

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Végétale

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 Décembre 2011

Par

Jérémy PILLET

Impact du microclimat sur le métabolisme de la baie de raisin

Devant le jury composé de :

M Philippe HUGUENEY Directeur de Recherches, INRA COLMAR - Rapporteur

M Charles ROMIEU Chargé de Recherches, INRA MONTPELLIER - Rapporteur

M. Yves GIBON Directeur de Recherches, INRA BORDEAUX - Examineur

M Félix KELLER Professeur, Université de ZÜRICH - Examineur

Mme Annick MOING Directrice de Recherches, INRA BORDEAUX - Examinatrice

M David LECOURIEUX Maître de Conférences, Université BORDEAUX Segalen – Dir. de thèse

M Eric GOMES Professeur, Université BORDEAUX 1 - Membre invité

M Philippe PIERI Chargé de Recherches, INRA-EA - Membre invité

« La phrase la plus excitante à entendre en science, celle qui annonce de nouvelles découvertes, n'est pas «Eurêka», mais plutôt «Tiens, c'est marrant...» »

Isaac Asimov

Résumé

Le réchauffement climatique planétaire annoncé ne sera pas sans conséquence sur le métabolisme de la baie et en particulier sur la teneur en composés phénoliques. Les objectifs de cette thèse visent à mieux comprendre les processus de régulation associant le microclimat des baies et la synthèse des composés phénoliques. Par des approches moléculaires et biochimiques, ce travail a permis de mieux décrire les réponses spécifiques des baies de raisin (cultivar Cabernet-Sauvignon) aux facteurs rayonnement et température.

L'analyse du transcriptome des baies exposées soit à un stress thermique soit à un stress lumineux a mis en lumière deux processus, une réponse rapide ayant lieu dès les premières heures de traitement et une réponse apparaissant au bout de plusieurs jours d'exposition aux stress. Cette étude a également permis de valider le système expérimental de découplage des effets du rayonnement et de la température.

L'analyse des profils d'expression d'une vingtaine de gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes révèle des différences dans la réponse transcriptionnelle des gènes en fonction du stress et du stade développement auquel il a été appliqué. Néanmoins cette réponse n'est pas ou peu corrélée avec les variations des teneurs en anthocyanes et flavonols observées. Les teneurs en anthocyanes sont fortement réduites par l'action de la chaleur alors que les teneurs de certains flavonols augmentent sous l'influence du rayonnement. Au niveau des acides présents dans la pulpe des baies, l'acide malique voit sa teneur réduite sous l'effet de la chaleur ainsi que d'une forte intensité lumineuse. Les analyses montrent un impact important du stress thermique sur la teneur de la phénylalanine, de la tyrosine et de la lysine dans la pellicule.

Parallèlement, l'initiation d'une étude du métabolome des pellicules de baies de raisin a été entreprise par UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™ et a permis d'acquérir des bases solides pour optimiser le protocole utilisé en vue d'analyses futures. Cette étude permet de dresser une liste préliminaire de métabolites d'intérêts.

Enfin, le gène *VvGOLS1* (*Galactinol synthase 1*) voit son expression stimulée dans les baies exposées au stress thermique, ce qui se traduit par une accumulation de galactinol, précurseur de la voie des RFOs. Un rôle de molécule «signal» est envisagé pour le galactinol. Un régulateur de la transcription de *VvGOLS1* a également été identifié par des expériences d'expression transitoire en protoplastes. Il s'agit du facteur de transcription *VvHsfA2*, dont l'expression est également stimulée par le stress thermique. Dans ce contexte, la caractérisation des gènes de la famille des Hsfs (Heat Stress Factors) a été initiée.

« Microclimate influence on berry metabolism »

Global warming will affect berry metabolism, and especially phenylpropanoid contents. This PhD work aimed to acquire a better understanding on the cellular processus linking the microclimate and the phenolic synthesis. By molecular and biochemical approaches, we extended this study to detail specific responses taking place in berries under heat and light stress.

Transcriptomic analysis of heat-stressed and light-stressed berries showed the existence of two processes that occur in exposed berries. The first one triggers a rapid and transient expression of genes within the first hours of treatment. The second one mobilizes a set of genes showing increase in their expression after several days of stress exposure. Furthermore, this study validated the experimental set used to discriminate the effects of light and temperature, respectively.

Expression analysis of 20 genes involved in the flavonoid biosynthetic pathway revealed strong differences among the transcriptional responses, depending on the nature of stress and the developmental stage of the berry. However, expression patterns of genes involved in the biosynthesis of flavonoid could not fully explain the changes in anthocyanin and flavonol contents. This suggests that additional regulation processes such as post-traductional modifications of enzymes or metabolite degradation might take place in berries under abiotic stress. Anthocyanin content decreases under heat stress whereas flavonol content increases under high light. Malic acid increases in berry exposed to heat stress and high light. Moreover, heat-stressed berries showed an accumulation of phenylalanine, tyrosine and lysine in skin but not in pulp.

In parallel, a metabolomic analysis was initiated on stress exposed berry skins by using UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™ technology. The first experiments revealed contrasted metabolite contents in berries according to the stress applied, and highlighted several metabolites of interest. The preliminary assays will help optimize this powerful tool for futures analysis.

Finally, expression of *VvGOLS1* (*Galactinol synthase 1*) was strongly induced in grape berries exposed to heat stress, in good agreement with the observed galactinol accumulation. Role of galactinol as a signaling molecule is discussed. Transient expression experiments revealed that *VvGOLS1* expression is regulated at the transcriptional level through *VvHsfA2* action. *VvHsfA2* expression is also stimulated under heat stress. In this context, characterization of the grapevine heat stress factors was initiated.

Sommaire

Avant-propos	1
Introduction	3
1. La baie de raisin.....	3
1.1. Morphologie	3
1.2. Développement.....	5
2. Le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire chez la Vigne	7
2.1. Le métabolisme primaire	7
2.1.1. Les sucres	7
2.1.2. Les acides organiques.....	8
2.1.3. Les hormones	9
2.2. Le métabolisme secondaire.....	9
2.2.1. Les alcaloïdes	11
2.2.2. Les terpènes	11
2.2.3. Les composés phénoliques.....	12
2.2.4. La voie de biosynthèse des flavonoïdes	20
3. Les stress abiotiques.....	28
3.1. Le stress thermique.....	28
3.1.1. Impacts physiologiques du stress thermique sur le fonctionnement des plantes	29
3.1.2. Réponses adaptatives des plantes face au stress thermique.....	32
3.1.3. Impact du stress thermique sur les métabolites secondaires et implications de ces composés dans la réponse au stress	38
3.2. Le stress rayonnement.....	39
3.2.1. Impacts physiologiques du stress rayonnement sur le fonctionnement des plantes	40
3.2.2. Réponses adaptatives des plantes face au stress rayonnement	42
3.3. Impacts des stress abiotiques sur les baies de raisin	45
3.3.1. Effets du stress thermique sur la baie de raisin	45
3.3.2. Effets du stress rayonnement sur les baies de raisin	46
4. Une famille de composés intervenant dans la réponse aux stress abiotiques : les oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs)	48
4.1. Présentation.....	48
4.2. La voie de biosynthèse des RFOs.....	49
4.2.1. La galactinol synthase (GOLS).....	49
4.2.2. La raffinose synthase (RAF)	52
4.2.3. La stachyose synthase (STS)	53
4.2.4. La synthèse des RFOs à longue chaîne	53
4.3. Rôles physiologiques des RFOs.....	54
4.3.1. Rôle dans la germination de la graine	54

4.3.2. Rôle dans la dessiccation de la graine	55
4.3.3. Rôles dans la résistance aux stress abiotiques	55
5. La métabolomique chez les plantes	57
5.1. Empreinte métabolique versus profilage métabolique	57
5.2. Méthodes analytiques utilisées en métabolomique.....	58
5.2.1. La Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN).....	59
5.2.2. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).....	59
5.2.3. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	60
5.2.4. L'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse (EC-MS).....	60
5.3. Etudes métabolomiques de la réponse des plantes au stress thermique	60
5.4. L'UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™	61
5.4.1. Le séparateur (UPLC)	61
5.4.2. La source d'ionisation (ESI).....	62
5.4.3. Le spectromètre de masse (LTQ-Orbitrap™)	63
6. Positionnements du travail de thèse	65
Matériel et méthodes.....	67
1. Matériel végétal et système expérimental	67
1.1. Matériel végétal.....	67
1.2. Conditions d'expérimentation en serre	67
2. Méthodes de biologie moléculaire	68
2.1. Extraction des ARN totaux des baies de raisin	68
2.1.1. Extraction d'ARN	68
2.1.2. Traitement des ARN totaux à la DNase	69
2.2. PCR quantitative en temps réel.....	69
2.2.1. La transcription inverse	69
2.2.2. Conception des amorces	69
2.2.3. Amplification des gènes candidats	71
2.2.4. Calculs des niveaux relatifs d'expression	71
2.3. Analyses microarrays	72
2.3.1. Utilisation de lames 14K Qiagen.....	72
2.3.2. Synthèse et marquages des sondes	72
2.3.3. Dosage des sondes et détermination de l'efficacité d'incorporation des fluorochromes	72
2.3.4. Co-hybridation et lavages des lames.....	73
2.3.5. Analyse et identification des gènes différentiellement exprimés	74
2.3.6. Mappage des sondes oligo-nucléotidiques et annotation des gènes cibles	74
2.3.7. Utilisation de l'outil MapMan appliqué à la Vigne	74
2.4. Expression transitoire dans des protoplastes de tabac.....	75
2.4.1. Clonage de séquences d'ADN à partir d'échantillons biologiques	75
2.4.2. Isolement et préparation des protoplastes de Tabac	75
2.4.3. Transformation des protoplastes	76
2.4.4. Test GUS de l'activité β-glucuronidase.....	76

3. Méthodes biochimiques	76
3.1. Préparation	76
3.2. Dosage des sucres.....	76
3.2.1. Dosage du glucose et du fructose par méthode enzymatique.....	76
3.2.2. Dosage du glucose, du fructose, du saccharose, du galactinol et du raffinose par HPLC	77
3.3. Dosage des acides organiques.....	78
3.4. Dosage des flavonoïdes	78
3.5. Dosage des acides aminés	79
3.6. Empreinte métabolique par UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™.....	79
4. Analyses bioinformatiques	80
4.1. Bases de données.....	80
4.2. Logiciels utilisés pour la caractérisation de séquences d'ADN <i>in silico</i>	80
4.3. Exploitation des données métabolomiques	80
4.4. Tests statistiques réalisés sur les dosages de métabolites.....	81
Chapitre I: Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt	83
I.1. Modalités d'application et caractérisation des stress thermiques et lumineux	83
I.2. Analyse transcriptomique des baies de raisin exposées à un stress thermique ou lumineux pendant la maturation	86
I.2.1. Effet de la température sur le transcriptome des baies de raisin	87
I.2.2. Effet de la lumière sur le transcriptome des baies de raisin	95
I.2.3. Comparaison des effets «stress thermique – stress lumineux» sur le transcriptome de la baie de raisin	103
I.3. Approche ciblée : analyse des profils d'expression de gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes dans des baies exposées aux stress	107
I.3.1. Expression de gènes du métabolisme phénolique dans des baies (stade véraison) exposées à une température élevée.....	107
I.3.2. Expression de gènes du métabolisme phénolique dans les baies (stade «+3SAV») exposées à une température élevée.....	109
I.3.3. Expression de gènes du métabolisme phénolique dans des baies (stade véraison) exposées à une lumière intense	111
I.3.4. Expression de gènes du métabolisme phénolique dans des baies (stade «+3SAV») exposées à une lumière intense	113
I.4. Analyse de la composition de la baie de raisin en anthocyanes.....	115
I.4.1. Composition en anthocyanes des baies exposées à un stress thermique ou lumineux à partir de la véraison	115

1.4.2. Composition en anthocyanes des baies exposées à un stress thermique ou lumineux trois semaines après la véraison	117
I.5. Analyse de la composition de la baie de raisin en flavonols	117
1.5.1. Composition en flavonols des baies exposées à un stress thermique ou lumineux à partir de la véraison	119
1.5.2. Composition en flavonols des baies exposées à un stress thermique ou lumineux trois semaines après la véraison	119
I.6. Analyse de la teneur des baies stressées à maturité en sucres et acides organiques	122
I.7. Analyse de la composition en acides aminés de la baie de raisin stressée	123
1.7.1. Les acides aminés acides.....	123
1.7.2. Les acides aminés basiques.....	123
1.7.3. Les acides aminés apolaires.....	124
1.7.4. Les acides aminés polaires.....	124
I.8. Discussion	128
Chapitre II: Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin.....	138
II.1. Similarités et différences dans les protocoles utilisés entre les deux expérimentations.	138
II.2. Validation de la méthode de quantification des métabolites	139
11.2.1. Elimination des signaux parasites.....	140
11.2.1.1. Elimination des signaux retrouvés dans les échantillons « blancs »	140
11.2.1.2. Elimination des signaux propres au système analytique.....	141
II.3. Comportement des signaux de masse issus des pellicules exposées ou non aux stress	141
11.3.1. Identification des signaux de masse réagissant de manière significative aux différents traitements..	142
11.3.2. Autres propriétés intrinsèques aux jeux de données métabolomiques.....	144
11.3.3. Distinction des traitements grâce aux empreintes métaboliques des différents échantillons.....	146
II.4. Annotations des signaux de masse variant de manière statistiquement significative sous l'effet d'un des traitements	147
11.4.1. Utilisation de la base de données KEGG	147
11.4.2. Classement des métabolites putatifs annotés	147
11.4.2.1. Expérimentation 2009	148
11.4.2.2. Expérimentation 2010	157
II.5. Discussion	163
Chapitre III: Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique	172

III.1. Identification et analyse <i>in silico</i> des gènes intervenant dans la voie des RFOs dans le génome de la vigne	172
III.2. Expression des différents gènes de la voie de synthèse des RFOs dans les baies de raisin soumises à un stress thermique ou lumineux.....	178
<i>III.2.1. Profils d'expression des différentes isoformes de VvGOLS.....</i>	<i>178</i>
<i>III.2.2. Profils d'expression des gènes RAF et STS.....</i>	<i>178</i>
III.3. Teneurs en sucres dans les baies exposées au stress thermique.....	182
III.4. Régulation de l'expression de VvGOLS1 par VvHsfA2	182
<i>III.4.1. Identification de VvHsfA2 dans le génome de la Vigne.....</i>	<i>182</i>
<i>III.4.2. Expression de VvHsfA2 dans les baies exposées au stress thermique.....</i>	<i>186</i>
<i>III.4.3. Etude de l'interaction de VvHsfA2 avec le promoteur de VvGOLS1</i>	<i>186</i>
III.5. Discussion	187
Conclusions générales et perspectives	193
Références bibliographiques	198

Liste des figures

INTRODUCTION

- Figure 1 Structure détaillée d'une baie de raisin mature
- Figure 2 Le développement de la baie de *Vitis vinifera* cv Muscat
- Figure 3 Schéma simplifié des voies principales conduisant à la synthèse des métabolites secondaires et leur interaction avec le métabolisme primaire
- Figure 4 Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes
- Figure 5 Structure chimique de base des flavonoïdes
- Figure 6 Structure chimique des principaux flavanols, flavonols et anthocyanes chez la Vigne
- Figure 7 Voies de biosynthèse des flavonoïdes
- Figure 8 Modèles d'organisation des enzymes du métabolisme des flavonoïdes en métabolons
- Figure 9 Mécanismes d'acquisition de la tolérance au stress thermique
- Figure 10 Représentation des voies de synthèse et de recyclage des AOS
- Figure 11 Modèle représentant les mécanismes de protection limitant la photoinhibition dans les feuilles
- Figure 12 Structure et voie de biosynthèse des premiers membres de la classe des oligosaccharides de la famille du raffinose
- Figure 13 Schéma simplifié du fonctionnement d'une source électrospray en mode positif
- Figure 14 Exemple de trajectoire empruntée par un ion au sein de l'Orbitrap

CHAPITRE I

- Figure 15 Relevé des températures perçues par les baies.
- Figure 16 Relevé des intensités lumineuses et des températures perçues par les baies
- Figure 17 Analyse en composante principale des gènes différentiellement exprimés (p.valeur ajustée <0.01) dans les baies de raisin exposées à un stress thermique par rapport à des baies témoins ($\Delta T = +9^\circ\text{C}$).
- Figure 18 Diagramme d'Euler représentant les gènes induits (en rouge) et réprimés (en vert) (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) selon la durée d'exposition des baies au stress thermique ($\Delta T = +9^\circ\text{C}$)
- Figure 19 Regroupement par catégories fonctionnelles (Mapman) des gènes différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^\circ\text{C}$) par rapport à des baies témoins.
- Figure 20 Analyse en composante principale des gènes différentiellement exprimés (p.valeur ajustée <0.01) dans les baies de raisin exposées à une forte intensité lumineuse par rapport à des baies témoins ($\Delta I = +850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons).
- Figure 21 Diagramme d'Euler représentant les gènes induits (en rouge) et réprimés (en vert) (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) selon la durée d'exposition des baies au stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).
- Figure 22 Regroupement par catégories fonctionnelles (Mapman) des gènes différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin ayant subi une exposition à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons).
- Figure 23 Diagrammes de Venn représentant le nombre de gènes différentiellement induits (en rouge) et réprimés (en vert) (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) présents dans les baies soumises à un stress thermique ($\Delta T = +9^\circ\text{C}$) et dans les baies soumises à une forte intensité lumineuse ($\Delta I = +850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons).
- Figure 24 Profils d'expression des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes en réponse à un stress thermique ($\Delta T = +9^\circ\text{C}$) appliqué sur les baies de raisin au stade « véraison ».

- Figure 25 Profils d'expression des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes en réponse à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) appliqué sur les baies de raisin au stade «+3SAV».
- Figure 26 Profils d'expression des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes en réponse à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) appliqué sur les baies de raisin au stade « véraison ».
- Figure 27 Profils d'expression des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes en réponse à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) appliqué sur les baies de raisin au stade «+3SAV».
- Figure 28 Profils d'accumulation des anthocyanes dans la pellicule de baies soumises à un stress thermique (T, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (L, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 17j à partir du stade « véraison ».
- Figure 29 Profils d'accumulation des anthocyanes dans la pellicule de baies soumises à des stress thermiques (T1, $\Delta T=+6^{\circ}\text{C}$; T2, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (L1, $\Delta I=+600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons ; L2, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ».
- Figure 30 Profils d'accumulation des flavonols dans la pellicule de baies soumises à un stress thermique (T, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (L, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 17j à partir du stade « véraison ».
- Figure 31 Profils d'accumulation des flavonols dans la pellicule de baies soumises à des stress thermiques (T1, $\Delta T=+6^{\circ}\text{C}$; T2, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (L1, $\Delta I=+600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons ; L2, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ».
- Figure 32 Profils d'accumulation du glucose (A) et du fructose (B) dans la pulpe de baies soumises à des stress thermiques (T1, $\Delta T=+6^{\circ}\text{C}$; T2, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (L1, $\Delta I=+600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons ; L2, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ».
- Figure 33 Profils d'accumulation de l'acide malique (A) et de l'acide tartrique (B) dans la pulpe de baies soumises à des stress thermiques (T1, $\Delta T=+6^{\circ}\text{C}$; T2, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (L1, $\Delta I=+600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons ; L2, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ».
- Figure 34 Profils d'accumulation des acides aminés acides (A) et basiques (B) dans la pellicule et la pulpe de baies soumises à des stress thermiques (T°, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (Lumière, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ».
- Figure 35 Profils d'accumulation des acides aminés apolaires dans la pellicule et la pulpe de baies soumises à des stress thermiques (T°, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (Lumière, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ».
- Figure 36 Profils d'accumulation des acides aminés polaires dans la pellicule et la pulpe de baies soumises à des stress thermiques (T°, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (Lumière, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ».

CHAPITRE II

- Figure 37 Répartition des signaux de masse réagissant de manière significative (p.value > 0,05) dans les pellicules de baies exposées aux différents types de stress (Stress thermique, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$ et stress lumineux, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons).
- Figure 38 Exemple de transformation du jeu de données obtenu suite à l'expérimentation 2010 en mode positif afin d'éliminer les variations parasites intrinsèques aux données métabolomiques.
- Figure 39 Analyses en composantes principales de la répartition des différents échantillons en fonction de leur variabilité au niveau du métabolome.
- Figure 40 Répartition des métabolites putatifs annotés automatiquement suivant la base de données KEGG et différentiellement accumulés ou diminués (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2009.
- Figure 41 Répartition des métabolites putatifs annotés automatiquement suivant la base de données KEGG et différentiellement accumulés ou diminués (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2010.
- Figure 42 Capacité de détection des différentes familles de métabolites selon le système analytique utilisé

Figure 43 Diagramme de Venn représentant le nombre de signaux de masse dont l'intensité varie de manière significative (p .value < 0,05) soit selon la méthode de production de rangs soit selon le t -test.

CHAPITRE III

Figure 44 Alignement des séquences protéiques de galactinol synthase chez différentes espèces.

Figure 45 Positionnement sur le chromosome de différents gènes putatifs codant une GALACTINOL SYNTHASE et présentant un pourcentage d'identité très élevé.

Figure 46 Arbre phylogénétique représentant les différentes GALACTINOL SYNTHASE présentes chez différentes espèces (Bootstrap = 1000).

Figure 47 Arbre phylogénétique représentant les différentes RAFFINOSE SYNTHASE et STACHYOSE SYNTHASE présentes chez différentes espèces (Bootstrap = 1000).

Figure 48 Profils d'expression de *VvGOLS1*.

Figure 49 Relevé des températures perçues dans la baie sur 24h (A) et profil d'expression de *VvGOLS1* durant ces 24h (B).

Figure 50 Profils d'expression de *VvGOLS2*, *VvGOLS3* et *VvGOLS4* dans des baies contrôles (gris), dans des baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}\text{C}$) pendant 21j (rouge) et dans des baies exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j (bleu).

Figure 51 Profils d'expression de *VvRAF1*, *VvRAF2* et *VvSTS1* dans des baies témoins (C) et dans des baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}\text{C}$) pendant 21j (T).

Figure 52 Teneur en galactinol et en sucres majeurs dans différents compartiments de baies contrôles (gris) ou de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}\text{C}$) pendant 21j.

Figure 53 Arbre phylogénétique représentant les différents Hsfs identifiés chez la Vigne et ceux présents chez différentes espèces (Bootstrap = 1000).

Figure 54 Alignement des séquences protéiques de *VvHsfA2* et d'homologues identifiés chez d'autres espèces.

Figure 55 Profils d'expression de *VvHSFA2* dans des baies témoins (gris) et dans des baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}\text{C}$, rouge) sur une journée (A) et pendant 21j (B).

Figure 56 Localisation des boîtes HSE (Heat Shock Elements) sur le promoteur de *VvGOLS1*.

Figure 57 Analyse de l'activité GUS placé sous le contrôle du promoteur de *VvGOLS1* seul ou co-transformé avec la construction *35S-VvHsfA2* dans des protoplastes de Tabac.

Liste des tableaux

INTRODUCTION

Tableau 1 Récapitulatif des galactinol synthases et des raffinose synthases impliquées dans la réponse à un stress et de l'accumulation de RFOs correspondants.

MATERIEL & METHODES

Tableau 2 Liste des amorces des gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et du transport des anthocyanes utilisées en PCR Quantitative.

Tableau 3 Liste des amorces des gènes de la voie de biosynthèse des RFOs utilisées en PCR Quantitative et pour le clonage.

Tableau 4 Paramètres utilisés lors de l'analyse XCMS pour le traitement des données chromatographiques obtenues par UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™.

CHAPITRE I

Tableau 5 Nombre de gènes différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin ayant subi une exposition à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) par rapport à des baies témoins.

