003), ou encore en fonction du développement cellulaire (Kosugi et al., 2003; Dewitte et al., 2003). Il apparaît donc que leur régulation peut prendre diverses formes.

##### **4.e.1) Régulation des facteurs de transcription par les séquences en *cis*.**

Les promoteurs des facteurs de transcription sont la plupart du temps extrêmement fournis en matière de séquences régulatrices et l'on retrouve dans beaucoup de cas des éléments en *cis* localisé sur les promoteurs des gènes cibles des facteurs de transcription étudiés suggérant une régulation commune entre facteur de transcription et gènes cibles. De plus, des cas *d'auto-régulation* ont été signalés (Balasubramanian et al., 2002 ; Sakamoto et al., 1996; Mikami et al., 1995 ). Tous ces résultats suggèrent que la première des régulations génique de l'expression du gène codant le facteur de transcription est lui-même.

##### **4.e.2) L'épissage alternatif, un mécanisme post-transcriptionnel de régulation.**

Un des exemples le plus connu est le gène *MYB-P* qui génère deux transcrits par épissage alternatif au niveau de la région 3' de l'ARN messager (ARNm) dit précurseur. L'ARNm le plus grand code une protéine de 43,7 kDa avec une région amino-terminale possédant une homologie certaine avec des protéines de type MYB. Le messenger plus petit, quant à lui, produit une protéine de 17,3kDa qui contient les domaines MYB mais dont l'extrémité carboxy-terminale diffère de la première protéine (Grotewold et al., 1991).

Un autre exemple concerne un gène LSD1 codant un répresseur qui intervient durant la mort cellulaire induite lors d'une attaque par un pathogène (Dietrich et *al.*, 1997). Les facteurs de transcription qui dérivent ainsi d'un même précurseur d'ARN messagers peuvent avoir des fonctions régulatrices distinctes. Par conséquent, *l'ajustement du rapport* entre les différents ARN messagers sera alors l'élément clé de la régulation de l'expression de gènes cibles.

#### **4.e.3) Répression de la traduction des ARNm codant les facteurs de transcription par des cadres de lecture additionnels.**

Il arrive dans certains cas que l'on observe sur certains facteurs de transcription des *petits cadres de lecture* situés en amont du véritable cadre de lecture codant des petits peptides. Ce type de configuration a tendance à défavoriser la traduction de la protéine située en aval (Gupta et *al.*, 1998 ; Magaraggia et *al.*, 1997). Ceci a été démontré avec le gène *Myb7* du riz qui possède un cadre de lecture additionnel codant un peptide de 13 acides aminés et qui se finit 60 nucléotides en amont du véritable codon d'initiation de la traduction (codon start). Ces cadres d'ouvertures additionnels ont tendance à réprimer la traduction du cadre de lecture suivant qui code le facteur fonctionnel.

Le gène *OsMyb7*, fusionné en amont d'un gène rapporteur de type CAT (chloramphénicol acetyl transférase) et exprimé de manière transitoire dans un système cellulaire révèle qu'il présente une expression trois fois plus importante quand le codon start de l'ORF additionnel est muté suggérant un rôle répresseur de ce dernier sur l'expression du gène *Myb* (Magaraggia et *al.*, 1997).

#### **4.f) Régulations post-traductionnelles des facteurs de transcription.**

##### **4.f.1) Effet de la translocation sur l'activité du facteur de transcription.**

Les facteurs de transcription entrent dans le noyau par des processus sélectifs qui détermineront leur fonction dans la plante (Chattopadhyay et *al.*, 1998 ; Harter et *al.*, 1994a). Les pores nucléaires des plantes supérieures contiennent des protéines qui fixent le signal de localisation nucléaire (Hicks et Raikhel, 1995). Ainsi, un certain nombre de facteurs de transcription voient leur position dans la cellule être sous le contrôle de stimuli environnementaux. Chez le Persil, il a été démontré que la translocation d'un certain nombre de facteur de transcription était déterminée par la phosphorylation cytosolique induite par la lumière (Harter et *al.*, 1994b). La phosphorylation régule elle-même l'importation des facteurs de transcription car elle peut dans certains cas, masquer voir modifier directement le signal de localisation nucléaire (Jans et Hubner, 1996). Par ailleurs, le rôle des *plasmodesmes* dans le trafic des facteurs de transcription de cellules à cellules est de plus en plus envisagé, notamment en ce qui concerne les mécanismes de morphogenèse cellulaire de l'épiderme (Perbal et *al.*, 1996 ; Wada et *al.*, 2002 ; Shiefelbein et *al.*, 2003).

##### **4.f.2) Les modifications post-traductionnelles affectent la fixation des facteurs de transcription à l'ADN.**

La régulation de la fixation à l'ADN par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation pourrait déterminer l'expression de plusieurs gènes cibles. En effet, dans certains cas, l'interaction avec l'ADN est annulée par déphosphorylation (Klimczack et *al.*, 1992 ; Shen et *al.*, 1997 ; Johnson et *al.*, 2002) et stimulée par phosphorylation (Dröge-laser et *al.*, 1997 ; Cheong et *al.*, 2003, Kim et *al.*, 2004) et l'inverse

est aussi possible (Ciceri et al., 1997, Meshi et al., 1998). Ces modifications post-traductionnelles peuvent avoir lieu dans le cytoplasme (Dröge-Laser et al., 1997, Fujita et al., 2003) mais aussi dans le noyau (Meshi et al., 1998, Cheong et al., 2003). Il est possible que l'action de kinases puisse modifier les capacités de combinaison de plusieurs facteurs de transcription avec l'ADN (Reindl et al., 1997). D'autres stimuli peuvent affecter les mécanismes de phosphorylation de régulateurs, ainsi la phosphorylation d'*Opaque 2* est contrôlé par un mécanisme circadien (Ciceri et al., 1997).

En conclusion, bien que les domaines fonctionnels d'une grande majorité de facteurs de transcription des plantes aient été caractérisés, il reste, néanmoins, à comprendre exactement leur rôle précis et leur mode de fonctionnement. *L'analyse par rayons X ou RMN* pourrait nous fournir donc de précieux renseignements concernant la structure de ces facteurs de transcription en condition de fixation à l'ADN. Par ailleurs, l'action d'un seul facteur est rarement suffisante pour activer l'expression de gènes cibles. Plusieurs facteurs de transcription, et dans une certaine combinaison, sont nécessaires pour l'induction de tels gènes. Il est donc nécessaire, pour une meilleure compréhension des mécanismes régulateurs de la transcription, de s'attarder sur la combinatoire des facteurs de transcription.

## **5) Contrôle de la régulation transcriptionnelle par la combinatoire des facteurs de transcription.**

Il est maintenant clair qu'une partie des mécanismes associés à la régulation transcriptionnelle est sous le contrôle de la combinatoire des facteurs de transcription. A un moment donné, pour un gène donné, un ensemble de protéines régulatrices se fixe sur différents sites promoteurs ou interagissent pour donner naissance à un complexe nucléoprotéique que l'on appelle « *enhanceosome* » (Carey, 1998). Les interactions entre ces protéines mais aussi celles ayant lieu avec les différents composants de la machinerie transcriptionnelle conduit à augmenter la coopérativité du complexe Pol II avec l'ADN et à initier ainsi la transcription. La composition de l'enhanceosome sur un promoteur donné peut changer en fonction du signal environnemental ou développemental généré par la plante. Ainsi, il est possible de former un grand nombre d'enhanceosomes distincts à partir d'un nombre réduit de facteurs de transcription. De plus, un facteur de transcription donné peut favoriser la régulation de différents gènes dont l'expression est induite par des signaux distincts.

À titre d'exemple de la combinatoire, nous pouvons citer la régulation de la production des pigments chez le Maïs qui un des exemples les mieux caractérisés (Mol et al., 1996; 1998). Cette régulation est le résultat *d'interactions entre deux familles de facteurs de transcription*. La première famille est la famille C1 qui est constituée de protéines régulatrices de type MYB et qui comprend la protéine C1 et P1 (Paz Ares et al., 1987 ; Cone et al., 1993). La seconde est la famille, dénommée R, code des protéines de type MYC ou b/HLH (Ludwig et Wessler, 1990).

La plupart du temps, les membres de ces deux familles de facteurs pris séparément ne sont pas suffisants pour induire l'expression de la totalité des gènes de la voie de biosynthèse des anthocyanes sur la plante. Par contre, la co-expression de chacun des membres de ces deux classes de facteurs permettra l'activation des gènes associés à la production d'anthocyanes d'avoir lieu.

Ainsi, des études ont montré que la combinaison *de R et C1* était responsable de *la pigmentation dans les grains de Maïs* alors que la combinaison de *B et de P1* favorisait l'induction des gènes de la *biosynthèse des anthocyanes dans les feuilles* (Mol et al., 1996). L'importance de la combinaison de ces facteurs a été aussi illustrée par des études de transgénèse démontrant que l'expression ectopique de C chez le Tabac ou *Arabidopsis thaliana* n'était pas suffisante pour augmenter l'expression des gènes structuraux de la voie de biosynthèse des anthocyanes. Elle nécessitait aussi la co-expression de R (Lloyd et al., 1992).

De manière générale, depuis quinze ans, de multiples travaux ont démontré que ces deux familles étaient impliquées dans la régulation de la biosynthèse des phénylpropanoïdes dont celle des flavonoïdes. Depuis peu, d'autres familles de protéines ont été rapportées comme régulatrice de l'expression des gènes structuraux des flavonoïdes, comme les protéines de type WD40 (Walker et al., 1999) suggérant encore le rôle clé de la combinatoire.

Le projet de thèse étant concentré sur l'identification de gènes MYB, nous allons nous attacher à faire d'abord un rappel bibliographique sur cette classe de facteurs de transcription, chez les Eucaryotes, avec une attention plus particulière des résultats obtenus chez les végétaux.

## Partie 5: Les facteurs de transcription de type MYB.

### 1) Généralités.

Les protéines MYB constituent une classe de protéines fixatrices à l'ADN d'une extrême importance en ce qui concerne la régulation de la transcription de nombreux gènes chez les Eucaryotes. Cette famille de protéines régulatrices fut découverte pour la première fois suite à une induction d'une lignée cellulaire animale par le virus aviaire de la Myéloblastose (Klempnauer et *al.*, 1982). Elles se définissent comme des **protéines modulaires** comprenant deux régions distinctes : un domaine de fixation à l'ADN, localisé dans la partie amino-terminale de la protéine et un domaine de régulation de la transcription vers l'extrémité carboxy-terminale, responsable de la modulation du niveau basal de transcription conférée par le complexe de la transcription RNA Pol II (**Figure 32**). Les membres de cette famille sont caractérisés par la présence au sein de la séquence protéique de **domaines peptidiques ultra-conservés**, impliqués dans la fixation du facteur aux séquences nucléotidiques présentes sur les promoteurs des gènes cibles. Ces domaines, composés d'une cinquantaine de résidus, sont fortement similaires et sont dénommés *R1*, *R2* et *R3* (R pour Repeat).

Une des spécificités de ces facteurs MYB et, en général des facteurs possédant des motifs **Helice-Boucle-Hélice**, est la présence à chaque répétition R de trois résidus Tryptophane espacés régulièrement. Leur rôle est de participer à la mise en place d'un core hydrophobe du domaine MYB qui va stabiliser l'interaction ADN/protéine. Ils sont **généralement conservés** chez la plupart des facteurs de type MYB bien que le premier résidu Tryptophane dans la répétition R3 soit fréquemment remplacé par un autre acide aminé de type aromatique ou hydrophobe (**Figure 33**). Chaque motif R a la capacité de former 3 hélices de type  $\alpha$  qui facilitent l'insertion de la protéine dans le grand sillon de l'hélice d'ADN double brin (Luscher et Eisenman, 1990). Si la répétition R1 participe uniquement à la stabilisation de l'interaction entre la séquence d'ADN et la protéine, les répétitions R2 et R3 sont impliquées directement dans cette fixation (Howe et *al.*, 1991). En effet, la troisième hélice de chaque répétition (R2 et R3) est impliquée dans la reconnaissance de la courte séquence d'ADN cible, lors de la fixation du facteur sur la séquence promotrice du gène cible (Rabinowitz et *al.*, 1999).

### 2) Les facteurs MYB chez les animaux.

Les génomes des vertébrés contiennent relativement peu de gènes codant des facteurs de transcription de type MYB (Rosinski et Atchley, 1998). Ces derniers sont classés en trois groupes fonctionnels, les A-Myb, B-Myb et C-Myb. Chez les animaux, ces facteurs de transcription sont intimement **associés au phénomène de division et de différenciation** des cellules hématopoïétiques (Weston et *al.*, 1998), ce qui explique l'intérêt de ce type de facteur dans la mise en place des mécanismes cellulaires du cancer des cellules sanguines.

Ainsi, le facteur C-Myb est fortement exprimé dans les cellules sanguines indifférenciées, dans les cellules épithéliales, mais son expression a tendance à diminuer dans des cellules dont le niveau de différenciation augmente (Duprey et *al.*, 1985). De nombreuses études ont démontré que ce gène était essentiel au phénomène de l'hématopoïèse chez la souris (Mucenski et *al.*, 1991). Deux gènes codant des facteurs MYB (A-Myb et B-Myb) ont été, par la suite, identifiés chez l'homme (Nomura et *al.*, 1988).

Des analyses mutationnelles au niveau des gènes de type A-Myb ont démontré leur implication à la fois dans la spermatogenèse et **la prolifération** des cellules épithéliales des glandes mammaires durant la grossesse (Toscani et al., 1997). Au contraire de l'expression tissu spécifique de c-Myb et A-Myb, le facteur B-Myb semble être exprimé dans toutes les cellules en division chez les Vertébrés. Ainsi, un certain nombre de résultats suggèrent que la régulation de l'expression du gène B-MYB est une étape critique dans le déroulement du cycle cellulaire (Robinson et al., 1996). La mutation de ce même gène conduit à un bouleversement irréversible du développement embryonnaire chez la Souris (Tanaka et al., 1999).

Cependant, le rôle exact de B-Myb dans le cycle cellulaire reste à être identifié. Des homologues chez la Drosophile et l'Amibe ont été récemment identifiés avec des fonctions similaires (Katzen et al., 1985 ; Coffman et al., 1997). Il a été démontré chez la Drosophile, que la mutation de cet unique gène conduisait à un défaut au cours de la phase S de division cellulaire aboutissant à des dysfonctionnements cellulaires (Manack et al., 2002). Par ailleurs, plusieurs études ont montré une certaine ambivalence de ces facteurs de transcription dans des mécanismes cellulaires comme l'apoptose. Ainsi, le gène C-Myb qui donne par épissage alternatif deux transcrits code en fait deux protéines dont la sur-expression dans des lignées de cellules Myéloïdes (32Dcl3 et FDCP1) aboutit à des phénomènes cellulaires totalement opposés avec soit une accélération de la mort cellulaire, soit une prévention des mécanismes apoptotiques (Kumar et al., 2003).

Il apparaît clairement que les facteurs de type MYB, chez les animaux, sont intimement liés **aux mécanismes de division et de différenciation cellulaire**. Leur implication dans l'émergence de certains cancers pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes qui sont à l'origine de ce désordre cellulaire.

### 3) Les facteurs MYB chez les plantes.

Les facteurs Myb d'origine végétale peuvent être classés en trois sous-familles qui sont caractérisées par le nombre de répétitions R (Jin et Martin, 1999 ; Rosinski et Atchley, 1999). Récemment, il a été identifié chez *Arabidopsis*, un facteur MYB contenant quatre domaine de type R (Stracke et al., 2001). **La majorité des facteurs de type MYB chez les plantes possèdent, seulement deux répétitions, R2 et R3.** Seuls quelques facteurs MYB peuvent n'en contenir qu'une seule (Mercy et al., 2003), trois (Ito et al., 2003) voire quatre (Stracke et al., 20001).

#### 3.a) Les MYB1R.

La fonction des protéines avec une seule répétition se distingue de la plupart des fonctions que l'on peut attribuer à ces protéines. Elle inclut, en effet, des facteurs de transcription qui se fixent sur la séquence consensus de l'ADN télomérique (Yu et al., 2000). Récemment, certains facteurs à une seule répétition ont été identifiés chez *Arabidopsis* (LHY pour Late elongated Hypocotyl et CCA1 pour Circadian Clock Associated 1), leur fonction est associée à la régulation de **gènes circadiens** (Shaffer et al., 2001 ; Wang et al., 1997 ; Shaffer et al., 1998). Chez le Maïs, un ADNc codant un MYB de cette classe a été isolé et serait impliqué dans la différenciation cellulaire de l'embryon (Mercy et al., 2003). Chez le Riz, trois nouveaux gènes codant des facteurs de type MYB1R, semblent être impliqués dans la régulation du gène codant l' $\alpha$ -amylase (Lu et al., 2002).

### 3.b) Les MYB3R.

Chez *Arabidopsis*, cinq gènes codant cette classe de facteurs ont été isolés lors du séquençage du génome. Comme leurs homologues chez les animaux, ils sont associés au **contrôle du cycle cellulaire** (Ito et al., 2001). Ceci indique une certaine conservation entre les fonctionnalités de ce type de facteur entre les deux règnes du vivant. Cependant, le rôle exact de ces protéines régulatrices comme AtMYBCDC5 dans le cycle cellulaire des plantes reste à déterminer (Hirayama et Shinozaki, 1996).

### 3.c) Les MYB2R.

Cette classe de facteurs représente la vaste majorité des facteurs MYB identifiés. Elle est aussi à l'origine de la quasi-totalité des résultats scientifiques obtenus concernant le mode de fonctionnement de ces protéines régulatrices depuis près de 20 ans chez les Végétaux. On en dénombre près de 125 chez *Arabidopsis* (Stracke et al., 2001), 80 chez le Maïs (Rabinowicz et al., 1999), environ 30 chez le Pétunia (Avila et al., 1993) et approximativement 200 chez le coton (Cedroni et al., 2003). Bien que nous possédions de nombreux résultats concernant l'étude fonctionnelle de certains d'entre eux, la fonction de la plupart de ces facteurs est inconnue à l'heure actuelle. Toutefois, à partir des études réalisées, trois rôles bien définis peuvent leur être attribué: **le contrôle du métabolisme secondaire et en particulier celui des flavonoïdes, la régulation de la morphogenèse cellulaire, la modulation des voies de transductions générées par des stress abiotiques ou suite à l'attaque par des pathogènes**. Nous allons essayer de faire un récapitulatif de ce qui est connu jusqu'à ce jour concernant cette classe de facteurs de transcription.

## 4) Le contrôle du métabolisme secondaire.

### 4.a) La voie des acides phénoliques et de la lignine.

Plusieurs études, sur différents modèles (*Arabidopsis*, Mufler ou Pin) ont permis d'identifier deux classes de facteurs dont l'étude du comportement régulateur, par expression ectopique ou analyse de mutants, a révélé des modes de fonctionnement totalement opposés. Ainsi, il a été découvert un premier groupe de facteurs qui active la synthèse de la lignine.

Chez *Arabidopsis*, l'analyse phénotypique d'une lignée mutée pour un gène codant AtMyb26 a montré des retards de déhiscence dans les anthères, dûs à un défaut de lignification des cellules de l'endothécium de l'anthère (Steiner-Lange et al., 2003). Récemment, un nouveau gène codant un facteur MYB chez *Arabidopsis thaliana*, AtMyb61 a été identifié. Son expression est associée à la régulation de la lignine (Newman et al., 2004). Chez le Pin (*Pinus taeda*), deux nouveaux facteurs MYB ont été caractérisés (Patzlaff et al., 2003 a, b), PtMyb4 et PtMyb1. Leur fonction respective est aussi d'induire la lignification dans les vaisseaux xylémiens et il pourrait jouer un rôle durant la formation du bois chez le Pin (**Figure 34**).

La deuxième catégorie est composée de répresseurs de la transcription de gènes qui sont associés aux acides phénoliques et à la lignine. Deux d'entre eux, AmMyb308 et AmMyb330 ont été identifiés chez le Mufler et leur expression ectopique chez le Tabac inhibe l'expression de certains gènes structuraux associés à la biosynthèse des acides phénoliques (Tamagnone et al., 1998a). Cette inhibition du métabolisme des acides phénoliques avait pour conséquence une mort cellulaire précoce et une morphologie anormale des cellules foliaires de Tabacs transgéniques (**Figure 35, 36**), se traduisant par des volumes

et des surfaces cellulaires beaucoup plus importants chez les Tabacs transgéniques (**Tableau 5**) (Tamagnone et *al.*, 1998b). Un autre facteur, chez *Arabidopsis*, dénommée AtMyb4 possède aussi un rôle répresseur de la transcription de ses gènes cibles. La mutation d'AtMyb4 se traduit par une augmentation de l'expression de la cinnamate-4-hydroxylase ayant pour résultat une augmentation des dérivés sinapiques photoprotecteurs des émissions UV (Jin et *al.*, 2000).

#### **4.b) La voie des flavonoïdes.**

La régulation de cette voie métabolique a été l'objet de nombreux travaux dans la mesure où elle est à l'origine de la production de molécules indispensables pour la survie des plantes (pigments, protection contre les UV) mais présentant aussi un intérêt pharmaceutique pour l'homme. Il était donc important de comprendre les mécanismes régulateurs responsables de la biosynthèse de ces molécules à forte valeur ajoutée.

La voie de biosynthèse des anthocyanes a été, à la fois, la première et la plus étudiée des voies sur trois principaux modèles : le Maïs, le Muflier et le Pétunia. Plus tard, les résultats obtenus avec ces plantes ont conduit à des études fonctionnelles avec d'autres modèles végétaux comme *Arabidopsis thaliana* ou encore la Tomate. Bien que plusieurs familles de facteurs de transcription soient associées à la biosynthèse des anthocyanes, le rôle des facteurs de transcription de type MYB2R dans leur régulation est considéré majeur dans cette voie métabolique.

##### **4.b.1) La voie des anthocyanes.**

Le premier gène codant pour un facteur de transcription de type MYB, chez les Végétaux, a été mis en évidence en 1986 par une étude génétique réalisée chez le Maïs. Cette étude concernant la pigmentation des fleurs de Maïs (Cone et *al.*, 1986) a permis le clonage d'un gène dont la séquence protéique correspondante présentait une très forte homologie avec le facteur C-Myb d'origine animale (Paz-Arez et *al.*, 1987).

À ce titre, il fut nommé Myb-C1. Son étude fonctionnelle démontra que sa fonction régulatrice était cantonnée **à la pigmentation des aleurones et des tissus embryonnaires** (Coe et *al.*, 1985) et que son action était sous la dépendance de l'expression d'un autre type de protéine régulatrice codé par gène R, appartenant à la famille des MYC ou bHLH. Une étude génétique menée par Cone et *al.*, 1993 a permis d'isoler un certain nombre d'allèles correspondant à un gène codant une protéine MYB2R, Pl (Purple leaf), qui semblait responsable de la **pigmentation de l'ensemble des organes végétatifs** de la plante.

Chez le Pétunia, des études **sur des mutants d'insertion** affectant la couleur des pétales de différentes variétés ont permis d'évaluer le rôle plusieurs facteurs de transcription (MYB, MYC et WD40) dans l'activation de la voie de biosynthèse des anthocyanes. Parmi eux, le facteur AN2, qui est un facteur MYB2R, a fait l'objet d'une étude poussée validant son rôle de régulateur des gènes structuraux des anthocyanes. En effet, il semble impliqué dans l'activation de la chalcone synthase (Quattrocchio et *al.*, 1999).

Ce gène, qui ne s'exprime que dans les épidermes de pétales, présente des propriétés identiques à celle de MYB-C1 (Quattrocchio et *al.*, 1998) et peut être considéré aussi comme l'homologue de **TRANSPARENT TESTA 2** (Nesi et *al.*, 2001) et de **PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1 et 2** (PAP1,2) isolés chez *Arabidopsis* (Borevitz et *al.*, 2000). La sur-expression de ces deux derniers gènes chez *Arabidopsis*

*thaliana* ou chez le Tabac génère des plantes transgéniques qui accumulent de manière constitutive des anthocyanes quelque soit l'organe analysé (**Figure 37**). L'analyse de gènes structuraux chez le mutant *AtPAP1* montre que ce gène était impliqué à la fois dans la régulation de gènes associés aux acides phénoliques mais aussi aux flavonoïdes.

Récemment, un orthologue du gène *AtPAP1*, *ANT1*, a été identifié chez la Tomate avec le même phénotype (Mathews et al., 2003). Chez la Fraise, un facteur de type MYB2R a été isolé par Aharoni et al., 2001. Ce dernier agit en tant que répresseur de l'expression de l'anthocyanidine synthase (ANS), ce qui provoque une diminution drastique de l'accumulation des pigments dans les fleurs de Tabacs transgéniques. Par ailleurs, une étude par double hybride montre les possibilités d'interaction de ce facteur avec une autre famille de facteurs de transcription, les MYC. En effet, *FaMYB1* est capable d'interagir avec *JAF13* qui est un facteur de transcription de type MYC, chez le Muflier, reconnu pour jouer un rôle dans la régulation des anthocyanes (Dooner et al., 1996) ainsi qu'avec *ANI*, un gène codant un facteur de type MYC isolé chez le Pétunia et aussi associé à la régulation des flavonoïdes (Spelt et al., 2000) (**Figure 38**). Une dernière plante modèle, le Muflier, a permis de mettre en évidence la redondance fonctionnelle de deux gènes MYB. Ainsi comme le montre le **Tableau 6**, les gènes codant les protéines régulatrices AmMyb340 et AmMyb305 connus pour leur rôle régulateur de certains gènes structuraux de la voie des acides phénoliques, comme la PAL sont capables d'activer *in vitro* l'expression de mêmes gènes structuraux de la voie des flavonoïdes comme la Chalcone Isomérase ou (Moyano et al., 1996).

#### **4.b.2) La voie du phlobaphène.**

La voie des phlobaphènes qui conduit à la production de molécules ayant des propriétés insecticides et antifongiques est aussi régulée par un facteur de type MYB2R. Le facteur de transcription, MYB-P, active la transcription de la Dihydroflavonol Réductase pour diriger la biosynthèse des précurseurs des flavanones vers la production de phlobaphènes alors que la voie des anthocyanes n'est pas activée (Grotewold et al., 1994).

#### **4.b.3) La voie des proanthocyanidines.**

Un seul facteur de type MYB2R a été isolé chez *Arabidopsis* à partir d'un mutant et considéré comme un régulateur de la voie des proanthocyanidines. Il s'agit du gène TT2 dont les plus proches homologues sont un facteur MYB identifié chez le riz (*OsMyb3*) et le facteur COLORLESS1 du Maïs. Cette protéine est capable d'induire l'expression à la fois de la DFR et de l'ANR (Anthocyanidine Réductase) qui est à l'origine de la formation des épiflavan-3-ols qui s'accumulent dans les téguments des graines (Nesi et al., 2001). La fonctionnalité de la protéine a été mise en évidence par des tests de complémentations fonctionnelles sur des mutants d'*Arabidopsis thaliana* (**Figure 39**).

#### **4.b.4) La voie des flavonols.**

De récents résultats (**Figure 40**) ont montré que la surexpression du facteur MYB-C1 en association avec un partenaire MYC, LC, présent aussi chez le Maïs pouvait induire une très forte accumulation de flavonols comme le Kaempférol ou la quercétine dans des tomates transgéniques (Bovy et al., 2002).

## 5) Le contrôle de la morphogenèse cellulaire.

Les cellules végétales adoptent une grande variété de « **formes cellulaires** » qui les rendent fonctionnellement spécifiques. Par exemple, les cellules palissadiques sont en forme de colonne du mésophylle pour améliorer la concentration des chloroplastes lors de la récolte de la lumière. Les cellules du parenchyme lacuneux créent des interstices afin de faciliter la diffusion des gaz durant la fixation du dioxyde de carbone (**Figure 41**). La composition et l'organisation des cellules est un élément moteur à la définition des formes cellulaires.

De nombreux papiers ont mis en lumière l'importance de la paroi dans la mise en place de la forme des cellules, mais l'organisation et l'activité du cytosquelette ainsi que la signalisation de certaines voies métaboliques sont tout aussi essentielles dans le développement ou non de l'architecture cellulaire.

Ainsi, une des premières études qui a mis en évidence l'implication des facteurs MYB dans l'identité cellulaire concernait la sur-expression chez le Tabac d'un facteur MYB AmMixta isolé à partir d'une banque ADNc de pétales de Muflier (Noda et *al.*, 1994). L'analyse structurale des fleurs des transformants révéla que la protéine AmMixta était **nécessaire à la formation de cellules coniques** au niveau de l'épiderme des pétales permettant ainsi d'améliorer l'entrée de la lumière incidente dans les cellules et par conséquent augmenter le rendement de fluorescence des pigments (**Figure 42**).

Depuis quelques années, la spécificité des cellules épidermiques des racines et des tiges chez *Arabidopsis thaliana* a servi de modèle à des études concernant la morphogenèse cellulaire. Durant le développement de ces organes, des cellules voisines de l'épiderme exprime des **activateurs ou des répresseurs transcriptionnels** du type MYC ou b-HLH (Payne et *al.*, 2000), WD40 (Galway et *al.*, 1994) et MYB dont l'expression différentielle entre cellules va déterminer leur forme.

Ainsi, les gènes WEREWOLF (WER) et GL1 qui code des MYB2R seront en partie responsable de la différenciation des cellules épidermiques en poils racinaires ou en trichomes pour les parties aériennes d'une plante. WER est nécessaire pour le développement de cellules épidermiques non-pilifères dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* en régulant l'expression d'un gène à homéo-domaine GL2 (Lee et *al.*, 1999). GL1, équivalent de WER dans les cellules épidermiques des parties aériennes, intervient, lui dans la formation des trichomes. En parallèle à ces facteurs, un autre complexe protéique composé de facteurs de type MYB1R vient interférer la régulation mise en place respectivement par WER et GL1.

Il s'agit du complexe CAPRICE /TRIPTYCHON ou CPC/TRY qui va réguler le profil des cellules à poils racinaires et des cellules non trichomiales des tiges (Wada et *al.*, 1997 ; Shellmann et *al.*, 2002) (**Figure 43**). Récemment, un nouveau facteur de type MYB2R, AtMYB103, a été identifié comme un régulateur de l'endoreduplication lié à la formation des trichomes (Higginson et *al.*, 2003).

Dans un domaine proche, deux autres facteurs de type MYB associés au déterminisme foliaire chez le Muflier et chez le Maïs ont été isolés. Dans le premier, le gène PHAN pour Phantastica contribue à la **disposition du feuillet dans les feuilles composées** (Kim et *al.*, 2003). Dans le deuxième, le gène MRS2 pour Maize Rough Sheath 2 détermine **le programme de développement de la feuille de Maïs** en régulant l'expression d'un gène à

homéodomaine, le gène Knox, dans le primordium foliaire (Timmermans et *al.*, 1999). Un orthologue à ces deux gènes MYB2R a été identifié chez *Arabidopsis*. Il s'agit d'Asymmetric Leave 1 ou AS1 dont la fonction est de réguler l'expression toute une batterie de gènes dont ceux de la famille des gènes Knox (Byrne et *al.*, 2000 ; Byrne et *al.*, 2002).

## 6) Induction lors d'un stress abiotique.

Un certain nombre de ces protéines régulatrices de type MYB sont impliquées aussi dans les ***cascades de signalisation cellulaires*** mises en place lors de stress abiotiques comme les stress salins (Urao et *al.*, 1993 ; Nagaoka et Nakano, 2003), oxydatifs (Gefferers et *al.*, 2001) ou encore hydriques (Urao et *al.*, 1996). La déshydratation ou le stress salin sont des phénomènes abiotiques qui activent la production d'ABA endogène induisant à son tour l'expression de divers gènes qui seront nécessaires à l'adaptation de la plante face aux nouvelles conditions environnementales (Zhu JK., 2002).

Bien que plusieurs études aient montré le rôle-clé de facteurs de transcription de type AP2 (Finkelstein et *al.*, 2002) ou b-ZIP (Kang et *al.*, 2002) dans la régulation de gènes associés à la signalisation par l'ABA, l'implication d'un ou plusieurs facteurs MYB via la signalisation ABA n'avait pas été prouvée jusqu'à peu de temps (Abe et *al.*, 1997).

Depuis, Urao et *al.*, (1997) ont démontré l'activation du gène AtMyb2 par de fortes doses de NaCl (250mM) (**Figure 44**). De plus, il a été prouvé chez *Arabidopsis* qu'AtMyb2 est capable d'activer le promoteur du gène rd22 (Abe et *al.*, 1997) dont la régulation par l'ABA a été étudiée (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 1993). La régulation de ce gène nécessite en plus la présence d'un autre facteur, partenaire d'AtMyb2, AtMyc2, qui fait partie de la famille des facteurs de type MYC (Abe et *al.*, 2003), ce qui démontre encore la relation intime qui existe entre ces deux grandes familles de facteurs de transcription.

## 7) Implication dans les mécanismes de défenses.

La présence de séquences *cis*-régulatrices, associées aux facteurs MYBs, sur la plupart des promoteurs de gènes associés à la mise en place des mécanismes de résistances comme les gènes ***PR* ou *LTPs*** suggèrent que les facteurs MYB peuvent jouer un rôle de régulateur dans la défense (Chakravarthy et *al.*, 2003 ; Kader, 1996 ; Yubero-Serrano et *al.*, 2003). Cependant, peu d'études ont validé l'implication de tels facteurs dans la mise en place d'une résistance ou du moins dans l'activation transcriptionnelle de gènes associés à la résistance des plantes.

La première étude qui a prouvé un lien entre les facteurs MYB et les mécanismes de résistances des plantes face à un pathogène, concerne l'identification chez le Tabac d'une protéine régulatrice, NtMyb1 dont l'expression du gène correspondant est ***induite par le virus de la mosaïque du Tabac et l'acide salicylique*** (Yang et *al.*, 1996). Depuis, quatre autres facteurs de transcription de type MYB ont été identifiés chez le Tabac et semblent impliqués dans la régulation de PAL (Yang et *al.*, 2001).

Or, ces derniers ont la capacité de se fixer sur le motif conservé (LTR) de 13 bases présent sur le rétrotransposon Tto1 (Sugimoto et *al.*, 2000). Ce dernier fait partie d'une famille de rétrotransposons dit actifs fortement exprimés suite à une infection par un

pathogène, des inoculations d'éliciteurs microbiens ou encore par addition d'acide salicylique (Pouteau et al., 1994 ; Grandbastien et al., 1997).

Des plantes transgéniques sur-exprimant *NtMyb2* active l'expression du gène de la PAL (Sugimoto et al., 2000). Récemment, l'étude d'un mutant déficient pour un MYB2R chez *Arabidopsis*, *AtMYB30*, a révélé qu'il agissait en tant que ***régulateur positif dans le mécanisme de réponse hypersensible de la plante*** suite à une attaque par un pathogène conduisant à la mise en place d'un programme de mort cellulaire localisé (**Figure 45**) (Vailleau et al., 2002).

## 8) Association avec les rythmes circadiens.

Les analyses moléculaires des rythmes circadiens chez les animaux ont permis d'établir un modèle faisant intervenir tout un complexe de gènes régulateurs qui subit à la fois des autorégulations transcriptionnelles mais aussi des régulations négatives post-traductionnelles de type feedback (Dunlap et al., 1999). Chez *Arabidopsis*, les gènes *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* sont des gènes candidats de type MYB1R qui sont associés à cette régulation circadienne (Wang et al., 1998 ; Shaffer et al., 1998).

Leur surexpression chez *Arabidopsis thaliana* modifie considérablement les rythmes circadiens de la plante (**Figure 46**). La perte de fonction de l'un d'eux (LHY) ou des deux (LHY+CCA1) a pour conséquence de réduire le ***rythme circadien de la régulation de l'expression de nombreux gènes*** conduisant à une floraison précoce en conditions de jours courts (Mizoguchi et al., 2002). De plus, la sur-expression de ces deux gènes s'est traduite aussi par la suppression à moyen terme des ARN messagers codant CCA1 et LHY (Wang et al., 1998). Toutefois, il ne s'agirait pas d'une autorégulation dans la mesure où la protéine CCA1 est détectée au même moment que son ARN messenger correspondant (Wang et al., 1998). Il s'agirait plutôt ***d'une régulation en feedback*** impliquant d'autres facteurs de transcription qui réprimerait l'expression de ces deux gènes candidats.

Récemment, un modèle pour une telle régulation a été proposé faisant intervenir CCA1, LHY et une nouvelle protéine, dénommé TOC1 (Timing for Cab expression 1), appartenant à une nouvelle famille de facteur de transcription (*Arabidopsis* Pseudo-Response Regulator) (Alabadi et al., 2001). Ce modèle propose à l'échelle de 24 heures que l'expression de *TOC1* culminant le soir participerait à l'activation de LHY et CCA1 le matin suivant. En retour, LHY et CCA1 inhibe l'expression de *TOC1*, ce qui conduit à une baisse dans un deuxième temps de leur propre expression puisque TOC1 favorise normalement leur expression (Mizoguchi et al., 2002).

En parallèle à ce mécanisme de régulation, l'implication d'un autre facteur de type MYC, PIF3 (Phytochrome-interacting Factor 3), a été validée dans l'activation de l'expression de *LHY et CCA1* (**Figure 47**) (Martinez-Garcia et al., 2000). Il semble que ce facteur PIF3 interagisse avec TOC1 pour induire l'expression de *CCA1 et LHY* (Makino et al., 2002).

## 10) Relation MYB et hormones.

Nous avons vu précédemment que les facteurs MYB étaient impliqués dans la réponse au stress hydrique ou salin via une hormone, l'ABA. Quelques éléments de la littérature suggèrent que l'expression des facteurs de types MYB peut être contrôlée en amont par des hormones. L'exemple le plus connu est le facteur GAMYB, dont le rôle de régulateur du gène codant l' $\alpha$ -amylase via la Gibbérelline a été validé (Gubler *et al.*, 1999). L'activation de l'expression par les cytokinines du facteur MYB P1 chez le Maïs a aussi été démontré (Piazza *et al.*, 2002). L'auxine pourrait jouer aussi un rôle de régulateur, notamment sur les facteurs de type CDC5+ associés aux mécanismes de division cellulaire (Planchais *et al.*, 2002).

## 11) Les MYB et les polyphénols chez la baie de raisin.

Les cinétiques d'accumulations des polyphénols au cours du développement de la baie de raisin correspondent fortement avec le niveau d'expression de la plupart des gènes structuraux de la voie de biosynthèse des polyphénols (Boss *et al.*, 1996a). Ceci suggère qu'il existe une forte *régulation coordonnée* de la plupart de ces gènes. Comme nous l'avons vu précédemment, la voie des anthocyanes, une branche majeure des flavonoïdes, est une voie extrêmement régulée avec des différences concernant le point de départ de la régulation sur la voie métabolique.

Ainsi, chez le Maïs, il semble que la CHS soit considérée comme le point de départ de la régulation alors qu'il s'agit respectivement de la F3'H et de la DFR chez le Muflier et le Pétunia (Martin et Gerats, 1993). Toutefois, dans tous les cas, la régulation des gènes structuraux est sous le contrôle de gènes régulateurs de type MYB et MYC. On peut donc imaginer que les gènes de la voie de biosynthèses des polyphénols dans la baie de raisin pourraient être sous le contrôle de ces deux familles de facteurs de transcription. Cependant, le mécanisme de régulation semble différent de celui qui est observé dans le Maïs, le Muflier et le Pétunia.

Deux types de mécanismes régulateurs peuvent être envisagés dans la pellicule. Le premier concernerait des gènes régulateurs exprimés de manière précoce induisant l'expression de la plupart des gènes structuraux à l'exception de l'UFGT. Le second comprendrait les mêmes ou d'autres gènes régulateurs qui s'exprimeraient vers la véraison, ce qui conduirait à l'activation de la totalité des gènes structuraux incluant aussi l'UFGT. Récemment, cinq ADNc, codant des facteurs de type Myb2R, ont été isolés à partir de baies de raisin (Kobayashi *et al.*, 2002). L'expression transitoire d'un seul ADNc sur des embryons somatiques de Vigne (*Vitis Labrusca*) a conduit à l'accumulation localisée de « spots » anthocyaniques (**Figure 48**). Un seul des ADNc clonés semble impliqué dans l'activation de l'expression de l'UFGT (VIMyBA). Il est admis que l'absence d'anthocyanines dans les pellicules des cépages blancs tient à l'inactivité de l'UFGT (Kobayashi *et al.*, 2001). Or, récemment, une étude a démontré que l'absence d'expression de ce gène structural tenait à la présence d'un rétrotransposon dans la séquence ADNc du gène codant VIMyBA, régulateur potentiel de l'UFGT (Kobayashi *et al.*, 2004). Toutefois, l'expression des gènes situés en amont de ce dernier ne semble pas être foncièrement affectée par la sur-expression de VIMyBA.

Cependant, ils présentent tous un profil d'expression fortement coordonnée, suggérant que ces gènes structuraux soient aussi sous le contrôle de facteurs de transcription communs. L'identification de tels gènes dont le rôle régulateur se situerait en amont de

l'UFGT garantirait l'accumulation de précurseurs dans la baie nécessaires aux différentes classes des flavonoïdes comme les tanins ou encore les flavonols.

## **RESULTATS**

## **RESULTATS**

<b>Partie 1 : Identification de clones d'ADNc codant deux facteurs de transcription : VvMybCS1 et VvMybCs2.....</b>	<b>44</b>
1) Stratégie de clonage.....	44
2) Modélisation d'oligonucléotides dégénérés à partir d'alignements nucléotidiques.....	44
3) Obtention d'un signal d'amplification pour la région 5'..	45
4) Obtention d'un signal d'amplification pour la région 3'..	45
5) Obtention des clones entiers..	46
6) Analyse globale de la séquence nucléique et protéique de VvMybCs1.....	46
6.a) Analyse préliminaire.....	46
6.b) Etudes des sites de modifications post-traductionnelles..	46
6.b.1) Site de phosphorylation pour une Tyrosine Kinase. ....	47
6.b.2) Sites de phosphorylation pour une Protéine Kinase C.....	47
6.b.3) Sites de phosphorylation pour une Caséine kinase de type II. ....	47
6.b.4) Sites de N-Myristoylation.....	47
6.e.5) Sites de fixation de NTPs. ....	48
7) Analyse globale de la séquence nucléique et protéique de VvMybCs2.....	48
7.a) Analyse préliminaire. ....	48
7.b) Etudes des sites de modifications post-traductionnelles . ....	48
8) Interprétation et conclusions.....	48
<b>Partie 2 : Caractérisation fonctionnelle de VvMybCs1 et VvMybCs2 chez le Tabac. ....</b>	<b>50</b>
1) Introduction.....	50
2) Article 1. ....	51
2) Article 2.....	86
3) Conclusion des deux articles..	119
<b>Partie 3 : Etude phénotypique de transformants d'Arabidopsis thaliana.....</b>	<b>120</b>
1) Intérêt de la sur-expression chez Arabidopsis thaliana.....	120
2) Interprétation et Conclusions.....	121

<i>Partie 4 : Analyse d'une série de mutants de Tabac</i> .....	121
1) <i>Effet d'une mutation sur l'activité de VvMybCs2</i> .....	121
1.a) <i>Obtention de la mutation.</i> .....	121
1.b) <i>Analyse de la mutation.</i> .....	121
2) <i>Comparaison analytique et moléculaire de plants de Tabacs transgéniques sur-exprimant VvMybCs2a et VvMybC2b</i> .....	122
2.a) <i>Analyse phénotypique des fleurs de Tabacs.</i> .....	122
2.b) <i>Analyse cytologique des tissus conducteurs des pétioles et des tiges transgéniques</i> .....	122
2.c) <i>Analyse par coloration chimique des tissus conducteurs des pétioles et des tiges</i> .....	123
3) <i>Analyse transcriptionnelle des gènes structuraux de la voie des lignines et des flavonoïdes</i> .....	123
3.a) <i>Les gènes de la voie des lignines.</i> .....	123
3.b) <i>Les gènes de la voie des flavonoïdes.</i> .....	124
4) <i>Interprétation et conclusions</i> .....	125
4.a) <i>Régulation des monolignols</i> .....	125
4.b) <i>Effet de la mutation sur la fonctionnalité de VvMybCs2</i> .....	126
<i>Partie 5 : Etude préliminaire d'une éventuelle redondance fonctionnelle entre VvMybCs1 et VvMybCs2</i> .....	127
1) <i>Restauration partielle de la déhiscence dans les anthères</i> .....	127
2) <i>Atténuation de l'accumulation d'anthocyanes dans étamines VvMybCs12</i> .....	127
3) <i>Accentuation de la pigmentation au niveau des pétales de VvMybCs12</i> .....	127
4) <i>Interprétation et conclusions</i> .....	127
<i>Partie 6 : Etude de la régulation des gènes VvMybCs1 et VvMybCs2</i> .....	129
1) <i>Approche des mécanismes de régulation de VvMybCs1 et VvMybCs2</i> .....	129
2) <i>Les facteurs régulateurs de la biosynthèse des flavonoïdes</i> .....	129
3) <i>Effet du saccharose et de l'acide abscissique</i> .....	129
4) <i>Identification de la région régulatrice de VvMybCs1</i> .....	130
5) <i>Analyse préliminaire d'un fragment de 1,3kb correspondant à une séquence promotrice du gène VvMybCs1</i> .....	131

<i>5. a) Analyses des séquences cis – régulatrices.....</i>	<i>131</i>
<i>5.a.1) Les séquences ABRE Abscissic Responsive Elements. ....</i>	<i>131</i>
<i>5.a.2) Les séquences LRE ou Light Responsive Elements. ....</i>	<i>132</i>
<i>5.a.3) Les séquences associées à la régulation par les sucres . ....</i>	<i>132</i>
<i>5.b) Interprétation et conclusions. ....</i>	<i>132</i>
<i>Partie 7 : La transgénèse Vigne.....</i>	<i>133</i>

## **Partie 1 : Identification de clones d'ADNc codant deux facteurs de transcription : *VvMybCS1* et *VvMybCs2*.**

### **1) Stratégie de clonage.**

La banque ADNc utilisée comme matrice est une banque orientée. Les ADNc sont donc insérés dans un sens particulier dans le vecteur plasmidique pTRIPLEX (Clontech ; UK). Les amorces universelles sont nommées **5'Primer** du côté 5' de l'ADNc et **T7 primer** du côté 3'. La stratégie de clonage par PCR permet d'obtenir la totalité d'un ADNc en deux étapes et chacune d'elle nécessite l'utilisation d'une amorce spécifique du gène cible et d'une amorce universelle avec les combinaisons suivantes (**Figure 49**).

Une réaction de PCR employant une amorce sens (par rapport au sens de l'ADNc 5'-3') en combinaison avec une amorce T7 Primer permet d'obtenir la partie dite 3' de l'ADNc alors qu'une réaction de PCR avec une amorce dite antisens et l'amorce universelle 5'Primer génère un signal d'amplification correspondant à la partie 5' de l'ADNc.

De manière générale, les amorces sens et antisens sont choisies de telle façon que lors du séquençage des produits d'amplification, il y ait ***un chevauchement*** de séquence d'au moins 400 bases afin de confirmer que les fragments amplifiés pour chacune des conditions correspondent bien au même gène. Il est également conseillé de choisir un nouveau couple d'amorces (sens et antisens) qui sera utilisé pour une deuxième PCR (Principe de la nested-PCR) à partir du premier produit amplifié pour tester la validité des premiers produits amplifiés.

### **2) Modélisation d'oligonucléotides dégénérés à partir d'alignements nucléotidiques.**

Les facteurs de transcription de type MYB, comme nous l'avons abordé dans l'introduction, appartiennent à une famille multigénique. Chez *Arabidopsis thaliana*, on en dénombre plus de 130. Chez le Coton, on estime leur nombre à 200 (Cedroni *et al.* 2003). Le dénominateur commun de ces gènes tient à leur extrémité N-terminale fortement conservée à travers le règne Végétal. Ceci devrait donc faciliter l'obtention d'amorces dégénérées déduites des séquences protéiques. Cependant, si la présence de tels domaines conservés, s'avèrait être un avantage, l'absence, au moment où nous avons commencé l'étude, de motifs protéiques associés directement à la régulation de polyphénols, a rendu délicat le choix des oligonucléotides dégénérés.

En effet, parmi les 130 membres de cette famille chez *Arabidopsis thaliana*, tous ne sont pas impliqués dans la régulation des polyphénols, de même chez la plupart des espèces végétales. Or, ce n'est que très récemment que la signature de certains domaines peptidiques présents chez ces protéines, a été associée à des métabolismes particuliers (Payne *et al.*, 2000).

Au moment de notre analyse bioinformatique, le choix des séquences protéiques soumises à un alignement s'est donc avéré crucial. Il a fallu dans un premier temps effectuer un tri concernant le choix des séquences. Notre choix s'est porté sur 5 séquences protéiques correspondant à des facteurs de transcription dont la fonction était associée à plusieurs aspects de la régulation des polyphénols (**Figure 50**).

L'alignement nucléique des ADNc correspondant à ces protéines nous a permis de confirmer la position éventuelle des amorces dégénérées et d'optimiser ainsi le choix de nos oligonucléotides (**Figure 51**). Toutefois, nous avons été confrontés à un problème majeur. Il nous a été impossible d'une part, de « positionner » les amorces dégénérées sens et antisens de telle façon à obtenir le chevauchement optimal de 400 bases, d'autre part, de choisir une deuxième couple d'amorces interne au premier.

Nous avons donc fait le choix risqué d'utiliser une amorce unique située à l'extrémité du domaine R3 fortement conservé chez les facteurs MYBs et le début de l'extrémité C-terminale plus spécifique à la protéine (cf. **Figure 50**). Cette amorce a été synthétisée à la fois dans le sens du gène et dans le sens inverse complémentaire (antisens). Une troisième amorce sens dégénérée localisée en amont de l'amorce antisens a été synthétisée afin de valider par nested-PCR, un éventuel signal d'amplification pour l'extension 5'. Par contre, il nous a été impossible de dessiner une quatrième amorce susceptible de valider par nested-PCR, un éventuel signal d'amplification pour l'extension 3'.

### **3) Obtention d'un signal d'amplification pour la région 5'.**

La réaction PCR réalisée en utilisant les amorces **antisens (MybAS) et 5' primer** avec une gamme de températures comprise entre 58 et 64°C a permis d'amplifier un fragment de 450 bases. Comme le montre la **Figure 52**, le signal d'amplification initialement appelé *VvMybCs1-5'* est conservé à toutes les températures avec un signal "propre" à la température la plus haute ; ce qui suggère une bonne spécificité de l'amorce dégénérée. Ce fragment a été cloné dans un vecteur pGEM-T (Promega) et séquencé (Genome Express, Grenoble). La soumission de notre séquence à la base de données GeneBank a montré une forte homologie avec des facteurs de transcription de type MYB. Ce clone, nommé ultérieurement *VvMybCs3-5'* code une extrémité amino-terminale d'un facteur MYB contenant les deux domaines de fixation à l'ADN (Annexe 1) dont un des plus proches homologues (*AmMixta*, gène MYB du Muflier) est impliqué dans le contrôle de la différenciation cellulaire (Noda et al., 1994).

### **4) Obtention d'un signal d'amplification pour la région 3'.**

Après avoir réalisé un gradient de température compris entre 54°C et 62°C avec l'amorce **sens (MybS)** et le T7 primer, un signal d'amplification conservé est observé (**Figure 53**). La taille du signal d'amplification correspondant éventuellement avec le positionnement de l'amorce dégénérée sur la séquence nucléique a d'abord été validée par nested-PCR. Puis, le produit purifié correspondant au premier signal a été cloné dans le vecteur pGEM-T (Promega ; US) et intégré dans une souche bactérienne de type *E. coli*. La vérification de la présence d'un insert chez plusieurs colonies *via* la digestion des plasmides par *EcoRI* a mis en évidence la présence de deux séquences différentes. Sur un nombre de dix clones analysés, l'un d'entre eux possède un site de coupure interne suggérant la présence d'au moins de deux types de séquences.

Le séquençage des deux types de clones (Genome Express ; Grenoble) a permis d'identifier deux clones ADNc différents appelés *VvMybCs1-3'* et *VvMybCs2-3'*. L'analyse de la séquence confirme la présence dans la séquence du clone appelé *VvMybCs2-3'* d'un site de coupure EcoRI à l'extrémité de la région codante. Les deux séquences semblent coder la totalité de deux régions terminales de facteurs de type MYB.

## 5) Obtention des clones entiers.

Le positionnement des amorces n'a pas permis de réaliser le chevauchement des séquences amplifiées en 5' et en 3'. Le caractère inédit des séquences amplifiées en 3', par rapport à celle qui est obtenue pour l'extrémité 5' suggérant la présence d'un orthologue du gène Mixta du Muflier, nous a incité à réaliser dans un premier temps une étude fonctionnelle sur ces deux nouvelles séquences.

En effet, la fonction non validée par des études fonctionnelles des plus proches homologues s'alignant avec nos séquences ADNc en 3' suggère que nous ayons éventuellement identifié deux nouveaux gènes régulateurs de la famille des protéines régulatrices de type MYB (Li et al., 1996). Toutefois, il convient de rester prudent et d'attendre les études de validation fonctionnelle pour avoir une idée sur le caractère inédit de ces deux nouvelles séquences et sur la fonction des protéines correspondantes.

Des amorces spécifiques de chacune des deux séquences côté 3' *VvMybCs1-3'* et *VvMybCs2-3'* ont donc été déterminées dans la partie 3' non codante en antisens et utilisées en tandem avec l'amorce 5' Primer pour amplifier un nouveau clone sur la banque d'ADNc de baie. Le séquençage des fragments obtenus a permis d'obtenir des séquences correspondant aux côtés 5' complémentaires des parties 3'. Les deux séquences ADNc complètes ont été appelées *VvMybCs1* et *VvMybCs2*.

## 6) Analyse globale de la séquence nucléique et protéique de *VvMybCs1*.

### 6.a) Analyse préliminaire.

Le premier clone ADNc de pleine longueur, *VvMybCs1*, contient 1213 bases (**Figure 54**) et présente une région non codante en 5' de 39 bases et une région non codante en 3' de 213 bases. Le cadre de lecture ouverte donne une protéine de 320 acides aminés. On peut constater la présence des signatures associées aux deux répétitions imparfaites des domaines R2-R3 de fixation à l'ADN en position 25-33 (WTPEEDEL) et en position 97-120 (WSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHL) ainsi que la présence de résidus Tryptophane régulièrement espacés au sein des domaines R2-R3 caractéristique des facteurs de type MYB eucaryotes.

### 6.b) Etudes des sites de modifications post-traductionnelles.

L'analyse de la séquence peptidique de *VvMybCs1* soumise à une base de données de motifs protéiques a révélé de nombreux sites potentiels de modifications post-traductionnelles ((PROSCAN, Bairoch et al., 1997) (**Tableau 7**).

### **6.b.1) Site de phosphorylation pour une Tyrosine Kinase.**

Un site de phosphorylation par la Tyrosine Protéine Kinase, [RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y semble se trouver en position 107-115 de la séquence peptidique. Toutefois, si le rôle des tyrosines Phosphatase/Kinase a largement été étudié chez l'animal, sa fonction chez les plantes a été jusqu'à présent négligée.

Seules quelques études récentes ont permis de caractériser ce type de protéines chez les plantes et ont montré leur implication dans le développement du pollen chez *Arabidopsis* (Gupta et al., 2002) ou encore dans la régulation des stomates (Luan, 2002). Toutefois, aucune étude n'a permis de mettre en évidence des interactions entre ce type de protéines et des facteurs de transcription. Son implication a été cependant proposée dans la régulation d'une famille de facteur de transcription (STATS) par l'intermédiaire des cytokinines (Leaman et al., 1996).

### **6.b.2) Sites de phosphorylation pour une Protéine Kinase C.**

Sept sites potentiels de phosphorylation du type [S/T]-x-[R/K] (Kishimoto et al., 1985) ont été repérés le long de la séquence protéique de VvMybCs1. Cette classe de kinases dont l'activité est dépendante à la fois du calcium et de phospholipides, appartient à la famille des Sérine/Thréonine kinases.

Elles font partie d'un groupe d'enzymes régulatrices impliquées dans des processus comprenant le développement cellulaire, et la différenciation cellulaire (Nishizuka, 1984, 1986, 1992 ; Battaini et al., 1994). La protéine kinase C a la propriété de phosphoryler de manière préférentielle les résidus Sérine et Thréonine qui sont localisés sur l'extrémité carboxy-terminale des protéines cibles.

### **6.b.3) Sites de phosphorylation pour une Caséine kinase de type II.**

Cinq sites potentiels de phosphorylation du type [S/T]-x(2)-[D/E] (Pinna, 1990) ont été répertoriés sur la séquence protéique de VvMybCs1. La caséine kinase de type II est une Sérine/Thréonine Kinase dont l'activité est indépendante des nucléotidiques et du calcium. Initialement isolées chez les animaux, elles ont été par la suite identifiées dans le règne végétal (Grasser et al., 1989 ; Klimzack et al., 1992 – 1995 ; Zhang et al., 1993). Ces protéines sont directement impliquées dans la régulation de l'expression de gènes associés à la voie de transduction du signal (Klimzack et al., 1992 – 1995).

### **6.b.4) Sites de N-Myristoylation.**

VvMybCs1 possède quatre sites potentiels de N-myristoylation (Towler et al., 1988). La N-Myristoylation se traduit par l'attachement covalent d'un acide gras saturé à 14 carbones (l'acide myristique) par une liaison amide au niveau d'un résidu glycine qui est situé à l'extrémité N-terminale d'un polypeptide. Dans la plupart des cas, cette modification est nécessaire au bon fonctionnement de la protéine et facilite l'association de la protéine avec les membranes (Epanand et al., 2003) ou les interactions de type protéine/protéine (Matsubara et al., 2004).

### **6.e.5) Sites de fixation de NTPs.**

VvMybCs1 possède une séquence de résidus en position 53-60 : GLLRCGKS, pouvant correspondre à un motif de fixation de nucléotides Tri-Phosphate de type ATP ou GTP (Satischandran *et al.*, 1992) connu aussi sous le nom de motif consensus Walker de type A qui comprend quatre variantes (G/AXXXXGK(T/S) (Walker *et al.*, 1982), GXXGXXK (Driscoll *et al.*, 1995), GXXXXGKS (Satischandran *et al.*, 1992), et GXXGXGKS (Thomas *et al.*, 1995). Ce motif flexible se situe au niveau de la jonction entre un feuillet  $\beta$  et une hélice  $\alpha$ . Il permet la formation d'une poche à l'intérieur de laquelle le groupement phosphate peut s'insérer.

## **7) Analyse globale de la séquence nucléique et protéique de VvMybCs2.**

### **7.a) Analyse préliminaire.**

Le deuxième clone ADNc de pleine taille, *VvMybCs2*, contient 1220 bases avec une région non codante en 5' d'une centaine de bases et une région non codante en 3' de 250 bases (**Figure 55**). Le cadre de lecture ouverte donne une protéine de 307 acides aminés. Comme *VvMybCs1*, on retrouve les deux signatures correspondant au domaine R2R3 spécifiques des facteurs MYB.

### **7.b) Etudes des sites de modifications post-traductionnelles.**

La plupart des sites de modifications observés pour la séquence protéique de VvMybCs1 se retrouvent aussi au niveau de la séquence de VvMybCs2 mais à des positions distinctes. Cependant, il existe quelques différences avec la présence de deux sites putatifs de glycosylation absents chez VvMybCs1. Ils sont identifiés respectivement en position 3-6 et 145-148. La N-glycosylation correspond à la transformation d'une protéine en N-glycosylprotéine par le transfert en bloc d'un squelette d'oligosaccharide appelé glycane à partir d'un transporteur lipidique (Dolichol) sur un résidu d'asparagine présent sur la protéine acceptrice suite à l'action d'une oligosaccharyl transférase (Kornfeld *et al.*, 1985, Kaplan *et al.*, 1987). Ces sites de N-Glycosylation ont été identifiés sur ce type de facteur pour la première fois, lors de l'étude du locus R chez le Maïs qui est composé de différents gènes régulateurs de type MYB et MYC dont le niveau d'expression détermine la distribution de la pigmentation des anthocyanes chez la plante (Consonni *et al.*, 1993).

## **8) Interprétation et conclusion.**

Le choix de la banque ADNc stade véraison s'est révélé réfléchi dans la mesure où cette période correspond chez la baie à une étape où a lieu de nombreux bouleversements à la fois structuraux, biochimiques que moléculaires. De plus, c'est à la Véraison que débute la biosynthèse des anthocyanes, suggérant que l'activation de la transcription de la plupart des gènes structuraux associés à cette voie métabolique a lieu à ce moment. Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée par Boss *et al.*, (1996) montrant par une étude transcriptionnelle que la totalité des gènes structuraux de la voie des polyphénols est activée à cette période suggérant une forte régulation transcriptionnelle à ce stade de développement.

L'obtention des deux clones ADNc *VvMybCs1* et *VvMybCs2* et d'un troisième *VvMybCs3* suggère que certains membres de cette famille de facteurs de transcription sont fortement exprimés au cours de cette période. Ainsi, ils doivent jouer un rôle direct ou indirect sur les différents événements moléculaires ayant lieu pendant cette période.

L'analyse des séquences hypothétiques des protéiques VvMybCs1 et VvMybCs2 indique bien que nous sommes en présence de clones ADNc codant des facteurs MYB. La présence à la fois des répétitions R2R3 ainsi que la présence conservée à intervalles réguliers de résidus Tryptophane (**Figure 54 et 55**) en sont des preuves formelles.

Par ailleurs, d'autres motifs ont pu être identifiés, notamment au niveau de l'extrémité C-terminale. La présence dans cette région, habituellement très variable chez ce type de facteurs, de motifs conservés permet dans certains cas d'estimer la fonctionnalité de la protéine régulatrice.

Un premier domaine au début de l'extrémité C-terminale qui est un motif, nommé C1 que l'on retrouve sur les séquences protéiques de facteur MYB associés à la régulation des phénylpropanoïdes (Glover et al., 1998). Un deuxième domaine dénommé arbitrairement C3, présent sur *VvMybCs1* et *VvMybCs2*, et conservé chez les proches homologues, a été identifié. Par ailleurs, un autre domaine (Riche Residus Glutamine) identifié essentiellement chez VvMybCs1 et présent chez des régulateurs de certains gènes homéotiques suggère que ces protéines régulatrices peuvent jouer un rôle répresseur sur l'expression de certaines classes de gènes (Conner et Liu, 2000).

En conclusion, ces premiers résultats encourageants nous laissent penser que ces gènes pourraient avoir un lien étroit avec la régulation des composés phénoliques. Mais d'autres effets régulateurs sont envisagés. Il reste donc à valider cette hypothèse par des expériences de sur-expression chez le Tabac.

## Partie 2 : Caractérisation fonctionnelle de *VvMybCs1* et *VvMybCs2* chez le Tabac

### 1) Introduction

Les études portées sur la régulation des flavonoïdes chez les végétaux l'ont été tout d'abord dans les années 90 sur trois modèles végétaux qui sont le Maïs (Donner et al., 1991), le Muflier (Martin et al., 1995) et le Pétunia (Quattrocchio et al., 1998). De ces différentes études, deux familles de facteurs de transcription ont été largement plébiscitées en ce qui concerne leur rôle-clé dans la régulation de la plupart des gènes structuraux associés aux polyphénols.

Plus tard, la connaissance du génome d'*Arabidopsis thaliana* et l'avènement de la génétique inverse a permis d'améliorer nos connaissances en ce qui concerne la régulation des phénylpropanoïdes dont fait partie la branche des flavonoïdes (Borevitz et al., 2000). Depuis un certain nombre d'années, on sait que le contrôle du métabolisme des flavonoïdes chez les fruits est un déterminant majeur de sa qualité. À ce titre plusieurs études ont permis de transposer les résultats obtenus sur les plantes à fruits secs, chez les plantes à fruits charnus.

Ainsi, certaines études récentes ont démontré le rôle prépondérant des facteurs MYB sur la régulation du métabolisme des polyphénols chez le fruit (Aharoni et al., 2001 ; Mathews et al., 2003). Les polyphénols de la baie de raisin sont considérés comme un élément déterminant de la qualité organoleptique d'un vin. Il apparaît évident qu'une meilleure compréhension des mécanismes régulateurs du métabolisme des polyphénols dans la baie de raisin serait un atout majeur dans la recherche de gènes candidats associés à la qualité de la baie de raisin. Kobayashi et al., (2002) ont identifié une série de clones ADNc codant des facteurs MYB chez la baie de raisin. L'un d'entre eux, *VIMYBA* est associé à la régulation de l'enzyme clé de la biosynthèse des anthocyanes, l'UFGT. Toutefois, à ce jour, aucun facteur de type MYB identifié chez la baie de raisin a été associé à la régulation de gènes situés en amont de l'UFGT. Il nous est apparu intéressant de se concentrer sur de tels gènes dans la mesure où leurs expressions pré-déterminent l'accumulation de telle ou telle classe de composés phénoliques.

Dans ces deux articles, nous décrivons l'identification d'une nouvelle classe de facteurs de type MYB, *VvMybCs1* et *VvMybCs2* comportant de nouveaux motifs protéiques, et leur impact sur le métabolisme des polyphénols chez le Tabac. Ces deux articles en plus semblent indiquer un effet pléiotropique de ces types de facteurs suggérant qu'ils soient sûrement impliqués dans plusieurs voies métaboliques.

**ARTICLE 1**

# **Characterization of a new MYB transcription factor involved in the control of the phenylpropanoid pathway in grape berry**

Deluc<sup>a</sup>, L.G., Barrieu<sup>a</sup>, F., Marchive<sup>a</sup>, C. Lauvergeat<sup>a</sup>, V., Decendit<sup>b</sup>, A., Richard<sup>b</sup>, T.A.,  
Carde<sup>a</sup>, J.P., and Hamdi<sup>a</sup>, S.

<sup>a</sup>: Equipe Biologie de la Vigne, UMR 619, IBVM, INRA 33883 Villenave d'Ormon

<sup>b</sup>: GESVAB: Groupe d'Etude des substances Végétales à Activité Biologique, UFR des  
Sciences Pharmaceutiques, Université Victor Ségalen, Bordeaux 2.

**ABSTRACT:**

In grape berry, ripening is characterized by dramatic changes in gene expression, enzymatic activities and metabolism leading to the production of compounds essential for the wine quality. Flavonoids pathway belong to these metabolisms that underlies spectacular modifications during grape berry development. Although this process has been studied extensively, we still lack information on coordinated regulation of gene expression involved in the flavonoid pathway. In this paper we describe the characterization of *VvMybCs1*, a cDNA isolated from *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon grape library, encoding a protein belonging to a new class of MYB proteins transcription factors. The C-terminus of *VvMybCs1* contains two particular core motifs. The first motif named C3 is only found in some MYB proteins whose functions are not clear yet. The second motif, a glutamine rich residue restricted to the extremity of carboxy terminus, is known to be involved in the repression of homoeotic genes expression such as *AGAMOUS*. Overexpression of *VvMybCs1* in tobacco triggered a strong accumulation of several phenolic compounds like Keracyanin cyanidin 3 rhamnoglucoside and quercetin 3 glucoside, which are the main anthocyanin and flavonol compounds found in tobacco. In addition, *VvMybCS1* overexpression increased the biosynthesis of condensed tannins. Finally, the lignin metabolism pathway was also altered by *VvMybCs1* ectopic expression resulting in delay of dehiscence of transgenic anthers. Taken together, these findings indicate that *VvMybCs1* belongs to a new class of MYB transcription factors involved in the control of the whole phenylpropanoid pathway in grape berry.

## INTRODUCTION

Flavonoids are a diverse group of plant secondary metabolites including anthocyanins, flavonols and proanthocyanidins (Figure 1), which accumulate in a wide variety of plant tissues. In grape berry, flavonoids like catechins are involved in the protection against UV radiations, others such as anthocyanins help attract seed dispersal agents. Moreover, proanthocyanidins lead subsequently to condensed tannins, which are known to protect grape berry against microbial and fungal growth.

Flavonoids also play an important role in the quality of the resulting product, namely wine. Anthocyanin compounds represent the major constituent of red wine color. Condensed tannins are significant organoleptic components of wines because they are responsible for the bitter and astringent wine properties. They are also considered as critical elements in red wine color stability (Glories, 1988). In addition to these properties, nutrient and health benefits have been reported for these compounds. Flavonoids that increase the antioxidant capacity of cells and tissues (Hollman et al., 1999; Lairon and Amiot, 1999; Bagchi et al., 2000) are responsible for the antioxidant property of red wine. *In vitro* studies have revealed the powerful antioxidant properties of some anthocyanins from grape berry such as Malvidin 3 - *O* - $\beta$  glucoside or peonidin 3 - *O* - $\beta$  glucoside (Fauconneau et al., 1997; Mérillon et al., 1997). Proanthocyanidins (condensed tannins) are also powerful antioxidants with beneficial effects on human cardiac health (Bagchi et al., 2003) and immunity (Lin et al., 2002). As a consequence, moderate red wine drinkers have reduced risk of cardiovascular disease and cancer (Klatsky, 2002).

Even though polyphenol composition of grape berries has been extensively studied, (Boss et al., 1996a; Kennedy et al., 2000; Downey et al., 2003), little is known about the regulation of gene expression along the flavonoid pathway during berry development. In plants, regulation of genes involved in flavonoid metabolism has been studied in petunia, maize, Snapdragon or

*Arabidopsis* (Cone et al., 1986; Paz-Ares et al., 1987; Martin et al., 1991; Quattrocchio et al., 1993; Holton and Cornish, 1995; Mol et al., 1998, Borevitz et al., 2000) and more recently in fruit species (Mathews et al., 2003; Aharoni et al., 2001). These studies have identified a conserved regulatory mechanism of the flavonoid biosynthetic pathway, which appeared to be under the control of two families of transcription factors, MYC and MYB proteins, respectively. In grape berry, the coordinated expression of most of the structural genes involved in this pathway except UFGT suggest the implication of two groups of regulatory factors during berry ripening (Boss et al., 1996). Therefore, the first group would control expression of PAL, CHS, CHI, F3H, DFR and ANS and the other one would induce UFGT gene expression (Boss et al., 1996). In this case, the first regulatory genes would have to be expressed early in berry development whereas the second regulatory factors that triggered UFGT expression would be expressed when grape ripening began, e.g. after véraison. Recently, one Myb related gene associated to the regulation of UFGT gene has been identified in berries of *Vitis labrusca* (Kobayashi et al., 2002). To date, no study has been performed to isolate MYB regulatory genes expressed early in berry development and potentially responsible of the regulation of flavonoid genes expression. In this paper, we report the functional characterization of a new transcriptional regulator named *VvMybCs1* isolated from grapeberries. The *VvMybCs1* gene belongs to a new group of MYB genes and is mainly expressed in the early steps of berry development. Overexpression of *VvMybCs1* in tobacco affect the expression levels of most flavonoid structural genes and lead to strong accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins, especially in flowers. In addition, *VvMybCs1* is also involved in the regulation of monolignols metabolism, triggering delay in anthers development. Taken together, our findings indicate that *VvMybCs1* belongs to a new class of MYB transcription factors involved in the control of the whole phenylpropanoid pathway.

## **METHODS**

### **Plant Materials**

Berries from *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon were sampled at 2 weeks intervals during the 2002 growing season. Each week, a sample of 50 randomly selected berries from three bunches were harvested. Stages of berry development were chosen according to criteria including size, measures of soluble solids (Brix), softening and coloring of the berries as previously described by Boss et al., 1996. Berries for RNA extraction were randomly sampled and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at – 80°C pending further analysis. Separate skin and flesh samples were obtained by peeling fresh berries before freezing in liquid nitrogen.

Non-transgenic and transgenic tobacco *in vitro* plants (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) were grown at 23°C in a 16 day light cycle and transferred to a green house to produce seeds with same culture conditions. For harvesting seedlings, seeds of *N. tabacum* were sterilized in 70 % ethanol for two minutes, 2.5% potassium hypochlorite for 10 minutes and finally washed three times with sterile water. They were stratified for two days at 4°C in the dark and germinated on 0.5% agar plates containing selective Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1962) medium complemented with 30% (W/V) sucrose by incubation in 16 hours light, 8 hours dark at 23°C.

### **cDNA Cloning**

A cDNA library of grapevine (Véraison stage) constructed using Smart cDNA cloning kit provided by Clontech (US) was used as template for Polymerase Chain Reaction (PCR) cloning. Two degenerated oligonucleotides 5'- **GANRTMAARAAYTAYTGGAACWCN** - 3' in forward and 5'- **NGTGTTCCARTARTTYTTKAYNTC**-3' in reverse respectively were used in combination with T7 primer and 5' primer located in the pTriplex vector. PCR products were cloned into pGemTeasy (Promega, US) and sequenced by Genome Express

(Paris, France). Afterward, specific oligonucleotides defined within the 5' and 3' UTR regions of sequenced cDNA were used to amplify the complete full length cDNA.

### **Sequence Analyses**

Comparison and analysis of the sequences were conducted with the advanced Basic Local Alignment Search Tool BLAST (Altschul et al., 1990) at the National center for Biotechnological information (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). For sequence alignments and illustration, Clustal W program (Thompson et al., 1997), Tree View software (License manager, UK 2000) and Seq Vu1.0.1 (Australia, 1995) were used.

### **Plasmid Constructions**

*VvMybCs1* cDNA was amplified by PCR using Pfu polymerase (Promega, US) with oligonucleotides containing respectively XbaI restriction site in the forward and SalI in the reverse. PCR products were digested by XbaI and SalI and inserted into the binary vector pGiBIN19 (Bevan, 1984) to generate pGiBIN19-*VvMybCs1* under control of the 35S promoter of *Cauliflower Mosaic Virus* and the Nopaline synthase (Nos) terminator. For expression in *E. coli* M15 (pREP4) strain (Qiagen, US), *VvMybCs1* cDNA was amplified by PCR using Pfu polymerase with oligonucleotides containing respectively SacI restriction site in the forward and SalI in the reverse. PCR products were digested by SacI and SalI and inserted into the pQE30 vector (Qiagen, US) to generate pQE30-*VvMybCs1*.

### **Production of Recombinant MYB proteins and Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA).**

The production of recombinant *VvMybCs1* protein was performed according to the QIA-expressionist type IV kit protocol provided by Qiagen (US). The crude protein extracts were desalted using G-25 Sepharose column and stored in dialysis buffer (PBS 1X, glycerol V/V and 5mM of PMSF) and stored at -80°C. The protein concentration was determined with the Bradford method (Bradford, 1976). All probes used for EMSA were labeled using 5' end labeling kit (Amersham Pharmacia, Sweden). Binding reactions were performed at 4 °C for

30 minutes, or 45 minutes when pre-incubated unlabeled competitor, in 25  $\mu$ l containing 10 $\mu$ g crude extracts, 3  $\mu$ g of poly (dIdC), 100000cpm of  $\gamma$ P<sub>33</sub> probe (0.1 to 0.5 ng) and 10 mM Tris-Hcl pH=8, 50mM NaCl, 7mM  $\beta$  mercaptoethanol, 10% glycerol. Free and bound DNA were separated in 5% polyacrylamide gel containing 1X TBE. Gels were then fixed in acetic/ethanol solution (10%/10%), dried for two hours in gel dryer at 75°C and exposed to Phospho-Imager screen for three or four days.

### **Plant Transformation**

Tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthii*) was used as the host to generate transgenic plants. P*G*iBIN19-*VvMybCs1* construct was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* LB4401 strain. Leaf discs transformation and regeneration from transgenic plants were performed as described by Horsch (1986). Transformed plants were selected using kanamycin (100 $\mu$ g/ml) as selective marker and the presence of transgene was detected by PCR.

### **RNA : Analysis and extraction**

RNAs from berries were extracted according to the method as described by Asif et al.,2000. RNAs of transformed tobacco leaves were extracted using RNA Extraction Plants Mini Kits (Qiagen, US). Total RNAs from tobacco flowers were extracted as described by Verwoerd et al., 1989. Gene-specific primers used for RT-PCR assays were chosen in 3'UTR regions. RT-PCR products were resolved by electrophoresis in 0.8 % agarose gels and transferred to Nylon Hybond XL filters (Amersham Pharmacia, Sweden) for two hours in alkaline buffer (0.4N NaOH). Hybridization was performed at 65°C overnight with specific cDNAs probes ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dCTP-labelled by random priming method (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). Washing was performed according to instructions provided by the manufacturer. For Northern analysis, totals RNAs were resolved by electrophoresis in 1.5% agarose-formaldehyde gels, transferred to nylon Hybon XL filters (Amersham Pharmacia, Sweden). Total RNAs were fixed using a cross-Linker (Stratagene). Membranes were probed with cDNAs ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dCTP-

labelled by random priming method (Amersham Pharmacia, Sweden). Probes were purified using G50 columns (Amersham Pharmacia, Sweden). Equal loading of RNA samples and uniform transfer onto filters were confirmed by hybridization with constitutive Ubiquitin gene probe. For Northern blot analyses, hybridization was performed overnight at 42°C followed by washes under low stringency conditions once for 20 minutes in 2X SSPE, 0.1%SDS at room temperature, then once again for 20 minutes in 1XSSPE, 0.1%SDS and then under stringent conditions at 65°C, 0.5XSSPE and 0.1%SDS and finally in 0.2XSSPE, 0.1%SDS at 65 for 20 minutes.

### **Quantification of Anthocyanins from Petals and Stamens Extracts**

Petal limbs and stamens were harvested from transgenic and wild type control tobaccos at equivalent ages and submitted to freeze-drying. Each sample (30mg DW (dry weight)) was extracted with methanol-0.32M HCl (85:15, v/v) overnight at 4°C. After centrifugation (3000 rpm, 5min), absorbance of the supernatant was measured at 535nm with a Secoman S250 spectrophotometer (Domont-France). Total anthocyanin content was calculated according to the extinction coefficient ( $E_{1\%} = 461$  at this wavelength in the same solvent) of keracyanin (=cyanidin-rhamnoglucoside) purified from transgenic and wild type tobacco flowers or purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Each extract was then diluted with an equal volume of water. 100 $\mu$ L of each diluted sample was analysed by HPLC with a ProntoSil Eurobound C18 (5 $\mu$ M) reversed phase column (4mm i.d. x 250mm) Bischoff (Leonberg-Germany) with guard column. Solvents used for the separation were: A, TFA 0.1% in H<sub>2</sub>O; B, TFA 0.1% in acetonitrile. The elution program at 0.6mL/min was 12-26% B (0-35min), 26-100% B (35-36min), 100% B (36-49min), 100-12% B (49-50min), 12% B (50-60min). The chromatogram was monitored at 521nm. Keracyanin contents were estimated from a calibration curve obtained with pure compound using the same HPLC conditions.

HPLC analyses and purifications were carried out on a Gilson gradient system equipped with an UV-vis detector Spectra Physics model SP8450. Mass spectra were recorded with VG Autospec-Q in the FAB<sup>+</sup> mode. NMR spectra were recorded at 303K on a 500MHz Bruker spectrometer using CD<sub>3</sub>OD as a solvent.

### **Histochemical Staining of Condensed Tannins and Lignin Compounds**

Light microscopy studies were performed using a Zeiss Axiophot fluorescence microscope (Jena, Germany). Pictures were taken using a digital imaging system (Leica Microsystems, Beinsheim, Germany). Photographs were analyzed using Image ProPlus software (Media Cybernetics, UK).

To determine modifications of lignin deposition in endothecium, transgenic and wild type anthers were fixed in 3% formaldehyde solution for 60 minutes, were embedded in Paraplast Plus (Sherwood, St Louis, US) and subsequently used for preparing 2.5 µm thin cross sections. After transferring the sections to slides, samples were incubated for 30 s at room temperature in aqueous solution of 0.05% (w/v) of toluidine blue solution and subsequently washed twice for 5 min with sterile water. After drying the sections at room temperature, Paraplast Plus was removed by incubating the slides in 100% HistoClear (National Diagnostic, Hesse Hull, UK). Then, the slides were treated with Entellan and subsequently covered with a cover slip. For histological staining in nerves, cross sections of 10 leaves from 5 transgenic independent lines plants and 10 control plants were hand cut. Sections were immediately placed on glass microscope slides and kept by adding distilled water. For staining with the Maüle reagent, water was removed and sections were stained with Maüle reagent according to Chapple et al. (1992). Photographs were taken within 30 min using a Zeiss (Jena, Germany) dissecting microscope fitted with a camera.

Transgenic petals were incubated for five minutes in pDiMethylAminoCinnamAldehyde (Sigma, France) solution (ethanol/HCl 12 N, v/v with 0.1% of DMACA powder). Then samples were rinsed successively three times using distilled water.

**Test of pollen viability of VvMybCs1 sense lines.**

Auto pollination was performed on transgenic lines showing delay on dehiscence to evaluate viability of pollen grains. Disrupted anthers in non-opened flowers were cut to sample pollen grains and subsequently put on the style of non-opened control flowers with cut stamens. Viability was supported by the appearance of capsule after three weeks.

## RESULTS

### Sequence Analysis

Using PCR on *Vitis vinifera* grape berry cDNA library at véraison stage, we identified one clone, named *VvMybCs1*, encoding putative R2R3 MYB protein. *VvMybCs1* cDNA appeared to be a full length cDNA of 1213 bp encoding a protein of 320 amino acids. The amino terminal extremity contains the R2R3 imperfect repeats responsible for binding to target DNA sequences (Figure 2A) and very conserved among MYB proteins involved in the control of secondary metabolism (Figure 2B) (Solano et al. 1997). In this DNA Binding Domain (DBD), we reported the presence of a shorter sequence closely related to amino residues in the maize transcriptional activator C1 (Grotewold et al., 2000) and required to interact with a bHLH cofactor (IR domain, Figure 2A).

We could also note the occurrence of constantly spaced tryptophan (five or six) residues associated to the formation of tertiary structure of the conserved MYB motifs (Figure 2B). Besides, some lines of evidence in the protein sequence at the COOH extremity suggested strongly that *VvMybCs1* protein might be related to MYB family proteins involved in the regulation of the phenylpropanoid pathway. Indeed, at the beginning of the carboxy region, we could see a conserved C-terminal GIDPxTH motif, which was found in most of MYB transcription factors associated to the control in expression of several “phenylpropanoid genes” (Figure 2C).

Two others motifs were detected in the carboxy region of *VvMybCs1* protein. The first motif named arbitrary C3 was located only in a few number of MYB proteins belonging to a distinct cluster whose biological functions were little known (Li et al., 1996; Suzuki et al., 1997). The second core motif, which contained a conserved glutamin rich domain (Figure 2A) QQQQQQQQLQQVQQP, was detected for the first time in MYB proteins and was found only in a family of repressors (Conner et liu, 2000).

Regarding to sequence homology, even though the amino terminal region appeared to be more conserved with other MYB proteins, the overall VvMybCs1 protein sequence shared little homology with known MYB proteins involved in the regulation of phenylpropanoid pathway. The first homology in sequence was found with a cotton seed MYB factor named BnGHI233, (GenBank accession no. AAK19611) with only 59% overall identity whom function is little investigated.

A probable key role of VvMybCs1 protein in the regulation of flavonoid could be observed through phylogenetic positioning of neighbor joining tree from 21 MYB proteins (Figure 2D) that allow to distinct VvMybCs1 from other MYB factors involved in the control of biosynthetic flavonoid pathway. VvMybCs1 showed a relative homology in the neighbor joining tree with MYB factors known to regulate flavonoid genes such as AtPAP1 (Borevitz et al., 2000), or ANT1 recently identified in tomato (Mathews et al., 2003) whereas slight homology with repressor proteins such as FaMyb1 (Aharoni et al., 2000) or AmMyb308-330 (Tamagnone et al., 1998) was observed.