Tableau 6 Liste de gènes classés dans la catégorie « stress » et différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin ayant subi une exposition à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) par rapport à des baies témoins.

Tableau 7 Liste de gènes classés dans la catégorie « protéine » et différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin ayant subi une exposition à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) par rapport à des baies témoins.

Tableau 8 Liste de gènes classés dans la catégorie « développement » et différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin ayant subi une exposition à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) par rapport à des baies témoins.

Tableau 9 Liste de gènes classés dans la catégorie « secondary metabolism » et différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin ayant subi une exposition à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) par rapport à des baies témoins.

Tableau 10 Nombre de gènes différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin ayant subi une exposition à un stress lumineuse ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) par rapport à des baies contrôle.

Tableau 11 Liste de gènes classés dans la catégorie « stress » et différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin ayant subi une exposition à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) par rapport à des baies témoins.

Tableau 12 Liste de gènes classés dans la catégorie « développement » et différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin ayant subi une exposition à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) par rapport à des baies témoins.

Tableau 13 Liste de gènes classés dans la catégorie « protéine » et différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin ayant subi une exposition à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) par rapport à des baies témoins.

Tableau 14 Liste de gènes classés dans la catégorie « métabolisme secondaire » et différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin ayant subi une exposition à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) par rapport à des baies témoins.

Tableau 15 Liste de gènes différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) présents à la fois dans les baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) et dans les baies exposées à une forte intensité lumineuse ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pour au moins un temps d'exposition.

CHAPITRE II

Tableau 16 Quantification des étalons internes ajoutés lors de l'expérimentation 2009 (A) et 2010 (B).

Tableau 17 Récapitulatifs du nombre de variables détectées dans chaque expérimentation suite à l'application des différents filtres statistiques

Tableau 18 Récapitulatif du nombre de signaux biologiques détectés et réagissant de manière significative (p.valeur < 0,05) dans les pellicules de baies de raisin exposées soit à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) soit à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons).

Tableau 19 Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (p.valeur < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) suite à l'expérimentation 2009.

Tableau 20 Liste des métabolites putatifs annotés et significativement diminués (p.valeur < 0,05) dans les

pellicules de baies exposées à stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) suite à l'expérimentation 2009.

- Tableau 21 Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2009.
- Tableau 22 Liste des métabolites putatifs annotés et significativement diminués (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2009.
- Tableau 23 Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (A) et diminués (B) (p.value < 0,05) de manière commune dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) et celles exposées à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2009.
- Tableau 24 Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (A) et diminués (B) (p.value < 0,05) de manière inverse dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) et celles exposées à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2009.
- Tableau 25 Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) suite à l'expérimentation 2010.
- Tableau 26 Liste des métabolites putatifs annotés et significativement diminués (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) suite à l'expérimentation 2010.
- Tableau 27 Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (A) et diminués (B) (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2009.
- Tableau 28 Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (A) et diminués (B) (p.value < 0,05) de manière commune ou de manière inverse (C et D) dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) et celles exposées à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2010.
- Tableau 29 Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (FDR < 0,05) de manière commune ou spécifique dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) et celles exposées à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2010.

CHAPITRE III

- Tableau 30 Pourcentage d'identité entre les séquences protéiques de VvGOLS1, VvGOLS2, VvGOLS3 et VvGOLS4.

Liste des abréviations	
°C	Degré Celsius
aa	Acides Aminés
ABA	Acide Abscissique
ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
AOS	Active Oxygen Species
ARN	Acide Ribonucléique
bHLH	basic Helix Loop Helix
CE	Capillary Electrophoresis
cm	Centimètre
CoA	Coenzyme A
CPDK	Calcium Dependent Protein Kinase
CTAB	Bromure d'hexadécylTriméthylAmmonium
cv	Cultivar
DRE	Dehydration Responsive Element
DREB	Dehydration Responsive Element Binding
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EI	Electron Impact
ESI	Electrospray Ionization
FDR	Taux de fausses découvertes
FWHM	Full Width at Half Maximum
Gal	Galactose
GC	Gas Chromatography
GGT	galactan-galactan galactosyl transférase
GUS	béta Glucuronidase
h	Heures
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSE	Heat Shock Elements
HSF	Heat Shock Factors
HSP	Heat Shock Proteins
j	jours
L	Litres
LC	Liquid Chromatography
LHC	Light Harvesting Complex
LiCl	Chlorure de Lithium

Liste des abréviations (2)	
LTQ	Linear Trap Quadrupole
m	Mètre
M	Molaire (mole/litre)
m/z	Rapport Masse sur Charge
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MF	Matière Fraîche
min	Minutes
MS	Mass Spectrometry
MS	Matière Sèche
MYB	Myeloblastosis
nm	Nanomètres
OEC	Oxygen Evolving Complex
PAs	Proanthocyanidines
PCR	Polymerase Chain Reaction
ppm	Partie Par Million
PSII	Photosystème II
PVPP	PolyVinylPolyPyrrolidone
Ratio S/C	Ratio baies Stressées sur baies Contrôles
RFO	Raffinose Family Oligosaccharides
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RP	production de rangs
rpm	Rotations Par Minute
RT	Reverse Transcription
s	Secondes
SAV	Semaine Après Véraison
SDS	DodécylSulfate de Sodium
sHSP	Small Heat Shock Proteins
SPE	Solid Phase Extraction
SSC	Saline-Sodium Citrate
TOF	Time Of Flight
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultra-Violet
v/v	Volume pour Volume
W	Watt
ΔI	Différence d'irradiance
ΔT	Différence de température

Liste des gènes testés	
4CL	4 Coumaroyl CoA Ligase
AM	AnthoMATE
ANR	Anthocyanidine Réductase
ANS	Anthocyanidine Synthase
AOMT	Anthocyanine O-MéthylTransférase
C4H	Cinnamate 4 Hydrolase
CHI	Chalcone Isomérase
CHS	Chalcone Synthase
EF1γ	Elongation Factor 1γ
F3H	Flavanone 3 Hydrolase
FLS	Flavonol Synthase
Ga2ox	Gibbérelline 2 oxydase
GAPDH	Glycéraldehyde 3-Phosphate DéHydrogenase
GOLS	Galactinol Synthase
HSFA2	Heat Shock Factor A2
LAR	Leucoanthocyanidine Réductase
PAL	Phényl Ammonia Lyase
RAF	Raffinose Synthase
STS	Stachyose Synthase
TAL	Tyrosine Ammonia Lyase
UFGT	UDP-Glucose Flavonoïdes Glycosyl Transférase

Liste des composés phénoliques dosés	
Dp-glc	Delphinidine glucoside
Cy-glc	Cyanidine glucoside
Pt-glc	Pétunidine glucoside
Pn-glc	Péonidine glucoside
Mv-glc	Malvidine
Dp-glc-ac	Delphinidine acétyl glucoside
Cy-glc-ac	Cyanidine acétyl glucoside
Pt-glc-ac	Pétunidine acétyl glucoside
Pn-glc-ac	Péonidine acétyl glucoside
Mv-glc-ac	Malvidine acétyl glucoside
Dp-glc-cou	Delphinidine coumarate glucoside
Cy-glc-cou	Cyanidine coumarate glucoside
Pt-glc-cou	Pétunidine coumarate glucoside
Pn-glc-cou	Péonidine coumarate glucoside
Mv-glc-cou	Malvidine coumarate glucoside
Myr-glc	Myricétine glucoside
Querc-glc	Quercétine glucoside
Querc-glc-ac	Quercétine acétyl glucoside
Kaempf-glc	Kaempférol glucoside

Liste des acides aminés dosés	
ALA	Alanine
ARG	Arginine
ASN	Asparagine
ASP	Acide aspartique
GLN	Glutamine
GLU	Acide glutamique
HIS	Histidine
ILEU	Isoleucine
LYS	Lysine
MET	Méthionine
PHE	Phénylalanine
PRO	Proline
SER	Sérine
THR	Thréonine
TYR	Tyrosine
VAL	Valine

Avant-propos

L'importance économique et culturelle de la Vigne lui confère une place particulière dans le secteur de l'agro-alimentaire français. Premier producteur mondial de vin en 2010, la France totalise une surface viticole de plus de 820 000 hectares et une production de vin estimée à 44,75 millions d'hectolitres.

Néanmoins, l'ensemble de la profession doit relever plusieurs défis, parmi lesquels l'adaptation du vignoble français au changement climatique. En effet, les vignes, comme toutes les autres espèces cultivées, vont devoir faire face aux effets prédits et déjà en cours du réchauffement climatique. Ces changements vont modifier de nombreux aspects physiques de l'environnement, notamment la température, le niveau de rayonnement, la disponibilité en eau, la vitesse du vent et l'humidité de l'air. Bien que plusieurs de ces contraintes puissent d'ores et déjà être limitées par des pratiques au champ spécifiques (irrigation, barrières anti-vent, modification du système de conduite), la température reste un des paramètres les plus difficiles à contrôler dans les conditions au champ. La température et les autres facteurs physiques altèrent de manière importante le développement de la Vigne et modifient la qualité des baies de raisin et finalement du vin. L'augmentation de la température peut altérer le goût du vin (via l'équilibre acide), sa couleur (liée au contenu en anthocyanes) et son bouquet (lié au contenu en précurseurs d'arômes) (Champagnol, 1984; Schultz, 2000; Spayd *et al.*, 2002). Le réchauffement prédit par les modèles climatiques se pose donc comme un risque majeur pour la durabilité de la filière vitivinicole française et européenne. Ce réchauffement pourrait représenter à terme une menace parmi les plus graves depuis l'invasion du phylloxera à la fin du 19^{ème} siècle.

Ce travail de thèse se focalise sur la baie de raisin, produit final du développement de la Vigne et plus précisément sur l'impact de deux aspects de ce changement climatique, la température et le rayonnement, sur la qualité et la croissance de ces baies. Les objectifs de la thèse sont de mieux comprendre les processus de régulation associant le microclimat des baies et leur métabolisme. Pour cela, nous avons choisi une démarche expérimentale en conditions contrôlées permettant de séparer les effets du rayonnement et de la température, pour étudier leurs conséquences respectives. Pour limiter au maximum l'implication de variables interférentes et mieux contrôler les conditions expérimentales, les expériences ont été réalisées en serre et sur un système expérimental particulier, la bouture fructifère (cultivar

Cabernet-Sauvignon). La démarche de la thèse se situe à deux échelles différentes. En premier lieu, des analyses ont été menées par des approches sans *a priori* afin d'avoir un aperçu général des modifications engendrées par les différents types de stress. Par la suite, le travail a ciblé des voies métaboliques d'intérêt par rapport à la problématique posée. Ces voies sont celles des flavonoïdes, composés importants pour la qualité des baies et des vins et celles des oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs), qui interviennent dans la réponse au stress thermique. Par des approches moléculaires et biochimiques, ce travail a permis de mieux décrire les réponses du développement et de la maturation des baies de raisin aux facteurs rayonnement et température.

Introduction

1. La baie de raisin

1.1. Morphologie

De l'extérieur vers l'intérieur, la baie est constituée successivement de l'exocarpe (communément appelé pellicule), du mésocarpe ou pulpe, et de l'endocarpe, entourant les pépins (Figure 1). Elle est reliée par le pédicelle à la rafle, partie ligneuse ramifiée supportant les grains.

- **L'exocarpe**

L'exocarpe est formé de la cuticule recouverte d'une cire appelée pruine, de l'épiderme généralement unicellulaire, et enfin de l'hypoderme constitué d'une dizaine d'assises cellulaires situées en dessous de l'épiderme (Hardie *et al.*, 1996; Carmona *et al.*, 2008). La pruine assure un rôle de protection. L'hypoderme est composé d'un hypoderme supérieur (constitué d'une assise comprenant trois couches de cellules) et d'un hypoderme inférieur, la morphologie cellulaire étant différente selon les deux types d'assises (Reynier, 2007). Les cellules de la pellicule accumulent notamment dans leurs vacuoles les composés phénoliques et les composés aromatiques (Hardie *et al.*, 1996; Reynier, 2007). L'accumulation des anthocyanes, un groupe particulier de composés phénoliques, dans les différentes assises cellulaires de l'exocarpe, permet de distinguer les cépages blancs des cépages rouges (Walker *et al.*, 2006; Reynier, 2007). De l'anthèse à la maturité des baies, la surface de la pellicule peut augmenter jusqu'à 640 fois (Hardie *et al.*, 1996).

- **Le mésocarpe**

Le mésocarpe, également appelé pulpe, représente 75 à 85% du poids frais de la baie et peut constituer jusqu'à 64% du volume final de la baie. Le mésocarpe se décompose en mésocarpe externe et mésocarpe interne, séparés par les vaisseaux conducteurs périphériques. La pulpe est constituée par les cellules parenchymateuses du mésocarpe et est impliquée dans l'accumulation de l'eau, des sucres et des acides organiques (Carmona *et al.*, 2008). Généralement incolore, la pulpe de la baie de raisin peut être colorée chez les cépages dits teinturiers (Huglin and Schneider, 1998). Le mésocarpe est irrigué par les faisceaux

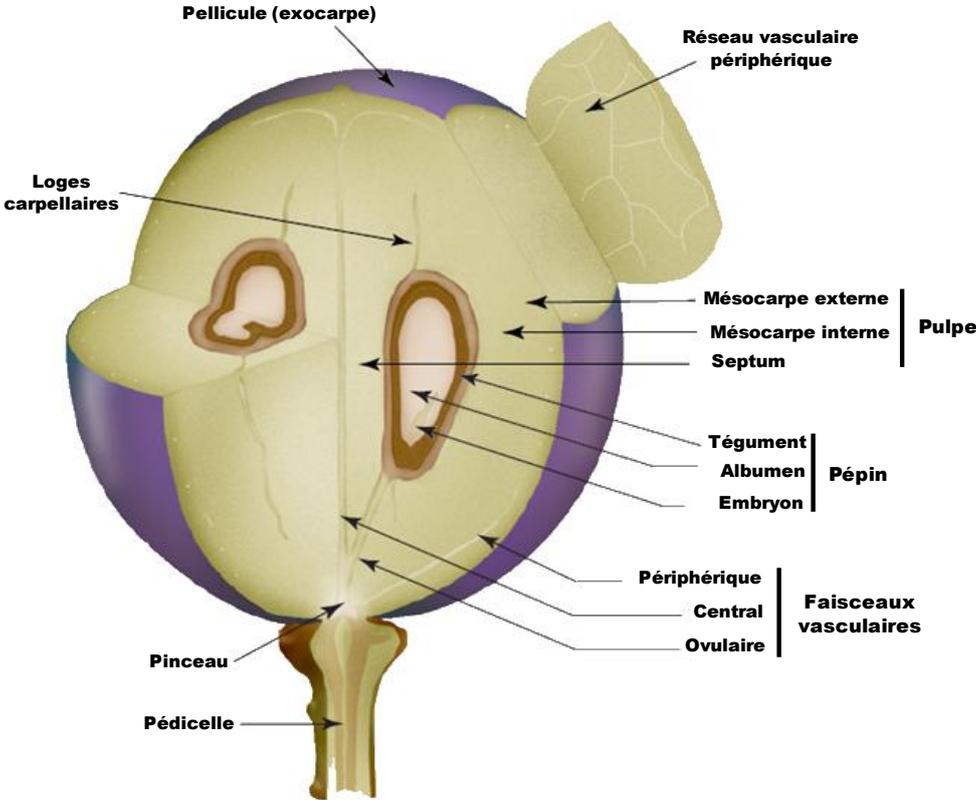


Figure 1. Structure détaillée d'une baie de raisin mature (d'après Kennedy *et al*, 2002)

vasculaires, reliés à la rafle par le pédoncule, et dont l'axe central, qui alimente les pépins, s'appelle le pinceau (Reynier, 2007).

- **L'endocarpe**

L'endocarpe est constitué de quelques assises cellulaires délimitant et entourant les loges carpellaires (Carmona *et al.*, 2008). Il est constitué d'un hypoderme directement en contact avec le mésocarpe et d'un épiderme entourant les loges carpellaires (Hardie *et al.*, 1996). Ces loges carpellaires entourent les pépins qui sont constitués d'un tégument, d'un albumen et d'un embryon. Ils sont riches en lipides et en composés phénoliques (Winkler, 1974). Le nombre de pépins dans une baie peut varier de 1 à 4, ce qui entraîne une variation dans la taille et le poids de la baie (Huglin and Schneider, 1998).

1.2. Développement

L'évolution du poids et du volume de la baie suit une courbe en deux étapes de croissance de type sigmoïde (Coombe, 1976) (Figure 2). Les deux phases principales de croissance sont appelées croissance herbacée et maturation du raisin. Elles sont séparées par une étape d'arrêt ou de ralentissement de la croissance.

D'une durée de 5 à 7 semaines, la phase herbacée (ou «verte», phase I) est définie comme la phase de formation de la baie. Elle est caractérisée par d'intenses divisions et par un grandissement cellulaire, associé à la différenciation des cellules, aussi bien dans la pellicule et la pulpe que dans les pépins. Ce grandissement cellulaire est principalement dû à une accumulation d'eau et d'acides organiques dans les vacuoles. Cette accumulation se déroule à un pH vacuolaire constant et extrêmement acide de l'ordre de 2,5 (Hrazdina *et al.*, 1984). A la fin de la période herbacée, les baies de raisin sont vertes, dures et acides, et les pépins ont atteint leur taille finale. A la phase herbacée succède une courte phase de ralentissement de la croissance de 8 à 12 j environ, pendant laquelle les pépins commencent à changer de couleur (brunissement), et qui s'achève par la véraison (Ristic and Iland, 2005). Cette phase de transition marque le début de l'accumulation des sucres, juste avant la véraison (Deluc *et al.*, 2007).

La véraison correspond au démarrage de la maturation du fruit. La véraison a lieu environ 60 j après la floraison (Huglin and Schneider, 1998; Coombe and McCarty, 2000). C'est une étape clé, visible chez les cépages colorés par la pigmentation progressive des baies de raisin, et la translucidité de la pellicule chez les cépages blancs (Huglin and Schneider, 1998;

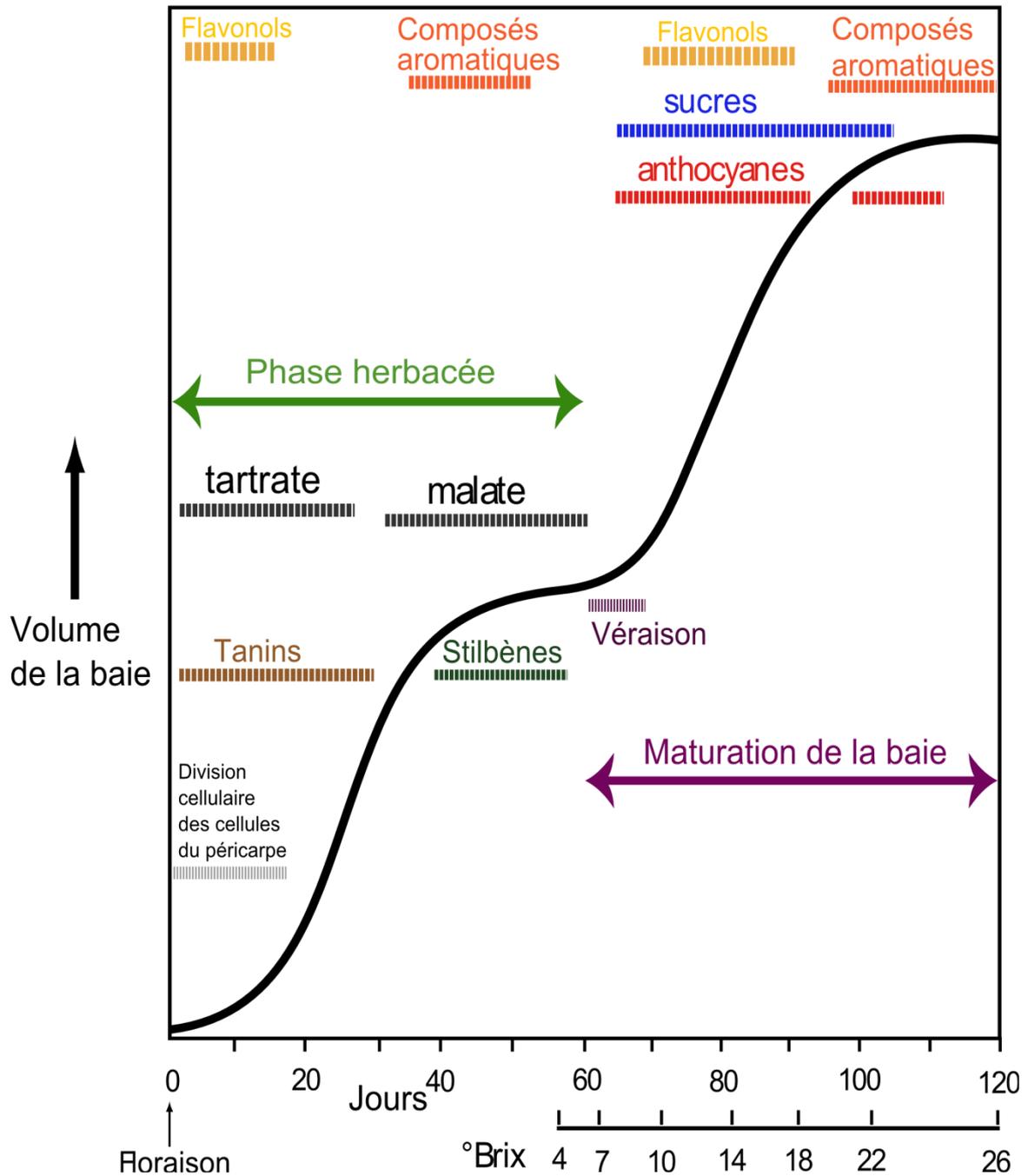


Figure 2. Le développement de la baie de *Vitis vinifera* cv Muscat. Le degré brix est la mesure du pourcentage de sucres solubles dans les baies de raisin (modifié d'après Coombe et McCarthy, 2000).

Carmona *et al.*, 2008). Elle se caractérise par un brusque ramollissement de la baie en environ 24 h ; les parois cellulaires sont fines et subissent des changements structuraux expliquant ce ramollissement (Barnavon *et al.*, 2000). Ce changement s'accompagne d'une entrée massive de sucres (Saito and Kasai, 1978) et d'une chute d'acidité due principalement à une diminution de la concentration en acide malique dans les baies. Dans le cas des cépages rouges, cette phase correspond au début de coloration de la pellicule des baies. La véraison est un phénomène propre à chaque baie, non synchronisé à l'échelle d'une grappe.

La véraison indique donc le début de la phase de maturation (phase II), caractérisée par la diminution de l'acidité des baies et l'accumulation des sucres, ainsi qu'un ramollissement des baies. Les pépins peuvent perdre un peu de poids au cours de cette phase, suite à la dessiccation des téguments externes, qui confère une couleur brune aux pépins (Ristic and Iland, 2005). Durant cette phase, la baie double de volume. L'importante distension ou expansion des cellules du mésocarpe résulte essentiellement de l'accumulation d'eau et de sucres dans les baies (Huglin and Schneider, 1998). Cette expansion cellulaire durant la phase II est due à l'activité de plusieurs enzymes de modification des parois cellulaires, telles que les expansines ou les pectine méthylestérases (Schlosser *et al.*, 2008). La remontée du pH vacuolaire se poursuit du fait de la baisse de la concentration en malate jusqu'à atteindre environ 3,5 à la maturité. De nombreux métabolites secondaires sont accumulés notamment les précurseurs d'arômes et les pigments phénoliques (anthocyanes et flavonols). Le développement de ces caractéristiques est essentiel dans la qualité du produit final. La maturation du fruit se termine environ 120 j après la floraison (Carbonneau, 2007).

2. Le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire chez la Vigne

2.1. Le métabolisme primaire

2.1.1. Les sucres

Produit de la photosynthèse, le saccharose est transporté depuis les feuilles (organe source) vers les baies (organe puits) par le phloème. Pendant la croissance herbacée, la majorité du saccharose importé dans la baie est métabolisé, et de fait, la concentration en sucres est relativement faible (pas plus de 150 mM d'hexoses). De plus, durant cette phase, les baies vertes se comportent comme des organes chlorophylliens en croissance, présentant une photosynthèse active. La production de sucres résultant de cette activité durant la phase

herbacée s'ajoute au saccharose importé par les jeunes baies et couvre leurs besoins métaboliques (Reynier, 2007). A partir de la véraison, les sucres importés dans la baie de raisin proviennent surtout de la photosynthèse foliaire. Dans la baie, les sucres sont déchargés par la voie symplastique (*via* les plasmodesmes) avant la véraison, puis par la voie apoplastique après la véraison (Zhang, Wang, Wang, *et al.*, 2006). La voie apoplastique requiert l'intervention de transporteurs membranaires permettant la sortie du saccharose à partir des cellules conductrices, l'absorption du saccharose et/ou des hexoses à travers la membrane plasmique puis à travers la membrane vacuolaire des cellules accumulatrices. Au cours de la maturation, les baies accumulent en effet des hexoses dans les cellules du mésocarpe, notamment le fructose et le glucose, qui résultent du clivage du saccharose importé par des invertases (pariétales, cytoplasmiques ou vacuolaires). Environ 20 jours après la véraison, la concentration en hexoses vacuolaires des cellules du mésocarpe est de 1 M, avec un rapport glucose sur fructose proche de 1 (Conde *et al.*, 2007). Pour une moindre part, du saccharose peut provenir des réserves amylacées du bois et du système racinaire (Reynier, 2007).

2.1.2. Les acides organiques

Les acides organiques jouent un rôle important dans la qualité de la baie de raisin, et donc du vin. On en détecte plus d'une vingtaine dans la baie (Kliewer, 1966). Durant la phase herbacée, deux acides sont fortement accumulés dans les cellules du mésocarpe, l'acide tartrique et l'acide malique. Ces acides peuvent représenter jusqu'à 92% des acides organiques totaux dans les baies au cours des différents stades de développement, ainsi que dans les feuilles (Kliewer, 1966; Conde *et al.*, 2007). L'acide tartrique s'accumule essentiellement au début de la phase I, tandis que l'acide malique s'accumule vers la fin de la phase I, et sa vitesse de synthèse est maximale juste avant la véraison. La quantité d'acides organiques, le rapport acide tartrique/acide malique, et la quantité d'ions potassium dans la baie déterminent le pH et la qualité du vin. En effet, la fermentation alcoolique ne se déroule correctement qu'à un pH compris entre 4 et 6. L'acide tartrique est l'acide organique majeur pour la qualité organoleptique du vin, et il contribue également à la stabilité et à la longévité du vin lors de son vieillissement. Durant la fermentation, l'acide tartrique précipite, notamment avec le potassium et le calcium, tandis que l'acide malique est consommé par les bactéries malolactique lors de la fermentation lactique (Conde *et al.*, 2007). Enfin, parmi les acides organiques présents en quantités infimes dans la baie de raisin, on note par exemple

l'acide citrique ou encore l'acide succinique. Ces acides sont aussi impliqués dans la qualité organoleptique des vins (Conde *et al.*, 2007).

2.1.3. Les hormones

Les fruits climactériques tels que la banane ou la tomate se caractérisent par un pic de production d'éthylène et un pic d'activité respiratoire au cours de la phase de maturation. Le raisin ne présentant pas ces phénomènes, la Vigne est classée dans les espèces dites non climactériques (Chervin *et al.*, 2004). Après la véraison, l'acide abscissique (ABA) est accumulé dans la baie de raisin. On lui attribue un rôle déterminant dans la maturation du raisin, particulièrement dans l'accumulation des sucres (Coombe and Hale, 1973; Conde *et al.*, 2007). D'autre part, l'ABA intervient aussi dans la maturation des semences et la régulation de la dormance, ainsi que dans la résistance au stress hydrique lors de la phase de maturation (Conde *et al.*, 2007). Comme l'ABA, les brassinostéroïdes sont surtout impliqués dans la maturation des fruits non climactériques, comme les agrumes et les baies de raisin. En effet, au cours de la phase de maturation une importante accumulation de castastérone, une forme active de brassinostéroïdes chez la Vigne est observée (Symons *et al.*, 2006). Enfin, il faut noter que la concentration de l'éthylène dans la baie de raisin est relativement constante et faible : seul un pic de synthèse pré-véraison est plus ou moins visible (Coombe and Hale, 1973; El-Kereamy *et al.*, 2003; Chervin *et al.*, 2004). Les fonctions de l'éthylène au cours du développement de la baie de raisin sont discutées. Cependant, l'éthylène jouerait un rôle dans l'augmentation de la taille des baies, la diminution de leur acidité, et l'accumulation des anthocyanes (Chervin *et al.*, 2004). En effet, le traitement lors de la véraison des baies par de l'acide 2-chloroéthylphosphonique, qui permet la libération de l'éthylène, stimule l'accumulation d'anthocyanes (El-Kereamy *et al.*, 2003; Chervin *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'effet de l'éthylène sur la maturation de la baie est associé à une baisse de la concentration interne en auxine, ce qui rendrait le fruit plus sensible à l'éthylène (Coombe and Hale, 1973).

2.2. Le métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires sont, par définition, des composés organiques non indispensables à la croissance, au développement et à la reproduction d'un organisme. Ils dérivent néanmoins de voies de biosynthèse provenant du métabolisme primaire et sont constitués principalement de trois grands groupes de composés : les alcaloïdes, les terpènes et les composés phénoliques (Figure 3).

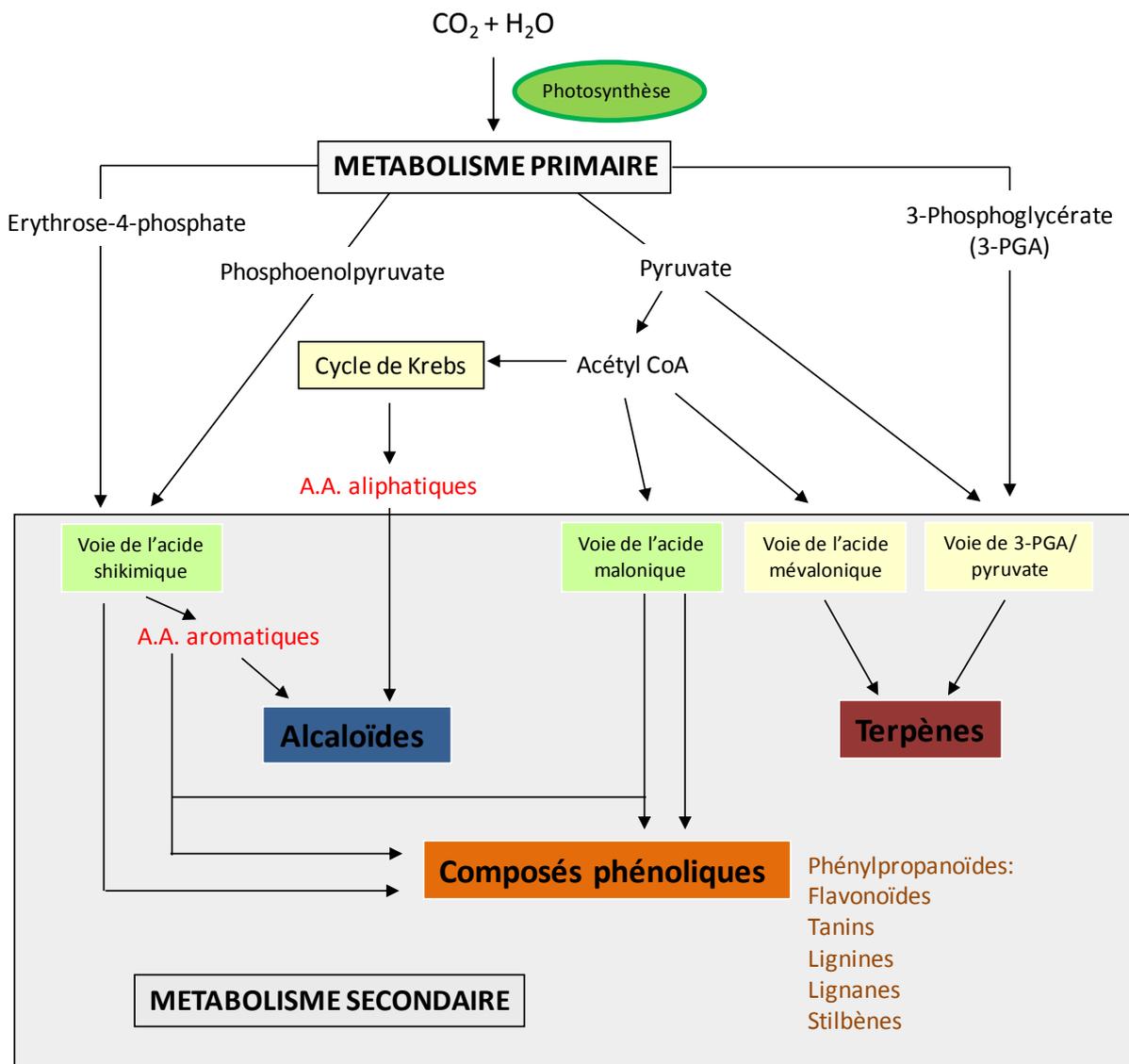


Figure 3. Schéma simplifié des voies principales conduisant à la synthèse des métabolites secondaires et leur interaction avec le métabolisme primaire.

2.2.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes constituent un des trois grands groupes de métabolites secondaires. Il en existe environ 12000 répertoriés à ce jour, toutes espèces confondues (Croteau *et al.*, 2000). Ce sont des produits d'origine végétale souvent basiques (goût amer) et plutôt hydrophiles. Les alcaloïdes sont des hétérocycles possédant au moins un atome d'azote. Les alcaloïdes sont généralement classifiés selon la voie de biosynthèse dont ils sont issus. Selon cette nomenclature, il existe trois principaux types d'alcaloïdes : les « vrais » alcaloïdes, les protoalcaloïdes et les pseudoalcaloïdes. Les vrais alcaloïdes dérivent des acides aminés et partagent un hétérocyclique contenant un atome d'azote. Les précurseurs de cette famille sont principalement l'ornithine, la lysine, la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane et l'histidine. Les protoalcaloïdes sont des composés dont l'atome d'azote provenant des acides aminés n'est pas intégré dans l'hétérocycle. Ils dérivent principalement du tryptophane et de la tyrosine. Les pseudoalcaloïdes sont quant à eux des molécules dont le squelette carboné ne dérive pas d'acides aminés mais de précurseurs ou de dérivés d'acides aminés. Ils peuvent également dériver de précurseurs non reliés aux acides aminés (Aniszewski, 2007). Le rôle des alcaloïdes reste obscur. Néanmoins, ils sont habituellement catalogués comme faisant partie des défenses chimiques constitutives de la plante, bien que plusieurs études aient indiqué que certains alcaloïdes pourraient aussi être impliqués dans des réponses de défense induites (Croteau *et al.*, 2000).

2.2.2. Les terpènes

Les terpènes sont une famille de composés chimiques responsables en partie du caractère fruité des baies et représentant la plus large classe de métabolites secondaires chez les plantes (Dudareva *et al.*, 2006). Ce sont tous des dérivés de l'isopentényl pyrophosphate (IPP) ou de son isomère le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). Leur classification s'effectue par rapport au nombre de carbones qui les composent. Cinq classes sont présentes chez les plantes : les hemiterpènes volatils (C5), les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les homoterpènes (C11 et C16) et les diterpènes (C20) (Dudareva *et al.*, 2006). Au niveau de la composition aromatique du fruit, les monoterpènes et les sesquiterpènes apparaissent comme les plus importants de cette famille avec approximativement 1000 monoterpènes et plus de 7000 sesquiterpènes possibles (Bohlmann *et al.*, 1998). Chez la Vigne, environ 70 monoterpènes ont été identifiés. Parmi les monoterpènes dits libres, les composés les plus fréquemment retrouvés sont le citronellol, le 3,6-diméthyl-1,5-octadien-1,7-diol, le linalool, le géraniol, le nérol et l' α -terpineol (Rapp, 1998; Mateo and Jiménez, 2000). Mais d'autres

monoterpènes importants sont présents chez la Vigne avec notamment les formes éthers (oxyde de rose ou de nérol) et les formes polyhydroxylées, qui sont des produits de l'oxygénation des monoterpènes libres (Williams *et al.*, 1980; Luan *et al.*, 2004). En plus des formes libres de monoterpènes, il existe par ailleurs dans la baie de raisin des formes glycosylées présentes en plus grande quantité que les formes libres (Williams *et al.*, 1982; Voirin *et al.*, 1990; Dimitriadis and Williams, 1987; Gunata *et al.*, 1985) et qui constituent des précurseurs d'arômes, libérés lors de la vinification.

Les sesquiterpènes ont été moins étudiés que les monoterpènes chez la Vigne. Toutefois, plusieurs d'entre eux ont pu être détectés dans des baies de cultivars différents (Coelho *et al.*, 2006; Parker *et al.*, 2007). Le premier sesquiterpène qui a été impliqué dans l'arôme du vin a été le rotundone, responsable du caractère poivré des vins provenant du cultivar Shiraz (Wood *et al.*, 2008). L'ABA, qui intervient dans de nombreux processus décrits précédemment, est aussi un sesquiterpène (chapitre 2.1.3). A ce jour, aucune forme glycosylée de sesquiterpènes n'a été identifiée, contrairement aux monoterpènes.

Le caractère aromatique de certains cépages (Gewurztraminer, Muscats) est principalement dû au mélange terpénique les composant (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Par leur implication dans l'arôme des fruits, les terpènes interviennent dans les processus d'attraction d'insectes pollinisateurs, mais leur rôle ne semble pas se cantonner à ce processus. En effet, ces molécules jouent aussi un rôle dans la défense de la plante et principalement en réponse à des stress biotiques (ex : défense contre les herbivores) (Arimura *et al.*, 2004). De manière intéressante, il semblerait que les baies ayant été moins exposées au soleil posséderaient une teneur en monoterpènes plus faibles, altérant ainsi leur arôme (Reynolds and Wardle, 1997).

2.2.3. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent la troisième grande famille de métabolites secondaires, caractérisés par la présence d'un groupement phénol, composé chimique constitué d'un cycle aromatique benzénique et d'une fonction hydroxyle. Les composés phénoliques, présents dans le règne végétal dès les Ptéridophytes (premières plantes vasculaires), jouent des rôles essentiels pour la survie des végétaux en milieu terrestre en intervenant notamment dans leur défense contre des stress biotiques et abiotiques et dans leur reproduction. La distinction des différents groupes de composés phénoliques est fondée sur leur structure, chaque groupe pouvant contenir de quelques dizaines à plusieurs milliers de molécules différentes. Les composés phénoliques comprennent notamment les acides phénoliques, les coumarines, les

lignines, les lignanes, les stilbènes et les flavonoïdes (Figure 4). Ces derniers ont une importance majeure chez la Vigne, car ils contribuent à la qualité organoleptique de la baie de raisin et des produits dérivés, vins et jus de raisin. Ainsi, alors que les acides phénoliques, les coumarines et les lignines ne seront que rapidement abordés, cette introduction détaillera les composés phénoliques majoritairement accumulés dans la baie de raisin au cours de son développement, les flavonoïdes.

2.2.3.1. Les acides phénoliques et les coumarines

- **Les acides hydroxybenzoïques**

Les acides hydroxybenzoïques (gallique, salicylique...) dérivent de l'acide benzoïque et possèdent une formule de base de type C6-C1 (Figure 4). Ces acides sont parmi les formes phénoliques les plus simples, répandus aussi bien chez les Gymnospermes que chez les Angiospermes. Chez la Vigne, ils sont généralement présents sous leur forme glycosylée (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

- **Les acides hydroxycinnamiques**

Les acides hydroxycinnamiques, tels que l'acide caféique ou l'acide *p*-coumarique, dérivent de l'acide cinnamique, et présentent un squelette carboné de type C6-C3. Les acides hydroxycinnamiques existent généralement sous forme de glycosides de glucose, ou sous forme d'esters, particulièrement avec l'acide tartrique (Macheix *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). L'ester de Co-enzyme A de l'acide *p*-coumarique est le précurseur commun des composés phénoliques de type stilbènes, flavonoïdes et lignines. Les fonctions assurées par les acides phénoliques chez les plantes sont encore peu connues. On leur attribue cependant une fonction antioxydante permettant de réguler la sénescence cellulaire, ainsi qu'une fonction de « ciment » intercellulaire, qui permet de lier notamment les lignines aux polysaccharides, ou encore les pectines entre elles ou à d'autres polysaccharides. Les acides phénoliques pourraient également agir comme des facteurs de croissance régulant les divisions et l'expansion cellulaires. Des feuilles de Tabac (*Nicotiana tabacum*) ne produisant pas d'acides hydroxycinnamiques et de monolignols présentent une couleur pâle, un développement anormal des cellules du mésophylle, ainsi qu'une mort cellulaire prématurée (Tamagnone *et al.*, 1998). Parmi les acides phénoliques il faut aussi mentionner l'acide salicylique, qui est une molécule « signal » indispensable à la mise en place de la résistance systémique acquise chez le Tabac et le Concombre (*Cucumis sativus*) par exemple, en réponse à de nombreux pathogènes (Yalpani *et al.*, 1993; Lee, Jin, *et al.*, 1995).

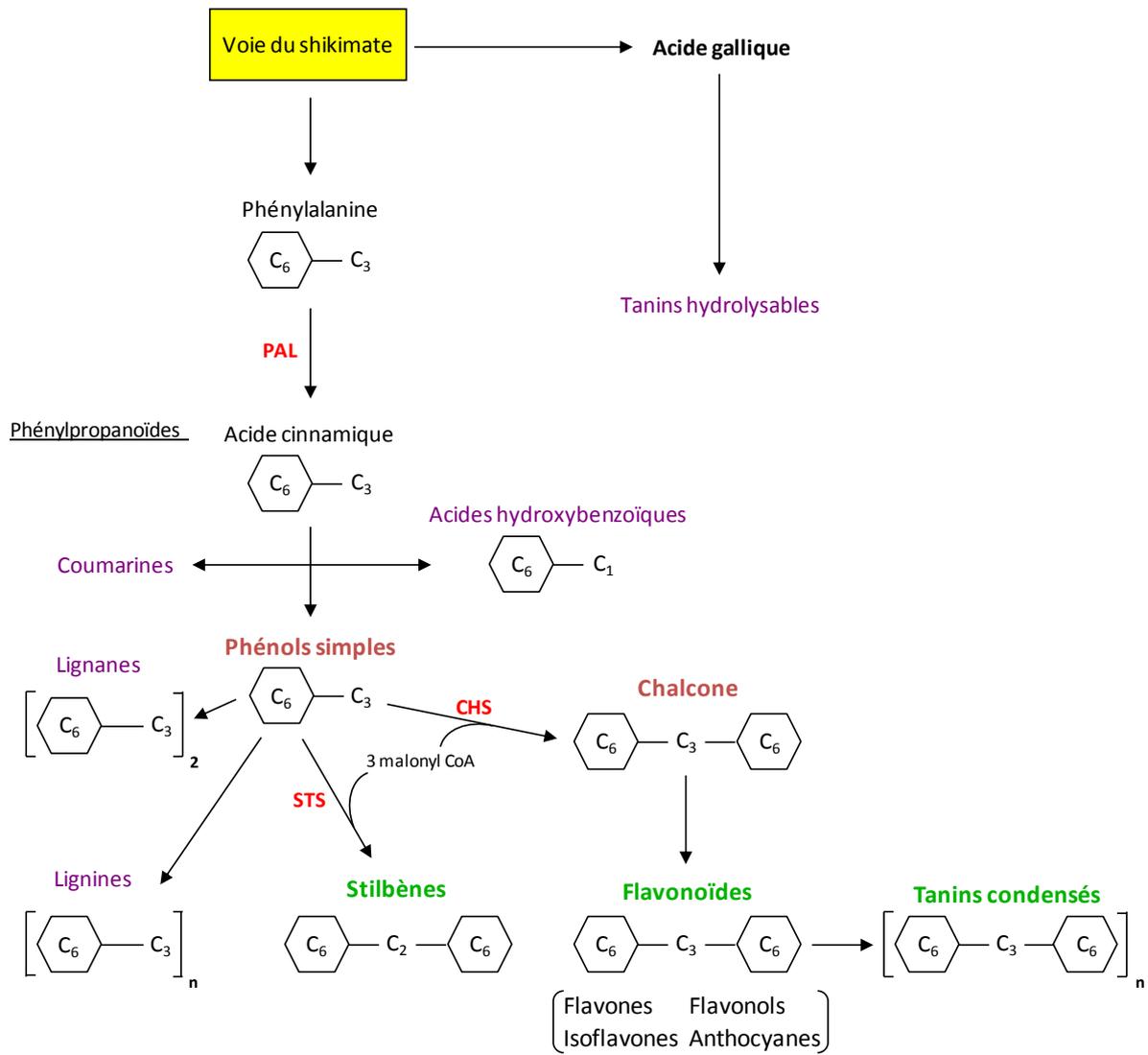


Figure 4. Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes

- **Les coumarines**

La biosynthèse des coumarines provient de l'hydroxylation, de la glycosylation ou de la cyclisation de l'acide cinnamique (Figure 4). Les coumarines sont notamment présentes chez *Quercus robur*, sous forme glycosylée (esculine et scopoline) dans le bois encore vert, ou aglycone (esculétine et scopolétine) dans le bois plus âgé (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

2.2.3.2. Les lignines

Les lignines sont synthétisées à partir des monolignols (alcool *p*-coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique). La polymérisation tridimensionnelle de ces trois précurseurs par l'intermédiaire d'oxydases (peroxydases et laccases) permet la formation des unités de base des lignines, les unités H (*p*-hydroxyphényl), S (syringyl) et G (guaiacyl). Les polymères de lignines sont cependant beaucoup plus complexes car en plus d'une composition variable en unités H, S, et G dépendant des plantes, de leur âge, de l'organe, du tissu, etc..., ils contiennent des acides hydroxycinnamiques, tels que l'acide *p*-coumarique ou l'acide férulique (Campbell and Sederoff, 1996). Après la cellulose, les lignines constituent les polymères les plus abondants chez les plantes (Ferrer *et al.*, 2008). Elles assurent la rigidité des plantes, rendent les parois cellulaires hydrophobes et imperméables, et peuvent constituer jusqu'à 36% de la matière sèche du bois. Les lignines peuvent également être synthétisées en réponse à des attaques pathogènes, et lors de blessures mécaniques (Whetten and Sederoff, 1995).