## ***VvMybCs1* recombinant protein bound MBSI and MBSII motif sites but preferentially MBSIIG**

To evaluate DNA binding capacity of *VvMybCs1*, EMSA were performed with three oligonucleotids containing MYB Binding Site core motifs MBSI, MBSII and MBSIIG (Figure 3A) found on most promoters of phenylpropanoid genes (Sablowski et al., 1994). As shown in figure 3B, a specific retarded band was detected when protein extracts of *E. coli* producing *VvMybCs1* were incubated with MBSI, MBSII and MBSIIG radio labeled probes. Competition experiments revealed that binding behavior of MBSII and MBSIIG oligonucleotids was different with a greater affinity for MBSIIG (Figure 3C). Band shift began to disappear when nuclear extract was incubated with a 50-fold excess of MBSII whereas band shift in the same condition disappeared when incubated with a nuclear extract with a 25 fold excess of MBSIIG. Therefore, *VvMybCS1* is able to bind MBS sequences with differential affinity depending of MBS motifs.

## **Expression of *VvMybCs1* gene in grapevine tissues**

The expression pattern of *VvMybCs1* was analyzed by semi quantitative RT-PCR performed using 3'UTR *VvMybCs1* specific DNA as radiolabelled probe (Figure 4). All tissues studied showed expression of *VvMybCs1* especially in berry and leaves. In berry (e.g. flesh and skin) (Figure 4A), *VvMybCS1* transcripts lead to a strong decrease during berry development and become very low after véraison. The same pattern was found in flesh tissue (Figure 4B) but the overall transcripts level was weak compared to that obtained in berry. In grape skin (Figure 4B), an identical profile expression can be observed whereas in grape seed, an inverse pattern was detected with a highest level during the early step (6 weeks post-flowering) of seed development (Figure 4B) when compared to the later stage (10 weeks post-flowering). In the same manner, in seeds, a peak of mRNA was detected 6 weeks post-flowering. Subsequently, the amount of transcripts led to a decrease during grape seed development.

Gene expression in leaves was closely related to that obtained in grape berry with same evolution of expression during development (Figure 4C). In summary, *VvMybCs1* transcription factor was not fruit specific but expression studies indicated a strong relation between berry development, tissue origin and level of expression of *VvMybCs1*.

### **Accumulation of Anthocyanin and Proanthocyanidin Derived Compounds in Transgenics Flowers**

Primary transformants and T1 generation of transgenic tobaccos overexpressing *VvMybCs1* under the control of CaMV 35S promoter showed no significant differences in growth and aspect of leaves compared to control lines. On the other hand, dramatic changes in coloring were detected in transgenic tobacco flowers (Figure 5) and more particularly in petals (Figure 5B,D) . In addition, tissues with a weak coloration in wild type such as petal tube showed a strong red pigmentation restricted to the connective tissue not observed in wild type (data not shown). Most important alterations in pigmentation were observed in stamens (Figure 5F,H) where the amount of coloring was about ten fold more important in transgenic stamens than in control stamens (Figure 5E,G). In addition, the classic green coloration in the beginning of the fruit set was substituted by a pale green pigmentation that lead to pink coloration at the extremity of tobacco capsules during the early stages of development (Figure 5I,J). Another aspect that appeared in transgenic lines was the accumulation of condensed tannins in transgenic petals. DMACA reagent known to interact with condensed tannins (CT) (Xhie et al., 2003) provided a blue staining from *VvMybCs1* sense lines in the extremity of petal limbs (Figure 5L) as compared to control (Figure 5K). Surprisingly, no accumulation was observed in stamens (data not shown) independently of the developmental stage. DMACA staining in epidermal cells of petal limbs supported these results with an accumulation of CT in this tissue for transgenic epidermal cells (Figure 5M) as compared to the control (Figure 5O). CT

accumulation was even detected in transgenic seeds with increased levels in the seed coat (Figure 5P) as compared to control seeds (Figure 5M).

### **Quantification of Anthocyanins from Petals and Stamens Extracts**

Profiles of different chromatograms at 521 nm (Figure 6) identify anthocyanin compounds and other flavonoids giving some interesting results with regard to the differential distribution of polyphenolic compounds in petal limbs and stamens from transgenic or wild type control tobaccos. For wild type tobaccos, all compounds present in petal limbs are detected in small quantity in stamen tissues (peak B, D, E) or even absent as shown by peak A and C (Figure 6A and B). In petal limbs of transgenic tobacco, over expression of VvMybCs1 triggers a slight increase of most compounds cited above with the exception of compound B, which surprisingly decreases as compared to the wild type sample (Figure 6A). On the other hand, in stamens, spectacular increase in the peak C is observed (Retention time = 17 min). Moreover, a weak increase in the peaks D, E and finally the emergence of peak A is observed (Figure 6B). Because the strong accumulation of compound C in transgenic stamens might be associated to the emergence of reddish pigmentation (it gave a intense pink eluate at the exit of HPLC column, other peaks gave no such color), compound C was further investigated. Peak C was therefore collected and yielded a pure compound. FAB<sup>+</sup> mass spectroscopy showed [M]<sup>+</sup> peak at m/z = 595 consistent with molecular formula C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>15</sub>. The structure of this compound was elucidated by 1D and 2D-NMR experiments. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR data for this compound are reported in Table 1. By comparison with the literature (Toskangerpoll et al., 1999) and with our experimental data, the aglycon is confirmed to be cyanidin with a rhamnose and a glucose unit. The cross peak (see Table 1) between C-3 and H-1'' in the HMBC spectrum confirms the linkage position between the aglycone and the β-glucopyranoside. The cross peak between C-6'' and H-1''' indicated that the α-rhamnopyranoside was connected to position 6 of the glycosyl residue. The compound was

identified as Cyanidin 3-*O*-(6''-*O*- $\alpha$ -rhamnopyranosyl- $\beta$ -glucopyranoside), also known Keracyanin. Co-chromatographies with an authentic standard purchased from Extrasynthese (Genay-France) confirmed our results. Quantitative determination of total anthocyanin content absorbance was performed by spectrophotometry in stamens and petal limbs. The strongest variations were detected for stamen tissue with a total estimated anthocyanin concentration of  $4.33 \pm 0.08$  mg/g DW for transgenic plants while no basal level was detected in the wild type. In transgenic petal limbs, a slight accumulation was present ( $3.39 \pm 0.09$  mg/g DW) as compared to the wild type ( $1.48 \pm 0.26$  mg/g DW) (Figure 7). Quantifications performed by HPLC to estimate more accurately Cyanidin 3-rhamnoglucoside content confirmed the increase of anthocyanin production in transgenic petals and stamens. Our measurements show that the anthocyanin metabolic pathway in different tissues studied lead unequally to the production of Cyanidin 3-rhamnoglucoside because it represented 83% of total anthocyanin contents in *VvMybCs1* stamens, 61% in *VvMybCs1* petals and 80% in WT petals (data not shown). In addition to these analyses regarding to the anthocyanin derived compounds, peak E (Figure 6A and B) yielded a pure compound that was identified as quercetin-3-glucoside by mass spectrometry and co-eluting with an authentic standard purchased from Extrasynthese (data not shown). In summary, *VvMybCS1* over expression enhanced the anthocyanin biosynthetic pathway but several lines of evidences lead us to think that the production of other flavonoid compounds was altered in transgenic lines and certainly other anthocyanin compounds explaining partially various phenotype of coloration intensity observed in petal limb from transgenic flower tobaccos (data not shown). In summary, HPLC analyses revealed that *VvMybCs1* over-expression in tobacco enhanced flavonoid biosynthetic pathway and not only the anthocyanidin pathway. Further identification of compounds will give a more accurate picture regarding to the PA pathway altered by transformation, as suggested by differential coloration of transgenic petal limbs.

### **Differential Transcriptional Activation of Phenylpropanoid Genes**

RT-PCR analysis in leaves (figure 8) and flowers (figure 9) for three independent lines indicated that *VvMybCs1* acts as an activator of expression of several phenylpropanoid genes. In leaves of plants over-expressing *VvMybCs1*, genes involved in phenolic metabolism such as Coumaroyl CoA 4 Hydroxylase or in monolignol metabolism such as CAD, COMT appeared to be up-regulated compared to control plants. In stamens, expression of genes involved in the flavonoid biosynthetic pathway was up regulated as compared to the wild type. Surprisingly, no significant increase of expression of these same genes was detected in petals limb whereas final products were over-produced. In addition, expression of DFR in petals was down regulated as compared to the expression of control plants. Northern blot using heterologous probe of ANS cDNA from *Petunia* revealed an enhancement in transcript levels from transgenic petal limbs but no up regulation was detected in stamens leading to think that regulatory mechanism of *VvMybCs1* for ANS gene expression could be different between these two organs.

### **Histological staining of secondary vassels from nerves of transgenic tobacco leaves**

To evaluate the role of *VvMybCS1* in the regulation of lignin metabolism, we study the quantity and the composition of lignin in secondary vassels by two experiment methods. Autofluorescence by UV was used to estimate the content of lignin in vassels. In stems as shown in fig 10(A-B), a dramatic decrease of lignin content was observed in transgenic lines (Figure 10A) as compared to the control line (Figure 10B). Indeed, only secondary vassels appeared to accumulate lignin. Same experiments in petioles showed no quantitative modification in lignin deposition between control line (Figure 10C) as compared to the transgenic line (Figure 10D). However, Maüle reagent test in same petioles revealed changes in ratio S/G units in favor of S Unit restricted only to the phloem cells (Figure 10F) as compared to the controls petioles where no red staining was detected (Figure 10E).

### **Disruption of VvMybCs1 in anther development**

Anther development was followed in transgenic plants strongly overexpressing VvMybCs1 as well as in wild type plants. The overall development was similar in both lines with regards to the size and shape of anthers and stamen filaments (Figure 11A,B). However, anthers of the transgenic line remained undehiscent. At the same stage, pollen grains were freely released from wild type flowers. Germination experiments showed that male sterility of transformed plants was not related to the production of abnormal pollen (not illustrated here).

Cross sections of tobacco inflorescences before dehiscence show that anther development is not affected in transgenic plants during the early stages of development described by Koltunow et al., 1990 (Figure 11B,C). Close inspection of the anther endothecium showed that this difference was related to changes occurring during lignification of endothelial cell walls. During maturation of endothelial cells before dehiscence, secondary lignified thickenings were growing along the radial walls of the endothecium, but not on tangential ones (Figure 11D,E). This rigid frame later allowed the breaking of endothelial walls, stomium formation and pollen release. In transformed plants, less endothelial cells developed lignified fibers (Figure 11F) and these fibers were often incomplete, covering only part of the radial walls (Figure 11E). In these conditions, the rigidity of the wall frame was lower and at the later stages, the subsequent shrinkage of the anther walls resulting in the release of pollen grains in wild plants did not take place in the transgenic plants.

## Discussion

### VvMybCs1, a new class of MYB factor

In this work, all results obtained for VvMybCs1 suggest that we have identified a new class of MYB regulatory factors that might play a key role in the control of at least three branches of the phenylpropanoid pathway. Global and local protein analyses, especially on the R2R3 MYB domain, show a weak homology in sequence with known MYB proteins whose functions have been investigated. The nearest known homologue for VvMybCs1 is the repressor AtMyb4 with 66% sequence homology to R2R3 MYB domain followed by 64% of homology in sequence for AmMyb330 and AmMyb308. However, all these MYB factors involved in the repression of some target gene expression contain in their C-terminal region the conserved C2-motif  $\text{pdLNL}^{\text{D}}/\text{E}^{\text{I}}\text{xI}^{\text{G}}/\text{S}$ , that was not detected in the carboxyl domain of the present protein (Jin *et al.*, 2000, Aharoni *et al.*, 2000). Without ruling out the possibility of a repressive action mode of VvMybCs1, it might act differentially in the control of “phenylpropanoid” genes expression. On the other hand, two elements within the protein sequence attest to the original character of VvMybCs1. Indeed, we detected the occurrence, for the first time, in MYB proteins of a conserved Glutamin Rich Domain (GRD) restricted to the carboxyl region. This particular motif sequence was found only in a new class of transcriptional factors that repressed AGAMOUS homeotic expression gene during flower development suggesting other likely target genes for VvMybCs1 factor (Conner and Liu, 2000). Moreover, another conserved motif named C3 was found, which was located exclusively in three of the nearest MYB homologues of VvMybCs1 including AtMYB5, BNGHi233 and OSMYB4. The functionality of these three MYB genes is not well understood. Also, no one of these regulatory proteins appeared to be involved in the control of flavonoid pathway (Li *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1997). However, according to Kranz’s classification (Kranz *et al.*, 1998) where AtMYB5 belongs to a sub-group represented by itself

only and the homology results between the ectopic expression of VvMybCs1 gene in tobacco, and AtMYB5, BNGHi233 and OSMYB4, therefore, indicate the emergence of a new MYB cluster associated to the control of several branches of phenylpropanoid pathway.

In the flavonoid pathway, we saw in results that several branches were regulated by VvMybCs1 factor exclusively in tobacco flowers (anthocyanin, flavonol and proanthocyanin) with differences according tissues. Except AtPAP1 in *Arabidopsis thaliana* that triggered the activation of lignin and anthocyanin pathways on the whole plant; it is unusual to have a unique gene with the ability to control three branches of same metabolic pathway (Borevitz et al., 2000). But, the phylogenetic distance of AtPAP1 and other known MYB proteins associated in the production of several flavonoid derived compounds suggests the association of VvMybCs1 to a distinct group. It is the same for the effect in lignin content. Definitely, in transgenic stems and petioles, global modifications in lignin content were strongly different than that was observed in most of transgenic tobaccos overexpressing MYB factors such as AmMYB308, AtMYB61, PtMYB4 from other plants, which had an overall effect on the lignin content in *planta* (Tamagnone et al., 1998, Newman et al., 2004; Patzlaff et al., 2003). So, the interest of this new regulatory protein is consistent with its dual functionality in the phenylpropanoid pathway that is depending also on the cell specificity.

#### **VvMybCs1 : interaction with others regulatory proteins and cell specificity**

In plants, anthocyanin metabolism is under the control at least of two large family regulatory proteins (MYB, MYC). Recently, a third family (WD40 repeats) has been found to play a key role in the triggering of some flavonoid genes (Walker et al., 1999). In maize, the majority of structural genes encoding enzymes committed to anthocyanin biosynthesis, is coordinately regulated by MYC protein R and the MYB protein C1 in the aleurone layer and by other family gene members in other plant parts (Mol et al., 1998). In *Arabidopsis thaliana*, ectopic expression of *AtPAP1* leading to up regulation of PAL, CHS and DFR gene

expression is sufficient to enhance production of both lignin and anthocyanin compounds (Borevitz et al., 2000). Recently, a homologous of *AtPAP1* in tomatoes, *ANT1* was identified and its overexpression, in tobacco and tomatoes, allowed to the accumulation of a huge quantity of anthocyanin derived compounds in the whole plant (Mathews et al., 2003).. In petunia, combinatorial control of MYB and MYC transcription factors is likely to be required to control the entire biosynthetic anthocyanin pathway (Quattrocchio et al., 1998; Spelt et al., 2000). In our study, the first biosynthetic pathway easily observed in transgenic lines was the anthocyanin pathway with a dramatic reddish pigmentation of epidermal cells of stamens (filaments and anthers) and a relative increase in coloration of petal limbs as compared to the control.

In stamen tissue, the accumulation of anthocyanin derived pigments was located only in epidermal cells (data not shown). Expression studies of some structural genes involved in the anthocyanin pathway revealed strong difference in the behaviour of VvMybCs1 between the stamen and petal tissues. This tissue-specific functioning is commonly observed in analysis of most of MYB or MYC proteins (Solano et al., 1995; Li et al., 1996; Noda et al., 1994; Quattrocchio et al., 1998; Spelt et al., 2000).

Two mechanisms were proposed to explain the cell specificity in function for VvMybCs1. Firstly, VvMybCs1 underwent post-traductionnal modifications in epidermal cells that were required for its activity (Solano et al., 1995). Secondly, it need to the co-expression of one or more protein partners such as MYC or WD-40 proteins, which could be specifically expressed in some layer cells of flowers.

Whether we admitted the first assumption, results obtained on the expression of some structural genes in petal limb tissues, might be explain by competition events occurring between an active MYB factor present in epidermal cells of corolla and the grape berry MYB factor introduced. These two proteins expressed in the same cells and supposed similar for

DNA binding affinities, could bind at same target genes leading, *in vivo*, to a reduction in expression of their transcriptional level (Moyano et al., 1996). In our work, the expression of DFR gene in petals limbs is less significant in transgenic lines as compared to the control line would support this assumption. Meanwhile, retro-transcripts levels for this same gene, in stamens tissues are in favor of transgenic lines as compared to the control line.

The second assumption to explain these various phenotypes between stamens and petals may be due to the titration of an endogenous co-partner, which would be generated by ectopic expression of *VvMybCs1* gene. This solution has been recently investigated with the expression of a MYB from Maize, which titrated a MYC protein in tobacco flowers (Chen et al., 2004). In our case, the relative increase in anthocyanin, detected in petal limbs could be explained by a titration of MYC partner, thus limiting the enhancement of anthocyanin genes. But this assumption did not explain clearly the profile obtained in stamens. So, additional investigations will be required to elucidate the functioning of *VvMybCs1* protein in stamens.

### ***VvMybCs1* activates the cyanidin biosynthetic pathway**

Even if *VvMybCs1* activates expression of all genes in flowers, especially in stamens, it is not sufficient to produce several anthocyanin derived compounds. Indeed, only one diglycosylated cyanidin is overproduced in transgenic tobaccos. Recently, a metabolom analysis on tobacco flowers overexpressing a MYB repressor of the anthocyanin pathway from strawberry, revealed among nine molecules that showed a strong differential content between transgenic and control plants, and only one anthocyanin derived compound, the cyanidin-3-rhamnoglucoside commonly named Keracyanin was detected (Aharoni et al., 2002). So, the cyanidin pathway appears to be the main pathway in tobacco flowers. However several lines of evidence in HPLC analyses suggest that other compounds closed to anthocyanin skeleton are weakly produced. So, it might be interesting to estimate whether

VvMybCs1 allows the production of other anthocyanin derived compounds different than cyanidin compounds and dependant from other anthocyanin pathway (Holton et al., 1995).

In grape berry, the pelargonidin pathway does not exist, but the cyanidin and the delphinidin pathways allow producing respectively two classes of anthocyanins. The first consists of cyanidin and peonidin derived compounds and the second is composed of delphinidin, petunidin, malvidin derived compounds. The separation of these two pathways depends of the expression of two genes encoding proteins that belong cytochrome P-450 family, the flavonoid-3'-hydroxylase and flavonoid-3'5'-hydroxylase. It might be thus interesting to know whether VvMybCs1 factor activate preferentially the transcription of one of these two genes, thus encouraging one of two biosynthetic pathways and finally modify the global content in anthocyanins within grape berry. These study are actually in progress in transformed grape berry to determinate which anthocyanin pathways are predominantly favoured.

### **VvMybCs1 is involved in the spatio-temporal regulation of proanthocyanidin pathway**

It is noteworthy that ANS is the first enzyme that controls the production of epicatechins in *Arabidopsis thaliana* (Abrahams et al., 2003). So, its implication in these two metabolic branches of flavonoids (anthocyanin and proanthocyanidin) suggests the regulation of its gene expression may be different from those observed for other flavonoid genes. It could depend on developmental stage and the tissue localization. In this work, the up-regulation of ANS gene observed only in petals might be related to the proanthocyanidin pathways whereas the non-affected expression of its gene in stamens could explain the absence of condensed tannins observed in this tissue.

However, the accumulation of condensed tannins in petals might indicate the implication of VvMybCs1 in the control of one or several structural genes involved in the proanthocyanidin pathways. In most of plants, the proanthocyanidin pathway is divided in

two branches afterward the action of dihydroflavonol reductase enzyme. The first pathway leads to the production of epicatechins derived compounds. The starting point begins, as we previously saw, by the anthocyanidin synthase, which is considered as the key enzyme in the production of epicatechins derived compounds (Abrahams et al., 2003). The following step in this metabolic pathway is performed by the anthocyanidin reductase named also ANR, which has been identified by mutation in *Arabidopsis thaliana* (Devic et al., 1999). Its function is to trigger the synthesis of the epiflavan-3-ols that are useful to precursors of proanthocyanidins (Xhie et al., 2003). The second pathway for proanthocyanidin pathway begins by the loss of a hydroxyl residue of leucoanthocyanidin by leucoanthocyanidin reductase or LAR, which results in the production of flavan-3-ols or catechins derived compounds (Tanner and Kristiansen, 1993). Subsequently, all these compounds will polymerize to produce proanthocyanidin compounds to form the structural units of condensed tannins (Tanner and Kristiansen, 1993).

Then, ANR and/or LAR genes could be good target genes for *VvMybCs1* and subsequently to explain accumulation of condensed tannins in transgenic tobacco (Tanner and Kristiansen, 1993, Xhie et al., 2003). In grape berry, seed is the organ, which more accumulate condensed tannins. This accumulation represents 85% of condensed tannins produced in the berry. In grape Shiraz seed, the production of tannins has occurred between fruit set and véraison stage, with a peak of accumulation around 9 weeks after post-flowering (Downey et al., 2003). This result is coincident with the pattern of *VvMybCs1* expression that displays an increase within three weeks after post-flowering when condensed tannins began to accumulate. In particular, during this stage in seeds, increase in content of epicatechins monomers compounds was observed. So, *VvMybCs1* might be involved in this production via the control of the ANR expression. However, to attest the likely control of *VvMybCs1* on ANR expression, it will be necessary, in the future, to perform analytical studies (HPLC, CG-

MS) in order to identify the tannins compounds accumulating in transgenic petal limbs. By another way, we do not a putative control of LAR expression gene by VvMybCs1 triggering thus the catechins biosynthesis in this tissue. So, complementary experiments will have to be performed to attest the probably key role of VvMybCs1 in the regulation of these proanthocyanidin target genes in particularly for LAR and ANR genes.

### **VvMybCs1, a likely interaction in anthers development**

Delay in dehiscence observed in most of VvMybCs1 sense plants may be approached to recent studies about a MYB gene named AtMyb26 that regulate the cell wall fortification in the endothecium cell (Steiner-lange et al., 2003). Likewise, fail in anther dehiscence is also observed in *HvGAMYB* sense barley plants where anther development is altered resulting in male sterility (Murray et al., 2003). However some lines of evidences in results indicate that VvMybCs1 acts differentially to AtMyb26 or HvGAMYB. Homology in protein sequence has been shown, in several cases of MYB transcription factor, to correspond to a similar function. In our case, except to the presence of ultra conserved R2R3 repeat, any functionally relation can be established between these three regulatory proteins. In addition, tissue specific expression of *AtMYB26* and *HvGAMYB* gene exclusively in inflorescence while *VvMybCs1* is expressed in all tissues of grapevine could support that it action regulatory mode and the array of target genes might be different. Even though event male sterility in VvMybCs1 sense plants is related to that observed in AtMyb26 mutant and HvGAMyb sense plants, microscopic analyses revealed differences in the alteration of lignin depositing and in the cell compartment affected by these various mutations. While *VvMybCs1* sense anthers showed only one difference in the composition of lignin depositing within the endothecium cells especially, overall cell wall fortifications are missing in AtMyb26 mutant. In HvGAMyb, even the release of pollen grain is altered by overexpression, it is not the case in

VvMybCs1 plants where pollen grains are viable. So, we can suppose that VvMybCs1 can act differently to AtMyb26 and HvGAMYB in the regulation of anther development.

The understanding of dehiscence program during pollen release in plants has given rise to numerous works. In *Arabidopsis thaliana*, two functionally redundant MADS-Box genes, *SHATTERPOOF 1* and 2 (Shp 1, Shp2) are involved in the differentiation of cells on the dehiscence zone and the lignification of adjacent cells required for successful dehiscence (Liljegren et al., 2000). Previously observations have shown that *AGAMOUS* MADS-Box gene positively regulate the expression of shp1 and 2 (Savidge et al., 1995; Flanagan et al., 1996). Function of another MADS-box gene named FRUITFULL has been validated as repressor of *Shp1/Shp2* genes (Ferrandiz et al., 2000). Regulation of dehiscence program in anthers implies action of numerous regulatory proteins that control target genes expression, which promote dehiscence zone differentiation at the valve/replum boundary. Furthermore, the occurrence of one glutamine rich domain in the protein sequence of VvMybCs1 and shared with LEUNIG belonging to as new class of repressor of *AGAMOUS* gene (Conner et Liu, 2000) let to think us that VvMybCs1 might interact with / or regulate the expression of these regulatory proteins.

However, it remains to identify the real target genes and to determine the nature of interaction with the grapevine gene. Further analyses have to be performed to support this assumption. To summarize, the pleiotropic effects of VvMybCs1 and its broad mRNA expression profile in grapevine suggest that our candidate gene may interact also with several different DNA-Binding factors in different tissues or at different developmental with different arrays of targets. The molecular analyses of VvMybCs1 provided us with a unique opportunity to further investigate mechanisms underlying spatially and temporally restricted gene expression and to identify the real target and interacting genes involved in other metabolism than phenylpropanoid pathway.

**ACKNOLEWDGMENTS:**

We thank Dr. Christopher Augur and Pr. Jean Michel Mérillon for comments and advice on the manuscript. We are grateful to Dr. Cathie Martin and Dr. Asaph Aharoni for providing some cDNA probes used in this work. This work was supported by grants from Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux.

## REFERENCES

- Abrahams, S., Lee, E., Walker, A.R., Tanner, G.J., Larkin, P.J., and Ahston, A.R.** (2003). The *Arabidopsis TDS4* gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX).. and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *Plant J.* **35**, 624-636.
- Aharoni, A., Ric de Vos, H.C., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J.N.M., and O'Connell, A.P.** (2001). The strawberry FaMyb1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J.* **28**, 319-322.
- Aharoni, A., Ric de Vos, C.H., Verhoeven, H.A., Maliepaard, C.A., Kruppa, G., Bino. R., and Goodenowe, D.B.** (2002). Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry. *OMICS* **6**, 217-234
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Asif, M.H, Dhawan, P., and Nath, P.** (2000). A simple procedure for the isolation of high quality RNA from Ripening Banana Fruit. *Plant Mol. Biol. Report.* **18**, 105-119.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG.** (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* **148**, 187-197.
- Bagchi, D., Sen, C.K., Ray ,S.D., Das, D.K., Bagchi, M., Preuss, H.G., and Vinson, J.A.** (2003). Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat Res.* **523-524**:87-97.
- Bevan, M.W.** (1984). Binary Agrobacterium vectors for plants transformation. *Nucl. Aci. Res.* **12**, 22.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A. and Lamb, C.** (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383-2394.

- Boss, P.K., Davies, C. and Robinson, S.P.** (1996a). Analysis of the Expression of Anthocyanin Pathway Genes in Developing *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* **111**, 1059-1066.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Chapple, C.C., Vogt, T., Ellis, B.E., and Somerville, C.R.** (1992). An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell.* **4**, 1413-1424.
- Chen, B., Wang, X., Hu, Y., Wang, Y., and Lin, Z.** (2004). Ectopic expression of a c1-I allele from maize inhibits pigment formation in the flower of transgenic tobacco. *Mol Biotechnol.* **26**, 187-192.
- Cone, K.C., Burr, F.A., and Burr, B.** (1986). Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 9631-9635.
- Conner, J., and Liu, Z.** (2000). LEUNIG, a putative transcriptional corepressor that regulates AGAMOUS expression during flower development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12902-12907.
- Devic, M., Guilleminot, J., Debeaujon, I., Bechtold, N., Bensaude, E., Koorneef, M., Pelletier, G., and Delseny, M.** (1999). The *BANYULS* gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant J.* **19**, 387-398.
- Downey, M.O., Harvey, J.S., and Robinson, S.P.** (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. of Grape and Wine Res.* **9**, 15-27.
- Fauconneau, B., Waffo Teguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., and Mérillon, J.M.** (1997). Comparative study of radical scavenger and antioxydant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci.* **61**, 2103-2110.
- Ferràndiz, C., Liljegren, S.J., and Yanofsky, M.F.** (2000). Negative regulation of the shatterproof genes by fruitfull during *Arabidopsis* fruit development. *Science* **289**, 436-438.

**Flanagan, C.A., Hu, Y., and Ma, H.** (1996). Specific expression of the *AGLI* MADS-box gene suggests regulatory functions in *Arabidopsis* gynoecium and ovule development *Plant J.* **10**, 343-355.

**Glories, Y.** (1988). Anthocyanins and tannins from wine : Organoleptic properties. In : « Plants flavonoids in biology and medicine II : Biochemical, cellular, and medicinal properties ». Eds V. Cody et al. (Liss A.R., Inc., New York). pp. 124-134.

**Grotewold, E., Sainz, M.B., Tagliani, L., Hernandez, J.M., Bowen, B., and Chandler, V.L.** (2000). Identification of the residues in the Myb domain of Maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13579-13584.

**Hollman, P.C., and Katan, M.B.** (1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol.* **37**, 937-942.

**Holton, T.A., and Cornish, E.C.** (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1071-1083.

**Horsch, R.B., Klee, H.J., Stachel, S., Winans, S.C., Nester, E.W., Rogers, S.G., and Fraley, R.T.** (1986). Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutants in leaf discs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**, 2571-2575.

**Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrrens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weissarr, B., and Martin, C.** (2000). Transcriptional repression by AtMyb4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **22**, 6150-6161.

**Kennedy, J.A., Troup, G.J., Pilbrow, J.R., Hutton, D.R., Hewitt, D., Hunter, C.R., Ristic, R., Iland, P.G., and Jones, G.P.** (2000). Development of seed polyphenols in berries from *Vitis Vinifera* L.cv. Shiraz. *Aust. J. Grape Wine Res.* **6**, 244-254.

**Klatsky, A.L.** (2002). Alcohol and cardiovascular diseases: a historical overview. *Ann N Y Acad Sci.* **957**, 7-15.

- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K., and Honda, C.** (2002). MYB related genes of the kyoho grape *Vitis labruscana* regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*. **205**, 924-933.
- Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M., and Golberg, R.B.** (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* **2**, 1201-1224.
- Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., 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**, 263-276.
- Lairon, D, and Amiot, M.J.** (1999). Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Curr Opin Lipidol.* **10**, 23-28.
- Li, S.F., Santini, J.M., Nicolaou, O., and Parish, R.W.** (1996). A novel myb related gene from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **379**, 117-121.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L., and Yanofsky, M.F.** (2000). SHATTERPRORF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis* *Nature* **404**, 766-770.
- Lin, L.C., Kuo, Y.C., Chou CJ.** (2002). Immunomodulatory proanthocyanidins from *Ecdysanthera utilis*. *J. Nat. Prod.* **65**, 505-508.
- Martin, C., Prescott, A., MacKay, S., Bartlett, J., and Vrijlandt, E.** (1991). The control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum Majus*. *Plant J.* **1**, 37-49.
- Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., Liu, X.L., Connors, K., Matheis, N., Shuster, D.K., Menasco, D.J., Wagoner, W., Lightner, J., and Ry Wagner, D.** (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification and transport. *Plant Cell.* **15**, 1689-1703.
- Mérillon, J.M., Huguet, F., Fauconneau, B., Waffo Teguo, P., Barrier, L., Vercauteren, J., and Huguet, F.** (1997). Antioxydant activity of stilbene astringin, newly extracted from

Vitis vinifera cell cultures. Clin. Chem. **43**, 1092-1093.

**Mol, J., Grotewold, E., and Koes, R.** (1998). How genes paint flowers and seeds. Trends Plant Sci. **3**, 212-217.

**Moyano, E, Martinez-Garcia, J.F., and Martin C.** (1996). Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in antirrhinum flowers. Plant Cell **9**, 1519-32.

**Murray, F., Kalla, R., Jacobsen, J., and Gubler, F.** (2003).. A role for HvGAMYB in anther development. Plant J. **33**, 481-491.

**Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. **15**, 473-477.

**Newman, L.J., Perazza, D.E., Juda, L., and Campbell, M.M.** (2004). Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic components of the det3 mutant phenotype. Plant J. **37**,239-250.

**Noda, K, Glover, B.J., Linstead P., and Martin C.** (1994). Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a MYB-related transcription factor. Nature **369**, 661-664.

**Patzlaff, A., McInnis, S., Courtenay, A., Surman, C., Newman, L.J., Smith, C., Bevan. M.W., Mansfield, S., Whetten, R.W., Sederoff, R.R., and Campbell, M.M.** (2003). Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. Plant J. **36**, 743-754.

**Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A., and Saedler, H.** (1987). The regulatory c1 locus of Zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. EMBO J. **6**, 3553-3558.

**Quattrochio, F., Wing, J.F., van der Woode, K., Mol, J.N., and Koes, R.** (1998). Analysis of bHLH and MYB domain proteins : Species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. Plant J. **13**, 475-478.

- Quattrocchio, F., Wing, J.F., Leppen, H.T.C., Mol, J.N.M., and Koes, R.E.** (1993). Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *Plant Cell* **5**, 1497-1512.
- Sablowski, R.W., Moyano, E., Culianez-Macia, F.A., Schuch, W., Martin, C., and Bevan, M.** (1994). A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J.* **13**, 128-37.
- Savidge, B., Rounsley, S.D., and Yanofsky, M.F.** (1995). Temporal Relationship between the Transcription of Two Arabidopsis MADS Box Genes and the Floral Organ Identity Genes *Plant Cell* **7**, 721-733.
- Solano, R., Nieto, C., Avila, J., Cañas, L., Diaz, I. and Paz-Ares, J.** (1995). Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia Hybrida*. *EMBO J.* **14**, 1773-1784.
- Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J.N.M., and Koes, R.** (2000). *Anthocyanin 1* of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* **12**, 1619-1631.
- Steiner-Lange, S., Unte, U.S., Eckstein, L., Yang, C., Wilson, Z.A., Schmelzer, E., Dekker, K., and Saedler, H.** (2003). Disruption of *Arabidopsis thaliana* MYB26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers. *Plant J.*, **34**, 519-528.
- Suzuki, A., Suzuki, T., Tanabe, F., Toki, S., Washida, H., Wu, C.Y, and Takaiwa, F.** (1997). Cloning and expression of five myb-related genes from rice seed. *Gene* **198**, 393-398.
- Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F.A., 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.
- Tanner, G., and Kristansen, K.N.** (1993). Synthesis of 3,4 – cis [3H] – leucocyanidin and enzymatic reduction to catechin. *Anal Biochem* **209**, 274-277.

**Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., JeanMougin, F., and Higgins, D.G.** (1997). The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Aci. Res.* **17**, 2362.

**Toskangerpoll, K., Fossen, T., and Andersen, O.M.** (1999). Anthocyanin pigments of tulips. *Phytochem.* **52**, 1687-1692.

**Verwoerd, T.C., Dekker, B.M.M., and Hoekema, A.** (1989). A small scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucl. Aci. Res.* **17**, 2362.

**Walker, A.R., Davison, P.A, Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, M.D., and Gray, J.C.** (1999). The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* Locus, Which Regulates Trichome Differentiation and Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis, Encodes a WD40 Repeat Protein. *Plant Cell* **11**, 1337-1349.

**Xhie, D.Y., Sharma, S.B., Paiva, N.,L., Ferreira, D., and Dixon, R.A.** (2003). Role of Anthocyanidin Reductase encoded by BANYULS in plants flavonoid biosynthesis. *Science* **199**, 396-399.

**Yang, S., Sweetman, J.P., Amirsadeghi, S., Barghchi, M., Huttly, A.K., Chung, W.I., and Twell, D.** (2001). Novel Anther-specific MYB gene from tobacco as putative regulators of Phenylalanine Ammonia Lyase Expression. *Plant Physiol.* **126**, 1738-1753.

**ARTICLE 2**

## **Characterization of a new MYB transcription factor involved in the regulation of flavonoid throughout berry development**

Deluc<sup>a</sup>, L.G., Marchive<sup>a</sup>, C., Barrieu<sup>a</sup>, F., Lauvergeat<sup>a</sup>, V., Farbos<sup>b</sup>, I., Hernould<sup>b</sup>, M., Geny<sup>c</sup>, L. and Hamdi<sup>a</sup> S.

<sup>a</sup> : Equipe Biologie de la Vigne, UMR 619, IBVM, INRA, 33883 Villenave d'Ornon.

<sup>b</sup> : Equipe Organogenèse et régulation de la division cellulaire, UMR 619, IBVM, INRA, 33883 Villenave d'Ornon.

<sup>c</sup> : Equipe Ecophysiologie et Agronomie Viticole, UMR 1219 Œnologie et Ampélogie-INRA, Bordeaux.

## ABSTRACT

In grape berry, ripening is characterized by dramatic changes in gene expression, enzymatic activities and metabolism that lead to the production of compounds. Flavonoid pathway belongs to this metabolism that underlies spectacular modifications throughout grape berry development. Although these processes have been extensively studied, little is known about the mechanism resulting in the coordinated regulation of structural genes involved in the biosynthesis of flavonoid derived compounds in grape berry. Several lines of evidences in this work indicate that identification of a new cDNA encoding a MYB factor allows focus a new class of MYB regulatory proteins required for activating the transcriptional machinery involved in the flavonoid pathway. In addition to the classical DNA Binding Domain shared by most of MYB proteins, protein sequence in the carboxy terminus revealed both the occurrence of a conserved C-terminal GIDPxTH motif specific to the regulatory acting in the control of phenylpropanoid genes but also the presence of new motifs that are only present in a few number of MYB proteins (AtMyb5, OsMyb4). Ectopic expression in tobacco led to an accumulation of several phenolic compounds such as the cyaniding-3-rhamnoglucoside commonly keracyanin and also quercetin-3-glucoside, which correspond respectively to the main anthocyanin and flavonol compounds identified in tobacco. Additionally, we showed that VvMybCs2 factor might be involved in the control of biosynthesis of epicatechin derived compounds via regulation of anthocyanidin synthase gene expression. Besides, control in the expression of anthocyanidin reductase positioned upstream in the pathway was discussed. Moreover, pleiotropic effects of *VvMybCs2* over-expression, in particular in the lignin metabolism pathway and in the identity of male floral organ were investigated. Taken together, these findings are consistent with the hypothesis that VvMybCs2 is strongly involved in the control of some critical steps of flavonoid pathway but it appeared to be associated to others metabolisms.

## INTRODUCTION

Phenylpropanoid metabolism leads to the accumulation of several compounds (Figure 1), which play a key role in the growth and the stability of plants. In addition to offering a beautiful pigmentation in flowers, fruit, seeds, and leaves, flavonoids, a sub-class of phenylpropanoid, are also involved in the signaling between plants and microbes (Hahlbroock et al., 1989, Koes et al., 1994), in male fertility of some species, in defense as antimicrobial agents and feeding deterrents, and in UV protection.

The flavonoid family comprises several classes of compounds. The well known is the class of anthocyanins, responsible for the wide range of color in various organs of the plant (Mol et al., 1999). The physiological function of the anthocyanin pigments and flavonol copigments is the recruitment of pollinators and seed dispersers to facilitate the dissemination of seeds. In addition, flavonoids contribute to the stability of grape berry by protecting it as natural barrier against environmental stresses such as UV irradiation (Downey et al., 2003).

In addition, these compounds are responsible for the bitter and astringent properties of wine, and their interactions between them are known to be critical in red wine color stability (Glories, 1988).

In plants, the regulation of flavonoid pathway is well understood, in particular the anthocyanin pathway (Martin et al., 1991; Holton and Cornish, 1995; Mol et al., 1998). Two genes families encoding MYC and MYB- like protein are extensively characterized in various plant species such as maize, snapdragon and petunia (Cone et al., 1986; Martin et al., 1991; Quattrocchio et al., 1998; Mol et al., 1998). MYB transcription factors family is widely represented in plants. They take part in the control of various regulatory mechanisms, which are mainly involved in the secondary metabolism (Tamagnone et al., 1998; Martin et al., 1991; Patzlaff et al., 2003; Nesi et al., 2001), the control of cellular morphogenesis (Noda et al., 1994; Lee and Shiefelbein, 1999), and sometimes in the signaling pathway (Abe et al.,

1997). Members of this family are characterized by having a structurally conserved DNA binding domain, the MYB domain. Different categories of MYB proteins have been identified. They depend on the number of imperfect repeats of the MYB domain that they contain (Jin et al., 1999). The two-repeat R2R3 MYB family is the largest family studied in plants. In plant crop species, the regulation of the flavonoid pathway showed similar results with the implication of these transcription factors in various species such as strawberry (Aharoni et al., 2000), tomato (Mathews et al., 2003).

Recently, a study on a mutant of *Arabidopsis thaliana* demonstrated the key role of this type of regulatory proteins in the production of proanthocyanidin biosynthesis, precursors of condensed tannins in the seed coat (Nesi et al., 2001). In grape berry, the coordinated expression of most structural genes during grape berry development suggested the implication of this regulatory protein family in this flavonoid branches (Boss et al., 1996a). In our laboratory, we identified a first MYB gene, named VvMybCs1 involved in the regulation of several branches of flavonoid pathway during the early stages of berry development (Deluc et al., in submission). However, the identification of new transcriptional regulators involved in the regulation of late stages of flavonoid biosynthesis will give new insights to complete our previous results obtained with VvMybCs1 and to better understand the coordinated regulation of this biosynthetic pathway during all stages of grape berry ripening. Recently, recent studies of grapevine have pointed to the key role of several MYB factors in the regulation only of the *UFGT* gene, a LFG (Latter Flavonoid Gene) responsible for the glycosylation of anthocyanidin precursor biosynthetic pathway (Kobayashi et al., 2002). However, we still lack information about the control of the other down stream genes than UFGT, which are also involved in the biosynthesis of other flavonoids than anthocyanins, such as tannins and flavonols.

In this study, we observed the identification of a new transcriptional regulator that encodes a MYB protein, *VvMybCs2*, whose function was closely related to *VvMybCs1*. Its ectopic expression in tobacco plants enhanced the production of anthocyanidin and proanthocyanidin derived compounds, especially epicatechin precursors. Moreover, it may play a critical role in the regulation of flavonol pathway by activating the quercetin-3-glucoside biosynthesis. In addition, we identified several male sterile mutants in *VvMybCs2* sense lines, suggesting that it could be also play a key role in the regulation of other metabolisms than phenylpropanoid pathway. Indeed, conversion of stamens into petaloid structures for 30% of transgenic lines indicated that *VvMybCs2* might interact in the program of floral development. However, futures studies will be carried out to corroborate these results and to focus on a likely relation between our target gene and others involved in floral organization.

## **METHODS**

### **Plant Materials**

Berries from *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon were sampled at 2 weeks intervals during the 2002 growing season. Each week, a sample of 50 randomly selected berries from three bunches were harvested. Stages of berry development were chosen according to criteria including size, measures of soluble solids (Brix), softening and coloring of the berries as previously described by Boss et al., 1996. Berries for RNA extraction were randomly sampled and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at – 80°C pending further analysis. Separate skin and flesh samples were obtained by peeling fresh berries before freezing in liquid nitrogen.

Non-transgenic and transgenic tobacco *in vitro* plants (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) were grown at 23°C in a 16 day light cycle and transferred to a green house to produce seeds with same culture conditions. For harvesting seedlings, seeds of *N. tabacum* were sterilized in 70 % ethanol for two minutes, 2.5% potassium hypochlorite for 10 minutes and finally washed three times with sterile water. They were stratified for two days at 4°C in the dark and germinated on 0.5% agar plates containing selective Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1962) medium complemented with 30% (W/V) sucrose by incubation in 16 hours light, 8 hours dark at 23°C.

### **cDNA Cloning**

A cDNA library of grapevine (véraison stage) constructed using Smart cDNA cloning kit provided by Clontech (US) was used as template for Polymerase Chain Reaction (PCR) cloning. Two degenerated oligonucleotides 5'- GANRTMAARAAYTAYTGGAACWCN - 3' in forward and 5'- NGTGTTCCARTARTTYTTKAYNTC-3' in reverse respectively were used in combination with T7 primer and 5' primer located in the pTriplex vector. PCR products were cloned into pGemTeasy (Promega, US) and sequenced by Genome Express

(Paris, France). Afterward, specific oligonucleotides defined within the 5' and 3' non coding regions of sequenced cDNA were used to amplify the complete full length cDNA.

### **Plasmid Constructions**

*VvMybCs2* cDNA was amplified by PCR using Pfu polymerase (Promega, US) with oligonucleotides containing respectively XbaI restriction site in the forward and SalI in the reverse. PCR products were digested by XbaI and SalI and inserted into the binary vector pGiBIN19 (Bevan, 1984) to generate pGiBIN19-*VvMybCs2* under control of the 35S promoter of *Cauliflower Mosaic Virus* and the Nopaline synthase (Nos) terminator. For expression in *E. coli* M15 (pREP4) strain (Qiagen, US), *VvMybCs1* cDNA was amplified by PCR using Pfu polymerase with oligonucleotides containing respectively SacI restriction site in the forward and SalI in the reverse. PCR products were digested by SacI and SalI and inserted into the pQE30 vector (Qiagen, US) to generate pQE30-*VvMybCs2*.

### **Plant Transformation**

Tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthii*) was used as the host to generate transgenic plants. PGiBIN19-*VvMybCs1* construct was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* LB4401 strain. Leaf discs transformation and regeneration from transgenic plants were performed as described by Horsch (1986). Transformed plants were selected using kanamycin (100µg/ml) as selective marker and the presence of transgene was detected by PCR.

### **RNA: Analysis and extraction**

RNAs from berries were extracted according to the method as described by Asif et al., 2000. RNAs of transformed tobacco leaves were extracted using RNA Extraction Plants Mini Kits (Qiagen, US). Total RNAs from tobacco flowers were extracted as described by Verwoerd et al., 1989. Gene-specific primers used for RT-PCR assays were chosen in 3'UTR regions. RT-PCR products were resolved by electrophoresis in 0.8 % agarose gels and transferred to Nylon Hybond XL filters (Amersham Pharmacia, Sweden) for two hours in alkaline buffer (0.4N

NaOH). Hybridization was performed at 65°C overnight with specific cDNAs probes ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dCTP-labelled by random priming method (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). Washing was performed according to instructions provided by the manufacturer. For Northern analysis, total RNAs were resolved by electrophoresis in 1.5% agarose-formaldehyde gels, transferred to nylon Hybon XL filters (Amersham Pharmacia, Sweden). Total RNAs were fixed using a cross-Linker (Stratagene). Membranes were probed with cDNAs ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dCTP-labelled by random priming method (Amersham Pharmacia, Sweden). Probes were purified using G50 columns (Amersham Pharmacia, Sweden). Equal loading of RNA samples and uniform transfer onto filters were confirmed by hybridization with constitutive Ubiquitin gene probe. For Northern blot analyses, hybridization was performed overnight at 42°C followed by washes under low stringency conditions once for 20 minutes in 2X SSPE, 0.1%SDS at room temperature, then once again for 20 minutes in 1XSSPE, 0.1%SDS and then under stringent conditions at 65°C, 0.5XSSPE and 0.1%SDS and finally in 0.2XSSPE, 0.1%SDS at 65 for 20 minutes.

### **Quantification of anthocyanins derived compounds from petals and stamens extracts**

Petal limbs and stamens were harvested from transgenic and wild type control tobaccos at equivalent ages and submitted to freeze-drying. Each sample (30mg DW (dry weight)) was extracted with methanol-0.32M HCl (85:15, v/v) overnight at 4°C. After centrifugation (3000 rpm, 5min), absorbance of the supernatant was measured at 535nm with a Secoman S250 spectrophotometer (Domont-France). Total anthocyanin content was calculated according to the extinction coefficient ( $E1\% = 461$  at this wavelength in the same solvent) of cyanidin or cyanidin-rhamnoglucosid, purified from transgenic and wild type tobacco flowers or purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Each extract was then diluted with an equal volume of water. 100 $\mu$ L of each diluted sample was analysed by HPLC with a ProntoSil Eurobound C18 (5 $\mu$ M) reversed phase column (4mm i.d. x 250mm) Bischoff (Leonberg-

Germany) with guard column. Solvents used for the separation were: A, TFA 0.1% in H<sub>2</sub>O; B, TFA 0.1% in acetonitrile. The elution program at 0.6mL/min was 12-26% B (0-35min), 26-100% B (35-36min), 100% B (36-49min), 100-12% B (49-50min), 12% B (50-60min). The chromatogram was monitored at 521nm. Keracyanin contents were estimated from a calibration curve obtained with pure compound using the same HPLC conditions.

HPLC analyses and purifications were carried out on a Gilson gradient system fitted with an UV-vis detector Spectra Physics model SP8450. Mass spectra were recorded with VG Autospec-Q in the FAB<sup>+</sup> mode. NMR spectra were recorded at 303K on a 500MHz Bruker spectrometer using CD<sub>3</sub>OD as a solvent.

#### **Quantification of proanthocyanidins derived compounds.**

Extraction of condensed tannins were carried out as described by Geny et al., 2003 and measurements were performed according to the method of Saucier et al., 2001. HPLC analyses were carried out on a Spectra-Physics system fitted with UV-Vis detector driven by a PC1000 system. Each extract was then diluted 10 fold excess with methanol and analyzed by HPLC with a HYPERSIL-KEYSTONE R BDS-C18 (5 $\mu$ M), reversed phase column (4 mm i.d. x 250 mm). Solvents used for the separation were A: acetic acid (5%) in water, B: methanol in acetic acid solution. The elution program at 1mL/min was 30-60% B (0-15 min), 100% B (15-25 min), 30% B (26-30 min).

#### **Histochemical staining of condensed tannins and lignin compounds**

Light microscopy studies were performed using a Zeiss Axiophot fluorescence microscope (Jena, Germany). Pictures were taken using a digital imaging system (Leica Microsystems, Beinsheim, Germany). Photographs were analyzed using Image ProPlus software (Media Cybernetics, UK).

To determine modifications of lignin deposition in endothecium, transgenic and wild type anthers were fixed in 3% formaldehyde solution for 60 minutes, were embedded in Paraplast Plus (Sherwood, St Louis, US) and subsequently used for preparing 2.5µm thin cross sections. After transferring the sections to slides, samples were incubated for 30 s at room temperature in aqueous solution of 0.05% (w/v) of toluidine blue solution and subsequently washed twice for 5 min with sterile water. After drying the sections at room temperature, Paraplast Plus was removed by incubating the slides in 100% HistoClear (National Diagnostic, Hessele Hull, UK). Then, the slides were treated with Entellan and subsequently covered with a cover slip. For condensed tannins revelation, transgenic petals were incubated for five minutes in 0.1% (m/v) of pDiMethylAminoCinnamAldehyde (Sigma, France) solution (ethanol/HCl 12 N, v/v). Then samples were rinsed successively three times using distilled water.

### **Scanning Electron Microscopy**

Young buds and early floral meristems were dissected and fixed overnight in 3% glutaraldehyde in 0.025M Sodium Phosphate buffer (pH 7.0) at 4°C. They were rinsed in buffer, dehydrated in a graded ethanol series and critical point dried in liquid carbon dioxide. Individual buds were mounted on stubs, coated with gold, and viewed in a scanning electron microscope, SEM.

### **In situ hybridization**

In situ hybridization experiments were carried out according to Bereterbide *et al.* (2002). Plasmids pGemT-*NtGlo3'* and PgemT*NtAG3'* containing 3'UTR of *Nt-Globosa* and *Nt-Agamous* from tobacco were used to synthesize the riboprobes. The probes were synthesized using the DIG (digoxigenin) RNA labeling kit (Boehringer Mannheim Biochemical) according to the manufacturer's instructions.

## **Sequence Analyses**

Comparison and analysis of the sequences were conducted with the advanced Basic Local Alignment Search Tool BLAST (Altschul et al., 1990) at the National center for Biotechnological information (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). For sequence alignments and illustration, Clustal W program (Thompson et al., 1997), Tree View software (License manager, UK 2000) and Seq Vu1.0.1 (Australia, 1995) were used. Accession numbers of genes used for phylogenetic tree are from top to bottom (1) X52125, (2) AAL78741, (3) CAA78388, (4) P27900, (5) AAB67720, (6) M37153, (7) AAA33482, (11) AAQ55181, (12) T02988, (13) U26935, (14) AAS68190, (15) AF336278, (16) in submission (17) BAC07543, (18) Z13996, (19) CAA55725, (20) BAA21619 (21) AAK84064, (22) JQ0957, (23) JQ0960.

## **Test of pollen viability of VvMybCs2 sense lines**

Auto-pollination was performed on transgenic lines showing delay on dehiscence to evaluate viability of pollen grains. Disrupted anthers in non-opened flowers were cut to sample pollen grains and subsequently put on the style of non-opened control flowers with cut stamens. Viability was supported by the appearance of capsule after three weeks.

## RESULTS

### Sequence analysis

Using PCR on *Vitis Vinifera* grape berry cDNA library at véraison stage, we identified one clone, named VvMybCs2, encoding putative R2R3 MYB proteins. *VvMybCs2* cDNA appeared to be a full length cDNA of 1220 bp encoding a protein of 312 amino acids. The amino terminal extremity contains the R2R3 imperfect repeats (DBD) responsible for binding to target DNA sequences (Figure 2A) and very conserved among MYB proteins associated to the regulation of phenylpropanoid pathway (Solano et al., 1997). In this DNA Binding Domain (DBD), we reported the presence of a shorter sequence closely related to amino residues in the maize transcriptional activator C1 (Grotewold et al., 2000) and required to interact with a bHLH cofactor (IR domain; Figure 2A). Others lines of evidence might indicate that VvMybCs2 could be associated to the regulation of “phenylpropanoid genes”. It contained one conserved sequence motif (C1-motif) (Figure 2B), which related it to several other MYB proteins previously clustered as members of subgroup 4 (Kranz et al., 1998) and restricted to the beginning of carboxy extremity. The motif  $\text{GIDP-x-TH}^{\text{K}}_{\text{R}}/\text{S}^{\text{P}}/\text{L}^{\text{L}}_{\text{K}}$ , remains essentially conserved in other MYB plant proteins involved in the regulation of phenylpropanoid genes. In addition two others motifs were detected in the carboxy region of VvMybCS2 protein. The motif C3 was located only in a few number of proteins whose one of members was VvMybCs1 transcription factor (Figure 2B) (Deluc et al., in submission) and others MYB factor such AtMYB5 (Li et al., 1996)(Figure 2B). VvMybCs2 contained also a second core motif (Glutamin Rich Domain) (Figure 2A) previously found in VvMybCs1 protein (Deluc et al., in submission). But, in this case, the conserved motif appeared to be partial.

Taken together, phylogenetic tree (Figure 2C) from 22 MYB protein sequences with VvMybCs2 revealed the emergence of a new cluster (shaded in blue) distinct from classical group of MYB regulators involved in the regulation of phenylpropanoids pathway.

### **Expression of *VvMybCs2* gene in grapevine tissues**

The expression pattern of VvMybCs2 was analyzed by semi quantitative RT-PCR performed using 3' UTR VvMybCs2 specific DNA as radiolabelled probe (Figure 3). All tissues studied showed expression of VvMybCs2 especially in berry and leaves. In berry (e.g. (flesh and skin) (Figure 3A), VvMybCs2 transcripts were present during all the stages of berry development studied with a constant high level from Véraison stage. The same pattern was found in flesh tissue (Figure 3B) but the overall transcripts level was weak compared to that obtained in berry. In grape skin (Figure 4B), an identical profile expression could be observed with a highest level 10 weeks after the flowering. In seed, the pattern was strongly different with a high level of gene expression during the early step of berry development (6 weeks after flowering) and a low level in the later step (10 weeks after flowering). In other tissues, gene expression in leaves was consistent with gene evolution in seeds with a relative decrease for ripening.

### **Enhancement of flavonoid accumulation in transgenic flowers**

Primary tobacco transformants and T1 generation overexpressing *VvMybCs2* under the control of CaMV 35S promoter showed no significant differences in growth and aspect of leaves. On the other hand, dramatic changes in flower pigmentation were observed in transgenic tobacco (Figure 4B) compared to the control line (Figure 4A), especially in petals. Two phenotypes in petal coloring were observed. Indeed, the first phenotype, extremities of petal limbs more deeply pink stained. However, this enhanced reddish pigmentation of petals displayed a particular phenotype with an unusual allocation of reddish stained cells on the epidermal layer. Flowers of these transgenic lines were dotted with pink

and red spots surrounded by anthocyanin less cells resulting in a spotty aspect (Figure 4D,E). This aspect of petals was very improved when one compared them to the regular distribution in the epidermal cells from control petals (Figure 4F). However, a second phenotype was also observed in 35 % of transgenic lines with an alteration in color of petal limbs resulting in a partial loss of pigmentation as described in Figure 4C. This apparent loss in pigmentation was still substituted by a strong red staining within the connective tissue as described by Aharoni et al., 2000 (Figure 4D).

But, the main change was observed in the staining of the stamen tissues, with anthers and filaments deeply red colored in transformed plants (Figure 4G). This result was consistent with the accumulation of a pink reddish pigment in the epidermal cells, which lacked any staining in the control plants (Figure 4H). The red pigmentation was also observed on sepals and carpel but color intensity was lower than that observed in petals and stamens (data not shown).

Another chemical appeared to accumulate in transgenic flower. Indeed, histochemical analyses revealing the accumulation of condensed tannins by incubation of transgenic flowers in DMACA solution showed the occurrence of proanthocyanidin derived compounds in the extremities of petal limbs (Figure 4I,J) and in some parts of stamens, especially on the tips of anthers (Figure 4K,L). Finally, another phenotype was observed and appeared to affect around 20 % of *VvMybCs2* sense lines, resulting in a dramatic modification of the identity of male floral organs. Indeed, these transgenic lines displayed a partial conversion of stamens into petals. In some cases, the extent of this phenotype varied considerably from a partial conversion in which the third-whorl organs consisted of a nearly wild-type stamen with petaloid tissue within the anthers (Figure 4M,P) to a nearly complete conversion of stamens into petals, leading to complete male sterility (Figure 4N).

Conversion into petaloid structures did not occur very early in floral development; analyses of inflorescence at stage -1 according to Koltunow et al., 1990, indicated that the conversion process of stamens into petaloid structures had not begun (Figure 4O).

**VvMybCs2 over-expression triggered the accumulation of flavonoid compounds.**

HPLC-MS analyses confirmed by RMN experiments from transgenic flowers (Figure 5A) and stamens (Figure 5B) extracts revealed an accumulation of the pigment mainly represented in tobacco petals (Figure 5A) and stamens (Figure 5B), the cyanidin 3 rhamnoglucoside (Compound C) called keracyanin. These results might be related to previously a recently study in laboratory, which showed the accumulation of this same compound in transgenic tobacco plants that over-expressed another MYB transcription factor, VvMybCs1 (Deluc et al., in submission). Quantification by using keracyanin as standard revealed a strong accumulation in stamens with an average of 1,5 mg/g of DW (dry weight) in transgenic lines whereas no keracyanin compound was detected in control line (Figure 5C). In petal limbs, accumulation was less clear with a relative increase compared to the control line (Figure 5C). As mentioned in this same study, a weak increase of the compound arbitrary named E was also observed predominantly in petals. In fact, this peak co-eluted with quercetin-3-glucoside). In addition to the anthocyanin derived compounds, accumulation of condensed tannins previously detected with DMACA staining were confirmed by HPLC analyses that allowed detecting monomer units of condensed tannins. Surprisingly, only epicatechin derived compounds were accumulated (Figure 6A) with appreciatively 10 mg/g of fresh weight compared to the control line that only contained 1 mg/g of FW.

### **RT-PCR analyses in transgenic flowers**

After having checked the transgene expression in tobacco (Figure 7A), RT-PCR analyses performed in transgenic flowers (petals and stamens) indicated that it mediated the expression of some flavonoid genes. However, up-regulation seen in analyses appeared to be more or less different according to the tissue. Indeed, although, in stamens, all studied genes displayed a strong activation in their expression, transcript levels of these same genes, in petals, were differently affected by the over-expression. Thus, if one found again the same profile for the expression of CHI, F3H and ANS gene (Figure 7B,C), in some cases, the level of transcripts was unaffected (CHS) or was even lower compared to the control plant (DFR).

### **Alterations in lignin deposition on the endothecium layer**

Anther development, followed in transgenic plants overexpressing *VvMybCs2* as well as in control plants displayed a similar pattern with regards to the size and shape of anthers and stamen filaments. However, while pollen grains were freely released at stage 12, anthers in transgenic lines remained indehiscent, resulting in a dramatic difficulty to autopollinate (Figure 8A). Germination experiments by controlled pollination performed with success would thus indicate that apparent male sterility observed in transformed plants found its origin in a mechanical delay in the release of pollen grains. In fact, cross sections in transgenic and control tobacco anthers before dehiscence showed that their development appeared to be not affected during the early stages of development described by Koltunow *et al.*, 1990. However, close inspection of the anther endothecium (Figure 8B) suggested dramatic changes occurring during lignification of endothelial cell walls (Figure 8C). During maturation of endothelial cells before dehiscence, secondary lignified thickenings were growing along the radial walls of the endothecium, but not on tangential ones (Figure 8C). This rigid frame later allowed the breaking of endothelial walls, stomium formation and pollen release. In transformed plants, fewer endothelial cells developed lignified fibers, and

these fibers were often incomplete, covering only part of the radial walls. In these conditions, the rigidity of the wall frame was lower and at the later stages, the subsequent shrinkage of the anther walls resulting in the release of pollen grains in wild plants did not take place in the transgenic plants explaining the sterility of some transgenic lines.

### **Organogenesis of flower organs**

To determine the origin of abnormal development in internal whorls, early floral meristems were examined. The nomenclature for *Nicotiana Tabacum* flower development, as described by Koltunow et al., (1990), was used to describe the developmental stages investigated during flower organogenesis. At stage -2, SEM analyses revealed the presence of laterally formed structures on stamens (Figure 9B,D,F). These structures appeared to be of a petaloid identity revealed by the shape of their epidermal cells (Figure 9D,F), which displayed trichomes and mucus cells commonly occurring in petal limbs. In addition, other outgrowths were detected on this same organ, which seemed to indicate the neo-formation of stigmatoid structures on the tip of anthers (Figure 9G,H).

### **VvMybCs2 did not affect the mRNA accumulation of *NAG1* and *Nt-Glo* in transgenic flowers**

The pattern described above may be approached to some tobacco lines displaying a male sterility when the expression of an homeotic gene *NAG1* was down regulated by antisens constructs as described by Kempin et al., (1993). In addition, modification in the second whorl also prompted us to study the expression of *Nt-Glo*, which takes part, in tobacco, in the formation of petals and stamens. The expression patterns were determined on sections of buds at different stages of bud development, using Dig-labelled antisens probes. In all bud transverse sections, *NAG1* and *Nt-Glo* mRNA accumulations were detected respectively at stages -6,-5 and at stages -8, -7 (bud length < to 0,2 mm).

For *NAG1*, mRNA accumulation was detected in the center of the incipient flowers of control and mutant lines which would later develop into stamens and carpels for *NAG1* (Figure 10A to D). *Nt-Glo* transcripts (Figure 10E to H) were also detected at the same level between the mutant line (Figure 10E,F) and the control line (Figure 10G,H). These preliminary results were confirmed by semi-quantitative RT-PCR for *NAG1* and *Nt-GLO* that showed no variation in expression of these two genes between stages -6, -4, -2, according to Koltunow et al., 1990 (Figure 11) where the same levels of retrotranscripts were detected during the floral bud development. Taken together, the spatial and temporal expressions of *NAG1* and *Nt-Glo* in the mutant lines were comparable to the control line.

## DISCUSSION

### **VvMybCs2, functionally redundant from VvMybCs1 and coordinated the regulation of flavonoid pathway in grape berry.**

Some lines of evidences in results indicate strongly that function of VvMybCs2 is very close to those of VvMybCs1 previously described in literature as a strong regulator of flavonoid pathway. All the results of sequences alignment support the idea of the emergence of a new class of MYB factor involved in the regulation of phenylpropanoid genes and that both these MYB regulators. The origin of this new cluster appeared to be closely related to the presence, in protein sequence, of a new conserved motif located at the extremity of carboxy region and arbitrary named C3 (SFLNSLINE). This motif was found in both MYB protein sequences (VvMybCs1 and VvMybCs2) but in others MYB proteins such as AtMYB5 (Yie et al., 1995) or OsMYB4 (Suzuki et al., 1997), whose functions in plants have not been well investigated. In addition to these structural datas, the similarity in phenotype between transgenic over-expressing VvMybCs1 and VvMybCs2 Over-expression of *VvMybCs2* in tobacco let to same phenotype than that observed in VvMybCs1 sense lines. By another way, when we look at the sequence of VvMybCs2 protein and, as previously described, with VvMybCs1, we could suppose that VvMybCs2 also played a key role in the regulation of phenylpropanoid pathway, especially in the flavonoid pathway. This assumption is strongly confirmed by results of transgenic tobaccos, which showed a real accumulation of two classes of flavonoid derived compounds (anthocyanins and proanthocyanidins) in flowers.

As previously described for VvMybCs1 lines (Deluc et al., In submission) VvMybCs2 sense lines displayed a very similar phenotype concerning accumulation of flavonoid compounds and delay of dehiscence of transgenic anther leading to suggest a similar function of these two regulatory proteins. In addition, a MYC interaction domain

(Grotewold et al., 2000) (LxxRxxRL) in the same position as in VvMybCs1 protein within the R2R3 repeats region confirmed the likely redundancy of these two regulatory genes.

However, even though they seemed to be more related, three lines of evidence characterize the VvMybCs2 lines in tobacco. Firstly, the expression of VvMybCs2 throughout berry ripening is mainly detected from véraison stage until harvest stages, while VvMybCs1 was predominantly expressed during the early stages of berry development, suggesting a common regulatory role but a distinct role throughout grape berry development. Secondly, the male sterility phenotype observed in 30% of transgenic *VvMybCs2* sense lines was not described in *VvMybCs1* sense lines.

Therefore, we could suppose that VvMybCs2 transcription factor had a wider spectrum of target genes including a likely regulation of these genes involved in the cellular morphogenesis, partially explaining transformation of stamens into petaloid structures. Trying to explain the role of VvMybCs2 in grape berry required remembering the regulatory role of VvMybCs1. As previously described by Deluc (in submission), VvMybCs1 was shown to regulate the expression of structural genes in the early stages of flavonoid pathway. In this article, we showed that firstly, VvMybCs2 transcription factor did up-regulate most genes involved in the synthesis of the three major classes of flavonoid pathway (anthocyanins, condensed tannins and flavonols). Secondly, the expression in seed and in berry of VvMybCs2 seemed to indicate that it could play a distinct regulatory role in these two organs.

In berry, the reverse expression of VvMybCs2 compared to that observed with VvMybCs1 suggests that it might be more involved in the regulation of anthocyanins and flavonols, which accumulate during this period in grape berry, suggesting a complementary role leading to the accumulation of flavonoid compounds from véraison in berry. In seed, the pattern expression of these two genes, which expressed at the early steps of grape seed indicate that they might be involved in the same regulatory mechanism in tissue with a control

of the proanthocyanidin pathway and especially, the regulation of the ratio between the epicatechin and catechin compounds. HPLC analyses suggest that VvMybCs2 like VvMybCs1 factor (not shown) are involved only in the regulation of the epicatechin pathway. However, it will be necessary to confirm this result in homologous plants. So, we cannot exclude that regulatory mechanism of VvMybCs2 could play a distinct role in grapevine compared to that observed in tobacco results. Transformation in grapevine is in progress and the first analyses will be to identify new flavonoid compounds to confirm results in homologous plants.

Taken together, *VvMybCs1* and *VvMybCs2* expression genes, during grape berry ripening, are highly likely to be related to the strongly coordinated expression of most structural genes in berry skin, which show high levels of expression during the early stages of berry development, followed by a decrease at véraison stage and subsequently a new increase until harvest stage (Boss et al., 1996a). Therefore, the overlapping expression of *VvMybCs1* and *VvMybCs2* genes throughout berry development matched very well with the coordinated expression of the structural genes in these same tissues suggesting a complementary regulatory role of these two regulatory genes in berry for the regulation of flavonoid pathway.

The redundancy in protein sequences between VvMybCs1 and VvMybCs2, a relative similarity in target genes, in EMSA assays and HPLC analyses suggest that VvMybCs2 could play the same function than VvMybCs1 with some differences after Véraison stage in berry development to achieve the control of structural genes and to allow the production of flavonoid derived compounds.

### **VvMybCs2 generated co-pigmentation events by repressing DFR gene expression**

Among transgenic lines generated, we observed a likely loss of pigmentation in 30% of transgenic lines, which is not related to the level of transgene expression. However, in this cluster of transgenic lines, keracyanin contents in petals show similar contents as control

plants. Consequently, the loss of pigmentation is not related to a decrease of the main anthocyanin pigment occurring in tobacco petal limbs. To try to explain this, we must remember the apparent ability of VvMybCs2 protein to interact with MYC proteins. The occurrence in protein sequence of an interaction domain with MYC protein and the loss of pigmentation detected in our transgenic lines as previously shown by Chen et al. (2004) in *Myb sense* tobacco lines may be due to a titration of a copartner, which alters the regulation of anthocyanin pathways. This titration, which was tissue and gene specific, seems to affect only petal limbs by modification of coloration, while no alteration in red staining is observed in stamens.

At the transcriptional level, just one gene expression is totally different between stamens and petals. It concerns the DFR gene. Several lines of evidences show that DFR expression is critical to the accumulation of proanthocyanidin compounds (Bavage et al., 1997) and take part in co-pigmentation events in flowers. Some modification in expression of this structural gene could thus explain changes in transgenic flower petals corresponding to a modification of co-pigmentation (Aida et al., 2000). This result thus gave new insights into the probable interaction of VvMybCs2 with other partners and showed that DFR gene expression in grape berry required the implication of more than one regulatory MYB gene, while ANS, CHS, CHI and F3H expression appear to be less dependent on the expression of a co-partner.

### **VvMybCs2 could regulate proanthocyanidin pathway via regulation of ANS and accumulate epicatechin derived compounds**

Two distinct pathways provide condensed tannins in plants. The starting point of the first pathway, recently identified in *Arabidopsis thaliana* (Abrahams et al., 2003), is the Anthocyanidin Synthase gene that allows the production of Leucanthocyanidin-derived

compounds that subsequently serve as precursors for the Anthocyanidin Reductase to accumulate epicatechin-derived compounds.

The second pathway, which is dependent on the action of LAR, allows the accumulation of flavan-3-ol derived compounds, precursor of catechins from Leucanthocyanidins . Several lines of evidence in our experiments show that VvMybCs2 is very close to the regulation of proanthocyanidin pathway and in particular to the epicatechin pathway. Indeed, as previously shown, VvMybCs2 over-expression up-regulates the ANS gene in transgenic stamens whereas VvMybCs1 did not (Deluc et al., 2004). DMACA staining reveals a blue coloration of epidermal cells in VvMybCs2 stamens while VvMybCs1 did not.

Secondly, the accumulation of condensed tannins revealed by DMACA reagent in both organs (petals and stamens) from *VvMybCS2 sense* lines corroborated strongly with up-regulation of *anthocyanidin synthase* gene expression. Recently, it has been shown in *Arabidopsis* that the ANS gene is the first enzyme that takes part in the biosynthesis of epicatechin-derived compounds before being reduced by ANR and in giving epicatechins precursors (Abrahams et al., 2003). HPLC analyses, concerning monomer units of proanthocyanidin contents performed from transgenic petal limbs extracts, reveal the presence exclusively in samples of epicatechin compounds.

The implication of VvMybCs2 in the biosynthesis of epicatechin via ANS regulation is strongly probable. However, we cannot exclude a likely regulation of anthocyanidin reductase that acts downstream to the anthocyanidin synthase. Taken together, these preliminary results seem to corroborate what may have occurred throughout berry ripening. In grape seeds, the main period of proanthocyanidin accumulation occurred immediately after fruit-set with maximum levels observed around véraison (Downey et al., 2003), which strongly corresponded with mRNA accumulation of *VvMybCs2*. In skin,

proanthocyanidin accumulation occurred from fruit set until 1- 2 weeks after véraison stage corresponding to B10 stage in our article. Even though *VvMybCs2* pattern expression remains constant after 2 weeks after véraison while proanthocyanidin contents appear to decrease, its likely implication in this pathway in berry skin could be questioned.

### ***VvMybCs2* overexpression in tobacco alters a regulatory mechanism involved in floral development**

Some results reported in this work indicate that over-expression of our candidate gene directly affects metabolism, allowing the edification of male structures. The first changes detected are the delay of dehiscence as previously described by Deluc *et al.*, 2004, which also occurred in *VvMybCs2* *sense* plants, suggesting that both genes function redundantly.

However, the endothecium layers of transgenic plants appeared to be less strikingly affected. Indeed, the steady state in lignin deposition of endothecium cells appeared to be average with a partial lignin network but closer to the intact fiberwood network detected in control lines. Therefore, this result suggested that even though *VvMybCs2* appeared to be redundant to *VvMybCs1* for several gene regulations, it displayed some differences in target genes concerning the lignin deposition, explaining definitely the distinct phenotype observed in transgenic anthers.

As we saw for *VvMybCs1* and the possibility that it could interact with homeotic genes such as SHP1 and 2, which are known to play a key role in the dehiscence of anthers (Liljegreen *et al.*, 2000), we can suppose that *VvMybCs2* acts redundantly for these kinds of gene because of the extreme similarity between these two regulatory proteins. The second, more dramatic changes concern the conversion of stamens into petaloid and stigmatoid structures as previously described. In 20% of transgenic lines, we showed that *VvMybCs2*

significantly disrupt floral development of the male organ, which resulted in partial sterility that extended to a complete male sterility in some cases.

The similarity to the phenotype described by Kempin *et al.*, 1993 leads us to wonder whether NAG1 and Nt-GLO expression could be altered in *VvMybCs2* sense lines harboring mutant phenotype. Unfortunately, in-situ hybridization during floral development revealed NAG1 and Nt-GLO mRNA transcript levels did not appear affected in transgenic lines when compared to the control line.

However, when we looked at the initiation of flower primordium in mutant lines, we saw that the overall organization within the inflorescence meristem was respected during the early steps flower organs formation. As shown in Figure 9, initial changes occurred when the four productive organs were very well developed, eg. around stage - 6, -7 , which corresponds for anther development to the period when tissue differentiation begins in the anther primordium (Koltunow *et al.*, 1990). Therefore, organ identity and the establishment of flower organ type were not affected in these mutant lines. While several studies observed their involvement in other metabolism regulations than the regulation of phenylpropanoid pathway, no MYB were identified to act directly in the identity of floral organ. In flower development, except for the regulatory role of the two single repeat MYB proteins named CCA1 (Wang *et al.*, 1998) and LHY (Shaffer *et al.*, 1998) in the control of circadian clock leading to the flowering time, no MYB transcription factor was found to be involved directly in the control flower organs. Therefore, as we have seen in transgenic petal limbs with a likely titration of copartner, we can suppose that over-expression of *VvMybCs2* may disrupt the regulatory mechanism of a transcription factor that is involved in the regulation of differentiation cells. The number of putative copartners that could eventually interact with *VvMybCs2* is very weak. To date, only MYB-MYC interaction has been observed (Grotewold *et al.*, 2000). Nevertheless, in *Arabidopsis thaliana*, one transcriptional regulatory gene of the MYC family

is known to play a critical role in the gynoecium development. Moreover, this bHLH regulator, named SPATULA, is also expressed in later steps of stamen development (Heisler et al., 2001; Bowman et al., 1999). Consequently, neutralization generated by over-induced *VvMybCs2*, of SPATULA protein in stamens might be the cause of our phenotype male sterility. However, if SPATULA function is altered, modifications in carpel development must occur in mutant lines. Thus, further investigations in carpel and in stamens tissues need to be carried out to validate or invalidate our proposition and to precisely estimate the regulatory mechanism altered by ectopic expression of *VvMybCs2*.

#### **ACKNOLEWDGMENTS:**

We thank and Pr. Mérillon for comments and advice on the manuscript. We are grateful to Dr. Cathie Martin and Dr. Asaph Aharoni for providing some cDNA probes used in this work. This work was supported by grant from the “Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux.”.

## REFERENCES :

**Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K.** (1997). Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9**, 1859-1868.

**Abrahams, S., Lee, E., Walker, A.R., Tanner, G.J., Larkin, P.J., and Ashton, A.R.** (2003). The *Arabidopsis TDS4* gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *Plant J* **35**, 624-636.

**Aharoni, A., De Vos, C.H., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J.N., and O'Connell, A.P.** (2001). The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J* **28**, 319-332.

**Aida, R., Yoshida, K., Kondo, T., Kishimoto, S., and Shibata, M.** (2000). Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. *Plant Sci* **160**, 49-56.

**Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.

**Bavage, A.D., Davies, I.G., Robbins, M.P., and Morris, P.** (1997). Expression of an *Antirrhinum* dihydroflavonol reductase gene results in changes in condensed tannin structure and accumulation in root cultures of *Lotus corniculatus* (bird's foot trefoil). *Plant Mol Biol* **35**, 443-458.

- Bereterbide, A., Hernould, M., Farbos, I., Glimelius, K., and Mouras, A.** (2002). Restoration of stamen development and production of functional pollen in an alloplasmic CMS tobacco line by ectopic expression of the *Arabidopsis thaliana* *SUPERMAN* gene. *Plant Journal* **29**, 607-615.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383-2394.
- Boss, P.K., Davies, C., and Robinson, S.P.** (1996a). Analysis of the Expression of Anthocyanin Pathway Genes in Developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz Grape Berries and the Implications for Pathway Regulation. *Plant Physiol* **111**, 1059-1066.
- Boss, P.K., Davies, C., and Robinson, S.P.** (1996b). Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol Biol* **32**, 565-569.
- Bovy, A., de Vos, R., Kemper, M., Schijlen, E., Almenar Pertejo, M., Muir, S., Collins, G., Robinson, S., Verhoeyen, M., Hughes, S., Santos-Buelga, C., and van Tunen, A.** (2002). High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes LC and C1. *Plant Cell* **14**, 2509-2526.
- Bowman, J.L., and Smyth, D.R.** (1999). CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* **126**, 2387-2396.

**Chen, B., Wang, X., Hu, Y., Wang, Y., and Lin, Z.** (2004). Ectopic expression of a c1-I allele from maize inhibits pigment formation in the flower of transgenic tobacco. *Mol Biotechnol* **26**, 187-192.

**Cone, K.C., Burr, F.A., and Burr, B.** (1986). Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 9631-9635.

**Downey, M.O., Harvey, J.S., and Robinson, S.P.** (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine research* **9**, 15-27.

**Glories, Y.** (1988). *Anthocyanins and tannins from wine: organoleptic properties.* (New-York: Liss Inc.).

**Grotewold, E., Sainz, M.B., Tagliani, L., Hernandez, J.M., Bowen, B., and Chandler, V.L.** (2000). Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13579-13584.

**Hahlbrock, K., and Shcheel, D.** (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 347-369.

**Heisler, M.G.B., Atkinson, A., Bylstra, Y.H., Walsh, R., and Smyth, D.R.** (2001). *SPATULA*, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Development* **128**, 1089-1098.

**Holton, T.A., and Cornish, E.C.** (1995). Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1071-1083.

**Horsch, R.B., Klee, H.J., Stachel, S., Winans, S.C., Nester, E.W., Rogers, S.G., and Frakey, R.T.** (1986). Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutants in leaf discs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2571-2575.

**Jin, H., and Martin, C.** (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* **41**, 577-585.

**Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrrens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., and Martin, C.** (2000). Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis. *Embo J* **19**, 6150-6161.

**Kempin, S.A., Mandel, A., and Yanofsky, M.F.** (1993). Conversion of perianth into reproductive organs by ectopic expression of the tobacco floral homeotic gene *NAG1*. *Plant Physiol* **103**, 1041-1046.

**Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K., and Honda, C.** (2002). Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* **215**, 924-933.

**Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M., and Golberg, R.B.** (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* **2**, 1201-1224.

**Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J., and Weisshaar, B.** (1998). Towards functional characterization of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 263-276.

**Lee, M.M., and Schiefelbein, J.** (1999). WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* **99**, 473-483.

**Li, S.F., Santini, J.M., Nicolaou, O., and Parish, R.W.** (1996). A novel myb-related gene from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **379**, 117-121.

**Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L., and Yanofsky, M.F.** (2000). *SHATTERPROOF MADS*-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 766-770.

**Martin, C., Prescott, A., Mackay, S., Bartlett, J., and Vrijlandt, E.** (1991). Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J* **1**, 37-49.

**Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., Liu, X.L., Connors, K., Matheis, N., Schuster, D.K., Menasco, D.J., Wagoner, W., Lightner, J., and Wagner, D.R.** (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* **15**, 1689-1703.

**Mol, J., Grotewold, E., and Koes, R.** (1998). How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Sciences* **3**, 212-217.

**Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**, 473-477.

**Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M., and Lepiniec, L.** (2001). The *Arabidopsis* *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* **13**, 2099-2114.

**Noda, K., Glover, B.J., Linstead, P., and Martin, C.** (1994). Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a MYB-related transcription factor. *Nature* **369**, 661-664.

**Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S., and Nishimura, Y.** (1994). Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell* **79**, 639-648.

**Patzlaff, A., McInnis, S., Courtenay, A., Surman, C., Newman, L.J., Smith, C., Bevan, M.W., Mansfield, S., Whetten, R.W., Sederoff, R.R., and Campbell, M.M.** (2003). Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *Plant J* **36**, 743-754.

**Quattrocchio, F., Wing, J., van der Woude, K., Souer, E., de Vetten, N., Mol, J., and Koes, R.** (1999). Molecular analysis of the *Anthocyanin2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell* **11**, 1433-1444.

**Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I.A., and Coupland, G.** (1998). The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts

circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**, 1219-1229.

**Solano, R., Fuertes, A., Sanchez-Pulido, L., Valencia, A., and Paz-Ares, J.** (1997). A single residue substitution causes a switch from the dual DNA binding specificity of plant transcription factor MYB.Ph3 to the animal c-MYB specificity. *J Biol Chem* **272**, 2889-2895.

**Suzuki, A., Suzuki, T., Tanabe, F., Toki, S., Washida, H., Wu, C.Y., and Takaiwa, F.** (1997). Cloning and expression of five myb-related genes from rice seed. *Gene* **198**, 393-398.

**Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F.A., 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.

**Thompson, J.D., Gibson, T.T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and FHiggins, D.G.** (1997). The clustal X windows interface; flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**, 4876-4882.

**Wang, Z.Y., and Tobin, E.M.** (1998). Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* **93**, 1207-1217.

**Xhie, D.Y., Sharma, S.B., Paiva, N.L., Ferreira, D., and Dixon, R.A.** (2003). Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science* **299**, 396-399.

Conclusion des deux articles :

À travers l'étude de ces deux gènes régulateurs de type Myb, nous avons réussi à confirmer le rôle critique de cette famille de facteur de transcriptions dans la régulation de la voie des polyphénols chez la baie de raisin. En ce qui concerne *VvMybCs1*, bien que sa surexpression induit une accumulation d'anthocyanes dans les fleurs de tabac, il semble qu'un rôle de régulateur de la voie des proanthocyanidines serait plus envisageable dans la mesure où son expression dans la baie a essentiellement lieu dans les phases précoces du développement de la baie. À l'opposé, la sur-expression de *VvMybCs2* chez le tabac et son étude transcriptionnelle au cours du développement de la baie suggère qu'il soit plutôt impliqué dans la biosynthèse des composés phénoliques après la Véraison. Je pense notamment à la régulation de la voie des anthocyanes et des flavonols, bien qu'une accumulation de tanins ait été observée dans les pétales et les étamines.