2.2.3.3. Les stilbènes

Les stilbènes sont des molécules de type C6-C2-C6, dont la synthèse est initiée à partir de coumaroyl-CoA et de malonyl-CoA (Figure 4). Ils sont présents chez quelques familles de plantes telles que les Pinacées, les Fagacées, les Liliacées et les Vitacées (Bavaresco and Fregoni, 2001). Les stilbènes existent sous leur forme aglycone comme le resvératrol (isomère *trans*), qui est le principal stilbène chez la Vigne, ou encore sous leur forme glycosylée (picéides), ou méthylée (ptérostilbènes). Le resvératrol peut également former des oligomères, tels que les viniférines (Jeandet *et al.*, 2002; Waterhouse, 2002). Dans la baie, les stilbènes sont essentiellement synthétisés dans la pellicule, et beaucoup plus faiblement dans la pulpe, avant la véraison (Bavaresco and Fregoni, 2001). Principalement synthétisés en réponse à des attaques fongiques, notamment dues à *Botrytis cinerea* (responsable de la pourriture grise),

Plasmopara viticola (responsable du mildiou), ou encore *Erysiphe necator* (responsable de l'oïdium) les stilbènes sont aussi présents, en concentration infime, dans les baies saines (Bavaresco and Fregoni, 2001). Les stilbènes possèdent une activité antifongique *in vitro* (Celimene *et al.*, 2001) et *in planta* (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001). Leur disparition progressive durant le développement des baies expliquerait pourquoi celles-ci sont plus sensibles à certains pathogènes à l'approche de la maturité (Bais *et al.*, 2000). Les stilbènes sont aussi synthétisés en réponse à des stress abiotiques tels que le rayonnement UV, avec une réponse rapide dans les baies avant véraison (Bais *et al.*, 2000; Versari *et al.*, 2001; Schmidlin *et al.*, 2008). Enfin, les stilbènes sont également synthétisés dans les feuilles de Vigne après élévation par divers pathogènes, blessure ou traitement aux UV, ainsi que dans les organes lignifiés (tige, pépins, racines,...) de façon constitutive (Bavaresco and Fregoni, 2001; Jeandet *et al.*, 2002). Le déclin de la biosynthèse des stilbènes après la véraison a souvent été attribué au début de la synthèse des anthocyanes, tous deux ayant pour précurseur le *pcoumaroyl* CoA. Or on observe que ce déclin post-véraison a également lieu dans les cépages blancs, affaiblissant par conséquent l'hypothèse de la compétition entre les enzymes des deux voies (Bais *et al.*, 2000).

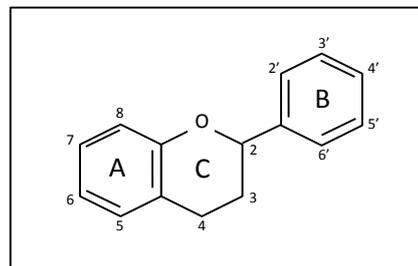


Figure 5. Structure chimique de base des flavonoïdes. Les deux cycles benzéniques (A et B) sont reliés par un hétérocycle oxygéné (C). A, B et C forment l'unité flavane.

2.2.3.4. Les flavonoïdes

Présents chez toutes les plantes vasculaires, les flavonoïdes comprennent au moins 6000 molécules, réparties en isoflavonoïdes, phlobaphènes, aurones, flavones, flavonols et anthocyanes. Ils présentent une structure générale de type C6-C3-C6, sauf pour les aurones, ayant une structure de type C6-C2-C6 (Figure 5). La classification des flavonoïdes est fondée sur l'oxydation de l'hétérocycle central, mais aussi sur les substitutions hydroxyles et méthyles des cycles B et C, et sur la glycosylation (par le glucose, le galactose, l'arabinose ou le rhamnose voir plus rarement par des disaccharides) et la polymérisation des flavonoïdes (Waterhouse, 2002; Ferrer *et al.*, 2008). Les flavonoïdes sont presque tous liés à des sucres de

différentes natures. La glycosylation, et par la suite l'acylation des sucres (liaison d'un ou plusieurs acides, notamment l'acide *p*-coumarique et l'acide caféique), ainsi que la méthylation, modifient les propriétés biologiques et physico-chimiques des flavonoïdes. Ces modifications affectent par exemple la couleur des anthocyanes donc leur spectre d'absorption, et augmentent leur stabilité et leur solubilité, ce qui permet une accumulation vacuolaire plus importante (Kong, 2003; Macheix *et al.*, 2005; Aron and Kennedy, 2008). Chez la Vigne, les principales classes de flavonoïdes synthétisées sont les flavanols (à l'origine des tanins condensés), les flavonols et les anthocyanes.

- **Les flavanols**

Les flavan-3-ols sont présents dans le raisin sous forme de monomères et de structures polymérisées, appelées proanthocyanidines (PAs) ou tanins condensés. Les structures de base des proanthocyanidines sont les flavan-3-ols monomères stéréo-isomères, (+)-catéchine et (-)-épicatéchine (Dixon *et al.*, 2005). Ces monomères peuvent être estérifiés en position 3 par l'acide gallique. Au niveau du raisin, les proanthocyanidines se différencient entre les différents tissus par leur degré de polymérisation et par la proportion des différentes sous-unités.

Au sein des pépins, les sous-unités des proanthocyanidines sont la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine avec des degrés de polymérisation inférieurs à 10 et des taux de galloylation de 10 à 20% (Prieur *et al.*, 1994) (Figure 6). Les monomères flavan-3-ols sont essentiellement synthétisés dès la formation des pépins, et atteignent un premier pic d'accumulation 3 à 5 semaines avant la véraison. S'en suit alors une deuxième phase de synthèse, pour atteindre un maximum environ 2 semaines après la véraison, avant de diminuer au cours de la maturation. Après la véraison, lorsque les pépins brunissent et que leur teneur en eau diminue, la quantité de PAs extractibles diminue également, ce qui est probablement dû à la complexation des PAs avec d'autres composés. Par ailleurs, au cours de la maturation, les PAs subissent également des réactions d'oxydation (Kennedy *et al.*, 2000; Downey, Harvey, and Robinson, 2003a; Bogs *et al.*, 2005). Cependant, 75% des PAs extractibles à la récolte des baies sont issus des pépins (Downey, Harvey, and Robinson, 2003a).

Au sein de la pellicule, les proanthocyanidines sont composées principalement d'unités de (+)-catéchine, de (-)-épicatéchine et de (-)-épigallocatechine avec des degrés de polymérisation aux alentours de 30 et des taux de galloylation inférieurs à 5% (Souquet *et al.*, 1996). La synthèse des tanins condensés dans la pellicule a uniquement lieu avant la véraison.

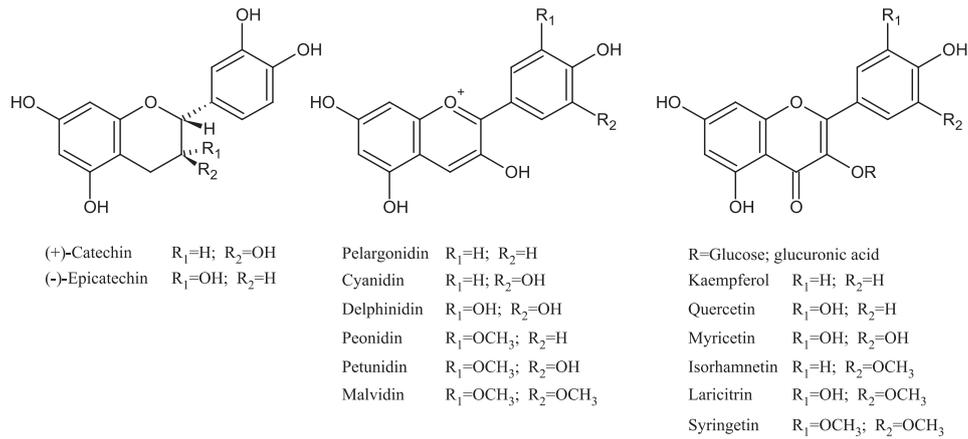


Figure 6. Structure chimique des principaux flavanols, flavonols et anthocyanes chez la Vigne. Le résidu glucose des anthocyanidines peut être lié à un groupement acyl, caffeoyl ou p-coumaroyl (d'après Flamini et Traldi, 2010).

Au cours de la maturation, les tanins condensés vacuolaires (qui constituent 80% de la quantité totale) s'associent pour former des amas condensés au niveau des membranes vacuolaires, tandis que les tanins condensés localisés dans la paroi cellulaire s'associent avec des polysaccharides pariétaux ou des molécules de lignine (Downey, Harvey, and Robinson, 2003a; Gagné *et al.*, 2006). Chez le cultivar Cabernet-Sauvignon, la composition en flavan-3-ols est identique, dans la pellicule et les pépins (Gagné *et al.*, 2006).

• Les flavonols

Les flavonols sont des pigments jaunes qui s'accumulent dans les baies à maturité, notamment en réponse à l'exposition au rayonnement UV et au rayonnement visible. Dans les cépages rouges, on détecte majoritairement la quercétine (44%), la myricétine (37%) et en plus faible quantité le kaempférol, la laricitine, l'isorhamnétine et la syringétine (Mattivi *et al.*, 2006) (Figure 6). Dans les cépages blancs, la quercétine (81%) et le kaempférol (17%) et en plus faible quantité l'isorhamnétine sont les plus fréquents (Mattivi *et al.*, 2006). Dans le raisin, les flavonols présentent globalement des quantités inférieures à celles des proanthocyanidines et des anthocyanes (Downey, Harvey, and Robinson, 2003b). Ils s'accumulent uniquement sous forme glycosylée, majoritairement quercétine 3-O-glucoside et quercétine 3-O-glucuronide (Downey, Harvey, and Robinson, 2003b; Cheynier and Rigaud, 1986; Price *et al.*, 1995). Au cours du développement de la baie, la synthèse des flavonols s'effectue à deux périodes. Une phase de synthèse précoce a lieu dans les inflorescences, où les flavonols contribueraient à la fertilité du pollen. La deuxième phase de synthèse a lieu dans la baie après véraison, avec une nette accumulation des flavonols totaux (mg/baie) 3 à 4 semaines après véraison, alors que la

synthèse des anthocyanes a déjà débuté (Downey, Harvey, and Robinson, 2003b). On retrouve également les flavonols dans les organes végétatifs tels que les feuilles, les vrilles, la tige ou encore les bourgeons (Downey, Harvey, and Robinson, 2003b).

- **Les anthocyanes**

Les anthocyanes ont une structure de base commune, le cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrilium. Le terme « anthocyane » désigne en réalité la forme glycosylée des anthocyanidines. Harborne et Williams (2001) ont rapporté 18 structures d'anthocyanidines, cependant on en retrouve principalement six, pélargonidine, delphinidine, cyanidine, péonidine, pétunidine et malvidine (Figure 6). Leurs structures se différencient par le nombre et la position de groupes hydroxyls et méthyls sur le noyau B. Les anthocyanidines sont le plus souvent glycosylées en position 3 et 5 avec le plus fréquemment des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose) et des di- et tri-saccharides formés par la combinaison des monosaccharides précédents (Brouillard and Dangles, 1993). Cette glycosylation augmente leur solubilité et leur stabilité. Les sucres peuvent aussi être acylés par l'acide cinnamique, *p*-coumarique, acétique, caféique, ferulique, sinapique et malonique, augmentant ainsi la diversité de ces molécules (Brouillard and Dangles, 1993). La principale caractéristique des anthocyanes est leur diversité de couleur allant du bleu, au rouge, mauve, rose et orange (Tanaka *et al.*, 2008). En milieu aqueux acide, la couleur de l'anthocyanidine est déterminée par le degré d'hydroxylation du noyau B, produisant un effet bathochrome. Au contraire, les réactions de méthylation et de glycosylation produisent un effet hypsochrome (Brouillard and Dubois, 1977).

Dans le raisin de *Vitis vinifera*, seulement cinq anthocyanidines (delphinidine, cyanidine, péonidine, pétunidine et malvidine) sont présentes. Ces molécules instables sont ensuite glycosylées en position 3 pour former des anthocyanes. Ces anthocyanes peuvent être ultérieurement substituées par des acides aromatiques (acide *p*-coumarique ou caféique) ou aliphatiques (acide acétique). La proportion des différentes formes d'anthocyanes est une caractéristique variétale et peut être utilisée comme critère taxonomique (Roggero *et al.*, 1988). Ainsi, les raisins des cépages Pinots ne contiennent pas d'anthocyanes acylées (Fong *et al.*, 1971), ceux de Gamays possèdent très peu d'acétylées, mais renferment des coumaroylées, les baies de Syrah sont riches dans tous les types d'anthocyanes et celles de cépages Muscats contiennent moins de dérivés malvidine que les autres cépages (Cravero *et al.*, 1994). Néanmoins, la malvidine 3-O-glucoside reste l'anthocyane majoritaire dans le raisin.

Dans la baie de raisin, les anthocyanes ne sont détectées que dans la pellicule des cépages colorés (sauf pour les cépages teinturiers comme déjà mentionné), et constituent 20 à 40 % de la fraction totale des polyphénols (Boss *et al.*, 1996; Gagné *et al.*, 2006). Leur accumulation débute après la véraison, puis se stabilise ou diminue légèrement à la maturité (Boss *et al.*, 1996). Chez *V. vinifera*, les anthocyanes les plus abondantes sont les dérivés 3-monoglucoside, 3-acétylglucoside et 3-*p*-coumarylglucoside de la malvidine, la péonidine, la pétunidine, la cyanidine et la delphinine (Boss *et al.*, 1996; Conde *et al.*, 2007). La couleur des baies de raisin et du vin résultent de la composition et de la teneur en anthocyanes, mais également de leur interaction avec d'autres flavonoïdes, notamment les flavonols, des ions métalliques tels que les ions Fe^{2+} et Mg^{2+} , des caroténoïdes ou encore d'autres composés phénoliques. Ce phénomène est appelé la co-pigmentation (Harborne and Williams, 2000; Grotewold, 2006).

2.2.4. La voie de biosynthèse des flavonoïdes

2.2.4.1. Les différentes enzymes de la voie

- **Dans le règne végétal**

Durant les trois dernières décennies, la voie de biosynthèse des flavonoïdes a fait l'objet de nombreuses études (Winkel-Shirley, 2001; Vom Endt *et al.*, 2002; Marles *et al.*, 2003; Springob *et al.*, 2003; Schijlen *et al.*, 2004; Dixon *et al.*, 2005; Lepiniec *et al.*, 2006) et peut se décomposer en différentes étapes résumées dans la figure 7. Partant de la phénylalanine comme substrat, la synthèse de flavonoïdes commence par 3 réactions catalysées successivement par la phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (Koukol and Conn, 1961), la cinnamate 4- hydroxylase (C4H) (Russel and Conn, 1967) et la 4-coumaroyl CoA ligase (4CL) (Heller and Forkmann, 1988) pour aboutir au 4-coumaroyl CoA. La structure en C6-C3-C6 caractéristique des flavonoïdes est obtenue par l'action d'une chalcone synthase (CHS) sur le 4-coumaroyl CoA, générant une chalcone. Le gène codant pour cette enzyme est le premier gène identifié et décrit dans cette voie métabolique (Reimold *et al.*, 1983). Cette chalcone est ensuite transformée en naringénine sous l'action d'une chalcone isomérase (CHI) (Moustafa and Wong, 1967). Le noyau C de cette molécule est ensuite hydroxylé en position 3 par une flavanone 3-b hydroxylase (F3H) (Forkmann *et al.*, 1980) pour donner le dihydrokampférol. Cette molécule peut ensuite être hydroxylée sur le noyau B soit en position 3' soit en 3'et 5' par une flavonoïde 3' ou 3'-5' hydroxylase (F 3'H ou F 3'5'H) (Froemel *et al.*, 1985; Menting *et al.*, 1994) ce qui génère respectivement soit la dihydroquercétine soit la

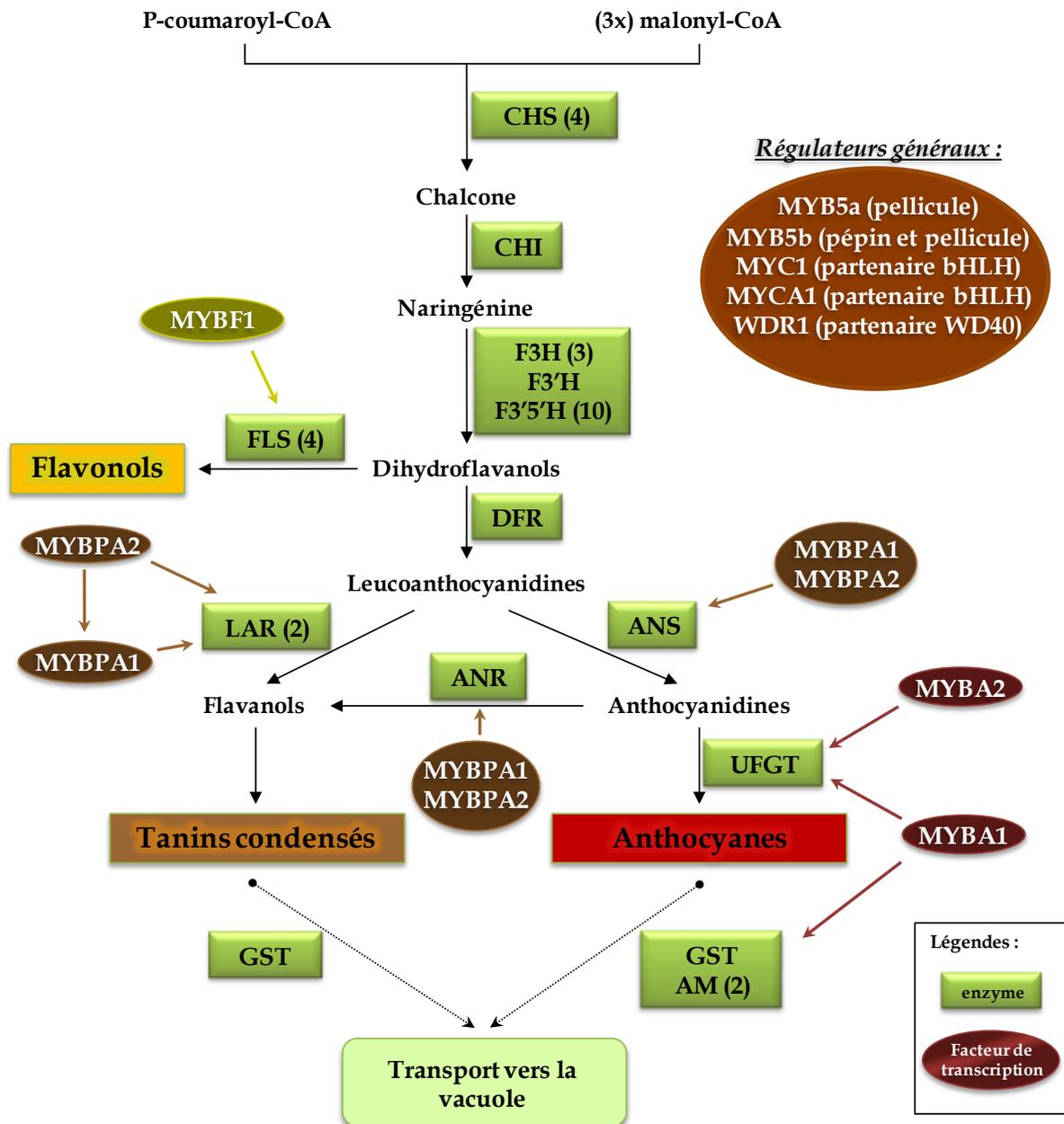


Figure 7. Voies de biosynthèse des flavonoïdes. Les protéines entourées par un carré représentent les enzymes de la voie de biosynthèse et celles entourées par un cercle représentent les facteurs de transcription identifiés chez la vigne. Le chiffre entre () indique le nombre d'isoformes selon Velasco *et al.* (2007).

CHS, Chalcone synthase ; CHI, Chalcone isomérase ; F3H, Flavanone 3 hydrolase ; F3'H, Flavanone 3' hydrolase ; F3'5'H, Flavanone 3'5' hydrolase ; FLS, Flavonol synthase ; DFR, Dihydroflavanol réductase ; LAR, Leucoanthocyanidine réductase ; ANR, Anthocyanidine réductase ; ANS, Anthocyanidine synthase ; UFGT, UDP-Glucose flavonoïde glycosyl transférase ; GST, Glutathione S-transférase ; AM, transporteur AnthoMATE

dihydromyricétine. A partir des dihydroflavonols, la flavonol synthase (FLS) catalyse la formation des flavonols. La dihydroflavonol 4-réductase (DFR) (Stafford and Lester, 1982) catalyse la formation des précurseurs des anthocyanes et des flavan 3-ols : leucocyanidine, leucodelphinidine et leucopélargonidine. D'une part, l'oxydation des leucoanthocyanidines catalysée par la leucoanthocyanidine dioxygénase/anthocyanidine synthase (LDOX/ANS) aboutit à la formation des anthocyanidines, cyanidine, delphinidine et pelargonidine (Abrahams *et al.*, 2003). D'autre part, à partir d'une réduction catalysée par une leucoanthocyanidine réductase (LAR), sont obtenus les isomères 2,3 *trans* des flavan 3-ols : (+)-catéchine, (+)-gallocatéchine et (+)-afzeléchine (Tanner *et al.*, 2003). Les isomères 2,3 *cis*, (-)-épicatechine, (-)-épigallocatéchine et (-)-épi-afzeléchine sont pour leur part synthétisés à partir d'une réduction respectivement de la cyanidine, la delphinidine et la pelargonidine par une anthocyanidine réductase (ANR) (Devic *et al.*, 1999). Le mécanisme de biosynthèse des proanthocyanidines par lequel les précurseurs sont incorporés aux polymères reste à ce jour inconnu (Dixon *et al.*, 2005).

- **Chez la Vigne**

Chez la Vigne, la voie métabolique des flavonoïdes a été décrite pour la première fois par Sparvoli *et al.* (1994). Ces travaux ont permis le clonage et la description des enzymes PAL, CHS, CHI, F3H, DFR, LDOX à partir d'un criblage dans une collection d'ADNc de Vigne à partir de sondes obtenues chez *Antirrhinum majus* et le maïs. Plus récemment, Bogs *et al.* (2006) et Castellarin *et al.* (2006) ont identifié des gènes codant pour une F3'H et une F3'5'H. Pour ce qui concerne la voie spécifique des tannins condensés, deux isoformes de LAR (VvLAR1 et VvLAR2) et une isoforme d'ANR ont été identifiées (Bogs *et al.*, 2005). Concernant la synthèse des anthocyanes, le gène codant l'enzyme UDP-glucose: flavonoïde 3-O-glucosyltransférase (UFGT) qui catalyse la réaction de glycosylation en position 3 du noyau C des anthocyanidines a été cloné et la fonction de l'enzyme a été caractérisée (Ford *et al.*, 1998). La majorité des gènes de la voie des flavonoïdes sont présents en plusieurs copies et ils sont organisés en grandes familles multigéniques (VvPAL (13 isoformes), VvF3'5'H (10)) ou en petites familles (VvCHS (4), VvF3H (3), VvFLS (4), VvLAR (2)). D'autres gènes sont présents en une seule copie (VvC4H, Vv4CL, VvCHI, VvF3'H, VvDFR, VvLDOX, VvANR, VvUFGT) (Figure 7) (Velasco *et al.*, 2007). Le raisin accumule les différents flavonoïdes, flavonols, tannins condensés et anthocyanes, selon une localisation spatio-temporelle spécifique. Généralement, les gènes de biosynthèse ne sont exprimés que dans les tissus accumulant ces composés, et leur expression est concomitante à la biosynthèse de ces

différents composés. Ainsi *VvANR* et *VvLAR* sont exprimés de manière importante chez le raisin à partir de la floraison et jusqu'à véraison dans la pellicule et le péricarpe, lieu de stockage des proanthocyanidines (Bogs *et al.*, 2005). L'expression de *VvLAR1* est quasiment limitée aux péricarpes, tandis que celle de *VvLAR2* est observée dans la pellicule et le péricarpe (Bogs *et al.*, 2005), suggérant un rôle préférentiel de *VvLAR1* dans la synthèse des tannins condensés dans les péricarpes, et de *VvLAR2* dans la pellicule. Les transcrits *VvUFGT* sont détectés dans la pellicule à partir de la véraison et tout au long de la maturation (Boss *et al.*, 1996). *VvUFGT* est exprimé uniquement dans les baies rouges contenant des anthocyanes (Kobayashi *et al.*, 2001).

2.2.4.2. Les enzymes de modifications des anthocyanidines

Les flavonoïdes, notamment les anthocyanidines, subissent des modifications comme la glycosylation, l'acylation ou la méthylation. Ces réactions enzymatiques, associées au pH vacuolaire, à la complexation avec des ions métalliques ou à la co-pigmentation avec d'autres flavonoïdes, contribuent, via la diversité structurale des anthocyanes, à la diversité de la coloration de la plupart des fleurs et des fruits.

- **La glycosylation**

La glycosylation est la première modification des anthocyanidines. L'UFGT permet la stabilisation des anthocyanes par addition d'un groupement glucosyl en position 3 (et parfois 5) du cycle C. C'est l'enzyme caractéristique des cépages colorés. En effet, le gène *VvUFGT* n'est pas exprimé dans les cépages blancs (Boss *et al.*, 1996). Cependant, l'analyse de sa séquence codante et de sa séquence promotrice ne révèle pas de différence entre les cultivars blancs ou rouges, indiquant que l'UFGT serait fonctionnelle dans les cultivars blancs. Par conséquent, l'absence d'expression de *VvUFGT* chez ces derniers résulterait d'une régulation en amont (Kobayashi *et al.*, 2001). D'une façon générale, l'expression de l'ensemble des gènes structuraux, c'est-à-dire les gènes codant pour les enzymes métaboliques, est beaucoup plus faible dans les cépages blancs que dans les cépages colorés (Kobayashi *et al.*, 2001).

- **La méthylation**

La méthylation réduit la réactivité des groupements hydroxyles situés sur le noyau phényle, et modifie l'activité biologique des flavonoïdes, comme les propriétés anti-inflammatoires et antivirales de la quercétine. Dans le cas des anthocyanes, la méthylation a lieu directement sur la molécule d'anthocyanidine, en position 3, 5, 6, 7 ou encore 4' ou 5' (Winkel, 2006). La méthylation des flavonoïdes est réalisée par une enzyme de type OMT (*O*-méthyltransférase).

Les méthyltransférases peuvent être classées en deux grands groupes. Le premier comprend des OMT de l'acide caféique, des flavonoïdes, des coumarines et des alcaloïdes. Le second comprend les enzymes ayant pour substrat des esters de coenzyme A et des flavonoïdes, et semble spécifique de la synthèse des lignines. L'activité des enzymes de ce second groupe dépend de cations bivalents comme le Mg^{2+} (Winkel, 2006; Hugueney *et al.*, 2009). Récemment, une méthyltransférase appartenant au groupe 2 et désignée par AOMT a été identifiée chez la Vigne. *VvAOMT* ne s'exprime qu'après la véraison dans la pellicule des cultivars Syrah et Nebbiolo. AOMT permet la méthylation en 3' ou en 3' et 5' du noyau B des anthocyanes et des flavonols possédant un groupement hydroxyl à ces positions (Hugueney *et al.*, 2009).

- **L'acylation**

Les acyltransférases appartiennent à la famille BAHD, qui compte au moins 70 membres chez *Arabidopsis*, et les gènes correspondant sont généralement très exprimés dans les fleurs. Ces enzymes catalysent le transfert du groupement acyl d'une molécule d'acyl-CoA sur le groupement glycosyl des anthocyanes, modifiant ainsi leurs propriétés chimiques. En effet, les groupements acyl sont à l'origine de réactions de co-pigmentation inter et intramoléculaires. Les anthocyanes ainsi stabilisées prennent une teinte bleue. Ces effets sont d'ailleurs d'autant plus prononcés que le nombre de groupements acyl fixés par les anthocyanes est important, cette réaction étant séquentielle (Fujiwara *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2004). Le Pinot Noir ne produit pas d'anthocyanes acétylées (Boss and Davies, 2001). La localisation cytosolique d'une acyltransférase d'anthocyanes dans les fleurs de *Gentiana triflora*, ainsi que d'une méthyltransférase d'anthocyanes chez le Pétunia (*Petunia hybrida*), suggère que ce sont les anthocyanes totalement modifiées, et non les molécules intermédiaires, qui sont transportées vers la vacuole (Jonsson *et al.*, 1983; Fujiwara *et al.*, 1998).

2.2.4.3. La compartimentation et le transport des flavonoïdes

Une fois synthétisés, les flavonoïdes sont adressés vers leurs compartiments d'activité d'une part pour remplir leurs fonctions biologiques et, d'autre part, en raison de leur toxicité intrinsèque. Les flavonols glycosylés, les anthocyanes et les PA sont surtout accumulés dans la vacuole, alors que les phlobaphènes et les flavonols méthylés sont retrouvés majoritairement dans la paroi cellulaire (Lepiniec *et al.*, 2006). Plusieurs modèles ont été proposés pour le transport des flavonoïdes, certains impliquant l'intervention de protéines de

transport comme les GST, d'autres impliquant la formation de vésicules dérivées du RE (Kitamura, 2006).

- (1) Chez le Maïs, le Pétunia, *Arabidopsis* et la Vigne (Marrs *et al.*, 1995; Larsen *et al.*, 2003; Kitamura *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2011) des GST (glutathione S-transférase) sont impliquées dans la séquestration des anthocyanes et proanthocyanidines dans la vacuole. Ce sont des enzymes de détoxification cellulaire. Cependant, aucune anthocyane glutathionylée n'a été mise en évidence. Les GST seraient simplement responsables de la liaison et la stabilisation de ces composés pendant le transport cytoplasmique.
- (2) Le passage de la membrane plasmique impliquerait d'autres enzymes, vraisemblablement des pompes H⁺/ATPase, dont certaines sont impliquées dans le transport des proanthocyanidines chez *Arabidopsis* (Baxter *et al.*, 2005).
- (3) Des transporteurs de type MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) de la membrane vacuolaire sont impliqués dans le transport des anthocyanes chez le Maïs (Goodman *et al.*, 2004), dans celui des proanthocyanidines chez *Arabidopsis* (Debeaujon *et al.*, 2001) et dans celui des anthocyanes acylées chez *V. vinifera* (VvAM1 et VvAM3) (Gomez *et al.*, 2009) (Figure 7).

Un transport vésiculaire a été mis en évidence. Les anthocyanes seraient exportées du réticulum endoplasmique (RE) par des vésicules de type AVI (Anthocyanic Vacuolar Inclusion) et transportées dans la vacuole (Zhang, Wang, Deroles, *et al.*, 2006; Poustka *et al.*, 2007).

2.2.4.4. La régulation transcriptionnelle de la biosynthèse des flavonoïdes

Les différents profils d'expression des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes indiquent une régulation temporelle de celle-ci. L'expression des gènes est régulée au niveau transcriptionnel par des facteurs de transcription, des protéines capables de se fixer aux séquences *cis*-régulatrices des gènes (séquences nucléotidiques présentes en amont des promoteurs des gènes régulés). De nombreux complexes MYB/bHLH identifiés chez le Maïs, le Pétunia et le Mufler ont été identifiés comme régulateurs de la synthèse d'anthocyanes (Vom Endt *et al.*, 2002). Des études de sur- et sous-expression de gènes chez *Arabidopsis*, couplées à des analyses d'interactions protéine-protéine ont également montré qu'un complexe composé de protéines MYB, bHLH et WD40 (MBW) est à l'origine du contrôle de la transcription des gènes menant à la synthèse des anthocyanes et surtout des

tanins condensés (Hartmann *et al.*, 2005; Baudry *et al.*, 2004; Ramsay and Glover, 2005; Gonzalez *et al.*, 2008). Chez la Vigne, des facteurs MYB ont été identifiés, qui régulent soit la synthèse des anthocyanes (VvMYBA1 (Kobayashi *et al.*, 2004), VvMYBA2, VvMYBA3, VvMYBA4 (Walker *et al.*, 2007), VvMYB5a (Deluc *et al.*, 2006), VvMYB5b (Deluc *et al.*, 2008), soit celle des tanins condensés (VvMYBPA1 (Bogs *et al.*, 2007)), soit celle des flavonols (VvMYBF1 (Czemmel *et al.*, 2009)). Deux protéines bHLH ont également été identifiées, VvMYC1 et VvMYCA1. VvMYC1 régule la synthèse des anthocyanes en s'associant à VvMYB5a, VvMYB5b, VvMYBA1, VvMYBA2 et VvMYBPA1 et des études suggèrent que VvMYCA1 et VvMYC1 interviendrait également dans la régulation de la synthèse des tannins (Hichri *et al.*, 2010; Matus *et al.*, 2010). De plus, une protéine de type WD40 a été identifiée chez la Vigne comme régulant positivement l'accumulation des anthocyanes lorsque cette protéine était surexprimée chez *Arabidopsis* (Matus *et al.*, 2010). La figure 7 indique les niveaux de régulation de ces différentes protéines sur la voie de biosynthèse des flavonoïdes.

La régulation transcriptionnelle des gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes est donc fortement impliquée dans la spécificité temporelle d'accumulation de ces composés. Cependant, quelque soit le stade de développement de la baie plusieurs familles de composés sont accumulées simultanément. Les dihydroflavonols et les leucoanthocyanidines étant à eux deux précurseurs des flavonols, des anthocyanes et des tanins condensés, une compétition est prévisible entre les enzymes spécifiques de ces trois voies (Figure 7). Afin d'éviter cette compétition, des complexes multienzymatiques (ou métabolons) orientant la synthèse vers l'une ou l'autre des trois voies sont envisagés. Ces complexes sont associés aux membranes cytosoliques du RE ou de la vacuole grâce aux enzymes de la famille des cytochromes P450 (F3'H, F3'5'H, C4H). Deux hypothèses sur la nature de ces complexes multienzymatiques appelés aussi métabolons sont proposées (Figure 8). Dans le modèle proposé par Ralston et Yu (2006), les enzymes seraient en contact avec plus d'un partenaire, permettant la coexistence de plusieurs voies de biosynthèse simultanément dans un même complexe (flavonols, anthocyanes, ...) (Figure 8A). De tels complexes seraient non seulement utiles pour séquestrer les intermédiaires toxiques ou instables mais aussi pour orienter la synthèse vers l'un ou l'autre des nombreux produits de cette voie (anthocyanes, proanthocyanidines, flavonols, ...). Au contraire, dans le modèle de Jørgensen *et al.* (2005) et Lepiniec *et al.* (2006), le complexe multienzymatique serait linéaire, chaque enzyme ayant comme partenaire l'enzyme précédente et la suivante, privilégiant une seule voie de biosynthèse (Figure 8B).

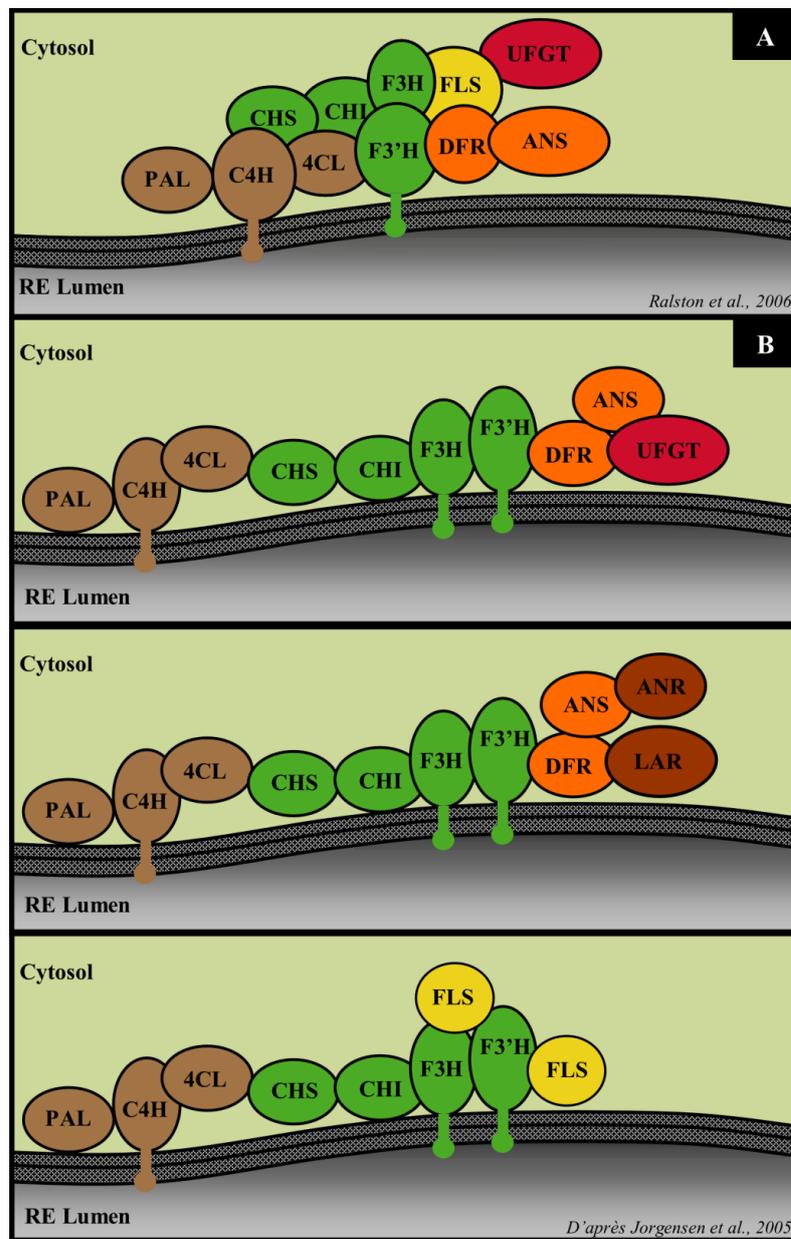


Figure 8. Modèles d'organisation des enzymes du métabolisme des flavonoïdes en métabolons selon (A) Ralston *et al.* (2006) et (B) Jorgensen *et al.* (2005). En marron clair sont indiquées les enzymes communes à la voie des phénylpropanoïdes et en vert celles communes à la voie des flavonoïdes. Les enzymes qui sont spécifiquement impliquées dans une voie de biosynthèse sont indiquées par d'autres couleurs (jaune, flavonols ; orange, tanins/anthocyanes ; rouge, anthocyanes ; marron, tanins).

PAL, phénylalanine ammonia lyase ; C4H, cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL, 4-coumarate CoA ligase ; CHS, Chalcone synthase ; CHI, Chalcone isomérase ; F3H, Flavanone 3-hydroxylase ; F3'H, Flavonoïde 3' hydroxylase ; DFR, Dihydroflavonol réductase ; ANR, Anthocyanidine réductase ; FLS, Flavonol synthase) ; LAR, Leucoanthocyanidine réductase ; UFGT, UDP-glucose:flavonoïde 3-O-glucosyltransferase ; RE, réticulum endoplasmique.

3. Les stress abiotiques

Le stress abiotique est défini comme l'impact négatif de facteurs environnementaux sur un organisme vivant. Un stress est caractérisé comme tel lorsque son influence, au delà des limites normales de variation, affecte la physiologie de l'organisme de manière significative (Vinebrooke *et al.*, 2004). Ces stress environnementaux, dus à des facteurs comme un rayonnement intense ou bien une élévation de la température, interviennent naturellement chez les plantes et peuvent occasionner des dommages nombreux et variés. Selon Bray *et al.* (2000), les stress abiotiques sont la limitation majeure de la production céréalière mondiale. Les auteurs estiment qu'ils sont responsables de pertes de rendement de l'ordre de 50 à 80% chaque année. La nature sessile des plantes rend l'exposition aux stress abiotiques inévitable et rend donc ceux-ci particulièrement préoccupants pour tous les agriculteurs. Les stress abiotiques sont extrêmement nombreux et ils sont particulièrement dommageables lorsqu'ils agissent de concert (Mittler, 2006).

Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes intéressés à deux facteurs de stress abiotiques, particulièrement importants dans le contexte du réchauffement climatique, le stress thermique et le stress lumineux.

3.1. Le stress thermique

Le stress thermique est souvent défini comme une augmentation de la température au delà d'un certain seuil et durant une période suffisante pour entraîner des dommages dans la croissance et le développement de la plante (Wahid *et al.*, 2007). En général, une élévation transitoire de la température de 10-15°C par rapport à la température ambiante est considérée comme un choc ou un stress thermique. Néanmoins, le stress thermique est la combinaison complexe de plusieurs facteurs. Ces facteurs sont l'intensité thermique, la durée d'exposition et la vitesse d'augmentation de la température (Wahid *et al.*, 2007). A de très hautes températures, de nombreux dommages cellulaires peuvent apparaître en quelques minutes. Ces événements peuvent être attribués à une détérioration critique de l'organisation cellulaire et déboucher sur des processus de mort cellulaire (Schöffl and Prändl, 1999). A des températures plus modérées, ces dommages apparaissent seulement après une longue exposition au stress. Les effets néfastes directs entraînés par des températures anormalement élevées peuvent notamment se traduire par la dénaturation et l'agrégation protéiques ou encore par l'augmentation de la fluidité des membranes lipidiques. Parmi les dommages indirects ou

plus lents à se mettre en place, on peut citer l'inactivation d'enzymes des chloroplastes et des mitochondries, l'inhibition de la synthèse protéique, la dégradation des protéines et la perte de l'intégrité de la membrane cellulaire (Howarth, 2005) (Figure 9).

3.1.1. Impacts physiologiques du stress thermique sur le fonctionnement des plantes

- **Relation hydrique**

Le statut hydrique de la plante est une des variables les plus importantes dans le cadre d'une élévation de la température (Mazorra *et al.*, 2002). En général, les plantes essayent de maintenir un statut hydrique stable dans les tissus indépendamment de la température quand l'humidité de l'air est suffisante (Machado and Paulsen, 2001). Par ailleurs, dans les conditions au champ, le stress thermique est souvent associé à la diminution de la disponibilité en eau (Simões-Araújo *et al.*, 2003). De manière générale, l'augmentation de la transpiration induite par le stress thermique entraîne une diminution du potentiel hydrique de la plante et perturbe donc de nombreux processus physiologiques comme la photosynthèse ou les flux de sèves (Tsukaguchi *et al.*, 2003).

- **Perturbations de la photosynthèse en conditions de stress thermique**

La photosynthèse est très rapidement affectée par un changement de température (Camejo, 2005). Le processus photosynthétique le plus sensible aux stress en général et au stress thermique en particulier, est le photosystème 2 (PSII) (Havaux, 1992; Tang *et al.*, 2007; Murata *et al.*, 2007). Le complexe producteur d'oxygène (Oxygen Evolving Complex : OEC) du PSII est le composant le plus thermolabile de l'appareil photosynthétique. L'oxydation de l'eau en oxygène par le PSII nécessite l'activité de métalloprotéines contenant 4 Mn^{2+} , stabilisés par plusieurs protéines extrinsèques du OEC sensibles à la chaleur (McEvoy and Brudvig, 2006). Le stress thermique provoque la perte de ces protéines extrinsèques et de deux Mn^{2+} , conduisant à l'inactivation du PSII (Allakhverdiev *et al.*, 2008). Parmi les composants intrinsèques du PSII, la protéine D1 est la plus fragile et peut se cliver dès 40°C quand les autres protéines restent intactes (Yoshioka *et al.*, 2006).

Le transport d'électrons entre les photosystèmes PSII et PSI, réalisé par le LIGHT HARVESTING COMPLEX (LHC) est inhibé dès 35°C (Pastenes and Horton, 1996; Busch *et al.*, 2008). La thermotolérance du PSII est liée à la stabilité des thylakoïdes dont les membranes subissent une réorganisation dans l'intervalle 35-45°C (Nishiyama *et al.*, 2006).
Les

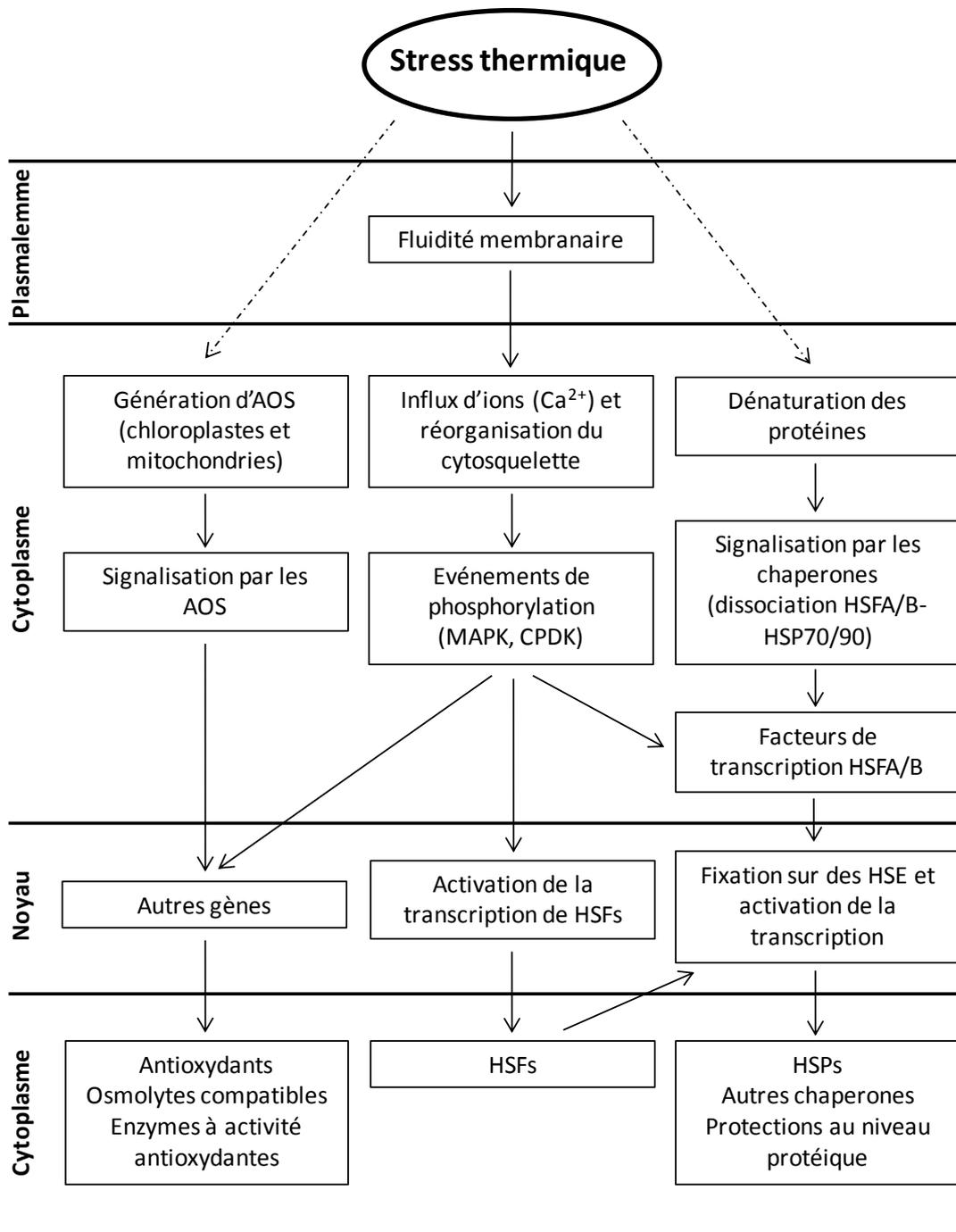


Figure 9. Mécanismes d'acquisition de la tolérance au stress thermique.

AOS, Active oxygen species ; MAPK, Mitogen activated protein kinases ; CPDK, Calcium dependent protein kinases ; HSF, Heat stress factors ; HSP, Heat stress proteins ; HSE, Heat stress elements (modifié d'après Wahid *et al.*, 2007).

dommages irréversibles n'interviennent généralement qu'au-delà de 45°C (Sharkey, 2005; Haldimann and Feller, 2005). L'une des autres causes de la réduction de la photosynthèse par une température élevée est l'inhibition de la RuBisCO activase, ce qui empêche la fixation du CO₂ (Law and Crafts-Brandner, 1999; Salvucci and Crafts-Brandner, 2004). La solubilité du CO₂ est également en cause car elle est réduite, même à des températures qui n'affectent pas la RuBisCO activase ou le transport d'électrons des photosystèmes (Crafts-Brandner and Law, 2000).