Un autre élément important est mis en évidence à travers cette étude le rôle clé de l'intervention d'autres facteurs de la même famille ou pas dans la régulation des gènes structuraux de la voie des polyphénols. Certains résultats comme l'expression du gène codant la DFR ou encore le profil d'accumulation différent selon le tissu floral chez les tabacs transgéniques pour les deux constructions suggèrent que le rôle activateur de nos deux gènes est en étroite relation avec l'activité d'autres facteurs. Des hypothèses ont été avancées, concernant la nature du partenaire, il pourrait s'agir d'un ou plusieurs facteurs MYC. Toutefois, ces hypothèses restent à être confirmées.

L'impact de *VvMybCs1* et *VvMybCs2*, sur le métabolisme des lignines tant au niveau des organes végétatifs (tiges, pétioles) que des organes floraux (étamines) a mis en lumière le caractère pléiotropique de ce type de protéine. Cet effet pléiotropique s'est aussi manifesté avec l'émergence de lignées mutantes *VvMybCs2* qui présentaient des modifications très importantes au niveau de leurs organes floraux. Le fait que ces facteurs ont la capacité de moduler l'expression de plusieurs gènes dans des voies métaboliques totalement distinctes confirme la notion de gènes maitres qui ont la capacité de réguler plusieurs groupes de gènes. Cependant, des analyses supplémentaires seront nécessaires pour définir exactement le rôle clé de ces facteurs de transcription dans la régulation de ces divers métabolismes.

## **Partie 3 : Etude phénotypique de transformants d'*Arabidopsis thaliana*.**

### **1) Intérêt de la sur-expression chez *Arabidopsis thaliana*.**

Nous avons engagé un travail de sur-expression de VvMybCs1 et VvMybCS2 chez *Arabidopsis thaliana* (Col-0) afin d'une part de valider leur rôle régulateur chez un autre modèle végétal et d'autre part d'élargir nos analyses d'expression par RT-PCR semi quantitative sur de nouveaux gènes cibles non identifiés chez le Tabac.

En effet, nos études sur le Tabac ne nous ont pas permis d'étudier l'expression de l'UDP glucose-flavonoïde 3-O-glucosyltransferase (UFGT), gène essentiel de la voie de biosynthèse des anthocyanes (Kobayashi et al., 2002, Boss et al., 1996b), de la flavonol synthase (FLS) intervenant dans la production des précurseurs des flavonols (Pelletier et al., 1997) ou encore l'expression des deux gènes codant les deux enzymes clé de la voie des proanthocyanidines qui sont l'anthocyanidine réductase appelée ANR (Xie et al., 2003) et la leucoanthocyanidine réductase ou LAR (Tanner et Christiansen, 1993).

Bien que des essais de Northern-Blot avec des sondes hétérologues (ADNc de Vigne) aient été réalisés sur les Tabacs transgéniques, seul un signal propre a été obtenu pour l'analyse de l'expression de l'anthocyanidine synthase. On peut supposer que les gènes identifiés, chez la Vigne, ne sont pas suffisamment proches de ceux du Tabac. Toutefois des analyses complémentaires devront être réalisées avec d'autres types de sondes. Je pense notamment à des sondes issues du Pétunia ou encore de la Tomate qui, d'un point de vue phylogénétique, sont plus proches du Tabac que la Vigne.

Après transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, la disponibilité de l'ensemble du génome d'*Arabidopsis thaliana* peut nous permettre de réaliser des études d'expressions sur de nouveaux gènes cibles.

Une trentaine de transformants a été sélectionnée sur milieu sélectif pour chaque construction. La présence du transgène a été vérifiée ensuite par PCR avec l'ADN extrait à partir des cotylédons. Cependant, dès la mise germination et l'émergence des deux premiers cotylédons, on a pu constater un certain nombre de défauts de croissance et des modifications phénotypiques qui vont avoir pour conséquence d'altérer le développement de la majorité des transformants.

Un certain nombre de lignées avaient des difficultés de développement végétatif se traduisant par des modifications de la forme des feuilles (B) qui sont plus allongées que les feuilles d'une plante contrôle (A). Dans des cas extrêmes de certaines lignées, nous avons des phénotypes nains avec des phénomènes d'épinastie foliaire (C) qui aboutissaient au bout de quelques jours à la mort des lignées (**Figure 56**).

De plus, près de 80% des lignées transgéniques, présentaient une accumulation de composés supposés phénoliques à la base de la rosette (coloration rouge). Cette accumulation de composés s'est traduite au bout de quelques semaines par des nécroses léthales des lignées ne nous permettant pas de réaliser les analyses moléculaires escomptées. L'événement de transformation a été répété une deuxième fois et s'est vu confirmé par un phénotype similaire.

## **2 ) Interprétation et Conclusions.**

L'analyse moléculaire n'ayant pu être réalisée, il est difficile d'interpréter ces résultats. Cependant, la présence d'une accumulation de composés supposés phénoliques et l'apparition de phénotypes de modification cellulaires au niveau des cotylédons peuvent être rapprochés de ceux obtenus chez le Tabac. L'accumulation observée des polyphénols au niveau de la rosette n'était pas due à un événement de stress quelconque. La mise en germination en parallèle de cette étude semis de plants sauvages indiquait que cette accumulation de composés de type anthocyanique était bien dû à l'événement de transformation qui a permis d'insérer *VvMybCs1* et *VvMybCs2*.

L'emploi d'un promoteur constitutif de type CAMV 35S est peut être à l'origine de cette mort précoce des lignées transgéniques. Il serait donc envisageable de changer de vecteur et prendre un vecteur inductible. Ceci nous permettrait de décaler cette production de composés phénoliques dans les stades précoces du développement de la plante qui s'avère létale.

## **Partie 4 : Analyse d'une série de mutants de Tabac .**

### **1) Effet d'une mutation insertionnelle sur l'activité de *VvMybCs2*.**

#### **1.a) Obtention de la mutation.**

Lors du clonage par PCR de l'ADNc *VvMybCS2* dans le vecteur d'expression pBin19, le séquençage nucléique de plusieurs plasmides pBin19-*VvMybCs2* a révélé la présence d'un clone ADNc, que nous appellerons *VvMybCs2b*, à opposer à *VvMybCs2a*, présentant une substitution d'une base nucléotidique conduisant à la modification d'un résidu Arginine en position 69 par un résidu Leucine (**Figure 57**).

#### **1.b) Analyse de la mutation.**

La mutation de l'ADNc *VvMybCs2* se situe au niveau d'un résidu impliqué dans un pont salin. Les ponts salins correspondent à des interactions électrostatiques entre deux acides aminés qui vont se traduire par la formation d'une liaison hydrogène. Ce type d'interaction électronique a pour conséquence de baisser l'énergie libre de la protéine et de stabiliser sa conformation (Makhatdze et *al.*, 2003). Ainsi la mutation nucléotidique qui a conduit lors de la traduction de l'ARN messager à la substitution d'un résidu arginine polaire en position 69 par un résidu Leucine apolaire se traduit probablement par la perte du pont salin établi entre les résidus Arginine et Aspartate en position 35. L'absence supposée de ce pont salin pourrait conduire donc à une certaine instabilité conformationnelle de la protéine régulatrice. Cette prédiction est bien entendue à confirmer par l'analyse tridimensionnelle de la protéine mutée.

## 2) Comparaison analytique et moléculaire de plants de Tabacs transgéniques sur-exprimant *VvMybCs2a* et *VvMybC2b*.

Une vingtaine de lignées indépendantes a été obtenue après transformation de disques foliaires de Tabacs. L'ensemble des lignées présente une croissance similaire à celle qui est observée chez une plante témoin. Les différentes analyses ont été réalisées sur trois lignées indépendantes pour chaque construction qui présentaient des niveaux, faible, moyen et élevé d'expression du transgène.

### 2.a) Analyse phénotypique des fleurs de Tabacs.

Comme nous l'avons relaté dans l'article 2, les fleurs de Tabacs transgéniques sur-exprimant *VvMybCs2a* ont un phénotype fort ressemblant à celui obtenu sur les fleurs de type *VvMybCs1* avec une forte accumulation de pigments dans les étamines et une légère accumulation dans les pétales. À l'opposé, les fleurs des Tabacs sur-exprimant *VvMybCs2b* présentent un aspect tout à fait comparable à celui des fleurs d'une plante témoin avec une très faible pigmentation des étamines et une coloration des pétales similaire. Toutefois, certaines lignées présentent, comme les lignées M2BT6 et M2BT11, une pigmentation encore plus faible que ce que l'on observe sur une plante contrôle (**Figure 58**).

En ce qui concerne le phénotype du retard de déhiscence relaté dans les deux articles, nous ne l'avons observé dans aucune des lignées sur-exprimant *VvMybCs2b*. Ceci suggère le rétablissement du réseau ligneux initial au niveau des cellules de l'endothécium. Le retard de déhiscence ayant disparu dans la plupart des cas des lignées transgéniques, nous avons voulu vérifier au niveau cellulaire l'état de lignification de l'assise endothéciale. L'analyse de cette dernière révèle un réseau ligneux tout à fait comparable à celui qui existe chez les anthères de Tabacs dites témoin avec des fibres normalement structurées de façon radiale au niveau de l'assise endothéciale. Le phénotype de fibres tronquées, vu sur les anthères de Tabacs sur-exprimant *VvMybCs2a*, n'est pas répété cette fois-ci (**Figure 59**).

### 2.b) Analyse cytologique des tissus conducteurs des pétioles et des tiges transgéniques.

Comme le montre la **figure 60**, le niveau d'accumulation de lignine dans les tissus xylémiens des sections de tiges *VvMybCS2a* est largement inférieur par rapport à celui qui est observé dans les sections de tiges *VvMybCs2b* ou encore dans celles des tiges dit témoin.

Il est à noter que seul, les cellules xylémiennes primaires présentent une accumulation de lignine, l'accumulation de lignine au niveau des fibres phloémiennes a totalement disparu. Par contre, au niveau des pétioles, les coupes semblent indiquer qu'il n'y ait pas de différences entre les lignées transgéniques *VvMybCs2a* et *VvMybCs2b* par rapport à ce qui est observé chez une plante contrôle avec un dépôt de lignine, équivalent dans les cellules de xylèmes primaires ou secondaires (**Figure 60**).

Cependant, il nous a paru essentiel de réaliser une analyse qualitative d'une part sur les coupes des lignées *VvMybCs2b* et sur les coupes issues des pétioles de deux types de constructions afin d'estimer d'éventuelles variations qualitatives concernant le rapport entre les unités Guaiacyl et Syringyl constituant de la lignine.

## **2.c) Analyse par coloration chimique des tissus conducteurs des pétioles et des tiges.**

Le réactif de Maïle permet d'évaluer la proportion d'unités Guaiacyl et Syringyl constituantes du réseau lignifié chez les Plantes. La coloration du réactif (rouge orangée) sous lumière blanche observée chez les tissus conducteurs de sections de pétioles de plantes dites témoin nous servira d'indicateur comme niveau basal.

L'analyse par microscopie photonique des tissus conducteurs des tiges sur les Tabacs transgéniques sur-exprimant *VvMybCs2b* semble ne pas indiquer de différences entre les rapports S/G entre les sections transgéniques et témoins (**Figure 61**). Au niveau des pétioles, la coloration par le réactif de Maïle donne des résultats identiques pour l'ensemble des constructions. En effet, les mêmes profils d'accumulation de lignines sont retrouvés pour les lignées sur-exprimant *VvMybCs2a* et *VvMybCs2b*.

Dans les plantes sur-exprimant *VvMybCs1*, nous avons constaté que la modification du ratio S/G observé par coloration du réactif de Maïle pouvait être partiellement expliqué par l'augmentation de deux gènes structuraux, l'alcool cinnamylique déhydrogénase (CAD) de type 1 et de la coumaryl O méthyltransférase de type I (COMT I) connus pour être des éléments majeurs de la production d'unités S de la Lignine (Guo et al., 2001).

Afin de confirmer les résultats observés sur les sections des pétioles de Tabacs de type *VvMybCs1*, nous avons étudié le niveau d'expression par RT-PCR semi-quantitative de certains gènes de la voie des acides phénoliques et de la voie plus spécifique des monolignols.

Le retour à un phénotype normal pour les deux types de lignées transgéniques *VvMybCs2b* nous a incités à évaluer le niveau d'expression des gènes structuraux de la voie des acides phénoliques et des monolignols pour voir si nous pouvions corroborer l'expression d'un gène avec le retour à un phénotype normal sur les plantes sur-exprimant *VvMybCs2a* et *VvMybCs2b*. Par ailleurs, la même démarche a été réalisée en ce qui concerne l'expression des gènes structuraux de la voie des flavonoïdes.

## **3) Analyse transcriptionnelle des gènes structuraux de la voie des lignines et des flavonoïdes.**

### **3.a) Les gènes de la voie des lignines.**

L'analyse par RT-PCR des gènes codant la phenyl ammonia lyase (PAL), la 4 coumaroyl CoA ligase (4CL1), l'alcool cinnamylique déhydrogénase (CAD) de type 1, coumaroyl O méthyltransférase de type I (COMT I), la caffeyl CoA O méthyltransférase de classe II (CCoAOMT II) a été réalisée sur des extraits de pétioles transgéniques (**Figure 62**). Les résultats montrent que l'ensemble des gènes pré-cités présente une expression augmentée dans les lignées de Tabac transgénique *VvMybCs2a* sens. L'analyse de l'expression de ces mêmes gènes sur les Tabacs transgéniques exprimant l'ADNc muté a révélé des résultats surprenants qui peuvent nous donner des indications sur le mode de fonctionnement du facteur de transcription *VvMybCs2*.

En effet, trois cas de figures sont observés :

i) la mutation ne semble pas affecter l'activité régulatrice du facteur, ce qui est le cas pour les gènes de la CAD 1 et de la COMT I. Leur niveau d'expression est, en effet, identique aux lignées sur-exprimant le facteur VvMybCs2a.

ii) la mutation affecte de manière globale le rôle régulateur de la protéine. Le niveau d'expression du gène dit cible est équivalent à celui qui existe chez la plante témoin. De tels profils sont retrouvés pour l'expression des gènes codant la 4CL1, la C4H ou encore la CcoAOMT-II. Dans ce cas, la présence de la protéine mutée n'a aucun effet sur les niveaux d'expression de ces gènes.

iii) le niveau d'expression du gène dit cible est inférieur dans les plantes sur-exprimant le facteur de transcription muté par rapport à celui observé chez une plante témoin. Ce cas de figure s'est présenté pour l'expression du gène codant la PAL. La présence de VvMybCs2 muté a dans ce dernier cas un effet répresseur sur l'expression des gènes.

Une des hypothèses proposée est que le facteur de transcription a conservé sa faculté de se fixer sur la séquence en *cis* du promoteur du gène codant la PAL mais il ne permet pas l'activation de la transcription. Il bloque l'accès au site de fixation, pour un facteur MYB endogène, qui normalement va se fixer sur ces mêmes éléments *cis*-régulateurs au niveau du promoteur du gène cible. Ceci a pour conséquence de diminuer le niveau d'expression du gène cible.

### **3.b) Les gènes de la voie des flavonoïdes.**

Les analyses par RT-PCR sur les étamines et les pétales de Tabacs sur-exprimant VvMybCs2a comme pour VvMybCs1 ont montré une activation de la transcription de l'ensemble des gènes étudiés, c'est à dire : la chalcone synthase (CHS), la chalcone isomérase (CHI), la dihydroflanonol-4-reductase (DFR), l'anthocyanidine synthase (ANS) dans les étamines (**Figure 63**).

Comme pour les lignées sur-exprimant VvMybCs1, les résultats sont beaucoup plus nuancés dans les pétales avec un effet nul sur l'expression de la CHS, voire répresseur de VvMybCs2a sur la DFR et enfin un effet activateur sur l'expression la CHI, la F3H et l'ANS. A l'opposé, la mutation semble affecter les capacités régulatrices de cette protéine pour la régulation de l'expression de certains gènes.

i) la mutation ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de la chalcone synthase qui est toujours activée chez les fleurs de Tabacs transgéniques.

ii) la mutation au niveau du pont salin affecte l'expression de la flavanone 3 hydroxylase (F3H) et la chalcone isomérase (CHI) où l'on observe une expression moins forte chez les plantes transgéniques par rapport au contrôle. Par contre, au niveau de l'expression de la Dihydro Flavonol Reductase, le niveau basal de transcription dans les plantes transgéniques est équivalent à celui qui est observé dans les plantes contrôles.

## 4) Interprétation des résultats et conclusions.

### 4.a) Régulation des monolignols.

En ce qui concerne la régulation du métabolisme des monolignols, nous avons pu constater des différences de profils avec un rôle régulateur de *VvmybCs2* distinct selon le tissu. Ainsi, *VvMybCs2*, comme nous l'avons vu aussi pour *VvMybCs1*, semble jouer un rôle répresseur dans les tiges alors que son rôle dans les pétioles est, semble-t-il, neutre d'après les analyses cytologiques.

Toutefois, les analyses par RT-PCR semblent indiquer le contraire. En effet, son action ne se traduit pas dans les pétioles par un phénotype différentiel par rapport à un contrôle. Il est clair que *VvMybCs2* favorise l'expression de certains gènes structuraux de la biosynthèse des monolignols et notamment celui de la CAD, de la COMT I et de la CcoAOMT II. Cependant, les mêmes résultats, observés chez les pétioles sur-exprimant *VvMybCs1*, avaient révélé une modification du rapport des unités Syringyl/Guaiacyl.

Or, d'après Guo et *al.*, 2001 ( **Figure 64** ), il existe une voie préférentielle de la biosynthèse des différentes unités constituant la lignine. La production de l'unité Syringyl nécessite respectivement l'expression de la COMT (Zhong et *al.*, 1998) , la férulate 5 hydroxylase (F5H) (Meyer et *al.*, 1998 ; Franke et *al.*, 2000) et de la CAD (Ralph et *al.*, 1998) alors que l'unité Guaiacyl requiert l'expression de la CcoA-OMT (Guo et *al.*, 2001) et de la cinnamoyl coA réductase (CCR) (Ralph et *al.*, 1998) et enfin de la CAD (Ralph et *al.*, 1998).

Nous n'avons fait aucune analyse transcriptionnelle de ces deux gènes dans nos Tabacs transgéniques. Les différences observées entre le phénotype identifié dans les pétioles de *VvMybCs1* et *VvMybCs2* pourraient provenir d'une régulation différente de l'expression des gènes codant la F5H ou bien la CCR. En effet, la régulation de l'expression, en faveur ou en défaveur, de l'un ou l'autre de ces deux gènes pourrait affecter le rapport S/G. Donc, deux possibilités s'offrent à nous :

- VvMybCs2* ne régulerait que partiellement la voie de biosynthèse des unités Syringyl en n'activant que l'expression de deux gènes, codant la CAD et la COMT I,
- VvMybCs2* activerait la régulation de l'expression de la CCR en plus des trois gènes intervenant dans la biosynthèse des unités S équilibrant ainsi le rapport S/G, expliquant ainsi qu'aucune modification n'ait été détectée.

Cependant, il est nécessaire de rester très prudent quant à l'interprétation peut être un peu trop subjective de ces résultats. En effet, pour valider ces hypothèses, un certain nombre de travaux restent à faire.

Dans un premier temps, des analyses transcriptionnelles dans les pétioles et les tiges devront être réalisées pour évaluer le niveau d'expression manquant de ces deux gènes que sont la F5H et la CCR. Ceci sera possible, à court terme, au moins pour le gène codant la CCR dans la mesure où ce dernier a été identifié chez le Tabac. Quant à la F5H, il sera possible de tenter un Northern avec une sonde hétérologue de F5H provenant d'*Arabidopsis thaliana*.

Le phénotype obtenu dans les tiges VvMybCs2 sens semble indiquer une répression du métabolisme des lignines, déjà révélé chez les plantes sur-exprimant VvMybCs1. Il sera intéressant de cibler par des études de RT-PCR semi quantitatives le ou les gènes dont l'expression dans les tiges semble diminuer.

#### **4.b) Effet de la mutation sur la fonctionnalité de VvMybCs2.**

L'ensemble des données moléculaires et phénotypiques concernant la comparaison entre les lignées VvMybCs2a et VvMybCs2b indique que le comportement transcriptionnel de notre protéine régulatrice est à la fois différent selon le tissu et selon le gène.

L'effet de la mutation apparaît comme intéressant à étudier dans la mesure où cette dernière semble affecter la fonctionnalité de notre protéine régulatrice et peut ainsi nous aider à mettre en avant diverses hypothèses quant au mode d'action de VvMybCs2.

Ainsi, il semble très probable qu'il est besoin dans la régulation de certains gènes comme ceux de la PAL, PAL, CHI, F3H, de la présence d'un partenaire pour activer la transcription. Cependant, il apparaît aussi que la mutation de VvMYbCs2 ne semble pas affecter l'activation de certains gènes comme ceux codant la CHS, CAD, COMT I, ou encore l'ANS.

Bien que plusieurs hypothèses soient envisageables pour expliquer ce type de régulation, nous nous sommes concentrés sur l'idée de l'intervention d'un partenaire dont l'expression serait tissu spécifique et nous avons retenu deux hypothèses de travail qui impliquent que le pont salin intervient dans la stabilité de l'interaction protéine mais ne joue pas de rôle critique dans la stabilité du complexe ADN/ protéine:

- i) VvmybCs2 a besoin d'un partenaire pour être fonctionnel, c'est le cas pour l'expression du gène de la chalcone isomérase et de la flavanone 3 hydroxylase. La mutation affectant alors l'interaction protéine/ protéine.
- ii) VvMybCs2 agit en tant que co-activateur et augmente un niveau basal d'expression, ceci pourrait correspondre au niveau d'expression du gène codant la DFR (étamines).

Cependant ces hypothèses de travail sont à prendre avec beaucoup de précautions et nécessiteront des études beaucoup plus poussées que celles présentées ici.

Je pense notamment à des analyses de promoteur cibles de VvMybCs2 fusionné à un gène rapporteur. Ce type de méthode pourrait nous permettre d'évaluer de manière quantitative le rôle de la mutation sur l'activation de la transcription de gènes cibles comme ceux des flavonoïdes.

## **Partie 5 : Etude préliminaire d'une éventuelle redondance fonctionnelle entre VvMybCs1 et VvMybCs2.**

Au cours des travaux ayant conduit à la caractérisation fonctionnelle de VvMybCs1 et VvMybCs2, nous nous sommes rendu compte qu'un certain nombre de résultats suggérait que le mode de fonctionnement de nos deux protéines régulatrices était très proche voire similaire.

Par conséquent, nous avons trouvé intéressant d'évaluer l'effet combinatoire des deux protéines dans les mêmes lignées de Tabacs en croisant les deux types de constructions par fécondation contrôlée et de voir si des modifications phénotypiques pouvaient mettre en évidence soit une éventuelle redondance, soit une complémentarité fonctionnelle de nos deux facteurs de transcription.

### **1) Restauration partielle de la déhiscence dans les anthères.**

Bien que l'on observe un très faible décalage dans le temps de la déhiscence par rapport au sauvage sur la dizaine de plantes transgéniques double mutant observée, toutes les plantes présentent une libération de pollen suite à l'ouverture des anthères (**Figure 65a**).

### **2) Atténuation de l'accumulation d'anthocyanes dans étamines VvMybCs12.**

Un des résultats les plus intéressants que nous ayons pu observer concerne l'intensité de la coloration des étamines, au niveau des doubles mutants, qui est plus faible par rapport à ce qui était observé chez les simples mutants VvMybCs1 ou VvMybCs2 (**Figure 65b**). L'atténuation de la pigmentation sur cet organe est homogène au niveau du filet et de l'anthère où le nombre de cellules épidermiques pigmentées semble beaucoup plus faible par rapport à celui qui est observé chez les simples mutants (**Figure 65c**).

### **3) Accentuation de la pigmentation au niveau des pétales de VvMybCs12.**

À l'inverse, la pigmentation des pétales dans les lignées VvMybCs12 semble beaucoup plus homogène en termes de distribution de la pigmentation par rapport à ce que l'on avait observé chez les simples mutants. L'aspect des pétales est plus proche de celui qui est observé chez la plante contrôle. Cependant, l'intensité de la coloration nous laisse penser que l'accumulation des anthocyanes y est plus importante (**Figure 66**).

### **4) Interprétation et conclusions.**

Le croisement contrôlé chez le Tabac, des deux constructions VvmybCs1 et VvMybCs2 dans une même lignée avait pour objectif d'évaluer par une analyse phénotypique préliminaire les capacités de complémentarité de ces deux protéines.

De ces premiers résultats, même s'il convient de rester prudent quant à la pertinence de la méthodologie, quelques éléments de réponses montrent bien que l'effet combiné de ces deux gènes au sein d'une même plante se traduit par des modifications métaboliques associés aux flavonoïdes et probablement aussi aux voies métaboliques de la lignine (restauration du retard de la déhiscence).

Toutefois, ce dernier point reste à confirmer. Par ailleurs, il apparaît clairement que les conséquences de la présence des deux protéines régulatrices chez le Tabac semblent dépendre du tissu comme nous l'avons constaté dans les pétales et les étamines.

D'une part, dans les étamines, le phénotype dit témoin est retrouvé et se traduit par une atténuation de la pigmentation des cellules épidermiques de l'anthere et du filet ou encore par un retour partiel de la déhiscence des anthères.

D'autre part, dans les pétales, l'effet inverse est observé en faveur d'une augmentation de la coloration. Une des explications à de tels effets contradictoires serait une certaine redondance fonctionnelle de nos deux facteurs de transcription qui aurait pour conséquence, dans le cas où les deux protéines seraient exprimées en même temps et dans le même tissu voire la même assise cellulaire, de générer des phénomènes de compétitions entre les deux facteurs concernant la régulation de l'expression des certains gènes cibles.

Ceci se traduirait, selon les affinités de chacune des protéines régulatrices pour tel ou tel séquences promotrices de gène cibles, par des ajustements métaboliques en faveur d'une voie de biosynthèse ou d'une autre, celles des anthocyanes dans les pétales, ou bien dans un cas extrême, la neutralisation plus ou moins par les deux protéines de la régulation de la voie de biosynthèse des polyphénols, ce qui est observé dans les étamines.

Un cas de compétition a été décrit dans la littérature (Moyano et *al.*, 1996). Il s'agissait de deux facteurs de transcription de type MYB du Mufler AmMyb305 et AmMyb340 qui présentaient des affinités différentes pour la promotion de deux gènes structuraux des flavonoïdes codant la F3H et la CHI (**Figure 67**).

Ainsi, si AmMyb340 permettait d'activer plus fortement qu'AmMyb305 la transcription du gène codant la F3H par rapport à celui qui code la CHI, la présence simultanée des deux protéines régulatrices avait un effet négatif plus important sur l'expression du gène *F3H* que *CHI*.

Ceci semble bien montré que l'affinité de chacune de deux protéines régulatrices redondantes pour les séquences promotrices de gènes cibles a un rôle déterminant dans le phénomène de compétition généré par la présence simultanée des deux protéines. Selon cette affinité, les conséquences de la compétition seraient différentes.

## **Partie 6 : Etude de la régulation des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2*.**

### **1) Approche des mécanismes de régulation de *VvMybCs1* et *VvMybCs2*.**

Après avoir caractérisé fonctionnellement chacun des deux gènes régulateurs, il nous est apparu intéressant d'essayer d'identifier les voies de signalisation à l'origine de leur expression chez la baie de raisin. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les différents résultats scientifiques concernant la régulation des flavonoïdes ont porté sur l'étude de la régulation de la voie de biosynthèse des anthocyanes par différents composés comme le sucre ou encore certaines hormones (Cormier, 1996, Boss et *al.*, 1997, Larronde et *al.*, 1998). Nous avons donc essayé d'étudier l'effet du Saccharose et de l'ABA sur l'expression de nos gènes d'intérêt.

### **2) Les facteurs régulateurs de la biosynthèse des flavonoïdes.**

Des analyses par RT-PCR ont été réalisées sur des ARN totaux issus de cultures cellulaires de Vigne (souche CS6) ayant poussée en présence de sucre à 58mM et d'ABA à 10µM. Le modus operandi est le suivant.

Les cellules sont repiquées le jour J0 avec un milieu de culture B5 (Decendit et *al.*, 1996), dépourvu en saccharose pour les essais saccharose et sans ABA pour les essais correspondants. A J3, dès le retour en phase exponentielle de croissance, on administre de manière indépendante les deux composés suivi de prélèvements de 10 ml de suspension cellulaire par prélèvement pour chaque temps analysé. Une culture cellulaire ne contenant pas de sucre sert de témoin pour les essais saccharose et une culture cellulaire sans ABA sert de contrôle pour les essais ABA. Différents prélèvements sont effectués à des temps précis au bout d'une heure, 2, 4, 8, 24, 48 heures.

### **3) Effet du saccharose et de l'acide abscissique.**

D'après les premiers résultats, l'analyse des produits d'amplification sur gel d'agarose correspondant au transcrite des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* semble indiquer que l'ABA et le saccharose pourraient avoir un effet sur l'expression de ces deux gènes.

En effet, en présence de saccharose (58mM), l'expression de *VvMybCs1* semble être légèrement augmentée avec un nombre de transcrite quatre fois plus important au bout de deux heures par rapport au nombre de transcrite au temps  $t_0$ .

En revanche, l'abondance des transcrits en ce qui concerne le gène *VvMybCs2* ne semble pas être modifiée suite à l'addition du saccharose (**Figure 68**). En ce qui concerne l'effet de l'acide abscissique (10µM), son addition au milieu semble avoir un effet plus ou moins important sur l'abondance relative des transcrits de *VvMybCs1* et *VvMybCs2* avec une réponse plus précoce pour le gène *VvMybCs1* par rapport à *VvMybCs2*.

Pour *VvMybCs1*, l'évolution de l'abondance se divise en trois phases. Tout d'abord, on peut constater une augmentation des transcrits à partir de deux heures, suivie d'une légère diminution à quatre heures et enfin un nouveau pic d'abondance au bout de huit heures est détecté.

Pour ce qui est de l'évolution des transcrits correspondant au gène *VvMybCs2*, il semble que l'ABA induise une réponse au bout quatre heures avec un pic d'abondance relative au bout de huit heures (**Figure 68**).

Ces résultats, certes intéressants, sont à prendre avec une certaine précaution. L'analyse par RT-PCR sur gel d'agarose marquée au BET (Bromure d'éthydiu) peut nécessiter dans un certain nombre de cas, un grand nombre de cycles d'amplification qui va atténuer ou amplifier un résultat. Nous avons réalisé, du fait de la faible expression de *VvMybCs1* et *VvMybCs2* dans les cultures cellulaires, 27 cycles d'amplification par PCR, ce qui semble trop pour évaluer de manière quantitative, l'abondance des ARN messagers correspondant à ces deux gènes dans les cultures soumises aux expériences.

Il sera donc nécessaire d'affiner ces résultats soit par des études d'expression à partir des ARN totaux (Northern-Blot) ou bien par des analyses de RT-PCR semi quantitatives (Southern-Blot de produits PCR) voire des essais de PCR quantitatives.

#### **4) Identification de la région régulatrice de *VvMybCs1* par PCR inverse.**

Dans la mesure où, le saccharose et l'ABA pourraient éventuellement jouer un rôle prépondérant en ce qui concerne la régulation de *VvMybCs1* et de *VvMybCs2* nous avons tenté d'identifier toute ou partie de la séquence promotrice correspondant à ces deux gènes par la technique de PCR inverse.

L'objectif de cette démarche était de valider la présence de séquences régulatrices en *cis* connues pour être associées à la régulation par le saccharose et l'ABA. 3µg d'ADN génomique de Vigne ont été digérés par quatre enzymes (*BstU I*, *Eag I*, *BamH I*, *Xma I*) pour le gène *VvMybCs1* et par trois enzymes (*BssHIII*, *EcoRI* et *BsTYI*) pour le gène *VvMybCs2*.

Le choix des enzymes s'est porté sur des enzymes qui présentaient des sites de coupures susceptibles de générer de fragments ni trop longs, ni trop courts. La taille de ces derniers sont des éléments critiques en ce qui concerne la circularisation des fragments digérés mais en ce qui concerne la réaction de PCR. À ce titre, nous avons choisi des enzymes dont la probabilité de coupures de l'ADN permettait de générer des fragments compris entre 800 et 1500 paires de bases afin qu'il soit possible ensuite de les amplifier par une réaction de PCR.

Pour *VvMybCs1*, nous avons donc choisi d'utiliser des enzymes dont le site de coupures unique était localisé entre 200 et 300 bases après le codon « Start » (**Figure 69**). Trois enzymes (*Xma I*, *BamH I* et *Eag I*) sur quatre ont un site de restriction à 6 bases, la dernière *BstU I* présente un site de restriction à quatre bases. Après circularisation des fragments digérés, une réaction de PCR a permis d'obtenir un signal d'amplification correspondant à un fragment de 1300 bases pour seulement pour la réaction PCR avec *BamH I*.

Aucun signal d'amplification n'a été détecté pour les autres enzymes. Une fois purifié, le fragment est testé par Nested-PCR avec deux amorces respectivement externes avant circularisation, à MybCs1PROS et MybCS1PROAS (MybCs1PROS2 et MybCS1PROAS2). Puis, après clonage et séquençage, il s'est avéré que ce fragment était bien une partie du promoteur du gène de *VvMybCs1* (**Figure 70**).

En ce qui concerne le gène *VvMybCs2* nous n'avons pas, à l'heure de la rédaction du manuscrit, réussi à amplifier un quelconque signal.

## **5) Analyse préliminaire d'un fragment de 1,3kb correspondant à une séquence promotrice du gène *VvMybCs1*.**

La séquence identifiée a été soumise à une base de données japonaise nommée PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) recensant la plupart des motifs régulateurs présents sur les régions promotrices des gènes d'origine végétale.

L'analyse globale fait état de nombreuses boîtes régulatrices qui répondent à différents type de signaux (hormonal, lumière et autres) nécessaires à la régulation de l'expression du gène *VvMybCs1*. Par contre, elle ne rend compte de la présence d'aucune boîtes d'initiation de la transcription de type TATA box ou CAAT box. Nous allons nous attacher à faire une étude non exhaustive de quelques régions qui semblent déterminante pour la régulation de ce gène.

### **5. a) Analyses des séquences cis – régulatrices.**

#### **5.a.1) Les séquences ABRE Abscissic Responsive Elements.**

L'analyse globale des séquences cis-régulatrices montre une forte présence de boîtes régulatrices en relation avec la signalisation induite par l'acide abscissique (ABA).

Plusieurs types de boîtes associées à la régulation ABA ont été localisées sur trois régions (**Figure 71**) de cette séquence promotrice.

À titre d'exemple, on peut citer la présence de séquence ABRELATERD1 répétée à quatre reprises et soupçonnée chez *Arabidopsis thaliana* d'intervenir dans l'activation de gènes (ERD) pour Early Responsive Dehydration inductibles par l'ABA suite à un stress hydrique (Simpson et al., 2003).

D'autres sites de régulation par l'ABA ont été identifiés. Ainsi, nous avons identifié des séquences correspondant aux motifs ABREATCONSENSUS et EMBP1TAEM localisés de manière fréquente sur les promoteurs de gènes dont l'expression est sous le contrôle, via l'ABA, de facteurs de transcription de la famille des Leucines Zipper (Choi et al., 2000 ; Kang et al., 2002 ; Guiltinan et al., 1990).

Un autre motif répété au moins à dix reprises au sein des trois régions a été localisé. Il s'agit de la séquence nommée MYCONSENSUSAT qui correspond à un site de reconnaissance par une famille de facteurs de transcription, les MYC, induite lors d'un stress hydrique via l'ABA (Abe et al., 2003).

Il en est de même avec d'autres séquences comme MYB2CONSENSUSAT, MYB1AT ou MYB2AT qui présentent aussi des motifs répétés le long de ce promoteur et qui sont impliqués aussi dans la mise en place du complexe AtMYC/AtMYB2 nécessaire à l'induction du gène RD22 associé à la réponse de la plante suite à un stress hydrique (Abe et *al.*, 2003).

Si l'on résume, trois domaines de ce promoteur peuvent être considérés comme important en ce qui concerne la régulation possible de ce gène par la voie de l'ABA.

### **5.a.2) Les séquences LRE ou Light Responsive Elements.**

Bien que les séquences de réponses à l'ABA soient de loin les plus importantes, d'autres séquences régulatrices ont été identifiées, notamment, celle liées à la régulation par la lumière. Bien que plusieurs sites soient répertoriés sur l'ensemble de la séquence, plusieurs types de boîtes Ibox, Iboxcore ou BoxII CHS (Giuliano et *al.*, 1988 ; Rose et *al.*, 1999) semble regroupées sur trois régions de la séquence promotrice : en position -940-1020, -500, et -200 (**Figure 71**).

### **5.a.3) Les séquences associées à la régulation par les sucres .**

Parmi les 1300 bases présentes sur le promoteur, nous n'avons trouvé aucune séquence régulatrice de type SURE (AATAGAAAA) décrit comme essentiel dans le contrôle positif des gènes régulés par les sucres (Grierson et *al.*, 1994).

Par contre, des éléments régulateurs de type AMYBOX ont été identifiés. Une première séquence AMYBOX1 (TAACAAA) en position -1107 qui est un motif fortement conservé chez les promoteurs des  $\alpha$  amylases du riz, de l'orge et du blé est considéré comme un élément essentiel de la régulation négative par les sucres (Huang et *al.*, 1990) (**Figure 71C**).

Une deuxième séquence AMYBOX2 (TATCCAT) est identifiée. Présente en deux exemplaires en position -114 et -498, cette séquence est reconnue comme un élément activateur situé dans la région 5' non codante du gène codant l' $\alpha$ -amylase du riz (Huang et *al.*, 1990). Enfin, une séquence AMYBOX3, répétée en un seul exemplaire en position -105 sur le brin (-) est un élément nécessaire pour un haut niveau d'expression de l' $\alpha$  amylase 3D (Huang et *al.*, 1990).

De plus, deux séquences supplémentaires pourraient avoir un lien avec une régulation par le sucre. La première positionnée à -294 est une séquence riche en pyrimidine (CCTTTT) partiellement associée à la répression par les sucres de l' $\alpha$  amylase 1 du riz (Morita et *al.*, 1998).

La deuxième séquence correspond à une boîte de type W de type TGACT répétée à deux reprises sur le brin (-) en position -186 et sur le brin (+) en position 281 associée à la régulation de l'expression de l'isoamylase de l'orge (Sun et *al.*, 2003).

### **5.b) Interprétation et conclusions.**

Ces premiers résultats encourageants nous laisse espérer que l'ABA et le sucre pourraient être de bon candidats à la régulation de ces gènes. L'analyse globale de la séquence du promoteur nous a permis de mettre en évidence plusieurs régions régulatrices. Il sera donc

intéressant dans un avenir proche d'évaluer le rôle de chacune de ces zones régulatrices sur l'expression de *VvMybCs1*.

À ce titre, des études de promoteur délété de certaines régions régulatrices sont en cours de réalisation et devraient nous permettre d'identifier les régions susceptibles d'intervenir de manière prépondérante dans la régulation du gène *VvMybCs1*.

## **Partie 7 : La transgénèse Vigne.**

La transformation génétique de la Vigne est une technique récente qui a nécessité au cours de ces dix dernières années un grand nombre de mises au point afin d'optimiser les rendements de transformation. La régénération à partir d'embryons somatiques a été utilisée pour la transformation de la majorité des cultivars (Iocco et al., 2001). Les Vignes transgéniques peuvent être générées par transformation de cals embryogènes obtenus à partir de différents tissus incluant des embryons zygotiques (Scorza et al., 1995), de feuilles (Scorza et al., 1996), d'ovaires (Motoike et al., 2001). Cependant, les rendements sont sans commune mesure avec les transformations classiques à partir de modèle moins récalcitrant comme le Tabac, la Tomate ou *Arabidopsis*. De plus, comme nous l'avons déjà constaté avec les transformants d'*Arabidopsis thaliana*, la sur-expression de *VvMybCs1* et *VvMybCs2* semble affecter d'autres métabolismes que celui des polyphénols.

Dans la mesure où nous ne possédons pas les compétences et le matériel végétal nécessaire pour la transformation, nous avons réalisé les expériences de transformation génétique dans le Laboratoire « Transport des Assimilats » ESA-CNRS 6161 de l'Université de Poitiers dirigé par le Professeur Serge Delrot en collaboration avec le Professeur Pierre Coutos-Thévenot. Après plusieurs tentatives infructueuses de transformations, nous avons à notre disposition à l'heure actuelle une dizaine de clones transgéniques *VvMybCs1* isolés et les clones transgéniques *VvMybCs2* sont en cours de régénération.

Toutefois, les premières constatations, que l'on peut faire concernant les lignées sur-exprimant *VvMybCs1*, comme pour *Arabidopsis thaliana*, sont que nous sommes confrontés à des problèmes de régénération et de croissance des plantes transformées. L'effet pléiotropique de *VvMybCs1* et l'impact sur d'autres métabolismes pourraient être à l'origine de ces problèmes de développement.

Mais à l'heure actuelle, il nous est difficile d'identifier quel métabolisme pourrait être affecté par la sur-expression de notre gène d'intérêt. Une analyse par puces à ADN est en cours afin d'une part de confirmer dans un système homologue, les résultats obtenus chez le Tabac et d'autre part d'élargir éventuellement la gamme de gène cible de ces facteurs de transcription de type.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

<i>Partie 1 : Analyse fonctionnelle de VvMybCs1 et VvMybCs2 .....</i>	<i>134</i>
<i>A) Analyse de la séquence protéique de VvMybCs1 et VvMybCs2. ....</i>	<i>134</i>
<i>B) VvMybCs1 et VvMybCs2 coordonnent la régulation du métabolisme des flavonoïdes de la baie de raisin. ....</i>	<i>136</i>
<i>2.a) VvMybCs1.....</i>	<i>136</i>
<i>2.b) VvMybCs2.....</i>	<i>138</i>
<i>C) Interactions entre VvMybCs1 et VvMybCs2 avec des facteurs MYC ?.....</i>	<i>138</i>
<i>D) Redondance fonctionnelle de VvMybCs1 et VvMybCs2 .....</i>	<i>140</i>
<i>Partie 2 : Perspectives .....</i>	<i>142</i>
<i>A) Quels signaux régulent l'expression des gènes VvMybCs1 et VvMybCs2 ? .....</i>	<i>142</i>
<i>B) Validation des interactions VvMybCs1 - VvMybCs2 / MYC.....</i>	<i>143</i>
<i>C) VvMybCs1 et VvMybCs2 et le métabolisme des monolignols. ....</i>	<i>144</i>
<i>D) D'autres rôles régulateurs pour VvMybCs1 et VvMybCs2 ? .....</i>	<i>144</i>
<i>E) Validation fonctionnelle de VvMybCs1 et VvMybCs2 sur un système homologue ou sur plantes à fruits charnus. ....</i>	<i>144</i>
<i>MATERIEL ET METHODES. ....</i>	<i>127</i>
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i>	<i>154</i>

## Partie 1 : Analyse fonctionnelle de *VvMybCs1* et *VvMybCs2*

### A) Analyse protéique de *VvMybCs1* et *VvMybCs2*.

Les résultats de transformation génétique chez le Tabac et *Arabidopsis thaliana* ont clairement montré que les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* sont impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse des polyphénols *via* un contrôle transcriptionnel de la plupart des gènes structuraux de cette voie métabolique. Une analyse fine des séquences primaires des protéines codées par les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* semble indiquer que ces protéines forment un nouveau sous-groupe de facteurs de transcription de type MYB.

En effet, les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* présentent une très faible homologie de séquence avec celles de facteurs de transcription de type MYB caractérisés chez d'autres plantes comme le Maïs, le Pétunia ou *Arabidopsis* (*ZmMyb-C1*, *pHMybAN2* et *AtPAP1*, respectivement) et connus pour être des régulateurs forts de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Dans la grande majorité des cas, les degrés d'homologie observés entre les gènes codant des facteurs de transcription de type MYB apparaissent comme de bons indicateurs de leurs rôles physiologiques *in planta*. Dans notre cas, il s'avère que les deux gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* présentent les mêmes plus proches homologues et que les rôles physiologiques de ces derniers n'ont été que partiellement définis dans différentes espèces modèles.

Ainsi, le plus proche homologue de *VvMybCs1* et *VvMybCs2* chez *Arabidopsis thaliana* est le gène *AtMyb5* qui n'a fait l'objet que d'une seule étude approfondie et dont la fonction précise n'a pas été élucidée (Li et al., 1996). Il est d'ailleurs très intéressant de noter que, dans la classification des facteurs MYB identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Strake et al., 2001), *AtMyb5* appartient à un sous-groupe dont il est le seul membre. Les deux autres plus proches homologues de nos deux gènes d'intérêts sont respectivement un facteur MYB isolé chez le Riz, *OsMyb4* (Suzuki et al., 1997), et *BnGHLi233* isolé chez le Coton et dont la fonction n'a pas été précisément étudiée mais qui pourrait être associé aux mécanismes de différenciation des trichomes (résultats non publiés).

L'origine des similarités de séquence observées entre les protéines codées par les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* et celles codées par les trois gènes pré-cités tient à la présence en position carboxy terminale d'un motif protéique -SFLNSLINED- retrouvé uniquement au sein de ce petit groupe de protéines. Il faut savoir que, chez les facteurs MYB, l'extrémité carboxy terminale est extrêmement variable et l'identification de motifs conservés dans cette zone pourrait permettre, dans certains cas, d'associer une fonction putative à la protéine étudiée.

Cependant, si l'originalité des séquences des protéines codées par les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* semble apparente, il n'en demeure pas moins que d'autres observations indiquent que ces derniers peuvent avoir une réelle implication dans le contrôle de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse globale des phénylpropanoïdes. On notera notamment la présence au début de l'extrémité carboxy-terminale des deux séquences protéiques d'une signature peptidique (motif C1) commune aux gènes régulateurs identifiés de cette voie (Patzlaff et al., 2003 ; Jin et al., 2000 ; Tamagnone et al., 1998).

D'autres éléments plaident en faveur d'une intervention des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* plus ciblée sur la régulation de la voie de biosynthèse des polyphénols. Ainsi, une homologie significative avec un facteur MYB récemment identifié chez une variété d'*Epicea* et régulant la biosynthèse des flavonoïdes (Xue et al., 2003), et des similarités sur l'ensemble des séquences avec *AtMyb4* et *AmMyb330*, répresseurs du métabolisme des acides phénoliques et des lignines (Jin et al., 2000 ; Tamagnone et al., 1998), sont autant d'éléments confortant nos hypothèses.

Par ailleurs, au delà de leurs rôles régulateurs de la voie de biosynthèse des polyphénols, les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* pourraient être également associés au contrôle d'autres événements cellulaires comme le déterminisme cellulaire. Nous avons constaté la présence inédite chez des facteurs de transcription de la famille MYB d'un motif « Glutamine Rich Domain » complet (*VvMybCs1*) ou partiel (*VvMybCs2*) au niveau de l'extrémité COOH-terminale. Ce type de signature est très peu répandu chez les végétaux mais relativement bien connu chez les animaux.

Chez ces derniers, la fonction première de ce motif, présent notamment dans les séquences protéiques de facteurs de transcription appartenant à la famille des protéines de type GROUCHO/TLE, est de faciliter la tétramérisation de la protéine (Ren et al., 1999 ; Pinto et Lobe, 1996). Cette famille de protéines, requises dans de nombreux processus développementaux comme le déterminisme cellulaire chez la *Drosophile*, fait partie d'une grande famille de corépresseurs qui en fait ne se fixent pas sur l'ADN directement mais favorisent plutôt le recrutement d'autres protéines régulatrices dont la fonction est de réprimer l'expression de gènes homéotiques (Chen et Courey, 2000). A l'heure actuelle, le seul gène codant une protéine portant ce domaine identifié chez les végétaux est le gène *LEUNIG*, qui a la capacité de co-reprimer l'expression du gène homéotique *AGAMOUS* intervenant dans les processus d'identité florale (Conner et Liu, 2000).

Il est donc possible que les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* soient impliqués dans des mécanismes de régulation autre que ceux ayant trait au métabolisme des polyphénols. Certaines observations relevées au cours de la caractérisation phénotypique des Tabacs transgéniques sur-exprimant les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* semblent conforter cette hypothèse. En effet, la forme, à la fois des pétales (cf. Article 2) et des anthères, ainsi que la transformation d'étamines en structures pétaloïdes chez les mutants *VvMybCs2*, sont autant d'éléments en faveur d'une action directe ou indirecte de nos deux gènes dans des mécanismes de différenciation cellulaire.

La similitude du phénotype étamines-pétaloïdes avec celui d'autres mutants déjà décrits (Kempin et al., 1993 ) nous avait conduit à étudier l'action de *VvMybCs2* sur quelques gènes candidats potentiels. Toutefois, cette approche n'a pas donné de résultats pouvant expliquer l'origine de ce phénotype. Le rôle de *VvMybCs2*, et en filigrane celui de *VvMybCs1*, dans les mécanismes associés au développement floral est vraisemblablement très complexe et pourrait faire intervenir des mécanismes régulateurs associés à l'identité de certaines assises cellulaires au sein de certains organes et non une altération globale du programme d'identité florale. Une caractérisation phénotypique plus poussée associée à une analyse histologique de tissus ou d'organes proches des étamines comme l'ensemble du carpelle apporterait des renseignements supplémentaires relatifs au rôle des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* dans le développement floral.

## **B) *VvMybCs1* et *VvMybCs2* coordonnent la régulation du métabolisme des flavonoïdes de la baie de raisin.**

Bien qu'ils semblent avoir un effet pléiotropique évident à l'origine des phénotypes floraux décrits dans le cadre de ce travail, la fonction principale des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* apparaît comme étant la régulation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. La validation fonctionnelle de nos gènes d'intérêts par sur-expression chez le Tabac a permis de mettre en évidence leurs rôles respectifs dans la régulation de ce métabolisme. En effet, deux classes de flavonoïdes semble fortement affectées par la sur-expression de *VvMybCs1* et *VvMybCs2*, à savoir les anthocyanes et les tannins. Dans une moindre mesure, la biosynthèse des flavonols, avec une légère augmentation de la quantité de quercétine-3-glucoside dans les étamines des plantes transgéniques, pourrait aussi être sous le contrôle de ces deux protéines régulatrices.

Bien que la plupart des gènes que nous ayons étudiés soient communs aux voies de biosynthèses de ces trois classes de composés, les résultats obtenus suggèrent que l'expression de gènes spécifiques à chacune des voies, comme l'UFGT pour la voie des anthocyanes, l'ANR pour la voie des tannins ou encore la FLS pour la voie des flavonols, soient également activées. L'étendue des propriétés régulatrices des protéines codées par les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* nous laisse penser que leur rôle est bien défini et est à l'origine de la production coordonnée des différentes classes de flavonoïdes dans la baie de raisin.

Durant le développement de la baie, ce sont les tanins qui apparaissent en premier à partir du stade petit pois, ou ils s'accumulent dans la pellicule et les pépins jusqu'à une à deux semaines après la véraison, avant que leur quantité diminue jusqu'à la récolte (Downey et al., 2003). Les flavonols et les anthocyanes, quant à eux, voient leur cinétique d'accumulation s'accélérer à partir de la véraison et ce jusqu'aux stades matures. La comparaison des profils d'expression des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* durant le développement de la baie avec les cinétiques d'accumulation des composés phénoliques et le niveau d'expression de la majeure partie des gènes structuraux à l'origine de la biosynthèse de ces composés permet d'avancer quelques hypothèses relatives aux rôles respectifs de nos gènes d'intérêt.

### **1) *VvMybCs1*.**

Les résultats obtenus au cours de cette étude indiquent que la forte expression du gène *VvMybCs1* au début du développement de la baie ne conduit pas à la formation d'anthocyanes au niveau de la pellicule, bien que la plupart des gènes structuraux associés à leur biosynthèse présentent au cours de cette période une forte activation de leur expression, à l'exception toutefois du gène codant l'UFGT (Boss et al., 1996). On peut donc penser que l'expression de *VvMybCs1* dans la baie de raisin n'est pas directement liée à la présence d'anthocyanes, mais plutôt à la biosynthèse de précurseurs qui permettront, après la véraison, l'accumulation de composés anthocyaniques et d'autres composés phénoliques comme les flavonols. Le phénotype d'accumulation d'anthocyanes observé chez les plants de Tabac sur-exprimant *VvMybCs1* suggère pourtant une activation de l'expression du gène codant l'UFGT.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénotype. Tout d'abord, la voie de biosynthèse des anthocyanes chez le Tabac étant relativement simple, avec la présence majoritaire d'un seul pigment, il est possible que les mécanismes régulateurs de l'expression du gène codant l'UFGT soient relativement flexibles et permettent une activation par le produit du gène *VvMybCs1*. Chez la Vigne, l'extrême coordination de la production des flavonoïdes au cours du développement de la baie implique que les mécanismes régulateurs inhérents soient d'une extrême finesse avec une grande spécificité entre le ou les facteurs de transcription et les domaines cis-régulateurs présents dans les séquences promotrices des gènes cibles. Par ailleurs, il est également possible que, chez le Tabac, l'expression du gène codant l'UFGT soit sous la dépendance d'un facteur de transcription endogène actif dès les stades précoces du développement de la fleur.

La relation entre l'expression du gène *VvMybCs1* et la production de tannins apparaît beaucoup plus claire dans la mesure où les profils d'expression observés dans la pellicule et les pépins coïncident parfaitement avec la production de tannins condensés dans ces deux organes (Downey et al., 2003). Ce résultat doit toutefois être nuancé. En effet, le dosage par HPLC de la composition en monomères de tannins dans les Tabacs sur-exprimant *VvMybCs1* a montré que seules des épicatechines avaient été synthétisées et accumulées en grandes quantités. Ces résultats indiquent que, chez le Tabac, le produit du gène *VvMybCs1* est capable d'activer l'expression du gène codant l'ANR, enzyme requise pour la production d'épicatechines. La deuxième voie métabolique, pilotée par le gène codant la LAR et conduisant à la production de catéchine, ne semble pas être sous le contrôle de *VvMybCs1*.

Dans la baie de raisin, le profil d'accumulation des monomères de tanins dans les pellicules montre que les composés majoritaires accumulés durant les phases précoces du développement de la baie appartiennent à la famille des catéchines (Downey et al., 2003). *VvMybCs1* ne serait donc pas responsable de la biosynthèse des composés proanthocyanidiques de la pellicule des baies. Par contre, le profil d'expression de *VvMybCs1* observé dans les pépins correspond parfaitement avec le début de l'accumulation de monomères de structures épicatechiniques dans cet organe. La fonction de *VvMybCs1*, en ce qui concerne le métabolisme des tanins, pourrait donc être cantonnée au niveau des pépins avec une activation de la biosynthèse d'épicatechines. Toutefois, nous sommes tout à fait conscients que les résultats observés sur les Tabacs transgéniques ne sont pas automatiquement transposables à la Vigne.

Il est possible que les fonctions régulatrices de la protéine codée par le gène *VvMybCs1* soient différentes chez la Vigne par rapport au Tabac, avec la capacité chez la Vigne de réguler une seconde voie métabolique conduisant à la production de catéchines. Enfin, il convient de rappeler que les mécanismes de régulation de la transcription impliquent souvent une combinaison entre différentes protéines régulatrices. La présence, chez la Vigne, d'un ou de plusieurs partenaires protéiques absents chez le Tabac, pourrait permettre à la protéine codée par le gène *VvMybCs1* d'intervenir dans la régulation d'autres voies de biosynthèse de composés phénoliques. Des travaux complémentaires seront toutefois nécessaires pour confirmer ou infirmer ces hypothèses.

## 2) VvMybCs2.

Durant le développement de la baie, l'expression du gène *VvMybCs2* est fortement induite à partir de la véraison. Ce profil d'expression apparaît donc compatible avec une fonction de stimulation de l'expression des gènes associés à la voie de biosynthèse des polyphénols et notamment des anthocyanes et des flavonols, observée également dans les Tabacs sur-exprimant *VvMybCs2*.

Par ailleurs, un rôle dans la biosynthèse des tannins peut être envisagée en ce qui concerne *VvMybCs2*. En effet, comme pour *VvMybCs1*, la sur-expression de ce gène s'est traduit par l'accumulation de tannins dans les pétales mais aussi dans les étamines. Nous avons d'ailleurs proposé dans l'article 2 que cette accumulation des tannins condensés dans les étamines était sûrement due à une activation de l'expression du gène de l'anthocyanidine synthase, existant chez les lignées *VvMybCs2* sens, connue depuis pour intervenir dans la biosynthèse des épicatechines.

Le pic d'expression de *VvMybCs2* observé trois semaines après l'anthèse au niveau des pépins pourrait être relié à une activation de l'expression des gènes structuraux de la voie de biosynthèse des épicatechines au niveau de la production des sous-unités d'extension (Downey et al., 2003). Toutefois, et tout comme pour *VvMybCs1*, des expériences complémentaires seront nécessaires pour préciser la fonction de *VvMybCs2* au niveau du métabolisme des tannins.

En conclusion, la fonction régulatrice des protéines codées par les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* sur le métabolisme des flavonoïdes semble indéniable. La complémentarité de leurs actions respectives au cours du développement de la baie sur le métabolisme polyphénolique, ainsi que le caractère commun de leurs gènes cibles, montre à quel point ces deux gènes semblent fonctionner de manière complémentaire afin de réguler l'expression des gènes structuraux des polyphénols.

## C) Interactions entre VvMybCs1 et VvMybCs2 avec des facteurs MYC ?

La complémentarité d'action MYB-MYC a été à de multiples reprises démontré dans le contrôle de différents métabolismes comme celui des anthocyanes (Cone et al., 1996; Shifielbein et al., 2003, Abe et al., 2003). L'interaction entre les facteurs MYB et MYC dans le cadre d'un mécanisme de régulation transcriptionnelle a également été démontré par des expériences de double hybride (Grotewold et al., 2000).

À l'heure actuelle, bien que nous ayons réussi à caractériser d'un point de vue histologique le mutant *VvMybCs2* chez le Tabac, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer par quels mécanismes la sur-expression de *VvMybCs2* conduit à un certain nombre de malformations florales. S'agit t-il d'un effet direct de *VvMybCs2* ou la sur-expression du gène perturbe t'elle l'activité d'autres protéines associées au développement floral ? Une hypothèse peut être avancée pour expliquer ces mutations.

Nous avons pu constater, lors de l'étude des plantes sur-exprimant le gène *VvMybCs2*, que l'expression des gènes homéotiques des classes B et C tels que *AGAMOUS* et *GLOBOSA* n'était pas affectée. L'action de *VvMybCs2* ne se situerait donc pas au niveau de l'attribution de l'identité des organes floraux, mais plutôt au niveau de la différenciation cellulaire dans des organes déjà déterminés.

Or comme nous venons de le voir, les liens qui unissent ces deux familles sont étroits. Les facteurs de type MYC, comme les gènes *SPATULA* ou *ALCATRAZ*, sont impliqués dans la différenciation de certaines assises cellulaires dans les étamines et dans le carpelle (Alvarez et al., 1999 ; Heisler et al., 2001 ; Rajani et al., 2001).

Dans ce cas, *VvMybCs2* pourrait interagir avec d'autres facteurs régulateurs impliqués dans ce type de mécanismes de différenciation. Ces facteurs pourraient être issus des gènes régulateurs comme les gènes *SPATULA* (Heisler et al., 2001), *ALCATRAZ* (Rajani et al., 2001) qui font partie de la famille des gènes MYC impliqués dans la différenciation des tissus périphériques, ou encore les gènes *SH1* et *SH2* (Liljegreen et al., 2000) associés à la déhiscence des anthères chez *Arabidopsis thaliana*. Récemment, un nouveau gène MYC a été identifiée chez *Arabidopsis thaliana*. Ce gène, *INDEHISCENT*, code une protéine MYC associé aux mécanismes de déhiscence des siliques (Liljegreen et al., 2004). Voici donc une série de gènes qui pourrait interagir avec notre facteur de transcription. Toutefois, à l'heure actuelle, nous ne disposons d'aucun élément de réponse favorable à cette hypothèse. La caractérisation, chez *Arabidopsis thaliana*, d'un mutant de fonction pour le gène *AtMyb5*, orthologue de *VvMybCs1* et *VvMybCs2*, pourrait apporter peut être quelques éléments de réponse concernant le rôle putatif de ces facteurs sur l'identité des organes floraux.

Si il est difficile de mettre en évidence des interactions entre les protéines codées par nos gènes d'intérêt et des facteurs de type MYC dans le contrôle des mécanismes de différenciation cellulaire, certaines observations semblent toutefois suggérer un tel partenariat dans le contrôle de la voie de biosynthèse des anthocyanes. En effet, nous avons pu mettre en évidence des variations dans la cinétique d'accumulation des anthocyanes entre les pétales et les étamines chez les Tabacs sur-exprimant les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2*. Ces variations pourraient être liées au fait que *VvMybCs1* et *VvMybCs2* ont besoin d'un partenaire exprimé de façon spatio-temporelle chez le Tabac pour activer la transcription de leurs gènes cibles.

L'une des propriétés principales des facteurs de transcription réside dans leurs capacités à se combiner avec d'autres protéines pour créer des complexes nucléoprotéiques nécessaires à l'initiation de la transcription par l'ARN PolIII. C'est cette capacité d'association qui est à l'origine de leur spécificité fonctionnelle tissulaire, voire cellulaire. Les conséquences de la sur-expression chez le Tabac des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* sur la biosynthèse des lignines sont ainsi totalement différentes dans les tiges et dans les pétioles. Ces résultats sont un exemple frappant de la spécificité d'action des facteurs de transcription. Cette spécificité est dépendante du niveau d'expression du gène dans un tissu donné mais surtout de la présence ou non du ou des co-facteurs requis pour sa fonctionnalité. Cette notion de combinaison de facteurs est reconnue et prouvée, principalement dans le cas de la régulation de voies métaboliques.

Ainsi, des interactions entre facteurs régulateurs MYB et MYC ont été mises en évidence dans plusieurs mécanismes de régulation transcriptionnelle, notamment au niveau du métabolisme secondaire, du contrôle de l'identité cellulaire mais aussi dans les mécanismes de signalisation suite à un stress biotique ou abiotique (Ludwig and Wessler, 1990 ; Mol et al., 1998 ; Grotewold et al., 2000 ; Urao et al., 2002).

L'analyse de la séquence en acides aminés des protéines codées par les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* a permis d'identifier, dans le domaine R3, un site spécifique impliqué des les mécanismes d'interactions entre les facteurs de type MYB et MYC (Grotewold et al., 2000).

De plus, comme nous l'avons évoqué précédemment, il semble que le rôle régulateur de *VvMybCs1* et *VvMybCs2* apparaît, dans les fleurs transgéniques, dépendant d'un facteur endogène dont la présence conditionne l'effet de nos deux protéines dans les différents organes des fleurs de Tabac (Lloyd *et al.*, 1992; Quattrochio *et al.*, 1993 ; Chen *et al.*, 2004; Ramsay *et al.*, 2003). Afin de confirmer une telle hypothèse, plusieurs approches peuvent être envisagées. Une étude approfondie, en utilisant la technique de double hybride, permettrait d'avoir une vision globale des capacités d'interaction des protéines codées par les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* avec d'autres facteurs régulateurs. L'inconvénient est, qu'à l'heure actuelle, nous n'avons aucune idée sur la nature des éventuels partenaires de *VvMybCs1* et *VvMybCs2* chez la Vigne.

Nous avons donc opté, dans un premier temps, pour une approche par des croisements chez le Tabac entre des lignées sur-exprimant nos gènes d'intérêts et des lignées sur-exprimant des facteurs MYC associés à la régulation de la voie de biosynthèse des anthocyanes chez le Muflier, et dénommés respectivement *MUTABILIS* et *DELILA*. Ces Tabacs transgéniques nous ont été généreusement fournis par le Pr Cathie Martin, de l'Institut du John Innes Centre à Norwich en Angleterre. Ces expériences devraient nous fournir, dans un délai rapide, des éléments de réponses quant aux capacités d'interaction des protéines codés par les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* avec les facteurs MYC *MUTABILIS* et *DELILA*. nos gènes d'intérêts. Les résultats préliminaires apparaissent d'ailleurs encourageants, avec notamment avec une modification de la coloration des feuilles liée à la présence supposée de flavonoïdes dans les plantes résultant du croisement entre des lignées sur-exprimant *VvMybCs1* et *MUTABILIS*. L'utilisation de notre mutant dominant négatif est maintenant envisagée pour confirmer que l'apparition de ce phénotype est directement liée à une interaction entre les protéines *VvMybCs1* et *MUTABILIS*.

#### **D) *VvMybCs1* et *VvMybCs2* pourraient être redondants.**

Tout au long de ces travaux, il nous est apparu clairement que les gènes régulateurs *VvMybCs1* et *VvMybCs2* présentaient une certaine redondance de fonctionnalité avec une affinité plus ou moins importante pour les séquences promotrices de certains gènes structuraux. Ces cas de redondance fonctionnelle pour des facteurs de transcription de la famille MYB ont déjà été étudiés entre deux gènes de Muflier, *AmMyb305* et *AmMyb340* (Moyano *et al.*, 1995). Lors de ces travaux, des études d'activation transcriptionnelle chez la levure et dans des protoplastes de Tabacs ont montré que la présence simultanée des ces deux facteurs MYB avait pour conséquence de neutraliser leurs effets activateurs respectifs sur l'expression des gènes codants la CHI ou la PAL.

Des résultats comparables ont été trouvés lors de nos travaux en analysant les plantes double-mutante, sur-exprimant à la fois les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2*. La restauration presque complète du retard de déhiscence et du dépôt de lignine dans les tiges, ainsi qu'une coloration anthocyanique atténuée dans les anthères observée sur les plantes double-mutantes pourraient être rapprochés des études menées chez la levure et dans les protoplastes de Tabac (Moyano *et al.*, 1995). Ainsi, les résultats observés sur les plantes double-mutantes ne seraient qu'une conséquence d'un phénomène de compétition entre nos deux protéines régulatrices sur-exprimées de manière constitutive. Cette compétition a pour conséquence une réduction de l'affinité des protéines codées par les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* pour des séquences cis-régulatrices localisées sur des gènes cibles communs. Dans ces conditions, l'effet régulateur d'un facteur de transcription sera atténué ou neutralisé par la présence de l'autre facteur, ce qui se traduira par une absence de variation du niveau de

transcription du gène cible. Toutefois, si le retard de déhiscence est restauré chez les doubles mutants, la coloration anthocyannique, certes atténuée, mais toujours présente dans les étamines, indique que cette compétition présente certaines variations qui pourraient être liées à des degrés d'affinité différents des facteurs de transcription vis à vis des séquences régulatrices de certains gènes cibles.

Selon ce degré d'affinité, le phénomène de compétition pourrait neutraliser partiellement ou complètement l'action régulatrice des protéines codées par les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2*. Ce mécanisme serait ainsi à l'origine d'une restauration seulement partielle du phénotype observé chez les double-mutant par rapport aux deux simples mutants. Des analyses complémentaires axées notamment sur l'étude du niveau d'expression de certains gènes dans différents tissus des plantes double-mutant seront nécessaires afin d'étayer cette hypothèse.

En conclusion, la redondance fonctionnelle, quelque soit le rôle répresseur ou activateur que possédait chacune de nos deux protéines régulatrices, semblent partiellement établi. Toutefois, un certain nombre d'analyses complémentaires pour, d'une part valider un retour du réseau lignifié dans les anthères des doubles mutants et d'autre part effectuer des dosages d'anthocyanes et de tannins dans les pétales et les étamines seront nécessaires afin de confirmer que les modifications de la pigmentation différente selon les organes étudiés correspondent bien à une variation quantitative et non qualitative de la Kéracyanine d'un côté et d'épicatéchine de l'autre coté.

Bien que nous ayons validé la fonctionnalité de ces protéines, certaines questions concernant, notamment l'effet pléiotropique de ces deux facteurs sur le métabolisme des flavonoïdes ou des monolignols, les capacités d'interactions de ces protéines avec d'autres ou leur capacité de complémentarité restent en suspens. Les hypothèses avancées jusqu'à présent sont à considérer avec prudence. Il sera nécessaire de les valider *in vitro* dans un premier temps par des expériences de doubles hybrides par exemple.

## Partie 2 : Perspectives.

### A) Quels signaux régulent l'expression des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* ?

L'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de ce travail de thèse indique que les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* sont des gènes régulateurs forts de la voie de biosynthèse des flavonoïdes dans la baie de raisin. Si l'identification de deux nouveaux marqueurs moléculaires, associés à la qualité organoleptique de la baie de raisin, représente une réelle amélioration de nos connaissances dans ce domaine, elle n'en reste pas moins une finalité. Il nous faut maintenant identifier les éléments régulateurs (biotiques ou abiotiques, endogènes ou exogènes) impliqués dans les mécanismes de régulation de l'expression des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2*.

Un intérêt tout particulier doit être apporté à l'identification d'éléments régulateurs exogènes potentiellement maîtrisables par les viticulteurs eux-mêmes. L'objectif finalisé de ces approches est de définir les conditions optimales (terroir, pratiques culturales, traitements....) susceptibles de modifier l'expression de ces gènes dans les baies afin d'optimiser leur qualité.

Pratiquement, deux approches complémentaires peuvent être envisagées. D'une part, la recherche globale d'éléments régulateurs de l'expression des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* peut être entreprise en utilisant un modèle simple de culture cellulaire (cellules de Vigne) après application de différents traitements (hormones, sucres, contraintes hydriques, ...). Parallèlement, des études de caractérisation fonctionnelle des promoteurs de ces gènes peuvent être mise en place.

Dans le cadre de cette deuxième approche, nous avons d'ores et déjà isolé un fragment d'ADN génomique de 1,3 kilobases située immédiatement en amont de la séquence du gène *VvMybCs1*.

L'analyse préliminaire de cette région promotrice a permis d'identifier plusieurs domaines conservés susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes régulateurs de l'expression du gène *VvMybCs1*. Nous avons également retrouvé une bonne corrélation entre la présence de certains de ces domaines et les premières études d'expression du gène *VvMybCs1* réalisées sur culture de Vigne en présence d'ABA et de saccharose.

Toutefois, de nombreux autres tests doivent encore être effectués pour identifier les composés biologiques ou les conditions physiologiques impliqués dans la régulation de l'expression du gène *VvMybCs1*. En particulier, il serait intéressant de comparer les résultats des études d'expression sur culture cellulaire de Vigne avec ceux obtenus par analyse d'une fusion promoteur *VvMybCs1*-gène rapporteur. Ces approches combinées permettraient d'évaluer de manière qualitative et quantitative les effets de chacun des facteurs régulateurs potentiels testés.

Enfin, des expériences de transformation stable de Tabac avec une construction contenant le promoteur du gène *VvMybCs1* fusionné au gène GUS sont en cours de réalisation au laboratoire. Le principal objectif de cette approche est de déterminer le profil d'expression spatio-temporel du gène *VvMybCs1*. Toutefois, et bien que cette étude puisse nous apporter de précieux renseignements, il sera nécessaire de confirmer les résultats obtenus sur un modèle

végétal de fruit charnu. L'obtention de boutures fructifères à partir de Vignes transformées étant assez longue, la transformation de la tomate pourrait être envisagée à court terme dans la mesure où les profils métaboliques des flavonoïdes sont bien caractérisés chez cette espèce modèle.

## **B) Validation des interactions VvMybCs1 - VvMybCs2 / MYC.**

Les résultats obtenus lors de ces travaux nous ont amené envisager un partenariat entre les protéines codées par les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* et des facteurs de transcription de type MYC dans la régulation de voie de biosynthèse des flavonoïdes. Les premiers résultats encourageants obtenus par l'analyse du croisement entre deux lignées transgéniques n'occulent pas le fait que la validation d'une telle interaction nécessite une étude beaucoup plus poussée.

Une approche utilisant la technique de double-hybride semble réellement indispensable à la mise en évidence d'une telle interaction. La présence dans nos banques EST de plusieurs clones codant des facteurs de transcription de type MYC permettra d'engager dans les mois à venir une étude visant à évaluer les différentes combinaisons d'interactions possibles *in vitro* entre nos deux gènes d'intérêts et des facteurs de type MYC. Par ailleurs, un mutant dominant négatif, nommé *VvMybCs2b*, pourrait être un outil très utile pour confirmer l'éventuel partenariat entre le produit du gène *VvMybCs2* et d'autres types de facteurs de transcription.

En effet, bien que la mutation ne se situe pas au niveau du domaine putatif d'interaction entre les protéines MYB/MYC, l'altération du pont salin causée par cette mutation pourrait éventuellement perturber les interactions protéine/protéine. Une telle hypothèse est à rapprocher des résultats obtenus lors de l'analyse des plants de Tabac sur-exprimant le gène *VvMybCs2b*. En effet, ces résultats indiquent que la mutation modifie partiellement les propriétés d'activation de la transcription de la protéine codée par le gène *VvMybCs2*, et ce de façon variable en fonction des différents gènes cibles étudiés. Il est donc possible que la mutation au niveau du pont salin n'affecte pas directement les capacités de fixation de la protéine sur l'ADN mais plutôt ses propriétés d'interactions avec d'autres protéines.

Cependant, le rôle de ce pont salin sur la stabilité de l'interaction protéine/protéine reste à confirmer. Tout d'abord, il est important de s'assurer que la mutation présente au niveau du pont salin n'affecte pas les interactions ADN/protéine. Pour cela, la sur-expression de deux clones ADNc codant l'un pour le domaine de fixation R2R3 fonctionnel et l'autre pour le domaine R2R3 muté est en cours chez *E. Coli*. L'objectif est, dans un premier temps, d'étudier les capacités de fixation des deux protéines à des séquences cis-régulatrices par des expériences de retard sur gel. D'autre part, nous espérons produire les deux protéines recombinantes en quantité suffisante pour des études de cristallisation et d'analyse structurale. Ce travail sera réalisé en collaboration avec l'Unité de Biophysique Structurale (UMR 5471, CNRS - Université de Bordeaux I) sous la direction des Dr. Bernard Gallois et Gilles Précigoux. L'objectif sera dans un premier temps d'étudier la conformation structurale des deux protéines recombinantes en présence d'une séquence nucléique reconnue par le domaine R2R3. Par la suite, et en fonction des résultats obtenus par l'approche double-hybride, il sera envisagé de cristalliser les deux protéines recombinantes en présence de leurs partenaires protéiques et des séquences d'ADN cible.

### **C) VvMybCs1 et VvMybCs2 et le métabolisme des monolignols.**

La caractérisation des plants de Tabac sur-exprimant les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* a mis en évidence un rôle régulateur de ces gènes sur la voie de biosynthèse des monolignols. Ce rôle se traduit par un effet répresser dans les tiges avec une diminution de la quantité de lignine déposée dans les tissus vasculaires, et par une modification qualitative de la structure des lignines au niveau des pétioles. Toutefois, d'autres analyses biochimiques, comme le dosage global des différents constituants de la lignine comme la vanilline, la syringaldéhyde et d'autres, par la méthode de Klason ou des analyses HPLC, pourraient apporter des informations plus précises sur le rôle de ces deux gènes dans le contrôle de cette voie métabolique.

Dans ce contexte, nous avons mis en place, en collaboration avec l'unité expérimentale de Lusignan (UE6), une approche visant à étudier d'éventuelles variations des teneurs en acide coumarique et en acide vanilique dans les plants de Tabac sur-exprimant les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2*. Les résultats préliminaires, bien qu'encourageants, doivent être confirmés en raison de la faible concentration des composés à analyser. Il s'est en fait avéré que la méthode d'extraction utilisée n'était pas adaptée au matériel végétal proposé, et il a donc fallu dans un premier temps optimiser cette méthode.

À l'heure actuelle, les problèmes d'extraction semblent résolus et de nouvelles analyses devraient prochainement nous permettre de mieux cerner le rôle des protéines codées par les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* dans la régulation du métabolisme des acides phénoliques et des monolignols.

### **D) D'autres rôles régulateurs pour VvMybCs1 et VvMybCs2 ?**

Nous venons de voir que les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* jouaient un rôle important dans la régulation du métabolisme des polyphénols. Dans la mesure où le métabolisme de stilbènes est, du fait de l'utilisation de précurseurs communs, très lié à celui des polyphénols, il nous apparaît maintenant très intéressant d'évaluer l'impact de la sur-expression de nos deux facteurs régulateurs sur le métabolisme des stilbènes. Nous avons d'ores et déjà au laboratoire des Vignes transgéniques sur-exprimant *VvMybCs1*, et d'autres plants sur-exprimant le gène *VvMybCs2* devraient être disponibles prochainement. Ces plantes représentent des outils parfaitement appropriés pour la mise en place d'un travail complet d'analyses biochimiques et transcriptionnelles pour évaluer l'impact de nos gènes régulateurs sur la voie de biosynthèse des stilbènes. De plus, elles permettront également la réalisation de tests de résistance à différents pathogènes de la Vigne, notamment *Botrytis cinerea* ou *Plasmopara viticola*.

### **E) Validation fonctionnelle de VvMybCs1 et VvMybCs2 sur un système homologue ou sur plantes à fruits charnus.**

Au cours de ces travaux de thèse, l'obtention de plants de Vigne transgéniques nous est apparu indispensable pour la validation fonctionnelle des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2*. En effet, il est essentiel de pouvoir confirmer les résultats obtenus chez le Tabac sur système homologue. Toutefois, les difficultés que nous avons rencontrées lors de la régénération des plants de Vigne sur-exprimant les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* ont retardé ces travaux. A

l'heure actuelle, nous disposons d'une dizaine de plants sur-exprimant le gène *VvMybCs1* et une vingtaine de plants sur-exprimant *VvMybCs2* sont en cours de régénération.

L'utilisation de puces à ADN nous a toutefois permis d'entreprendre la caractérisation des plants sur-exprimant le gène *VvMybCs1*. Les résultats préliminaires semblent en accord avec ceux obtenus chez le Tabac (activation de la transcription des gènes cibles ??) et mettent en évidence des pistes de travail intéressantes avec notamment l'identification de nouveaux gènes cibles. Suite à ces analyses transcriptionnelles, il sera nécessaire d'étudier des profils métaboliques ,par HPLC ou par RMN, et ce principalement en ce qui concerne le métabolisme des phénylpropanoïdes afin de rechercher une corrélation entre les profils transcriptionnels et les profils métaboliques.

Un autre aspect intéressant sera l'évaluation de la dualité entre le métabolisme des stilbènes et celui des flavonoïdes. La Chalcone Synthase et la Stilbène Synthase sont des enzymes utilisant les mêmes substrats, ce qui pourrait expliquer dans une certaine mesure la sensibilité de la Vigne à l'attaque par divers pathogènes après la véraison (Jeandet et *al.*, 1995). Il sera donc intéressant d'utiliser les Vignes sur-exprimant les gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* pour évaluer le rôle régulateur de ces gènes sur l'expression de la stilbène synthase et la teneur en stilbènes. Des tests de sensibilité à des agents pathogènes comme *Botrytis Cinerea* ou le Mildiou pourront également être réalisés sur les Vignes transgéniques, afin d'évaluer leur degré de résistance par rapport à des plantes témoins.

Enfin, bien que les analyses HPLC relatives au métabolisme des anthocyanes et des tannins nous aient fournis de précieux renseignements concernant le rôle de nos deux gènes sur le métabolisme des flavonoïdes, la simplicité du modèle métabolique des flavonoïdes chez le Tabac nous a limité dans l'appréciation globale de ce rôle. De ce fait, il est difficile de transposer nos résultats sur un métabolisme plus complexe comme celui de la Vigne, où pas moins de 17 composés anthocyaniques ont été identifiés. L'obtention de fruit chez la Vigne étant également un facteur limitant, l'emploi d'un modèle végétal comme la tomate pourrait s'avérer intéressant dans la mesure où les profils métaboliques des flavonoïdes sont bien connus chez ce fruit (Mathews et *al.*, 2003 ; Bovy et *al.*, 2002).

En conclusion, l'objectif fixé au début de ce travail, à savoir l'identification et la caractérisation de nouveaux marqueurs moléculaires associés à la régulation de la voie de biosynthèse des polyphénols semble atteint. Nous disposons, à l'heure actuelle, de deux gènes impliqués à la fois dans la régulation du métabolisme des anthocyanes et de celui des tannins, deux familles importantes de composés qui contribuent de manière prépondérante à la qualité organoleptique de la baie de raisin et de son produit final, le vin. Afin d'exploiter au mieux ces résultats, il est maintenant nécessaire d'identifier les facteurs endogènes et exogènes impliqués dans les mécanismes de régulation de l'expression des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* dans la baie de raisin. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait, à terme, permettre aux viticulteurs d'adapter les pratiques culturales de façon à optimiser la nature et la quantité de composés phénoliques présents dans les baies dans des perspectives de qualité, saveur, couleur, typicité et de santé humaine.

## **MATERIEL ET METHODES**

# MATERIEL

## A) Matériel végétal.

### 1) Baies de raisin et suspensions cellulaires de Vigne cv Cabernet Sauvignon.

Les baies de raisin de *Vitis Vinifera* cv Cabernet Sauvignon, utilisées pour les études d'expression des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2* au cours du développement, ont été prélevées dans le vignoble du domaine du Grand Parc (parcelle P21) situé à Latresne (Gironde). Le prélèvement a eu lieu entre les mois de juin et septembre 2000 afin de pouvoir disposer de cinq stades représentatifs du développement de la baie de raisin (**Tableau 8**). Après section du pinceau des baies, ces dernières sont immédiatement congelées dans de l'azote liquide et stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

Ultérieurement, les baies ont été pesées au laboratoire pour homogénéiser les différents stades. Les études d'expression sur la pellicule et sur la pulpe ont nécessité un pelage de la pellicule des baies et une séparation de la pulpe des pépins sur le lieu de récolte avant d'être immédiatement plongées dans l'azote liquide et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . En ce qui concerne les racines et les feuilles, les prélèvements ont été effectués sur des boutures fructifères en conditions hydroponiques.

Des suspensions cellulaires nous ont été généreusement fournies par le Professeur Jean-Michel Mérillon du laboratoire de Mycologie et de Biotechnologie Végétale (EA491 : UFR de Pharmacie, Bordeaux II). Les cultures cellulaires ont été obtenues à partir de cals fructifères, puis stabilisées à l'obscurité dans une chambre thermostatée à  $25^{\circ}\text{C}$  sous agitation (160 tours/minutes) dans un milieu nutritif B5 décrit par Decendit et *al.*, 1996. Les ajouts de saccharose et d'acide abscissique sont réalisés 4 jours après le repiquage afin que les cellules se trouvent en phase de croissance exponentielle. Les teneurs en saccharose sont de 58mM et 10 $\mu\text{M}$  d'acide abscissique non conjugué (Sigma). Les suspensions embryogènes de Vigne (souche 41B Rootstock) sont conservées dans un milieu GM+ (**Annexe 2**).

### 2) Plants de Tabac.

Deux cultivars de Tabacs de la variété *Nicotiana tabacum* ont été utilisés dans le laboratoire, le Xanthi et le SR1. Les semences sont conservées à température ambiante à l'obscurité en présence d'un agent dessiccateur (Silicagel; Prolabo). Les vitroplants sont, quant à eux, propagés par bouturage de l'apex ou d'un entre-noeud sur milieu nutritif MS gélosé (**Annexe 2**). Ils sont conservés dans des chambres de culture thermostatées et soumises à une photopériode 16 heures de lumière à  $25^{\circ}\text{C}$  et 8 heures d'obscurité à  $21^{\circ}\text{C}$ . L'acclimatation se fait en salle de culture dans une mini-serre pendant environ trois semaines, puis les plants sont transférés sur un mélange de terreaux : vermiculite en serre climatisée jusqu'à la floraison et la production de graines.