Pour finir, le stress thermique appliqué en continu peut induire l'apparition d'un stress oxydatif. Par exemple, la génération de formes actives de l'oxygène (AOS) comme l'oxygène singulet (¹O₂), le radical superoxyde (O₂⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxylé (OH⁻) au niveau de la chaîne photosynthétique sont des symptômes de dommages cellulaires provoqués par des températures élevées (Liu and Huang, 2000). Les AOS peuvent entraîner la peroxydation autocatalytique des membranes lipidiques et des pigments engendrant ainsi une perte de la perméabilité membranaire (Xu *et al.*, 2006).

- **Stabilité de la membrane cellulaire**

Maintenir la fonction des biomembranes sous l'influence d'un stress est fondamental pour le bon déroulement de processus comme la photosynthèse et la respiration (Blum, 1988). Le stress thermique accélère l'énergie cinétique et le mouvement des molécules à travers la membrane en dénaturant certaines protéines membranaires ou bien en augmentant le nombre d'acides gras insaturés composant la membrane. Ce phénomène a pour conséquence de rendre la bicouche lipidique de la membrane cellulaire plus fluide (Savchenko *et al.*, 2002). L'intégrité et les fonctions biologiques des membranes sont sensibles au stress thermique car ce dernier altère les structures tertiaires et quaternaires des protéines membranaires. De telles altérations entraînent une augmentation de la perméabilité de la membrane ainsi qu'une perte d'électrolytes. L'augmentation de la fuite de ces électrolytes comme indication de la diminution de la stabilité membranaire a souvent été utilisé comme une mesure indirecte de la tolérance au stress thermique chez diverses espèces. Parmi ces espèces on retrouve le Pois (Martineau *et al.*, 1979), la Pomme de terre et la Tomate (Chen *et al.*, 1982) et l'Orge (Wahid and Shabbir, 2005).

- **Dénaturation des protéines**

Le stress thermique peut également entraîner la dénaturation des protéines. La désorganisation de la structure spatiale des protéines peut provoquer plusieurs effets avec par exemple, la perte de son activité biologique, le changement de ces propriétés optiques ou la modification de sa solubilité pouvant entraîner l'agrégation des protéines entre elles et la perte irréversible de leur fonction biologique.

Toutefois, les plantes ne sont pas complètement démunies face à ce stress thermique. Après perception de ce stress, les plantes sont capables de mettre en place un éventail de mécanismes permettant de réduire, voire d'éliminer les effets néfastes entraînés par la chaleur (Kotak *et al.*, 2007; Baniwal *et al.*, 2004). Ces réponses sont résumées ci-dessous.

3.1.2. Réponses adaptatives des plantes face au stress thermique

Les plantes mettent en place différentes réponses au niveau moléculaire afin de se prémunir contre les effets délétères du stress thermique. La figure 9 résume les différents mécanismes aboutissant à la mise en place de la tolérance au stress thermique. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à la partie finale de ce schéma, à savoir les mécanismes d'adaptations existant chez les plantes.

- **Déclenchement de voies de signalisation après perception du stress thermique**

L'un des premiers effets du stress thermique se situe au niveau du plasmalemme. La fluidification des membranes lipidiques entraîne un influx de Ca^{2+} dans le cytoplasme ainsi qu'une réorganisation du cytosquelette (Wahid *et al.*, 2007). Cet influx de calcium active des cascades de MAP kinases (Mitogen-activated protein). La transduction du signal véhiculée par cette voie intervient dans de nombreux processus chez les plantes, notamment dans leur réponse au stress thermique (Sung *et al.*, 2003). En effet, une MAP kinase répondant spécifiquement au stress thermique a été identifiée chez *Medicago sativa* (Sangwan *et al.*, 2002). L'activation de cette MAP kinase nécessite l'intervention d'une CDPK (Calcium Dependent Protein kinase), le remodelage du cytosquelette et l'influx de Ca^{2+} (Sangwan *et al.*, 2002).

D'autre part, diverses études ont testé différentes molécules pour leur capacité à améliorer la tolérance thermique de la plante (Dat, Foyer, *et al.*, 1998; Dat, Lopez-Delgado, *et al.*, 1998; Gong *et al.*, 1998; Jiang and Huang, 2001; Larkindale and Knight, 2002). Ces études suggèrent que l'ABA, l'acide salicylique (SA), l'éthylène et les formes actives de l'oxygène (AOS) possèdent tous un potentiel de signalisation associé à la tolérance au stress thermique.

Des prétraitements à base de chacune de ces molécules induisent une meilleure tolérance thermique des plantes. Des sphingolipides, l'acide phosphatidique, des changements de fluidité de la membrane cellulaire ainsi que des kinases et des phosphatases ont également été étudiés comme agents de signalisation et de perception du stress thermique (Sangwan *et al.*, 2002; Alfonso *et al.*, 2001).

- **Accumulation d'osmolytes compatibles**

Un mécanisme d'adaptation clé de nombreuses plantes en situation de stress thermique (mais également lors de déficit hydrique ou de stress salin) est l'accumulation de composés organiques à faible poids moléculaires appelés osmolytes compatibles (Hare *et al.*, 1998; Sakamoto and Murata, 2002). En condition de stress, différentes espèces peuvent accumuler un large éventail d'osmolytes comme des sucres, des polyols, de la proline ou bien des composés azotés tertiaires et quaternaires (Sairam and Tyagi, 2004). L'accumulation de telles molécules contribue à développer la tolérance au stress des plantes. Par exemple, chez de nombreuses espèces la proline s'accumule en forte quantité sous l'influence de stress environnementaux (Kishor *et al.*, 2005). Cette accumulation provoquerait un effet tampon sur le potentiel rédox de la cellule (Wahid and Close, 2007). Parmi d'autres osmolytes, on retrouve l'acide γ -4-aminobutyrique (GABA), un acide aminé n'intervenant pas dans la synthèse protéique. Le profil d'accumulation du GABA dans les plantes présente un profil spécifique du stress cohérent avec un rôle d'osmolyte. De plus, l'accumulation rapide de GABA dans les tissus stressés pourrait être un des maillons de la chaîne d'événements partant de la perception du stress environnemental à la réponse physiologique (Kinnersley and Turano, 2000).

- **Les Heat Shock Transcription Factors (HSFs)**

L'une des réponses des plantes les mieux connues face au stress thermique est la production de Heat Shock Proteins (HSP) (voir paragraphe suivant ; Vierling, 1991). La transcription des gènes correspondants est induite dès les premières secondes qui suivent la perception d'un stress thermique. Une famille spécifique de facteurs de transcription, les HSFs, est capable de reconnaître et de se lier à des éléments *cis* de type HSE (Heat Shock Element) présents sur les promoteurs des HSPs et d'autres gènes (Nover *et al.*, 2001). Dans de nombreuses espèces végétales certains gènes *HSFs* (exemple *LpHsfA1*) sont exprimés constitutivement et les protéines correspondantes sont présentes dans le cytoplasme même en absence de stress. Ces HSFs pré-existants seraient maintenus dans un état inactif via leur association avec des

protéines HSP70 et HSP90 (Schöffl *et al.*, 1998). L'activation de ces HSFs impliquerait la réduction de la disponibilité des HSP70 et HSP90 due au rôle de chaperones de ces protéines en présence de protéines dénaturées par le stress thermique. Néanmoins d'autres processus de signalisation et/ou de régulation pourraient affecter l'activité transcriptionnelle des HSFs, comme par exemple la phosphorylation de ces HSFs (Liu *et al.*, 2008). A partir du moment où la plante perçoit une élévation de la température et que les cellules perçoivent le signal correspondant, les HSFs passent d'un état monomérique dans le cytoplasme à un état trimérique dans le noyau, où ils peuvent se fixer sur les HSE (Lee, Hübel, *et al.*, 1995). La liaison de ces HSFs permet le recrutement d'autres facteurs de transcription entraînant en retour une activation de l'expression de gènes dans les minutes qui suivent l'élévation de la température.

Bien que ce système soit universel chez les eucaryotes, il est beaucoup plus complexe chez les plantes (von Koskull-Döring *et al.*, 2007). Contrairement aux animaux et aux levures qui possèdent au plus quatre HSFs, les plantes présentent de multiples copies de ces gènes, différence probablement liée à leur nature sessile. Chez *Arabidopsis*, on retrouve pas moins de 21 facteurs de transcription appartenant à cette famille (Nover *et al.*, 2001). Ces gènes ont été classifiés en trois groupes (A, B et C). Notre travail nous a amené à nous intéresser à la classe A et plus spécifiquement à HSFA2. Chez la Tomate, il existe trois HSFs appartenant à la classe A, LpHSFA1, LpHSFA2 et LpHSFA3.

LpHSFA1 et LpHSFA3 sont présents de manière constitutive dans les cellules. LpHSFA1 joue un rôle central dans la réponse au stress thermique et intervient également dans l'expression et la fonction d'autres HSFs (Nover *et al.*, 2001). LpHSFA3 quant à lui serait régulé au niveau développemental car il ne s'exprime que dans des cellules en division (Bharti *et al.*, 2000).

Tout comme LpHSFA1, LpHSFA2 est un fort activateur de la transcription. Néanmoins son accumulation dépend strictement du stress thermique. LpHSFA2 existe sous trois formes :

- (1) La forme nucléaire : la présence dans le noyau et la capacité d'activation de la transcription de LpHSFA2 dépend de la présence de LpHSFA1. En effet, LpHSFA2 n'est trouvé que sous forme d'un hétéro-oligomère issu de son association avec HSFA1 (Scharf *et al.*, 1998; Heerklotz *et al.*, 2001)
- (2) La forme cytoplasmique insoluble : l'accumulation de cette protéine durant une exposition longue au stress thermique coïncide avec son interaction avec HSP17

(Nover *et al.*, 2001). Durant ce stress, les deux protéines sont incorporées dans des Heat Stress Granules (HSG), constituées notamment par de nombreuses chaperones.

- (3) La forme cytoplasmique soluble apparaît lors de la phase de récupération de la plante à la fin du stress. En effet pendant cette phase, LpHSFA2 se dissocie des complexes HSGs et son relargage nécessite l'intervention de la protéine HSP90 (Nover *et al.*, 2001).

Chez *Arabidopsis*, la protéine AtHSFA2 n'est également présente que lors d'un stress thermique (Schramm *et al.*, 2006).

- **Les Heat Shock Proteins (HSP)**

Les HSPs tiennent une place importante parmi les réponses adaptatives des plantes confrontées à des stress environnementaux et plus particulièrement à des stress thermiques (Timperio *et al.*, 2008). Ainsi la synthèse des HSPs intervient lorsque la plante subit une élévation brutale ou graduelle de la température (Nakamoto and Hiyama, 1999; Schöffl *et al.*, 1999). L'induction de ces HSPs semble être une réponse universelle à la température car elle a été observée dans tous les organismes vivants (Vierling, 1991). Des plantes de régions arides ou semi-arides peuvent synthétiser et accumuler de grandes quantités de HSPs. Certaines de ces protéines sont également produites dans des cellules sous contrôle développemental (Hopf *et al.*, 1992). Dans ce cas, l'expression des HSPs est restreinte à certains stades de développement comme l'embryogénèse, la germination ou le développement du pollen (Prasinos *et al.*, 2005). Ces protéines sont très conservées parmi les différents organismes (Vierling, 1991).

Cinq classes de protéines ont été définies en se fondant sur leur masse moléculaire : les HSP100, HSP90, les HSP70, les HSP60 et les HSPs de faibles poids moléculaires (15-30 kDa) également appelées small HSPs (sHSPs). L'importance particulière de ces sHSPs chez les plantes est suggérée par leur abondance et leur diversité. Les proportions de ces cinq classes varient entre les espèces. Les HSP90 et les HSP70 peuvent être accumulées de l'ordre de 10 fois plus alors que les sHSPs peuvent s'accumuler jusqu'à 200 fois plus au sein d'une même cellule. D'autres protéines comme les polypeptides de 110 kDa et l'ubiquitine sont également considérées comme des HSPs (Feussner *et al.*, 1997). Les protéines de type HSP70 et HSP60 comptent parmi les protéines les plus conservées dans la nature (Kultz, 2003). Toutes les HSPs caractérisées ont montré une fonction de chaperones. Les chaperones constituent un groupe de protéines qui partagent une capacité de liaison avec des protéines se

retrouvant dans des états structuraux instables (Boston *et al.*, 1996). Le rôle de ces chaperones est de faciliter le repliement, et le transport des protéines à travers la membrane, la régulation de l'activité ou de la dégradation protéique et la prévention de l'agrégation des protéines dénaturées. Cette dernière propriété apparaît comme critique pour la survie de la plante en conditions de températures élevées et explique l'accumulation des HSPs dans ces conditions. Parmi les HSP de poids moléculaires plus élevés, des protéines HSP90 participent à l'assemblage et à la maintenance du protéasome (Imai *et al.*, 2003) alors que des protéines HSP70 interviennent plus dans le marquage des protéines destinées à être dégradées par ce protéasome (Hartl, 1996). Une étude sur des graines de Maïs, d'Orge et de Seigle a montré que lorsque ces graines subissent un choc thermique (42°C) cinq sHSPs différentes sont exprimées chez le Maïs alors qu'une seule était présente chez l'Orge et le Seigle. Ce résultat expliquerait en partie la meilleure tolérance au stress thermique du Maïs par rapport à l'Orge et au Seigle (Korotaeva *et al.*, 2001). La capacité des sHSPs à s'assembler pour former des Heat Shock Granules (HSG) est un prérequis pour la survie de la plante en condition de stress continu (Miroshnichenko *et al.*, 2005). Des études d'immuno-localisation ont déterminé que les HSPs peuvent s'associer à des structures cellulaires particulières comme la paroi cellulaire, les chloroplastes, les ribosomes et les mitochondries (Nieto-sotelo *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2006). La localisation de certaines sHSPs dans les membranes chloroplastiques suggèrent que ces protéines interviennent dans la protection du PSII en cas de stress thermique (Barua *et al.*, 2003).

- **Processus de détoxification des AOS**

Le radical superoxyde est synthétisé dans les chloroplastes et les mitochondries. Le recyclage de l' O_2^- , effectué par la superoxyde dismutase (SOD), entraîne la production d' H_2O_2 qui est éliminé par l'ascorbate peroxydase (APX) ou la catalase (CAT). Néanmoins, ces AOS ne sont pas aussi toxiques que l' OH^- qui est formé par la combinaison d' O_2^- et d' H_2O_2 en présence de faibles quantités de Fe^{2+} ou Fe^{3+} par la réaction d'Haber-Weiss (Figure 10). L'ion OH^- peut endommager la chlorophylle, les protéines, l'ADN, les lipides et d'autres macromolécules importantes. Cet ion entraîne donc la limitation de la croissance de la plante et de son rendement (Sairam and Tyagi, 2004).

Comme décrit dans la figure 10, les plantes ont développé une série de systèmes de détoxification enzymatiques et non enzymatiques pour contrecarrer les effets toxiques des AOS et se protéger des dégâts engendrés par le stress oxydatif (Sairam and Tyagi, 2004). Par

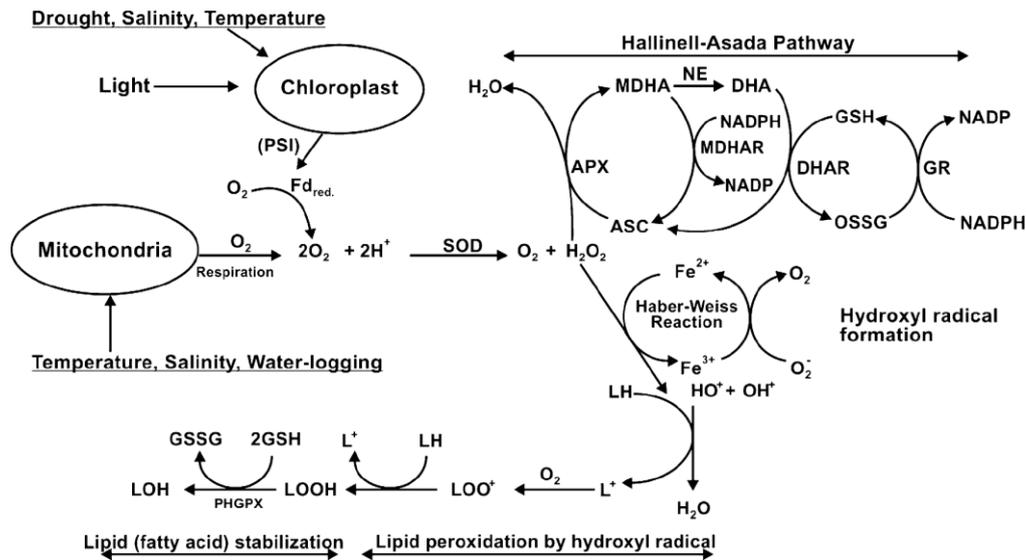


Figure 10. Représentation des voies de synthèse et de recyclage des AOS (d'après Sairam et Tyagi, 2004).

APX, ascorbate peroxydase ; ASC, ascorbate ; DHA, dehydroascorbate ; DHAR, dehydroascorbate réductase ; Fd, ferredoxin ; GR, glutathione réductase ; GSH, glutathione ; GSSG, oxi-glutathione ; HO•, radical hydroxyle ; LH, lipide ; L, LOO ; LOOH, lipide instable radicalaire et hydroperoxyde ; LOH, lipide stable (acide gras) ; MDHA, monodehydro-ascorbate ; MDHAR, mono dehydro-ascorbate réductase ; NE, réaction non enzymatique ; PHGPX, phospholipid-hydroperoxyde glutathione peroxydase ; SOD, superoxide dismutase.

exemple chez *Agrostis palustris*, l'activité de la SOD augmente après une exposition longue au stress thermique alors que l'activité de l'APX, de la CAT et de la glutathion réductase diminue (Jiang and Huang, 2001). Chez le Maïs par contre, l'activité de toutes ces enzymes augmente sous l'effet du stress thermique (Gong *et al.*, 1998).

Le peroxyde d'hydrogène est produit très rapidement en réponse à un stress thermique (Dat, Lopez-Delgado, *et al.*, 1998; Vacca *et al.*, 2004). La propension du stress thermique à générer des dommages oxydatifs à travers la production d'AOS est connue depuis longtemps. Néanmoins depuis quelques années le potentiel de ces AOS à agir comme molécules signal a été mis en évidence. Ainsi, H₂O₂ peut induire la production de HSPs chez la Tomate ou le Riz (Banzet *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000), et stimule l'activité des HSFs dans les cellules de mammifères (Calabrese *et al.*, 2001).

Cependant la réduction trop importante d'activités antioxydantes dans les tissus stressés par la chaleur peut entraîner une trop forte accumulation d'AOS causant ainsi des dommages aux tissus (Fadzillah *et al.*, 1996). La protection contre les stress oxydatifs est donc un facteur important dans la capacité de la plante à survivre à un stress thermique prolongé. Une étude sur *Festuca arundinacea* et *Lolium perenne*, deux variétés de gazon présentant des niveaux de tolérance à la chaleur différents, a montré que l'espèce tolérante possédait une concentration

inférieure en AOS. Ce constat pouvait s'expliquer par une synthèse plus efficace de molécules antioxydantes telles que l'ascorbate et le glutathion (Xu *et al.*, 2006).

3.1.3. Impact du stress thermique sur les métabolites secondaires et implications de ces composés dans la réponse au stress

La plupart des métabolites secondaires (terpènes, alcaloïdes et phénylpropanoïdes) sont synthétisés à partir d'intermédiaires du métabolisme primaire via les voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes, du shikimate, du mévalonate ou bien du méthylérythritol phosphate (voie MEP) (Wahid and Ghazanfar, 2006).

Parmi ces composés, certains isoprénoïdes, qui forment une classe de molécules à faible poids moléculaire et volatiles de la famille des terpènes, peuvent conférer une meilleure tolérance de l'appareil photosynthétique face au stress thermique (Loreto *et al.*, 1998). Les plantes capables de synthétiser de plus grandes quantités d'isoprènes montrent généralement un meilleur rendement photosynthétique sous l'effet d'un stress thermique (Velikova and Loreto, 2005).

Les caroténoïdes, autre classe de la famille des terpènes, sont connus pour protéger les structures cellulaires lors de la perception de divers stress abiotiques comme la température, la lumière ou le stress salin (Havaux, 1998; Wahid and Ghazanfar, 2006; Wahid, 2007). Par exemple, le cycle des xanthophylles joue un rôle essentiel dans la photoprotection. Ce cycle correspond à la conversion réversible de deux caroténoïdes, la violaxanthine et la zéaxanthine. La zéaxanthine est hydrophobe et se trouve à la périphérie des antennes du photosystème (LHC). Ce terpène protège les membranes lipidiques des dommages causés par des AOS (Horton, 2002). Des caroténoïdes de la famille des xanthophylles ainsi que d'autres terpènes comme l'isoprène ou l' α -tocophérol peuvent stabiliser et protéger les parties lipidiques de la membrane des thylakoïdes (Havaux, 1998; Sharkey, 2005; Velikova and Loreto, 2005). L'interaction entre les xanthophylles et les membranes lipidiques permet de réduire la fluidité de ces membranes et limite également la peroxydation des lipides entraînée par le stress thermique (Havaux, 1998).

Les polyphénols comme les flavonoïdes, les anthocyanes et les lignines jouent également un rôle dans la tolérance des plantes face aux stress abiotiques (Chalker-Scott, 2002; Wahid and Ghazanfar, 2006; Wahid, 2007). Plusieurs études ont montré que l'accumulation de composés phénoliques sous l'influence d'un stress thermique est accompagnée d'une augmentation de l'activité Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL), première enzyme de la voie de biosynthèse

des composés phénoliques et d'une diminution des activités des peroxydases et des polyphénols lyases (Rivero *et al.*, 2001). Les anthocyanes s'accumulent quand les plantes sont exposées à des températures faibles, alors que leur teneur diminue en réponse à des températures élevées (Shaked-Sachray *et al.*, 2002). Par exemple, des températures élevées entraînent une diminution de la synthèse des anthocyanes dans les organes reproductifs des pommes rouges (Tomana and Yamada, 1988), des chrysanthèmes (Shibata *et al.*, 1988) et des asters (Shaked-Sachray *et al.*, 2002). La réduction de la concentration en anthocyanes pourrait s'expliquer par une synthèse moins intense et une diminution de leur stabilité (Shaked-Sachray *et al.*, 2002). En revanche, une accumulation d'anthocyanes est observée dans certains tissus végétatifs soumis à un stress thermique comme les feuilles de Rose et de Canne à sucre (Wahid and Ghazanfar, 2006). Cette observation pourrait s'expliquer par la capacité des anthocyanes à diminuer le potentiel osmotique des feuilles (Chalker-Scott, 2002). Cette propriété permettrait aux feuilles de réagir rapidement à des conditions environnementales changeantes.

3.2. Le stress rayonnement

La lumière peut représenter un stress abiotique important pour les plantes dont la survie dépend, entre autres, de leur faculté d'adaptation aux conditions de lumière toujours changeantes. Le spectre lumineux arrivant à la surface des plantes résulte de l'interaction du spectre solaire avec la traversée de l'atmosphère, ce qui se traduit par une gamme de longueurs d'ondes situés entre 280 et 2500 nm. La partie de ce spectre interagissant directement avec la biologie des plantes est constituée par des radiations de longueurs d'onde variant de 280 nm à 700 nm. Ces radiations peuvent se décomposer en trois catégories :

- (1) Les ultraviolets B (UV-B), d'une longueur d'onde de 280 à 320 nm. Ces radiations sont fortement énergétiques mais ne représentent qu'un faible pourcentage des radiations perçues par les plantes (Madronich *et al.*, 1998).
- (2) Les ultraviolets A (UV-A), moins énergétiques, d'une longueur d'onde de 320 à 400 nm.
- (3) La lumière visible, correspondant aux radiations photosynthétiquement actives (PAR) de longueur d'onde de 400 nm à 700 nm (Smith, 1982).