### **3) *Arabidopsis thaliana*.**

L'écotype *columbia* (Col-O) d'*Arabidopsis thaliana* est utilisé. Les semences sont conservées à température ambiante à l'obscurité en présence d'un agent dessiccateur (Silicagel ; Prolabo). Les vitro-plants sont conservés dans les mêmes conditions que le tabac. L'acclimatation se réalise dans les mêmes conditions que le Tabac. Les plantules de 1 cm de hauteur sont alors repiquées dans un mélange de terreaux et de vermiculite (3 :1) et placées en serre jusqu'à l'obtention de graines.

## **B) Souches de bactéries.**

### **1) La souche Easypore (MBI Fermentas, Vilnius).**

La souche *E. Coli* Easypore, dérivée de la souche *E. Coli* K12 (Yanisch-Perron et al., 1985) est Rec A1 et ne peut pas subir de recombinaisons de son génome. Elle est utilisée à la fois pour le clonage d'ADNc isolés par PCR sur banque ADNc ou par RT-PCR. Par ailleurs, elle sert aussi pour la conservation des vecteurs d'expression de type pQE-30 (QIAGEN) ou binaire de type pgiBin19 (Bevan, 1984).

### **2) La souche M15 (QIAGEN).**

La souche *Escherichia coli* M15 est aussi dérivée de la souche *E. coli* K12. Elle contient le plasmide pREP4 qui possède le gène de résistance NPTII permettant la sélection des bactéries et le gène LacI codant la protéine répresseur Lac qui assure la régulation de l'expression des protéines recombinantes au niveau du promoteur du plasmide pQE-30.

### **3) La souche LBA 4404.**

La souche LBA4404 (Hoekema et al., 1983) qui héberge le plasmide Ti à octopine (pTiAch5) est utilisée pour la transformation des disques foliaires de Tabacs et d'*Arabidopsis thaliana*. Elle contient le gène de résistance à la Rifampicine.

### **4) La souche EHA 105.**

La souche EHA 105 est une souche ultra virulente dérivée de la souche EHA 101 qui possède un plasmide Ti à nopaline et leucinopine (Hood et al., 1993). Elle est utilisée pour la transformation des cellules de Vigne récalcitrante à la transformation.

## **C) Les vecteurs de clonage et d'expression (Annexe 3).**

### **1) Le vecteur pGEM-Teasy.**

Le vecteur pGEMTeasy (Promega, France) est utilisé pour tous les clonages et sous-clonages des ADNc. Il est fourni sous sa forme linéarisée et possède une thymidine en position 3' sur chaque extrémité. Le sous-clonage du produit amplifié par la technique de PCR est ainsi favorisé dans la mesure où la plupart des ADN polymérase de type *Thermophilus* ajoutent une désoxyadénosine en 3' du produit amplifié. Les marqueurs de sélection pour ce plasmide sont le gène de résistance à l'ampicilline codant la  $\beta$  lactamase qui

valide la transformation bactérienne et le gène LacZ codant la sous-unité de la  $\beta$ -galactosidase qui confirme ou non la présence d'un insert dans le vecteur (système de bactéries blanc-bleu).

## 2) Le vecteur pQE-30 (QIAGEN).

Le plasmide pQE-30 (**Annexe 3**) appartient à la famille des plasmides pDS (Bujard et al., 1987) et dérive du vecteur pDS56/RBSII (Stüber et al., 1990). Il porte le gène de la  $\beta$ -lactamase (bla) qui lui assure la résistance à l'ampicilline. Les éléments de l'opérateur et du promoteur du phage T5 situés en amont du site multiple de clonage (SMC) sont reconnus par l'ARN polymérase d'*E. Coli*. La répression du promoteur fort T5 est assurée par la fixation du répresseur Lac sur les deux séquences opératrices situées en aval du promoteur. Ces plasmides possèdent en aval du Site Multiple de Clonage deux séquences terminatrices fortes, T0 issue du phage  $\lambda$  et T1 de l'opéron *rrnB* d'*E. Coli*, qui permettent ainsi la stabilité de l'expression.

## 3) Le vecteur binaire d'expression.

Le vecteur binaire pGiBin19 (**Annexe 3**) dérive du pBin19 (Bevan, 1984) et possède les fonctions de réplication dans *E. Coli* et *Agrobacterium tumefaciens*. Il possède le gène de résistance assurant la résistance à la kanamycine qui permet son expression dans les bactéries. Par ailleurs, il contient le gène de la  $\beta$ -glucuronidase comportant un intron et le gène de la néomycine phosphotransférase (Npt II) qui confère la résistance à la kanamycine. Le gène codant la  $\beta$ -glucuronidase est bordé en amont d'un promoteur constitutif de type CAMV 35S et en aval d'une séquence terminatrice en 3' de la Nopaline Synthase. Les deux gènes sont encadrés par les bordures droite et gauche de l'ADN de transfert. C'est ce deuxième gène de résistance à la kanamycine qui permettra de sélectionner les plantes ayant inséré cette partie de l'ADN-T dans leur génome.

# METHODES.

## A) Clonage des séquences ADNc -*VvMybCs1* et *VvMybCs2*.

### 1) Techniques de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Les conditions sont variables selon les applications et selon l'enzyme utilisée.

#### 1. a) Milieu réactionnel avec la *Thermophilus aquaticus* ou Taq ADN polymérase.

L'ensemble des réactions d'amplification par la technique de Polymerase Chain Reaction ou PCR (Saiki et al., 1985) pour les clonages ou les études d'expression transcriptionnelle ont été réalisées avec la Taq ADN polymérase (Promega Corp.; Madison) conditionnée dans un tampon B (20 mM Tris-HCl pH= 8, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glycérol et 1% Triton X-100).

Chaque réaction de PCR nécessite pour un volume final de 50  $\mu$ l:

- 1/10 de Tampon 10 X DNA polymérase (Promega, Madison) contenant 10 mM Tris-HCl pH = 9,0, 50 mM KCl et 0,1% Triton X-100.
- 200  $\mu$ M pour chaque dNTP

- 200 nM pour chaque amorce oligonucléotidique
- 3 mM de MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 unité de Taq ADN polymerase.

### **1.b) Milieu réaction avec la *Pyrococcus furiosus* ou Pfu ADN polymérase.**

Les mêmes conditions sont utilisées à l'exception du tampon d'incubation (*pfu* ADN polymerase 10X) qui est spécifique à la polymérase ( 200 mM Tris-HCl pH = 8,8, 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MGSO<sub>4</sub>, 1 mg/ml BSA, 1% Triton X-100) et de la quantité d'enzyme qui est de l'ordre de 0,5 à 1 unité par réaction de 100 µl.

### **1.c) Conditions d'amplification.**

L'amplification est réalisée dans un appareil automatisé iCycler (BIORAD; Ivry sur Seine) à couvercle chauffant. Le mélange est soumis à des cycles d'amplifications variables entre 15 et 35 cycles qui dépendront de l'objectif de l'analyse.

PCR sur banque ADNc :

Cycle 1 : 95°C, 3 minutes

Cycle 2 : (nombre de cycles variables)

Etape 1(Dénaturation) : 95°C, 30 s

Etape 2 (Hybridation) : la température appliquée est fonction de la température de fusion des amorces oligonucléotidiques utilisées, 30 à 60 s

Etape 3 (Elongation) : 72°C, le temps d'élongation va dépendre à la fois de la taille des fragments amplifiés et de la nature de l'ADN polymérase utilisée, la gamme de temps s'étend de 30 secondes à 3 minutes. Les essais sont réalisés dans des tubes Eppendorf de 200µl.

### **1.d) Purification des fragments amplifiés.**

Après amplification par PCR et contrôle sur gel d'agarose les produits amplifiés sont purifiés à l'aide du Kit « PCR Product Purification Kit » (QIAGEN). Le principe est de fixer l'ADN sur une membrane de gel de silice contenu dans un tampon à forte salinité et après un lavage de la membrane dans un tampon PE, l'ADN est récupéré par centrifugation (15000 g, 1 minute) dans un tampon d'élution EB.

## **2) Techniques de clonage.**

### **2.a) Amplification par PCR des séquences codantes des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2*.**

Des amorces contenant des sites de restriction présents au niveau des sites multiples de clonages des vecteurs sont utilisées pour amplifier une matrice d'ADN (Banque ADNc ou plasmide). La qualité des amorces a été validée à l'aide du logiciel Oligo 4 (Richlyk, 1992). L'ensemble des amorces utilisées pour les études d'expression chez la Vigne et le Tabac, à l'exception de la DFR, CHI et C4H (close de confidentialité), ont été choisies dans la région 3' non codante des gènes correspondant. La liste des amorces des amorces utilisées se trouve dans l'**Annexe 4**.

## 2.b) Extraction et purification de produits de clonage.

Les vecteurs et les fragments à sous-cloner sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à pourcentage approprié selon leur taille sous une tension constante de 100 Volts dans un tampon TAE (**Annexe 5**). Les gels contenant 100 µg/l de bromure d'éthidium (BIORAD) sont observés sous lumières U.V. et révèlent la présence d'un signal d'amplification photographié par une caméra digitale (Biorad-Imager). Les bandes correspondant aux fragments d'intérêts sont découpées sur gel et ensuite purifiées à l'aide du kit QIAquickGel extraction Kit (QIAGEN).

Après incubation à 50°C pendant dix minutes qui permettent de dissoudre l'agarose, l'ADN est fixé sur la colonne contenant la membrane de silice par centrifugation (16000 g, 1 minute). La colonne est lavée ultérieurement par l'addition d'un tampon de lavage PE (16000 g, 1 minute) et l'ADN est récupéré par une nouvelle centrifugation dans un tampon d'élution EB (Tris-HCl 10mM, pH = 8,5). La taille d'exclusion de ce kit ne prenant pas en compte la longueur du vecteur PgiBin19, ce dernier est purifié à l'aide du kit de purification sur gel QIAXII (QIAGEN) qui fonctionne sur le même principe que le précédent avec une résine et non une colonne.

## 2.c) Quantification des fragments d'ADN.

Tous les produits purifiés sont quantifiés et leur qualité est évaluée à l'aide d'un spectrophomètre de type GeneQuant 8000 à la longueur d'onde de 260 nm (AMERSHAM, Suède). Des mesures d'absorbance, à 230 nm et 280 nm, sont effectuées pour évaluer la présence respectivement de sucres et de protéines dans les extraits. Un aliquote d'ADN est considéré comme pur pour des rapports 260/230 supérieur à 2 et 260/280 supérieur ou égal à 1,8.

## 2.d) Réaction de ligation.

L'efficacité de la réaction de ligation dépend en grande partie du rapport des concentrations molaires vecteur/insert. Pour les clonages dit classiques avec des vecteurs appropriés comme le PgemTeasy il est conseillé de tester trois rapports molaires différents vecteur/insert (1/3 ; 1/1 ; 3/1). La quantité d'insert à ajouter à 50 ng de vecteur est calculée grâce à la formule suivante.

$$\frac{(\text{ng de vecteur}) \times (\text{taille de l'insert en kb}) \times (\text{rapport molaire Insert/Vecteur})}{(\text{taille du vecteur})} = \text{ng d'insert}$$

Toutes les réactions de ligation qui ont conduit au clonage des fragments d'intérêts ont été réalisées à l'aide du kit PgemTeasy system I (Promega, Madison). 50 ng de vecteur linéarisé et  $\mu\text{l}$  de fragments purifiés à sous-cloner sont mis en présence de 1 à 3 unités de T4 DNA ligase (Promega) et de 5µl d'un tampon 2X de ligation (66mM Tris-HCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM ATP, pH=7,5). L'ensemble de la réaction est incubé pendant au moins 16 heures à 4°C ou 3 heures à 20°C.

Les réactions de ligation, concernant le clonage des clones ADNc *VvMybCs1* et *VvMybCs2* dans le vecteur d'expression bactérien pQE-30 ont été réalisées en respectant les mêmes rapports molaires. En ce qui concerne le clonage dans pGiBin19, 100 à 150 ng de vecteur linéarisé par digestion sont utilisés et deux nouveaux rapports molaires vecteur / insert ont été testés (1/5 et 1/8) pour améliorer l'efficacité de ligation. La réaction est réalisée dans un tampon de ligation 10 X (300mM Tris-HCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM DTT, 10mM ATP, pH=7,8).

### 3) Transformation bactérienne.

#### 3.a) Transformation des bactéries électro-compétentes par choc électrique.

Le principe de la transformation par électroporation est d'appliquer un courant électrique pendant 4 à 6 ms de 1800 volts pour des souches de type *E. Coli* et 1500 volts de type *Agrobacterium* à l'aide d'un électroporateur (Eppendorf, Inc.). Ce choc électrique va générer temporairement des pores dans la paroi bactérienne facilitant ainsi l'entrée du plasmide. 40 µl de bactéries électro-compétentes sont décongelées dans la glace et placées en présence de 1/10<sup>ème</sup> du mélange de ligation dessalé. Le mélange est placé dans une cuve d'électroporation ( $d_{\text{(électrodes)}} = 2\text{mm}$ ). L'électroporateur est réglé sur une capacité de 50µF et une résistance de 150 Ω. Après l'impulsion électrique, les bactéries sont immédiatement transférées dans 1 ml de milieu nutritif (LB, SOC) et soumises à une agitation (140rpm) pendant 1 heure 30 minutes à 37°C. Plusieurs aliquotes de volume variable (50, 100 et 200 µl) sont étalées sur un milieu LB sélectif par la présence d'antibiotiques et mises à incuber pendant 16 h dans une étuve à 37°C pour des souches bactériennes de type *E. Coli* et 48 heures à 28°C pour des souches d'*Agrobacterium tumefaciens*. Pour les plasmides permettant la sélection blanc/bleu, le milieu sélectif est complété avec le substrat chromogène X-gal à 20mg/l et l'inducteur IPTG à 10 mg/l.

#### 3.b) Sélection des bactéries transformées.

Le milieu de sélection dépend du gène de résistance (généralement un antibiotique) porté par le vecteur. Seules les bactéries transformées par ce vecteur pousseront sur milieu de sélection. Les différents milieux de culture bactérienne utilisés sont décrits dans l'**annexe 5**.

#### 3.c) Sélection des bactéries par le système « Blanc-bleu ».

Dans certaines conditions, il est possible de sélectionner directement les bactéries transformées par le vecteur contenant l'insert. En effet, certains vecteurs comme le pGemTEasy portent les sites multiples de clonage dans le gène codant la β-galactosidase. La présence d'un insert interrompt la phase de lecture et l'enzyme produite est inactive et ne peut plus transformer son substrat chromogénique (Xgal) en produit bleu. Certains substrats de la β-galactosidase (ex : Xgal) donnent, en effet un produit de coloration bleue en présence d'un inducteur (ex : IPTG). Sur un milieu LB+IPTG+XGal (**Annexe 5**), les colonies transformées avec un vecteur contenant l'insert seront blanches tandis que les colonies transformées avec un vecteur sans insert seront bleues. Les colonies blanches sont donc mises en culture sur milieu sélectif.

#### 3.d) Extraction d'ADN plasmidique : lyse alcaline (Birboim et Doly, 1979).

Cette méthode est utilisée pour vérifier la présence du plasmide contenant l'insert dans les bactéries transformées. L'ADN chromosomique et plasmidique subissent une phase de dénaturation par un traitement alcalin puis ils sont rapidement renaturés en ajoutant une solution acide. Seul, l'ADN plasmidique reste soluble alors que l'ADN chromosomique reste insoluble. Une colonie bactérienne est cultivée dans 3 ml de milieu LB contenant l'antibiotique sélectif pendant 16 heures à 37°C sous agitation (140 rpm). La suspension bactérienne est alors sédimentée pendant 5 minutes à 12000 g. Le culot est repris dans 100 µl de TE (25 mM Tris-HCl pH = 8, 10 mM EDTA) auquel on rajoute 200 µl de solution dénaturante alcaline (0,2 N NaOH, 1% SDS). Après avoir agité au vortex, la lyse est laissée à température ambiante pendant cinq minutes. Les débris bactériens et l'ADN chromosomique

sont précipités 10 minutes dans la glace par ajout de 150 µl d'une solution 3M d'acétate de sodium pH =5,2. Après 5 minutes de centrifugation à 12000 g., le surnageant est transféré dans un tube propre pour subir une extraction au phénol/ chloroforme (v/v). Puis, l'ADN plasmidique est précipité 30 minutes à -20°C par 2,5 volumes d'éthanol en présence de un dixième de 3M d'acétate de sodium pH = 5,2. Après un cycle de centrifugation (12000 g, 5 minutes) le culot est lavé par 500 µl d'éthanol à 70% et séché au speedvac. L'ADN est finalement repris dans 50 µl d'eau Dnase free et analysé sur gel d'agarose 1% dans un tampon TAE .

### **3.e) Réaction de digestion d'ADN par des enzymes de restriction.**

Toutes les réactions enzymatiques qui ont permis d'aboutir à la digestion de matrice d'ADN plasmidique ont nécessité l'utilisation de 5 à 10 unités d'enzymes par µg d'ADN en présence d'un agent piégeant (BSA) ou (sérum bovin d'albumine) à 1 g/l et d'un tampon spécifique fourni avec l'enzyme (Promega ; Biolabs).

### **3.f) Séquençage et analyse informatique.**

Les échantillons plasmidiques sont envoyés en séquençage automatique à Génome Express (Meylan). L'alignement des séquences nucléotidiques et protéiques a été effectué par le logiciel Clustal X (Thompson *et al.*, 1991). L'édition des alignements a été réalisé par le logiciel SeqPUP9 (Gibert, Indiana). L'édition des séquences nucléiques et protéiques a été réalisée par le logiciel DNA Strider (GIF sur Yvette). Les Comparaisons de séquences avec les banques de données ont été réalisées avec le programme BLAST (Altschul *et al.*, 1997) via internet (<http://.ncbi.nlm.nih.gov>).

## **B) Etude de l'expression des gènes VvMybCs1 et VvMybCs2 chez la baie de raisin.**

Pour l'extraction et la manipulation des ARN, toutes les solutions sont traitées avec 0,1% (v/v) de DEPC (DiEthylPyroCarbonate), un inhibiteur des ribonucléases, ou préparées avec de l'eau traitée au DEPC à l'exception du Tris-HCl. Le matériel est nettoyé au chloroforme puis séché à l'éthanol avant autoclavage.

### **1) Extraction d'ARN totaux de Vigne.**

#### **1.a) À partir de baies de raisin.**

La baie de raisin est un matériel récalcitrant à l'extraction d'ARN totaux du fait de l'accumulation au cours du développement de polyphénols et de sucres. De nombreux protocoles ont été essayés avec plus ou moins de réussite. Un protocole mis au point par une équipe australienne (Boss *et al.*, 1996) permettait d'obtenir de bons rendements pour les stades compris entre le stade Véraison et le stade récolte. Toutefois, les rendements pour les extractions des stades plus précoces se sont avérés faibles. Nous avons donc opté pour un autre protocole utilisé chez la Banane (Asif *et al.*, 1996) qui nous a permis d'obtenir de meilleurs rendements pour les stades précoces.

Environ 500 mg de poudre des différents organes étudiés sont homogénéisés dans un tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl, pH = 8,2, 1,4M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB (m/v)) préchauffé à 65°C auquel on ajoute extemporanément 15 mM de β-mercaptoéthanol. Après quarante minutes d'incubation à 65°C, en homogénéisant toutes les quinze minutes,

l'ensemble est laissé à refroidir à température ambiante puis extrait par un volume égal de chloroforme / alcool isoamylique (24/1 ; v/v) et mélangé par inversion des tubes une vingtaine de fois. Une fois centrifugé (7000 g, 20 minutes) la phase aqueuse est récupérée et extraite de nouveau avec du chloroforme/alcool isoamylique dans les mêmes conditions. Une nouvelle centrifugation est opérée dans les mêmes conditions.

Les acides nucléiques sont précipités pendant 30 minutes à  $-20^{\circ}\text{C}$ , par addition d'un volume de chlorure de lithium à 10 M, calculé pour obtenir une concentration finale de 3 M. Après centrifugation (12000 g, 45 minutes,  $4^{\circ}\text{C}$ ), le culot est préalablement remis en suspension dans 500  $\mu\text{l}$  d'eau traitée au DEPC pendant 30 minutes dans la glace. Trois extractions successives au phénol, au phénol/ chloroforme et au chloroforme/ alcool isoamylique sont réalisées. Dans la mesure où nous travaillons sur un tissu contenant, selon les stades de développement de fortes concentrations de sucre, une précipitation sélective des sucres est réalisée, à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes, par addition d'un trentième de volume de 3M Na acétate pH = 5,2 et de un dixième d'éthanol absolu. Ensuite, une nouvelle centrifugation est réalisée et le surnageant est récupéré.

Les ARNs sont précipités pendant trois heures à  $-20^{\circ}\text{C}$  par 2,5 volumes d'éthanol absolu et 1/10 de volume de 3 M Na Acétate pH = 5,2. Le précipitat est alors centrifugé à 16000 g pendant 30 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le culot contenant les ARNs est préalablement lavé par 500  $\mu\text{l}$  d'éthanol à 70% puis séché sous vide (Speedvac, Bioblock). Par la suite, le culot est resuspendu dans 50 à 200  $\mu\text{l}$  d'eau DEPC. Le rendement varie selon le stade mais en moyenne, il est de 50 à 100  $\mu\text{g/g}$  de poudre congelée.

### **1.b) À partir des feuilles et des racines de Vigne.**

L'extraction de ces deux tissus est réalisée selon le protocole de Chang et *al.*, 1993. Deux grammes de poudre broyés dans l'azote sont mis en présence de 15 ml d'un tampon d'extraction préchauffé à  $65^{\circ}\text{C}$  [100 mM Tris-HCl pH = 8 , 25 mM EDTA, 2M NaCl, 3,5mM spermidine, 290mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 2% PVP (m/v), 2% CTAB (m/v)] pendant 45 minutes à  $65^{\circ}\text{C}$ . L'ensemble est extrait à deux reprises avec un volume équivalent de chloroforme / alcool isoamylique (24 :1). La phase aqueuse est récupérée après centrifugation (10000 g, 15 minutes). Les acides nucléiques sont précipités sur une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$  en présence de chlorure de lithium 2 M. Après centrifugation (9000 g, 20 minutes,  $4^{\circ}\text{C}$ ), le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans un tampon SSTE [Tris-HCl 2mM pH = 8, 200mM NaCl, 200 $\mu\text{M}$  EDTA, SDS 0,1% (m/v)].

Afin d'éliminer toute trace de contaminant, la suspension est extraite une nouvelle fois avec une solution de chloroforme / alcool isoamylique (24 :1) puis centrifugée (16000g, 10 minutes). Les acides nucléiques sont précipités dans 2,5 volumes d'éthanol absolu froid en présence de 0,1 volume de 3M Na Acétate pH=5,2 à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant au moins deux heures. Après centrifugation (16000 g, 30 minutes,  $4^{\circ}\text{C}$ ), le culot est lavé avec de l'éthanol à  $70^{\circ}\text{C}$ , puis séché sous vide et finalement resuspendu dans 100 $\mu\text{l}$  d'eau traitée au DEPC. Les rendements de ce protocole sont de l'ordre de 200 à 300  $\mu\text{g/g}$  de baie.

## **2) Technique de RT-PCR.**

### **2.a) Quantification des ARN totaux.**

Tous les produits purifiés sont quantifiés et leur qualité est évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre de type GeneQuant 8000 à la longueur d'onde de 260 nm (AMERSHAM). Des mesures d'absorbance à 230 nm et 280 nm sont effectuées pour évaluer la présence respectivement de sucres et de protéines. Un aliquote d'ARN considéré comme purifié doit avoir un rapport d'absorbance 260/230 supérieur à 2,2 et un rapport 260/280 d'environ de 2.

### **2.b) Traitement des ARN totaux à la Dnase.**

Pour la plupart des protocoles d'extractions d'ARN, nous avons été confrontés à une contamination en ADN. La plupart de nos études d'expression sont des RT-PCR semi quantitatives qui permettent d'estimer le niveau d'expression d'un gène par l'intermédiaire de l'abondance de l'ADNc correspondant. Or, la présence d'ADN génomique pourrait fausser donc nos résultats de quantification après la réaction de PCR. À ce titre, nous avons donc effectué un traitement à la désoxyribonucléase (Dnase Q1 ; Promega) pour l'ensemble de nos réactions. 10 µg d'ARN totaux sont mis en présence d'un tampon d'incubation Dnase Buffer Free Rnase, (Promega) (250 mM Tris-HCl pH=8,3, 250 mM KCL, 50 mM de MgCl<sub>2</sub> ; 2,5mM de spermidine 50 mM de DTT), de 40 unités d'inhibiteur de Ribonucléase (Promega, US) et de 10 unités de Dnase sont ajoutées au mélange.

L'échantillon est mis à incuber pendant 30 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par ajout d'un volume de Dnase Stop solution (45 mM d'EDTA pH=8 ; 900 mM d'Acétate de Sodium , SDS 1%). Deux extractions successives ont ensuite été réalisées au phénol/chloroforme/IAA (25/24/1, v/v/v) puis au chloroforme/IAA (24/1, v/v) (cf. Extraction des ARN totaux de baies). Les ARN contenus dans la phase aqueuse de la seconde extraction sont précipités pendant 3 heures à -20°C après addition de 1/10 de volume de Na Acétate 3 M (pH 5,2) et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Après centrifugation (16000 g, 25 minutes, 4°C), le culot est finalement lavé dans 500 µl d'éthanol 70 % (v/v) et remis en suspension dans de l'eau traitée au DEPC et à -80°C.

### **2.c) Réaction de rétrotranscription.**

Deux µg d'ARN totaux dénaturés à 75 °C pendant 10 minutes, puis utilisés pour la synthèse d'un simple brin d'ADNc à l'aide de la rétrotranscriptase (MMLV Rnase H, Promega) en présence d'oligo dT à 1,2 µM, de tampon de transcription inverse (RT 5X Buffer, Promega), de DTT à 4 mM, de dNTPs à 800 µM, de 20 unités d'inhibiteur de Rnase (Rnasine ; Promega) et de 100 unités de RT-MMLV (Transcriptase inverse ; Promega). La réaction de rétrotranscription se réalise dans un thermocycleur de type iCycler (BIORAD, Ivry sur Seine) pendant une heure à 42°C. La réaction enzymatique est arrêtée par un passage à 70°C pendant 10 minutes. Tous les produits de rétrotranscription sont dilués au cinquième puis 5 µl sont utilisés pour chaque réaction de PCR.

### **3) Analyse des produits d'amplification par Southern-Blot.**

#### **3.a) Transferts des produits PCR issus des rétro-transcrits.**

Les produits PCR sont résolus sur un gel d'agarose TAE 1 X (20 mM Tris acétate, 1 mM EDTA pH 8.0) à 0,8 % (m/v) par migration dans un tampon TAE 1X. L'électrophorèse est réalisée à 100 Volts pendant 15 minutes dans des cuves de migration de type MUPID (Eurogentec). Le gel est ensuite équilibré dans une solution de 0,4 M de NaOH pendant 30 minutes sous agitation. Puis le transfert des acides nucléiques sur une membrane de nylon chargé positivement de type XL (AMERSHAM ; Upssala) est effectué dans un tampon alcalin de NaOH (0,4 M) sur une période de deux qui dépendra de la taille des produits PCR amplifiés. Cependant, la taille des produits PCR n'excédant pas les 500 bases, le transfert est considéré comme effectué au bout de deux heures.

#### **3.b) Marquage des sondes radioactives.**

Le marquage des sondes double brin est réalisé par la technique d'amorçage aléatoire à l'aide du kit « Ready Prime Labelling Kit » (Amersham) selon le protocole fourni. La matrice d'ADN (2,5-25 ng) est dénaturée pendant cinq minutes à 100°C puis immédiatement placé dans la glace. Le mélange d'hexanucléotides, du fragment de Klenow de l'ADN polymérase d'*E. Coli* et de dATP, dTTP, dGTP sont ajoutés à la matrice. La synthèse du brin complémentaire radioactif sera réalisée à 37°C pendant 30 minutes par l'ajout de 50 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham). La sonde radioactive est ensuite purifiée des nucléotides non incorporés par filtration à travers une colonne de Sephadex G-50 (ProbeQuant™ G-50, Amersham). La quantité de radioactivité est déterminée sur un échantillon de 1 µl de sonde mélangé à 2 ml de liquide à scintillation (Lumaflo) à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Tri CARB 2000CA).

#### **3.c) Hybridation et lavages de la membrane.**

Les hybridations sont réalisées dans un four à hybridation dans lequel les membranes sont incubées pendant 4 heures dans une solution de préhybridation [SSC 5X, Denhardt 5X, SDS 0,5 % (m/v), 100 ng/ml d'ADN de sperme de Saumon] puis environ 16 h à 65°C avec la sonde radioactive préalablement dénaturée pendant 5 minutes à 100°C. Les membranes sont lavées 2 fois 10 minutes dans une solution SSC 2X, SDS 0,1% (m/v), une fois 20 minutes à 65°C dans une solution SSC 1X, SDS 0,1% (m/v) puis 2 fois dix minutes à 65°C dans une solution de SSC 0,5X, SDS 0,1% (m/v). Enfin, les membranes sont enveloppées dans un film plastique de type SARAN avant la révélation et disposées à température ambiante dans un endroit sec.

#### **3.d) Révélation.**

Toutes les membranes sont soumises à des écrans adaptés à la révélation par un Phospho-Imager (Biorad, Ivry sur Seine). Les temps d'expositions dépendant du niveau d'expression des gènes étudiés varient de 30 minutes à 16 heures.

## **C) Caractérisation *in vitro* de VvMybCs1 et VvMybCs2.**

Les manipulations concernant la production de protéines recombinantes correspondent l'ensemble des protocoles fournis avec le kit QIA-Expressionist Type IV (QIAGEN).

### **1) Expression des protéines.**

#### **1.a) Transformation des bactéries compétentes M15 par choc thermique.**

Cent cinquante  $\mu\text{l}$  de cellules thermo-compétentes sont mis respectivement en présence de cent nanogrammes de plasmides pQE30-VvMybCs1 et pQE30-VvMybCs2 purifiés. Après co-incubation dans la glace pendant 30 minutes, le mélange réactionnel est transféré dans un bain-marie à 42°C pendant 1 minute et trente secondes et de nouveau placé dans la glace pendant 2 minutes. Après ajout de milieu de culture Psi Broth (Annexe 3), l'ensemble est incubé pendant 90 minutes sous agitation (140 rpm) à 37°C. Des aliquotes de 50, 100 et 200  $\mu\text{l}$  de bactéries transformées sont étalées sur milieu LB solide sélectif contenant de la kanamycine (30 mg/l) et de l'ampicilline (100 mg/l) pendant 16 heures à 37°C.

#### **1.b) Conditions de culture.**

Une pré-culture de bactéries M15 transformées est mise à incuber dans 10 ml de deux types de milieu (LB et du Psibroth) contenant de l'ampicilline (100 mg/l) et de la kanamycine (25 mg/ml) à différentes températures (37, 21°C) pendant une nuit sous agitation (140rpm). Les 10 ml sontensemencés de nouveau avec deux cents ml de milieu frais contenant les mêmes antibiotiques de sélection sous une forte agitation dans les mêmes conditions de températures (200 rpm) jusqu'à obtenir une densité optique à 600 nm de 0,6. L'induction de l'expression est réalisée par l'addition d'IPTG. 1 ml de culture, avant l'addition de l'IPTG, pour chaque condition est prélevé en tant que contrôle. La culture est maintenue à 21 °C sous agitation (140 rpm) pendant 4 heures. Après 1, 2, et 4 heures d'incubation, 2 ml de suspension bactérienne, pour chaque condition, sont prélevés et sédimentés par centrifugation (4000 g, 20 minutes) avant d'être congelés à - 20°C.

### **2) Extraction des protéines.**

#### **2.a) Minipréparation de protéines totales en conditions dénaturantes.**

Après une centrifugation rapide (15000 g, 1 minute), le culot bactérien, correspondant à 2 ml de suspension bactérienne induite, est suspendu dans 200  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse B (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris-HCl, 8M Urée, pH = 8). Le lysat est vortexé pour faire éclater les cellules et les protéines, puis de nouveau centrifugé 10 minutes à 15000 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est alors mis en présence de 50  $\mu\text{l}$  de résine Ni-NTA (Nickel-acide nitrilotriacétique, QIAGEN) à 50% (v/v) sous agitation douce pendant trente minutes à 4°C. Après un cycle de centrifugation (15000 g, 10 secondes), 10  $\mu\text{l}$  du surnageant sont prélevés et la résine est lavée deux fois avec 250  $\mu\text{l}$  de Tampon C (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris-HCl, 8M Urée, pH = 6,8). Les protéines sont finalement éluées à trois reprises avec 25  $\mu\text{l}$  de tampon d'éluion (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH = 8). L'imidazole présent dans le tampon d'éluion va favoriser le décrochage des protéines fixées à la résine car il présente une très grande affinité pour les ions nickel et rentre donc en compétition avec les protéines qui interagissent avec ces ions  $\text{Ni}^{2+}$ .

## **2.b) Minipréparation de protéines totales en conditions natives.**

Pour chaque condition de culture, après une centrifugation rapide (15000 g, 1 minutes) de 2 ml de suspension bactérienne induite, le culot bactérien est suspendu dans 100 µl de tampon de lyse pH= 8,0 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole). La lyse des bactéries est aussi favorisée par une série de deux congélations/ décongélations dans l'azote liquide des aliquotes. Afin de compléter ce traitement, les suspensions bactériennes sont mises en présence d'une solution de lysozyme à 1 mg/ml pendant 30 minutes à 4°C afin de détruire le reste de paroi bactérienne. Après centrifugation (15000 g, 10 minutes), le surnageant est mis à incuber en présence de 20 µl de résine Ni-NTA à 50% sous agitation douce à 4°C pendant 30 minutes. L'ensemble est de nouveau centrifugé, et 10 µl sont écartés. La résine est alors lavée à trois reprises avec 100 µl du tampon de lavage (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH = 8). L'élution est réalisée à trois reprises avec 20 µl de tampon d'élution B (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH = 8).

## **2.c) Préparation de l'extrait protéique en conditions natives.**

Pour les essais de retard sur gel, 1 litre de culture bactérienne a été préparé. Après sédimentation des bactéries (4000 g, 20 minutes, 4°C), les tubes contenant les culots sont immergés pendant 30 secondes dans de l'azote liquide, puis décongelés dans la glace pendant 15 minutes. Le culot est suspendu dans 2 à 5 ml du tampon de lyse pH = 8 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole) par gramme de bactéries induites. Après incubation dans une solution de lysozyme à 1mg/ml pendant 30 minutes dans la glace, la culture bactérienne est soumise à une sonication à 4°C pendant 3 minutes à intervalle régulier (1 pulsation d'une seconde toutes les trois secondes). Le lysat est sédimenté par centrifugation (10000 g, 30 minutes, 4°C), et le surnageant et le culot sont conservés séparément à -80°C.

## **2.d) Purification par chromatographie d'affinité.**

Des essais de purification des protéines recombinantes ont été réalisés à partir d'extraits protéiques bactériens par passage sur des colonnes de résine d'agarose couplées à un complexe Nickel-acide nitrilotriacétique (Ni-NTA). 1 ml de la solution de résine est mis à incuber sous une forte agitation (200 rpm) avec 4 ml d'extrait protéique total à 4°C pendant une heure et demie. L'ensemble est déposé sur la colonne fournie par le Kit QIAGEN. La colonne est lavée deux fois par 10 ml de tampon de lyse, puis deux fois par un tampon de lavage pH = 8 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole) afin d'éliminer des protéines pouvant avoir une affinité relative avec les ions nickel de la résine. Les protéines d'intérêt sont finalement décrochées par passage à travers la colonne de 2 ml d'un tampon d'élution pH = 8 (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 250mM imidazole, pH=8) à forte concentration d'imidazole qui possède une forte affinité avec les ions nickel, facilitant ainsi le décrochage des protéines étiquetées.

## 2.e) Dosage des protéines.

Les protéines de l'extrait brut d'*Escherichia coli* sur-exprimant les deux protéines d'intérêts sont dosées par la méthode de Bradford (1976). Elle repose sur la fixation non covalente d'un colorant sur les protéines, le bleu de Coomassie. A pH acide, la forme anionique de ce colorant se fixe préférentiellement aux protéines par des interactions électrostatiques avec les groupements cationiques des acides aminés, principalement de l'arginine, de la lysine mais aussi de l'histidine. Le complexe ainsi formé absorbe dans une gamme de longueurs d'onde dont le maximum se situe à 595 nm. La BSA (Albumine de sérum bovin) (Sigma) est utilisée comme standard.

## 2.f) Dessalage et concentration des protéines.

Les protéines éluées issues, soit l'extrait brut soit de l'extrait purifié sur colonne Ni-NTA, sont dans un premier temps dessalées par passage sur colonne P10 Sephadex G50 (AMERSHAM, SUEDE) saturée avec de l'eau distillée. Après dosage spectrophotométrique, la solution dessalée peut être concentrée si nécessaire sur des colonnes Centricon C-10 (Amicon) dont le niveau d'exclusion est de 10 kDalton par centrifugation à 5000 g à 4°C jusqu'à obtention de la concentration appropriée. Afin d'éviter toute dégradation des protéines, un cocktail d'inhibiteurs de protéases spécifiques aux bactéries (Sigma) est ajouté selon les recommandations du fournisseur.

## 3) Analyse par électrophorèse des protéines bactériennes.

Le polyacrylamide est un polymère réticulé d'unité monomérique acrylamide. En présence de radicaux libres, le persulfate d'ammonium (PSA) stabilisé par le TEMED, une réaction en chaîne est initiée dans laquelle les monomères d'acrylamide sont polymérisés en une longue chaîne. Quand un agent bifonctionnel, le méthylène bisacrylamide est inclus lors de la réaction de polymérisation, la chaîne se réticule pour former un gel dont la porosité est déterminée par la taille des chaînes (concentration en monomères) et le degré de réticulation (la concentration en bisacrylamide).

### 3.a) Séparation des protéines par électrophorèse monodimensionnelle.

Le système d'électrophorèse discontinue décrit par Laemmli (1970) a été utilisé. En présence de SDS, un détergent anionique, les protéines acquièrent une charge électrique négative proportionnelle au nombre de molécule de SDS fixées, leur charge étant alors négligeable. Dans ces conditions, les protéines se déplacent dans un champ électrique vers l'anode. Le gel est constitué de deux parties différentes par leur concentration en acrylamide et leur pH :

Gel de concentration : acrylamide 5% (m/v), bisacrylamide 0,13% (m/v), Tris-HCl 125 mM pH=6,8, SDS 0,1% (m/v) puis les deux catalyseurs PSA (persulfate d'ammonium) 0,5% (m/v) et TEMED 0,05% (v/v).

Gel de séparation : acrylamide 12%, bisacrylamide 0,32% (m/v), Tris-HCl 375 mM pH=8,8, SDS 0,1% (m/v), PSA 0,5% (m/v) et TEMED 0,05% (m/v).

Les extraits protéiques (30 µg) sont dilués dans le tampon de charge (Tris-HCl 225mM pH=6,8, glycérol 50% (v/v), SDS 5% (m/v), bleu de bromophénol 0,05% (m/v) et β-mercaptoéthanol 10 mM) et dénaturés pendant 5 minutes à 100°C. Les échantillons sont déposés sur un gel de 8 X 6 cm d'une épaisseur de 0,75 mm. La migration se déroule dans un tampon d'électrophorèse (Tris 25mM, glycine 192 mM et SDS 0,1% (m/v)) pendant 1 heure à 50 mA à température ambiante.

### **3.b) Révélation des protéines.**

Après électrophorèse en condition dénaturante, les bandes protéiques sont révélées et fixées par immersion du gel dans une solution de coloration [éthanol 45%, acide acétique 10%, bleu de Coomassie R250 (Sigma) 0,25% (m/v)]. Le gel est ensuite décoloré sous agitation douce jusqu'à obtention du meilleur contraste dans une solution et d'éthanol à 30% et d'acide acétique à 5%.

### **3.c) Electrotransfert des protéines.**

Après électrophorèse en condition dénaturante, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de type PROTRAN (pores = 0,25  $\mu\text{m}$  ; Schleicher et Schuell) préalablement incubée dans le tampon de transfert (25mM Tris pH=7,4 192 mM glycine, 0,1% SDS, méthanol 20%). L'électrotransfert est effectué pendant 20 minutes à 50mA à l'aide du système Trans-blot cell (Biorad). La membrane est ensuite colorée dans une solution de Rouge Ponceau (Rouge Ponceau 0,1% (m/v), acide acétique 1% (v/v)) afin de vérifier l'uniformité et la qualité du transfert. La membrane est ensuite décolorée à l'eau distillée avant de réaliser l'immunodétection.

### **3.d) Immunodétection des protéines.**

Dans un premier temps, la membrane est d'abord incubée pendant une heure trente minutes à température ambiante sous agitation dans une solution de blocage contenant un tampon PBS (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) supplémenté par 3% de lait en poudre (m/v) pour saturer les sites de liaison non spécifiques de la membrane. La membrane saturée est incubée à nouveau dans une nouvelle solution de blocage à laquelle on rajoute l'anticorps primaire anti-Histidine de souris (Euromedex) à une dilution de 1/500 pendant une heure à température ambiante. Puis, la membrane est lavée trois fois 10 minutes dans du tampon PBS et une fois dans du TBS (20 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH=7,5).

Une deuxième incubation d'une heure à température ambiante est réalisée avec l'anticorps secondaire anti-souris conjugué à la phosphatase alcaline (Sigma) dilué au 1/10000 dans une solution de TBS contenant 3% de lait en poudre. Après trois lavages de 10 minutes dans une solution de TBS, la membrane est prête à être révélée. Après incubation dans un tampon de révélation ( Tris-HCl 50 mM, NaCl 50mM et  $\text{MgCl}_2$  25mM, pH = 9,5), la membrane est mise en présence de 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) 50 $\mu\text{g/ml}$  et de nitrobleu tétrazolium (NBT) 75 $\mu\text{g/ml}$  qui vont servir de substrats chromogènes à la phosphatase alcaline. La coloration est initiée au bout de quelques minutes à l'obscurité à 37°C par le clivage d'un groupement phosphate du BCIP par la phosphatase alcaline. Cette réaction libère un proton provoquant ainsi la réduction du NBT qui se traduit par la formation d'un précipité pourpre insoluble.

#### **4) Le retard sur gel ou EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay).**

L'EMSA est utilisée pour valider l'interaction sur l'ADN de protéines. La fixation des protéines régulatrices sur les fragments d'ADN radiomarqués va diminuer la mobilité de ces sondes et donc provoquer un retard dans la migration de ces derniers sur un gel de polyacrylamide non dénaturant. Les essais sont réalisés en utilisant comme sondes des oligonucléotides contenant des séquences cis régulatrices connues pour interagir avec les facteurs de transcription de type MYB .

Le protocole peut être divisé en six étapes :

- L'hybridation des simples brins d'oligonucléotides
- Le marquage au  $\gamma^{32}\text{P}$  des oligonucléotides contenant le site d'interaction particulier des protéines régulatrices
- La préparation du gel de polyacrylamide non dénaturant
- Les réactions de liaison
- L'électrophorèse
- La révélation du retard par autoradiographie.

#### **4.a) Synthèse et marquage d'oligonucléotides double-brins.**

Afin de produire une sonde double-brin nécessaire à l'interaction ADN/ facteur de transcription, deux oligonucléotides (100 ng/ $\mu\text{l}$ ) (en sens et en antisens) sont mélangés dans un tube Eppendorf en présence d'un tampon d'hybridation (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH=8) et incubés à 95°C pendant deux minutes. Puis, l'hybridation s'effectue par un retour progressif à la température ambiante (45-60 minutes). Une fois l'hybridation terminée, les fragments double brins sont isolés sur gel et purifiés à l'aide du kit QIAEX II afin d'obtenir une matrice d'ADN double brin reprise dans de l'eau Dnase free. Pour une longue conservation, il est conseillé de lyophiliser les échantillons et de les conserver à -20°C en présence d'un agent dessiccateur (Silicagel ; Prolabo).

Le marquage des oligonucléotides est réalisé par l'intermédiaire du kit 5' End Labelling kit (AMERSHAM, Uppsala). La polynucléotide kinase T4 catalyse le transfert d'un groupement phosphate radioactif en position  $\gamma$  d'un ribonucléoside 5'triphosphate donneur à un groupe 5' hydroxyl de l'oligonucléotide. Entre cinq et dix picomoles d'oligonucléotides double-brins sont mis en présence d'un tampon de phosphorylation 10X, de 5  $\mu\text{l}$  de [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP (5000 Ci/mmol, 10mCi/ml) et de 10 unités de T4 polynucléotide kinase à 37°C pendant 30 minutes. Après inactivation de l'enzyme à 70°C pendant 10 minutes, les oligonucléotides marqués sont précipités dans 2,5 volumes d'éthanol absolu en présence de 1,5 M acétate d'ammonium à -20°C pendant une heure. Après centrifugation (15000 g, 30 minutes), le surnageant contenant du [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP non fixé est écarté et le culot invisible est lavé à l'éthanol 70% puis séché à l'étuve. Le culot est mis en suspension dans dix  $\mu\text{l}$  d'eau Dnase free et conservé à -20°C.

#### **4.b) Détermination du taux d'incorporation.**

Le comptage de la scintillation en milieu liquide est la méthode la plus utilisée pour mesurer le taux de radioactivité incorporé dans un échantillon. À 1 $\mu\text{l}$  d'oligonucléotide marqué est homogénéisé avec 3 ml de liquide à scintillation (Kodak). Puis, la radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation (Tri CARB 2000CA, Packard), La solution de scintillation contient une substance émettant une lumière quand elle absorbe les produits de désintégration radioactive.

L'appareil mesure donc l'intensité émise correspondant directement à la décroissance radioactive de l'échantillon, exprimée en nombre de coups par minute (cpm). La concentration des différents échantillons est donc ajustée à 20000 cpm/ $\mu$ l.

#### **4.c) Réaction de liaison à l'ADN.**

Chaque réaction est réalisée dans un volume final de 20 $\mu$ l comprenant 5 $\mu$ l d'un tampon d'hybridation 5X (50 mM Tris-HCl pH = 8, 250 mM NaCl, glycérol 20% (v/v), 2,5 mM DTT, 8 mM spermidine, 2,5 mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ g/ml BSA). 2  $\mu$ l d'un compétiteur aspécifique poly dI-dC à 1  $\mu$ g/ $\mu$ l (Sigma) est rajouté à la réaction. 10 à 20  $\mu$ g d'extrait brut non purifié sur colonne Ni-NTA ont été utilisés pour les réactions. 2,5  $\mu$ l (50000 cpm) de sonde radiomarquée sont ajoutés en fin de manipulation et le mélange est complété à 20 $\mu$ l par de l'eau désionisée autoclavée. Pour les essais de compétition, de l'ADN cible non marqué est rajouté en excès molaire (50 x, 100 x et 200 x). L'ADN compétiteur est rajouté en premier, puis au bout de vingt minutes, l'ADN marqué est rajouté. Après incubation à 4°C pendant une demi-heure, le mélange réactionnel est ensuite prêt à être déposé sur un gel de polyacrylamide à 4,5% non dénaturant.

#### **4.d) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant.**

La dimension des gels étant de 150mm sur 120mm, et l'épaisseur du gel étant de 1,5 mm, une solution de 40ml par gel est préparée avec un mélange d'acrylamide/bisacrylamide à 4,5% (acrylamide/bisacrylamide en proportion 37/1 à 40%) (Euromedex), du TBE 0,5X (45 mM de Tris-Borate pH 8,0, 2mM EDTA), du glycérol 2,5 % (m/v), de l'APS 0,1 % (m/v). Cette solution est filtrée sur une membrane dont le diamètre de pores est de 0,22  $\mu$ m (Millipore) et 0,1 % de TEMED sont rajoutés avant de couler le gel entre les plaques de verre. Une fois le peigne déposé, la polymérisation se déroule pendant une heure à température ambiante. Une électrophorèse préliminaire de trente minutes est réalisée à 150 Volts. Une tension de 25 volts est appliquée au moment du dépôt des échantillons dans les puits afin que les complexes ADN/protéine, éventuellement instables, pénètrent immédiatement dans le gel et ne diffusent pas. L'électrophorèse est ensuite réalisée à 4°C sous une tension de 150 volts pendant 3 h.

#### **4.e) Séchage du gel et révélation.**

Le gel est transféré par capillarité sur du papier Whatman découpé aux dimensions du gel. L'autre face du gel est recouverte de couches successives de film plastique de type SARAN. Une deuxième feuille de papier Whatman est déposée sur la première pour augmenter la vitesse de séchage. Le gel est séché par un gel Dryer (Fischer) sous vide pendant 3 heures à 70°C. Une fois, le deuxième film plastique enlevé, le gel est mis en présence d'un écran pour phospho-imager (BIORAD ; France) puis révélé jusqu'à obtention d'un bon signal.

## **D Caractérisation fonctionnelle *in vivo* de VvMybCs1 et VvMybCs2.**

### **1) La transgénèse végétale.**

#### **1.a) Transformation de disques foliaires de Tabac (*Nicotiana tabacum* Var. Xanthi).**

Pour chaque transformation, un clone indépendant d'*Agrobacterium tumefaciens*, contenant le vecteur d'expression et la séquence ADNc d'intérêt, est mis en culture dans 3 ml de milieu YEB (Annexe 3) à 28°C sur une nuit sans antibiotique, mais en présence d'un composé phénolique, l'acétosyringone à 50 µM qui active les gènes de virulence de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* (Sachel et al., 1985). Les disques foliaires sont réalisés à partir de feuilles de différents âges prélevées sur des vitroplants âgés de 6 semaines. Les feuilles sont découpées stérilement en fragments de 1 cm<sup>2</sup> à l'aide d'un scalpel stérile. Les fragments sont déposés dans des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) contenant 20 ml de milieu MS supplémenté de 0,1 mg/l d'ANA (acide  $\alpha$ -naphtaléique), de 1 mg/l de BAP (benzyl-aminopurine) et 400 µl de la pré-culture d'*Agrobacterium tumefaciens* traitée à l'acétosyringone. La co-culture se déroule sur deux jours à 25°C sous une faible luminosité.

Au bout de cette période d'incubation, la culture bactérienne est éliminée par deux rinçages successifs des disques foliaires dans une solution de MS. Les disques sont ensuite séchés entre deux feuilles de papier absorbant stérile puis transférés sur un milieu gélosé contenant du milieu MS solide additionné de kanamycine à 50 mg/l pour la sélection des cellules végétales transformées, et de timentin (acide cluvamique : acide ticarcillique, Duchefa) à 200 mg/l pour inhiber le développement résiduel d'agrobactéries, d'ANA à 0,1 mg/l et de BAP à 1 mg/l pour induire la formation et la croissance de cals. Les disques foliaires sont laissés sur ce même milieu durant quinze jours, sous une photopériode de 16 heures de luminosité à 25°C et 8 heures à l'obscurité à 21°C. Lorsque des cals commencent à apparaître, les disques foliaires sont transférés sur un milieu de même composition pour 15 jours supplémentaires. Après avoir atteint un développement assez conséquent, les cals sont transférés sur un milieu gélosé MS additionné de BAP à 2 mg/l afin de favoriser le développement de tiges feuillées.

Dès que les tiges feuillées sont bien développées, chaque vitroplant issu de calstransformé 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 par prélèvement de l'apex ou d'un entrenœud. La transformation génétique des vitroplants est vérifiée par PCR.

#### **1.b) Transformation d'inflorescences d'*Arabidopsis thaliana*.**

La transformation d'*Arabidopsis* s'effectue selon la méthode décrite par Clough et Bent (1998), par mise en contact des inflorescences de la plante avec la souche LB4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* transformées. La culture d'*Agrobacterium tumefaciens* est réalisée par inoculation au 1/70<sup>ème</sup> d'une préculture de 48 h dans 300 mL de milieu LB supplémenté en kanamycine (50 mg/l) et en rifampicine (25 mg/l). Après incubation sous agitation durant une nuit à 28°C, la pré-culture est centrifugée à 1000 g, 4°C pendant 10 minutes. Le culot bactérien est repris dans une solution contenant 5 % de saccharose (m/v) et

d'un agent mouillant, le Silwett L77, à 0,02 % (v/v). Le volume est ajusté de façon à ce que la  $DO_{600nm}$  de la suspension bactérienne soit à 0,1 d'unité de DO.

Les inflorescences de plantes d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 4-5 semaines sont ensuite mises en contact avec cette solution pendant 30 secondes. Les plantes sont placées à l'obscurité pendant 24 h sous une forte hygrométrie, puis transférées en conditions normales de croissance. Les graines récoltées sont stérilisées et placées sur un milieu MS solide contenant de la kanamycine (100 mg/l). Les plantules résistantes sont alors repiquées dans des pots individuels dans du terreau contenant de la vermiculite et du sable, puis placées en serre jusqu'à l'obtention de graines.

### **1.c) Transformation de cellules de Vigne (41B Root stock).**

Deux clones d'*Agrobacterium tumefaciens* de la souche EHA 105 transformés pour *VvMybCs1* et *VvMybCs2* sont mis en culture dans 3 ml de YEB pH = 7,2 en présence de 25 mg/l de rifampicine et de 50 mg/l de kanamycine à 28°C pendant 24 heures sous agitation (140 rpm). Trois cent µl de pré-culture sont remis ensuite en culture dans 25 ml de milieu YEB pH= 7,2 avec les mêmes antibiotiques à 28°C sous agitation pendant 24 heures. La suspension bactérienne est ensuite sédimentée pendant 15 minutes à 500 g.

Le culot est repris dans un même volume de YEB supplémenté d'acétosyringone 100µM et mis sous agitation à 28°C pendant au moins deux heures. Puis les bactéries sont sédimentées par une nouvelle centrifugation et resuspendues dans 20 ml de milieu GM+ (Annexe 2) puis conservées dans la glace. La turbidité de la suspension bactérienne est ajustée par l'ajout de milieu GM+ (Annexe 3) de façon à obtenir une densité optique à 600 nm comprise entre 0,1- 0,15 unité de DO. Un volume correspondant à 500 µl de cellules embryogènes est alors déposé au fond d'un erlen stérile auquel on rajoute 10 ml de suspension bactérienne ajusté. L'ensemble est mis sous agitation pendant 10 minutes à 28°C. Puis le milieu est aspiré et les cellules sont déposées sur un fond de boîte de Pétri contenant un milieu GM+ gélosé pendant 48 heures à 26°C à l'obscurité. Les cellules sont alors récupérées et lavées en présence de 10 ml de GMO, puis sont réparties sur deux erlens contenant 25 ml de GM+ supplémenté de 2,5 mg/l de paromomycine et de 200 mg/l de timentin.

Afin d'obtenir des clones, 50 µl de cellules de suspension cellulaire sont mis en présence de 50 ml de GMO supplémenté par 2,5 mg/l de paromomycine et 200 mg/l de timentin. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 7 jours jusqu'à visualisation des embryons qui seront transférés sur un milieu gélosé Mac Cown (Duchefa) spécifique aux ligneux en présence de paromomycine (2,5 mg/l) et de timentin (200 mg/l). Une fois bien développé avec la présence de plusieurs feuilles et entrenoeuds, le clone est transféré sur milieu Mac Cown (Duchefa en présence des marqueurs sélectifs (paromomycine et timentin, aux mêmes concentrations que précédemment), de saccharose (30 g/l), d'ANA (0,2 mg/l) pour l'induction des racines et de charbon actif à raison de 2,5 g/l pour le géotropisme des racines.

## **2) Analyse transcriptionnelle des transformants.**

### **2.a) Mini-préparation d'ADN génomique.**

L'extraction d'ADN génomique des plants de Tabac et d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisée en utilisant le kit d'extraction DNAEasy plant miniKit (QIAGEN) et en respectant les recommandations du fournisseur.

### **2.b) Extraction des ARNs de Tabac et d'*Arabidopsis thaliana*.**

#### **2.b.1) Extraction des ARN totaux de feuilles de tabacs.**

L'extraction des ARN totaux de feuilles de tabacs a été réalisée en utilisant le kit d'extraction RNA Easy plant Minikit (QIAGEN) et en respectant les recommandations du fournisseur.

#### **2.b.2) Extraction des ARN totaux des fleurs de tabac.**

Les fleurs de tabac contenant une forte concentration de composés phénoliques, les protocoles classiques ne nous ont pas permis d'obtenir des ARNs de bonne qualité. Par conséquent, nous avons opté pour le protocole modifié de Verwoerd et *al.* (1989) appliqué aux feuilles de tabac, mais qui s'avère avoir un bon rendement en ce qui concerne les fleurs de tabacs et qui produit des ARN de qualité. 100 mg de poudre de fleur de tabacs sont incubés pendant trente secondes dans 500µl d'un tampon d'extraction maintenu à 80°C [0,1 M de LiCl, 100 mM de Tris-HCl pH=8, 10 mM d'EDTA, 1% de SDS (m/v) - phénol (1/1)].

Le mélange est homogénéisé par agitation vigoureuse pendant trente secondes et 0,5 volume d'un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique (24 :1) sont ajoutés et mélangés par vortex pendant une minute. Après centrifugation (12000 g, 5 minutes), la phase aqueuse est prélevée et mélangée avec un volume de chlorure de lithium 4 M. Après incubation à -20°C pendant une heure, les ARNs précipités sont sédimentés par centrifugation (12000 g, 4°C, 30 minutes). Une fois le surnageant écarté, le culot est resuspendu dans 250 µl d'eau DEPC et les ARNs sont de nouveau précipités de manière sélective avec 2 volumes d'éthanol et 0,1 volume d'Acétate de Sodium 3 M pendant deux heures à -20°C. Après centrifugation (12000 g, 4°C, 30 minutes), les culots sont lavés avec de l'éthanol 70% puis séchés au SpeedVac. Environ 50 µg d'ARN totaux sont obtenus à partir de 100 mg de poudre.

### **2.c) Dénaturation et résolution sur gel dénaturant des ARN totaux.**

Entre 15 et 20 µg d'ARNs sont séparés par migration sur gel d'agarose 1,5% en conditions dénaturantes dans du tampon composé de 0,7 % de formaldéhyde, 20 mM d'HEPES pH = 7,5, 1 mM d'EDTA. Les ARNs sont séchés sous vide (Speed Vac ; Bioblock). Les ARNs resuspendus dans 40 µl de tampon de solubilisation (20 µl de formamide, 7µl de formaldéhyde (37%), 4 µl de tampon de migration, 9 µl d'eau stérile) puis sont ensuite dénaturés à 65°C pendant 10 minutes et immédiatement mis dans la glace avant dépôt sur gel. Les ARNs dénaturés sont chargés sur le gel après addition de 8 µl de tampon de charge (glycérol 50%, 1mM EDTA, Bleu de Bromophénol 0,2%, Xylène Cyanol 0,2%) et 0,5 µl de BET (10mg/ml). Le formamide présent dans le tampon de dénaturation permet de maintenir la linéarité des ARNs, dont les structures secondaires ont été ouvertes par le formaldéhyde. L'électrophorèse est réalisée à 110 volts pendant 4 à 5 heures.

## **2.c) Transfert sur membrane de nylon chargée.**

Juste avant l'étape du transfert, le gel est visualisé à l'UV-imager (BIORAD) pour vérifier la quantité d'ARN chargé dans chaque puit. Le gel est rincé 4 fois 10 minutes dans de l'eau DEPC afin d'éliminer le formaldéhyde présent dans le gel et il est saturé dans le tampon de transfert SSPE 20 X (3M NaCl, 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 10mM EDTA pH=7,5) pendant 45 minutes avant d'être déposé sur un papier Watman assurant le pont salin entre le tampon et le gel. La membrane de nylon (Hybond XL, Amersham) est placée sur le gel et un dispositif absorbant, comprenant du papier Whatmann et du papier sopalin, permet de créer un flux passif de tampon SSPE qui traverse le gel puis la membrane. Ainsi, au bout de 16 heures, les ARNs sont transférés sur la membrane de nylon par capillarité et fixés à la membrane par liaison électrostatique. Ils seront fixés de façon covalente par émission d'UV administrée par un Stratalinker (1000 µJ/cm<sup>2</sup> de membrane) (Stratagen, Inc.).

## **2.e) Hybridation et lavages des ARNttx transférés.**

Les hybridations sont réalisées dans un four à hybridation. Les membranes sont incubées pendant au moins quatre heures à 42°C dans une solution de préhybridation (SSPE 5X, Denhardt 5X, formamide 50% (v/v), SDS 0,5%, ARNt de Levure 100 µg/ml) puis environ 16 heures à 42°C avec la sonde radioactive préalablement dénaturée 5 minutes à 100°C. Les membranes sont lavées 1 fois à température ambiante dans une solution de SSPE 2X, SDS 0,1% (m/v) pendant 15 minutes, puis dans une solution à 65°C pendant 20 minutes de SSPE 1X, SDS 0,1% (m/v) et finalement dans une solution à 65°C pendant 20 minutes de SSPE 0,5X, SDS 0,1% (m/v). Si cela est nécessaire, un dernier lavage dans une solution de SSPE 0,2X, SDS 0,1% (m/v) peut être réalisé. Les conditions d'exposition de la membrane sont identiques à celles utilisées pour les membranes issues des transferts des produits PCR de rétrotranscrits.

## **3) Analyse de l'abondance relative des transcrits chez les tabacs transgéniques.**

Les différentes étapes (traitement des ARNs à la Dnase, réaction de RT-PCR, transfert des produits PCR, hybridation et révélation de la membrane) ont été menées de la même manière que pour l'étude d'expression de *VvMybCs1* et *VvMybCs2* dans la baie de raisin (voir partie B, chapitre 3.b)

## **4) Analyse phénotypique des transformants.**

### **4.a) Analyse structurale des tissus conducteurs chez le Tabac.**

#### **4.a.1) Caractérisation des vaisseaux lignifiés.**

Des coupes transversales d'environ 100 µm d'épaisseur sont réalisées sur des tiges et des pétioles de vitro-plants de même âge (45 jours) ou sur des plants placés en serre. Montées entre lame et lamelles en présence d'eau, les coupes sont exposées sous lumière Ultra-violette ( $\lambda = Xnm$ ). La révélation se fait par émission d'une fluorescence des composés ligneux des tissus conducteurs lignines, proportionnelle à la quantité de lignine présente

#### **4.a.2) Tests de coloration chimique de coupes transversales de tabac.**

##### ***4.a.2.a) Coloration par une solution de phloroglucinol-HCl.***

Le même style de coupes que précédemment est réalisé pour des tests de coloration chimique des lignines. Une goutte de solution d'éthanol à 95% avec 0,1% (m/v) de phloroglucinol est ajoutée sur les coupes. Après incubation pendant 3 minutes, une goutte d'une solution d'HCl concentrée (12 N) est rajoutée sur les sections. Au bout de trente secondes, la solution acide est écartée par 3 lavages successifs avec de l'eau distillée pendant 1 minute. Les coupes sont montées sur lamelles et observées au microscope optique (Zeiss Axiophot) pour estimer la coloration des faisceaux libéro-ligneux des nervures.

##### ***4.a.2.b) Coloration par le réactif de Maïle.***

Après retrait de l'eau distillée, les lames sont traitées contenant 0,5% (m/v) de  $\text{KMnO}_3$  pendant dix minutes. Une fois rincées avec de l'eau distillée, les sections sont traitées pendant cinq minutes avec de l'HCl à 10% (v/v). Après incubation, les sections sont lavées à deux reprises avec de l'eau distillée et sont montées en présence d'hydroxyde d'ammonium fortement concentré.

#### **4.b) Analyse histologique et cytologique de la fleur de Tabac des transformants.**

Deux types matériel ont été fixés:

- des anthères de Tabac de stade 10 d'après Koltunow et al., 1990
- des inflorescences de tabacs de différents stades ( 0,5 à 3mm).
- 

##### **4.b.1) Les anthères de Tabac.**

###### ***4.b.1.a) L'étape de fixation et de déshydratation.***

Le matériel végétal est plongé dans le fixateur à 4°C pendant 2 heures (glutaraldéhyde à 2,5 %, 0,3 M saccharose, 0,1M de tampon phosphate  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH = 7,2) et soumis à un dégazage doux à l'aide d'une pompe à vide, afin d'extraire l'air présente dans les espaces intercellulaires et ainsi favoriser la pénétration du fixateur dans les cellules. Les objets sont ensuite rincés dans le même tampon phosphate trois fois dix minutes à température ambiante. La post-fixation se fait pendant 2 heures à 4°C dans une solution de tétroxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ) à 1% dans le même tampon phosphate. Les objets sont ensuite rincés dans de l'eau distillée.

La présence d'eau altérant la phase d'inclusion ultérieure, il est indispensable de déshydrater les échantillons. La déshydratation est réalisée à température ambiante par passages successifs des échantillons dans des bains d'éthanol de concentration croissante (30,50,70 et 90%) pendant 10 minutes chacun, puis dans trois bains de 15 minutes dans de l'éthanol à 100%. Les objets sont ensuite mis dans de l'éthanol à 100% à 4°C pendant une nuit.

###### ***4.b.1.b) L'imprégnation des coupes en résine epoxy.***

L'imprégnation à température ambiante débute par le remplacement progressif de l'éthanol contenu dans les objets par l'oxyde de propylène, un solvant miscible à l'Epon et très volatile, qui sera éliminé au cours de la phase d'imprégnation dans la résine pure. Deux bains dans l'éthanol 100 %/oxyde de propylène (1/1, v/v) sont réalisés pendant 10 minutes puis sont suivis par deux bains de 10 minutes d'oxyde de propylène pur. Les objets sont ensuite infiltrés par un mélange d'oxyde de propylène et de résine epoxy Epon conservée le maximum de temps à 4°C (1/1, v/v) dans des tubes Eppendorf de 500 µl fermés pendant 1 à 2

heures. Les tubes sont ensuite ouverts sous hotte aspirante afin de libérer l'oxyde de propylène. La résine epoxy (Epon 812) est constituée d'une résine de base : l'épikote 812 (Fluka), de deux anhydrides : le DDSA (anhydride dodécényl succinique, Fluka) et le MNA (anhydride méthyl nadique, Fluka), et d'un accélérateur de polymérisation, le DMP30 (2,4,6-tris (diméthylamiométhylphénol, Fluka). L'Epon est préparé extemporanément à partir d'un mélange en quantités égales (m/m) de deux solutions-mères : solution A (épikote 812 :77 g ; DDSA :100 g) et une solution B (épikote 812 :124 g ; MNA :100 g), auquel est rajouté 1,5% (m/m) de DMP30.

#### ***4.b.1.c) La confection des coupes.***

Les blocs de résine sont sectionnés (microtome Ultracut 2040 Reichert) à l'aide de couteaux de verre triangulaires. Les coupes de 1,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont colorées au bleu de toluidine (0,5 % (m/v) dans du borax 1% (m/v) pH = 8,8). Elles sont ensuite observées au microscope optique (Zeiss Axiophot) pour estimer le niveau de lignification des assises cellulaires constituant l'anthère de tabac. Les blocs choisis sont retaillés sur les zones d'intérêt. Une trentaine de coupes sur différents blocs d'une même lignée sont analysées afin d'estimer la reproductibilité des résultats. L'expérience est répétée sur deux autres lignées.

#### **4.b.2) Les boutons floraux de tabacs.**

##### ***4.b.2.a) Traitement du matériel : lame et lamelles.***

Les lames de verre sont dégraissées dans un mélange alcool/éther (1 :1), trempées dans une solution 2% (v/v) APES (SIGMA) dans l'acétone, puis dans une solution d'acétone et enfin rincées 2 fois dans de l'eau DEPC. Les lames sont séchées pendant une nuit dans une étuve à 60°C.

##### ***4.b.2.b) Fixation et traitement du matériel biologique.***

Les solutions de fixation et celles qui sont nécessaires au traitement des coupes à l'exception des solutions d'alcool, d'histosol Plus (CML) et de paraffine (Paraplastplus, Sigma) sont préparées extemporanément. Le matériel végétal est plongé dans une solution de fixateur FAA (formaldéhyde 4%(m/v) , éthanol 50%(v/v), acide acétique 5% (v/v). La fixation se déroule à température ambiante pendant 4 heures. La solution est renouvelée toutes les heures et à chaque fois le matériel est soumis au vide pendant 15 minutes afin d'éliminer toutes traces d'air susceptible d'altérer la fixation. Les étapes qui se déroulent jusqu'à l'inclusion sont réalisées à l'aide d'un automate Citadel 1000 (Shandon) . L'étape de déshydratation se déroule dans des bains d'alcool de concentration croissante de 50 à 100%, suivie par l'étape d'imprégnation par un solvant de la paraffine (Histosol plus) et finalement par la paraffine selon le protocole décrit par Gabe (1968). Les blocs de paraffine sont réalisés à l'aide d'un appareil à inclusion (Shandon), débités en rubans de 8  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un microtome (Shandon) et déposés sur des lames de verres préalablement traitées. Les préparations sont ensuite séchées dans une étuve à 45°C pendant une journée.

##### ***4.b.2.c) Déparaffinage et réhydratation des coupes.***

Les lames sont tout d'abord déparaffinées par 3 bains successifs d'Histosol plus pendant 10 minutes, puis rincées dans deux bains d'alcool absolu pendant 10 minutes. Les opérations de réhydratation sont réalisées dans des bains d'alcool successif à 95, 70, 50 et 30% d' 1 minute chacun. Les lames sont ensuite placées dans trois bains successifs de PBS 1X pendant 5 minutes à chaque fois, et finalement dans un bain de SSPE 2X pendant 10 minutes.

#### **4.b.2.d) Marquage à la digoxygénine des sondes ARN sens et antisens.**

La synthèse des sondes ARN en sens et en antisens est réalisée à l'aide des polymérases des bactériophages T7 et SP6 dont les promoteurs sont présents de part et d'autre du multisite de clonage du vecteur pGEM-T Easy (vecteur de clonage des fragments NtGlobosa et NtAgamous). Ces vecteurs sont préalablement linéarisés à l'aide d'enzymes de restriction adéquate. La linéarisation par SacI permet la synthèse des transcrits sens (contrôle de l'expérimentation) à partir du promoteur T7 et la linéarisation par SphI permet la synthèse des transcrits antisens à partir du promoteur SP6. Les plasmides linéarisés sont purifiés sur gel à l'aide du kit Gel extraction kit (QIAGEN). Pour éliminer toutes traces de Rnases, les plasmides sont purifiés par une extraction au phénol/chloroforme/IAA (25 :24 :1) puis suivie d'une extraction au chloroforme/IAA (24 :1). Les échantillons sont précipités finalement dans 2,5 volumes d'éthanol absolu en présence de 0,3 M Na Acétate pH = 5,2 pendant deux heures à - 20°C. Les culots sont alors repris dans 20 µl d'eau traitée au DEPC.

Le marquage des sondes est réalisé dans un mélange réactionnel de 20 µl composé de 1 µg d'ADN plasmidique linéarisé, d'un tampon 10X (400mM Tris-HCl pH=8, 60mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM DTT, 20mM Spermidine), d'ATP, CTP, GTP (1mM chacun), d'UTP 0,65mM, de DIG-11-UTP 0,35mM, de 20 U d'inhibiteur de Rnase et de 40 U de RNA polymerase correspondante. L'incubation est effectuée dans un thermocycleur (BIORAD, USA) pendant 5 heures à 37°C. Les ADN plasmidiques résiduels sont éliminés par un traitement à la Dnase (40 U) à 37 °C pendant 30 minutes supplémentaires. La réaction est stoppée par l'addition de 40 mM d'EDTA pH=8. Les ARN néo-synthétisés sont précipités en présence de 0,35M de LiCl et de 3 volumes d'éthanol absolu pendant deux heures à -80°C, puis finalement lavés dans de l'éthanol à 70% et séchés sous vide. Le culot est par la suite repris dans 20 µl d'eau traitée au DEPC. Les concentrations en ARNs sont ensuite évaluées par comparaison à une gamme étalon d'ARN témoin.

#### **4.b.2.e) Préhybridation et hybridation.**

Une solution de préhybridation (formamide 50%(v/v), SSPE 4X, Dextran sulfate 10% (m/v), Denhardt 1X, ARNt de Levure 250 µg/mL, ADN de sperme de Saumon soniqué 250 µg/mL) est déposée sur les coupes à raison de 150 µl par lame. La préhybridation se déroule à température ambiante pendant une heure dans une chambre humide. Les préparations sont ensuite rincées dans un bain SSPE 2X. Cent µl de la solution de préhybridation contenant 50ng de sonde marquée sont déposés sur chaque lame. Les lames sont recouvertes d'une lamelle siliconée puis placée dans un incubateur (modèle SM30, Merck Eurolab) à 45°C en atmosphère humide pendant une nuit.

#### **4.b.2.f) Lavages et détection immunologique.**

Afin d'éliminer l'excès de sonde ARN non hybridé, les lames sont rincées 4 fois pendant 15 minutes dans une solution de SSPE 2X, puis 1 fois pendant 30 minutes dans un bain de SSPE 1X. L'ARN fixé de manière aspécifique sur les préparations est écarté par des lavages de stringence variée consistant à réduire la concentration en SSPE et à augmenter la température durant trente minutes. Les conditions optimales sont déterminées expérimentalement. Pour la sonde Nt-Glo, une température de 70°C et une concentration de 0,1 SSPE est choisie ; pour la sonde Nt-AGA, une température de 65°C et une concentration de 0,5 SSPE est définie. Les lames sont ensuite soumises à un dernier lavage dans du SSPE 0,5X à température ambiante. La détection immunologique à l'aide de l'anticorps anti-digoxygénine (Roche Biochemical) nécessite des traitements préalables des lames. Elles sont immergées deux fois 5 minutes dans un tampon A (100 mM Tris-HCl pH= 7,5, 150 mM NaCl) à température ambiante et une fois 30 minutes dans une solution de BSA [Triton X-100

0,3% (v/v), BSA 2% (m/v)] préparée dans un tampon A, à température ambiante. 150µL de la solution d'anticorps diluée au 1/500 dans du tampon BSA sont déposés sur chaque lame. L'incubation dure une nuit à 4°C. L'excès d'anticorps est éliminé dans deux bains successifs de 15 minutes dans 200ml de tampon A suivis de deux rinçages de 5 minutes en tampon B (100mM Tris-HCl pH= 9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>), à température ambiante sous agitation douce. 150 µl d'une solution de NBT/BCIP (Roche Biochemical) respectivement à 450 µg/ml et 175 µg/ml diluée dans un tampon B sont déposés sur les coupes et placées à l'obscurité. La réaction de coloration, se traduisant par l'apparition d'une coloration rouge violet, est arrêtée par rinçage dans un bain d'eau distillée. Les lames sont mises à sécher une nuit à température ambiante et les préparations sont recouvertes d'une lamelle montée à l'aide d'une solution d'Entellan (Merck).

## **E Identification d'une séquence promotrice des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2*.**

### **1) Extraction d'ADN génomique à partir de feuilles de Vigne.**

Du fait de la présence de composés phénoliques et des polysaccharides, l'extraction d'ADN génomique s'avère délicate avec les protocoles habituels. Le protocole proposé correspond à celui de Reisch (1994) modifié et basé sur la méthode d'extraction au CTAB (Sambrook et *al.*, 1989) modifié par l'utilisation de NaCl afin d'écarter les polysaccharides et de PVP pour éliminer les polyphénols durant les étapes de purification. 0,5 g de feuilles est broyé grossièrement afin de ne pas altérer l'ADN à l'aide d'un mortier en présence d'azote liquide. Après addition de 6ml d'un tampon d'extraction [20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH = 8, 1.4 M NaCl, 0,2% de β-mercaptoethanol et 2.0% (m/v) de CTAB (CetylTrimethylAmmonium Bromide)] dans le mortier, l'extrait est transvasé dans un tube à centrifuger. 100mg/g de feuilles de polyvinylpyrrolidone (PVP) sont rajoutés à l'extrait et homogénéisés par plusieurs inversions du tube.

L'ensemble est incubé à 60°C dans un bain thermostaté pendant 25 minutes. Après avoir laissé refroidir à température ambiante, 6 ml de chloroforme :alcool isoamylique (24 :1) sont ajoutés et mélangés par inversion délicate jusqu'à apparition d'une émulsion. L'homogénat est centrifugé (4500 g, 15 minutes, TA) et la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube. Une deuxième extraction chloroforme :alcool isoamylique est réalisée si la phase aqueuse est opaque.

Les acides nucléiques sont précipités par ajout de 2 volumes d'éthanol absolu froid (-20°C) en présence de 0,5 volume de 5M NaCl à 4°C pendant une heure jusqu'à apparition des brins d'ADN. Après centrifugation (4500 g, 10 minutes, 4°C), le surnageant est éliminé et le culot contenant les acides nucléiques est lavé avec de l'éthanol à 70% puis séché dans une étuve (37°C, 30 minutes) afin d'éliminer toute trace d'éthanol. Le culot est ensuite suspendu dans 300 µl de TE (50mM Tris-Hcl pH = 8, 10mM EDTA). La suspension d'acides nucléiques est traitée à la Rnase A (Euromedex) (20µg/ml) à 37°C pendant 20 minutes puis déprotéinisée par deux extractions successives au phénol : chloroforme :alcool isoamylique (25 :24 :1) et au chloroforme:alcool isoamylique (24 :1). Après centrifugation (5000 g, 15 minutes), l'ADN présent dans la phase aqueuse est précipité en présence de 0,6 volume d'isopropanol froid puis récupéré extemporanément par centrifugation (7500 g, 10 minutes,

4°C). Une fois lavé avec une solution d'éthanol à 70 %, le culot est séché sous vide et resuspendu dans 300 µl de TE pH=7,5 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA).

## 2) Principe de la PCR inverse.

Le principe de la PCR (Annexe 6) inverse est de convertir une région nucléotidique, dont la séquence inconnue est flanquante à une région connue, en un fragment interne. Cette conversion est obtenue par digestion sélective pour obtenir un fragment dit de jonction qui va contenir à la fois d'une portion d'ADN connue et d'une région de séquence inconnue. La ligation de ce fragment en un monomère circulaire d'ADN et la synthèse d'oligonucléotides « divergents » conduiront par une PCR classique à l'obtention d'un signal d'amplification dans lequel un fragment interne inconnu sera amplifié.

## 3) Réaction de circularisation plasmidique par ligation.

Dans le cadre de l'identification des promoteurs des gènes *VvMybCs1* et *VvMybCs2*, un travail de PCR inverse a été entrepris qui nécessitait une réaction ligation permettant la circularisation de fragments digérés d'ADN génomique. Une bonne réaction de ligation à partir de fragments d'ADN génomique est la condition sine qua none à la circularisation de ces mêmes fragments et par conséquent augmente les chances d'obtenir un signal d'amplification après la réaction de PCR qui s'ensuit.

Les bases théoriques de la circularisation de l'ADN impliquent un facteur  $\alpha$  qui correspond à la concentration effective d'une molécule d'ADN qui présente une configuration spatiale de façon à ce que les deux extrémités soient considérées comme proche (Dugaiczyk et al., 1975 ; Collins et al., 1984). Ce facteur est à la fois dépendant de la taille  $l$  du fragment mais aussi de l'état d'enroulement de la molécule d'ADN  $b$  et dont la formule est  $\alpha = (3/2\pi l \cdot b)^{3/2}$  extrémités/ml. Des études antérieures ont permis de simplifier la formule originelle afin de ne dépendre que de la taille du fragment digéré en kilobases:  $\alpha = 63,4/kb^{1/2}$  µg/ml.

Si  $\beta$  est la concentration totale de fragments d'ADN présent dans l'extrait, alors la formation d'ADN circulaire peut être exprimé en pourcentage de circularisation dont la formule est  $\alpha/(\alpha+\beta) = 100$ . Donc si  $\beta > \alpha$ , la formation de multimère est favorisée.

Dans le cas contraire, les formes circulaires monomériques sont favorisées. Dans les conditions de ligation pour la PCR inverse, les valeurs  $\beta$  devront être au moins 10 fois inférieure à celle de  $\alpha$ . Dans ce cas précis, la fraction d'ADN circulaire formé sera de plus de 90%. À titre d'exemple, pour favoriser la circularisation d'un fragment de 800 bases, la concentration finale  $\beta$  ne devra pas dépasser 7ng/µl. La réaction de ligation est ensuite déprotéinisée par deux extractions successives de phénol/chloroforme (v/v) et l'ADN est précipité dans 2,5 volumes d'une solution d'éthanol absolu en présence de 0,3 M d'acétate de sodium à -20°C pendant 3 heures.

Après centrifugation à 13000 g pendant 25 minutes à 4°C, le culot est lavé en présence d'une solution d'éthanol à 70% puis séché sous vide (SpeedVac ; Bioblock) après élimination de l'éthanol. Le culot est resuspendu dans 30 µl d'eau distillée.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K.** (1997). Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9**, 1859-1868.
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**, 63-78.
- Abrahams, S., Lee, E., Walker, A.R., Tanner, G.J., Larkin, P.J., and Ashton, A.R.** (2003). The *Arabidopsis* *TDS4* gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *Plant J.* **35**, 624-636.
- Affi, M., El-Kereamy, A., Legrand, V., Chervin, C., Monje, M.C., Nepveu, F., and Roustan, J.P.** (2003). Control of anthocyanin biosynthesis pathway gene expression by eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, in grape cell tissue cultures. *J. Plant Physiol.* **160**, 971-975.
- Agarwal, C., Singh, R.P., and Agarwal, R.** (2002). Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU 145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. *Carcinogenesis* **23**, 1869-1876.
- Aharoni, A., De Vos, C.H., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J.N., and O'Connell, A.P.** (2001). The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J.* **28**, 319-332.
- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P., and Kay, S.A.** (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science* **293**, 880-883.
- Alfenito, M.R., Souer, E., Goodman, C.D., Buell, R., Mol, J., Koes, R., and Walbot, V.** (1998). Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathion *S* transferases. *Plant Cell* **10**, 1135-1149.
- Alleweldt, G., and Koch, R.** (1977). Ethylene content in ripening grape berries. *Vitis* **16**, 263-271.
- Almeida, J., Carpenter, R., Robbins, T.P., Martin, C., and Coen, E.S.** (1989). Genetic interactions underlying flower color patterns in *Antirrhinum majus*. *Genes Dev.* **3**, 1758-1767.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J.** (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Amedeo, P., Habu, Y., Afsar, K., Scheid, O.M., and Paszkowski, J.** (2000). Disruption of the plant gene MOM releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature* **405**, 203-206.
- Amrani Joutei, K., Glories, Y., and Mercier, M.** (1994). Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis* **33**, 133-138.
- Asif, M.H., Dhawan, P., and Nath, P.** (2000). A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Mol Biol Rep* **18**, 109-115.
- Atanassova, R., Leterrier, M., Gaillard, C., Agasse, A., Sagot, E., Coutos-Thevenot, P., and Delrot, S.** (2003). Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiol.* **131**, 326-334.
- Aukerman, M.J., Schmidt, R.J., Burr, B., and Burr, F.A.** (1991). An arginine to lysine substitution in the bZIP domain of an opaque-2 mutant in maize abolishes specific DNA binding. *Genes Dev.* **5**, 310-320.