L'excès de radiations entraîne une saturation du processus de photosynthèse aboutissant à une diminution du rendement photosynthétique. Ce phénomène s'appelle la photoinhibition (Takahashi and Badger, 2011). Les premières cibles de l'excès de lumière sont les complexes

producteurs d'oxygène (OEC) (Tyystjarvi, 2008) puis le centre réactionnel du PSII et plus précisément la protéine D1 (Demmig-Adams and Adams III, 1992) ainsi que les processus de réparation du PSII (Takahashi and Murata, 2008). La photoinhibition entraîne non seulement la chute du rendement photosynthétique de la plante, mais elle génère aussi la formation d'AOS induisant un stress oxydatif en présence d'un excès de lumière. Néanmoins, la plante a développé plusieurs mécanismes de protection limitant la photoinhibition, comme le mouvement des chloroplastes, le recyclage des AOS, le flux cyclique d'électrons et la photorespiration (Takahashi and Badger, 2011).

3.2.1. Impacts physiologiques du stress rayonnement sur le fonctionnement des plantes

- **Induction de la photoinhibition par l'absorption excessive de lumière**

Le phénomène de photoinhibition intervient lorsque que l'activité de transport de la chaîne d'électrons au sein du PSII est perdue. L'excès de lumière provoque des dommages sur différents complexes reliés au PSII. La première cible subissant des dégâts est le complexe producteur d'oxygène (OEC) et plus précisément les atomes de manganèse présent dans ce complexe (Tyystjarvi, 2008). La perte d'un atome de manganèse entraîne une déficience dans le rendement de production d'électrons pour le PSII. Ce dernier subit alors des dommages dus à l'absorption des photons par les pigments photosynthétiques qui oxydent alors les centres réactionnels (principalement la protéine D1) du PSII le rendant inactif (Ohnishi *et al.*, 2005). La principale cause de dommages provoqués par la lumière provient des radiations UV-B, bien que l'excès de lumière visible puisse entraîner un stress oxydatif (Takahashi *et al.*, 2010).

- **Stress oxydatif induit par la lumière visible**

Même si la photosynthèse est essentielle, le processus d'absorption de la lumière génère la formation d'AOS ($^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2) (Oelze *et al.*, 2008). Par ailleurs, sous l'influence d'une forte lumière, le flux d'électrons passant à travers la chaîne photosynthétique sature le passage d'électrons via la ferrédoxine vers des réductases. Ces électrons vont donc réduire les plastoquinones et les complexes cytochromes b (Oelze *et al.*, 2008). Ainsi, un jour de forte intensité lumineuse, les plantes sont soumises à un stress oxydatif constant. Plus de détails sur les conséquences du stress oxydatif ont été donnés au chapitre 3.1.4.

- **Implications des UV-B**

Les UV-B sont caractérisés par leur faible longueur d'onde. Bien qu'une grande partie de ces radiations soit bloquée par l'atmosphère (Madronich *et al.*, 1998), certaines atteignent le sol et la canopée et peuvent occasionner de sévères dommages au niveau des tissus, de l'ADN ou de diverses macromolécules entraînant ainsi un ralentissement marqué du développement végétal (Frohnmeier and Staiger, 2003).

Plusieurs études ont montré que les UV-B peuvent affecter trois processus importants de la photosynthèse :

- (1) La réaction de photophosphorylation
- (2) Les réactions de fixation du CO₂
- (3) Le contrôle stomatal d'approvisionnement en CO₂

Des études utilisant des filtres ont comparé les effets d'une exposition à des taux naturels de ces radiations face aux effets d'une dose réduite de ces radiations. Ces résultats indiquent que les UV-B inhibent la photosynthèse (Krause *et al.*, 1999; Xiong and Day, 2001; Albert *et al.*, 2005). D'autres études montrent que la diminution de l'accumulation de biomasse observée en réponse à la forte exposition aux UV-B est principalement due à la réduction de la surface foliaire et ne résulte pas des dommages subis au niveau de la chaîne photosynthétique (Sullivan *et al.*, 1994; Teramura and Sullivan, 1994; Xiong and Day, 2001). Plusieurs cibles moléculaires de ces radiations ont été identifiées (Kramer *et al.*, 1991 ; Greenberg, 1997). Le Photosystème I (PSI) apparaît comme relativement plus résistant que le PSII à l'exposition UV (Tevini, 2000). Les UV-B endommagent principalement les complexes autour du PSII (ex: OEC), entraînent une photoinhibition et endommagent les centres réactionnels du PSII (Murata *et al.*, 2007). Toutefois, Baker *et al.* (1997) ont montré que ces effets négatifs n'apparaissent qu'après inhibition de l'assimilation de CO₂. Ils ont ainsi émis l'hypothèse que l'impact négatif des UV-B sur la photosynthèse ne s'exerce pas via le PSII, mais suite aux dommages causés sur un éventail d'enzymes chloroplastiques solubles.

L'impact des UV-B sur la croissance reste obscur. En effet, plusieurs études portant sur l'absence ciblée d'UV-B dans le spectre lumineux montrent que les réponses des plantes varient énormément en fonction de l'espèce. Chez certaines espèces (ex : Concombre, Laitue...), la croissance est inhibée par les UV-B (Adamse *et al.*, 1997; Krizek *et al.*, 1997; Pal *et al.*, 1997; Krizek *et al.*, 1998). Dans d'autres espèces (ex : Tomate...), la croissance est

favorisée (Krizek *et al.*, 1997; Cybulski III and Peterjohn, 1999) alors que chez d'autres (ex : Coton, Avoine...), il n'y a pas d'effet (Adamse *et al.*, 1997; Krizek *et al.*, 1997).

- **Dégradation des acides nucléiques par les radiations UV ou les AOS**

Les radiations UV ou les AOS peuvent endommager les acides nucléiques. Plusieurs types de dommages peuvent survenir, de la dissociation des brins à des liaisons croisées en passant par des modifications de nucléotides. Chez les plantes, l'exposition aux UV-B entraîne principalement la formation de dimères de cyclobutane pyrimidine (CPD) et dans une moindre mesure de dimères de pyrimidine pyrimidinone (Britt, 2004). Ces formes d'ADN endommagé peuvent être réparées par des ADN photolyases soit en présence d'UV-A (lumière bleue) (phénomène de photoréactivation) soit dans des processus rayonnement-indépendant (Britt, 2004). Chez la levure et les mammifères, les UV-B et les UV-C activent des voies de signalisation qui aboutissent à l'arrêt du cycle cellulaire et stimulent la réparation de l'ADN (Sancar *et al.*, 2004). La présence de plusieurs composants de ces voies de signalisation chez les plantes suggère la conservation de ces mécanismes. Par exemple, chez *Arabidopsis*, des orthologues de protéines kinases (Ataxia Telangiectasia Mutated et Ataxia Telangiectasia Rad-3-related protéines kinases) peuvent repérer des dissociations de doubles brins d'ADN ou bien des brins seuls (Garcia *et al.*, 2003; Culligan *et al.*, 2004, 2006). De plus, des corrélations ont été observées entre la formation de CPD et la réponse aux UV-B (Kucera *et al.*, 2003; Giordano *et al.*, 2004).

3.2.2. Réponses adaptatives des plantes face au stress rayonnement

- **Mécanismes d'évitement de l'exposition directe à la lumière**

Certaines plantes modifient leur angle foliaire, évitant ainsi un contact direct avec la lumière. Ce phénomène, appelé héliotropisme (Kao and Forseth, 1992), permet de minimiser l'absorption des radiations solaires et d'éviter une absorption excessive d'énergie lumineuse (Figure 11). Un autre mécanisme d'évitement développé par les plantes est la migration des chloroplastes au niveau cellulaire. Ces organites sont capables de se rassembler le long des membranes cellulaires selon un plan parallèle à la direction du flux lumineux (Tholen *et al.*, 2008). Les photorécepteurs intervenant dans l'initiation de ce mouvement chloroplastique, identifiés chez *Arabidopsis*, sont les phototropines 1 (PHOT1) et 2 (PHOT2) (Jarillo *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2001; Kasahara *et al.*, 2002).

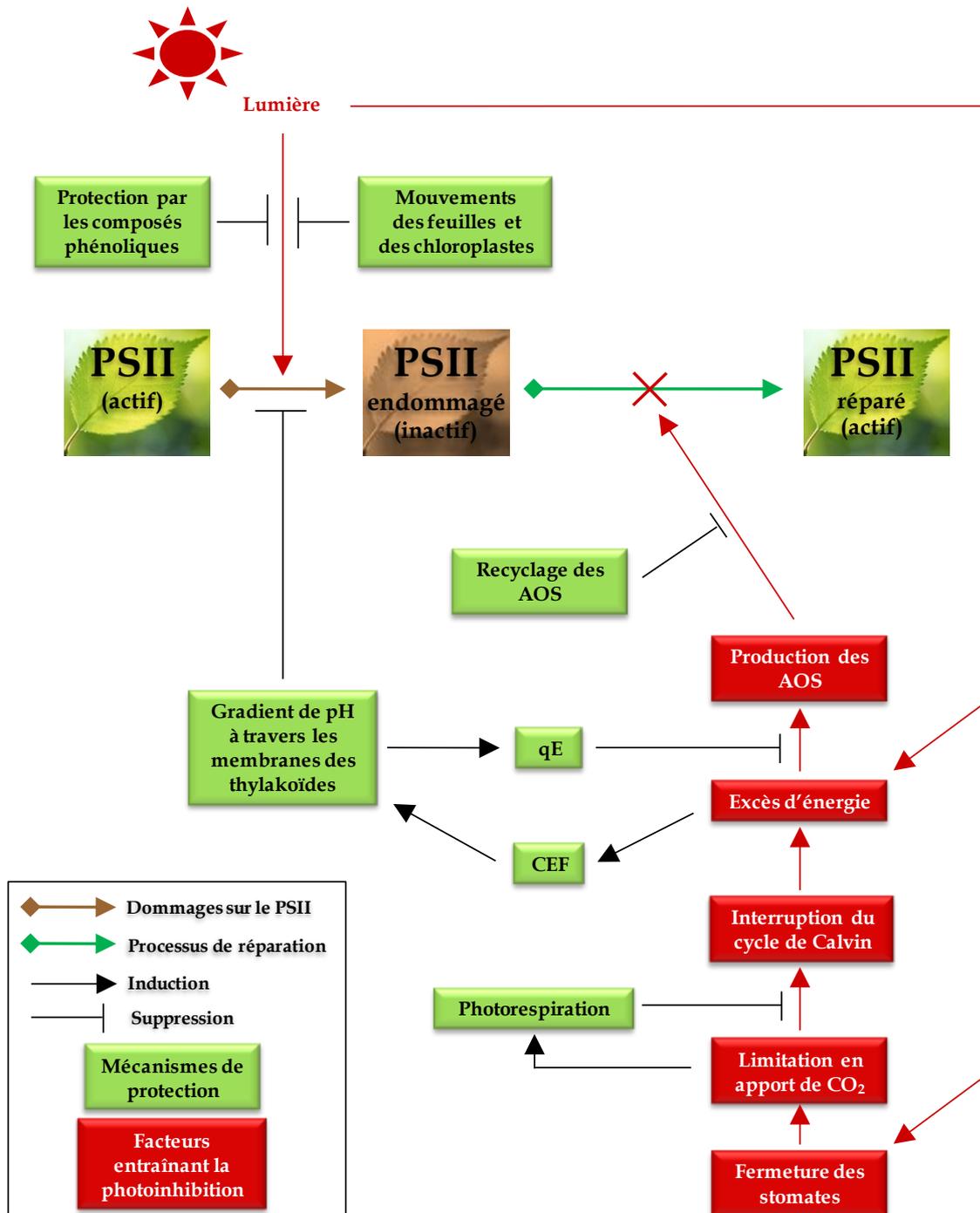


Figure 11. Modèle représentant les mécanismes de protection limitant la photoinhibition dans les feuilles (modifié d'après Takahashi et Badger, 2011).

PSII, Photosystème II ; AOS, Active oxygen species ; qE, dissipation thermique ; CEF, Cyclic electron flow

- **Dissipation de l'énergie lumineuse par conversion en énergie thermique**

Les plantes peuvent dissiper une absorption excessive d'énergie lumineuse par les LHC. Ce mécanisme (nommé qE dans la figure 11), qui fait intervenir l'énergie thermique comme moyen de dissipation (Ahn *et al.*, 2008), mobilise le cycle des xanthophylles (voir chapitre 3.1.3) et la sous unité PsbS du PSII (Baroli and Niyogi, 2000). Il intervient pour limiter l'inhibition des mécanismes de réparation du PSII, précisément pour la synthèse de la protéine D1 (Takahashi *et al.*, 2009).

- **Rôle du flux cyclique d'électrons**

Le flux cyclique d'électrons (CEF) est une réaction moléculaire se réalisant à proximité du PSI. Le fonctionnement exact du CEF est encore obscur, mais des approches génétiques ont démontré l'implication de la ferrédoxine et de la NADPH deshydrogénase (Shikanai, 2007). Le CEF génère à travers la membrane des thylakoïdes un gradient de pH indispensable à l'activation du qE. Il intervient donc dans la limitation de l'inhibition des mécanismes de réparation du PSII. De plus, il joue également un rôle dans la prévention de dommages directement infligés au PSII (Takahashi *et al.*, 2009) (Figure 11).

- **Le mécanisme de photorespiration**

La photorespiration est un mécanisme intervenant lorsque l'apport de CO₂ à la plante devient limité. En effet, les UV-B pouvant provoquer la fermeture des stomates, la limitation en CO₂ peut entraîner l'interruption du cycle de Calvin et donc accélérer la génération d'AOS. Dans ces conditions, la RuBisCO utilise de l'O₂ et entraîne la production de CO₂, relançant ainsi le fonctionnement du cycle de Calvin (pour revue, Bauwe *et al.*, 2010).

- **Implications des composés phénoliques**

Les composés phénoliques possèdent une structure de base comprenant un noyau aromatique avec un groupement hydroxyle, ce qui leur confère une capacité d'absorption des UV-B. L'augmentation de la concentration foliaire en certains composés phénoliques (flavonols, anthocyanes, acides phénoliques) quand l'exposition aux UV-B augmente est l'une des réponses les plus conservées chez les plantes (Searles *et al.*, 2001; Caldwell *et al.*, 2007). Il est bien établi que ces molécules apportent une protection à la plante contre les radiations UV. Ainsi une forte concentration de ces composés permet de protéger l'ADN (Stapleton and Walbot, 1994; Fujibe *et al.*, 2004) et le PSII contre les UV-B (Tevini *et al.*, 1991; Rao and

Ormrod, 1995; Fujibe *et al.*, 2004). Par exemple, chez des variétés de Soja présentant une forte concentration en composés phénoliques, l'ADN est moins endommagé et la biomasse moins réduite après exposition aux UV-B (D'Surney *et al.*, 1993; Mazza *et al.*, 2000). Inversement, des mutants affectés dans leur capacité à synthétiser des composés phénoliques montrent une plus grande sensibilité aux UV-B que les plantes sauvages (Landry *et al.*, 1995; Rao and Ormrod, 1995; Booij-James *et al.*, 2000). A l'opposé, des mutants possédant une quantité élevée de composés phénoliques possèdent une tolérance importante aux UV-B par rapport à leur homologue sauvage (Jin *et al.*, 2000; Bieza and Lois, 2001). Ces métabolites absorbent plus efficacement dans la région spectrale des UV-B et sont principalement localisés dans les vacuoles des assises épidermiques des feuilles (Markstädter *et al.*, 2001). De nombreuses études montrent une corrélation négative forte entre concentrations en composés phénoliques solubles et capacité de transmission de ces radiations à travers la couche épidermique (Barnes *et al.*, 2000; Burchard *et al.*, 2000; Mazza *et al.*, 2000; Bieza and Lois, 2001; Bilger *et al.*, 2001; Markstädter *et al.*, 2001). Par conséquent, ces métabolites sont souvent décrits comme conférant une protection contre le rayonnement solaire aux composés présents dans le mésophylle. Néanmoins plusieurs études démontrent la complexité de la relation entre leur concentration et la transmission épidermique (Day and Neale, 2002; Sullivan *et al.*, 2003; Kolb and Pfundel, 2005). Ces composés permettent donc d'éviter une exposition directe aux radiations UV qui endommageraient l'ADN, les ARNs ou les protéines. Récemment, des approches globales portant sur le protéome et le métabolome dans les feuilles de Maïs et de Riz ont montré que les UV-B entraînent l'accumulation de flavonoïdes, suggérant également leur implication dans la protection contre ces radiations (Casati *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2011).

Certains composés phénoliques comme les anthocyanes possèdent un autre pic d'absorption dans le domaine visible du spectre lumineux (450-550 nm). Bien que la lumière visible provoque moins de dommages que les UV-B, les radiations visibles sont beaucoup plus abondantes dans le spectre solaire (Takahashi *et al.*, 2010). L'absorption dans ces longueurs d'onde jouerait donc également un rôle dans la protection du photosystème II.

3.3. Impacts des stress abiotiques sur les baies de raisin

3.3.1. Effets du stress thermique sur la baie de raisin

Les fluctuations de température affectent la synthèse, la dégradation, et la nature des flavonoïdes, et plus particulièrement celle des anthocyanes, et semblent être l'une des

variables déterminantes de l'accumulation des flavonoïdes. Les températures élevées inhibent, voire abolissent totalement, la synthèse des anthocyanes, mais ne semblent pas particulièrement affecter celle des flavonols (Spayd *et al.*, 2002). Les températures diurnes (35°C) ou nocturnes (30°C) élevées réduisent l'accumulation des anthocyanes de moitié au moins par rapport aux baies témoins (25°C et 15°C respectivement) (Mori *et al.*, 2005, 2007). Cette réduction semble être associée à une modification de la nature des anthocyanes extractibles. En effet, les températures élevées induisent une production de dérivés coumaroylés d'anthocyanes (Downey *et al.*, 2006). Seule la malvidine-3-glucoside ne semble pas affectée par les hautes températures mais celles-ci entraînent néanmoins une augmentation des formes acylées et coumaroylées de l'anthocyanidine (Tarara *et al.*, 2008). Les tanins condensés présents dans les graines sont peu affectés par le stress thermique à la différence des tannins présents dans la pellicule. Ces derniers voient leur teneur et leur degré de polymérisation augmentés à mesure que la température s'élève (Cohen *et al.*, 2008).

L'expression de la *PAL* est induite par la haute température et l'activité enzymatique de la protéine correspondante augmente sous l'effet de la chaleur (Wen *et al.*, 2008). Ces mêmes auteurs suggèrent que l'expression de la *PAL* serait régulée par l'acide salicylique (Wen *et al.*, 2005). Cette hormone est impliquée dans la tolérance au stress thermique dans plusieurs espèces (Dat, Foyer, *et al.*, 1998; Larkindale and Knight, 2002; Larkindale and Huang, 2004). L'expression des gènes codant les enzymes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (CHS3, F3H2, DFR, ANS), ainsi que leur activité enzymatique (UFGT), de même que l'expression des gènes régulateurs, sont différemment affectées par le stress thermique selon les cépages, et selon que ces températures élevées soient diurnes ou nocturnes (Mori *et al.*, 2005, 2007). Par ailleurs, des expériences de marquage au ¹³C montrent qu'en plus de l'inhibition de leur synthèse, les anthocyanes sont fortement dégradés en conditions de température élevée. Les pigments montrent des sensibilités différentes à ce stress thermique (Mori *et al.*, 2007). Par exemple, on peut noter une plus grande stabilité des dérivés de la malvidine lorsqu'ils sont fortement méthylés.

3.3.2. Effets du stress rayonnement sur les baies de raisin

La lumière visible, les UV-A ou encore les UV-B influencent fortement l'expression des gènes structuraux et régulateurs de la voie des flavonoïdes chez *Arabidopsis* ou chez la pomme (*Malus domestica*), même si la synthèse de ces molécules peut avoir lieu à l'obscurité (Cominelli *et al.*, 2008; Rowan *et al.*, 2009). Chez la vigne, l'impact de la lumière sur la

composition en flavonoïdes des baies est variable en fonction des cépages. Dans les baies de Cabernet Sauvignon et de Merlot soumises à l'ombrage à partir de 2 semaines après la véraison, la quantité de quercétine (flavonol) est réduite de plus de moitié au stade récolte. Cette diminution est corrélée avec l'expression de *VvFLS4*, qui est nettement réduite voire totalement éteinte dans les baies ombragées (Spayd *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2006; Matus *et al.*, 2009). De même, l'ombrage des baies de Cabernet Sauvignon pendant la phase de véraison diminue la teneur en anthocyanes de la pellicule. La chute de la concentration en anthocyanes est corrélée avec la très forte baisse de l'expression de la plupart des gènes codant les enzymes de cette voie de biosynthèse, tels que *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS* ou encore *UFGT* (Jeong, 2004; Joscelyne *et al.*, 2007; Matus *et al.*, 2009). L'ombrage entraîne en outre une modification de la nature des anthocyanes accumulées, les molécules trihydroxylées (dérivées de la delphinidine, de la pétunidine et de la malvidine) devenant prédominantes (Spayd *et al.*, 2002; Downey *et al.*, 2006). Dans d'autres études, il a été montré que l'augmentation de l'intensité lumineuse sur les grappes provoquée par la pratique de l'effeuillage peut causer des dommages physiques aux baies ainsi qu'une réduction de la teneur en anthocyanes (Jeong, 2004; Chorti *et al.*, 2010). Dans les feuilles du cultivar Malbec, les radiations UV-B entraînent l'induction de l'expression de gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, comme la *PAL*, la *C4H* et la *4CL* ainsi que l'accumulation d'anthocyanes et de flavonols (Berli *et al.*, 2010; Pontin *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que, chez la laitue, les radiations UV pouvaient avoir un impact bénéfique sur la concentration en anthocyanes par la stimulation de l'expression de certains gènes de la voie de biosynthèse des anthocyanes (Parker *et al.*, 2007). Néanmoins aucune étude à ce jour n'a montré une telle relation dans les baies de raisin. L'augmentation de l'intensité des radiations visibles et/ou des UV-A (naturellement positivement corrélées) entraîne une accumulation d'anthocyanes dans les grappes du cultivar Gros Colman (Kataoka *et al.*, 2003).

Les vins produits à partir de baies ombragées de Cabernet Sauvignon ou de Shiraz contiennent 60% de composés phénoliques en moins que les baies témoins, la quantité de tannins et d'anthocyanes étant divisée par deux. De plus, la maturation est retardée par l'ombrage précoce des baies. Par conséquent, ces baies montrent une accumulation de sucres plus faible que chez les baies exposées à la lumière, aboutissant à la formation de vins avec un degré d'alcool moindre (Joscelyne *et al.*, 2007). A l'opposé, les vins produits à partir de baies exposées à une lumière plus intense ne présentent qu'une très légère augmentation de la quantité totale de composés phénoliques par rapport aux vins témoins. En effet, une lumière

intense obtenue par effeuillage s'accompagne d'un réchauffement très prononcé des baies, la conséquence étant une diminution de la synthèse des anthocyanes et probablement de leur dégradation (Pereira *et al.*, 2006; Joscelyne *et al.*, 2007; Mori *et al.*, 2007).