- Avila, J., Nieto, C., Canas, L., Benito, M.J., and Paz-Ares, J.** (1993). *Petunia hybrida* genes related to the maize regulatory C1 gene and to animal myb proto-oncogenes. *Plant J.* **3**, 553-562.
- 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.
- B.G., C., and Hale, C.R.** (1973). The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiol.* **51**, 629-634.
- Bagchi, D., Sen, C.K., Ray, S.D., Das, D.K., Bagchi, M., Preuss, H.G., and Vinson, J.A.** (2003). Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Research*, 523-524; 587-597.
- Balasubramanian, S., and Schneitz, K.** (2002). NOZZLE links proximal-distal and adaxial-abaxial pattern formation during ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **129**, 4291-4300.
- Baranowskij, N., Froberg, C., Prat, S., and Willmitzer, L.** (1994). A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *Embo J.* **13**, 5383-5392.
- Barzaghi, N., Gatti, G., Crema, F., and Perucca, E.** (1991). Protective effect of cyanidin (IdB1027) against aspirin-induced fall in gastric transmucosal potential difference in normal subjects. *It. J. Gastr.* **23**, 249-252.
- Beld, M., Martin, C., Huits, H., Stuitje, A.R., and Gerats, A.G.** (1989). Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Mol. Biol.* **13**, 491-502.
- Benharbit El Amani, N.** (1995). Recherche sur le développement normal et anormal du gynécée de *Vitis vinifera* L. du bouton floral à la fleur fécondée. Importance des tanins vacuolaires et relation avec la coulure (Bordeaux II), pp. 126.
- Bergqvist, J., Dokoozlian, N., and Ebisuda, N.** (2001). Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *Am. J. Enol. Vit.* **52**, 1-7.
- Bernard, A.C.** (1977). Observation histologiques sur les baies de *Vitis vinifera* au cours de leur croissance. *France Viticole* **5, 6, 7**.
- Bessis, R., and Fournioux, J.C.** (1992). Zone d'abscission et coulure de la vigne. *Vitis* **31**, 9-21.
- Bevan, M.W.** (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acid Res.* **12**, 22.
- Birboim, H.C., and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res.* **7**, 1513-1523.
- Blaney, W.M., and Simmonds, M.S.J.** (1983). Electrophysiological activity in Insects in response to Antifeedants. In COPR report Project 9; Overseas Development Organisation (Londres, Grande Bretagne).
- Blanke, M.M., and Leyhe, A.** (1987). Stomatal activity of the grape berry cv. Riesling, Müller, Thurgau and Ehrenfelser. *J. Plant Physiol.* **127**, 451-460.
- Bohm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., and Kroke, A.** (1998). [Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases]. *Z Ernährungswiss* **37**, 147-163.

- Bombardelli, E., and Morazonni, P.** (1995). *Vitis Vinifera*. *Fitoterapia* **66**, 291-317.
- Bordoli, L., Netsch, M., Luthi, U., Lutz, W., and Eckner, R.** (2001). Plant orthologs of p300/CBP: conservation of a core domain in metazoan p300/CBP acetyltransferase-related proteins. *Nucl. Acids Res* **29**, 589-597.
- Bordoli, L., Husser, S., Luthi, U., Netsch, M., Osmani, H., and Eckner, R.** (2001). Functional analysis of the p300 acetyltransferase domain: the PHD finger of p300 but not of CBP is dispensable for enzymatic activity. *Nucl. Acids Res.* **29**, 4462-4471.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383-2394.
- Bors, W., Michel, C., and Saran, M.** (1994). Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods Enzymol.* **234**, 420-429.
- Boss, P.K., Davies, C., and Robinson, S.P.** (1996a). Analysis of the Expression of Anthocyanin Pathway Genes in Developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz Grape Berries and the Implications for Pathway Regulation. *Plant Physiol.* **111**, 1059-1066.
- Boss, P.K., Davies, C., and Robinson, S.P.** (1996b). Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol Biol.* **32**, 565-569.
- Bottril, D.E., and Hawker, J.S.** (1970). Chlorophylls and their derivatives during drying of Sultana grapes. *J. Sci. and Food Agric.* **21**, 193-196.
- Bovy, A., de Vos, R., Kemper, M., Schijlen, E., Almenar Pertejo, M., Muir, S., Collins, G., Robinson, S., Verhoeven, M., Hughes, S., Santos-Buelga, C., and van Tunen, A.** (2002). High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes LC and C1. *Plant Cell* **14**, 2509-2526.
- 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.
- Britsch, L., Heller, W., and Grisebach, H.** (1981). Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Z. Naturforsch* **36C**, 742-750.
- Britsch, L., Ruhnau-Brich, B., and Forkmann, G.** (1992). Molecular cloning, sequence analysis, and *in vitro* expression of flavanone 3 hydroxylase from *Petunia hybrida*. *J. Biol. Chem.* **267**, 5380-5387.
- Broquedis, M.** (1987). L'acide abscissique et l'abscissate de  $\beta$  D glucopyranose dans le développement des baies de raisin, la germination des pépins et la formation des racines sur les boutures de Vigne. In *Ampélogie et oenologie* (Bordeaux I), pp. 225.
- Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., and Rice-Evans, C.A.** (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* **330**, 1173-1178.
- Bub, A., Watzl, B., Heeb, D., Rechkemmer, G., and Briviba, K.** (2001). Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *Eur. J. Nutr.* **40**, 113-120.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M.T., and Dobberstein, B.** (1987). A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol* **155**, 416-433.
- Burns, J., Gardner, P.T., O'Neil, J., Crawford, S., Morecroft, I., McPhail, D.B., Lister, C., Matthews, D., MacLean, M.R., Lean, M.E., Duthie, G.G., and Crozier, A.** (2000). Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *J Agric. Food Chem.* **48**, 220-230.

- Byrne, M.E., Simorowski, J., and Martienssen, R.A.** (2002). ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 1957-1965.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R.A.** (2000). Asymmetric Leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**, 967-971.
- Cao, X., and Jacobsen, S.E.** (2002). Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.* **12**, 1138-1144.
- Cao, X., and Jacobsen, S.E.** (2002). Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **99 Suppl 4**, 16491-16498.
- Cao, G., Muccitelli, H.U., Sanchez-Moreno, C., and Prior, R.L.** (2001). Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 920-926.
- Carbonneau, A., and Ollat, N.** (1993). Etude de la coulure et maîtrise de la production. *PAV* **110**, 331-340.
- Carey, M.** (1998). The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* **92**, 5-8.
- Cedroni, M.L., Cronn, R.C., Adams, K.L., Wilkins, T.A., and Wendel, J.F.** (2003). Evolution and expression of MYB genes in diploid and polyploid cotton. *Plant Mol. Biol.* **51**, 313-325.
- Chakravarthy, S., Tuori, R.P., D'Ascenzo, M.D., Fobert, P.R., Despres, C., and Martin, G.B.** (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.
- Champagnol, F.** (1986). L'acidité des moûts et des vins. facteurs physicochimiques et technologiques de variation. *Revue française de l'oenologie* **104**, 26-57.
- Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J.** (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11**, 113-116.
- Chattopadhyay, S., Ang, L.H., Puente, P., Deng, X.W., and Wei, N.** (1998). Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell* **10**, 673-683.
- Cheong, Y.H., Moon, B.C., Kim, J.K., Kim, C.Y., Kim, M.C., Kim, I.H., Park, C.Y., Kim, J.C., Park, B.O., Koo, S.C., Yoon, H.W., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y., and Cho, M.J.** (2003). BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol.* **132**, 1961-1972.
- Christiansen, H., Hansen, A.C., Vijn, I., Pallisgaard, N., Larsen, K., Yang, W.C., Bisseling, T., Marcker, K.A., and Jensen, E.O.** (1996). A novel type of DNA-binding protein interacts with a conserved sequence in an early nodulin ENOD12 promoter. *Plant Mol. Biol.* **32**, 809-821.
- Ciceri, P., Gianazza, E., Lazzari, B., Lippoli, G., Genga, A., Hoschek, G., Schmidt, R.J., and Viotti, A.** (1997). Phosphorylation of Opaque 2 changes diurnally and impacts its DNA binding activity. *Plant Cell* **9**, 97-108.
- Cichewicz, R.H., Kouzi, S.A., and Hamann, M.T.** (2000). Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.* **63**, 29-33.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.

- Coe, E.H., Jr.** (1985). Phenotypes in corn: Control of pathways by alleles, time and place. In *Plant Genetics* (Plant Genetics UCLA), pp. 509-521.
- Coe, E.H., Hoisington, D.A., and Neuffer, M.G.** (1988). The genetics of corn. In *Corn and corn improvement*, S.G.F.a.D. J., ed (Madison, WI: American Society of Agronomy), pp. 81-258.
- Coffman, J.A., Kirchhamer, C.V., Harrington, M.G., and Davidson, E.H.** (1997). SpMyb functions as an intramodular repressor to regulate spatial expression of CyIIIa in sea urchin embryos. *Development* **124**, 4717-4727.
- Collins, F.S., and Weissman, S.M.** (1984). Directional cloning of DNA fragments at a large distance from initial probe: a circularization method. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 6812-6816.
- Cone, K.C., Burr, F.A., and Burr, B.** (1986). Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 9631-9635.
- Cone, K.C., Cocciolone, S.M., Moehlenkamp, C.A., Weber, T., Drummond, B.J., Tagliani, L.A., Bowen, B.A., and Perrot, G.H.** (1993). Role of the regulatory gene *pl* in the photocontrol of maize anthocyanin pigmentation. *Plant Cell* **5**, 1807-1816.
- Conner, J., and Liu, Z.** (2000). *LEUNIG*, a putative transcriptional corepressor that regulates *AGAMOUS* expression during flower development. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 12902-12907.
- Coombe, B.G.** (1976). The development of fleshy fruits. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* **27**, 507-528.
- Coombe, B.G.** (1976). Abscisic acid and sugar accumulation in the grape berry. *Substances*, Ed. (Lausanne).
- Coombe, B.G.** (1987). Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. *Am. J. Enol. Vit.* **38**, 120-127.
- Coombe, B.G.** (1992). Research on development of the grape berry. *Am. J. Vit.* **43**, 101-110.
- Coombe, B.G., and McCarthy, M.G.** (1997). Identification and naming of the inception of aroma development in ripening grape berries. *Aust. J. of Grape and Wine Res.* **3**, 18-20.
- Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R., and Boulay, M.** (2001). *In vitro* tolérance to *Botrytis cinerea* of graine 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, L.L., and Coffe, M.** (1988). Phytoalexin production potential of grape berries. *Journal of American Society of Horticultural Science* **113**, 230-234.
- Cristoni, A., Malandrino, S., and Magistretti, M.J.** (1989). Effect of a natural flavonoid on gastric mucosal barrier. *Arzneimittelforschung* **39**, 590-592.
- Curl, A.L.** (1964). The carotenoids of several low-carotenoids fruits. *J. F. Sci.* **24**, 241-245.
- Darné, G., and Bouard, J.** (1988). Les anthocyanes des feuilles de différentes variétés de *Vitis vinifera* L. entre la véraison des raisins et la chute des feuilles. *Vitis* **27**, 71-78.
- Davies, C., and Robinson, S.P.** (1996). Sugar accumulation in grape berries. Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues. *Plant Physiol.* **111**, 275-283.
- de Freitas, V.A.P., and Glories, Y.** (1999). Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skins of white *Vitis vinifera* varieties. *J. Sci. Food Agri.* **79**, 1601-1606.

- de Freitas, V.A.P., Glories, Y., and Monique, A.** (2000). Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis Vinifera* varieties and their composition in reselective wines. *Am. J. Eno. Vit.* **51**, 397-403.
- de Vetten, N.C., and Ferl, R.J.** (1995). Characterization of a maize G-box binding factor that is induced by hypoxia. *Plant J.* **7**, 589-601.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M., and Lepiniec, L.** (2003). Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell* **15**, 2514-2531.
- Delrot, S.** (2000). Sèves et conductions chez les Végétaux. *Pour la Science, Numéro Spécial* **1536**, 28-33.
- Derck, W., and Creasy, L.L.** (1989). The significance of stilbene phytoalexins in the *plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Phys. Mol. Plant. Bio.* **34**, 189-202.
- Devic, M., Guillemot, J., Debeaujon, I., Bechtold, N., Bensaude, E., Koornneef, M., Pelletier, G., and Delseny, M.** (1999). The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant J.* **19**, 387-398.
- Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J.M., Jacquard, A., Kilby, N.J., and Murray, J.A.** (2003). Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**, 79-92.
- Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C., and Dangl, J.L.** (1997). A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* *LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* **88**, 685-694.
- Dixon, R.A., and Paiva, N.L.** (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085-1097.
- Dooner, H.K.** (1983). Coordinate genetic regulation of flavonoid biosynthetic enzymes in maize. *Mol. Genes Gen.* **200**, 240-246.
- Dooner, H.K., and Robbins, T.P.** (1991). Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Ann. Rev. of Gen.* **25**, 173-199.
- Douillet-Breuil.** (1999). Change in the phytoalexin content of various *Vitis* Spp. in response to ultraviolet C elicitation. *J. Agricul. Chem.* **47**, 4456-4461.
- Downey, M.O., Harvey, J.S., and Robinson, S.P.** (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. of Grape and Wine Res.* **9**, 15-27.
- Downey, M.O., Harvey, J.S., and Robinson, S.P.** (2003). Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of shiraz and chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. of Grape and Wine Res.* **9**, 110-121.
- Dröge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W.P., Halkier, B.A., Loake, G.J., Doerner, P., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (1997). Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *EMBO J.* **16**, 726-738.
- Dugaiczyk, A., Boyer, H.W., and Goodman, H.M.** (1975). Ligation of EcoRI endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* **96**, 171-184.
- Dunlap, J.C.** (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271-290.
- Duprey, S.P., and Boettiger, D.** (1985). Developmental regulation of c-myb in normal myeloid progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 6937-6941.

- Esau, K.** (1965). Plant Anatomy. (New-York).
- Escribano-Bailon, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C., and Santos-Buelga, C.** (1995). Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **200**, 221-224.
- Ferroni, F., Maccaglia, A., Pietraforte, D., Turco, L., and Minetti, M.** (2004). Phenolic Antioxidants and the Protection of Low Density Lipoprotein from Peroxynitrite-Mediated Oxidations at Physiologic CO (2). *J Agricul Food Chem.* **52**, 2866-2874.
- Fillion, L.** (1997). Aspects physiologiques, cytologiques et moléculaires des flux de glucides au cours de la maturation de la baie de raisin (*Vitis vinifera* L.). *Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées (Poitiers: Université de Poitiers)*, pp. 140.
- Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S., Coutos-Thevenot, P., Lemoine, R., Romieu, C., and Delrot, S.** (1999). Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiol.* **120**, 1083-1094.
- Finkelstein, R.R., and Gibson, S.I.** (2002). ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr. Opin. Plant. Biol.* **5**, 26-32.
- Ford, C.M., Boss, P.K., and Hoj, P.B.** (1998). Cloning and characterisation of *Vitis vinifera* UDP-Glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *Bronze-1* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins in vitro. *J. Biol. Chem.* **273**, 9224-9233.
- Forkmann, G., and Stotz, G.** (1981). Genetic control of flavanone 3-hydroxylase activity and flavonoid 3'-hydroxylase activity in *Antirrhinum majus* (Snapdragon). *Z. Naturforsch* **36C**, 411-416.
- Formica, J.V., and Regelson, W.** (1995). Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 1061-1080.
- Fougère-Rifot, M., Delavaux, J.J., Benharbit-El Alami, N., Bouard, J., and Brun, O.** (1993). Importance of vacuolar tannins in grapevine for the development of ovaries and ovules. *Vitis* **32**, 127-136.
- Francis, N.J., Saurin, A.J., Shao, Z., and Kingston, R.E.** (2001). Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Mol. Cell.* **8**, 545-556.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., and Kinsella, J.E.** (1993). Inhibition of Human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* **341**, 1103-1104.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., and Teissedre, P.L.** (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *J. Agricul. Food Chem.* **43**, 890-894.
- Franken, P., Niesbach-Klosgen, U., Weydemann, U., Marechal-Drouard, L., Saedler, H., and Wienand, U.** (1991). The duplicated chalcone synthase genes « C2 and Whp (white pollen) » of *Zea mays* are independently regulated; evidence for translational control of Whp expression by the anthocyanin intensifying gene. *Embo J.* **10**, 2605-2612.
- Franz, P.F., and Hans de Jong, J.** (2002). Chromatin dynamics in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 560-567.
- Fujita, H., Takemura, M., Tani, E., Nemoto, K., Yokota, A., and Kohchi, T.** (2003). An Arabidopsis MADS-box protein, AGL24, is specifically bound to and phosphorylated by meristematic receptor-like kinase (MRLK). *Plant Cell Physiol.* **44**, 735-742.
- Fuleki, T., and Ricardo da Silva, J.M.** (1997). Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *J Agricul. Food Chem.* **45**, 1156-1160.

- Furhman, B., Lavy, A., and Aviram, M.** (1996). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 549-554.
- Gabe, M.** (1968). *Techniques histologiques.* (Paris: Masson et Cie).
- Galway, M.E., Masucci, J.D., Lloyd, A.M., Walbot, V., Davis, R.W., and Schiefelbein, J.W.** (1994). The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Dev. Biol.* **166**, 740-754.
- Gee, J.M., Susan DuPont, M., Day, A.J., Plumb, G.W., Williamson, G., and Johnson, I.T.** (2000). Intestinal Transport of quercetin Glycosides in Rtas involves both Deglycosylation and Interaction with the Hexose Transport Pathway. *J. Nutr.* **130**, 2765-2771.
- Geffers, R., Sell, S., Cerff, R., and Hehl, R.** (2001). The TATA box and a Myb binding site are essential for anaerobic expression of a maize GapC4 minimal promoter in tobacco. *Biochim. Biophys. Acta* **1521**, 120-125.
- German, J.B., and Walzem, R.L.** (2000). The health benefits of wine. *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 561-593.
- Glassgen, W.E., Rose, A., Madlung, J., Koch, W., Gleitz, J., and Seitz, H.U.** (1998). Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. *Planta* **204**, 490-498.
- Glories, Y.** (1988). *Anthocyanins and tannins from wine: organoleptic properties.* (New-York: Liss Inc.).
- Glover, B.J., Perez-Rodriguez, M., and Martin, C.** (1998). Development of several epidermal cell types can be specified by the same MYB-related plant transcription factor. *Development* **125**, 3497-3508.
- Goff, S.A., Cone, K.C., and Fromm, M.E.** (1991). Identification of functional domains in the maize transcriptional activator C1: comparison of wild-type and dominant inhibitor proteins. *Genes Dev.* **5**, 298-309.
- Goff, S.A., Cone, K.C., and Chandler, V.L.** (1992). Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev.* **6**, 864-875.
- Goff, S.A., Cone, K.C., and Chandler, V.L.** (1992). Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev.* **6**, 864-875.
- Goldfarb, A.N., and Lewandowska, K.** (1994). Nuclear redirection of a cytoplasmic helix-loop-helix protein via heterodimerization with a nuclear localizing partner. *Exp. Cell. Res.* **214**, 481-485.
- Goodrich, J., and Tweedie, S.** (2002). Remembrance of things past: chromatin remodeling in plant development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **18**, 707-746.
- Graessle, S., Loidl, P., and Brosch, G.** (2001). Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 704-720.
- Grandbastien, M.A., Lucas, H., Morel, J.B., Mhiri, C., Vernhettes, S., and Casacubert, J.M.** (1997). The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to the plant defence responses. *Genetica* **100**, 241-252.
- Greenspan, M.D., Shackel, K.A., and Matthews, M.A.** (1994). Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits. *Plant Cell and Environment* **17**, 811-820.
- Gronbaek, M.** (1999). Type of alcohol and mortality from cardiovascular disease. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 921-924.
- Gross, J.** (1984). Chlorophyll and carotenoid pigments in grapes (*Vitis vinifera* L.). *Gartenbauwissenschaft* **49**,

180-182.

**Grotewold, E., and Peterson, T.** (1994). Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavonone isomerase. *Mol. Gen. Genet.* **242**, 1-8.

**Grotewold, E., Athma, P., and Peterson, T.** (1991). Alternatively spliced products of the maize P gene encode proteins with homology to the DNA-binding domain of myb-like transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 4587-4591.

**Grotewold, E., Drummond, B.J., Bowen, B., and Peterson, T.** (1994). The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* **76**, 543-553.

**Grotewold, E., Sainz, M.B., Tagliani, L., Hernandez, J.M., Bowen, B., and Chandler, V.L.** (2000). Identification of the residues in the Myb domain of Maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 13579-13584.

**Gubler, F., Raventos, D., Keys, M., Watts, R., Mundy, J., and Jacobsen, J.V.** (1999). Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *Plant J.* **17**, 1-9.

**Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T., and Murfett, J.** (1998). How does auxin turn on genes? *Plant Physiol.* **118**, 341-347.

**Guiltinan, M.J., and Miller, L.** (1994). Molecular characterization of the DNA-binding and dimerization domains of the bZIP transcription factor, EmBP-1. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1041-1053.

**Gupta, S., Chattopadhyay, M.K., Chatterjee, P., Ghosh, B., and SenGupta, D.N.** (1998). Expression of abscisic acid-responsive element-binding protein in salt-tolerant indica rice (*Oryza sativa* L. cv. Pokkali). *Plant Mol. Biol.* **37**, 629-637.

**Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., and Shirai, T.** (2001). Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b) pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Letters* **171**, 17-25.

**Hale, C.R., and Coombe, B.G.** (1974). Abscisic acid: an effect on the onset of ripening of grapes (*Vitis vinifera* L.). In *Mechanisms of regulation of plant growth* (Bull., Royal Soc. New Zealand), pp. 131-136.

**Hale, C.R., Coombe B.G., and Hawker, J.S.** (1970). Effects of ethylene and 2-chloroethylphosphonic acid on the ripening of grapes. *Plant Physiol.* **45**, 620-623.

**Harborne, J.B., and Williams, C.A.** (2001). Anthocyanins and others flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 310-333.

**Hardie, W.J., Aggenbach, S.J., and Jaudzems, V.G.** (1996). The plastids of the grape pericarp and their significance in isoprenoid synthesis. *Aust. J. of Grape and Wine Res.* **2**, 144-154.

**Harris, J.M., Kriedemann, P.E., and Possingham, J.V.** (1971). Grape berry respiration: effects of metabolic inhibitors. *Vitis* **9**, 291-298.

**Harter, K., Kircher, S., Frohnmeyer, H., Krenz, M., Nagy, F., and Schafer, E.** (1994a). Light-regulated modification and nuclear translocation of cytosolic G-box binding factors in parsley. *Plant Cell* **6**, 545-559.

**Harter, K., Frohnmeyer, H., Kircher, S., Kunkel, T., Muhlbauer, S., and Schafer, E.** (1994b). Light induces rapid changes of the phosphorylation pattern in the cytosol of evacuated parsley protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 5038-5042.

**Haslam, E.** (1989). *Plant Polyphenols: Vegetable tannins Revisited.* (Cambridge).

- Hedin, P.A., Jenkins, J.N., Collum, D.H., XWhite, W.H., and Parrot, W.L.** (1983). Plant resistance to Insects. (Washington D.C.: American Chemical Society).
- Heil, M., Baumann, B., Andary, C., Linsenmair, K.E., and MacKey, D.** (2002). Extraction and quantification of "condensed tannins" as a measure of plant anti-herbivore defence? Revisiting an old problem. *Naturwissenschaften* **89**, 519-524.
- Heller, W., and Forkmann, G.** (1988). Biosynthesis in the flavonoids, C.a. Hall, ed (Londres), pp. 399-425.
- Hicks, G.R., and Raikhel, N.V.** (1995). Nuclear localization signals binding proteins in higher plant nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 734-738.
- Higginson, T., Li, S.F., and Parish, R.W.** (2003). AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **35**, 177-192.
- Hilbert, G.** (2002). Effet de la nutrition azotée et du stress hydrique sur la maturation et la composition en anthocyanes des baies de *Vitis vinifera* L. au vignoble et en conditions contrôlées. (Thèse, INRA-La grande Ferrade, Villenave d'Ornon, pp. 190.
- Hill, A., Nantel, A., Rock, C.D., and Quatrano, R.S.** (1996). A conserved domain of the *viviparous-1* gene product enhances the DNA binding activity of the bZIP protein EmBP-1 and other transcription factors. *J. Biol. Chem.* **271**, 3366-3374.
- Hillis, W.E., and Yasaki, Y.** (1971). Biosynthesis of stilbene in eucalypt leaves. *Phytochemistry* **10**, 107-120.
- Hirayama, T., and Shinozaki, K.** (1996). A cdc5+ homolog of a higher plant, *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13371-13376.
- Ho, L.C.** (1996). In photassimilate distribution in plants and crops. Source Sink relation ships., E. Zamski and A.A. Shaffer, eds (New-York: Marcel Dekker Inc), pp. 709-728.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A.** (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-Plasmid. *Nature* **303**, 179-180.
- Holton, T.A., and Cornish, E.C.** (1995). Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1071-1083.
- Holton, T.A., Brugliera, F., and Tanaka, Y.** (1993). Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *Plant J.* **4**, 1003-1010.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S., and Hoekema, A.** (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transg. Res.* **2**, 208-218.
- Hopp, W., and Seitz, H.U.** (1987). The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension of *Daucus Carota*. *Planta* **170**, 74-85.
- Horn, P.J., and Peterson, C.L.** (2002). Molecular biology. Chromatin higher order folding-wrapping up transcription. *Science* **297**, 1824-1827.
- Horsch, R.B., Klee, H.J., Stachel, S., Winans, S.C., Nester, E.W., Rogers, S.G., and Frakey, R.T.** (1986). Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutant in leaf discs. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 2571-2575.
- Howe, K.M., and Watson, R.J.** (1991). Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by c-myb protein. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3913-3919.
- Hrazdina, G., and Moskowitz, A.H.** (1982). Subcellular status of anthocyanins in grape skins. In Proceedings Grape Wine Centennial Symposium (University of California, Davies: Webb A.D.).

- Hrazdina, G., Parsons, G.F., and Mattick, L.R.** (1984). Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *Am. J. Enol. Vit.* **35**, 220-227.
- Huang, H., Tudor, M., Su, T., Zhang, Y., Hu, Y., and Ma, H.** (1996). DNA binding properties of two Arabidopsis MADS domain proteins: binding consensus and dimer formation. *Plant Cell* **8**, 81-94.
- Huglin, P.** (1986). *Biologie et écologie de la vigne*. (Lausanne).
- Huits, H.S., Gerats, A.G., Kreike, M.M., Mol, J.N., and Koes, R.E.** (1994). Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*. *Plant J.* **6**, 295-310.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H., and Watanabe, A.** (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* **13**, 1891-1905.
- Jandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., and Meunier, P.** (1995a). Production of phytoalexin resveratrol by grapes as responses to botrytis attack under natural conditions. *J. of Phytopath.* **143**, 135-139.
- Jandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., and Meunier, P.** (1995b). The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to anthocyanin content in grape berry skins. *Vitis* **34**, 91-94.
- Jans, D.A., and Hubner, S.** (1996). Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol.Rev.* **76**, 651-685.
- Jin, H., and Martin, C.** (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB gene family. *Plant Mol. Biol.* **41**, 577-585.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., and Martin, C.** (2000). Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV protecting sunscreens in Arabidopsis. *Embo J.* **19**, 6150-6161.
- Johansen, D., Andersen, P.K., Jensen, M.K., Schnohr, P., and Gronbaek, M.** (2003). Nonlinear relations between alcohol intake and high-density lipoprotein cholesterol level: results from the Copenhagen City Heart Study. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **27**, 1305-1309.
- Johnson, R.R., Wagner, R.L., Verhey, S.D., and Walker-Simmons, M.K.** (2002). The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol.* **130**, 837-846.
- Johnson, C., Boden, E., Desai, M., Pascuzzi, P., and Arias, J.** (2001). *In vivo* target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *Plant J.* **28**, 237-243.
- Jona, R., and Botta, R.** (1988). Fruit set and early development in two grapevine cultivars. *Israelian Journal of Botany* **37**, 203-216.
- Kader, J.C.** (1996). Lipid-Transfer Proteins in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 627-654.
- Kahanbabaee, K., and Ree, T.V.** (2001). Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 641-649.
- Kaltenbach, M., Schroder, G., Schmelzer, E., Lutz, V., and Schroder, J.** (1999). Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plants. *Plant J.* **19**, 183-193.
- Kanellis, A.K., and Roubelakis-Angelakis, K.A.** (1993). Grape: Biochemistry of fruit ripening. In Chapman et Hall, G. Seymour, J. Taylor, and G. Tucker, eds (Londres), pp. 189-234.
- Kang, J.Y., Choi, H.I., Im, M.Y., and Kim, S.Y.** (2002). *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate

- stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* **14**, 343-357.
- Kantz, K., and Singleton, V.L.** (1990). Isolation and determination of polymeric polyphenols using sephadex LH-20 and analysis of grape tissues extracts. *Am. J. Enol. Vit.* **41**, 223-228.
- Karrer, P.** (1928). Sur les matières colorantes des fleurs. *Bull. Soc. Chim.* **4ème série**, 1041-1058.
- Kassemeyer, H.H., and Staudt, G.** (1982). Cytological investigations about the causes of shedding and limited growth of pistils in *Vitis*. *Vitis* **21**, 121-135.
- Katagiri, F., Seipel, K., and Chua, N.H.** (1992). Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcription activator. *Mol Cell. Biol.* **12**, 4809-4816.
- Katzen, A.L., Kornberg, T.B., and Bishop, J.M.** (1985). Isolation of the proto-oncogene c-myb from *D. melanogaster*. *Cell* **41**, 449-456.
- Kempin, S.A., Mandel, A., and Yanofsky, M.F.** (1993). Conversion of perianth into reproductive organs by ectopic expression of the tobacco floral homeotic gene *NAG1*. *Plant Physiol.* **103**, 1041-1046.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., and Waterhouse, A.L.** (2000a). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochem.* **55**, 77-85.
- Kennedy, J.A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E.J., and Jones, G.P.** (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agricul. Food Chem.* **49**, 5348-5355.
- Kennedy, J.A., Troup, C.J., Pilbrow, J.R., Hutton, D.R., Hewitt, D., Hunter, C.R., Ristic, R., Iland, P.G., and Jones, G.P.** (2000b). Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv Shiraz. *Aust. J. of Grape and Wine Res.* **6**, 244-254.
- Kim, C.Y., 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, M., McCormick, S., Timmermans, M., and Sinha, N.** (2003). The expression domain of PHANTASTICA determines leaflet placement in compound leaves. *Nature* **424**, 438-443.
- Kitamura, S., Shikazono, N., and Tanaka, A.** (2004). *TRANSPARENT TESTA 19* is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant J.* **37**, 104-114.
- Klein, M., Weissenböck, G., Dufaud, A., Gaillard, C., Kreuz, K., and Martinoia, E.** (1996). Different energization mechanisms drive the vacuolar uptake of a flavonoid glucoside and a herbicide glucoside. *J Biol. Chem.* **271**, 29666-29671.
- Klempnauer, K.H., Gonda, T.J., and Bishop, J.M.** (1982). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell* **31**, 453-463.
- Kliewer, V.M.** (1977). Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor grapes. *Am. J. Enol. Vit.* **28**, 96-103.
- Kliewer, V.M.** (1977). Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of emperor grape. *Am J Enol Vit* **2**, 17-26.
- Klimczak, L.J., Schindler, U., and Cashmore, A.R.** (1992). DNA-binding activity of the Arabidopsis G-boxbinding factor GFFI is stimulated by phosphorylation by casein kinase II from broccoli. *Plant Cell* **4**, 87-98.
- Knox, Y.M., Hayashi, K., Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., Shiina, R., Tsukui, A., Terahara, N., and Azuma, M.** (2001). Activity of anthocyanins from fruit extract of *Ribes nigrum* L. against influenza A and B viruses. *Acta Virol.* **45**, 209-215.
- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K., and Honda, C.** (2002). Myb-related genes of the Kyoho grape

- (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* **215**, 924-933.
- Koch, R., and Alleweldt, G.** (1978). Gas exchange of ripening grape berries. *Vitis* **17**, 30-40.
- Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M., and Golberg, R.B.** (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* **2**, 1201-1224.
- Kondo, K., Matsumoto, A., Kurata, H., Tanahashi, H., Koga, H., Amachi, T., and Itakura, H.** (1994). Inhibition of low density lipoprotein with red wine. *Lancet* **344**, 1152.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y.** (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to *cis* elements in the rice proloiferating cell nuclear gene. *Plant Cell* **9**, 1607-1609.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y.** (2003). Constitutive E2F expression in tobacco plants exhibits altered cell cycle control and morphological change in a cell type-specific manner. *Plant Physiol.* **132**, 2012-2022.
- Koussa, T., Broquedis, M., and Bouard, J.** (1993). Mise en évidence d'une relation entre les teneurs en acide abscissique des feuilles de Vigne et des baies de raisin à l'époque de la Véraison. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **27**, 263-276.
- Kreuzaler, F., and Hahlbrock, K.** (1975). Enzymic synthesis of an aromatic ring from acetate units. Partial purification and some properties of flavanone synthase from cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Eur. J. Bioch.* **56**, 205-213.
- Krisa, S., Larronde, F., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., and Mérillon, J.M.** (1999). Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures methyl jasmonate induction and <sup>13</sup>C labelling. *J. Nat. Prod.* **62**, 1688-1690.
- Kuhnau, J.** (1976). The flavonoids. A class of semi essential food components; their role in human nutrition. *World Rev. Nut. Diet.* **24**, 117-191.
- Kumar, A., Baker, S.J., Lee, C.M., and Reddy, E.P.** (2003). Molecular mechanisms associated with the regulation of apoptosis by the two alternatively spliced products of c-Myb. *Mol. Cell Biol.* **23**, 6631-6645.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Chèze, C., Deffieux, G., and Mérillon, J.M.** (1998). Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Rep.* **17**, 946-950.
- Lee, M.M., and Schiefelbein, J.** (1999). WEREWOLF, a MYB-related protein in Arabidopsis, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* **99**, 473-483.
- Leyhe, A., and Blanke, M.M.** (1989). Carbon economy of the grape inflorescence. CO<sub>2</sub> exchange of the grape inflorescence. *Vit. Enol. Sci.* **44**, 144-150.
- Li, Z., and Thomas, T.L.** (1998). PEI1, an embryo-specific zinc finger protein gene required for heart-stage embryo formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 383-398.
- Li, S.F., Santini, J.M., Nicolaou, O., and Parish, R.W.** (1996). A novel myb-related gene from Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett.* **379**, 117-121.
- Lloyd, A.M., Walbot, V., and Davis, R.W.** (1992). Arabidopsis and Nicotiana anthocyanin production activated by maize regulators R and C1. *Science* **258**, 1773-1775.
- Lodhi, M.A., Guang-Ning, Y., Weeden, N.F., and Reisch, B.I.** (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and Ampelopsis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**, 6-13.
- Lu, C.A., Ho, T.H., Ho, S.L., and Yu, S.M.** (2002). Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat

mediate sugar and hormone regulation of alpha-amylase gene expression. *Plant Cell* **14**, 1963-1980.

**Ludwig, S.R., and Wessler, S.R.** (1990). Maize R gene family: tissue specific helix-loop-helix proteins. *Cell* **62**, 849-851.

**Luger, K., Rechsteiner, T.J., Flaus, A.J., Waye, M.M., and Richmond, T.J.** (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J. Mol. Biol.* **272**, 301-311.

**Luscher, B., and Eisenman, R.N.** (1990). New light on Myc and Myb. Part II. *Myb. Genes Dev* **4**, 2235-2241.

**Lusser, A., Kolle, D., and Loidl, P.** (2001). Histone acetylation: lessons from the plant kingdom. *Trends Plant Sci.* **6**, 59-65.

**Lusser, A., Brosch, G., Loidl, A., Haas, H., and Loidl, P.** (1997). Identification of maize histone deacetylase HD2 as an acidic nucleolar phosphoprotein. *Science* **277**, 88-91.

**Lyck, R., Harmening, U., Hohfeld, I., Treuter, E., Scharf, K.D., and Nover, L.** (1997). Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two plant heat-stress transcription factors. *Planta* **202**, 117-125.

**Magaraggia, F., Solinas, G., Valle, G., Giovinazzo, G., and Coraggio, I.** (1997). Maturation and translation mechanisms involved in the expression of a myb gene of rice. *Plant Mol. Biol.* **35**, 1003-1008.

**Makhatadze, G.I., Loladze, V.V., Ermolenko, D.N., Chen, X., and Thomas, S.T.** (2003). Contribution of surface Salt Bridges to protein stability: Guidelines for protein Engineering. *J. Mol. Biol.* **327**, 1135-1148.

**Makino, S., Matsushika, A., Kojima, M., Yamashino, T., and Mizuno, T.** (2002). The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol.* **43**, 58-69.

**Manak, J.R., Mitiku, N., and Lipsick, J.S.** (2002). Mutation of the *Drosophila* homologue of the Myb protooncogene causes genomic instability. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7438-7443.

**Marquart, L.C.** (1835). The chemistry of flavonoids compounds (Pergamon Press, Oxford (1962)), pp. 278.

**Marrs, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M., and Walbot, V.** (1995). A Glutathion-S-Transferase involved in vacuolar transfer encoded by a maize gene *Bronze-2*. *Nature* **375**, 397-400.

**Martin, C., and Gerats, T.** (1993). The control of flower coloration. Dans « The molecular biology of flowering ». B. Jordan, ed (CAB international: Wallingford), pp. 219-255.

**Martin, C., and Paz-Ares, J.** (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics* **13**, 67-73.

**Martin, C., Prescott, A., Mackay, S., Bartlett, J., and Vrijlandt, E.** (1991). Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.* **1**, 37-49.

**Martinez-Garcia, J.F., Huq, E., and Quail, P.H.** (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* **288**, 859-863.

**Mas, T., Susperregui, J., Berke, B., Cheze, C., Moreau, S., Nuhrich, A., and Vercauteren, J.** (2000). DNA triplex stabilization property of natural anthocyanins. *Phytochem.* **53**, 679-687.

**Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., Liu, X.L., Connors, K., Matheis, N., Schuster, D.K., Menasco, D.J., Wagoner, W., Lightner, J., and Wagner, D.R.** (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* **15**, 1689-1703.

**Mazza, G., and Miniati, E.** (1993). Anthocyanins in fruits, vegetables and grains (Boca Raton: CRC Press).

**Mehdy, M.C., and Lamb, C.J.** (1987). Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. *Embo J.* **6**, 1527-1533.

- Meiers, S., Kemeny, M., Weyand, U., Gastpar, R., Von Angerer, E., and Marko, D.** (2001). The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the peridermal growth-factor receptor. *J. Agricol. Food Chem.* **49**, 958-962.
- Menssen, A., Höhmann, S., Martin, W., Schanle, P.S., Peterson, P.A., Saedler, H., and Gléri, A.** (1990). The En/Spm transposable element of *Zea mays* splice sites at the termini generating a novel intron from a dSpm element in the A2 gene. *Embo J.* **9**, 3051-3058.
- Mercy, I.S., Meeley, R.B., Nichols, S.E., and Olsen, O.A.** (2003). *Zea mays* ZmMybst1 cDNA, encodes a single Myb-repeat protein with the VASHAQKYF motif. *J. Exp. Bot.* **54**, 1117-1119.
- Mertz-Nielsen, A., Munck, L., Bukhave, K., and Rask-Madsen, J.** (1990). A natural flavonoid, IdB1027, increases gastric luminal release of prostaglandin E2 in healthy subjects. *Ital. J. of Gastro.* **22**, 288-290.
- Meshi, T., Moda, I., Minami, M., Okanami, M., and Iwabuchi, M.** (1998). Conserved Ser residues in the basic region of the bZIP-type transcription factor HBP-1a(17): importance in DNA binding and possible targets for phosphorylation. *Plant Mol. Biol.* **36**, 125-136.
- Meyerowitz, E.M.** (2002). Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* **295**, 1482-1485.
- Michael, W.M., Eder, P.S., and Dreyfuss, G.** (1997). The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *Embo J.* **16**, 3587-3598.
- Mikami, K., Katsura, M.A., Ito, T., and Iwabuchi, M.** (1995). Potential transcription regulatory sequences in a promoter region of the wheat basic/leucine zipper protein HBP-1b(c38) gene. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1375-1379.
- Miyata, M., Takano, H., Takahashi, K., Sasaki, Y.K., and Yamazoe, Y.** (2000). Suppression of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4,5-b) pyridine -induced DNA damage in rat colon after grapefruit juice intake. *Cancer Letters* **183**, 17-22.
- Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H.R., Carre, I.A., and Coupland, G.** (2002). LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev. Cell.* **2**, 629-641.
- Mol, J., Grotewold, E., and Koes, R.** (1998). How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Sci.* **3**, 212-217.
- Mol, J., Jenkins, G.I., Schafer, E., and Weiss, D.** (1996). Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Crit. Rev. in Plant Sci.* **15**, 525-557.
- Moriguchi, T., Kita, M., Ogawa, K., Tomono, Y., Endo, T., and Omura, M.** (2002). Flavonol synthase gene expression during citrus fruit development. *Physiol. Plant.* **114**, 251-258.
- Moyano, E., Martinez-Garcia, J.F., and Martin, C.** (1996). Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in *antirrhinum* flowers. *Plant Cell* **8**, 1519-1532.
- Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J., Jr., and Potter, S.S.** (1991). A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* **65**, 677-689.
- Mueller, L.A., and Walbot, V.** (2001). Models for vacuolar sequestration of anthocyanins. *Recent Advances in Phytochem.* **35**, 297-312.

- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**, 473-477.
- Murota, K., and Terao, J.** (2003). Antioxydative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch. of Biochem. and Biophysics* **417**, 12-17.
- Nagaoka, S., and Takano, T.** (2003). Salt tolerance-related protein STO binds to a MYB transcription factor homologue and confers salt tolerance in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **54**, 2231-2237.
- Nakayama, T., Okanami, M., Meshi, T., and Iwabuchi, M.** (1997). Dissection of the wheat transcription factor HBP-1a(17) reveals a modular structure for the activation domain. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 553-561.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., and Kingston, R.E.** (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475-487.
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M., and Lepiniec, L.** (2001). The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* **13**, 2099-2114.
- Newman, L.J., Perazza, D.E., Juda, L., and Campbell, M.M.** (2004). Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic component of the *det3* mutant phenotype. *Plant J.* **37**, 239-250.
- Ni, M., Dehesh, K., Tepperman, J.M., and Quail, P.H.** (1996). GT-2: *in vivo* transcriptional activity and definition of novel twin DNA binding domains with reciprocal target sequence selectivity. *Plant Cell* **8**, 1041-1059.
- Noda, K., Glover, B.J., Linstead, P., and Martin, C.** (1994). Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature* **369**, 661-664.
- Nomura, N., Takahashi, M., Matsui, M., Ishii, S., Date, T., Sasamoto, S., and Ishizaki, R.** (1988). Isolation of human cDNA clones of myb-related genes, A-myb and B-myb. *Nucl. Acids Res.* **16**, 11075-11089.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S., and Nishimura, Y.** (1994). Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell* **79**, 639-648.
- Okanami, M., Meshi, T., Tamai, H., and Iwabuchi, M.** (1996). HALF-1, a bZIP-type protein, interacting with the wheat transcription factor HBP-1a contains a novel transcriptional activation domain. *Genes Cells* **1**, 87-99.
- Osman, H.E., Maalej, N., Shanmuganayagam, D., and Folts, J.D.** (1998). Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys. *J. Nut.* **128**, 2307-2312.
- Park, H.S.** (1995). Le péricarpe des baies de raisin normales et millerandées: ontogenèse de la structure et évolution de quelques constituants biochimiques, notamment les tanins (Bordeaux: Université de Bordeaux II n°1434), pp. 208.
- Park, H.S., Fougère-Rifot, M., and Bouard, J.** (1995). Les tanins vacuolaires de la baie de *Vitis vinifera* L. var. Merlot à maturité. *Oenologie* **95**, 115-118.
- Patzlaff, A., Newman, L.J., Dubos, C., Whetten, R.W., Smith, C., McInnis, S., Bevan, M.W., Sederoff, R.R., and Campbell, M.M.** (2003). Characterisation of Pt MYB1, an R2R3-MYB from pine xylem. *Plant Mol. Biol.* **53**, 597-608.

- Patzlaff, A., McInnis, S., Courtenay, A., Surman, C., Newman, L.J., Smith, C., Bevan, M.W., Mansfield, S., Whetten, R.W., Sederoff, R.R., and Campbell, M.M.** (2003). Characterization of a pine MYB that regulates lignification. *Plant J.* **36**, 743-754.
- Payne, T., Clement, J., Arnold, D., and Lloyd, A.** (1999). Heterologous myb genes distinct from GL1 enhance trichome production when overexpressed in *Nicotiana tabacum*. *Development* **126**, 671-682.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A., and Saedler, H.** (1987). The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *Embo J.* **6**, 3553-3558.
- Pelletier, M.K., Murrell, J.R., and Shirley, B.W.** (1997). Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis*. Further evidence for differential regulation of "early" and "late" genes. *Plant Physiol.* **113**, 1437-1445.
- Perbal, M.C., Haughn, G., Saedler, H., and Schwarz-Sommer, Z.** (1996). Non cell autonomous function of the Antirrhinum floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development* **122**, 3433-3441.
- Piazza, P., Procissi, A., Jenkins, G.I., and Tonelli, C.** (2002). Members of the c1/p11 regulatory gene family mediate the response of maize aleurone and mesocotyl to different light qualities and cytokinins. *Plant Physiol.* **128**, 1077-1086.
- Pinto, M., and Lobe, C.G.** (1996). Products of the grg (Groucho-related gene) family can dimerize through the amino-terminal Q domain. *J. Biol. Chem.* **271**, 33026-33031.
- Pirie, A.** (1977). Phenolic accumulation in red wine grapes (*Vitis vinifera* L.) (Australie: Université de Sydney), pp. 141.
- Pirie, A., and Mullins, A.G.** (1980). Concentration of phenolics in the skin of grape berries during fruit development and ripening. *Am. J. Enol. Vit.* **31**, 34-36.
- Planchais, S., Perennes, C., Glab, N., Mironov, V., Inze, D., and Bergounioux, C.** (2002). Characterization of cis-acting element involved in cell cycle phase-independent activation of *Arabidopsis* CycB1;1 transcription and identification of putative regulatory proteins. *Plant Mol. Biol.* **50**, 111-127.
- Porter, L.J.** (1988). Flavans and proanthocyanidins. (New-york).
- Pouteau, S., Huttner, E., and Boccara, M.** (1994). Microbial elicitors plant defence responses activate transcription of retrotransposon in protoplasts. *Plant J.* **5**, 524-542.
- Pratt, C.** (1971). Reproductive anatomy in cultivated grapes, a review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 92-109.
- Price, S.F., Watson, B.T., and Valladao, M.** (1995). Vineyard and winery effects on wine phenolics-flavonols in Oregon Pinot Noir. In Proceedings of the ninth Australian wine industry technical conference, C.S. Stockley, A.N. Sas, R.S. Johnstone, and T.H. Lee, eds (Adelaide, South Australia), pp. 93-97.
- Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M., and Watson, B.T.** (1995). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wines. *Am. J. Enol. Vit.* **46**, 187-194.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., and Moutounet, M.** (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochem.* **36**, 781-784.
- Proteggente, A.R., Pannala, A.S., Pagana, G., WVan Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., Van de Put, F., Dacombe, C., and Rice-Evans, C.A.** (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetable

reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Rad. Res.* **36**, 217-233.

**Quattrocchio, F., Wing, J.F., Leppen, H., Mol, J., and Koes, R.E.** (1993). Regulatory Genes Controlling Anthocyanin Pigmentation Are Functionally Conserved among Plant Species and Have Distinct Sets of Target Genes. *Plant Cell* **5**, 1497-1512.

**Quattrocchio, F., Wing, J.F., van der Woude, K., Mol, J.N., and Koes, R.** (1998). Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *Plant J.* **13**, 475-488.

**Quattrocchio, F., Wing, J., van der Woude, K., Souer, E., de Vetten, N., Mol, J., and Koes, R.** (1999). Molecular analysis of the *anthocyanin 2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell* **11**, 1433-1444.

**Rabinowicz, P.D., Braun, E.L., Wolfe, A.D., Bowen, B., and Grotewold, E.** (1999). Maize R2R3 MYB genes: Sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics* **153**, 427-444.

**Reddy, A.R., Britsch, L., Salamini, F., Saedler, H., and Rohde, W.** (1987). The A1 (Anthocyanin 1) locus in *Zea Mays* encode dihydroquercetin reductase. *Plant Sci.* **52**, 7-13.

**Reif, H.J., Niesbach, U., Deumling, B., and Saedler, H.** (1985). Cloning and analysis of two genes for Chalcone Synthase from *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 208-215.

**Reindl, A., Schoffl, F., Schell, J., Koncz, C., and Bako, L.** (1997). Phosphorylation by a cyclin-dependent kinase modulates DNA binding of the Arabidopsis heat-shock transcription factor HSF1 *in vitro*. *Plant Physiol.* **115**, 93-100.

**Ren, B., Chee, K.J., Kim, T.H., and Maniatis, T.** (1999). PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. *Genes Dev.* **13**, 125-137.

**Renaud, S., and de Lorgeril, M.** (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**, 1523-1526.

**Ribéreau.** (1958). Formation et évolution des anthocyanes au cours de la maturation du raisin. *Compte rendus de l'Académie des Sciences de France* **246**, 1271-1273.

**Ribéreau-Gayon, P.** (1959). Recherches sur les anthocyanes des Végétaux, application au genre *Vitis* (Paris), pp. 114.

**Ribéreau-Gayon, P.** (1964). Les flavonoides de la baie dans le genre *Vitis*. In C.R. Académie des Sciences de Paris, pp. 1335-1337.

**Ribéreau-Gayon, P., and Stonestreet, E.** (1966). Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Analytique* **48**, 188-196.

**Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga.** (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biological Medicine* **21**, 417.

**Riechmann, J.L., and Meyerowitz, E.M.** (1997). MADS domain proteins in plant development. *Biol Chem* **378**, 1079-1101.

**Riechmann, J.L., and Ratcliffe, O.J.** (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Cur. Opi. in Plant Biol.* **33**, 423-434.

**Robinson, C., Light, Y., Groves, R., Mann, D., Marias, R., and Watson, R.** (1996). Cell-cycle regulation of B-Myb protein expression: specific phosphorylation during the S phase of the cell cycle. *Oncogene* **12**, 1855-1864.

- Roeder, R.G.** (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 327-335.
- Roggero, J.P., Coen, S., and Ragonnet, B.** (1986). High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. an approach to anthocyanin metabolism. *Am. J. Enol. and Vit.* **37**, 77-83.
- Romeyer, F.M., Macheix, J.J., Goiffon, J.P., Reminiac, C.C., and Sapis, J.C.** (1983). The browning capacity of grapes 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *J. Agr. and Food Chem.* **31**, 346-349.
- Rosinski, J.A., and Atchley, W.R.** (1998). Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *J. Mol. Evol.* **46**, 74-83.
- Ruffner, H.P.** (1982). Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review. *Vitis* **41**, 24759, 24346-24358.
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Relich, H.A., and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N., Augustin, M., Vivas, N., and Glories, Y.** (1997). A biochemical approach to the evolution of procyanidins in grape seeds during the ripening of red grapes (*Vitis vinifera* L.cv. Merlot Noir). *J. of Wine Res.* **8**, 159-167.
- Sainz, M.B., Grotewold, E., and Chandler, V.L.** (1997). Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related Myb domain proteins. *Plant Cell* **9**, 611-625.
- Sainz, M.B., Goff, S.A., and Chandler, V.L.** (1997). Extensive mutagenesis of a transcriptional activation domain identifies single hydrophobic and acidic amino acids important for activation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 115-122.
- Sakamoto, A., Omirulleh, S., Nakayama, T., and Iwabuchi, M.** (1996). A zinc-finger-type transcription factor WZF-1 that binds to a novel cis-acting element of histone gene promoters represses its own promoter. *Plant Cell Physiol.* **37**, 557-562.
- Sakamoto, A., Omirulleh, S., Nakayama, T., and Iwabuchi, M.** (1996). A zinc-finger-type transcription factor WZF-1 that binds to a novel cis-acting element of histone gene promoters represses its own promoter. *Plant Cell Physiol.* **37**, 557-562.
- Sarma, A.D., and Sharma, R.** (1999). Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. *Phytochem.* **52**, 1313-1318.
- SatueGarcia, M.T., Heinonen, M., and Frankel, E.N.** (1997). Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J. of Agric. Food Chem.* **45**, 3362-3367.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I.A., and Coupland, G.** (1998). The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**, 1219-1229.
- Schellmann, S., Schnittger, A., Kirik, V., Wada, T., Okada, K., Beermann, A., Thumfahrt, J., Jurgens, G., and Hulskamp, M.** (2002). TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. *Embo J.* **21**, 5036-5046.

**Schiefelbein, J.** (2003). Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 74-78.

**Schindler, U., Beckmann, H., and Cashmore, A.R.** (1993). HAT3.1, a novel Arabidopsis homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *Plant J.* **4**, 137-150.

**Schmid, M., Uhlenhaut, N.H., Godard, F., Demar, M., Bressan, R., Weigel, D., and Lohmann, J.U.** (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* **130**, 6001-6012.

**Schoonbeek, H., Del Sorbo, G., and De Waard, M.A.** (2001). The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Mol Plant Microbe Interact.* **14**, 562-571.

**Schouten, A., Wagemakers, L., Stefanato, F.L., van der Kaaij, R.M., and van Kan, J.A.** (2002). Resveratrol acts as a natural antifungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Mol. Microbiol.* **43**, 883-894.

**Schwechheimer, C., Zourelidou, M., and Bevan, M.W.** (1998). Plant Transcription Factor Studies. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 127-150.

**Schwinn, K.E., Davies, K.M., Miller, R.M., Deroles, S.C., and Bradley, J.M.** (1993). Floral flavonoids and their modifications in lisianthus. *Phytochem.* **33**, 17.

**Shaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V.V., Larson, M., and Wisman, E.** (2001). Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 113-123.

**Shanmuganayagam, D., Beahm, M.R., Osman, H.E., Krueger, C.G., Reed, J.D., and Folts, J.D.** (2002). Grape seed and grape skin extracts elicit a greater antiplatelet effect when used in combination than when used individually in dogs and humans. *J. of Nut.* **132**, 3592-3608.

**Shen, W.H., and Gigot, C.** (1997). Protein complexes binding to cis elements of the plant histone gene promoters: multiplicity, phosphorylation and cell cycle alteration. *Plant Mol Biol.* **33**, 367-379.

**Shoonhoven, L.M., and Van Loon, J.J.A.** (2002). An inventory of taste in caterpillars: each species its own key. In *Acta Zoologica Academic of Science (Hongrie)*, pp. 215-263.

**Silacci, M.W., and Morrison, J.C.** (1990). Changes in pectin content of Cabernet Sauvignon grape berries during maturation. *Am.J. Enol. Vit.* **41**, 111-115.

**Singleton, V.L., and Esau, P.** (1969). Phenolic substances in grapes and wine and their significance. In *Advances in Food research*.

**Singleton, V.L., and Esau, P.** (1969). Phenolic substances in grapes vines and wine and their significance. (New-York).

**Solano, R., Fuertes, A., Sanchez-Pulido, L., Valencia, A., and Paz-Ares, J.** (1997). A single residue substitution causes a switch from the dual DNA binding specificity of plant transcription factor MYB.Ph3 to the animal c-MYB specificity. *J Biol. Chem.* **272**, 2889-2895.

**Somers, T.C.** (1976). Pigment development during ripening of the grape. *Vitis* **14**, 269-277.

**Sommer, H., and Saedler, H.** (1986). Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum Majus*. *Mol. Gen. and Genet.* **202**, 429-434.

**Soppe, W.J., Jacobsen, S.E., Alonso-Blanco, C., Jackson, J.P., Kakutani, T., Koorneef, M., and Peeters, A.J.** (2000). The late flowering phenotype of fwa mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of homeodomain gene. *Mol. Cell* **6**, 791-802.

- Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossaud, F., and Moutounet, M.** (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochem.* **43**, 509-512.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., and Tonelli, C.** (1994). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.* **24**, 743-755.
- Spayd, S.E., Tarara, J.M., Mee, D.L., and Ferguson, J.C.** (2002). Separation of sunlight and Temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. *Am. J. Enol. Vit.* **53** **3**, 171-182.
- Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J.N., and Koes, R.** (2000). anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* **12**, 1619-1632.
- Stafford, H.** (1990). *Flavonoid metabolism.* (CRC Press).
- Steiner-Lange, S., Unte, U.S., Eckstein, L., Yang, C., Wilson, Z.A., Schmelzer, E., Dekker, K., and Saedler, H.** (2003). Disruption of *Arabidopsis thaliana* MYB26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers. *Plant J.* **34**, 519-528.
- Stockinger, E.J., Mao, Y., Regier, M.K., Triezenberg, S.J., and Thomashow, M.F.** (2001). Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in *Arabidopsis* and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold regulated gene expression. *Nucl. Acids Res.* **29**, 1524-1533.
- Stotz, G., de Viaming, P., Wiering, H., Schram, A.W., and Forckmann, G.** (1985). Genetic and biochemical studies on flavonoid 3' hydroxylasation gene Hf1 on dihydroflavonol intermediates. *Theor. Appl. in Genet.* **70**, 300-305.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 447-456.
- Stüber, D., Bannwarth, W., Pink, J.R.L., Meloen, R.H., and Matile, H.** (1990). New-B-Cell epitopes in the plasmodium falciparum malaria circumsporozoite protein. *Eur. J. Immunol.* **20**, 819-824.
- 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**, 2511-2528.
- Suzuki, A., Suzuki, T., Tanabe, F., Toki, S., Washida, H., Wu, C.Y., and Takaiwa, F.** (1997). Cloning and expression of five myb-related genes from rice seed. *Gene* **198**, 393-398.
- Swift, J.G., Buttrose, M.S., and Possingham, J.V.** (1973). Stomata and starch in grape berries. *Vitis* **12**, 38-45.
- Takatsuji, H.** (1998). Zinc-finger transcription factors in plants. *Cell Mol. Life Sci.* **54**, 582-596.
- Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F.A., 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.
- Tamagnone, L., Merida, A., Stacey, N., Plaskitt, K., Parr, A., Chang, C., Lynn, D., Dow, J.M., Roberts, K., and Martin, C.** (1998). Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **10**, 1801-1816.
- Tanaka, Y., Patestos, N.P., Maekawa, T., and Ishii, S.** (1999). B-myb is required for inner cell mass formation at an early stage of development. *J Biol. Chem.* **274**, 28067-28070.

- Tanaka, Y., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Holton, T.A., Higgins, E., and Kusumi, T.** (1995). Molecular cloning and characterization of *Rosa hybrida* dihydroflavonol 4 reductase gene. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1023-1031.
- Tanner, G.J., Ahston, A.R., Abrahams, S., Watson, J.M., Larkin, P.J., and Francki, K.T.** (2002). Novel gene and uses therefore to modify pasture qualities of crops. In International Publication Number (WO).
- Thompson, J.D., Gibson, T.T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and FHiggins, D.G.** (1997). The clustal X windows interface; flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* **24**, 4876-4882.
- Thorngate, J., and Singleton, V.** (1994). Localization of procyanidins in grape seeds. *Am. J. Enol. Vit.* **45**, 259-270.
- Tian, L., and Chen, Z.J.** (2001). Blocking histone deacetylation in *Arabidopsis* induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 200-205.
- Timmermans, M.C., Hudson, A., Becraft, P.W., and Nelson, T.** (1999). ROUGH SHEATH2: a Myb protein that represses knox homeobox genes in maize lateral organ primordia. *Science* **284**, 151-153.
- Toscani, A., Mettus, R.V., Coupland, R., Simpkins, H., Litvin, J., Orth, J., Hatton, K.S., and Reddy, E.P.** (1997). Arrest of spermatogenesis and defective breast development in mice lacking A-myb. *Nature* **386**, 713-717.
- Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S.A., and Schröder, J.** (1995). reaction mechanisms of homodimeric plants polyketide synthases (stilbene and chalcone synthase) - a single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones, and 6'deoxychalcones. *J. Biol. Chem.* **270**, 7922-7928.
- Tsuda, T., Horio, F., and Osawa, T.** (1999). Absorption and metabolism of cyanidin 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside in rats. *FEBS Letter* **449**, 179-182.
- Tsuda, T., Horio, F., and Osawa, T.** (2000). The role of anthocyanins as an antioxydant under oxidative stress in rats. *Biofactors* **13**, 133-139.
- Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S., and Osawa, T.** (1996). Oxydation products of cyanidin 3-*O*- $\beta$ -D glucoside with a free radical initiator. *Lipids* **31**.
- Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., and Osawa, T.** (1996). Inhibition of lipid peroxydation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1033-1039.
- Tsuda, T., Waranabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S.W., Kawakishi, S., and Osawa, T.** (1994). Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-*O*- $\beta$ -D glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2407-2410.
- Tsukaya, H., Ohshima, T., Naito, S., Chino, M., and Komeda, Y.** (1991). Sugar dependent expression of the CHS-A gene for Chalcone Synthase from *Petunia* in transgenic *Arabidopsis*. 1991 **97**, 1414-1421.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., and Shinozaki, K.** (1993). An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**, 1529-1539.
- Urao, T., Noji, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (1996). A transcriptional activation domain of ATMYB2, a drought-inducible *Arabidopsis* Myb-related protein. *Plant J.* **10**, 1145-1148.

- Vailleau, F., Daniel, X., Tronchet, M., Montillet, J.L., Triantaphylides, C., and 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 USA* **99**, 10179-10184.
- Van Eldik, G.J., Reijnen, W.H., Ruiter, R.K., van Herpen, M.M., Schrauwen, J.A., and Wullems, G.J.** (1997). Regulation of flavonol biosynthesis during anther and pistil development, and during pollen tube growth in *Solanum tuberosum*. *Plant J.* **11**, 105-113.
- van Tunen, A.J., Koes, R.E., Spelt, C.E., van der Krol, A.R., Stuitje, A.R., and Mol, J.N.** (1988). Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. *Embo J.* **7**, 1257-1263.
- Verhoeven, M.E., Bovy, A., Collins, G., Muir, S., Robinson, S., de Vos, C.H., and Colliver, S.** (2002). Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* **53**, 2099-2106.
- Vinson, J.A., Mandarano, M.A., Shuta, D.L., Bagchi, M., and Bagchi, D.** (2002). Beneficial effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract and a niacin-bound chromium in a hamster atherosclerosis model. *Mol. Cell. Biochem.* **240**, 99-103.
- Wada, T., Tachibana, T., Shimura, Y., and Okada, K.** (1997). Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a MYB homolog, CPC. *Science* **277**, 1113-1116.
- Wada, T., Kurata, T., Tominaga, R., Koshino-Kimura, Y., Tachibana, T., Goto, K., Marks, M.D., Shimura, Y., and Okada, K.** (2002). Role of a positive regulator of root hair development, CAPRICE, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* **129**, 5409-5419.
- Walgren, R.A., Karnaky, K.J., Lindenmayer, G.E., and Walle, T.** (2000). Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-B-Glucoside across Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers by Apical multidrug Resistance-Associated Protein-2. *J. Pharm. Exper. Therap.* **294**, 830-836.
- Walgren, R.A., Lin, J.T., Kinne, R.K.H., and Walle, T.** (2000). Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-B- glucoside by Sodium-Dependent Glucose Transporter SGLT1. *J. Pharm. Exper. Ther.* **294**, 837-843.
- Walker, A.R., Davison, P.A., Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, M.D., and Gray, J.C.** (1999). The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* **11**, 1337-1350.
- Wang, Z.Y., and Tobin, E.M.** (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* **93**, 1207-1217.
- Wang, H., Cao, G.H., and Prior, R.L.** (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **2**, 304-309.
- Wang, Z.Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M.S., and Tobin, E.M.** (1997). A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* Lhcb gene. *Plant Cell* **9**, 491-507.
- Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Chang, Y.C., Booren, A.M., Gray, J.I., and De Witt, D.L.** (1999). Antioxydant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J. Nat. Prod.* **62**, 294-296.

- Washburn, K.B., Davis, E.A., and Ackerman, S.** (1997). Coactivators and TAFs of transcription activation in wheat. *Plant Mol. Biol.* **35**, 1037-1043.
- Waterborg, J.H.** (1990). Sequence analysis of acetylation and methylation in two histone H3 variants of alfalfa. *J Biol. Chem.* **265**, 17157-17161.
- Weston, K.** (1998). Myb proteins in life, death and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 76-81.
- Winkel-Shirley, B.** (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 218-223.
- Wolffe, A.P., and Hayes, J.J.** (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucl. Acids Res.* **27**, 711-720.
- Wolffram, S., Block, M., and Ader, P.** (2002). Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J. Nut.* **132**, 630-635.
- Wong, E.** (1976). Biosynthesis of flavonoids. In *Chemistry and biochemistry of plant pigments* (New-York: Academic Press), pp. 464-526.
- Wu, J., and Grunstein, M.** (2000). 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 619-623.
- Wu, J.M., Wang, Z.R., Hsieh, T.C., Bruder, J.L., Zou, J.G., and Huang, Y.Z.** (2001). Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxydant present in red wine. *International Journal of Molecular Medecine* **8**, 3-17.
- Xhie, D.Y., Sharma, S.B., Paiva, N.L., Ferreira, D., and Dixon, R.A.** (2003). Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science* **299**, 396-399.
- Xue, B., Charest, P.J., Devantier, Y., and Rutledge, R.G.** (2003). Characterization of a MYBR2R3 gene from black spruce (*Picea mariana*) that shares functional conservation with maize C1. *Mol. Genet. Genomics* **270**, 78-86.
- Yadegari, R., Kinoshita, T., Lotan, O., Cohen, G., Katz, A., Choi, Y., Nakashima, K., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Fischer, R.L., and Ohad, N.** (2000). Mutations in the FIE and MEA genes that encode interacting polycomb proteins cause parent-of-origin effects on seed development by distinct mechanisms. *Plant Cell* **12**, 2367-2382.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (1993). The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **238**, 17-25.
- Yamamoto, N., Moon, J.H., Tsushida, T., Nagao, A., and Terao, J.** (1999). Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on Copper Ion-Induced Lipid Peroxydation in human Low-Density Lipoprotein. *Arch. Biochem. Biophy.* **372**, 347-354.
- Yanagisawa, S.** (2001). The transcriptional activation domain of the plant-specific Dof1 factor functions in plant, animal, and yeast cells. *Plant Cell Physiol.* **42**, 813-822.
- Yanagisawa, S., and Sheen, J.** (1998). Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell* **10**, 75-89.
- Yang, Y., and Klessig, D.F.** (1996). Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncogene homolog from tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 14972-14977.
- Yang, S., Sweetman, J.P., Amirsadeghi, S., Barghchi, M., Huttly, A.K., Chung, W.I., and Twell, D.** (2001). Novel anther-specific myb genes from tobacco as putative regulators of phenylalanine ammonia-lyase

expression. *Plant Physiol.* **126**, 1738-1753.

**Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

**Yoshimoto, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., and Yamakawa, O.** (2001). Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato. *Bioscience Biotechnical Biochemistry* **65**, 1652-1655.

**Yoshimoto, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., Yamakawa, O., Yamaguchi, O., and Yamada, J.** (1999). Antimutagenicity of sweetpotato (*Ipoema batatas*) roots. *Bioscience Biotechnical Biochemistry* **63**, 537-541.

**Youdim, K.A., Martin, A., and Joseph, J.A.** (2000). Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radical Biological Medicine* **29**, 51-60.

**Youdim, K.A., Shukitt-Hale, B., MacKinnon, S., Kalt, W., and Joseph, J.A.** (2000). Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. *Biochemical Biophysical Acta* **1523**, 117-122.

**Yu, E.Y., Kim, S.E., Kim, J.H., Ko, J.H., Cho, M.H., and Chung, I.K.** (2000). Sequence-specific DNA recognition by the Myb-like domain of plant telomeric protein RTBP1. *J Biol Chem* **275**, 24208-24214.

**Yubero-Serrano, E.M., Moyano, E., Medina-Escobar, N., Munoz-Blanco, J., and Caballero, J.L.** (2003). Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *J Exp Bot* **54**, 1865-1877.

**Zern, T.L., West, K.L., and Fernandez, M.L.** (2003). Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. *J Nutr* **133**, 2268-2272.

**Zhu, J.K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 247-273.

# ***ANNEXE 1***

# Séquence complète d'ADNc codant un facteur de transcription de VvMybCs1

mRNA: 1212 bases

```

      Extension en 5'      1/1      31/
AGA AAC CAA TTG ATC CAC GCA GAG AAG CAA GCC AGA GGG ATG AGA AAT CCG GCA TCT
GCG
                                     M  R  N  P  A  S
A 61/8                               91/18
TCT ACG AGT AAG ACT CCG TGC TGT ACC AAG GTT GGG TTG AAA AGA GGA CCA TGG ACG
CCT
S  T  S  K  T  P  C  C  T  K  V  G  L  K  R  G  P  W  T
P
121/28                               151/38
GAG GAA GAT GAG CTT CTA GCT AAT TAT GTG AAG AGA GAA GGT GAA GGG AGG TGG AGG
ACG
E  E  D  E  L  L  A  N  Y  V  K  R  E  G  E  G  R  W  R
T
181/48                               211/58
CTG CCG AAG CGA GCT GGG TTG CTG CGG TGC GGC AAG AGC TGT CGC CTC CGG TGG ATG
AAT
L  P  K  R  A  G  L  L  R  C  G  K  S  C  R  L  R  W  M
N
241/68                               271/78
TAT CTT CGG CCG TCA GTG AAG CGC GGC CAG ATA GCT CCC GAT GAG GAA GAT CTC ATT
CTT
Y  L  R  P  S  V  K  R  G  Q  I  A  P  D  E  E  D  L  I
L
301/88                               331/98
CGC CTC CAT CGC CTG CTC GGT AAC AGG TGG TCT CTG ATT GCC GGA AGG ATC CCG GGG
CGT
R  L  H  R  L  L  G  N  R  W  S  L  I  A  G  R  I  P  G
R
361/108                              391/118
ACA GAC AAT GAG ATC AAG AAC TAC TGG AAC ACC CAT CTC AGC AAG AAA CTC ATC AGC
CAA
T  D  N  E  I  K  N  Y  W  N  T  H  L  S  K  K  L  I  S
Q
421/128                              451/138
GGA ATA GAT CCC AGA ACC CAC AAG CCA CTA AAC CCT AAA CCT AAT CCA TCA CCA GAT
GTT
G  I  D  P  R  T  H  K  P  L  N  P  K  P  N  P  S  P  D
V 481/148                              511/158
AAT GCT CCT GTC TCA AAA TCA ATT CCA AAT GCA AAC CCT AAC CCT AGT TCT TCC CGG
GTG
N  A  P  V  S  K  S  I  P  N  A  N  P  N  P  S  S  S  R
V
541/168                              571/178
GGA GAA ATT GGA AGC AAC CAT GAG GTC AAG GAG ATT GAA AGT AAT GAA AAT CAC AAG
GAG
G  E  I  G  S  N  H  E  V  K  E  I  E  S  N  E  N  H  K
E 601/188                              631/198
CCG CCT AAC CTG GAT CAG TAT CAC AGT CCA CTT GCG GCC GAT AGC AAT GAG AAT TGG
CAA
P  P  N  L  D  Q  Y  H  S  P  L  A  A  D  S  N  E  N  W
Q
661/208                              691/218
AGC GCA GAT GGG TTG GTA ACG GGA CTA CAA AGC ACC CAT GGT ACC AGC AAC GAT GAC
GAA

```

```

S A D G L V T G L Q S T H G T S N D D
E 721/228                                751/238
GAC GAT ATC GGG TTC TGC AAC GAC GAT ACA TTC CCT TCA TTT TTG AAT TCT TTG ATT
AAC
D D I G F C N D D T F P S F L N S L I
N
781/248                                811/258
GAG GAT GTG TTT GGA AAT CAT AAT CAT CAT CAG CAG CAG CAG CAG CAA CAG CAG CTG
CAG
E D V F G N H N H H Q Q Q Q Q Q Q Q L
Q
841/268                                871/278
CAG GTG CAG CAG CCA TCT AAT GTG ATT GCA CCA TTG CCC CAC CCA GCA ATT TCT GTG
CAG
Q V Q Q P S N V I A P L P H P A I S V
Q
901/288                                931/298
GCC ACC TTC AGT AGT AGC CCT AGA ACT GTC TGG GAA CCT GCT GCA CTA ACA TCT ACA
TCG
A T F S S S P R T V W E P A A L T S T
S
961/308                                991/318
GCT CCT TTA GTC CAC GAT CAA AAA CAC TCC ATG TCT CCC TGA AAA TGA TGA ATC AAG
CTT
A P L V H D Q K H S M S P *
1021                                1051
ATA TGA GTT TGA TTA AAA TCT GTG TGA TGT AAT TTG TTG TTT CCC TTT TTG TGT TTT
GAT
1081/361                                1111/371
GTT GTA TTA GCT TCC ACT CTT GGT TAT TTA ATT AGG ATG TTA ATT AAA GCT TTA TGT
GTG
1141/381                                1171/391
AAT ATC GTA TGT GAA ATG GAT CCT TGC AAC TAA GTT GTT TTT CCC AAA AAA AAA AAA
AAA
1201/401
AAA AAA AAA AAA

```

## Alignements avec les plus proches homologues

```

>gi|13346178|gb|AAK19611.1|AF336278_1 (AF336278) BNLGHi233
[Gossypium hirsutum]
Length = 247

```

```

Score = 289 bits (739), Expect = 4e-77
Identities = 151/253 (59%), Positives = 170/253 (66%), Gaps = 4/253
(1%)
Frame = +1

```

```

Query: 40 MRNPA---
SASTSKTPCCTKVGLKRGPTPEEDELANYVKREGEGRWRTLPKRAGLLRC 210
MRNP + T TPCC+KVGLKRGPTPEEDEL+NY+
+EGEGRWRTLPKRAGLLRC
Sbjct: 1
MRNPTKKDNDVGTKTTTPCCSKVGLKRGPTPEEDELLSNYINKEGEGRWRTLPKRAGLLRC 60

```

```

Query: 211
GKSCRLRWMNYLRPSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWN 390
GKSCRLRWMNYLRPSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWN

```

Sbjct: 61  
GKSCRLRWMNYLRPSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWN 120

Query: 391 THLSKKLISQGIDPRTHKPLNPKP-  
NPSPDVNAPVXXXXXXXXXXXXXXXXRVGEIGSNHEV 567  
                  THLSKKLISQGIDPRTHKPLNP+ +PSP P + S  
V

Sbjct: 121 THLSKKLISQGIDPRTHKPLNPQQLSPSPSLKP-----  
SPSSSSMAKPNPPSPLPV 174

Query: 568  
KEIESNENHKEPPNLDQYHSPLAADSNEENWQADGLVTGLQSTHGTSNDDDEDDIGFCNDD 747  
                  + +N+ + ++ H + +++ Q D  
+DD

Sbjct: 175 HVVNANKQNYDDGSNEDHQGMIMNNDHYQQQQD-----  
HDD 211

Query: 748 TFPSFLNSLINED 786  
                  F SFLNSLINED  
Sbjct: 212 VFSSFLNSLINED 224

>gi|15231271|ref|NP\_187963.1| myb-related protein 5 [Arabidopsis thaliana]  
gi|2129649|pir||S68688 myb-related protein 5 - Arabidopsis thaliana  
gi|1218000|gb|AAC49311.1| (U26935) myb-related protein Atmyb5 [Arabidopsis thaliana]  
gi|9280306|dbj|BAB01761.1| (AP000603) myb-related protein 5 [Arabidopsis thaliana]  
gi|1587244|prf||2206352A Atmyb5 gene [Arabidopsis thaliana]  
Length = 249

Score = 264 bits (674), Expect = 1e-69  
Identities = 144/258 (55%), Positives = 163/258 (62%), Gaps = 4/258 (1%)  
Frame = +1

Query: 37  
GMRNPASASTSKTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLPKRAGLLRCGK 216  
                  G + P S T TPCCTK+G+KRGPWT EEDE+L  
+++K+EGEGRWR+LPKRAGLLRCGK  
Sbjct: 5 GGKKPVSKKT--  
TPCCTKMGMKRGPWTVEEDEILVSFIKKEGEGRWRS LPKRAGLLRCGK 62

Query: 217  
SCRLRWMNYLRPSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTH 396  
                  SCRLRWMNYLRPSVKRG I  
DEEDLILRLHRLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTH  
Sbjct: 63  
SCRLRWMNYLRPSVKRGGITSDEEDLILRLHRLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTH 122

Query: 397  
LSKKLISQGIDPRTHKPLNPKPNPSPDVNAPVXXXXXXXXXXXXXXXXRVGEIGSNHEVKEI 576  
                  L KKL+ QGIDP+THKPL+ +N  
E  
Sbjct: 123 LRKKLLRQGIDPQTHKPLD-----  
ANNIHKPEE 150

Query: 577 ESNENHKEPPNLDQYHSPLAADSNNENWQSAD--  
GLVTGLQSTHGTSNDDDEDDIGFCNDDT 750  
E + K P L+ S D+ N D + HG +D GFC  
DD  
Sbjct: 151 EVSGGQKYP--LEPISSHTDDTTVNGGDGDSKNSINVFGEHG-----  
YEDFGFCYDDK 203

Query: 751 FPSFLNSLINE--DVFGN 798  
F SFLNSLIN+ D FGN  
Sbjct: 204 FSSFLNSLINDVGDVDFGN 221

>gi|7438353|pir||T02988 myb-related protein 4 - rice  
gi|2605623|dbj|BAA23340.1| (D88620) OSMYB4 [Oryza sativa]  
Length = 275

Score = 231 bits (589), Expect = 1e-59  
Identities = 127/236 (53%), Positives = 153/236 (64%), Gaps = 2/236  
(0%)  
Frame = +1

Query: 97  
LKRGPWTPEEDELANYVKREGEGRWRTLPRKAGLLRCGKSCRLRWMNYLRPSVKGQIA 276  
LKRGPWTPEEDE+LA +V REG RWRTLPR+RAGLLRCGKSCRLRWMNYLRP +KR  
IA  
Sbjct: 20  
LKRGPWTPEEDEVLARFVAREGCDRWRTLPRRAGLLRCGKSCRLRWMNYLRPDIKRCPIA 79

Query: 277  
PDEEDLILRLHRLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQIDPRTHKPLNP 456  
DEEDLILRLHRLGNRWSLIAGR+PGRTDNEIKNYWN+HLSKKLI+QGIDPRTHKPL  
Sbjct: 80  
DDEEDLILRLHRLGNRWSLIAGRRLPGRTDNEIKNYWNSHLSKKLIAQGIDPRTHKPLTA 139

Query: 457 KPNPSPDVNAPVXXXXXXXXXXXXXXXXXRVGEIGSNHEVKEIESNENHKEPPN-  
LDQYHSPL 633  
+ S + A V R ++ IE +++ P + +  
+ +  
Sbjct: 140 AADHS-NAAAAVAATSYKKAVPAKPPRT-----  
ASSPAAGIECSDDRRAPADGGGDFAMV 194

Query: 634 AADSNNENWQSADG-LVTGLQSTHGTSNDDDEDDIGFCNDDTFPSFLNSLINEDVFGN  
798  
+A E ++ G + HG D DD F SFL+SLIN++ G+  
Sbjct: 195 SAADAEGFEGGFQDQFCAEDAVHG-GFDMGSASAMVGDDDFSSFLDSLINDEQLGD  
249

>gi|15233066|ref|NP\_191684.1| putative transcription factor (MYB17)  
[Arabidopsis thaliana]  
gi|11273969|pir||T47917 probable transcription factor (MYB17) -  
Arabidopsis thaliana  
gi|6850892|emb|CAB71055.1| (AL137898) putative transcription factor  
(MYB17) [Arabidopsis  
thaliana]  
Length = 299

Score = 211 bits (537), Expect = 1e-53

Identities = 88/127 (69%), Positives = 107/127 (83%)  
Frame = +1

Query: 70  
KTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLTPKRAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 249  
                  +TPCC K+GLK+GPWTPEEDE+L  ++K+ G G WRTLTPK AGLLRCGKSCRLRW  
NYLR  
Sbjct: 3  
RTPCCDKIGLKKGPWTPEEDEVLVAHIKKNHGHSWRTLTPKLAGLLRCGKSCRLRWTNYLR 62

Query: 250  
PSVKGQIAPDEEDLILRLHRLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 429  
                  P +KRG      DEE L+++LH +LGNRW+ IA ++PGRTDNEIKN WNTHL K+L+S  
G+D  
Sbjct: 63  
PDIKRGPFDADEEKLVIQLHAILGNRWAAIAAQLPGRTDNEIKNLWNTHLKKRLLSMGLD 122

Query: 430 PRTHKPL 450  
                  PRTH+PL  
Sbjct: 123 PRTHEPL 129

**>gi|7438345|pir||T09879 myb-related protein A - upland cotton  
gi|437327|gb|AAA33067.1| (L04497) MYB A; putative [Gossypium  
hirsutum]  
Length = 294**

Score = 209 bits (533), Expect = 3e-53  
Identities = 97/183 (53%), Positives = 125/183 (68%), Gaps = 3/183  
(1%)  
Frame = +1

Query: 70  
KTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLTPKRAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 249  
                  ++PCC K      +G WT EED+ L NY++ GEG WR+LPK  
AGLLRCGKSCRLRW+NYLR  
Sbjct: 3  
RSPCCEKAHTNKGAWTKEEDQRLINIRVHGEGCWRSPLKAAGLLRCGKSCRLRWINYLR 62

Query: 250  
PSVKGQIAPDEEDLILRLHRLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 429  
                  P +KRG      +E++LI++LH LLGN+WSLIAGR+PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KLIS+GID  
Sbjct: 63  
PDLKRGNFTEEEDELIIKLHSLLGNKWSLIAGRPLPGRTDNEIKNYWNTHIKRKLISRGID 122

Query: 430 PRTHKPLNPKPNPSPDVNAPV---  
XXXXXXXXXXXXXXXXRVGEIGSNHEVKEIESNENHKE 600  
                  P+TH+PLN      N + V AP                          + + N+ + +SN +  
E  
Sbjct: 123 PQTHRPLNQTANTN-  
TVTAPTELDFRNSPTS SVSKSSSIKNPSLDFNYNEFQFKSNTDSLE 181

Query: 601 PPN 609  
                  PN  
Sbjct: 182 EPN 184

>gi|1101770|gb|AAA82943.1| (U39448) MYB-like transcriptional factor  
MBF1 [Picea mariana]  
Length = 388

Score = 209 bits (531), Expect = 5e-53  
Identities = 89/125 (71%), Positives = 106/125 (84%)  
Frame = +1

Query: 70  
KTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 249  
+ PCC KVGL +G W+ EED LL Y++ GEG WR+LPK+AGL  
RCGKSCRLRW+NYLR  
Sbjct: 3  
RAPCCAKVGLNKGAWSAEEDSLLGKYIQTHGEGNWRSLPKKAGLRRCGKSCRLRWLNLYR 62

Query: 250  
PSVKRGQIAPDEEDLILRLHLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQGID 429  
P +KRG I DEE+LI+R+H LLGNRWS+IAGR+PGRTDNEIKNYWNT+LSKKL  
+GID  
Sbjct: 63  
PCIKRGNITADEEELIIRMHALLGNRWSIIAGRVPGRTDNEIKNYWNTNLSKKLAVRGID 122

Query: 430 PRTHK 444  
P+THK  
Sbjct: 123 PKTHK 127

>gi|15233894|ref|NP\_192684.1| DNA-binding protein [Arabidopsis  
thaliana]  
gi|1020155|gb|AAA98761.1| (U26936) DNA-binding protein [Arabidopsis  
thaliana]  
gi|7267641|emb|CAB78069.1| (AL161515) DNA-binding protein  
[Arabidopsis thaliana]  
Length = 236

Score = 204 bits (520), Expect = 1e-51  
Identities = 86/141 (60%), Positives = 109/141 (76%)  
Frame = +1

Query: 70  
KTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 249  
++PCC K +G WT EED+ L +Y++ GEG WR+LPK  
AGLLRCGKSCRLRW+NYLR  
Sbjct: 3  
RSPCCEKAHTNKGAWTKEEDQRLVDYIRNHGEGCWRS LPKSAGLLRCGKSCRLRWINYLR 62

Query: 250  
PSVKRGQIAPDEEDLILRLHLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQGID 429  
P +KRG DE+ +I++LH LLGN+WSLIAGR+PGRTDNEIKNYWNTH+ +KL+S  
GID  
Sbjct: 63  
PDLKRGNFDDDEDQIIIKLSLLGNKWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTHIKRKLSSHGID 122

Query: 430 PRTHKPLNPKPNPSPDVNAPV 492  
P+TH+ +N S V P+  
Sbjct: 123 PQTHRQINESKTVSSQVVVPI 143

>gi|7438344|pir||T02984 myb-related protein 1 - rice

**gi|2605617|dbj|BAA23337.1| (D88617) OSMYB1 [Oryza sativa]**  
**Length = 239**

Score = 202 bits (514), Expect = 5e-51  
Identities = 85/127 (66%), Positives = 106/127 (82%)  
Frame = +1

Query: 70  
KTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLTPKRAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 249  
++PCC K +G WT EED+ L Y++ GEG WR+LPK  
AGLLRCGKSCRLRWMNYLR  
Sbjct: 3  
RSPCCEKAHTNKGAWTKEEDQRLIAYIRAHGEGCWRSPLKAAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 62

Query: 250  
PSVKGQIAPDEEDLILRLHLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 429  
P +KRG DE++LI+RLH LLGN+WSLIAG++PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KL+++GID  
Sbjct: 63  
PDLKRGNFDDDEDELIIRLHSLGKWSLIAGQLPGRTDNEIKNYWNTHIKRKLARGID 122

Query: 430 PRTHKPL 450  
P+TH+PL  
Sbjct: 123 PQTHRPL 129

**>gi|13346194|gb|AAK19619.1|AF336286\_1 (AF336286) GHMYB9 [Gossypium hirsutum]**  
**Length = 264**

Score = 202 bits (513), Expect = 6e-51  
Identities = 85/128 (66%), Positives = 106/128 (82%)  
Frame = +1

Query: 70  
KTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLTPKRAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 249  
++PCC K +G WT EED+ L Y++ GEG WR+LPK  
AGLLRCGKSCRLRW+NYLR  
Sbjct: 3  
RSPCCEKAHTNKGAWTKEEDDRLIAYIRAHGEGCWRSPLKAAGLLRCGKSCRLRWINYLR 62

Query: 250  
PSVKGQIAPDEEDLILRLHLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 429  
P +KRG +E++LI++LH LLGN+WSLIAGR+PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KL+S+GID  
Sbjct: 63  
PDLKRGNFTEEEDELI IKLHSLGKWSLIAGRPLPGRTDNEIKNYWNTHIRKLLSRGID 122

Query: 430 PRTHKPLN 453  
P TH+PLN  
Sbjct: 123 PATHRPLN 130

**>gi|7438328|pir||T03828 myb protein - rice**  
**gi|1946267|emb|CAA72218.1| (Y11415) myb [Oryza sativa]**  
**Length = 368**

Score = 201 bits (512), Expect = 8e-51  
Identities = 85/126 (67%), Positives = 102/126 (80%)

Frame = +1

Query: 70

KTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 249  
+ PCC K GLK+GPWTPEEDE L Y+K G+G WRTLPK AGL RCGKSCRLRW  
NYLR

Sbjct: 3

RAPCCEKSGGLKKGWTPPEEDEKLIAYIKEHGQGNWRTLPKNAGLSRCGKSCRLRWTNYLR 62

Query: 250

PSVKGQIAPDEEDLILRLHRLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQGID 429  
P +KRG+ + +EE+ I++LH +LGN+WS IA R+PGRTDNEIKNYWNTH+ K+L+  
GID

Sbjct: 63

PDIKGRGFSFEEEEAIQLHSILGNKWSAIAARLPGRTDNEIKNYWNTHIRKLLRMGID 122

Query: 430 PRTHKP 447

P TH P

Sbjct: 123 PVTHAP 128

**>gi|421983|pir||S35729 myb-related protein 2 - barley  
gi|19055|emb|CAA50221.1| (X70876) MybHv5 [Hordeum vulgare]  
Length = 251**

Score = 201 bits (511), Expect = 1e-50

Identities = 85/127 (66%), Positives = 105/127 (81%)

Frame = +1

Query: 70

KTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 249  
++PCC K +G WT EED+ L Y++ GEG WR+LPK  
AGLLRCGKSCRLRWMNYLR

Sbjct: 3

RSPCCEKEHTNKGAWTKEEDQRLIAYIRANGEGCWRSPLKAAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 62

Query: 250

PSVKGQIAPDEEDLILRLHRLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQGID 429  
P +KRG DE++LI+RLH LLGN+WSLIAG++PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KL+S+G+D

Sbjct: 63

PDLKRGNFDDDEDELIIRLHSLGKWSLIAGQLPGRTDNEIKNYWNTHIKRKLRSRGMID 122

Query: 430 PRTHKPL 450

P TH+PL

Sbjct: 123 PHTHRPL 129

**>gi|15219923|ref|NP\_173678.1| putative myb-related transcription  
factor [Arabidopsis thaliana]  
gi|7438340|pir||T00780 myb-related protein T22J18.19 - Arabidopsis  
thaliana  
gi|3287694|gb|AAC25522.1|AAC25522 (AC003979) Similar to myb-related  
transcription factor (THM27)  
gb|X95296 from Solanum lycopersicum. ESTs gb|T42000,  
gb|T04118, gb|AA598042, gb|AA394757 and gb|AA598046 come  
from this gene. [Arabidopsis thaliana]  
Length = 257**

Score = 201 bits (510), Expect = 1e-50  
Identities = 82/128 (64%), Positives = 108/128 (84%)  
Frame = +1

Query: 70  
KTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 249  
++PCC K + +G WT EED+LL +Y+++ GEG WR+LP+ AGL  
RCGKSCRLRWMNYLR  
Sbjct: 3  
RSPCCEKAHMNKGAWTKEEDQLLDVYIRKHGEGCWRS LPRAAGLQRCGKSCRLRWMNYLR 62

Query: 250  
PSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQGID 429  
P +KRG +E++LI++LH LLGN+WSLIAGR+PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KL+S+GID  
Sbjct: 63  
PDLKRGNFTEEEDELI IKLHSL LGNKWSLIAGR LPGRTDNEIKNYWNTHIKRKL LSRGID 122

Query: 430 PRTHKPLN 453  
P +H+ +N  
Sbjct: 123 PNSHRLIN 130

**>gi|2129933|pir||S69189 myb-related protein TMH27 - tomato  
gi|1167484|emb|CAA64614.1| (X95296) transcription factor  
[Lycopersicon esculentum]  
Length = 273**

Score = 201 bits (510), Expect = 1e-50  
Identities = 87/137 (63%), Positives = 109/137 (79%)  
Frame = +1

Query: 70  
KTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 249  
++PCC K +G WT EEDE L +Y+++ GEG WR+LPK  
AGLLRCGKSCRLRW+NYLR  
Sbjct: 3  
RSPCCEKAHTNKGAWTKEEDERLISYIRAHGEGCWRS LPKAAGLLRCGKSCRLRWINYLR 62

Query: 250  
PSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQGID 429  
P +KRG +E++LI++LH LLGN+WSLIAGR+PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KL+S+GID  
Sbjct: 63  
PDLKRGNFTEEEDELI IKLHSL LGNKWSLIAGR LPGRTDNEIKNYWNTHIRKKL LSRGID 122

Query: 430 PRTHKPLNPKPNPSPDV 480  
P TH+ +N P P V  
Sbjct: 123 PTTHRSIN-DPTTIPKV 138

**>gi|82310|pir||JQ0957 myb-related protein 330 - garden snapdragon  
Length = 274**

Score = 200 bits (509), Expect = 2e-50  
Identities = 83/128 (64%), Positives = 106/128 (81%)  
Frame = +1

Query: 70  
KTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 249  
++PCC K +G WT EED+ L NY++ GEG WR+LPK  
AGLLRCGKSCRLRW+NYLR  
Sbjct: 3  
RSPCCEKAHTNKGAWTKEEDQRLINIRAHGEGCWRSLPKAAGLLRCGKSCRLRWINYLR 62

Query: 250  
PSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQGID 429  
P +KRG +E+++I++LH LLGN+WSLIAG +PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KL+S+GID  
Sbjct: 63  
PDLKRGNFTEEEDEIIIKLHSLLLGNKWSLIAGALPGRTDNEIKNYWNTHIKRKLVSRGID 122

Query: 430 PRTHKPLN 453  
P+TH+ LN  
Sbjct: 123 PQTHRSLN 130

>gi|15233021|ref|NP\_186944.1| putative MYB family transcription factor [Arabidopsis thaliana]  
gi|6728967|gb|AAF26965.1|AC018363\_10 (AC018363) putative MYB family transcription factor [Arabidopsis thaliana]  
gi|7644370|gb|AAF65560.1|AF249310\_1 (AF249310) putative transcription factor [Arabidopsis thaliana]  
Length = 321

Score = 200 bits (509), Expect = 2e-50  
Identities = 84/126 (66%), Positives = 101/126 (79%)  
Frame = +1

Query: 70  
KTPCCTKVGLKRGPWTPPEDELLANYVKREGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 249  
++PCC + GLK+GPWTPEED+ L N++++ G G WR LPK+AGL RCGKSCRLRW  
NYLR  
Sbjct: 3  
RSPCCDESGLKKGWPWTPEEDQKLINHIRKHGHGWSRALPKQAGLNRCGKSCRLRWTNYLR 62

Query: 250  
PSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQGID 429  
P +KRG +EE I+ LH LLGN+WS IAG +PGRTDNEIKNYWNTH+ KKLII  
GID  
Sbjct: 63  
PDIKRGNF TAE EEQTIINLHSLLLGNKWS SIAGHLPGRTDNEIKNYWNTHIRKKLIQMGID 122

Query: 430 PRTHKP 447  
P TH+P  
Sbjct: 123 PVTHRP 128

>gi|7446161|pir||T09773 myb-related protein - upland cotton  
gi|2921340|gb|AAC04720.1| (AF034134) MYB-like DNA-binding domain protein [Gossypium hirsutum]  
Length = 226

Score = 200 bits (508), Expect = 2e-50  
Identities = 89/146 (60%), Positives = 108/146 (73%), Gaps = 9/146 (6%)

Frame = +1

Query: 70

KTPCCTKVGLKRGPWTFEEDELLANYVKREGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCRLRWNYLR 249  
+ PCC K G +G W+ +ED+ L +Y++ GEG WR+LPK AGL

RCGKSCRLRW+NYLR

Sbjct: 2

RKPCCDKQGTNKGAWSKQEDQKLIDYIRIHGEGCWRSPLKAAGLHRCGKSCRLRWINYLR 61

Query: 250

PSVKRGQIAPDEEDLILRLHLLGNRWSLIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 429  
P +KRG A DEEDLI++LH LLGNRWSLIAGR+PGRTDNE+KNYWN+H+ +KL+

GID

Sbjct: 62

PDIKRGNFAQDEEDLIIKHLHLLGNRWSLIAGRPLGRTDNEVKNYWNSHIKRKLMKMGID 121

Query: 430 PRTHK-----PLNPKPNPSPDV 480

P HK PLNP S DV

Sbjct: 122 PNNHKLNQYPHHVGPLNPTTNSMDV 147

## Séquence complète d'un ADNc codant un facteur de transcription VvMybCs2

1/1 XbaI 31/11  
CGG GGG ACG AGA GAG AAA GAA GAA AGA AAG ATG AGG AAT GCA TCC TCA GCA TCA GCT  
CCA  
M R N A S S A S A  
P  
61/21 91/31  
CCT TCA TCT TCT TCA AAA ACA CCA TGC TGC ATC AAG GTT GGA TTG AAG AGG GGG CCA  
TGG  
P S S S S K T P C C I K V G L K R G P  
W  
121/41 151/51  
ACG CCG GAG GAA GAC GAG GTT CTG GCC AAT TAC ATC AAG AAA GAA GGA GAA GGC CGG  
TGG  
T P E E D E V L A N Y I K K E G E G R  
W  
181/61 211/71  
CGC ACC CTC CCG AAG CGC GCC GGT CTC CTC CGC TGC GGC AAG AGC TGT CGC CTC CTC  
TGG  
R T L P K R A G L L R C G K S C R L L  
W  
241/81 271/91  
ATG AAC TAC CTC CGC CCT TCC GTC AAG CGC GGC CAG ATC GCC CCC GAT GAA GAG GAT  
CTC  
M N Y L R P S V K R G Q I A P D E E D  
L  
301/101 331/111  
ATT CTC CGC CTC CAC CGA CTT CTC GGC AAC AGG TGG GCT TTG ATT GCC GGA AGA ATT  
CCG  
I L R L H R L L G N R W A L I A G R I  
P  
361/121 391/131  
GGC CGG ACG GAT AAT GAG ATA AAA AAC TAC TGG AAC ACA CAC CTG AGC AAG AAG CTG  
ATC  
G R T D N E I K N Y W N T H L S K K L  
I

421/141  
 AGC CAG GGA ATA GAT CCG AGA ACC CAT AAG CCA TTG AAC CCT AAT TCA TCA TCT GTT  
 GAT  
 S Q G I D P R T H K P L N P N S S S V  
 D  
 481/161  
 GTG AAA GCT TCT TCT TCA AAG GCA AAA GCT GTT ATG AAC CCT AAC CCT AAC CCT AAT  
 CCT  
 V K A S S S K A K A V M N P N P N P N  
 P  
 541/181  
 TCT CCT TCA GAA AAA GCA GCA GCC AAC AAG GAA GCT GGG AAC TTC AAG AGT GAC AAT  
 CAG  
 S P S E K A A A N K E A G N F K S D N  
 Q  
 601/201  
 TAT CAG ATT GGG GCA GCT GGC AAT GAT GGC AGT GCC AAT ATC CAG AAT TCG GAT GGT  
 TCC  
 Y Q I G A A G N D G S A N I Q N S D G  
 S  
 661/221  
 GGG ACC GGA TTG AGG AGC AGC AAC AAC GAA GAA **GAC GAT GAC CTT AAC TGT GGC ACC**  
 GAT  
 G T G L R S S N N E E D D D L N C G T  
 D  
 721/241  
 GAT GTC TTC TCT TCA TTT TTG AAC TCA TTG ATC AAT GAG GAT GTG TTT CCT GGA CAG  
 CAC  
 D V F S S F L N S L I N E D V F P G Q  
 H  
 781/261  
 CAT CTC CAA CAA CAG CAC CAT GGT GGT CTC ATT GCA CCG GGC TCC GAT GCT TTG ATC  
 TCT  
 H L Q Q Q H H G G L I A P G S D A L I  
 S  
 841/281  
 ACT TCT TCA GTC CAG TCG TTC GGG TTC GGT ACC AGC TGG GAG GCT GCA GCC ATG ACT  
 TCC  
 T S S V Q S F G F G T S W E A A A M T  
 S  
 901/301  
 931/311  
 ACG TCT GTT TTT AGC CAA ATC GAT CAC TCC AAG AGG TTT AAC GAT CAA CCT **GAT AAG**  
**CGG**  
 T S V F S Q I D H S K R F N D Q P D K  
 R  
 961/321  
**TTC TGA CAG CCG** GTG TTC TTT AAT TTG GCT TCA ACA CCC **TGC AAT GAG** **SacI** **ATA TAT AGT**  
**TAA**  
 F  
 TAA GAA TTC TAG GGT TTG GGT TGT TAA TTT ATG TAT GTG GTT GTG TTG TTG TGT TAG  
 TAT  
 GCT TTA TTT GTA TTG TGA AC





**gi|6850892|emb|CAB71055.1| (AL137898) putative transcription factor (MYB17) [Arabidopsis thaliana]**  
**Length = 299**

Score = 211 bits (538), Expect = 7e-54  
Identities = 91/127 (71%), Positives = 106/127 (82%)  
Frame = +1

Query: 76  
KTPCCIKVGLKRGPWTPPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCROLLWMNYLR 255  
                  +TPCC K+GLK+GPWTPEEDEVL +IKK G G WRTLPK AGLLRGKSCRL W  
NYLR  
Sbjct: 3  
RTPCCDKIGLKKGPWTPEEDEVLVAHIKKNGHGSWRTLPKLAGLLRCGKSCRLRWTNYLR 62

Query: 256  
PSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 435  
                  P +KRG DEE L+++LH +LGNRWA IA ++PGRTDNEIKN WNTHL K+L+S  
G+D  
Sbjct: 63  
PDIKRGPFDADEEKLVIQLHAILGNRWAAIAAQLPGRTDNEIKNLWNTHLKKRLLSMGLD 122

Query: 436 PRTHKPL 456  
                  PRTH+PL  
Sbjct: 123 PRTHEPL 129

**>gi|1101770|gb|AAA82943.1| (U39448) MYB-like transcriptional factor MBF1 [Picea mariana]**  
**Length = 388**

Score = 204 bits (518), Expect = 1e-51  
Identities = 87/125 (69%), Positives = 105/125 (83%)  
Frame = +1

Query: 76  
KTPCCIKVGLKRGPWTPPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCROLLWMNYLR 255  
                  + PCC KVGL +G W+ EED +L YI+ GEG WR+LPK+AGL RCGKSCRL  
W+NYLR  
Sbjct: 3  
RAPCCAKVGLNKGAWSAEEDSLLGKYIQTHGEGNWRSLPKKAGLRRCGKSCRLRWLNYLR 62

Query: 256  
PSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 435  
                  P +KRG I DEE+LI+R+H LLGNRW++IAGR+PGRTDNEIKNYWNT+LSKKL  
+GID  
Sbjct: 63  
PCIKRGNITADEEELIIRMHALLGNRWSIIAGRVPRTDNEIKNYWNTNLSKKLAVRGID 122

Query: 436 PRTHK 450  
                  P+THK  
Sbjct: 123 PKTHK 127

**>gi|7438345|pir||T09879 myb-related protein A - upland cotton**  
**gi|437327|gb|AAA33067.1| (L04497) MYB A; putative [Gossypium hirsutum]**  
**Length = 294**

Score = 202 bits (513), Expect = 6e-51  
Identities = 86/128 (67%), Positives = 107/128 (83%)  
Frame = +1

Query: 76

KTPCCIKVGLKRGPWTPPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCROLLWMNYLR 255  
++PCC K +G WT EED+ L NYI+ GEG WR+LPK AGLLRGKSCRL  
W+NYLR

Sbjct: 3

RSPCCEKAHTNKGAWTKEEDQRLINIRVHGEGCWRSPLKAAGLLRCGKSCRLRWINYLR 62

Query: 256

PSVKGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 435  
P +KRG +E++LI++LH LLGN+W+LIAGR+PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KLIS+GID

Sbjct: 63

PDLKRGNFTEEEDELIILHSLGKWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTHIKRKLISRGID 122

Query: 436 PRTHKPLN 459

P+TH+PLN

Sbjct: 123 PQTHRPLN 130

**>gi|7438344|pir||T02984 myb-related protein 1 - rice**  
**gi|2605617|dbj|BAA23337.1| (D88617) OSMYB1 [Oryza sativa]**  
**Length = 239**

Score = 197 bits (502), Expect = 1e-49  
Identities = 84/127 (66%), Positives = 105/127 (82%)  
Frame = +1

Query: 76

KTPCCIKVGLKRGPWTPPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCROLLWMNYLR 255  
++PCC K +G WT EED+ L YI+ GEG WR+LPK AGLLRGKSCRL  
WMNYLR

Sbjct: 3

RSPCCEKAHTNKGAWTKEEDQRLIAYIRAHGEGCWRSPLKAAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 62

Query: 256

PSVKGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 435  
P +KRG DE++LI+RLH LLGN+W+LIAG++PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KL+++GID

Sbjct: 63

PDLKRGNFDDDEDELIIRLHSLGKWSLIAGQLPGRTDNEIKNYWNTHIKRKLARGID 122

Query: 436 PRTHKPL 456

P+TH+PL

Sbjct: 123 PQTHRPL 129

**>gi|7438328|pir||T03828 myb protein - rice**  
**gi|1946267|emb|CAA72218.1| (Y11415) myb [Oryza sativa]**  
**Length = 368**

Score = 197 bits (502), Expect = 1e-49  
Identities = 84/126 (66%), Positives = 102/126 (80%)  
Frame = +1

Query: 76  
KTPCCIKVGLKRGPWTPPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLTPKRAGLLRCGKSCROLLWMNYLR 255  
+ PCC K GLK+GPWTPEEDE L YIK+ G+G WRTLTPK AGL RCGKSCRL W  
NYLR  
Sbjct: 3  
RAPCCEKSGLKKGPWTPEEDEKLIAYIKEHGOQGNWRTLTPKNAGLSRCGKSCRLRWTNYLR 62

Query: 256  
PSVVRGQIAPDEEDLILRLHLLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 435  
P +KRG+ + +EE+ I++LH +LGN+W+ IA R+PGRTDNEIKNYWNTH+ K+L+  
GID  
Sbjct: 63  
PDIKRGFRSFEEDLILRLHLLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHIRKLLRMGID 122

Query: 436 PRTHKP 453  
P TH P  
Sbjct: 123 PVTHAP 128

>gi|15233021|ref|NP\_186944.1| putative MYB family transcription  
factor [Arabidopsis thaliana]  
gi|6728967|gb|AAF26965.1|AC018363\_10 (AC018363) putative MYB family  
transcription factor [Arabidopsis  
thaliana]  
gi|7644370|gb|AAF65560.1|AF249310\_1 (AF249310) putative  
transcription factor [Arabidopsis thaliana]  
Length = 321

Score = 197 bits (501), Expect = 1e-49  
Identities = 84/126 (66%), Positives = 100/126 (78%)  
Frame = +1

Query: 76  
KTPCCIKVGLKRGPWTPPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLTPKRAGLLRCGKSCROLLWMNYLR 255  
++PCC + GLK+GPWTPEED+ L N+I+K G G WR LPK+AGL RCGKSCRL W  
NYLR  
Sbjct: 3  
RSPCCDESGLKKGPWTPEEDQKLINHIRKHGHGSRALPKQAGLNRCGKSCRLRWTNYLR 62

Query: 256  
PSVVRGQIAPDEEDLILRLHLLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 435  
P +KRG +EE I+ LH LLGN+W+ IAG +PGRTDNEIKNYWNTH+ KCLI  
GID  
Sbjct: 63  
PDIKRGNFATAEEEQTIINLHLLGNKWSIAGHLPGRTDNEIKNYWNTHIRKCLIQMGID 122

Query: 436 PRTHKP 453  
P TH+P  
Sbjct: 123 PVTHRP 128

>gi|13346194|gb|AAK19619.1|AF336286\_1 (AF336286) GHMYB9 [Gossypium  
hirsutum]  
Length = 264  
Score = 197 bits (501), Expect = 1e-49  
Identities = 84/128 (65%), Positives = 105/128 (81%)  
Frame = +1

Query: 76  
KTPCCIKVGLKRGPWTPPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCROLLWMNYLR 255  
++PCC K +G WT EED+ L YI+ GEG WR+LPK AGLLRGKSCRL  
W+NYLR  
Sbjct: 3  
RSPCCEKAHTNKGAWTKEEDRLIAYIRAHGEGCWRSPLKAAGLLRCGKSCRLRWINYLR 62

Query: 256  
PSVKGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQGID 435  
P +KRG +E++LI++LH LLGN+W+LIAGR+PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KL+S+GID  
Sbjct: 63  
PDLKRGNFTEEEDELIKLSLLGNKWSLIAGRPLGRTDNEIKNYWNTHIRKLLSRGID 122

Query: 436 PRTHKPLN 459  
P TH+PLN  
Sbjct: 123 PATHRPLN 130

>gi|15219923|ref|NP\_173678.1| putative myb-related transcription factor [Arabidopsis thaliana]  
gi|7438340|pir||T00780 myb-related protein T22J18.19 - Arabidopsis thaliana  
gi|3287694|gb|AAC25522.1|AAC25522 (AC003979) Similar to myb-related transcription factor (THM27)  
gb|X95296 from Solanum lycopersicum. ESTs gb|T42000, gb|T04118, gb|AA598042, gb|AA394757 and gb|AA598046 come from this gene. [Arabidopsis thaliana]  
Length = 257

Score = 196 bits (499), Expect = 2e-49  
Identities = 81/128 (63%), Positives = 107/128 (83%)  
Frame = +1

Query: 76  
KTPCCIKVGLKRGPWTPPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCROLLWMNYLR 255  
++PCC K + +G WT EED++L +YI+K GEG WR+LP+ AGL RCGKSCRL  
WMNYLR  
Sbjct: 3  
RSPCCEKAHMNKGAWTKEEDQLLDVYIRKHGEGCWRSPLPRAAGLQRCGKSCRLRWMNYLR 62

Query: 256  
PSVKGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQGID 435  
P +KRG +E++LI++LH LLGN+W+LIAGR+PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KL+S+GID  
Sbjct: 63  
PDLKRGNFTEEEDELIKLSLLGNKWSLIAGRPLGRTDNEIKNYWNTHIKRLLSRGID 122

Query: 436 PRTHKPLN 459  
P +H+ +N  
Sbjct: 123 PNSHRLIN 130

>gi|421983|pir||S35729 myb-related protein 2 - barley  
gi|19055|emb|CAA50221.1| (X70876) MybHv5 [Hordeum vulgare]  
Length = 251

Score = 196 bits (499), Expect = 2e-49  
Identities = 84/127 (66%), Positives = 104/127 (81%)

Frame = +1

Query: 76

KTPCCIKVGLKRGPWTPPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCRLWWMNYLR 255  
++PCC K +G WT EED+ L YI+ GEG WR+LPK AGLLRGKSCRL  
WMNYLR

Sbjct: 3

RSPCCEKEHTNKGAWTKEEDQRLIAYIRANGEGCWRSPLKAAGLLRCGKSCRLRWMNYLR 62

Query: 256

PSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 435  
P +KRG DE++LI+RLH LLGN+W+LIAG++PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KL+S+G+D

Sbjct: 63

PDLKRGNFDDDEDELIIRLHSLGKNSLIAGQLPGRTDNEIKNYWNTHIKRKLLSRGMD 122

Query: 436 PRTHKPL 456

P TH+PL

Sbjct: 123 PHTHRPL 129

>gi|15233894|ref|NP\_192684.1| DNA-binding protein [Arabidopsis thaliana]  
gi|1020155|gb|AAA98761.1| (U26936) DNA-binding protein [Arabidopsis thaliana]  
gi|7267641|emb|CAB78069.1| (AL161515) DNA-binding protein [Arabidopsis thaliana]  
Length = 236

Score = 196 bits (498), Expect = 3e-49  
Identities = 82/128 (64%), Positives = 104/128 (81%)  
Frame = +1

Query: 76

KTPCCIKVGLKRGPWTPPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCRLWWMNYLR 255  
++PCC K +G WT EED+ L +YI+ GEG WR+LPK AGLLRGKSCRL  
W+NYLR

Sbjct: 3

RSPCCEKAHTNKGAWTKEEDQRLVDYIRNHGEGCWRSPLKSAGLLRCGKSCRLRWINYLR 62

Query: 256

PSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 435  
P +KRG DE+ +I++LH LLGN+W+LIAGR+PGRTDNEIKNYWNTH+ +KL+S  
GID

Sbjct: 63

PDLKRGNFDDDEDQIIIKLHSLGKNSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTHIKRKLLSHGID 122

Query: 436 PRTHKPLN 459

P+TH+ +N

Sbjct: 123 PQTHRQIN 130

>gi|15227288|ref|NP\_179263.1| putative MYB family transcription factor [Arabidopsis thaliana]  
gi|2129777|pir||S58292 myb-related protein Y49 - Arabidopsis thaliana  
gi|928969|emb|CAA62033.1| (X90385) Y49 [Arabidopsis thaliana]

**gi|1020157|gb|AAA98762.1| (U26937) DNA-binding protein [Arabidopsis thaliana]**

**gi|4581115|gb|AAD24605.1|AC005825\_12 (AC005825) putative MYB family transcription factor [Arabidopsis thaliana]**

**Length = 269**

Score = 196 bits (497), Expect = 4e-49  
Identities = 83/128 (64%), Positives = 105/128 (81%)  
Frame = +1

Query: 76

KTPCCIKVGLKRGWPWTPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLTPKRAGLLRCGKSCRLWMMNYLR 255  
++PCC K + +G WT EEDE L +YIK GEG WR+LP+ AGLLRCGKSCRL  
W+NYLR

Sbjct: 3

RSPCCEKEHMNKGAWTKEEDERLVSIIKSHGEGCWRSLPRAAGLLRCGKSCRLRWINYLR 62

Query: 256

PSVKGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 435  
P +KRG DE++LI++LH LLGN+W+LIA R+PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KL+S+GID

Sbjct: 63

PDLKRGNFTHDEDELIKLSLLGNKWSLIAARLPGRTDNEIKNYWNTHIKRKLSSKID 122

Query: 436 PRTHKPLN 459

P TH+ +N

Sbjct: 123 PATHRGIN 130

**>gi|82310|pir||JQ0957 myb-related protein 330 - garden snapdragon**

**Length = 274**

Score = 196 bits (497), Expect = 4e-49  
Identities = 82/128 (64%), Positives = 105/128 (81%)  
Frame = +1

Query: 76

KTPCCIKVGLKRGWPWTPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLTPKRAGLLRCGKSCRLWMMNYLR 255  
++PCC K +G WT EED+ L NYI+ GEG WR+LPK AGLLRCGKSCRL  
W+NYLR

Sbjct: 3

RSPCCEKAHTNKGAWTKEEDQRLINIRAHGEGCWRSLPKAAGLLRCGKSCRLRWINYLR 62

Query: 256

PSVKGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQID 435  
P +KRG +E+++I++LH LLGN+W+LIAG +PGRTDNEIKNYWNTH+  
+KL+S+GID

Sbjct: 63  
PDLKRGNFTEEEDEIIIKLHSLGKNSLIAGALPGRTDNEIKNYWNTHIKRKLVSRGID 122

Query: 436 PRTHKPLN 459  
P+TH+ LN

Sbjct: 123 PQTHRSLN 130

>gi|2129933|pir||S69189 myb-related protein TMH27 - tomato  
gi|1167484|emb|CAA64614.1| (X95296) transcription factor  
[Lycopersicon esculentum]  
Length = 273

Score = 196 bits (497), Expect = 4e-49  
Identities = 83/128 (64%), Positives = 105/128 (81%)  
Frame = +1

Query: 76  
KTPCCIKVGLKRGWPWTPPEEDEVLANIYIKKEGEGRWRTLPKRAGLLRCGKSCRLWMMNYLR 255  
++PCC K +G WT EEDE L +YI+ GEG WR+LPK AGLLRGKSCRL

W+NYLR

Sbjct: 3

RSPCCEKAHTNKGAWTKEEEDERLISYIRAHGEGCWRSPLKAAGLLRCGKSCRLRWINYLR 62

Query: 256  
PSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYWNTHLSKKLISQGID 435  
P +KRG +E++LI++LH LLGN+W+LIAGR+PGRTDNEIKNYWNTH+

+KL+S+GID

Sbjct: 63

PDLKRGNFTEEEDELIIKLHSLGKNSLIAGRPLGRTDNEIKNYWNTHIRKLLSRGID 122

Query: 436 PRTHKPLN 459  
P TH+ +N

Sbjct: 123 PTHRSIN 130

## Séquence partielle d'un ADNc codant une région N terminale d'un facteur de type MYB nommée VvMybCs3

GCT ACC CCA TCT CTC TTC TTT CTT TCT TTC TTT TCT TCG GAG ACT TCT TCT TCT TCT  
TCT

Extension 5'

TCT TCT ACA AAT CTC TCT CCC TCG CTA TTT CTG TTC TCA CTG ACA AAA **ATG** GGC AGA  
TCA

M G R

S

121/5

151/15

CCA TGC TGT GAC AAG GTG GGG TTG AAG AAA GGG CCA TGG ACT CCG GAA GAA GAC CAG  
AAA

P C C D K V G L K K G P W T P E E D Q  
K

181/25

211/35

CTC TTG GCT TAC ATT GAA GAA CAC GGC CAT GGG AGC TGG CGA GCT TTG CCA TCA AAA  
GCG

L L A Y I E E H G H G S W R A L P S K  
A

```

241/45                               271/55
GGG CTT CAG AGA TGT GGC AAG AGT TGC AGA CTG AGA TGG ACT AAT TAT CTG AGG CCT
GAC
  G   L   Q   R   C   G   K   S   C   R   L   R   W   T   N   Y   L   R   P
D
301/65                               331/75
ATT AAG AGA GGA AAA TTC AGT TTA CAG GAG GAA CAG ACA ATC ATT CAA CTC CAT GCC
CTC
  I   K   R   G   K   F   S   L   Q   E   E   Q   T   I   I   Q   L   H   A
L
361/85                               391/95
TTG GGG AAC AGG TGG TCG GCT ATA GCA ACT CAC TTG CCT AAG AGA ACA GAC AAT GAG
ATC
  L   G   N   R   W   S   A   I   A   T   H   L   P   K   R   T   D   N   E
I
421/105
AAG AAC TAC TGG AAC AC
  K   N   Y   W   N

```

## Alignements

**>gi|282964|pir||S26605 myb-related protein 1 - garden petunia  
gi|20563|emb|CAA78386.1| (Z13996) protein 1 [Petunia x hybrida]  
Length = 421**

Score = 236 bits (603), Expect = 2e-62  
Identities = 107/109 (98%), Positives = 109/109 (99%)  
Frame = +1

```

Query: 109 MGRSPCCDKVGLKKG PWTPEEDQKLLAYIEEHGHG SWRALPSKAGLQRCGKSCRLRWTNY 288
          MGRSPCCDKVGLKKG PWTPEEDQKLLAYIEEHGHG SWRALP+KAGLQRCGKSCRLRWTNY
Sbjct: 1   MGRSPCCDKVGLKKG PWTPEEDQKLLAYIEEHGHG SWRALPAKAGLQRCGKSCRLRWTNY 60

```

```

Query: 289 LRPDIKRGK FSLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN 435
          LRPDIKRGKF+LQEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN
Sbjct: 61  LRPDIKRGKFTLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN 109

```

**>gi|15232045|ref|NP\_186763.1| (NC\_003074) putative Myb-related  
transcription factor [Arabidopsis  
thaliana]  
gi|6714474|gb|AAF26160.1|AC008261\_17 (AC008261) putative Myb-related  
transcription factor [Arabidopsis  
thaliana]  
gi|7644368|gb|AAF65559.1|AF249309\_1 (AF249309) putative  
transcription factor [Arabidopsis thaliana]  
Length = 345**

Score = 232 bits (592), Expect = 4e-61  
Identities = 104/109 (95%), Positives = 107/109 (97%)  
Frame = +1

```

Query: 109 MGRSPCCDKVGLKKG PWTPEEDQKLLAYIEEHGHG SWRALPSKAGLQRCGKSCRLRWTNY 288
          MGRSPCCDK GLKKG PWTPEEDQKLLAYIEEHGHG SWR+LP KAGLQRCGKSCRLRWTNY
Sbjct: 1   MGRSPCCDKAGLKKG PWTPEEDQKLLAYIEEHGHG SWRSLPEKAGLQRCGKSCRLRWTNY 60

```

```

Query: 289 LRPDIKRGK FSLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN 435
          LRPDIKRGKF++QEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN
Sbjct: 61  LRPDIKRGKFTVQEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN 109

```

>gi|15242272|ref|NP\_197035.1| (NC\_003076) myb-related protein - like  
[Arabidopsis thaliana]  
gi|11274013|pir||T49966 myb-related protein-like - Arabidopsis  
thaliana  
gi|7671500|emb|CAB89341.1| (AL353993) myb-related protein-like  
[Arabidopsis thaliana]  
gi|13877709|gb|AAK43932.1|AF370613\_1 (AF370613) myb-related protein-  
like [Arabidopsis thaliana]  
Length = 326

Score = 232 bits (591), Expect = 5e-61  
Identities = 104/109 (95%), Positives = 107/109 (97%)  
Frame = +1

Query: 109 MGRSPCCDKVGLKKGWPTPEEDQKLLAYIEEHGHGSWRALPSKAGLQRCGKSCRLRWTNY 288  
MGRSPCCDK+GLKKGWPTPEEDQKLLAYIEEHGHGSWR+LP KAGL RCGKSCRLRWTNY  
Sbjct: 1 MGRSPCCDKLGLKKGWPTPEEDQKLLAYIEEHGHGSWRSLPEKAGLHRCGKSCRLRWTNY 60

Query: 289 LRPDIKRGKFSLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN 435  
LRPDIKRGKF+LQEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN  
Sbjct: 61 LRPDIKRGKFNLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN 109

>gi|13346188|gb|AAK19616.1|AF336283\_1 (AF336283) GHMYB25 [Gossypium  
hirsutum]  
Length = 309

Score = 231 bits (590), Expect = 7e-61  
Identities = 105/109 (96%), Positives = 107/109 (97%)  
Frame = +1

Query: 109 MGRSPCCDKVGLKKGWPTPEEDQKLLAYIEEHGHGSWRALPSKAGLQRCGKSCRLRWTNY 288  
MGRSPCC+KVGLKKGWPTPEEDQKLLAYIE+HGHGSWRALP KAGLQRCGKSCRLRW NY  
Sbjct: 1 MGRSPCCCKVGLKKGWPTPEEDQKLLAYIEQHGHGSWRALPLKAGLQRCGKSCRLRWNY 60

Query: 289 LRPDIKRGKFSLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN 435  
LRPDIKRGKFSLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN  
Sbjct: 61 LRPDIKRGKFSLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN 109

>gi|4886264|emb|CAB43399.1| (AJ006292) Myb-related transcription  
factor mixta-like 1  
[Antirrhinum majus]  
Length = 359

Score = 228 bits (581), Expect = 8e-60  
Identities = 102/109 (93%), Positives = 106/109 (96%)  
Frame = +1

Query: 109 MGRSPCCDKVGLKKGWPTPEEDQKLLAYIEEHGHGSWRALPSKAGLQRCGKSCRLRWTNY 288  
MGRSPCCDKV LK+GPWPTPEEDQKLL+YI+EHGHGSWRALPSKAGLQRCGKSCRLRW+NY  
Sbjct: 1 MGRSPCCDKVSLKRGWPTPEEDQKLLSYIQEHGHGSWRALPSKAGLQRCGKSCRLRWSNY 60

Query: 289 LRPDIKRGKFSLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN 435  
LRPDIKRGKFSLQEEQ IIQLHA LGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN  
Sbjct: 61 LRPDIKRGKFSLQEEQAIQLHAF LGNRWSAIATHLPKRTDNEIKNYWN 109

>gi|629736|pir||S44926 gene MIXTA protein - garden snapdragon  
gi|629737|pir||S45338 myb-related protein MIXTA - garden snapdragon  
gi|485867|emb|CAA55725.1| (X79108) mixta [Antirrhinum majus]  
gi|743793|prf||2013346A myb-related protein [Antirrhinum majus]  
Length = 321

Score = 220 bits (561), Expect = 2e-57  
Identities = 100/109 (91%), Positives = 104/109 (94%)  
Frame = +1

Query: 109 MGRSPCCDKVGLKKG PWTPEEDQKLLAYIEEHGHG SWRALPSKAGLQRCGKSCRLRWTNY 288  
M RSPCCDKVG+KKG PWT +EDQKLLAYIEEHGHG SWR+LP KAGLQRCGKSCRLRW NY  
Sbjct: 1 MVRSPCCDKVGVKKG PWTVDEEDQKLLAYIEEHGHG SWRSLPLKAGLQRCGKSCRLRWANY 60

Query: 289 LRPDIKRGKFSLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIAATHLPKRTDNEIKNYWN 435  
LRPDIKRG FSLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIA+HLPKRTDNEIKNYWN  
Sbjct: 61 LRPDIKRGPFSLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIA SHLPKRTDNEIKNYWN 109

**>gi|15233021|ref|NP\_186944.1| (NC\_003074) putative MYB family  
transcription factor [Arabidopsis thaliana]  
gi|6728967|gb|AAF26965.1|AC018363\_10 (AC018363) putative MYB family  
transcription factor [Arabidopsis thaliana]  
gi|7644370|gb|AAF65560.1|AF249310\_1 (AF249310) putative  
transcription factor [Arabidopsis thaliana]  
Length = 321**

Score = 204 bits (520), Expect = 9e-53  
Identities = 89/109 (81%), Positives = 99/109 (90%)  
Frame = +1

Query: 109 MGRSPCCDKVGLKKG PWTPEEDQKLLAYIEEHGHG SWRALPSKAGLQRCGKSCRLRWTNY 288  
MGRSPCCD+ GLKKG PWTPEEDQKL+ +I +HGHG SWRALP +AGL RCGKSCRLRWTNY  
Sbjct: 1 MGRSPCCDESLKKG PWTPEEDQKLINHIRKHGHG SWRALPKQAGLNRCGKSCRLRWTNY 60

Query: 289 LRPDIKRGKFSLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIAATHLPKRTDNEIKNYWN 435  
LRPDIKRG F+ +EEQTII LH+LLGN+WS+IA HLP RTDNEIKNYWN  
Sbjct: 61 LRPDIKRGNF TAE EEEQTIIINLHSL LGNKWSSIAGHLPGR TDNEIKNYWN 109

**>gi|15218730|ref|NP\_174726.1| (NC\_003070) myb-related protein,  
putative [Arabidopsis thaliana]  
gi|5668784|gb|AAD46010.1|AC007894\_8 (AC007894) Strong similarity to  
M4 protein gb|X90381 from  
Arabidopsis thaliana and contains 2 PF|00249 Myb-like  
DNA-binding domains. EST gb|H36793 comes from this gene  
Length = 365**

Score = 203 bits (516), Expect = 3e-52  
Identities = 89/109 (81%), Positives = 98/109 (89%)  
Frame = +1

Query: 109 MGRSPCCDKVGLKKG PWTPEEDQKLLAYIEEHGHG SWRALPSKAGLQRCGKSCRLRWTNY 288  
MGRSPCCD+ GLKKG PWTPEEDQKL+ YI +HGHG SWRALP A L RCGKSCRLRWTNY  
Sbjct: 1 MGRSPCCDENGLKKG PWTPEEDQKLIDYIHKHGHG SWRALPKLADLNRCGKSCRLRWTNY 60

Query: 289 LRPDIKRGKFSLQEEQTIIQLHALLGNRWSAIAATHLPKRTDNEIKNYWN 435  
LRPDIKRGKFS +EEQTI+ LH++LGN+WSAIAATHL RTDNEIKN+WN  
Sbjct: 61 LRPDIKRGKFS A EEEQTILHLHLSILGNKWSAIAATHLQGR TDNEIKNF WN 109

## ***ANNEXE 2***

## Composition de milieux de culture végétale :

Milieu MS (Murashige et Skoog, 1962)

<b>Macroéléments</b>	
CaCl <sub>2</sub>	3mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25 mM
KNO <sub>3</sub>	20 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,5 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	21 mM

### Microéléments :

CoCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	0,1 µM
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,1 µM
FeNaEDTA	0,1 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 mM
KI	5 µM
MnSO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	1 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	1 µM
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	30 µM

### Vitamines :

Glycine	27 µM
Myo-Inositol	0,5 mM
Acide nicotinique	4 µM
Pyridoxine HCl	2,5 µM
Thiamine HCl	0,3 µM

### Sucres :

Saccharose	87 mM
pH	5,6-5,8

Milieu GM pour culture cellulaire de cellules embryogènes :

Macroéléments :

KNO <sub>3</sub>	95 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	100 mM
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	15 mM
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	6 mM

Microéléments :

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 µM
MnSO <sub>4</sub> , 1H <sub>2</sub> O	10 µM
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	3 µM
KI	500 nM
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	10 nM
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	10 nM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	100 nM

Solution de Lamport :

FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	11 µM
Na <sub>2</sub> , EDTA	8 µM

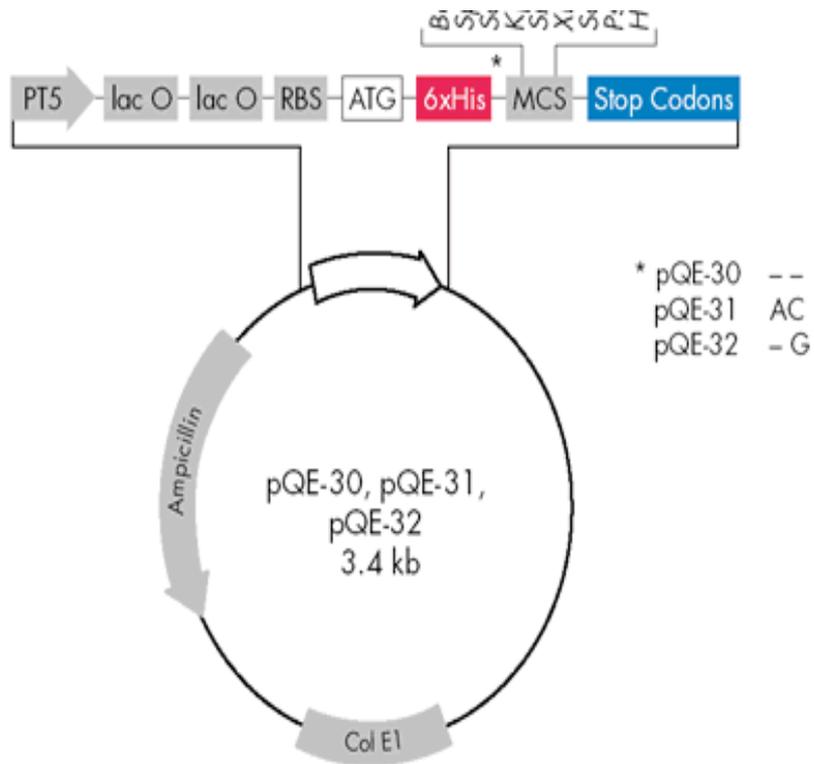
Vitamines :

Biotine	20 nM
Pyridoxine	400 nM
Acide nicotinique	400 nM
Myo-Inositol	40 µM
Thiamine	150 nM

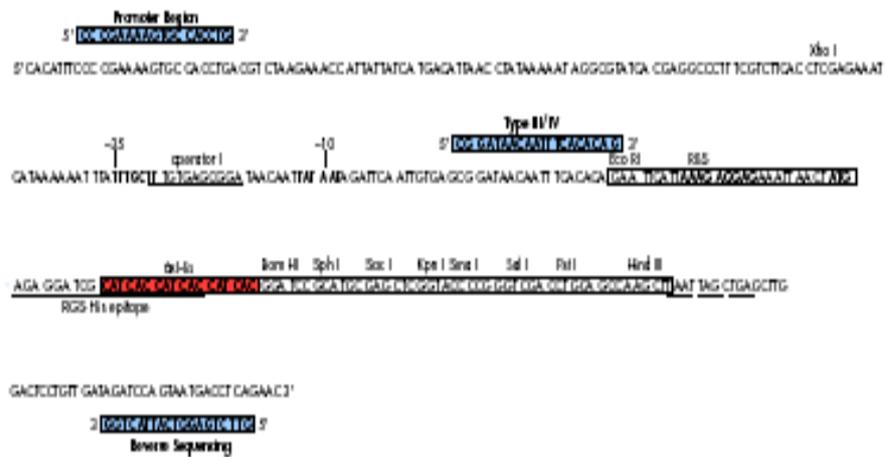
Glycérol	0,46% (m/v)
Maltose	50 mM
Hydrolysats de Caséine	0,1 % (m/v)

pH 5,8

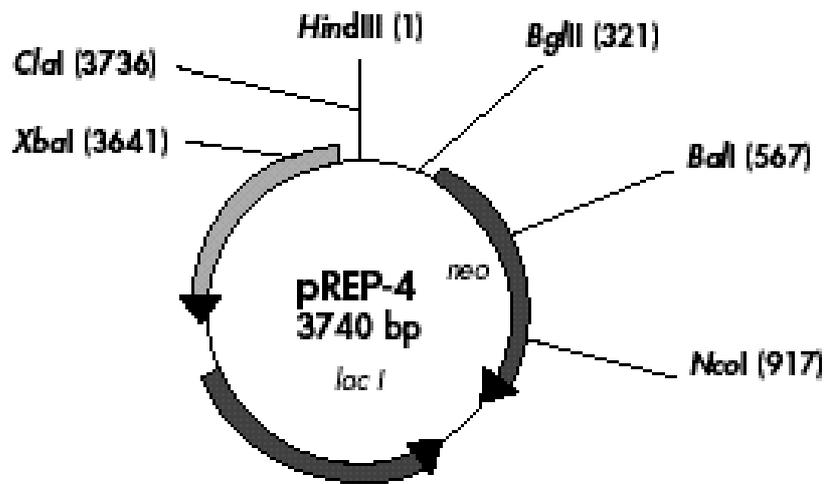
## ***ANNEXE 3***



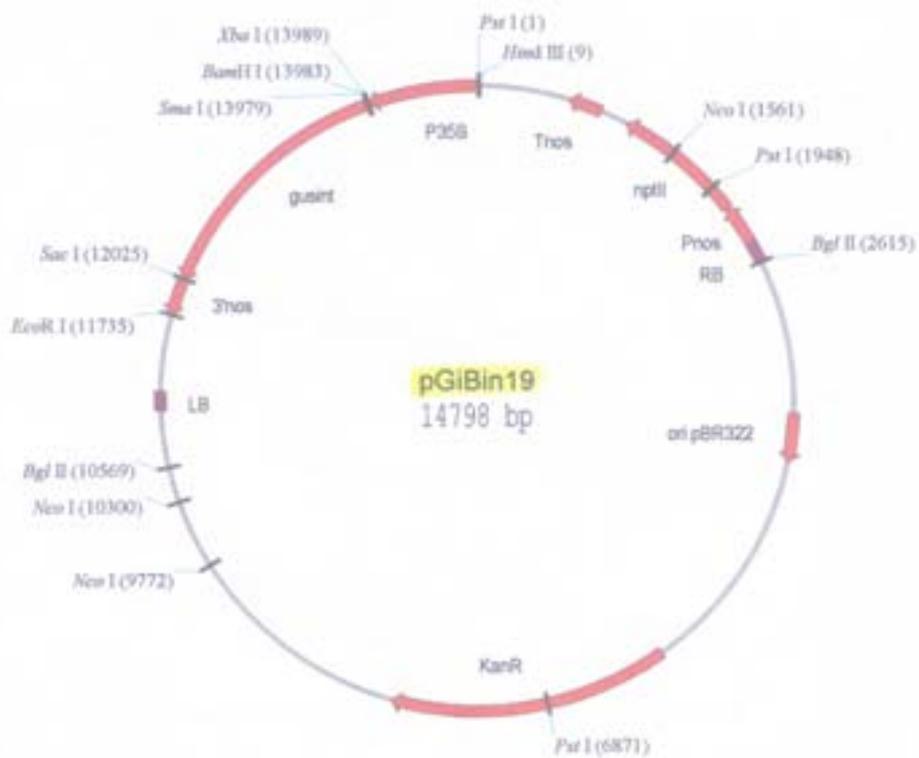
Cartographie de vecteur *pQE 30*



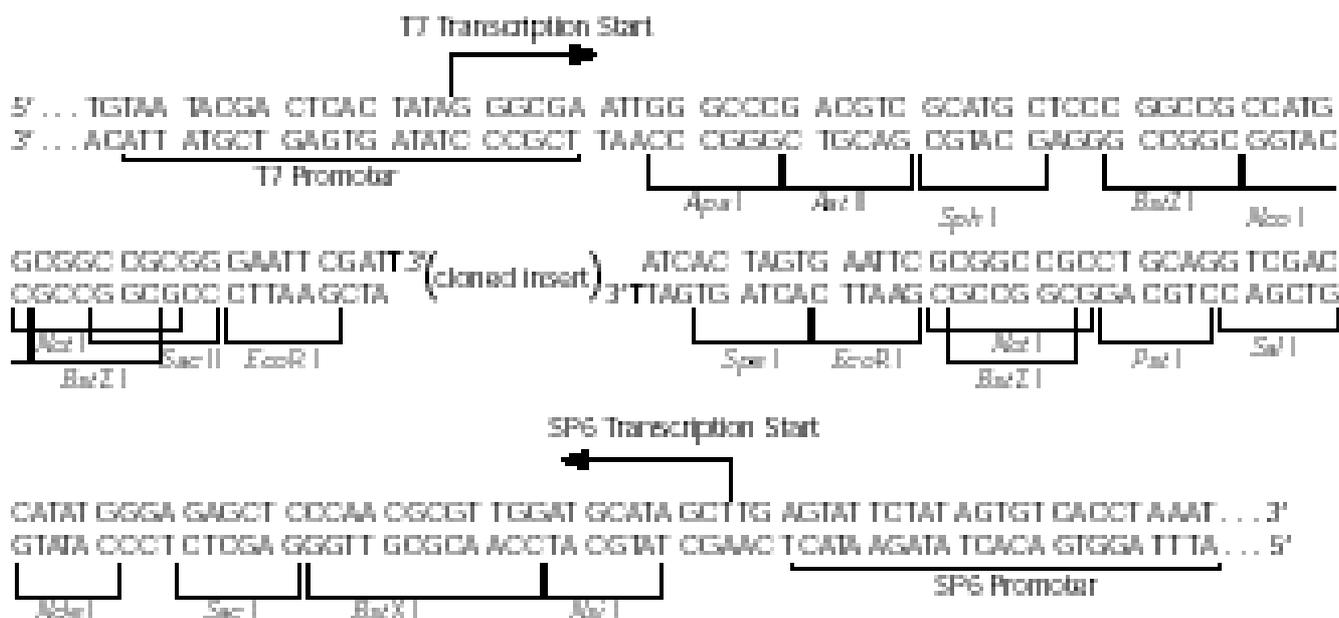
Séquence du multi-sites de clonage du vecteur *pQE 30*



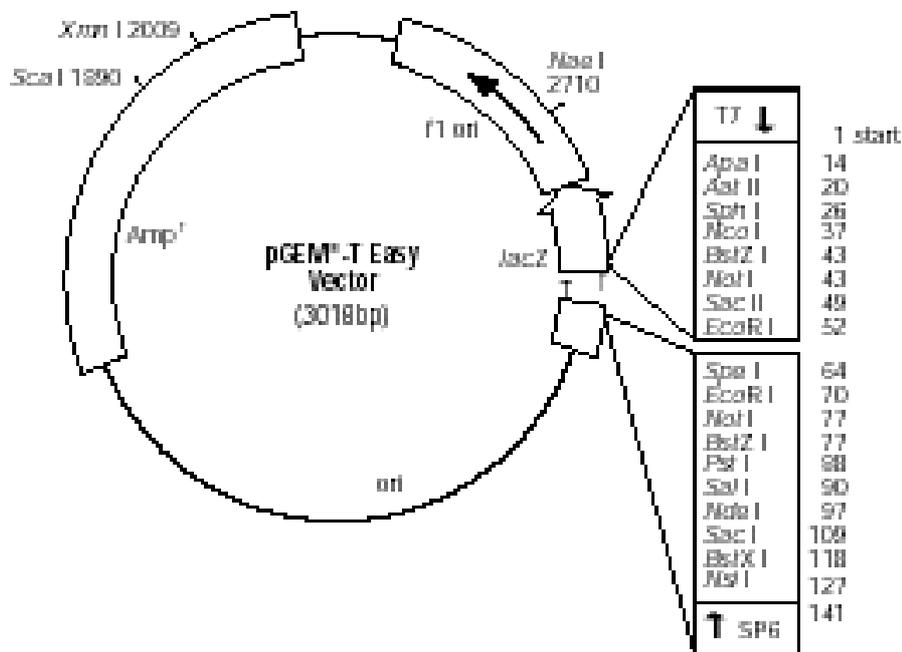
Carte de restriction du *pREP4*.



Carte de restriction du vecteur d'expression *PgiBin19*.



Sites multiples de clonage du PgemTEasy.



Carte de restriction du vecteur pGEM T Easy

## ***ANNEXE 4***

## Listing des amorces utilisées pour le clonage et les études d'expression par RT-PCR

### a) Amorces universelles

5'Primer	Sens	TCCGAGATCTGGACGAGC	56.6
T7	Antisens	TAATACGACTCACTATAGGGAGA	54.9
35 S	Sens	GGAAAGGCCATCGTTGAAGA	55.4
3'Nos	Antisens	TCATCGCAAGACCGGCAACA	57.4

### b) Amorces spécifiques à VvMybCs1 et VvMybCs2

VvMybCs1-3'S	Sens	CCCCACCCAGCAATTTCTGTG	59,8
VvMybCs1-3'AS	Antisens	CCATTTACATACGATATTCACAC	55,3
VvMybCs2-3'S	Sens	CATCTCCAACAACAGCAC	52,1
VvMybCs2-3'AS	Antisens	CAACAACACAACCACATAC	50,6

### c) Amorces transgénèse et expression dans *E.Coli*

VvMybCs1-XbaI	Sens	AACCAATGGATCCGTCTAGAGAGA	56.9
VvMybCs1-SacI	Antisens	CAAGAGTGGGAGCTCATACAACATC	60.6
VvMybCs2-XbaI	Sens	GGGTCTAGAGAGAAAGAAGAA	56.3
VvMybCs2-SacI	AntiSens	ACTATAGAGCTCATTGCAGG	53.3

d) Amorces RT-PCR, les amorces concernant la DFR , C4H et la CHI de Tabac ne sont pas données car elles ont été déduites de clones ADNc généreusement prêtée par le Docteur Cathie Martin (Equipe Génétique des Plantes, John Innes Center, Norwich, UK) et sont sous l'obligation d'une diffusion limitée.

UBQ-S	Sens	GAAGAAGCTCAACCAAAG	49,8
UBQ-AS	Antisens	GAGTCTAGAACATCACAAAC	51,3
EF1-S	Sens	GCGGGCAAGAGATACCTCAA	57,5
EF1-AS	Antisens	TCAATCTGTCTAGGAAAGGAAG	54,4
PAL-S	Sens	GCCAACAGGATAAAAGAATGC	53,9
PAL-AS	Antisens	TCCCACAATATAAGCCCAAGC	53,9
4CL1-S	Sens	CACACTGGCGACATTGGGTTTCATT	60,4
4CL1-AS	Antisens	TTCGCCCCTTGCCAAACTGGAAAT	60,4
4CL2-S	Sens	CATTGATGATGACGACGAGCTT	56,3
4CL2-AS	Antisens	TCCTCCTTTTGCCAATTCGGTA	56,3
ChS-S	Sens	CCTTTGGGAATTTCTGATTGG	53,9
ChS-AS	Antisens	TCCCACAATATAAGCCCAAGC	55,8
COMT I-S	Sens	CTTTGGAGGATTAAGCAATATA	56,7
COMT I-AS	Antisens	AAGCTTTTTCCTAACACACTGC	54,2
CcoAOMT-II S	Sens	CCCTATGGAATGGTTCTGTGG	53,7
CcoAOMT-II AS	Antisens	GAGTCCTCCCTTACATTATAAA	52,3

## ***ANNEXE 5***

### Milieux de cultures des bactéries :

-Milieu LB (Luria Bertani) : pour un litre : Bacto-tryptone (Duchefa) 5 g  
Extrait de Levure (Duchefa) 5 g  
NaCl 10 g  
Stérilisation par autoclavage (20 minutes, 121°C).

-Milieu Psi-Broth : pour un litre : Milieu LB 1 l  
MgSO<sub>4</sub> 4 mM  
KCl 10 mM

-Milieu LB-Agar : pour un litre : Milieu LB 1 l  
Bacto-Agar (Sigma) 15 g  
Stérilisation par autoclavage (20 minutes, 121° C).

-Milieu YEB : pour un litre : Saccharose 5 g  
Bacto-peptone 5 g  
Extrait de bœuf 5 g  
Extrait de levure 1 g  
MgSO<sub>4</sub> 10 mM  
Ajuster le pH à 7,2  
Stérilisation par autoclavage (20 minutes, 121°C).

Stock d'antibiotiques : Tous les stocks d'antibiotique et de substrats pour l'induction des bactéries sont à une concentration 1000X:

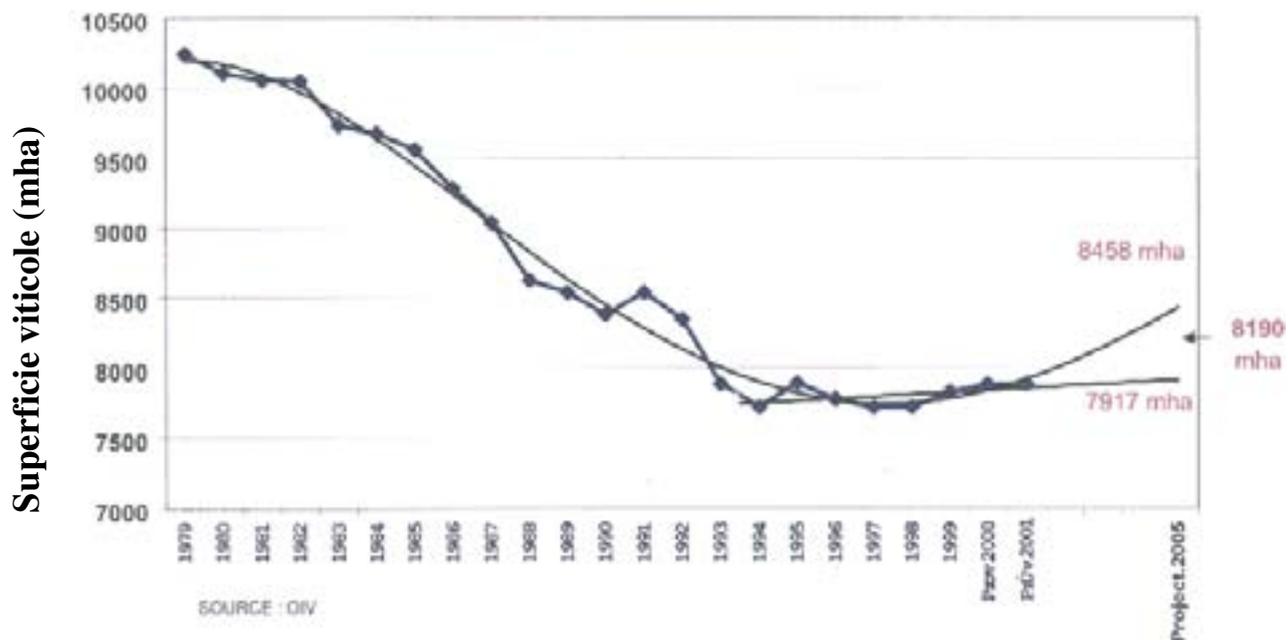
	<b>Stock</b>		<b>Finale</b>
Kanamycine :	50 mg/l	50	µg/l
Ampicilline :	100 mg/l	100	µg/l
X-Gal :	20mg/l	20	µg/l
IPTG :	8 mg/l	8	µg/l

Solution de biologie moléculaire :

Solutions	Composition	pH
TAE 50X	2 M Tris-HCl, pH = 8 50 mM EDTA 250 mM d'acétate de sodium	8
SSC 20X	3 M NaCl 0,3M de citrate de sodium	7
SSPE 20X	3 M NaCl 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM EDTA	7,4
Tampon phosphate 0,1 M	61 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O 39mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	7
Solution de Denhardt 50 X	1% (m/v) Ficoll 400 1% (m/v) polyvinylpyrrolidone 360 1% (m/v) BSA	



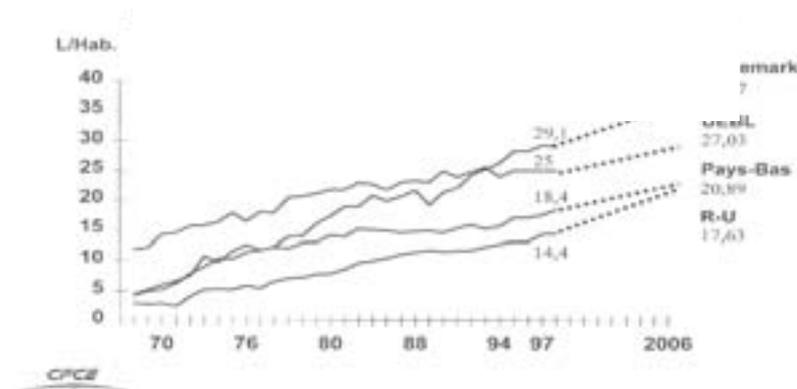




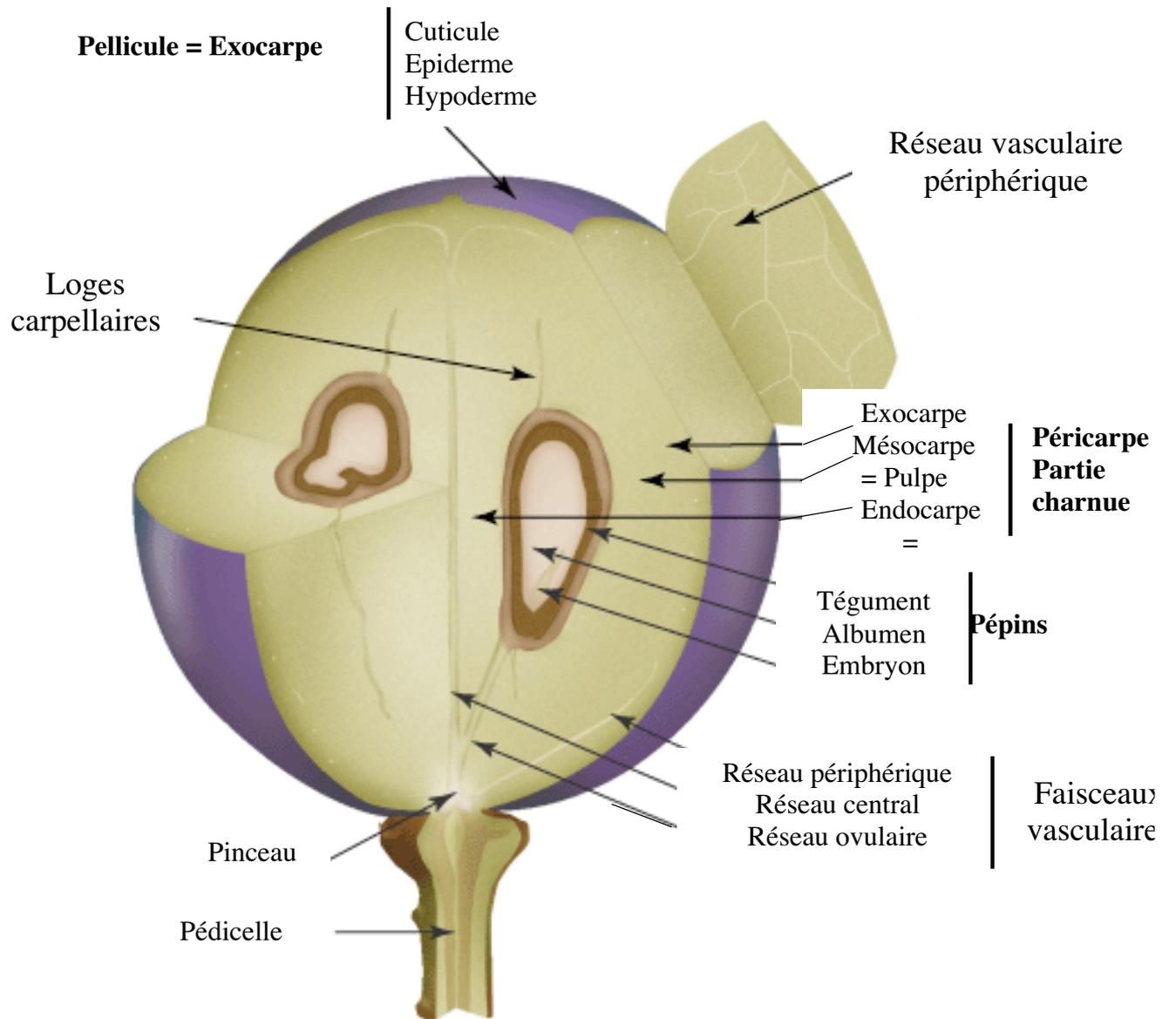
**Figure 1 :** Evolution des superficies viticoles dans le monde depuis 1979. Les superficies sont données en milliers d’hectares (mha). (Source OIV, année 2001)

Pays	Superficie viticole (milliers d’hectares)				Evolution 1998-2001
	1998	1999	2000	2001	
Etats-Unis	372	384	413	415	+11,6%
Argentine	210	208	209	213	+1,4%
Chili	144	158	174	175	+21,5%
Australie	98	123	140	160	+63,3%
Afrique du Sud	111	115	117	118	+6,4%

**Tableau 1 :** Progression des surfaces viticoles des nouveaux pays producteurs (source OIV, 2001)



**Figure 2 :** Evolution de la consommation de vin dans les pays Européens non producteurs. L’étude a été réalisée sur les trente dernières années (source OIV, 2001). La consommation de vin est donnée en litre par habitant (L/Hab.).



**Figure 3 :** Structure d'une baie mûre. D'après Coombe (1987).

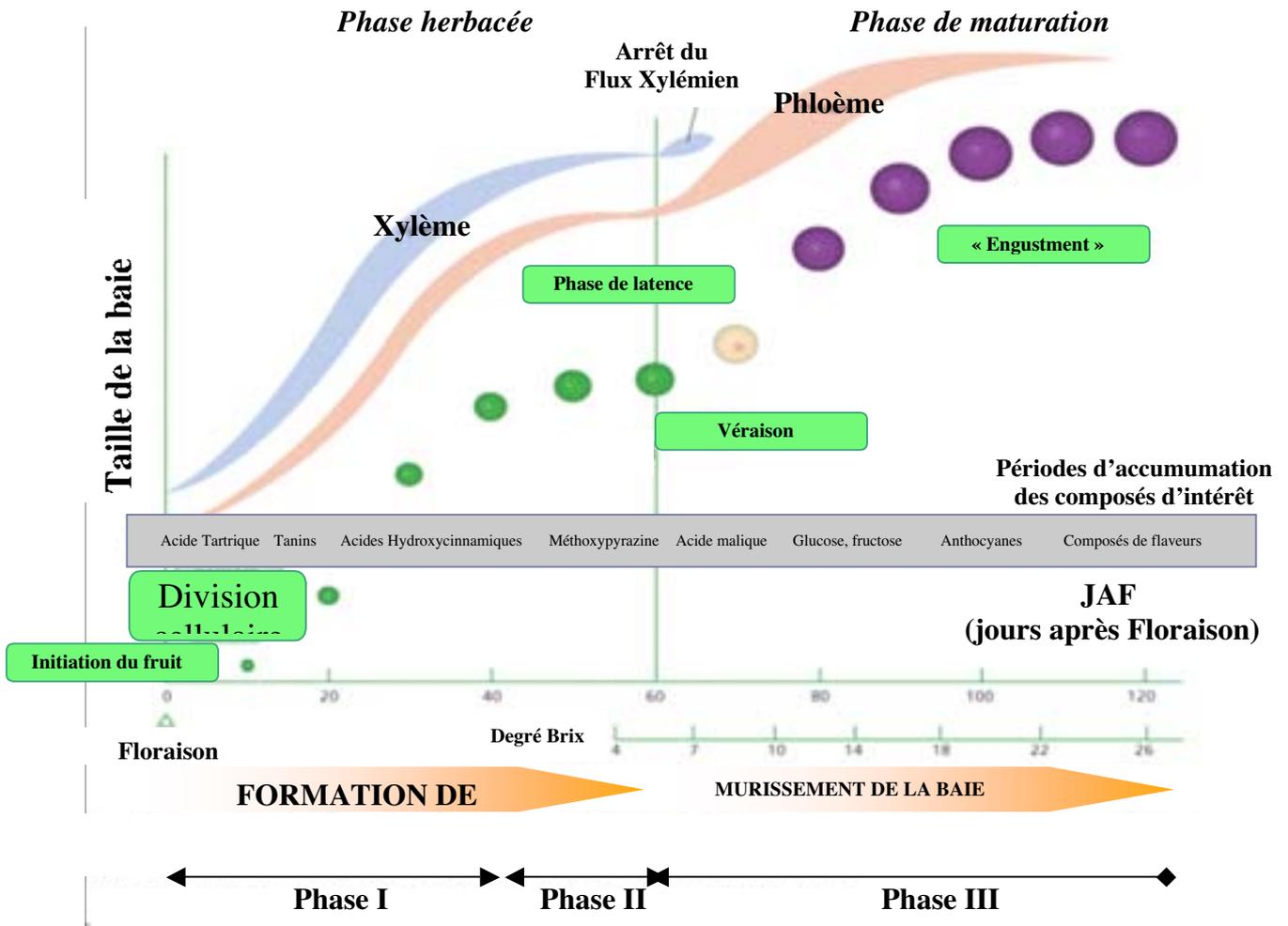


Figure 4 : Croissance et métabolisme de la baie de raisin.

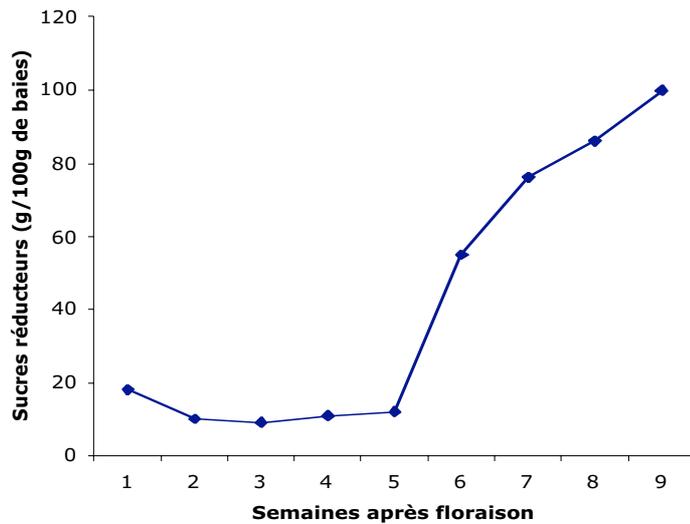
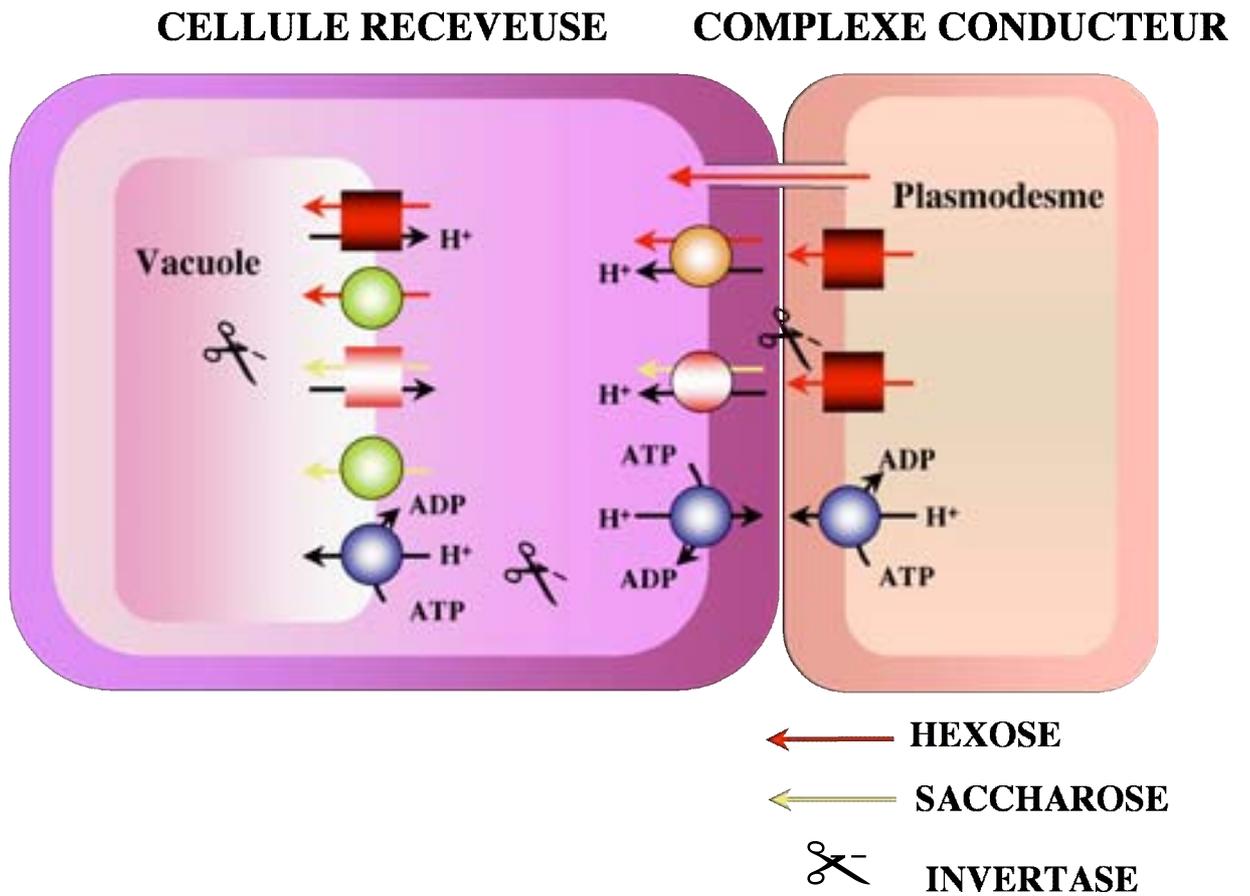
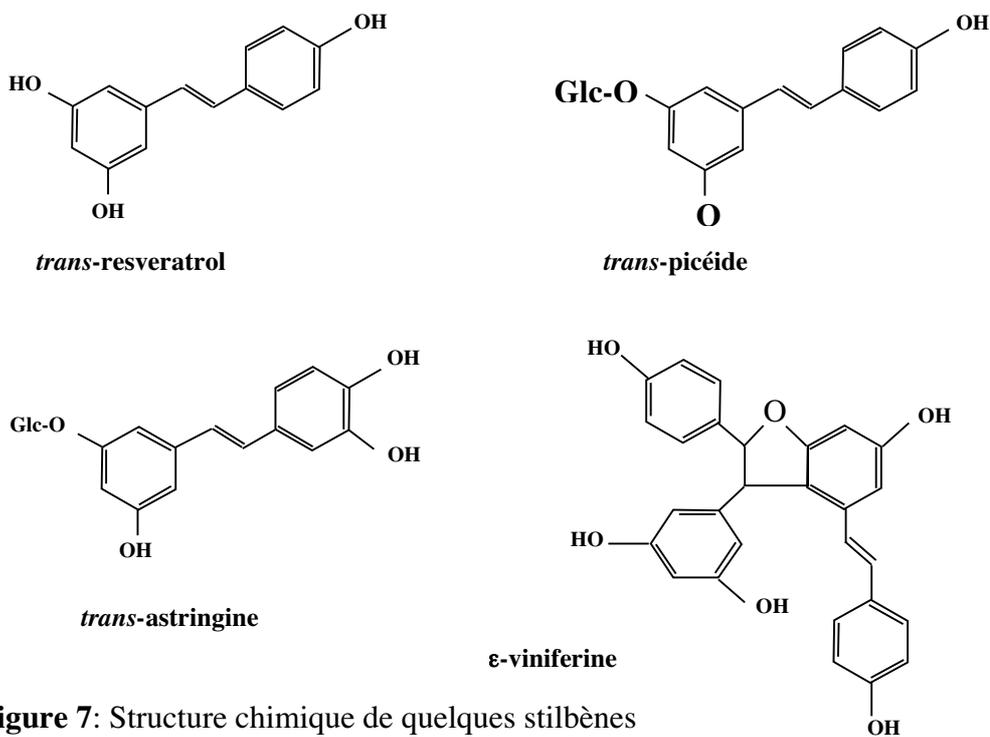


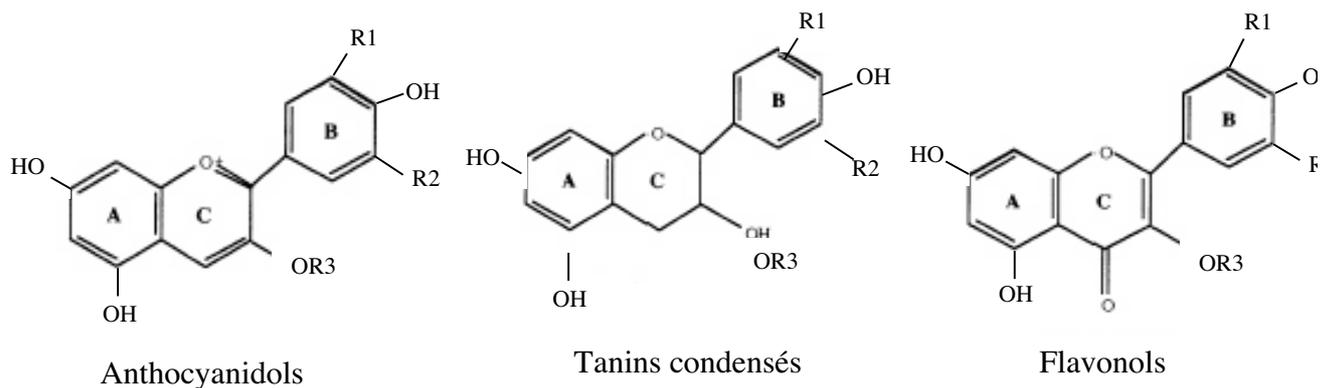
Figure 5 : Evolution de la teneur en sucres réducteurs au cours du développement de la baie (Cv Syrah). D'après Davies et Robinson (1996).



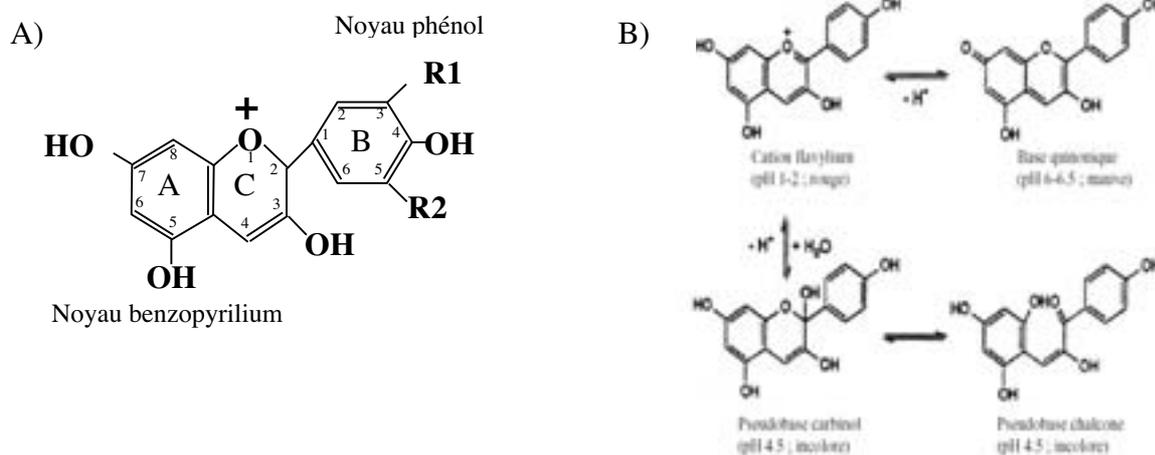
**Figure 6 :** Hypothèses du transport du déchargement des photoassimilats dans la baie.  
D'après Delrot (2000).



**Figure 7:** Structure chimique de quelques stilbènes



**Figure 8** : Différences structurales des squelettes carbonés entre les différentes classes de flavonoides présentes chez la baie de raisin.



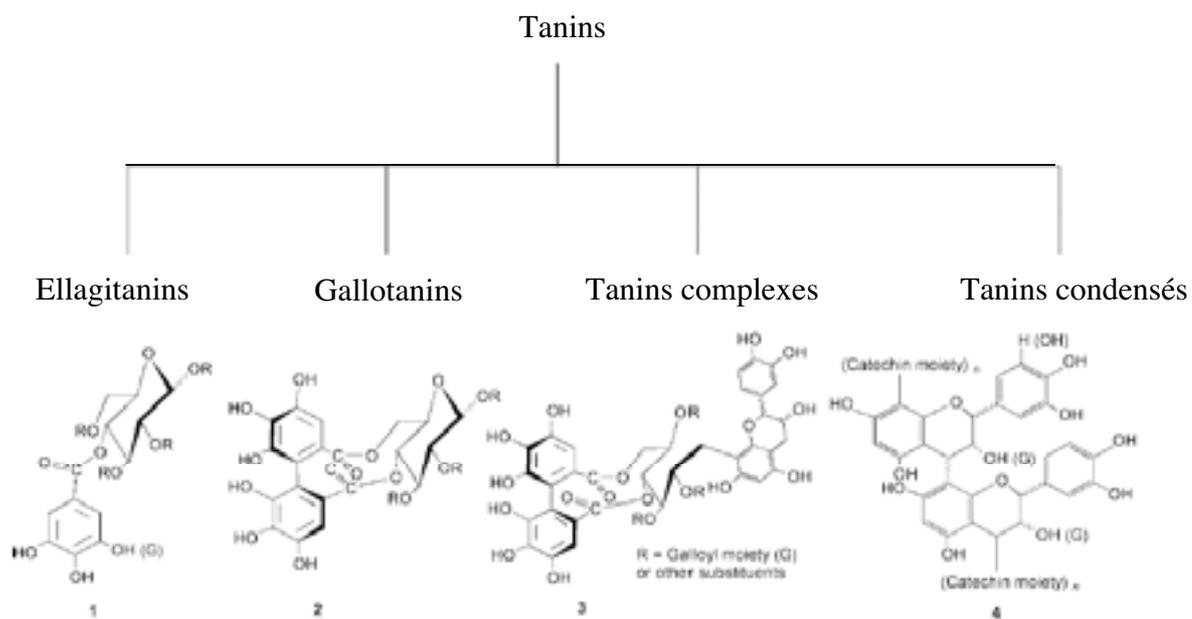
**Figure 9** : Structures des anthocyanidols.

A) Représentation schématique du squelette carboné

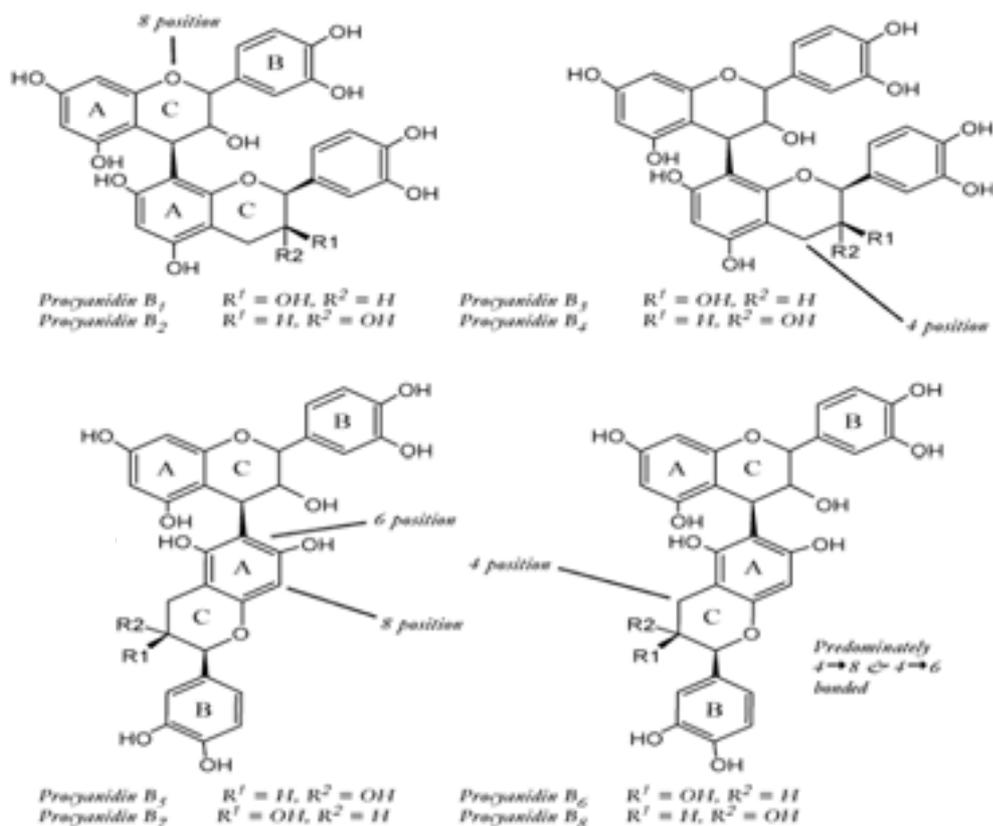
B) Transformation structurale des anthocyanidines en solution aqueuse en fonction du pH, d'après Strake (1997).

	R1	R2	Couleur à pH<1
<b>Cyanidol (Cy)</b>	OH	H	Orange-Rouge
<b>Delphinidol (Dp)</b>	OH	OH	Violet
<b>Pétunidol (Pt)</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	Violet
<b>Péonidol (Pn)</b>	OCH <sub>3</sub>	H	Rouge
<b>Malvidol (Mv)</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Violet

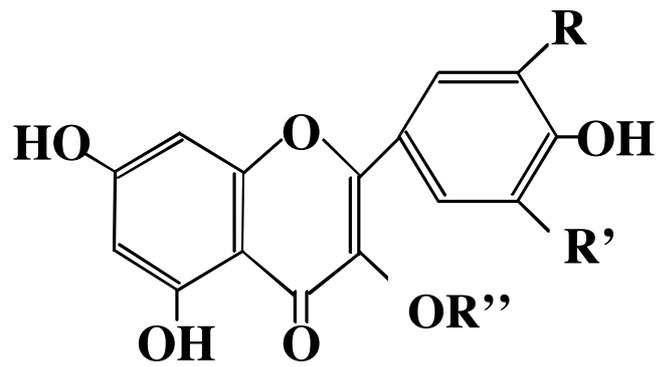
**Tableau 2** : Effets de la nature des radicaux sur la couleur des anthocyanidols



**Figure 10** : Classification des tanins. D'après Khanbabace et Ree (2001).



**Figure 11** : Exemples de structures de procyanidines de type B. D'après Bombardelli et Mazoranni (1995).



Composés	R	R'	R''
Kaempférol	-	-	H
Quercétine	OH	-	H
Myricétine	OH	OH	H
Rutine	OH	-	Glucose

**Figure 12** : Exemples de quelques flavonols simples et glycosylés.

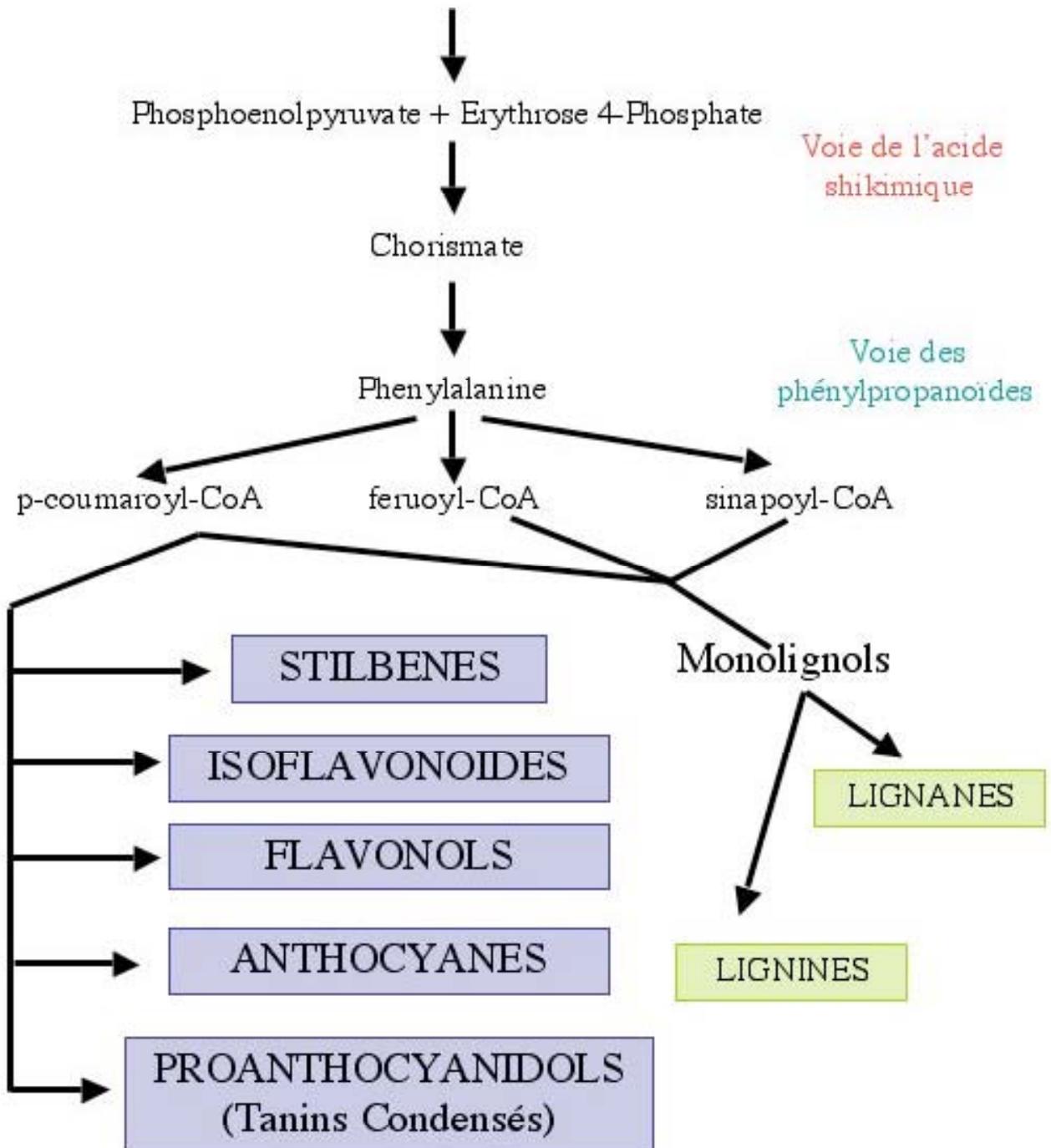
A) Squelette flavonol

B) Identification des composés en fonction des radicaux

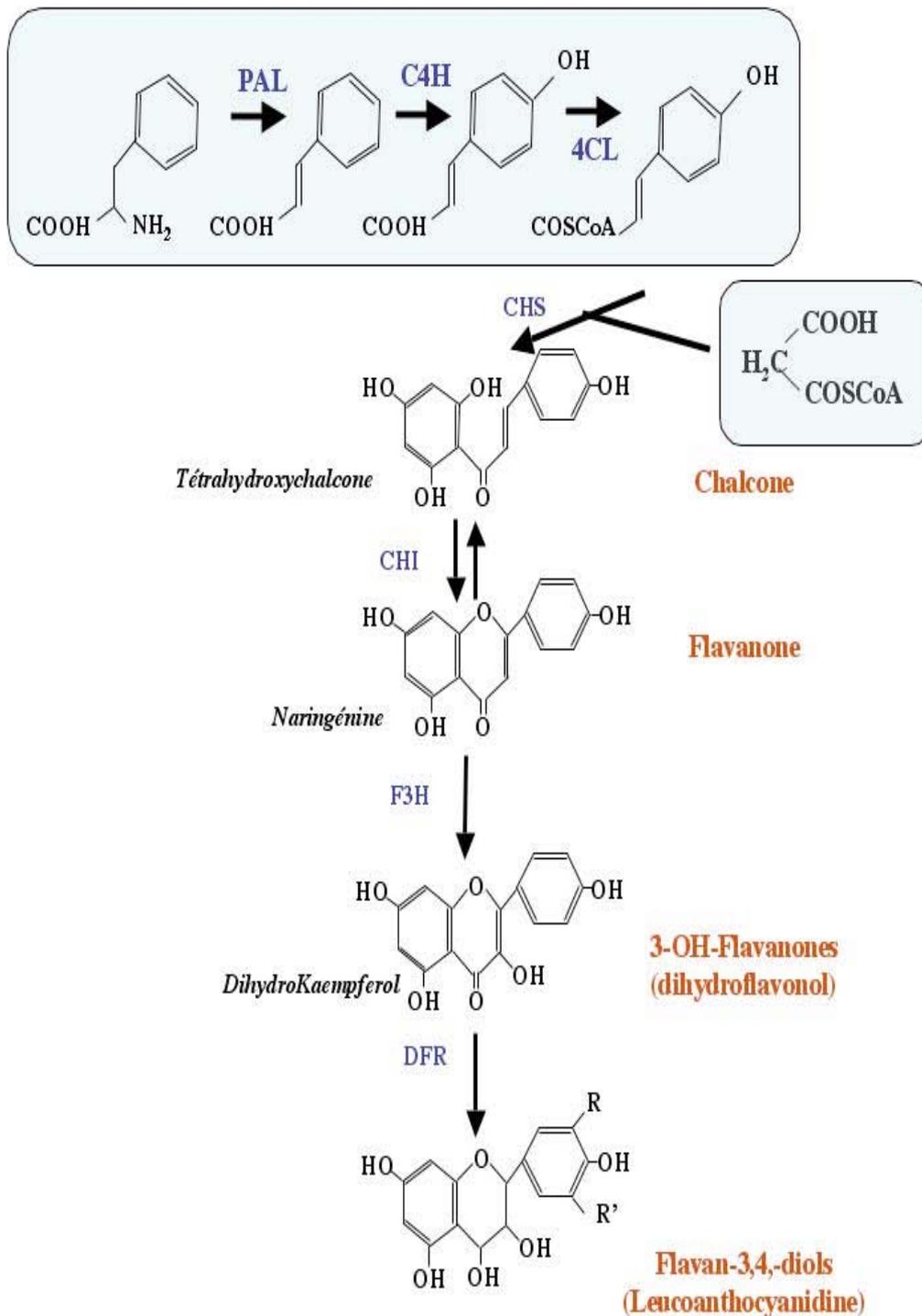
Composés	R1	R2	R3
3 $\beta$ -D-glucoside de delphinidol	OH	OH	Glu
3 $\beta$ -D-glucoside de cyanidol	OH	H	Glu
3 $\beta$ -D-glucoside de pétunidol	OCH <sub>3</sub>	OH	Glu
3 $\beta$ -D-glucoside de péonidol	OCH <sub>3</sub>	H	Glu
3 $\beta$ -D-glucoside de malvidol	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Glu
3 $\beta$ -D-(6-acétyl glucoside) de delphinidol	OH	H	Ac-Glu
3 $\beta$ -D-(6-acétyl glucoside) de cyanidol	OH	OH	Ac-Glu
3 $\beta$ -D-(6-acétyl glucoside) de pétunidol	OCH <sub>3</sub>	H	Ac-Glu
3 $\beta$ -D-(6-acétyl glucoside) de péonidol	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Ac-Glu
3 $\beta$ -D-(6-acétyl glucoside) de malvidol	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Ac-Glu
3 $\beta$ -D-(6- <i>p</i> -coumaroyl glucoside) de delphinidol	OH	OH	Cou-Glu
3 $\beta$ -D-(6- <i>p</i> -coumaroyl glucoside) de cyanidol	OH	H	Cou-Glu
3 $\beta$ -D-(6- <i>p</i> -caffeoyl glucoside) de malvidol	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Caf-Glu
3 $\beta$ -D-(6- <i>p</i> -coumaroyl glucoside) de pétunidol	OCH <sub>3</sub>	OH	Cou-Glu
3 $\beta$ -D-(6- <i>p</i> -coumaroyl glucoside) de péonidol	OCH <sub>3</sub>	H	Cou-Glu
3 $\beta$ -D-(6- <i>p</i> -coumaroyl glucoside) de malvidol	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cou-Glu

**Tableau 3:** Liste des principales anthocyanes que l'on retrouve dans la baie de raisin. D'après Hmamouchi et *al.* (1995) et Souquet et *al.* (1996).

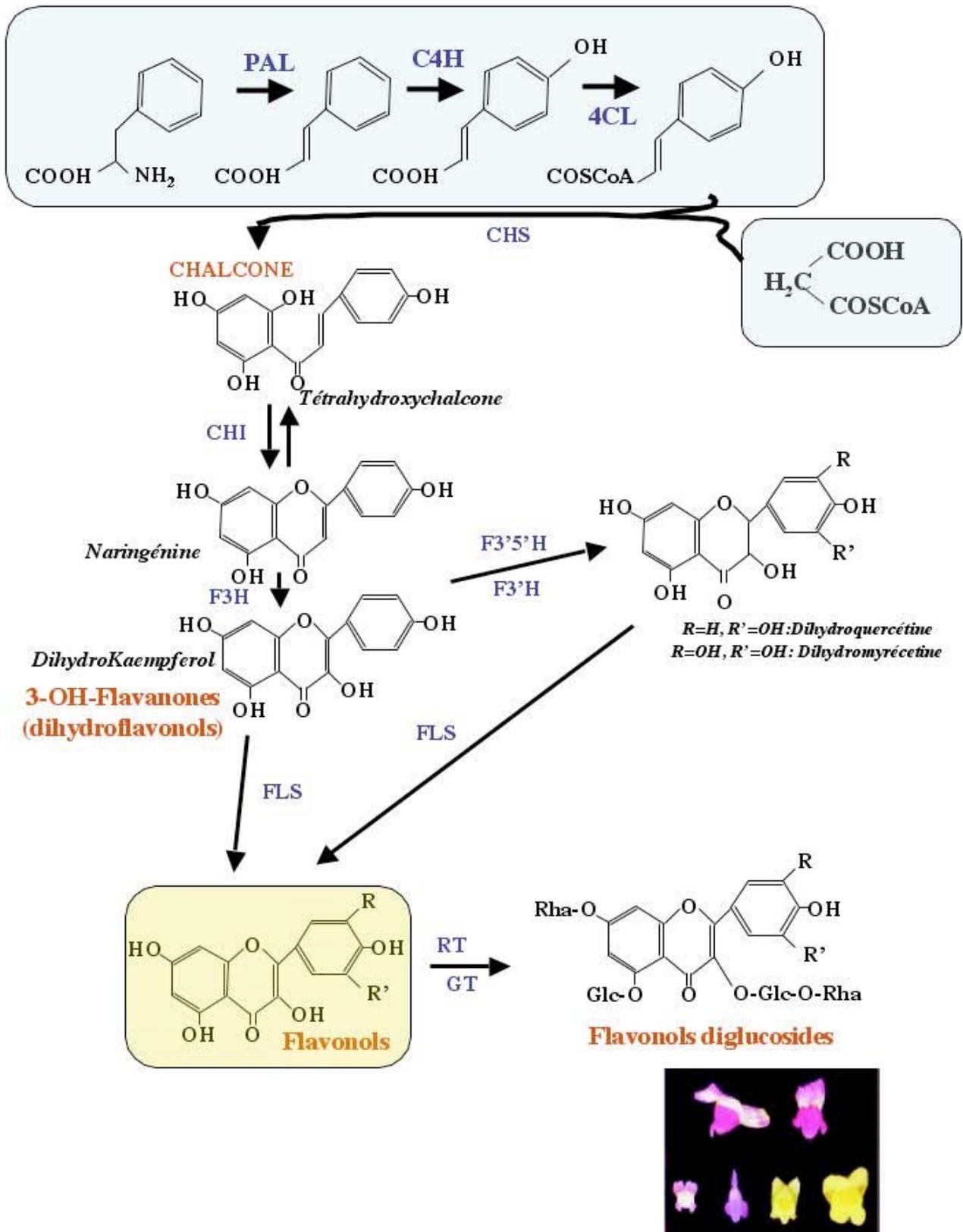
# Voie des Pentoses Phosphates



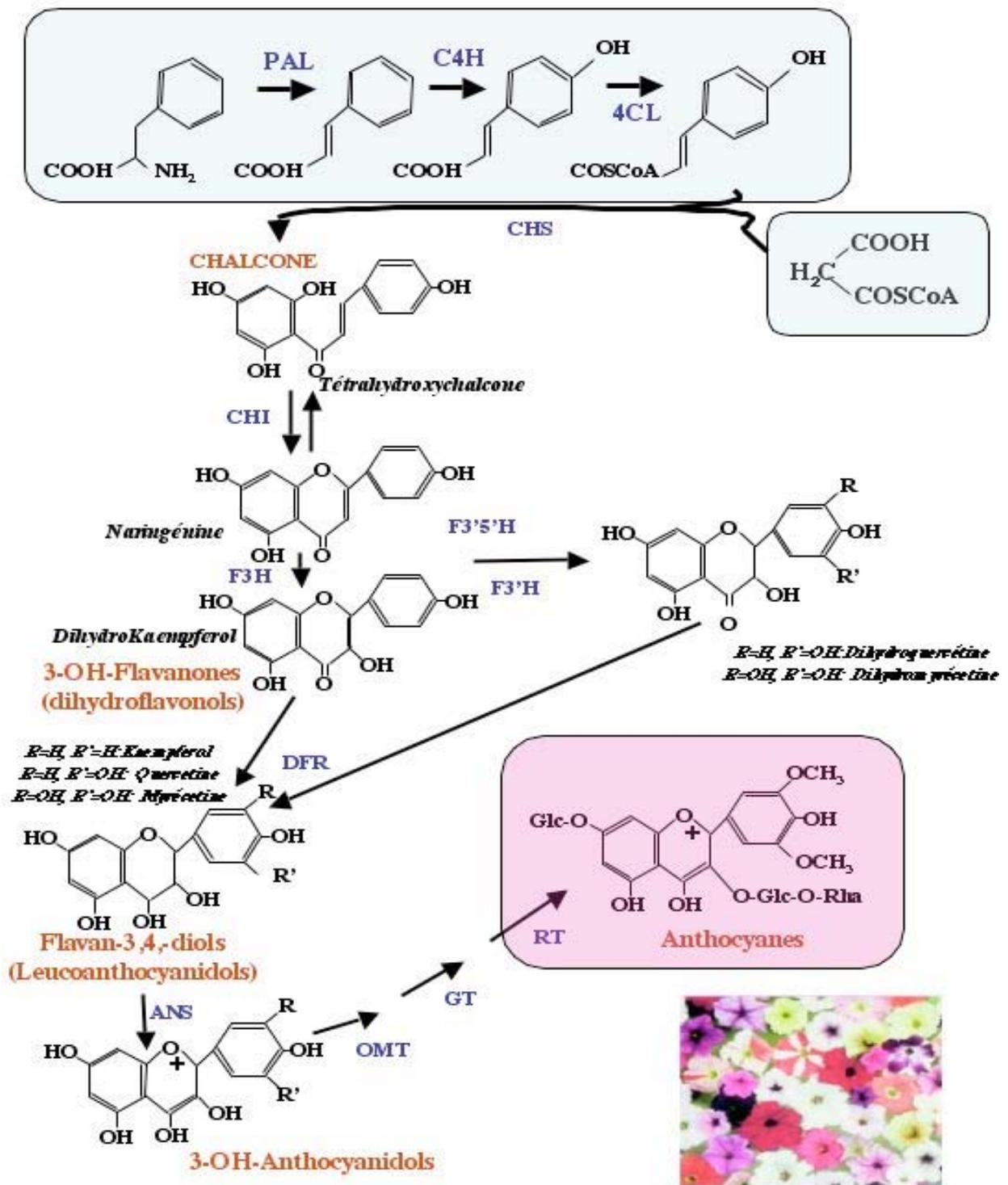
**Figure 13** : Voie schématique de biosynthèse des flavonoïdes et de lignines à partir des précurseurs de la voie des phénylpropanoïdes.



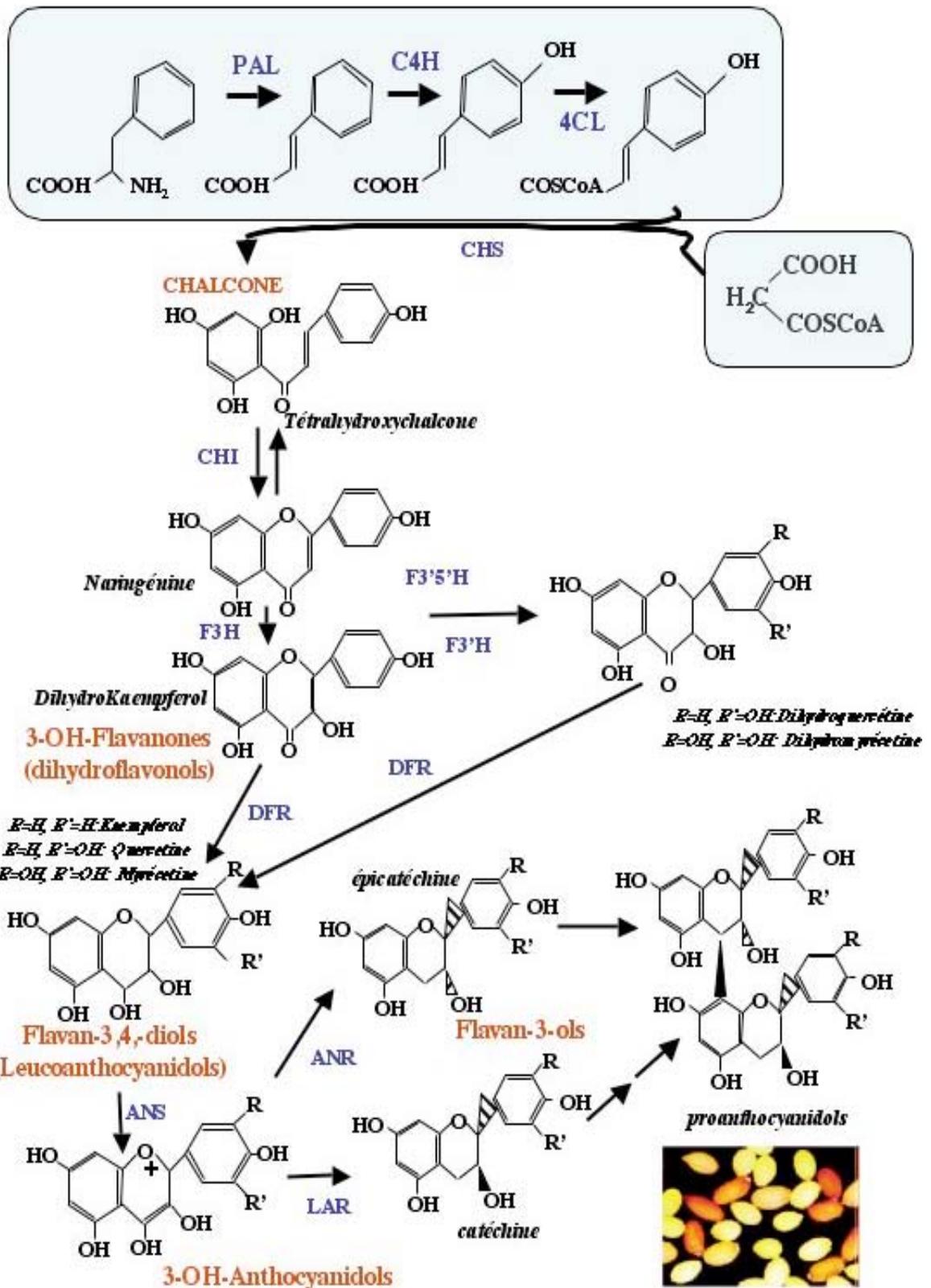
**Figure 14** : Schéma de la voie générale de biosynthèse des précurseurs des flavonoides chez les Végétaux. PAL, phénylalanine ammonia lyase ; C4H, cinnamate 4 hydroxylase ; 4CL, 4 coumaryl-CoA ligase ; CHS, chalcone synthase ; CHI, chalcone isomérase ; F3H, flavanone 3 hydroxylase ; DFR, dihydroflavonol réductase.



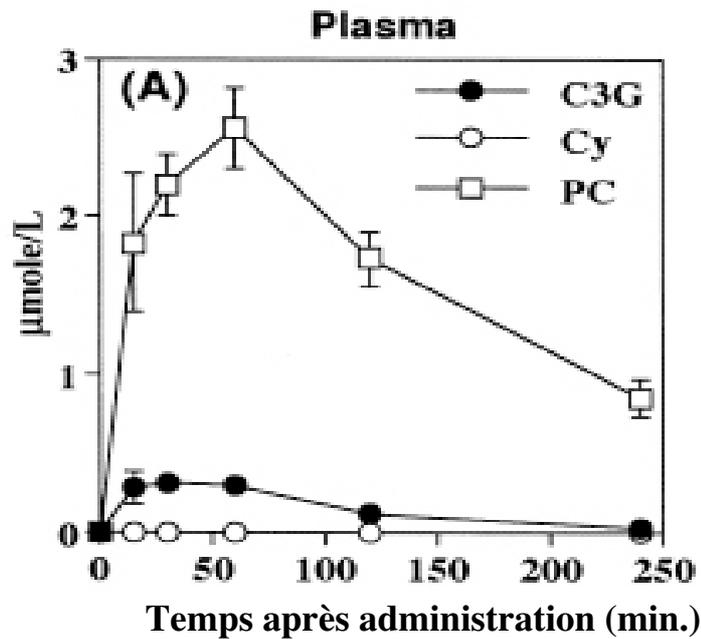
**Figure 15** : Schéma de la voie générale de biosynthèse des flavonols chez les Végétaux. PAL, phényl amonia lyase ; C4H, cinnamate 4 hydroxylase ; 4CL, 4 coumaryl-CoA ligase ; CHS, chalcone synthase ; CHI, chalcone isomérase ; FLS, flavonol synthase ; F3H, flavanone 3 hydroxylase ; F3'H, flavonoid 3' hydroxylase ; F3'5'H, flavonoid 3',5' hydroxylase ; RT, rhamnosyl transférase ; GT, glycosyl transférase.



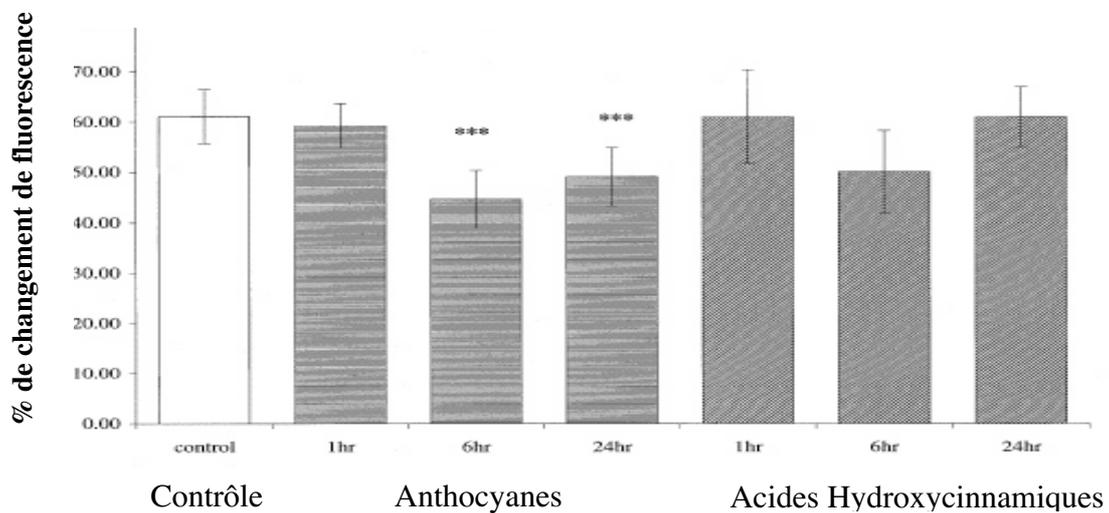
**Figure 16 :** Schéma de la voie générale de biosynthèse des Anthocyanes chez les Végétaux. PAL, phényl amonia lyase ; C4H, cinnamate 4 hydroxylase ; 4CL, 4 Coumaroyl-CoA Ligase ; CHS, chalcone synthase ; CHI, chalcone isomérase ; DFR, dihydroflavonol reductase ; F3H, flavanone 3 hydroxylase ; F3'H, flavonoid 3' hydroxylase ; F3'5'H, flavonoid 3',5' hydroxylase ; ANS, anthocyanidine synthase ; RT, rhamnose transférase ; GT, glucose transférase ; OMT, O methyl transférase



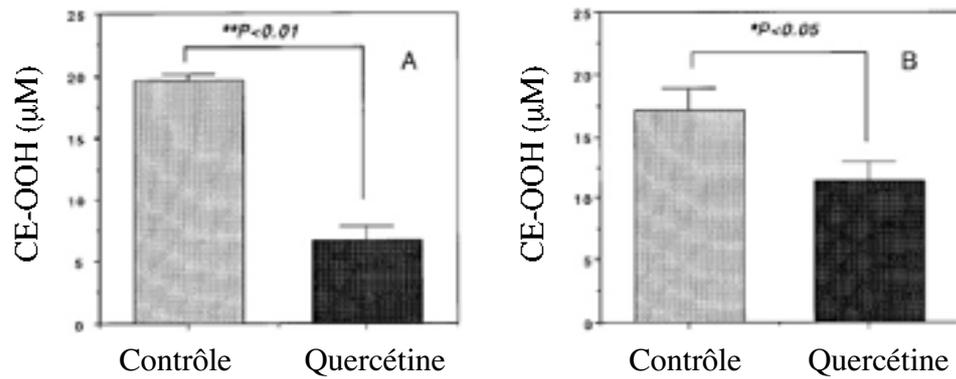
**Figure 17** : Schéma de la voie générale de biosynthèse des proanthocyanidines chez les Végétaux. PAL, phénylalanine amonia lyase; C4H, cinnamate 4 hydroxylase; 4CL, 4 coumaryl-CoA ligase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomérise; DFR, dihydroflavonol reductase; F3H, flavanone 3 hydroxylase; F3'H, flavonoid 3' hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3',5' hydroxylase; ANS, anthocyanidine synthase; ANR, anthocyanidine reductase; LAR, leucoanthocyanidine reductase.



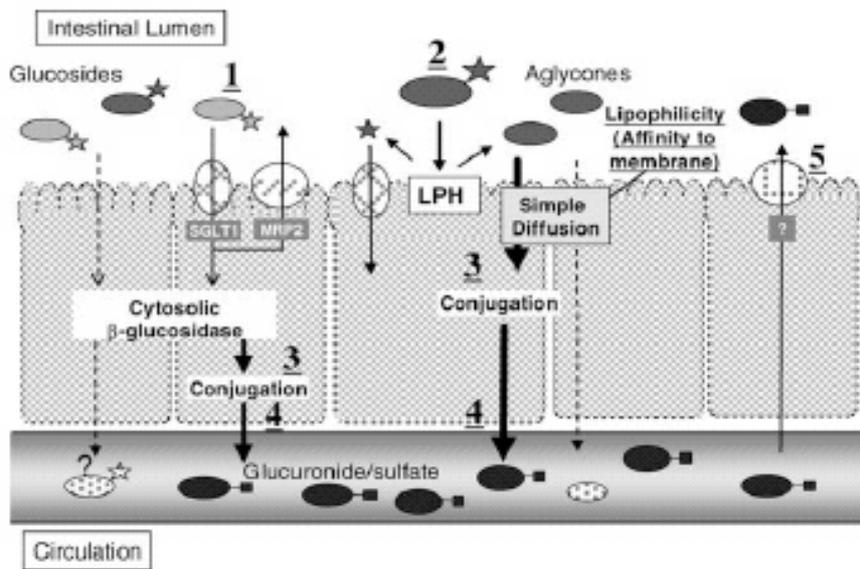
**Figure 18 :** Teneurs en Cyanidine 3 Glucoside (C3G), Cyanidine (Cy) et en acide protocatéchique (PC) dans le plasma d'un rat après administration orale de Cyanidine 3 Glucoside. Les mesures ont été répétées au moins trois fois. D'après Tsuda (1999).



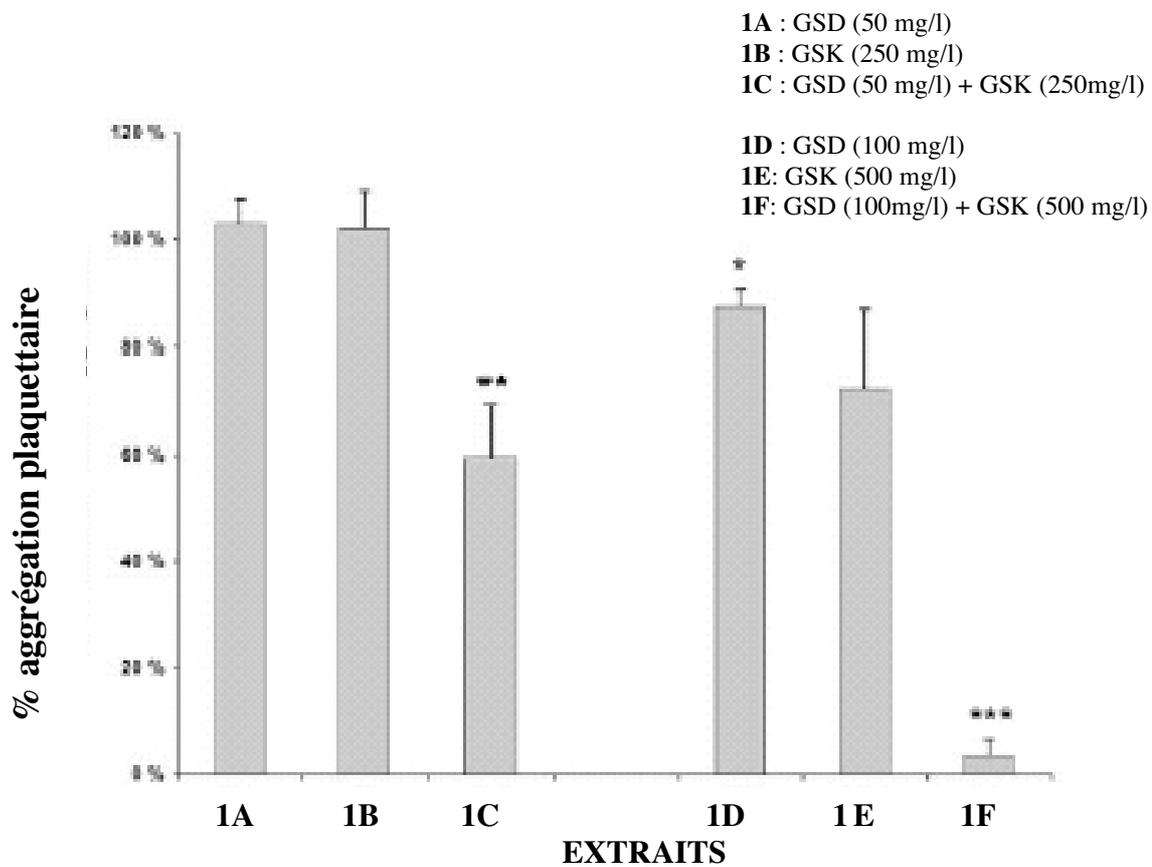
**Figure 19 :** Effet protecteur *in vitro* d'anthocyanes et d'acides hydroxycinnamiques contre une solution d' $H_2O_2$  (100 $\mu$ M), mesuré à différents temps sur des cellules sanguines prélevées à partir de rats ayant subi un régime alimentaire contenant 100 mg de composés phénoliques. Le changement de fluorescence des cellules est en relation avec leur vitalité. D'après Youdim (2000).



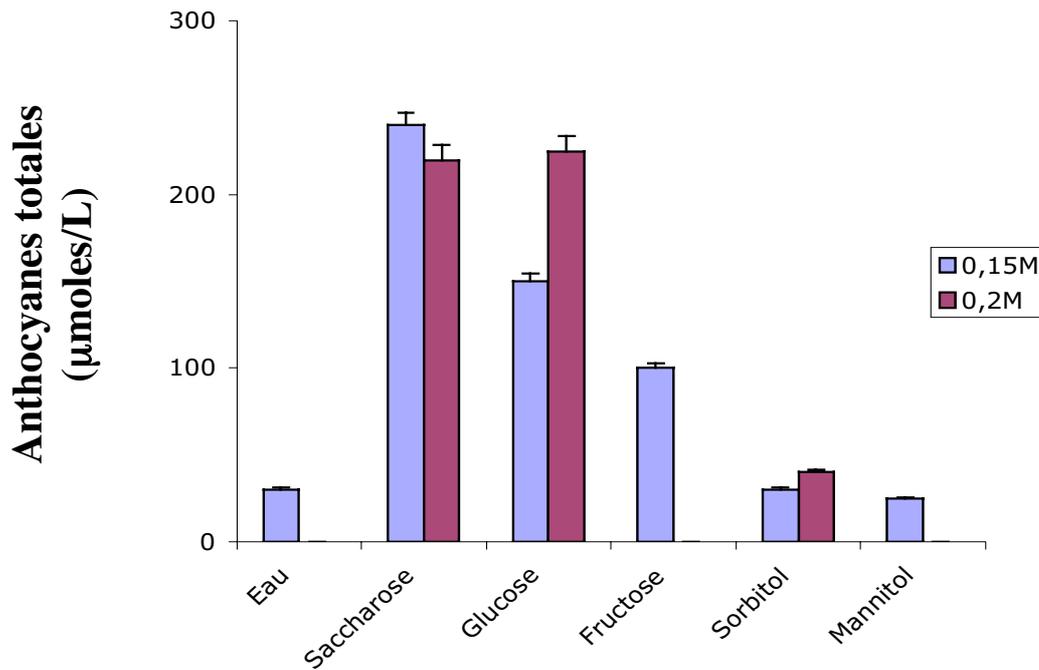
**Figure 20 :** Accumulation d'esters cholestéryl hyperoxydés (CE-OOH) par des lipoprotéines de rat. Les lipoprotéines sont incubées à 37°C pendant deux heures en présence de métabolites de quercétine et de sulfate de cuivre. **A:** 8,3 μM de Quercétine ; **B:** 3,7 μM de Quercétine. Le contrôle ne contient pas de quercétine. Les données sont obtenues à partir de trois rats différents pour chaque condition. D'après Yamamoto (1999).



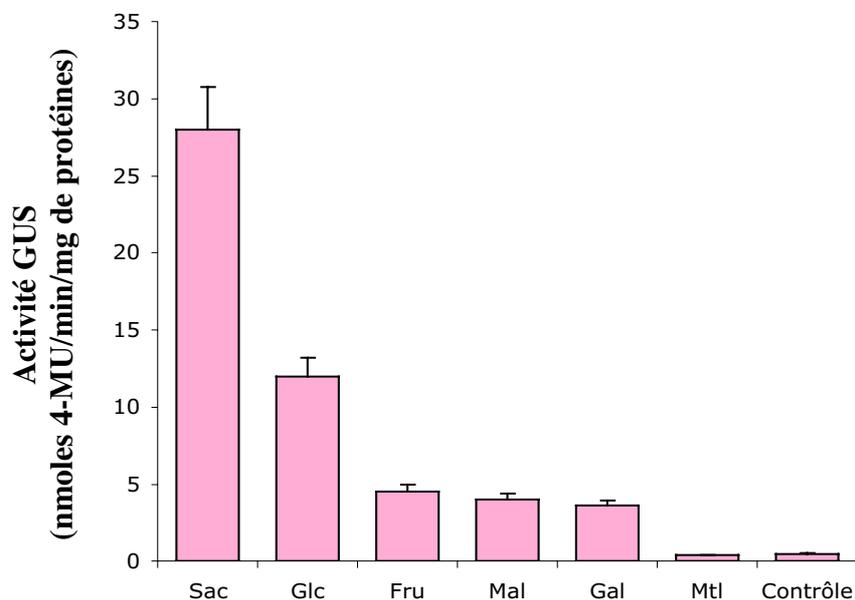
**Figure 21 :** Voies proposées pour l'absorption et le métabolisme des quercétines. LPH, Lactase Phloridzine Hydrolase ; SGLT1, Sodium-dépendant Glucose Transporteur 1 ; MRP2, Multi-drogue Résistance associée Protéine 2. **1**, implication du transporteur SGLT1 ; **2**, Hydrolyse de la quercétine par la LPH ; **3**, conversion d'une quercétine aglycone par l'UDP-glucuronosyl transférase et/ou une phénol sulfotransférase ; **4** et **5**, les métabolites conjugués sont transportés dans le système circulatoire 4 ou sont excrétés dans la lumière intestinale. D'après Murota (2003).



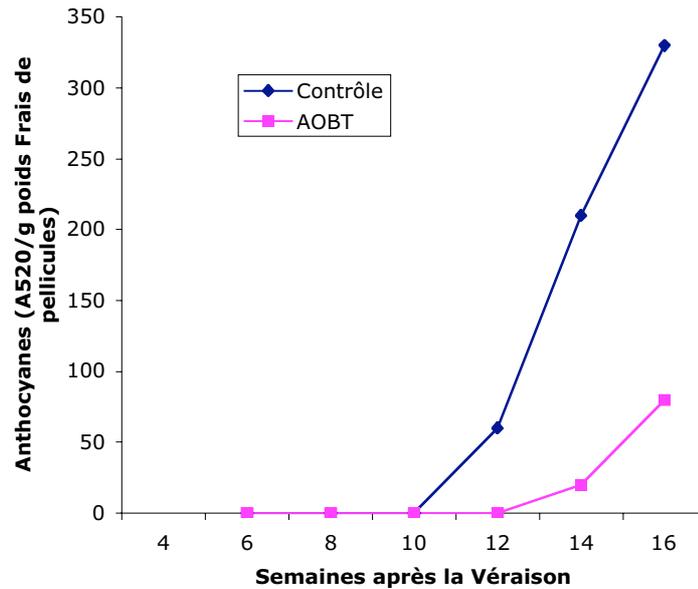
**Figure 22** : Effet sur l'agrégation plaquettaire après incubation de cellules sanguines en présence d'extraits de pellicules de baie de raisin, de pépins de raisin ou en combinaison. D'après Shanmuganayagam et al. (2002).



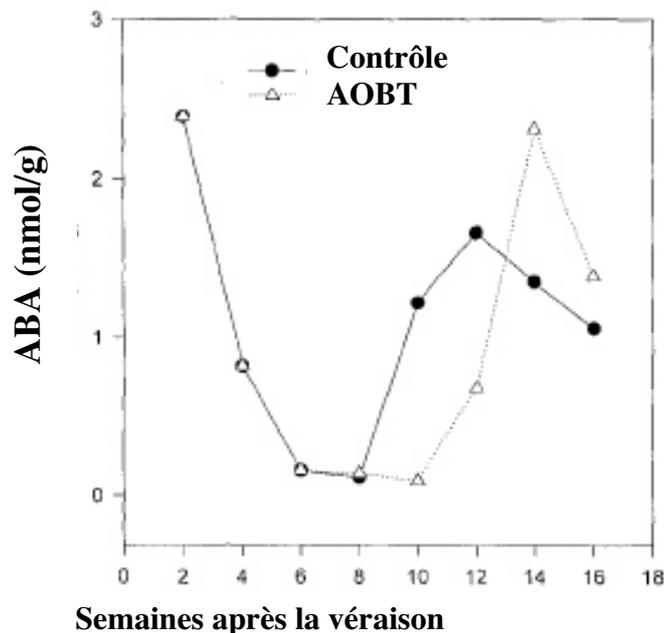
**Figure 23 :** Effets des sucres sur la concentration en anthocyanes de suspension de cellules de Vigne (*Vitis vinifera*). Les sucres à la concentration de 0,15 M ou de 0,2 M sont ajoutés à la suspension cellulaire le 7<sup>ème</sup> jour de culture. Ensuite, les suspensions cellulaires sont récoltées le jour 12 et la concentration en anthocyanes totales est déterminée. D'après Larronde et al. (1998).



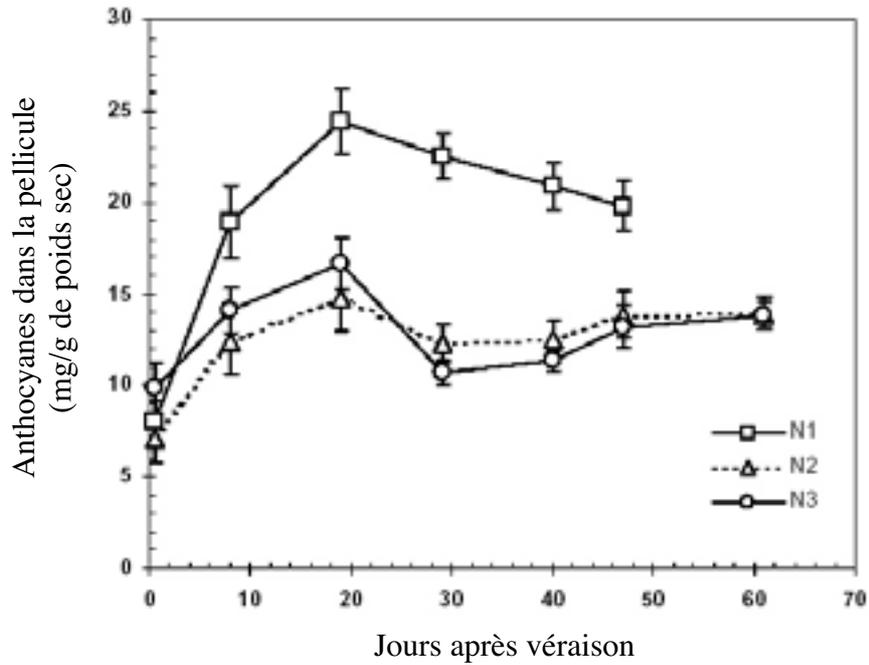
**Figure 24 :** Influence des sucres sur l'activité GUS chez *Arabidopsis* transformé avec le gène *GUS* fusionné au promoteur de la chalcone synthase de Pétunia (*Pétunia hybrida*). Des feuilles détachées issues des plantes transformées sont transférées dans un milieu contenant différents sucres à la concentration de 0,3 M (Sac, Saccharose ; Glc, Glucose ; Fru, Fructose ; Mal, Maltose ; Gal, Galactose ; Mtl, Mannitol ; Contrôle, milieu dépourvu de sucre). L'activité GUS est mesurée après 3 jours d'incubation des feuilles avec les sucres. D'après Tsukaya et al. (1991)



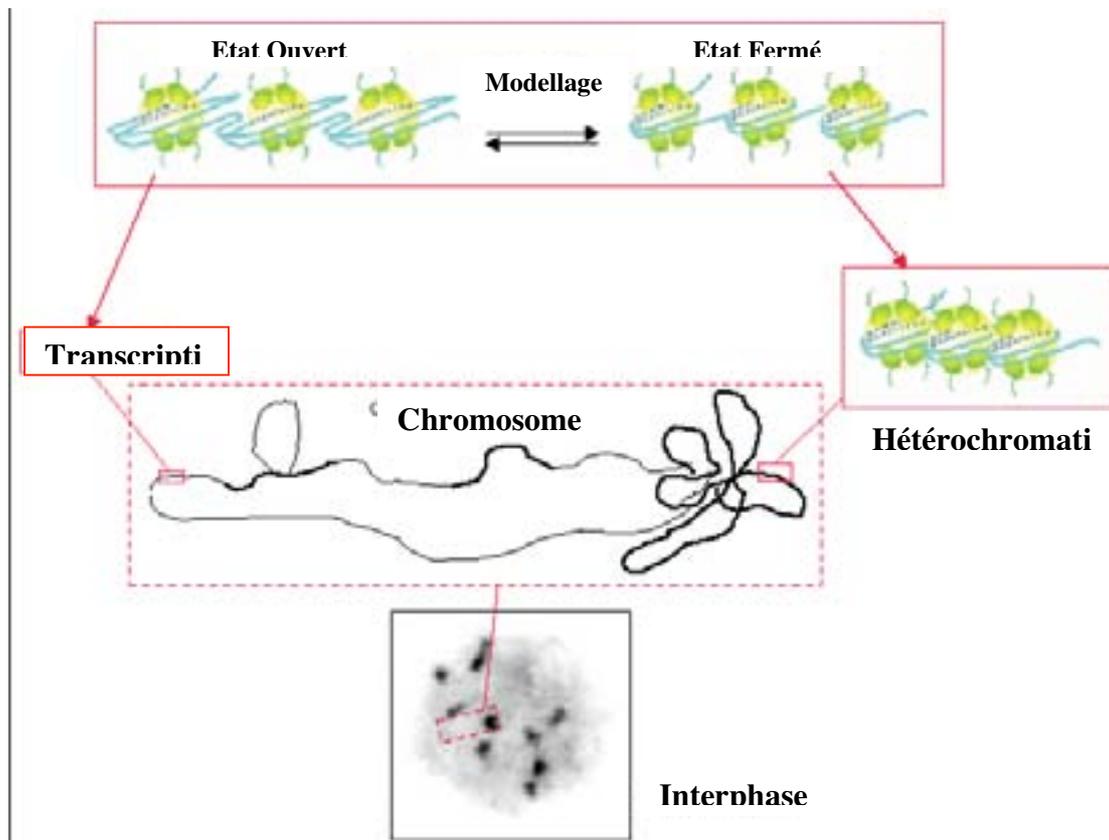
**Figure 25 :** Effet d'un traitement au AOBT sur la concentration en anthocyanes totales de pellicule de baie de raisin (cv Syrah). L'absorbance est mesurée à 520 nm sur des échantillons éthanoliques de pellicules prélevées à deux semaines d'intervalles tout au long du mûrissement de la baie de raisin. La concentration en anthocyanes est donnée en absorbance à 520 nm par gramme de matière fraîche de pellicule. D'après Davies (1995).



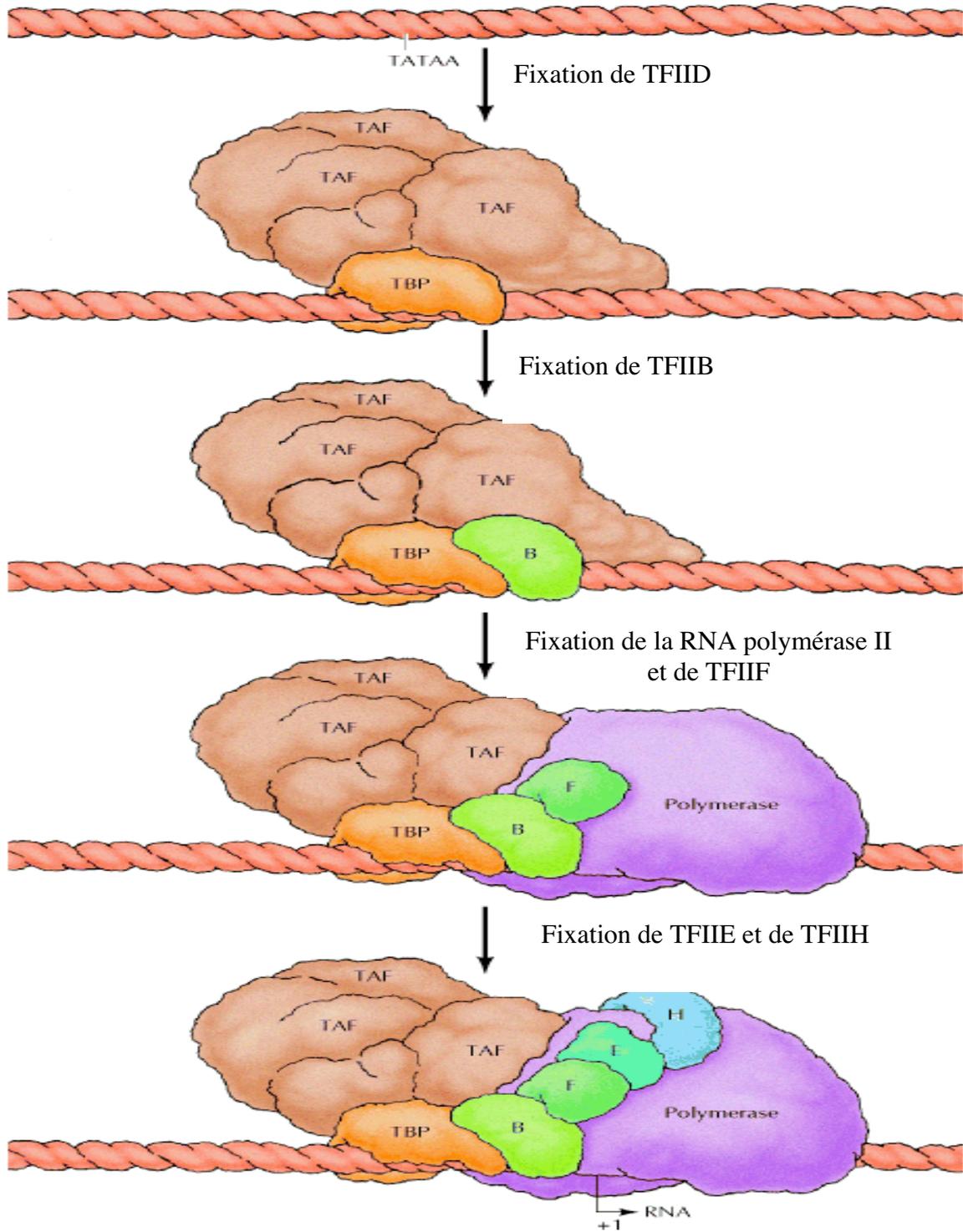
**Figure 26 :** Effet de l'AOBT sur la concentration en ABA dans les baies de raisin après la véraison. L'ABA est mesuré à près extraction par chromatographie gaz et spectrométrie de masse. D'après Davies (1995).



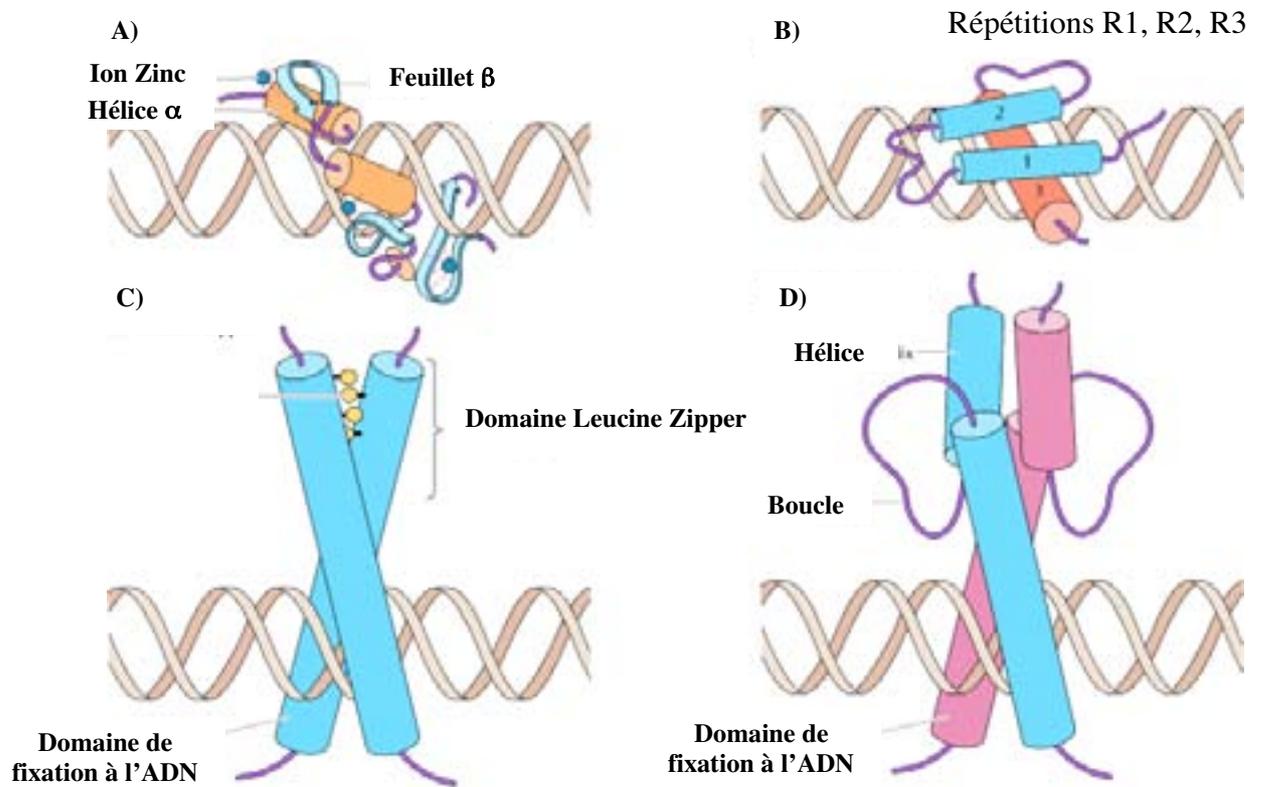
**Figure 27:** Incidence de la nutrition azotée des boutures fructifères sur la teneur en anthocyanes totales dans les pellicules des baies au cours de la maturation. N1=1,4mM, N2=3,6mM et N3=7,2mM. D’après Hilbert (2002).



**Figure 28:** Représentation schématique des relations entre le modellage chromatinien, l’activité transcriptionnelle et l’hétérochromatine. En présence du complexe SWI/SNF, la chromatine oscille entre un état de configuration dite ouverte qui permet la transcription et un état de configuration fermée qui forme l’hétérochromatine. L’état dit ouvert est soumis à l’action d’acétylases au niveau des histones alors que la méthylation des histones induit l’état dit fermé. D’après Fransz (2002).

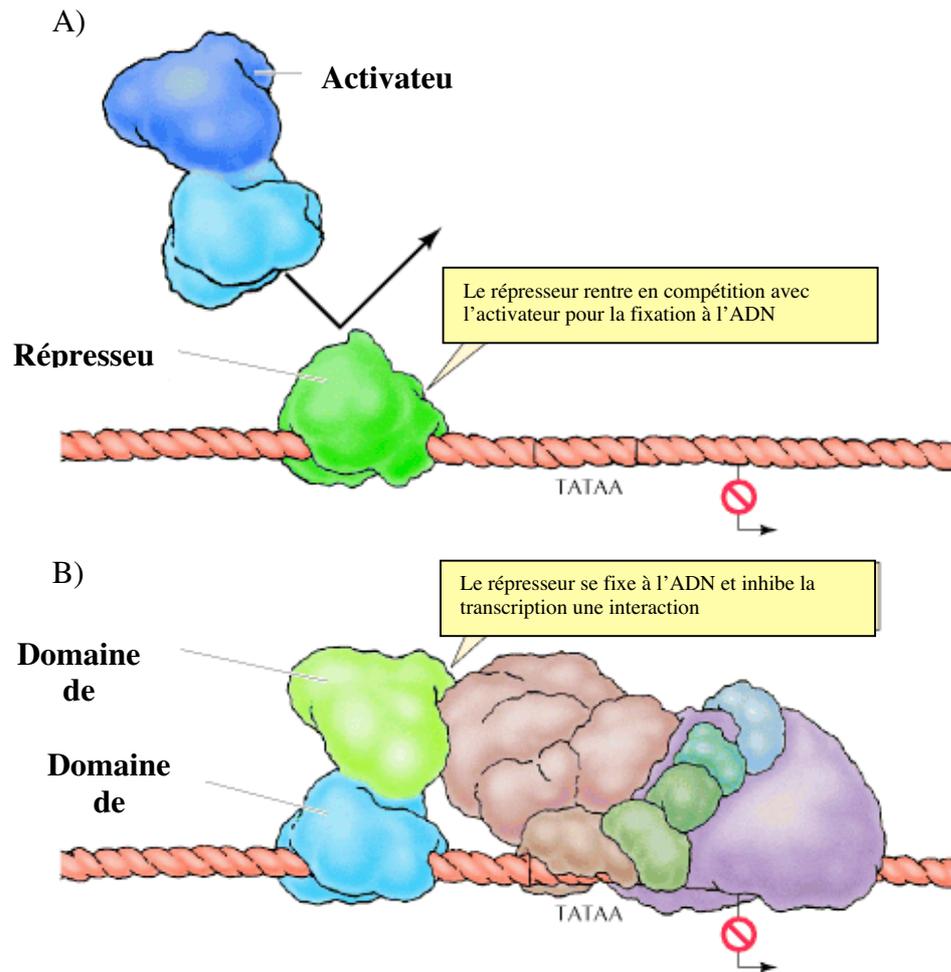


**Figure 29:** Etapes chronologiques du mécanisme de fixation à l'ADN de la RNA polymérase



**Figure 30** : Exemples de domaines de fixation à l'ADN chez les Plantes.

- A) Les doigts de Zinc
- B) Les répétitions imparfaites de type MYB
- C) Les Leucines Zipper
- D) Les motifs basiques Hélice-Boucle-Hélice.



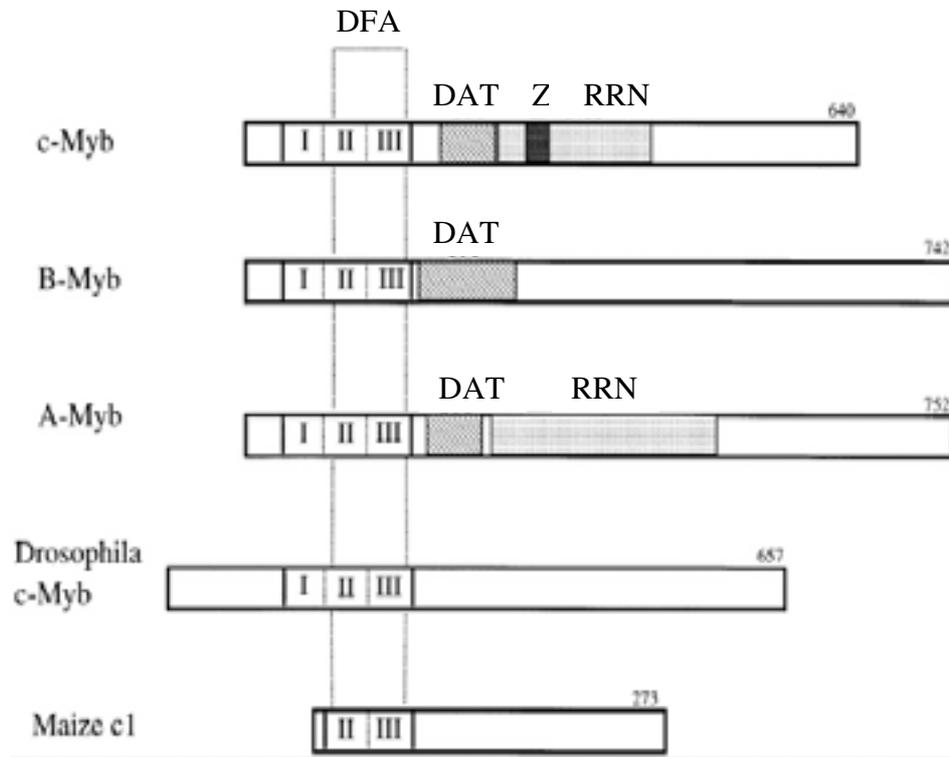
**Figure 31:** Mode opératoire des facteurs de transcriptions de type répresseur.

A) Inhibition par compétition d'affinité pour les sites promoteurs.

B) Inhibition de la transcription par fixation à l'ADN et interaction avec la RNA polymérase.

Type SLN	Séquence en acides aminés du SLN	Facteur de transcription	Localisation du SLN	Référence
SC	<b>K</b> RIAEGS <b>KKR</b> KIKQD	HSFA1 (Tomate)	Domaine d'oligomérisation	Lyck et al. (1997)
SB	<b>RKDKQRI</b> EVG <b>QKRRL</b> TM*	HSFA2 (Tomate)	Domaine d'oligomérisation	Lyck et al. (1997)
DB	<b>KKCKEK</b> FENVH <b>KYYKRTK</b> *	GT-2 (Arabidopsis, Riz)	Domaine N-terminal	Dehesh et al. (1995)
	<b>KRC</b> KEKWENINKY <b>FKKVK</b> *	GT-2 (Arabidopsis, Riz)	Domaine C-terminal	Dehesh et al. (1995)
	<b>RRKR</b> ESNRESARR <b>SRYRK</b> *	GT-2 (Arabidopsis, Riz)	Région basique du domaine bZIP	Varagona et al. (1994)
	<b>RRKLEED</b> LEAF <b>KMTR</b> *	Opaque 2 (Maïs)	Proximité du domaine d'activation	Varagona et al. (1994)
MC	<b>ERSK</b> KRSRE**	Opaque 2 (Maïs)	Région N-terminale non spécifiée	Boulikas et al. (1994)
	<b>ERELKREKRK</b> Q**	TAF-1 bZIP (tabac)	Région basique du domaine bZIP	Boulikas et al. (1994)
	<b>ARRSRLRK</b> Q**	TAF-1 bZIP (tabac)	Région basique du domaine bZIP	Boulikas et al. (1994)
MB	PAA... <b>KRK</b> ...S...SP...VR <b>VLR</b> S**	ZmHox2a et 2b	Région C-terminale non spécifiée	Klinge et al. (1996)

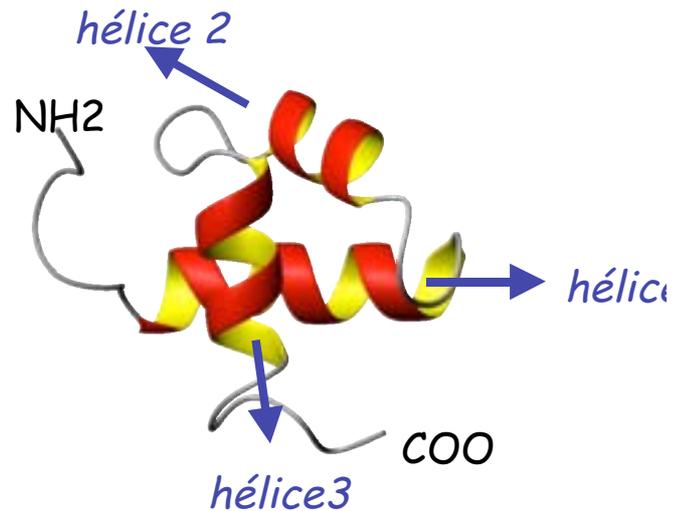
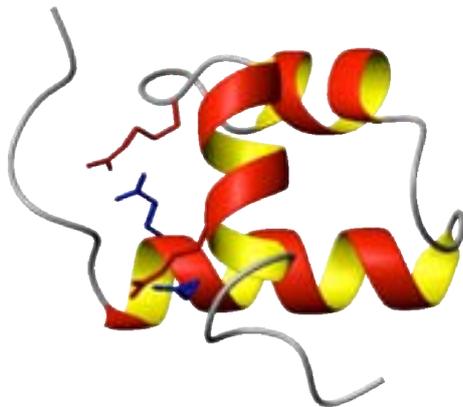
**Tableau 4:** Séquence, organisation et localisation des Signaux de Localisation Nucléaires (SLN) dans les séquences protéiques des facteurs de transcription d'origine végétale. Les facteurs contiennent des SLN contenant des motifs dit singulet continu (SC), singulet bipartite (SB), double bipartite (DB), multiple continu ou multiple bipartite (MB). Les séquences actuelles de SLN sont ici toutes montrées à l'exception de ceux des facteurs MYB qui sont en fait une séquence consensus des SLNs connus chez ZmHox2a et ZmHox2b. Les lettres en gras représentent les résidus Arginine et Lysine conservés dans les SLNs ; ... correspond à des résidus non conservés dans la séquence consensus du SLN ; \* correspond à une validation fonctionnelle de la séquence ; \*\* correspond à un SLN putatif ; les régions non spécifiées correspondent à des régions qui ne contiennent ni de domaine de fixation à l'ADN, de domaine d'oligomérisation ou encore de domaine régulateur.



**Figure 32 :** Domaines fonctionnels de protéines MYB. Les numéros romains désignent les répétitions en tandems répétés. DFA :Domaine de Fixation à l'ADN, DAT : Domaine d'Activation Transcriptionnelle, RRN : Région Régulatrice Négative, LZ : Leucine Zipper d'après Takabashi (1995). Les numéros correspondent au nombre de résidus aminés des protéines. D'après Rosinski (1998).

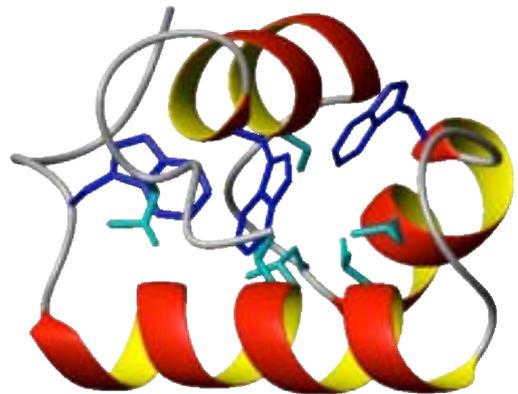
### 3 propriétés physico-chimiques

- Hélices 2 et 3 forment un motif HBH (hélice-boucle-hélice) déterminant pour l'insertion dans le grand sillon de l'hélice d'ADN

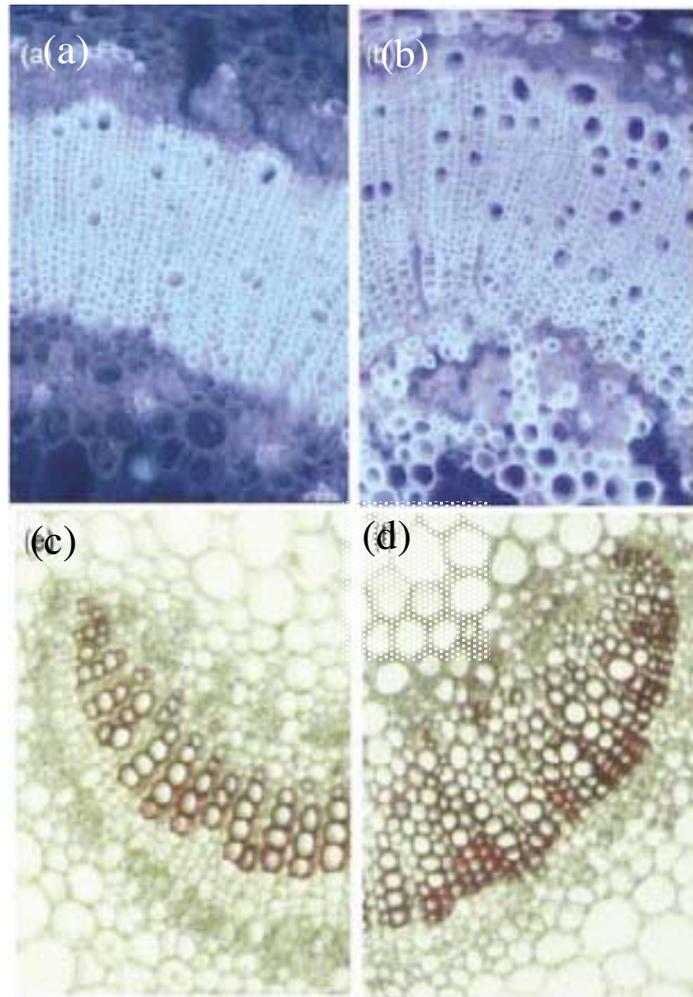


- Des ponts salins sont formés entre h1/b2 et h1/h3 afin de stabiliser le complexe nucléo-protéique

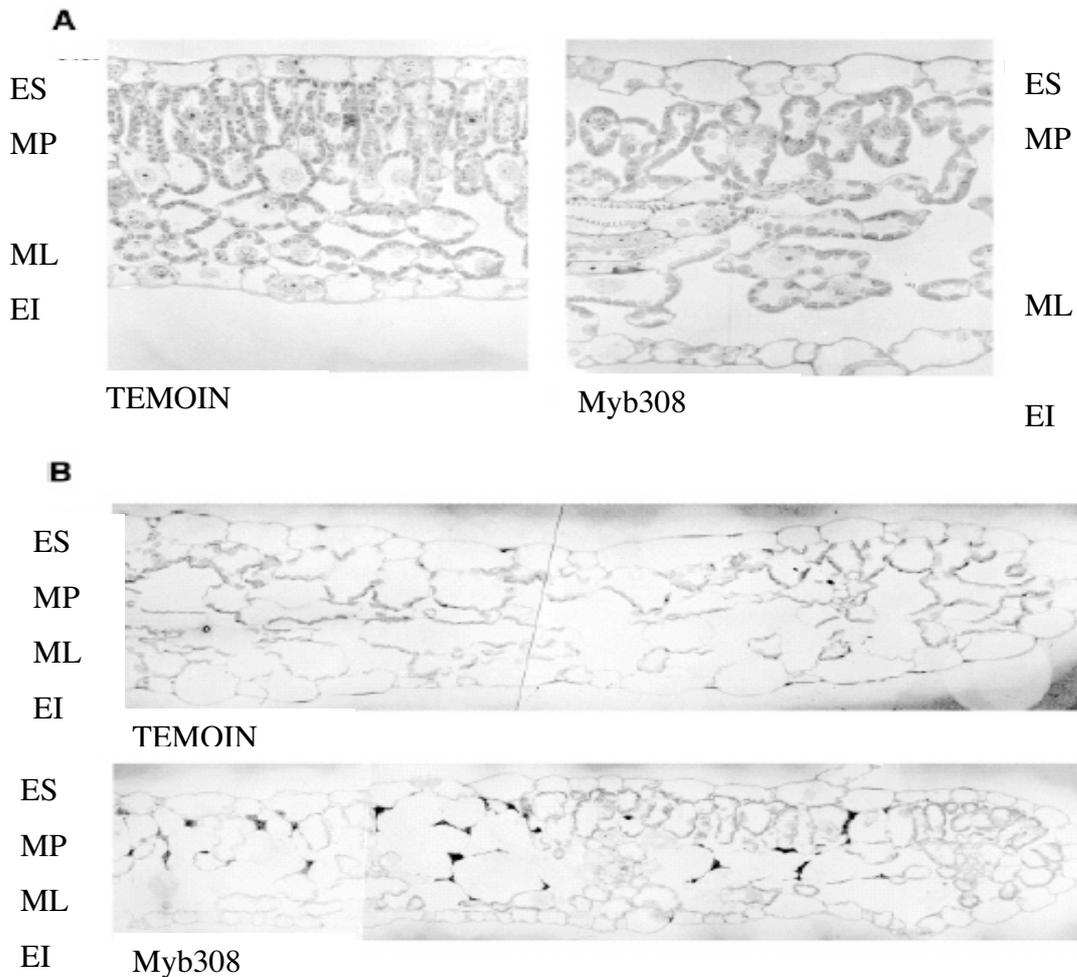
- Les résidus tryptophane W exposés à l'intérieur de la répétition forment un cœur hydrophobe



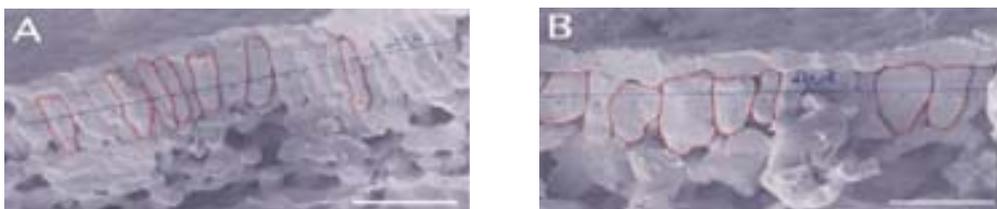
**Figure 33** : Propriétés structurales des domaines R1,R2,R3 des facteurs MYB. h1 : hélice1, b1 : boucle 1



**Figure 34** : Détection histochimique de lignine dans des tabacs transgéniques contrôle (a,c) et un vecteur contenant *PtMYB4* (b,d). La lignine est soit visible par autofluorescence aux émissions UV (a,b) soit à la suite d'une coloration au phloroglucinol-HCl qui induit une coloration rouge des réseaux ligneux. L'augmentation de l'accumulation de lignine est observée à la fois dans les tiges (b) et dans les pétioles (d) des tabacs transgéniques. D'après Patzlaff (2003).



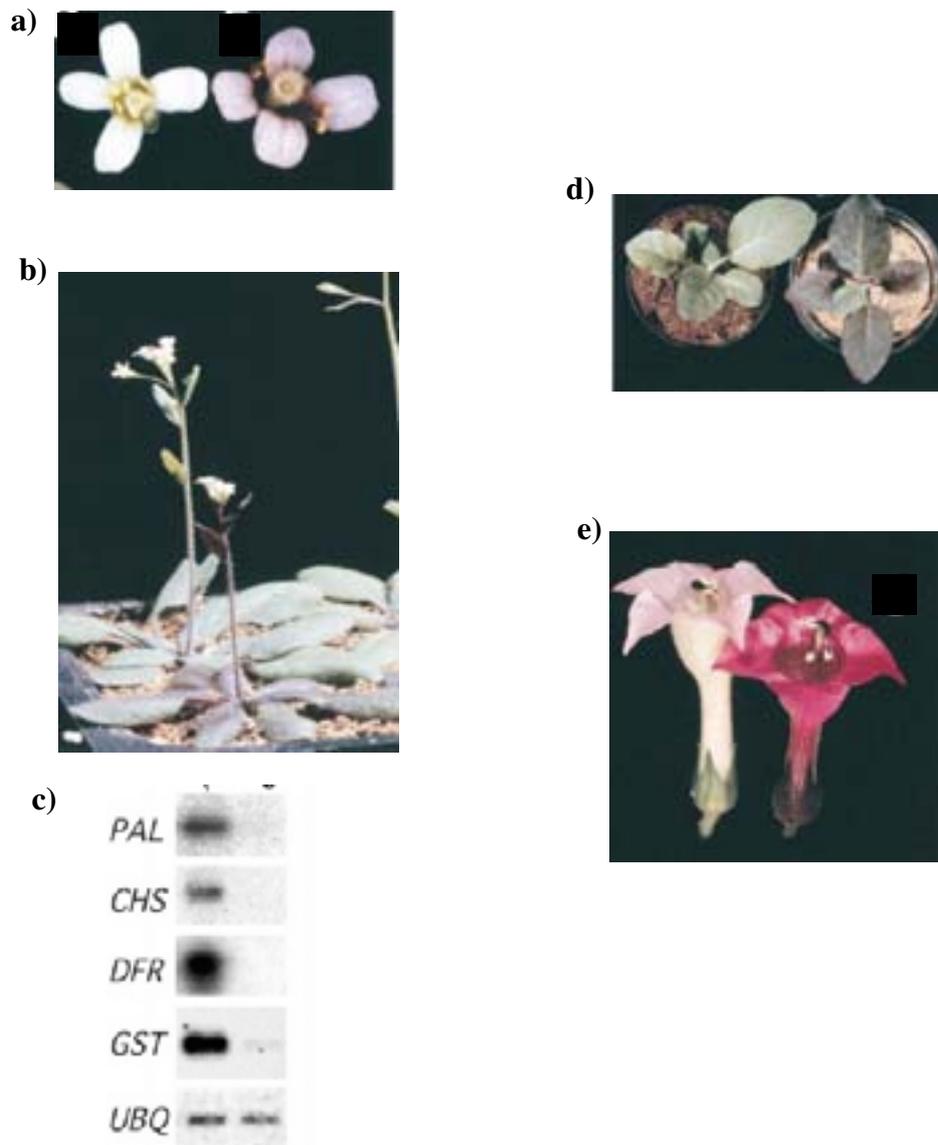
**Figure 35** : Analyses par microscopie électronique de plants de tabacs. D'après Tamagnone (1998). (A) Coupes transversales de feuilles matures (10 cm de longueur). L'assise palissadique des feuilles Myb308 (droite) contient des cellules arrondies n'ayant pas l'aspect en colonnes observées chez les coupes témoin (gauche). Les espaces intercellulaires plus importants dans les lignées Myb308 résultent d'un manque d'adhésion cellule à cellule qui est à l'origine de la séparation des tissus durant la fixation. (B) Coupes de vieilles feuilles. Dans les feuilles témoin, les cellules sénescents sont fortement vacuolaires avec des parois cannelées. Dans les feuilles Myb308, les cellules mortes isolées se présentent comme des amas denses aux électrons et localisés à la fois du côté du mésophylle palissadique (MP) et du mésophylle lacuneux (ML). (ES) : Epiderme Supérieur, (EI) : Epiderme inférieur.



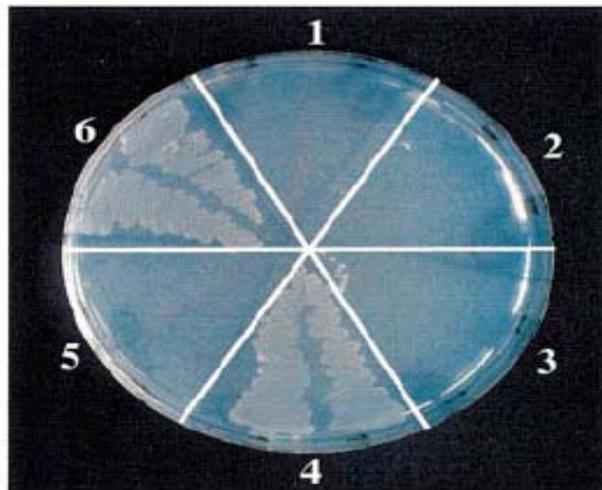
**Figure 36** : Microscopie électronique à balayage de coupes fractales cryogénisées de feuilles contrôles et de feuilles de type Myb308, A : contrôle ; B : Myb308. D'après Tamagnone (1998).

Echantillons de feuilles <sup>a</sup>	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	Volume/surface
<b>FJC</b>	1,672	4,363	2,6
<b>FJM</b>	2,053	7,992	3,9
<b>FIC</b>	5,191	22,629	4,4
<b>FIM</b>	8,840	67,621	7,6
<b>FMC</b>	18,035	145,912	8,1
<b>FMM</b>	18,997	211,207	11,1
<sup>a</sup> <b>FJ</b> : Feuilles Jeunes ; <b>FI</b> : Feuilles intermédiaires ; <b>FM</b> : Feuilles matures ; <b>C</b> : contrôle ; <b>M</b> : MYB308			

**Tableau 5** : Moyenne des surfaces et des volumes de cellules palissadiques de feuilles. D'après Tamagnone (1998).



**Figure 37:** Caractérisation d'un mutant *AtPAP1* chez *Arabidopsis thaliana* codant un facteur Myb  
a) Phénotype coloré des fleurs d'*Arabidopsis AtPAP1* (droite) par rapport au contrôle (gauche)  
b) Aspect général d'une rosette âgée de 6 semaines mutante (premier plan) par rapport au contrôle (arrière plan)  
c) Activation de l'expression de gènes structuraux associés à la biosynthèse des phénylpropanoïdes. PAL : Phényl Ammonia Lyase ; CHS : Chalcone Synthase ; DFR : Dihydroflavonol Réductase , GST : Gluthation-S Transférase, UBQ : Ubiquitine  
d) Phénotype de feuilles de tabac transformé avec un vecteur vide (gauche ) et avec *AtPAP1*  
e) Accumulation d'anthocyanes dans les fleurs de tabacs transgéniques sur-exprimant *AtPAP1* (droite). D'après Borevitz (2000).



1	Gal4BD	Gal4AD::FaMYB11-187
2	Gal4BD::FaMYB11-187	Gal4AD
3	Gal4BD::FaMYB11-187	Gal4AD::ANI11-337
4	Gal4BD::FaMYB11-187	Gal4AD::JAF131-234
5	Gal4BD::FaMYB11-187	Gal4AD::AN21-255
6	Gal4BD::FaMYB11-187	Gal4AD::ANI1-234

**Figure 38** : Interactions protéine/protéine entre FaMYB1 et des régulateurs de type MYC mises en évidence par des tests de double-hybrides. Deux lignées indépendantes de transformations ont été testées avec chacune des constructions contenant un ADNc codant un facteur MYC. Les combinaisons 1 et 2 ont été réalisées pour vérifier si FaMYB1 peut se fixer sur le promoteur GAL4 et si il ne contient pas de domaine d'activation fonctionnel dans la Levure. D'après Aharoni (2001).

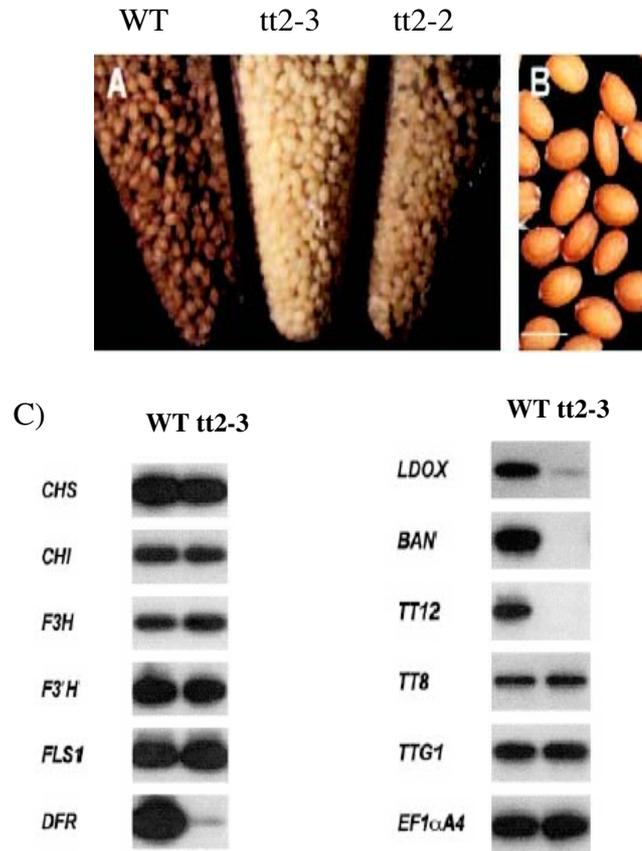
Promoteur testé <sup>a</sup>	Activité de la $\beta$ galactosidase (Unités) <sup>b</sup>		
	-MYB	MYB305	MYB340
gPAL2 (-250 à -150)	1,75 +/- 0,77	8,99 +/- 2,95 <sup>c</sup>	10,95 +/- 2,43
CHS (-171 à -34)	0,22 +/- 0,03	0,40 +/- 0,02	0,38 +/- 0,03
CHI (-251 à -32)	0,26 +/- 0,02	3,18 +/- 0,75	42,84 +/- 4,47
F3H (-243 à -29)	0,15 +/- 0,08	0,34 +/- 0,04	1,28 +/- 0,17
DFR (-228 à -26)	0,33 +/- 0,02	0,47 +/- 0,02	0,46 +/- 0,01
ANS (-210 à -26)	0,18 +/- 0,06	0,18 +/- 0,11	0,24 +/- 0,12

**Tableau 6** : Activation de l'expression de gènes rapporteurs de fragments de promoteurs de gènes de la voie de biosynthèse des anthocyanes par Myb305 et Myb340 chez la Levure.. D'après Moyano (1995).

<sup>a</sup> Les nombres entre parenthèses indiquent le positionnement des régions promotrices étudiées par rapport au codon initiateur de la transcription.

<sup>b</sup> L'activité  $\beta$ -galactosidase des extraits à partir des lignées de levures contenant le gène rapporteur sous le contrôle des différents fragments de promoteurs est lié à un promoteur minimal de type CYC1. Les activités dans les lignées contrôles sans le plasmide effecteur (-Myb) ou dans les lignées avec Myb305 et Myb340 exprimé sous le contrôle du promoteur GAL1 sont présentés avec les écarts types.

<sup>c</sup> Les résultats de Sablowski et al. (1994) sont inclus par comparaison.

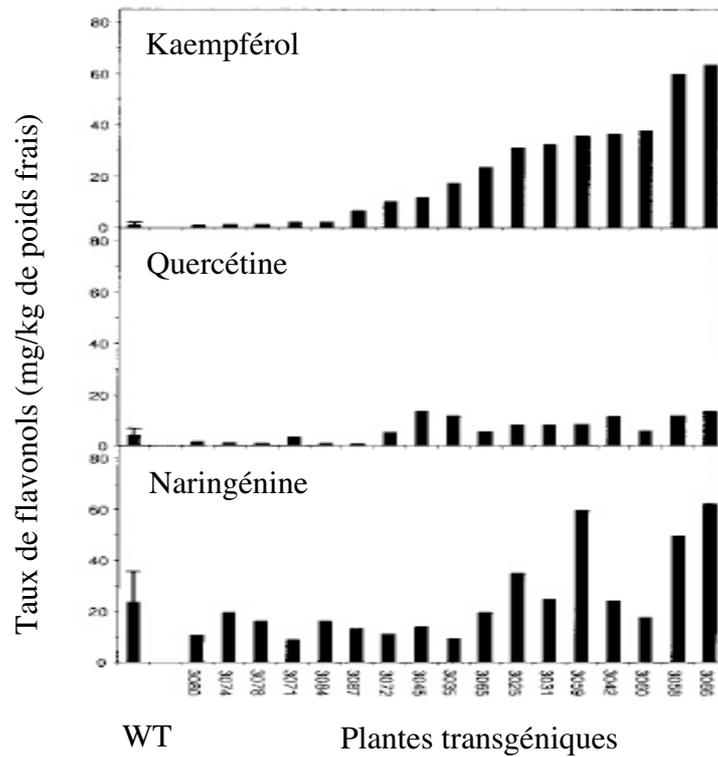


**Figure 39** :Phénotypes des graines d'*Arabidopsis thaliana* mutée pour le gène *tt2*.

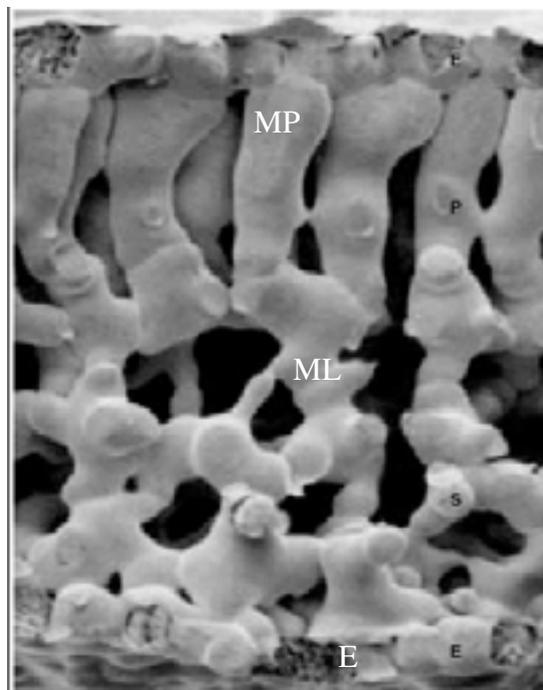
A) Graines issues de plantes sauvages et de la lignée mutante *tt2-3* et *tt2-2*.

B) Graines de génération T2 obtenues à partir d'un mutant homozygote transformé par l'ADNc TT2 sous le contrôle d'un promoteur double 35S. La pigmentation brune des graines transformées démontre la complémentation phénotypique par sur-expression de l'ADNc *tt2*

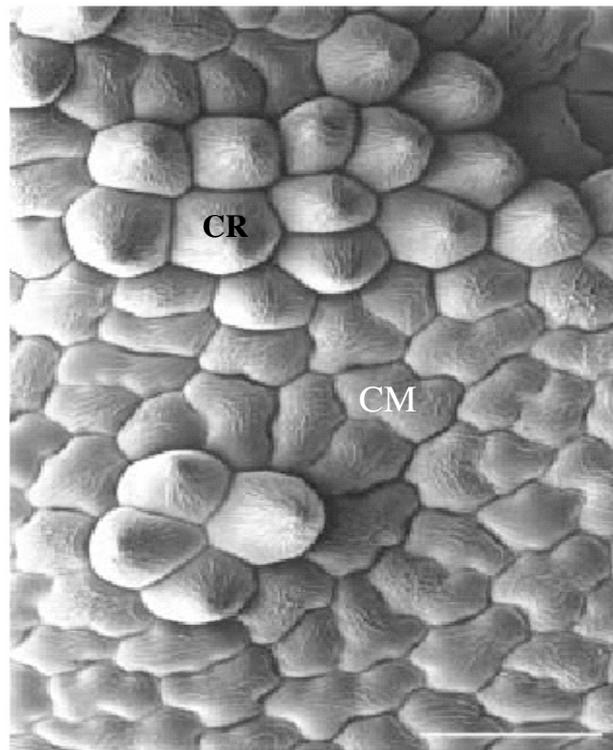
C) Niveaux des transcrits de cinq gènes précoces (CHS,CHI,F3H, F3'H, FLS1) et de quatre gènes dit tardifs (DFR,LDOX,BAN et TT12) de la voie de biosynthèse des anthocyanes, de deux gènes régulateurs (TT8 et TTG1) et d'un contrôle EF1. D'après Nesi (2001).



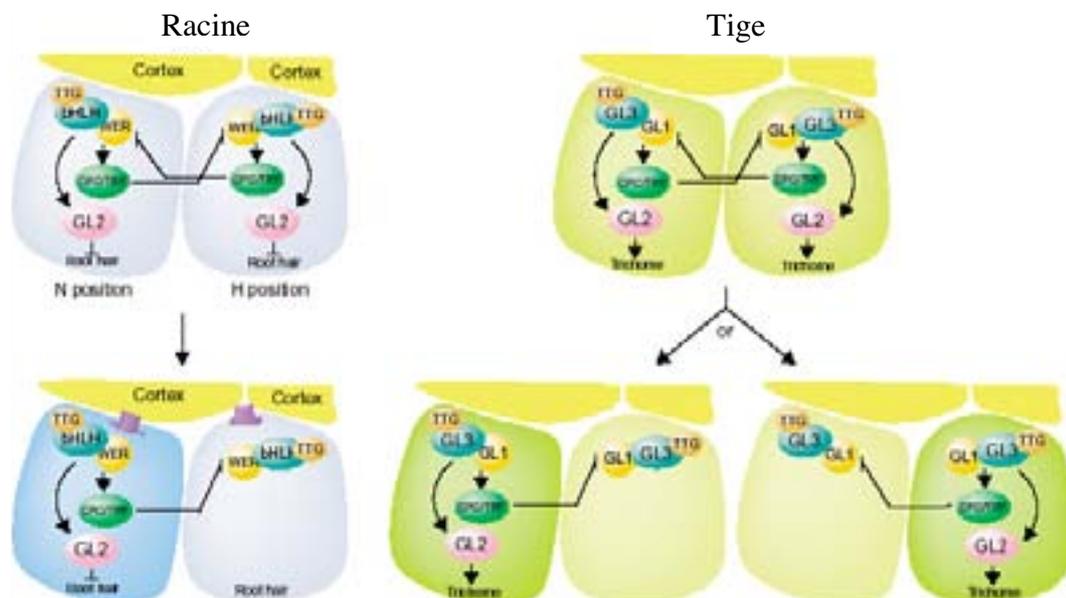
**Figure 40** : Quantifications des flavonoides dans des extraits hydrolysés de fruit de tomates entiers à partir de plantes transformées pour la double construction LC/C1. Les niveaux de Kaempférol, de quercétine et de Naringénine sont montrés pour les plantes transformées par rapport à une plante sauvage. D'après Bovy (2002).



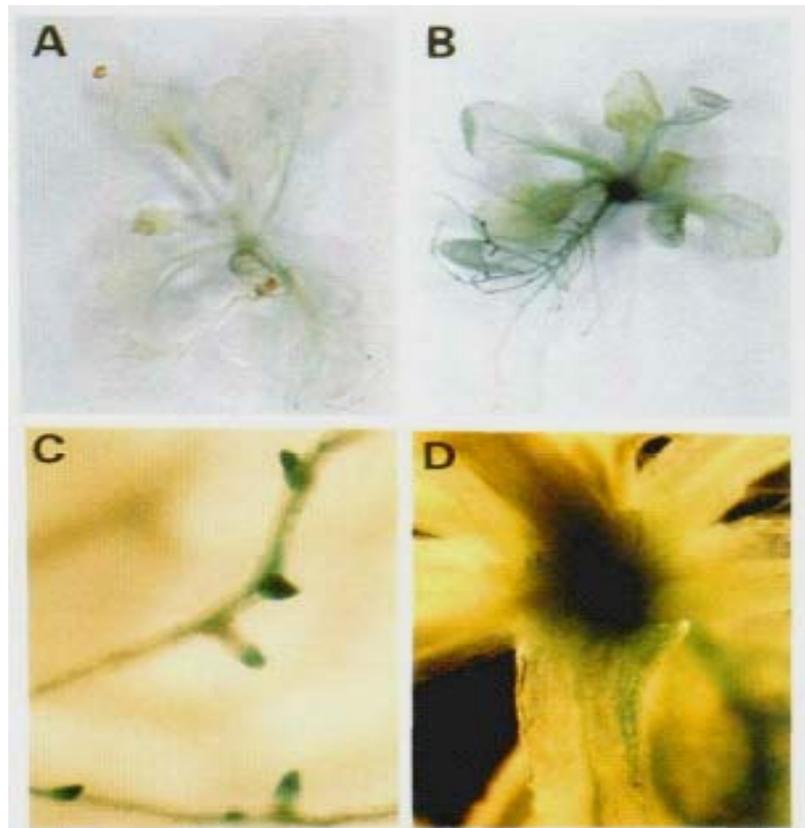
**Figure 41**: Microscopie électronique à balayage d'une feuille de Pétunia. La figure montre les cellules en forme de colonnes du mésophylle palissadique (MP) suivi de cellules rondes du mésophylle lacuneux (ML), E : cellules épidermiques. D'après Martin (2001).



**Figure 42:** Microscopie à balayage d'épidermes de pétales d'une lignée instable d'*Antirrhinum majus*. Le phénotype instable est du à une insertion d'un transposon dans le gènes Mixta qui détermine la forme des cellules épidermiques des pétales. Les plantes qui contiennent le transposon présentent une surface cellulaire plane et n'adopte pas la forme conique. Les cellules qui ont perdu le transposon retrouvent une forme conique caractéristiques des épidermes de fleurs sauvages. CR : Cellules révertantes, CM : cellules mutées contenant le transposon. D'après Jin (1999).



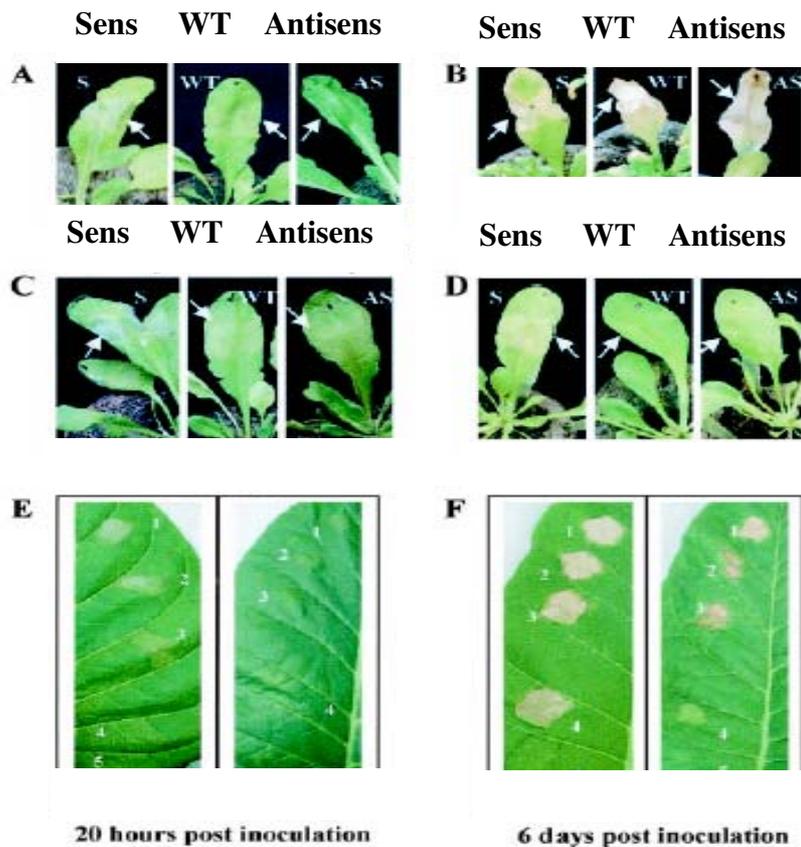
**Figure 43:** Modèle pour la différenciation cellulaire dans l'épiderme des racines et des tiges chez *Arabidopsis thaliana*. D'après Shiefelbein (2003).



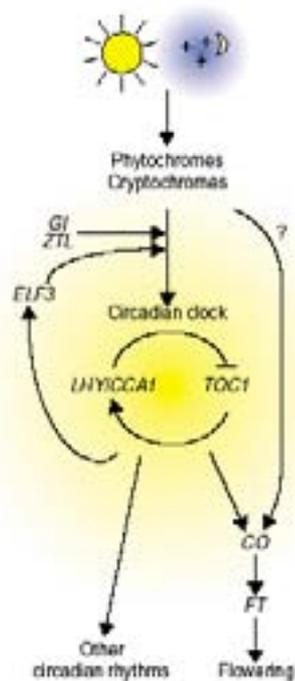
**Figure 44** : Localisation histochimique d'une activité GUS dans des plants d'*Arabidopsis thaliana* contenant le promoteur du gène *AtMyb2*.

(A) Plants poussant en conditions normales.

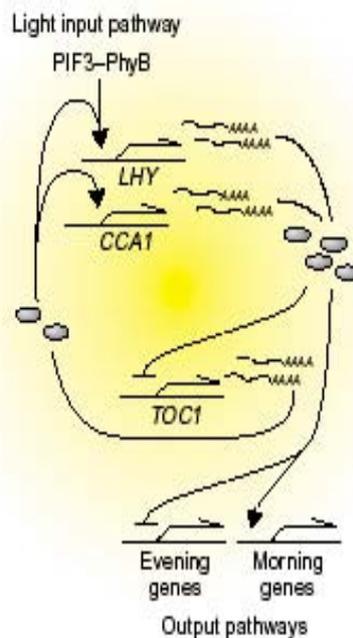
(B) à (D) Plantes exposées à de fortes conditions salines. Une forte activité GUS est observée à l'extrémité des racines (C) et à la base des pétioles et des feuilles (D) des plantes transgéniques transférées sur un milieu gélosé contenant 250 mM de NaCl. D'après Urao (1993).



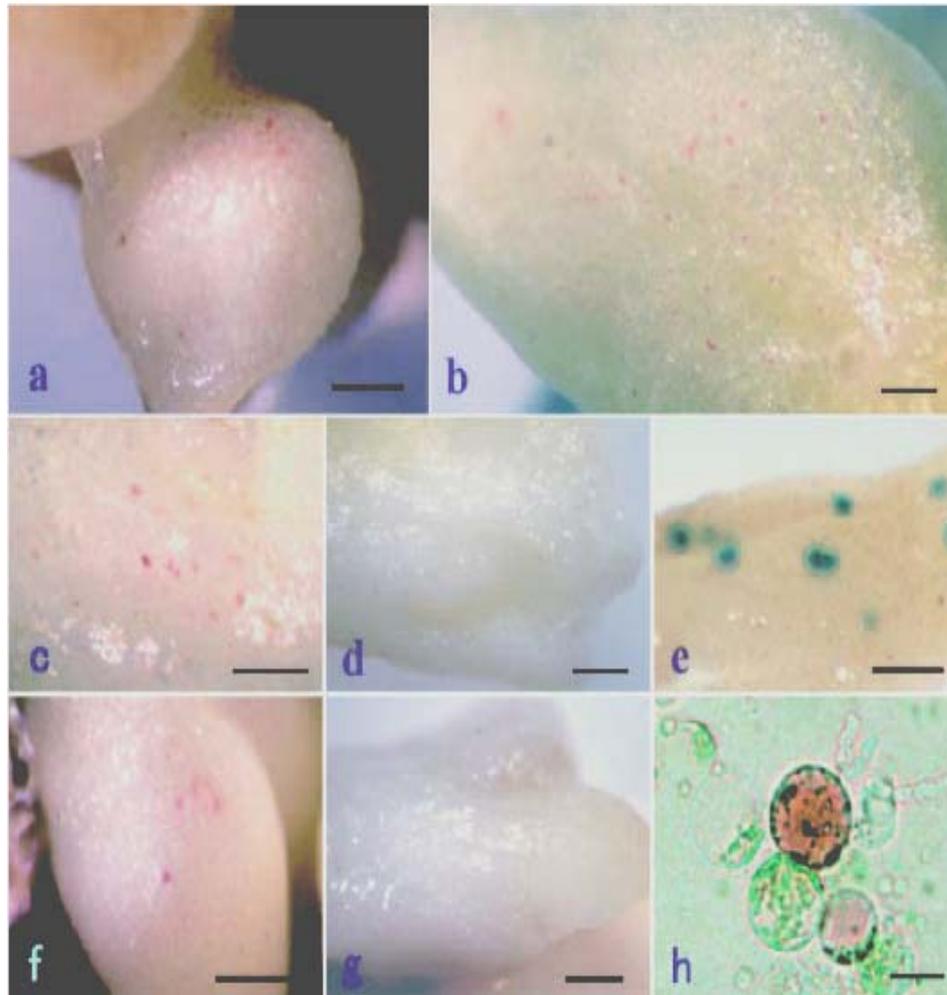
**Figure 45** : Phénotypes de plantes sens et antisens d'*Arabidopsis thaliana* et de tabacs en réponse à une inoculation d'une souche bactérienne virulente et avirulente. Les symptômes sont observés d'abord dans les plantes d'*Arabidopsis* sens, sauvage et antisens. (A) 24 heures d'inoculation avec la souche DC3000/avrRpm ( $10^7$ cfu/ml), (B) sept jours après l'inoculation avec DC3000 ( $10^7$ cfu/ml), (C) 24 heures d'inoculation avec Xcc147 ( $10^8$ cfu/ml), et (D) 48 heures après inoculation avec Xcc8004 ( $10^8$ cfu/ml). (E et F) Phénotypes de tabacs transgéniques en réponse à une inoculation avec *R. Solanacearum*. Différents inocula ont été réalisés pour la souche avirulente (GMI1000) qui vont de  $10^5$ cfu/ml (n°1),  $10^7$  cfu/ml (n°2), à  $5 \cdot 10^6$ cfu/ml (n°3) ; la souche virulente (K60) a été inoculée à  $5 \cdot 10^7$  cfu/ml (n°4) et un contrôle d'inoculation est réalisé avec de l'eau. D'après Vaillau (2002).



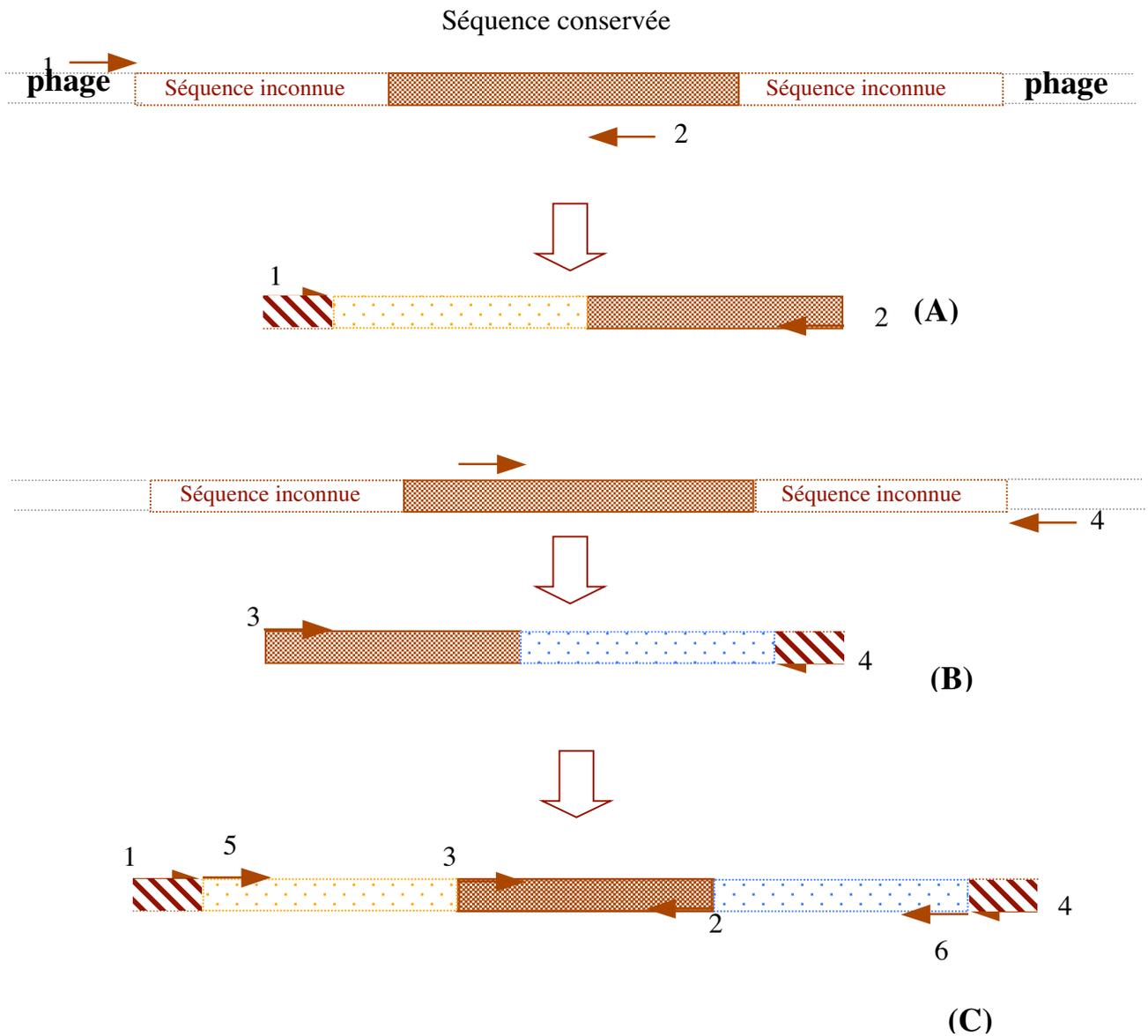
**Figure 46** : Modèle du système circadien chez *Arabidopsis thaliana* et sa relation privilégiée avec le gène *CO*. D'après Hayama (2003).



**Figure 47** : Mécanismes d'autorégulation des gènes Myb associés à la régulation de l'expression de gènes sous le contrôle du rythme circadien chez *Arabidopsis thaliana*.. D'après Hayama (2003).



**Figure 48** : Expressions transitoires d'ADNc codant des facteurs MYB de baie (*Vitis labrusca*) sous le contrôle d'un promoteur 35S par bombardement. Des spots rouge pourpres sont induits dans les embryons après introduction de VlmybA-1 (a), VlmybA-2 (b) et VlmybA2 (c). A l'opposé, les introductions de VlmybB1-1, VlmybB1-2, C1, B-Peru et mybC1 +B-Peru ne montrent pas d'accumulation de spots anthocyaniques. Quand on réalise un co-bombardement avec mybC1 et pBI221, on n'observe aucun spot (d) mais l'expression du gène gus est détectée par coloration avec 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -glucuronide (X-Gluc) à trois jours du bombardement (e). L'introduction du gène codant l'UFGT induit aussi des spots pourpres (f) alors qu'aucune présence de spots anthocyaniques est notée après introduction du gène codant l'ANS. Quand C1, avec B-Péru, est introduit dans des protoplastes de Maïs par électroporation. Des protoplastes rouges sont produits (h). Une barre équivaut à 200 $\mu$ m (a-g), 20  $\mu$ m (h). D'après Kobayashi (2002).



**Figure 49** : Principe de PCR sur banque ADNc

A) Obtention de l'extrémité 5' du l'ADNc en combinant amorce 1 (5'Primer) avec amorce 2 (amorce antisens dégénérée).

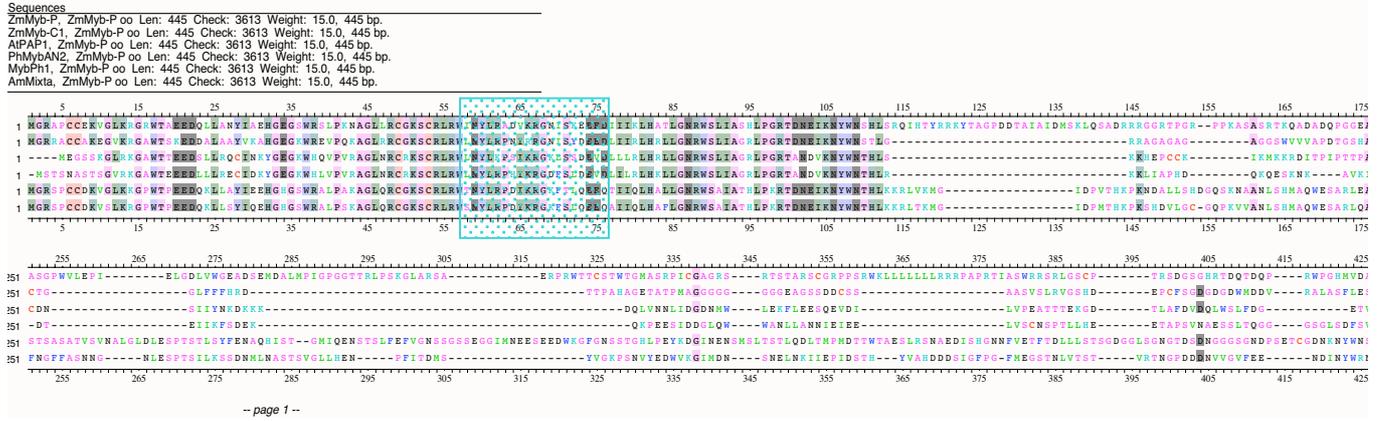
B) Obtention de l'extrémité 3' de l'ADNc en combinant amorce 3 (amorce sens dégénérée) avec amorce 4 (T7 Primer).

C) Obtention de l'ADNc de pleine taille avec des amorces 5 et 6 dans les parties 5' et 3' respectivement.

**Figure 50** : Alignements de séquences protéiques de facteurs de transcription de type MYB associés à la régulation de la biosynthèse des polyphénols

ZmMYB-P : AAB67720, ZmMYB-C1: AAA33482, AtPAP1: AAG42001, pHMybAn2: AAF66727, AmMixta: CAA55727

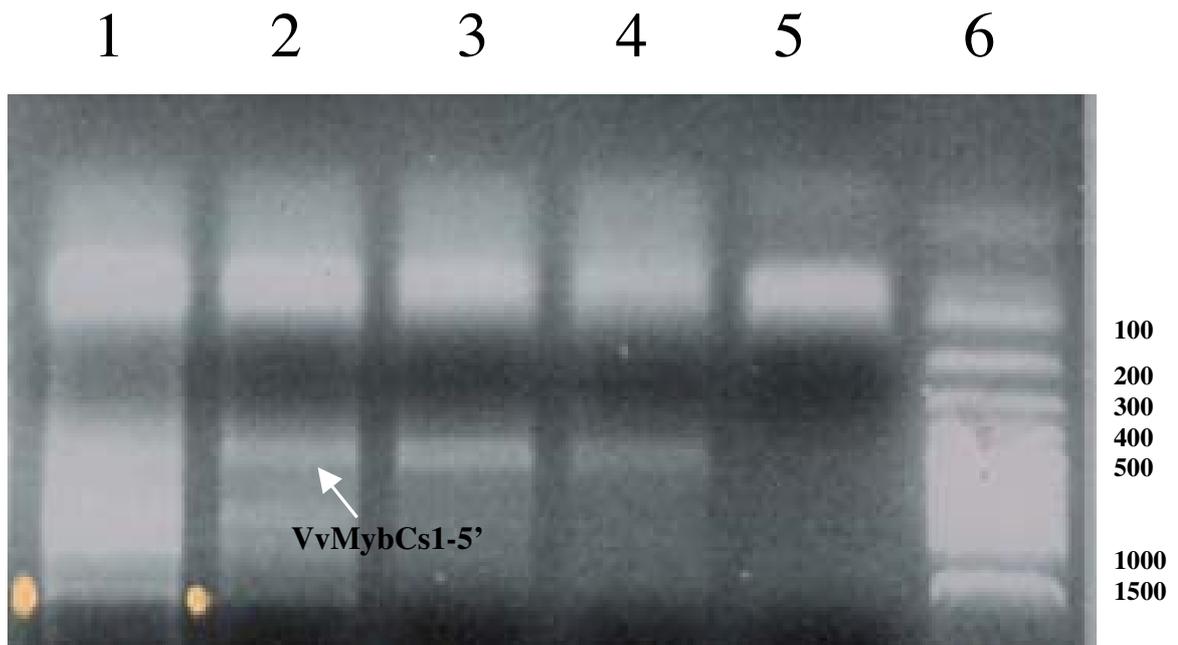
 Région conservée utilisée pour le dessin des amorces.



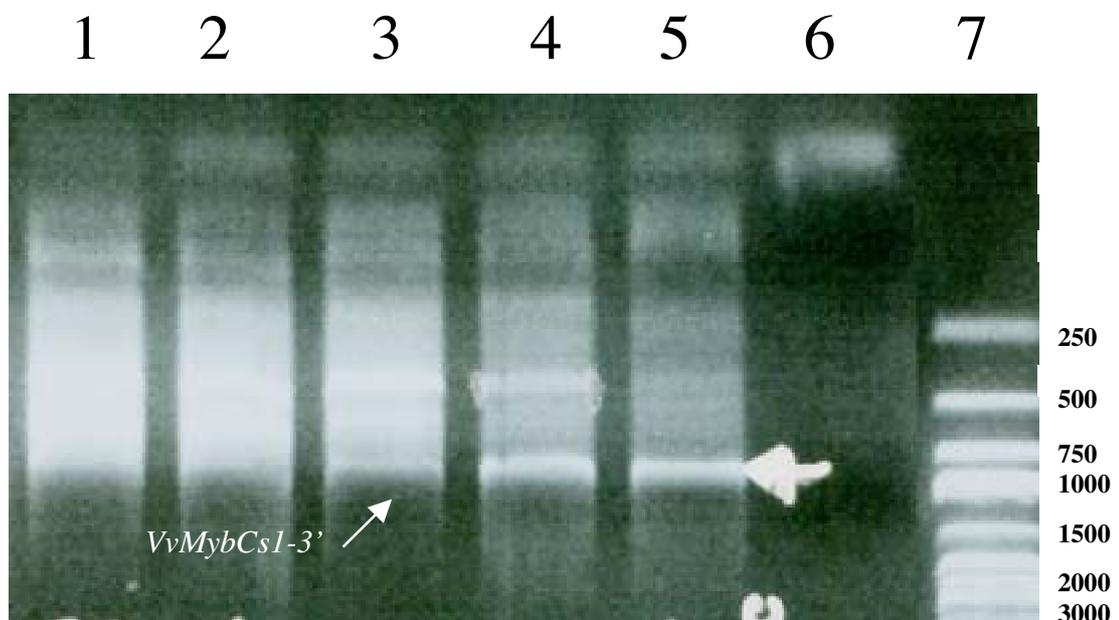
**Figure 51** : Alignements de séquences nucléiques codant des facteurs de transcription de type MYB associés à la régulation de la synthèse des polyphénols

MYB-P : AF015268, ZmMYB-C1: M37153, AtPAP1: AF325123, pHMybAn2: AF146702, AmMixta: X79108





**Figure 52 :** Electrophorèse sur gel d'agarose 1,2% en conditions non dénaturantes de produits d'amplification sur banque ADNc avec l'amorce MybAS1 5'Primer. Produits d'amplification pour gamme de température de fusion : 1 : 55°C, 2 : 57°C, 3 : 59,5°C, 4 : 61,2°C, 5 : 63°C, 6. 100 bp DNA ladder (Promega, US).



**Figure 53 :** Electrophorèse sur gel d'agarose 1,2% en conditions non dénaturantes de produits d'amplification sur banque ADNc avec les amorces MybS et T7 Primer. Produits d'amplification pour gamme de température de fusion : 1 : 54°C, 2 : 56,5°C, 3 : 58,5°C, 4 : 60,2°C, 5 : 62,5°C, 6 : 63,7°C. 7 : 1 kb DNA ladder (Promega, US).

Extension non codante en 5'

1/1 31/  
 AGA AAC CAA TTG ATC CAC GCA GAG AAG CAA GCC AGA GGG **ATG** AGA AAT CCG GCA TCT GCG  
 M R N P A S A 61/8  
 91/18  
 TCT ACG AGT AAG ACT CCG TGC TGT ACC AAG GTT GGG TTG AAA AGA GGA CCA TGG ACG CCT  
 S T S K T P C C T K V G L K R G P W T P  
 121/28 151/38  
 GAG GAA GAT GAG CTT CTA GCT AAT TAT GTG AAG AGA GAA GGT GAA GGG AGG TGG AGG ACG  
 E E D E L L A N Y V K R E G E G R W R T  
 181/48 211/58  
 CTG CCG AAG CGA GCT GGG TTG CTG CGG TGC GGC AAG AGC TGT CGC CTC CGG TGG ATG AAT  
 L P K R A G L L R C G K S C R L R W M N  
 241/68 271/78  
 TAT CTT CGG CCG TCA GTG AAG CGC GGC CAG ATA GCT CCC GAT GAG GAA GAT CTC ATT CTT  
 Y L R P S V K R G Q I A P D E E D L I L  
 301/88 331/98  
 CGC CTC CAT CGC CTG CTC GGT AAC AGG TGG TCT CTG ATT GCC GGA AGG ATC CCG GGG CGT  
 R L H R L L G N R W S L I A G R I P G R  
 361/108 391/118  
 ACA GAC AAT GAG ATC AAG AAC TAC TGG AAC ACC CAT CTC AGC AAG AAA CTC ATC AGC CAA  
 T D N E I K N Y W N T H L S K K L I S Q  
 421/128 451/138  
 GGA ATA GAT CCC AGA ACC CAC AAG CCA CTA AAC CCT AAA CCT AAT CCA TCA CCA GAT GTT  
 G I D P R T H K P L N P K P N P S P D V  
 481/148 511/158  
 AAT GCT CCT GTC TCA AAA TCA ATT CCA AAT GCA AAC CCT AAC CCT AGT TCT TCC CGG GTG  
 N A P V S K S I P N A N P N P S S S R V  
 541/168 571/178  
 GGA GAA ATT GGA AGC AAC CAT GAG GTC AAG GAG ATT GAA AGT AAT GAA AAT CAC AAG GAG  
 G E I G S N H E V K E I E S N E N H K E  
 601/188 631/198  
 CCG CCT AAC CTG GAT CAG TAT CAC AGT CCA CTT GCG GCC GAT AGC AAT GAG AAT TGG CAA  
 P P N L D Q Y H S P L A A D S N E N W Q  
 661/208 691/218  
 AGC GCA GAT GGG TTG GTA ACG GGA CTA CAA AGC ACC CAT GGT ACC AGC AAC GAT GAC GAA  
 S A D G L V T G L Q S T H G T S N D D E  
 721/228 751/238  
 GAC GAT ATC GGG TTC TGC AAC GAC GAT ACA TTC CCT TCA TTT TTG AAT TCT TTG ATT AAC  
 D D I G F C N D D T F P S F L N S L I N  
 781/248 811/258  
 GAG GAT GTG TTT GGA AAT CAT AAT CAT CAT CAG CAG CAG CAA CAG CAG CTG CAG  
 E D V F G N H N H H Q Q Q Q Q Q Q L Q  
 841/268 871/278  
 CAG GTG CAG CAG CCA TCT AAT GTG ATT GCA CCA TTG CCC CAC CCA GCA ATT TCT GTG CAG  
 Q V Q Q P S N V I A P L P H P A I S V Q  
 901/288 931/298  
 GCC ACC TTC AGT AGT AGC CCT AGA ACT GTC TGG GAA CCT GCT GCA CTA ACA TCT ACA TCG  
 A T F S S S P R T V W E P A A L T S T S  
 961/308 991/318  
 GCT CCT TTA GTC CAC GAT CAA AAA CAC TCC ATG TCT CCC **TGA** AAA TGA TGA ATC AAG CTT  
 A P L V H D Q K H S M S P \*  
 1021 1051  
 ATA TGA GTT TGA TTA AAA TCT GTG TGA TGT AAT TTG TTG TTT CCC TTT TTG TGT TTT GAT  
 1081/361 1111/371  
 GTT GTA TTA GCT TCC ACT CTT GGT TAT TTA ATT AGG ATG TTA ATT AAA GCT TTA TGT GTG  
 1141/381 1171/391  
 AAT ATC GTA TGT GAA ATG GAT CCT TGC AAC TAA GTT GTT TTT CCC AAA AAA AAA AAA AAA  
 1201/401  
 AAA AAA AAA AAA

**Figure 54** : Séquence ADNc *VvMybCs1* de pleine taille codant un facteur de transcription de type MYB. W : résidus de tryptophane conservé, A : acides aminés situés dans le domaine R2, K : acides aminés situés dans le domaine R3. **Motif C1**, **Motif C3**, **Domaine riche en glutamine**

Extension en 5' 1/1 31/11

CGG GGG ACG AGA GAG AAA GAA GAA AGA AAG **ATG** AGG AAT GCA TCC TCA GCA TCA GCT CCA  
M R N A S S A S A P

61/21 91/31  
CCT TCA TCT TCT TCA AAA ACA CCA TGC TGC ATC AAG GTT GGA TTG AAG AGG GGG CCA TGG  
P S S S S K T P C C I K V G L K R G P W

121/41 151/51  
ACG CCG GAG GAA GAC GAG GTT CTG GCC AAT TAC ATC AAG AAA GAA GGA GAA GGC CGG TGG  
T P E E D E V L A N Y I K K E G E G R W

181/61 211/71  
CGC ACC CTC CCG AAG CGC GCC GGT CTC CTC CGC TGC GGC AAG AGC TGT CGC CTC CTC TGG  
R T L P K R A G L L R C G K S C R L L W

241/81 271/91  
ATG AAC TAC CTC CGC CCT TCC GTC AAG CGC GGC CAG ATC GCC CCC GAT GAA GAG GAT CTC  
M N Y L R P S V K R G Q I A P D E E D L

301/101 331/111  
ATT CTC CGC CTC CAC CGA CTT CTC GGC AAC AGG TGG GCT TTG ATT GCC GGA AGA ATT CCG  
I L R L H R L L G N R W A L I A G R I P

361/121 391/131  
GGC CGG ACG GAT AAT GAG ATA AAA AAC TAC TGG AAC ACA CAC CTG AGC AAG AAG CTG ATC  
G R T D N E I K N Y W N T H L S K K L I

421/141 451/151  
AGC CAG GGA ATA GAT CCG AGA ACC CAT AAG CCA TTG AAC CCT AAT TCA TCA TCT GTT GAT  
S Q **G I D P R T H K P L N** P N S S S V D

481/161 511/171  
GTG AAA GCT TCT TCT TCA AAG GCA AAA GCT GTT ATG AAC CCT AAC CCT AAC CCT AAT CCT  
V K A S S S K A K A V M N P N P N P N P

541/181 571/191  
TCT CCT TCA GAA AAA GCA GCA GCC AAC AAG GAA GCT GGG AAC TTC AAG AGT GAC AAT CAG  
S P S E K A A A N K E A G N F K S D N Q

601/201 631/211  
TAT CAG ATT GGG GCA GCT GGC AAT GAT GGC AGT GCC AAT ATC CAG AAT TCG GAT GGT TCC  
Y Q I G A A G N D G S A N I Q N S D G S

661/221 691/231  
GGG ACC GGA TTG AGG AGC AGC AAC AAC GAA GAA GAC GAT GAC CTT AAC TGT GGC ACC GAT  
G T G L R S S N N E E D D D L N C G T D

721/241 751/251  
GAT GTC TTC TCT TCA TTT TTG AAC TCA TTG ATC AAT GAG GAT GTG TTT CCT GGA CAG CAC  
D V F S **S F L N S L I N E D** V F P G **Q H**

781/261 811/271  
CAT CTC CAA CAA CAG CAC CAT GGT GGT CTC ATT GCA CCG GGC TCC GAT GCT TTG ATC TCT  
**H L Q Q Q** H H G G L I A P G S D A L I S

841/281 871/291  
ACT TCT TCA GTC CAG TCG TTC GGG TTC GGT ACC AGC TGG GAG GCT GCA GCC ATG ACT TCC  
T S S V Q S F G F G T S W E A A A M T S

901/301 931/311  
ACG TCT GTT TTT AGC CAA ATC GAT CAC TCC AAG AGG TTT AAC GAT CAA CCT GAT AAG CGG  
T S V F S Q I D H S K R F N D Q P D K R

961/321 991/331  
TTC TGA CAG CCG GTG TTC TTT AAT TTG GCT TCA ACA CCC TGC AAT GAG ATA TAT AGT TAA  
F Extension en 3'

TAA GAA TTC TAG GGT TTG GGT TGT TAA TTT ATG TAT GTG GTT GTG TTG TTG TGT TAG TAT  
GCT TTA TTT GTA TTG TGA ACA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA

**Figure 55** : Séquence ADNc *VvMybCs2* de pleine taille codant un facteur de transcription de type MYB. **W** : résidus de tryptophane conservé, **A** : acides aminés situés dans le domaine R2, **K** : acides aminés situés dans le domaine R3. **Motif C1**, **Motif C3**, **Domaine riche en glutamine**

Types de modifications		VvMybCs1	VvMybCs2
Phosphorylation	Protéine Kinase C	9-11 TSK 60-62 SCR 72-74 SVK 121-123 SKK 133-135 THK 164-166 SSR 293-293 SPR	14-16 SSK 155-157 SSK 65-67 SCR 77-79 SVK 126-128 SKK 138-140 THK
	Caséine kinase II	26-29 TPEE 108-111 TDNE 172-175 SNHE 222-225 TSND 223-226 SNDD 296-299 TVWE	31-34 TPEE 113-116 TDNE 147-150 SSVD 171-174 SPSE 217-220 SNNE 281-284 TSWE 295-298 SQID
	Tyrosine Kinase	107-115 RTDNEIKNY	112-120 RTDNEIKNY
	<b>Sites de Myristoylation</b>	53-58 GLLRCG 94-99 GNRWSL 211-216 GLVTGL 215-220 GLQSTH	53-58 GLLRCG 99-104 GNRWAL 183-188 GNFKSD 194-199 GAAGND 197-202 GNDGSA 209-214 GSGTGL 213-218 GLRSSN
	<b>Sites de N-Glycosylation</b>		3-6 NASS 145-148 NSSS

**Tableau 7** : Liste et position des différents sites putatifs de modifications post-traductionnelles.



**Figure 56** : Mutants d'*Arabidopsis thaliana* sur-exprimant *VvMybCs1* et *VvMybCs2*. La sur-expression des deux gènes présente les mêmes caractéristiques.

A) : Vue d'ensemble d'un plant sauvage . B) : Vue d'ensemble d'un plant sauvage. C) Phénotype nain avec épinnostie des feuilles. D) : Blanchissement des ébauches foliaires au niveau de la rosette. E) : Accumulation de composés pigmentaires rouges dans le primordium foliaire. F) : Développement foliaire avorté.

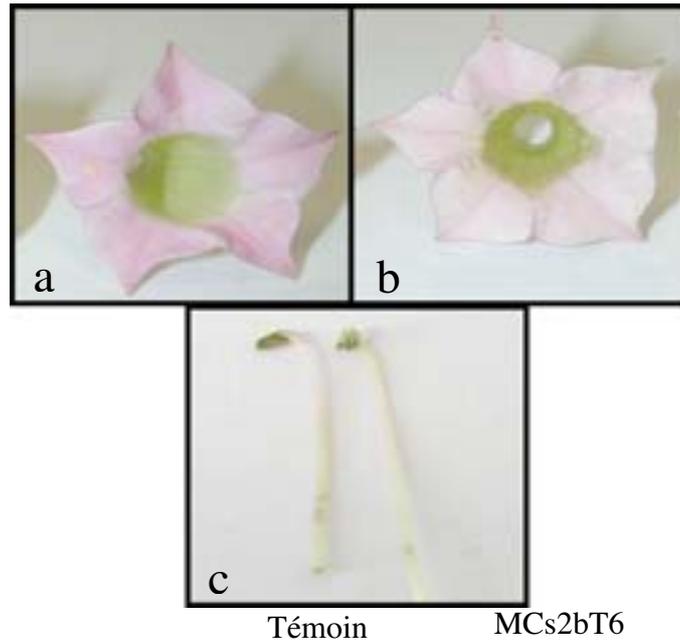
A)  
+1  
MRNASSASAPPSSSSKTPCCIKVGLKRGPWTPPEDEVLANYIKKEGEGRWRTLPKRAGLLR  
CGKSCRLWMNYLRPSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYW  
NTHLSKKLISQGIDPRTHKPLNPNSSSVVDVKASSSKAKAVMNPNPNPSPSEKAAANKEA  
GNFKSDNQYQIGAAGNDGSANIQNSDGS GTGLRSSNNEEDDDLNCGTDDVFSSFLNSLINE  
DVFPGQHHLQQHHGGLIAPGSDALISTSSVQSFSGTTSWEAAAMTSTSVFSQIDHSKRFN  
DQPKRF

B)  
+1  
MRNASSASAPPSSSSKTPCCIKVGLKRGPWTPPEDEVLANYIKKEGEGRWRTLPKRAGLLR  
CGKSCRLWMNYLRPSVKRGQIAPDEEDLILRLHRLLGNRWALIAGRIPGRTDNEIKNYW  
NTHLSKKLISQGIDPRTHKPLNPNSSSVVDVKASSSKAKAVMNPNPNPSPSEKAAANKEA  
GNFKSDNQYQIGAAGNDGSANIQNSDGS GTGLRSSNNEEDDDLNCGTDDVFSSFLNSLINE  
DVFPGQHHLQQHHGGLIAPGSDALISTSSVQSFSGTTSWEAAAMTSTSVFSQIDHSKRFN  
DQPKRF

**Figure 57** : Séquence protéiques de VvMybCs2.

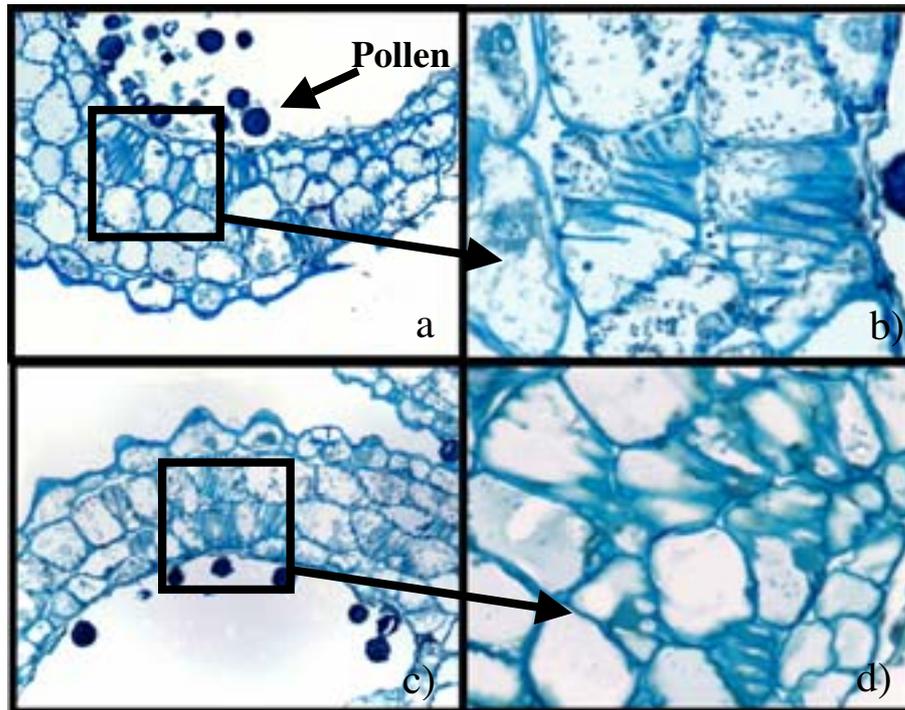
A) Séquence protéique de VvMybCs2a avec les deux ponts salins (E34- R61) et (D35-R69)

B) Séquence protéique de VvMybCs2b avec le pont salin conservé (E34- R61) et modifié (D35-L69). I résidu arginine en position 69 initialement présent chez VvMybCs2a est remplacé par un résidu Leucir chez VvMybCs2b.



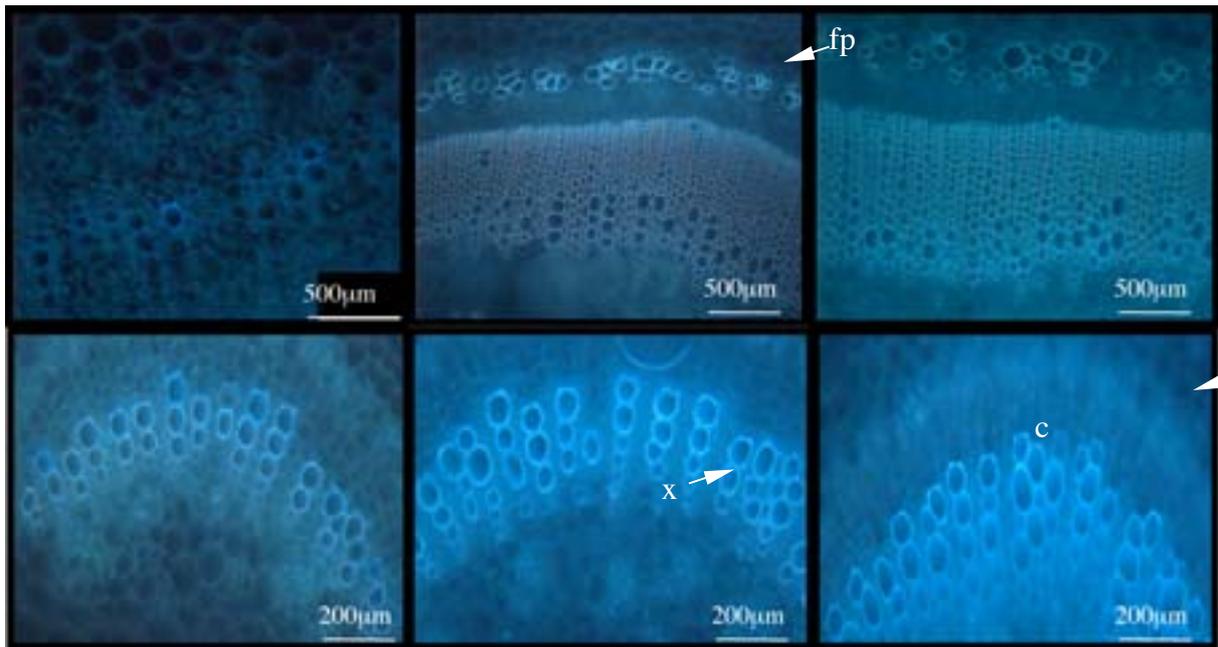
**Figure 58** : Différentiel de pigmentation dans les pétales et les étamines de fleurs de tabac transgéniques sur-exprimant VvMybCs2b.

- a) Pétales témoins.
- b) Pétales transgéniques (lignée MCs2bT6).
- c) Etamines témoin (CRTL)-Etamine transgénique (MCs2bT6).

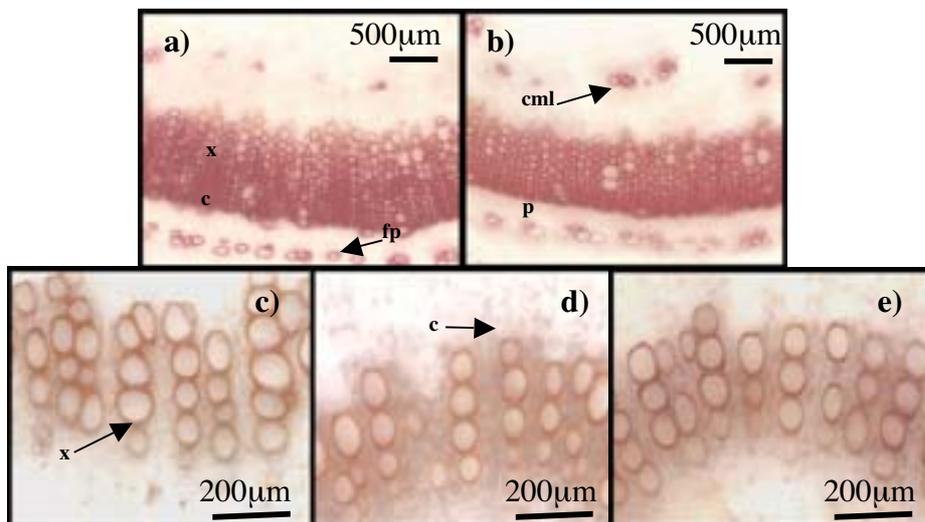


**Figure 59** : Coupes d'anthères de tabacs (stade 10 d'après Koltunow et *al.*, 1990).

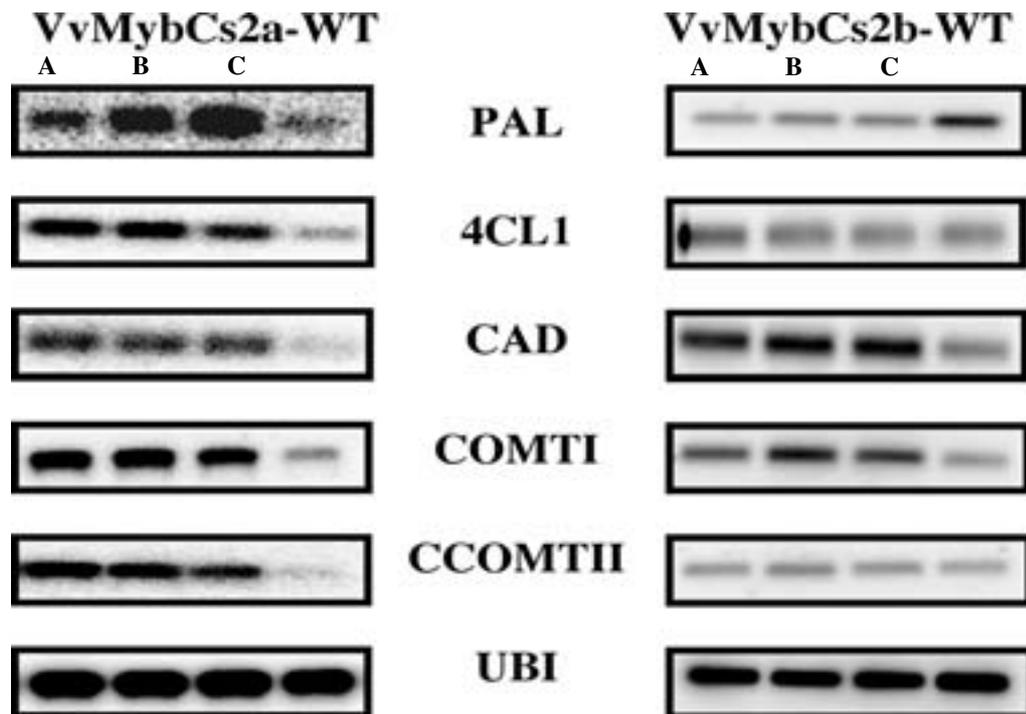
- a) Vue d'ensemble de l'assise endothéciale sur une coupe d'anthères transgéniques VvMybCs2b.
- b) Vue détaillée de l'assise endothéciale (VvMybCS2b).
- c) Vue d'ensemble de l'assise endothéciale sur une coupe d'anthères de plantes témoins.
- d) Vue détaillée de l'assise endothéciale (témoin).



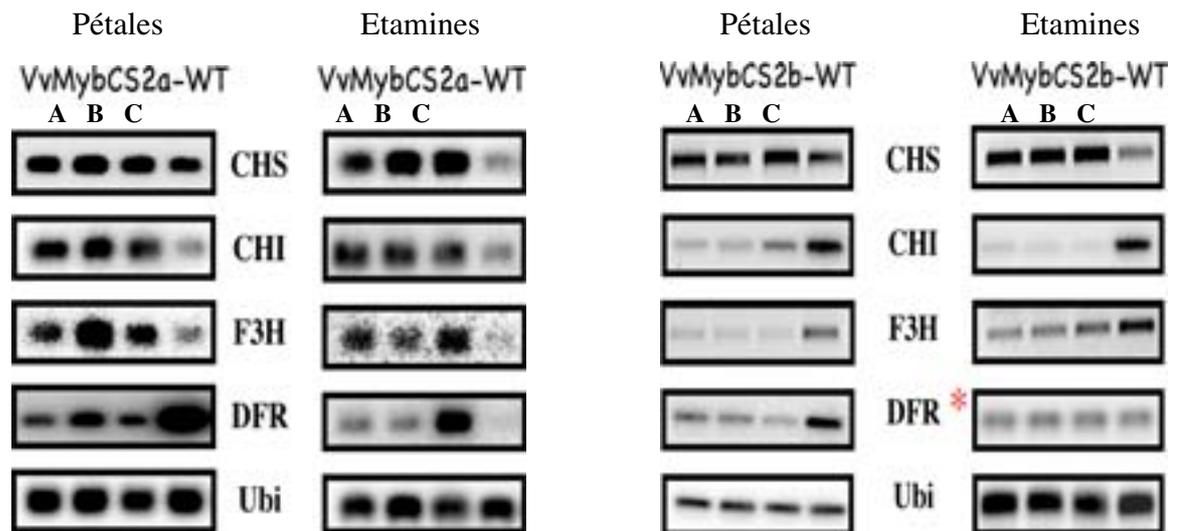
**Figure 60** : Autofluorescence naturelle de tissus lignifiés sur des coupes transversales de tiges (a, c, e) et de pétioles (b, d, f) de différentes lignées de tabacs. (a-b) : lignée *VvMybCs2a*, (c-d) : lignée témoin, (e-f) : lignée *VvMybCs2b*. c : cambium, x : xylème, fp : fibres du phloème, p : phloème. Les coupes de tiges sont effectuées au niveau du cinquième entre-noeud à partir du méristème apical. Les coupes des tiges sont réalisées sur des feuilles de même développement à la base du pétiole.



**Figure 61** : Coupes transversales de tiges (a, b) et de pétioles (c, d, e) de tabac après coloration au réactif de Maüle. Les mêmes conditions de prélèvement citées ci-dessus ont été réalisées pour ces analyses. a) et d) lignées témoins ; b) et e) lignées *VvMybCs2b*, c) lignée *VvMybCs2a*, c : cambium, x : xylème, fp : fibres du phloème, p : phloème, cml : cellules médullaires lignifiées

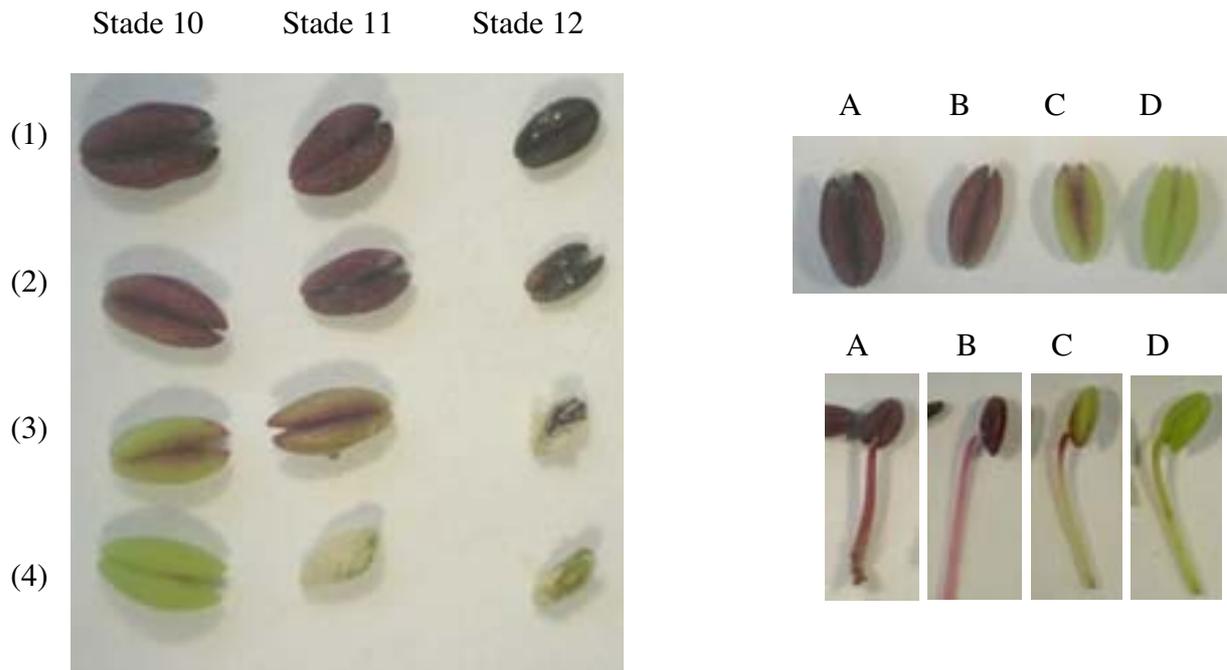


**Figure 62** : Autoradiographie de « Southern-Blot » de produits PCR issus de rétrotranscrits codant différentes protéines de la voie de biosynthèse des acides phénoliques et des monolignols sur trois lignées indépendantes sur-exprimant respectivement *VvMybCs2a* et *VvMybCs2b*. Une lignée sauvage est utilisée comme témoin. PAL : phenylalanine ammonia lyase, 4CL1 : coumaryl CoA ligase (isoforme 1), CAD : alcool cinnamylique déhydrogénase de type 1, COMT I : acide caffeic O methyltransférase de type I, CcoAOMT II : caffeoyl CoA O methyltransférase de classe II, UBI : ubiquitine.



**Figure 63** : Autoradiographie de « Southern-Blot » de produits PCR issus de rétrotranscrits codant différentes enzymes de la voie de biosynthèse des flavonoides sur trois lignées indépendantes sur-exprimant respectivement VvMybCs2a et VvMybCs2b à partir d'étamines et de pétales. Une lignée sauvage est utilisée comme témoin. CHS : chalcone synthase, CHI : chalcone isomérase, DFR : Dihydroflavonol réductase, UBI : Ubiquitine. PCR de 15 cycles à l'exception de \* où 17 cycles ont été effectués.





**Figure 65** : Restauration partielle du phénotype normal chez les doubles mutants VvMybCs12.

a) Libération du pollen sur des lignées simples et doubles mutantes par rapport à une lignée contrôle. (1) : VvMybCs1, (2) : VvMybCs2, (3) : VvMybCs12, (4) : témoin.

b) Atténuation de la coloration des anthères chez les lignées VvMybCs12 par rapport aux lignées simple-mutants. Les étamines ont été prélevées entre le stade 10 (avant l'anthèse), et le stade 12 (libération du pollen). A : VvMybCs1, B : VvMybCs2, C : VvMybCs12, D : contrôle.

c) Atténuation de la coloration du filet des étamines VvMybCs12 par rapport aux lignées VvMybCs1 et VvMybCs2

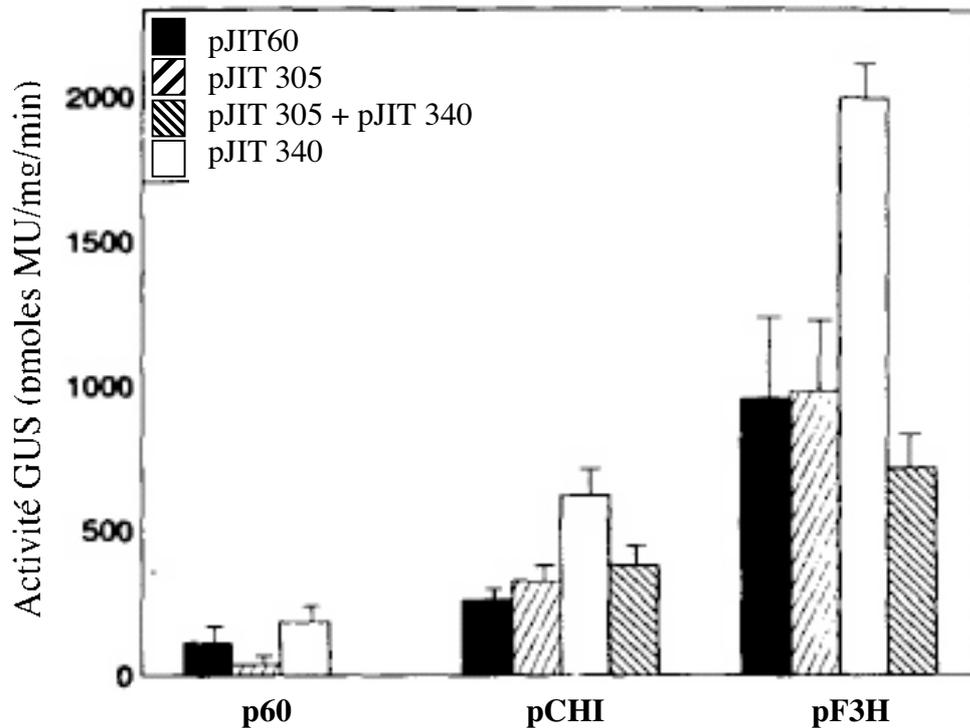
**Fleur sauvage**



**Fleur VvMybCs12**



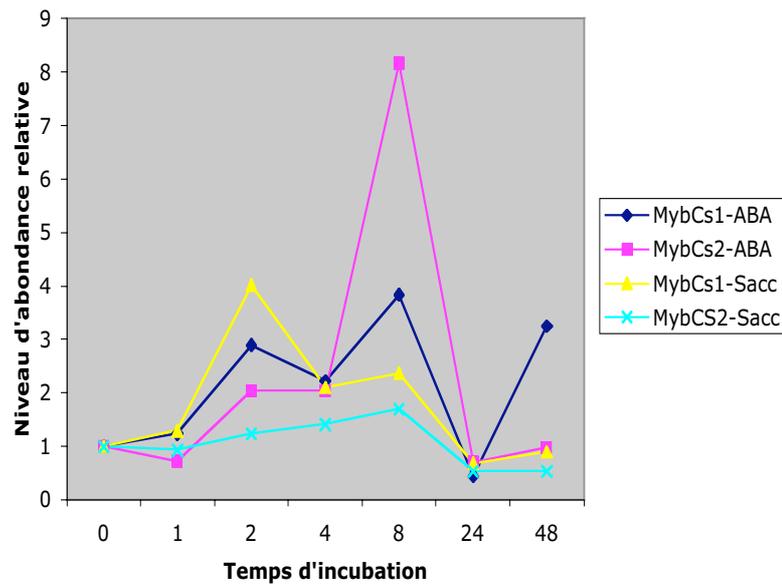
**Figure 66** : Augmentation du phénotype de coloration dans les pétales des lignées VvMybCs12. Les observations sont réalisées sur des fleurs bien ouvertes au stade 12 d'après Koltunow et al., 1990.



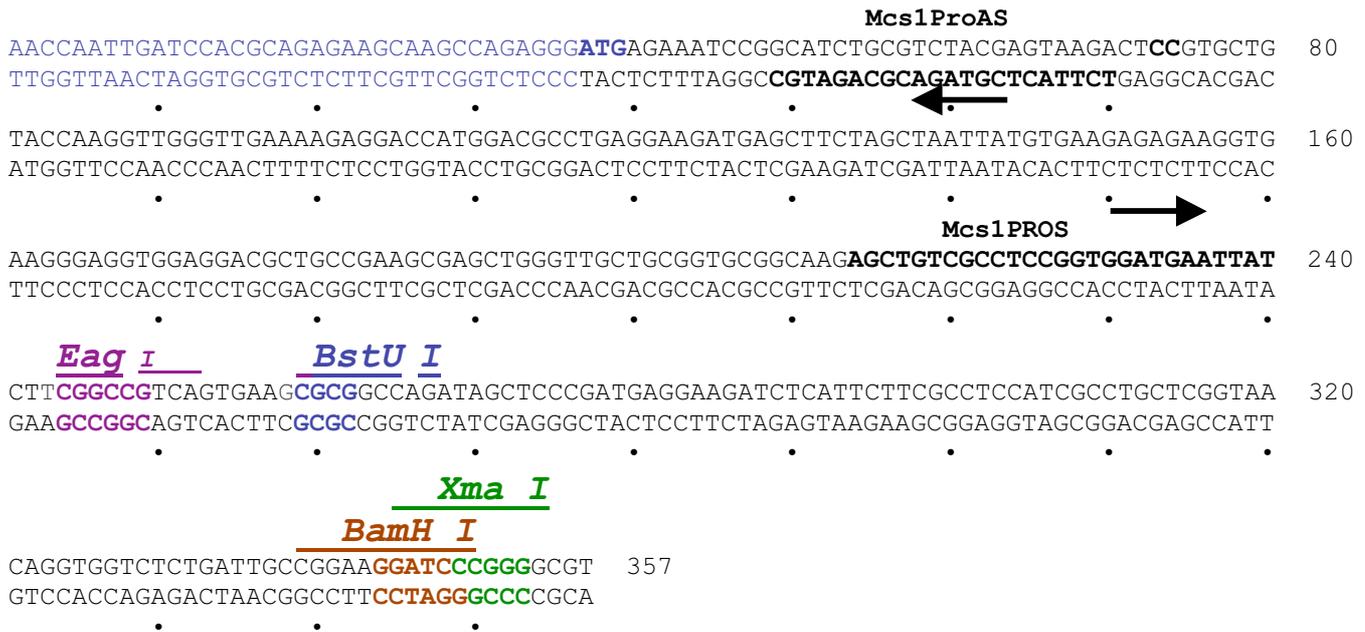
**Figure 67** : Activation transcriptionnelle des promoteurs des gènes CHI et F3H par AmMYB305 et AmMyb340 dans des protoplastes de tabacs.

P60 contient la région TATA du promoteur constitutif 35S du CaMV en amont du nucléotide -60 relatif au site d'initiation de la transcription fusionné avec le gène rapporteur GUS.

PJIT 305 et pJIT340 contiennent les séquences complètes des ADNc Myb 305 et Myb 240 inséré dans le pJIT60 dans lequel l'expression du gène est sous le contrôle d'une double séquence 35S. L'activité GUS est déterminée dans les protoplastes co-transformés de tabac avec différentes combinaisons de gènes rapporteurs et de gènes effecteurs. Les barres indiquent la moyenne des activités GUS avec l'écart type correspondant à la répétition de quatre transformations indépendantes. D'après Moyano (1996).



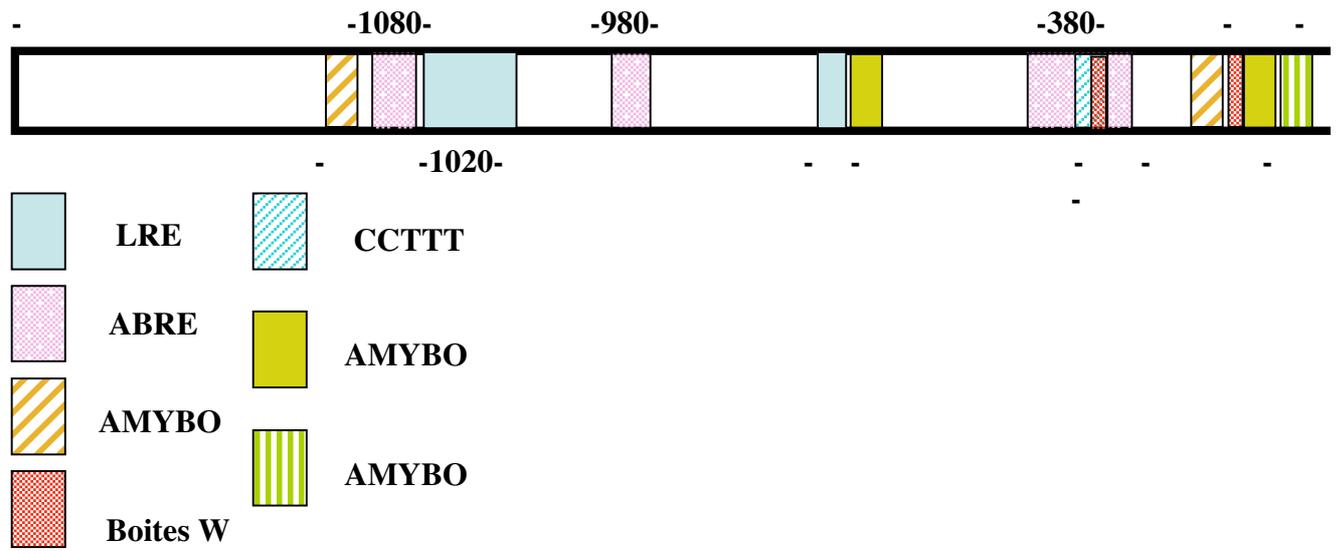
**Figure 68** : Niveaux d'abondance des transcrits *VvMybCs1* et *VvMybCs2* au cours du temps dans des cultures cellulaires induites de Vigne (CS6) suite à une induction par le Saccharose (58mM) et l'ABA (10 $\mu$ M). Les niveaux d'abondance des transcrits ont été calculés à partir d'une PCR réalisée sur trois lots différents de rétro-transcrits. Les niveaux d'abondance des transcrits sont normalisés dans un premier temps, par rapport au temps  $t_0$ , puis dans un deuxième temps en fonction de l'expression d'un gène contrôlé *EF1*. Le nombre de cycles de PCR effectués est de 27 cycles.



**Figure 69** : Position des sites de restrictions et des amorces utilisées pour la réaction de PCR inverse.



**Figure 70**: Identification et positionnement d'une séquence promotrice du gène *VvMybCs1*, en marron, Les régions non codantes, en bleu la séquence codante et bleu gris, la séquence promotrice. + 1 correspond au site d'initiation de la transcription.



**Figure 71** : Position des domaines ABRE, LRE, et quelques séquences liées à la régulation par les sucres sur la séquence promotrice du gène *VvMybC1*.

Numéro du stade	1	2	3	4	5
Jours après l'anthèse	20	36	71	91	107
Date	(Véraison)				
	26/06/2000	12/07/2000	16/08/2000	05/09/2000	21/09/2000
Poids moyen (g/baie)	0,137	0,615	1,4	1,57	1,7

**Tableau 8** : Récapitulatif des critères de prélèvement des baies de raisin.