4. Une famille de composés intervenant dans la réponse aux stress abiotiques : les oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs)

4.1. Présentation

Les oligosaccharides de la famille du raffinose sont des hydrates de carbone solubles ubiquitaires dans le règne végétal. Ils sont connus pour s'accumuler sous l'influence de stress abiotiques avant d'être catabolisés une fois le stress terminé (Bachmann *et al.*, 1994; Peterbauer and Richter, 2001; Taji *et al.*, 2002; Nishizawa *et al.*, 2008). Les formes les plus communes de RFOs sont le raffinose, le stachyose, le verbascose et l'ajugose qui sont respectivement des tri-, tetra-, penta- et hexasaccharides. Les dicotylédones accumulent principalement du stachyose et de verbascose alors que le raffinose est le RFO majeur des monocotylédones (Peterbauer and Richter, 2001). Le galactinol est le précurseur de la voie de biosynthèse des RFOs. Il sert de donneur de groupement galactosyl dans la formation des RFOs selon le schéma présenté en figure 12. Récemment, une étude a suggéré que le galactinol pouvait également agir comme molécule de signalisation impliquée dans la mise en place de la résistance systémique induite chez le concombre (Kim *et al.*, 2008).

Les RFOs sont des oligosaccharides non réduits constitués d'unités galactose (Gal) lié à du saccharose par une liaison glycosidée α -(1→6). Le raffinose (ou O- α -D-galactopyranosyl-(1→6)- α -D-glucopyranosyl-(1←→2)- β -D-fructofuranoside) a été le premier de ces composés à être détecté et ce, dans la betterave sucrière, (Loiseau, 1876). Le second membre, le stachyose a été isolé de *Stachys sieboldii* (Planta and Schultze, 1890) et le troisième membre, le verbascose a été isolé des racines de *Verbascum thapsus* (Bourquelot and Bridel, 1910). L'ajugose, moins courant, a quant à lui été isolé des racines de *Ajuga nipponensis* et intervient principalement dans les organes de stockage comme les graines de dicotylédones (Kotiguda *et al.*, 2006) mais également dans les racines, les rhizomes, les tubercules et les feuilles (Dey, 1990; Bachmann *et al.*, 1994).

Il existe des RFOs à plus longues chaînes carbonées mais peu de choses sont connues actuellement sur ces métabolites. Quelques études sur des *Laminaceae* comme *Ajuga reptans*

ont montré que ces RFOs à longues chaînes étaient présent dans les tissus végétatifs (Bachmann *et al.*, 1994; Bachmann and Keller, 1995).

4.2. La voie de biosynthèse des RFOs

La voie de biosynthèse des RFOs a été bien établie. La synthèse de galactinol est catalysée par l'UDP-*D*- α -galactose:*myo*-inositol-1- α -*D*-galactosyltransferase également appelé galactinol synthase (GOLS) (Keller and Pharr, 1996; Taji *et al.*, 2002). La GOLS utilise comme substrat l'UDP galactose et le *myo*-inositol pour former du galactinol (Loewus and Murthy, 2000) (Figure 12). La seconde étape est la synthèse de raffinose par la galactinol:saccharose-6-galactosyltransferase également appelée la raffinose synthase (RAF) (Lehle and Tanner, 1973). Cette étape consiste au transfert du groupement galactosyl du galactinol vers le groupement glucose d'une molécule de saccharose. La troisième étape aboutissant à la synthèse du stachyose fait intervenir la Galactinol:Raffinose-6-galactosyltransferase ou stachyose synthase (STS) (Tanner and Kandler, 1968; Peterbauer, Mucha, *et al.*, 2002). Cette réaction catalyse le transfert du groupement galactosyl du galactinol vers le groupement galactosyl du raffinose (Figure 12).

4.2.1. La galactinol synthase (GOLS)

La GOLS catalyse la formation de galactinol à partir d'UDP-galactose et de *myo*-inositol. L'enzyme est localisée dans le cytoplasme tout comme la RAF et la STS (Bachmann and Keller, 1995; Peterbauer, Mach, *et al.*, 2002). La réaction enzymatique a été détectée pour la première fois dans des extraits de graines de pois (Frydman and Neufeld, 1963) et depuis son activité a été reportée dans les graines et les parties végétatives de nombreuses espèces (Keller, 1992a; Liu *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 2000; Taji *et al.*, 2002). La GOLS est un polypeptide monomérique de 38 à 43 kDa et son activité enzymatique requiert un ion Mn^{2+} . Son pH optimum d'activité oscille entre 5,6 et 7,5 et dépend de la concentration en Mn^{2+} et du tissu considéré (Frydman and Neufeld, 1963). Un motif de liaison au manganèse (DXD) est conservé dans la plupart des galactosyl transférases et celui-ci est également présent dans toutes les GOLS (Busch *et al.*, 1998).

Différentes isoformes ont été isolées dans diverses espèces végétales. Chez *Ajuga reptans*, des galactinol synthase (*ArGOLS-1* et *ArGOLS-2*) sont induites par le froid (Tableau 1). Les séquences nucléotidiques et protéiques d'*ArGOLS-1* et *ArGOLS-2* partagent 70% de similarités et possèdent un site de phosphorylation et un pentapeptide hydrophobe dans la partie carboxy terminal (Sprenger and Keller, 2000). L'isoforme 1 serait responsable de la

Introduction

biosynthèse de RFOs impliqués dans le stockage du carbone dans les cellules du mésophylle.

L'isoforme 2 jouerait un rôle dans la biosynthèse des RFOs intervenant dans le transport du

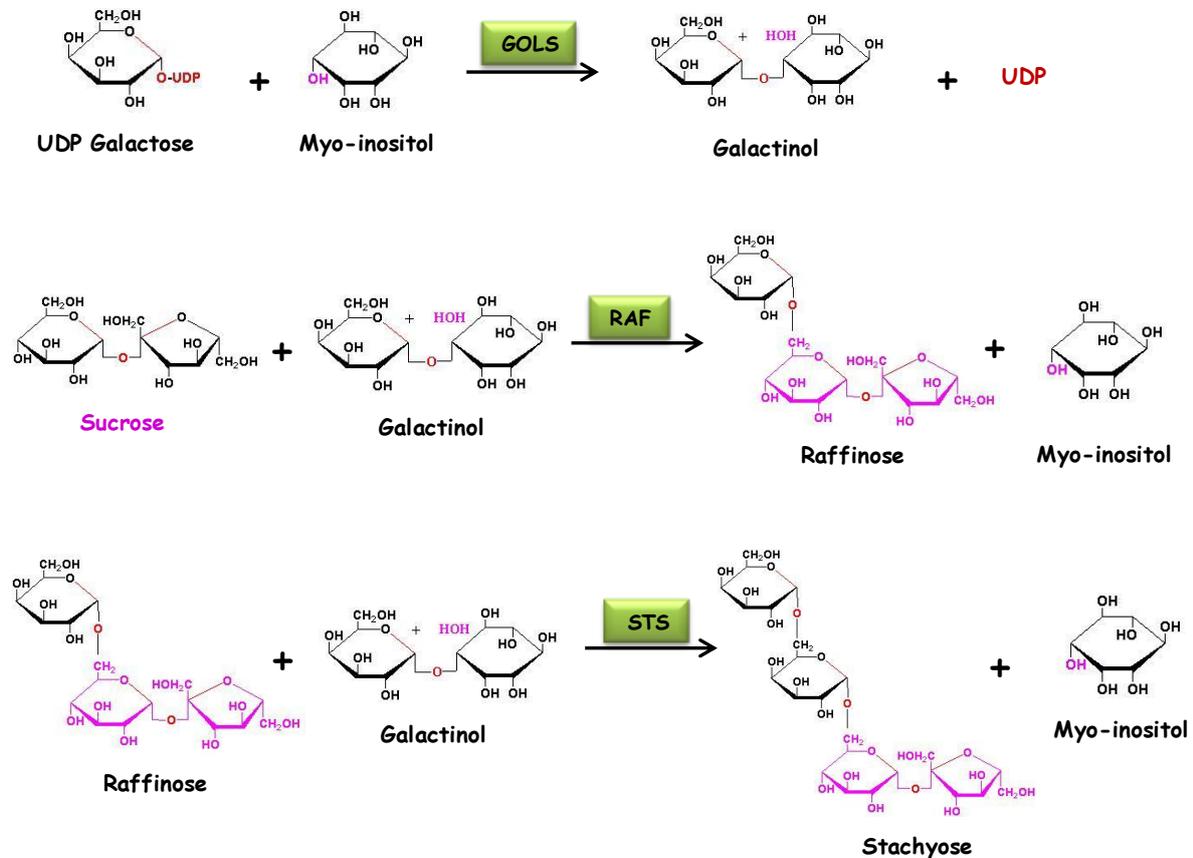


Figure 12. Structure et voie de biosynthèse des premiers membres de la classe des oligosaccharides de la famille du raffinose (d'après Taji *et al.*, 2002).

UDP, Uracyle diphosphate ; GOLS, Galactinol synthase ; RAF, Raffinose synthase ; STS, Stachyose synthase.

carbone dans les cellules compagnes du phloème. L'activité d'ArGOLS-1 est supérieure à celle d'ArGOLS-2 (Sprengr and Keller, 2000).

Sept gènes codant des galactinol synthases ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Taji *et al.*, 2002) et trois de ces gènes (*AtGOLS1*, *AtGOLS2* et *AtGOLS3*) sont inductibles par différents types de stress abiotique : oxydatif, hydrique et/ou température (Panikulangara *et al.*, 2004; Kaplan *et al.*, 2004; Nishizawa *et al.*, 2008). De manière intéressante, des HSFs régulent l'expression de *AtGOLS1* et *AtGOLS2* (Panikulangara *et al.*, 2004; Busch *et al.*, 2005; Schramm *et al.*, 2006). Des plantes surexprimant *AtGOLS2* ont montré une accumulation de galactinol et de raffinose endogènes en absence de stress. Ces résultats suggèrent que les *GOLS* inductibles par le stress joueraient un rôle dans l'accumulation de galactinol et de raffinose en réponse à une déshydratation (Taji *et al.*, 2002).

Espèce	Isoforme	Implications	Tissus	Accumulation des RFOs	References
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtGOLS1	H, S, C, O	feuille, graine	Galactinol (H, S, C, F, O), Raffinose (H, S, C, F, O)	Taji et al., 2002; Panikulangara et al., 2004; Nishizawa et al., 2008
	AtGOLS2	H, S, C, O	feuille, graine		Taji et al., 2002; Panikulangara et al., 2004; Nishizawa et al., 2008
	AtGOLS3	F, O	feuille, partie aérienne		Taji et al., 2002; Kaplan et al., 2007; Nishizawa et al., 2008
	AtGOLS4	O	feuille		Nishizawa et al., 2008
<i>Zea mays</i>	AtGOLS8	O	feuille	RAS	Nishizawa et al., 2008
	ZmGOLS1	D	graine		Zhao et al., 2004
	ZmGOLS2	H, C	graine		Zhao et al., 2003; Zhao et al., 2004
<i>Coffea arabica</i>	ZmGOLS3	H, D	épi, graine	Raffinose (C, S), Stachyose (C)	Zhao et al., 2004; Zhuang et al., 2007
	CaGOLS1	H, S, C	feuille		dos Santos et al., 2011
	CaGOLS2	H, S	endosperme, feuille		dos Santos et al., 2011
<i>Ajuga reptans</i>	CaGOLS3	H, S, C	fleur, racine		dos Santos et al., 2011
	ArgOLS-1	F	feuille adulte (source)	Stachyose (F), Verbascose (F), Ajugose (F)	Bachmann et al., 1994; Sprenger et Keller, 2000
	ArgOLS-2	F	jeune feuille (puit)		Bachmann et al., 1994; Sprenger et Keller, 2000
<i>Oryza sativa</i>	OsgOLS(wsi76)	H, F	feuille	Galactinol (F), Raffinose (F)	Takahashi et al., 1994; Liu et al., 1998; Saito et Yoshida, 2011
	OsgOLS1	F	feuille		Saito et Yoshida, 2011
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LeGOLS1	H, F, C	graine, feuille	ND	Downie et al., 2003
	XvGOLS	H	feuille	Raffinose (H), Stachyose (H), Verbascose (H)	Peters et al., 2007
<i>Xerophyta viscosa</i>	MsgOLS	F	racine, parties aériennes	Raffinose (F), Stachyose (F)	Cunningham et al., 2003
	BhGOLS1	H, F, C	feuille, racine	RAS	Wang et al., 2009
<i>Boea hygrometrica</i>	CjGOLS	P	plante entière	ND	Takanashi et al., 2008
	CsGOLS1	H, S, P	graine	Galactinol (P)	Kim et al., 2008
<i>Phaseolus vulgaris</i>	GOLS (AE)	F	graine	ND	Liu et al., 1998
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtRAF2	O	Feuilles	Galactinol, Raffinose	Nishizawa et al., 2008
	AtRAF5	F	Partie aérienne	Galactinol, Raffinose	Kaplan et al., 2007
<i>Zea mays</i>	RAF putative (x2)	H	Epi	ND	Zhuang et al., 2007
	RAF putative (x4)	F	Feuille	Galactinol, Raffinose	Saito et Yoshida, 2011

Tableau 1. Récapitulatif des galactinol synthases et des raffinose synthases impliquées dans la réponse à un stress et de l'accumulation de RFOs correspondants.

H, stress hydrique ; **S**, stress salin ; **C**, stress chaleur ; **F**, stress froid ; **O**, stress oxydatif ; **P**, stress biotique (pathogène) ; **D**, développement ; **AE**, activité enzymatique ; **RAS**, pas de modification notable ; **ND**, non déterminé ; **GOLS**, Galactinol synthase ; **RAF**, Raffinose synthase

Des *GOLS* réagissant aux stress abiotiques ont été identifiés dans plusieurs autres espèces qui sont récapitulées dans le tableau 1 mais cette liste n'est pas exhaustive car il existe d'autres *GOLS* identifiées chez certaines espèces intervenant dans d'autres processus comme la dessiccation de la graine (Li *et al.*, 2011). On peut citer parmi ces *GOLS*, par exemple, *PsGOLS1* identifiée à partir de graines de *Pisum sativum* et qui est induite au cours du développement de la graine (Peterbauer *et al.*, 2001).

4.2.2. La raffinose synthase (RAF)

La raffinose synthase (RAF) est l'enzyme clé d'entrée dans la voie de biosynthèse des RFOs. Cette enzyme catalyse le transfert du groupement galactosyl du galactinol sur une molécule de saccharose pour former le raffinose, le premier membre de la famille des RFOs.

La RAF a été purifiée des graines de *Vicia faba* (Lehle and Tanner, 1973) et de feuilles d'*Ajuga reptans* (Bachmann *et al.*, 1994). L'optimum d'activité catalytique a été obtenu à pH 7.0 et à 45°C (Lehle and Tanner, 1973; Peterbauer, Mach, *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007). La RAF peut utiliser le galactinol, le galactosyl ononitol (un dérivé méthylé du galactinol) ou bien le p-nitrophenyl α -D-galactopyranoside comme donneur de groupement galactosyl pour la synthèse de raffinose, et utiliser le saccharose, le D-ononitol ou le D-pinitol comme accepteurs. De plus, cette enzyme peut catalyser l'échange du galactinol entre le raffinose et le saccharose (Lehle and Tanner, 1973). Au niveau de leurs séquences peptidiques, les RAFs possèdent des homologies avec les stachyose synthases (Peterbauer *et al.*, 1999; Peterbauer, Mach, *et al.*, 2002) ainsi qu'avec une classe non caractérisée de SIPs (Seed Imbibition Proteins; Anderson and Kohorn, 2001; Romo *et al.*, 2001). Au niveau structurel, les RAF possèdent des similarités avec les α -D-galactosidases (α GALS). Leur inhibition par un inhibiteur spécifique des α GALS suggère une possible activité hydrolase (Peterbauer, Mach, *et al.*, 2002). La localisation subcellulaire des RAFs est probablement dans le cytosol (Keller and Pharr, 1996; Schneider and Keller, 2009).

Chez *Arabidopsis*, six gènes ont été annotés comme codant des RAFs mais aucune caractérisation fonctionnelle n'a encore été réalisée (Nishizawa *et al.*, 2008). Chez le Maïs, deux *RAF*s putatives ont été identifiées dans l'épi. Dans cette étude, ces *RAF*s sont induites par le stress hydrique (Zhuang *et al.*, 2007). De même, chez le riz, quatre *RAF*s putatives ont été annotées dans un contexte de stress «froid» (Saito and Yoshida, 2011).

4.2.3. La stachyose synthase (STS)

Le stachyose est le carbohydrate soluble majeur dans les graines de nombreuses espèces cultivées (Peterbauer *et al.*, 1999). Ce métabolite est produit par la stachyose synthase (STS) qui catalyse le transfert du groupement galactosyl du galactinol vers le raffinose (Keller and Pharr, 1996). La STS a été isolée pour la première fois et caractérisée à partir de graines de haricots rouges (Tanner and Kandler, 1968). Dans les feuilles d'*Ajuga reptans*, la STS a été localisée dans le cytosol (Bachmann and Keller, 1995). Dans les cellules du mésophylle, le stachyose pourrait être transporté dans la vacuole pour y être stocké ou pour participer à la synthèse des RFOs à longue chaîne. Le stachyose est également synthétisé dans les cellules intermédiaires du phloème où il pourrait être utilisé comme transporteur de carbone (Bachmann and Keller, 1995).

Les STS purifiées à partir de différents types de graines (haricots rouges, lentille...) ont montré des propriétés physico-chimiques similaires aux RAFs (Tanner and Kandler, 1968; Peterbauer and Richter, 1998; Hoch *et al.*, 1999) avec par exemple un pH optimum entre 6.5 et 7.0. La température optimum pour son activité enzymatique est de l'ordre de 35°C. En plus de la formation de stachyose, l'enzyme est capable de synthétiser des galactocyclitols comme le galactopinitol, le ciceritol ou bien le galactosylononitol à partir respectivement de D-pinitol, de galactopinitol A et de D-ononitol (Hoch *et al.*, 1999). Le galactosylononitol peut également servir de substitut au galactinol pour la synthèse de stachyose, indiquant ainsi que la STS est une enzyme multi-substrats qui pourrait intervenir dans la redistribution de groupement galacosyl à partir de différents carbohydrates (Peterbauer and Richter, 1998).

4.2.4. La synthèse des RFOs à longue chaîne

La biosynthèse des RFOs à longue chaîne (verbascose, ajugose...) s'effectue dans les vacuoles et peut être catalysée selon deux voies :

- (1) Une voie galactinol-dépendante. Peu d'informations sont disponibles pour cette voie. Le transfert du groupement galactosyl du galactinol vers le stachyose pour produire du verbascose semble pouvoir être catalysé par une STS bifonctionnelle ou par une verbascose synthase très proche de la STS (Tanner *et al.*, 1967; Peterbauer, Mach, *et al.*, 2002).
- (2) Une voie galactinol-indépendante. Dans cette voie, la synthèse des RFOs à longue chaîne est catalysée par une galactan-galactan galactosyl transférase (GGT) (Bachmann *et al.*, 1994; Bachmann and Keller, 1995; Obendorf *et al.*, 2009). La GGT

est une glycoprotéine qui catalyse le transfert du groupement galactosyl terminal du stachyose vers une seconde molécule de stachyose permettant ainsi la synthèse de verbascose et de raffinose (Bachmann *et al.*, 1994; Braun and Keller, 2000).

La synthèse de ces RFOs dans les vacuoles nécessite le transport du stachyose synthétisé dans le cytoplasme vers la vacuole via le tonoplaste. La concentration de stachyose étant plus importante dans le cytosol comparée à la vacuole, ce transport intervient donc contre le gradient de concentration. Ce transport impliquerait un système antiport H^+ /sucre similaire au système d'absorption vacuolaire du stachyose chez *Stachys sieboldii* (Keller, 1992b; Greutert and Keller, 1993).

4.3. Rôles physiologiques des RFOs

Les RFOs s'accumulent dans les graines, les tiges, les feuilles, les racines et les tubercules (Avigad and Dey, 1997). La plus grande concentration de RFOs est trouvée dans les graines où les RFOs jouent des rôles importants dans la germination et la tolérance à la dessiccation. Les travaux menés durant cette dernière décennie révèlent également l'implication des RFOs dans la résistance aux stress abiotiques. Le tableau 1 résume les différentes *GOLSs* et *RAFs* identifiées chez diverses espèces ainsi que les stress dans lesquelles elles sont impliquées. En parallèle, les RFOs accumulés sous l'influence de ces stress sont également indiqués.

4.3.1. Rôle dans la germination de la graine

Durant la germination, les graines dépendent de la dégradation du carbone stocké dans les réserves afin d'obtenir de l'énergie. Ces réserves sont principalement sous forme d'amidon, de sucres solubles, d'huiles et de protéines. Les RFOs stockés pourraient également jouer un rôle vital dans les premiers stades de la germination (Downie and Bewley, 2000; Blöchl *et al.*, 2007) et principalement lorsque les réserves stockées sous d'autres formes sont incapables de supporter la demande en énergie (Bewley and Black, 1994). La réduction de la concentration de RFOs durant la germination a été observée dans les graines de pois (Martin-Cabrejas, Maria *et al.*, 2008). Le rôle des RFOs durant la germination est également conforté par des études montrant que l'inhibition de l'activité α GALS à l'aide d'un inhibiteur spécifique entraîne un retard dans la germination (Blöchl *et al.*, 2007). L'effet inhibiteur peut être supprimé par ajout de galactose suggérant ainsi un rôle important du galactose comme molécule de signalisation (Blöchl *et al.*, 2007). Toutefois, il faut noter que plusieurs études rapportent que les RFOs ne sont pas nécessaires au bon déroulement de la germination (Neus *et al.*, 2005; Dierking and Bilyeu, 2009).

4.3.2. Rôle dans la dessiccation de la graine

Les graines résistantes à la dessiccation peuvent survivre dans des conditions telles que la majeure partie de l'eau intracellulaire a disparu. Le processus de résistance à la dessiccation a été attribué à l'accumulation de sucres solubles (Blackman *et al.*, 1991) et à certaines protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant ; Bartels *et al.*, 1988). L'accumulation de RFOs durant la maturation de la graine a suggéré un rôle d'osmoprotectants pour ces sucres ainsi que leur implication dans la longévité de la graine (Horbowicz and Obendorf, 1994; Obendorf, 1997). Le groupement hydroxyle des RFOs peut remplacer la perte d'eau autour des résidus polaires au sein des membranes phospholipidiques et ainsi maintenir l'intégrité des membranes et des protéines durant la dessiccation (Bryant and Wolfe, 1989; Crowe *et al.*, 1998).

4.3.3. Rôles dans la résistance aux stress abiotiques

4.3.3.1. Rôle des RFOs dans la protection contre le stress oxydatif

Le stress oxydatif est souvent une conséquence d'autres types de stress. Il est caractérisé par une concentration excessive en formes actives de l'oxygène (AOS) au niveau cellulaire. Récemment, il a été démontré que les RFOs pouvaient jouer un rôle dans la protection des plantes face au stress oxydatif (Nishizawa *et al.*, 2008). En effet, le stress oxydatif engendré par des changements de conditions environnementales induit l'expression de la plupart des *GOLSs* et des *RAFs* chez *Arabidopsis*. Cette induction entraîne l'augmentation de la concentration en galactinol et en raffinose dans les feuilles. De plus, des plantes surexprimants *AtGOLS1* ou *AtGOLS2* ont révélé un phénotype de résistance au stress oxydatif avec une plus forte teneur en galactinol et en raffinose. (Nishizawa *et al.*, 2006, 2008). Les auteurs ont suggéré que le galactinol et le raffinose pourraient agir en tant que molécules antioxydantes dans les feuilles d'*Arabidopsis*.

4.3.3.2. Rôle des RFOs dans la tolérance au stress froid

Le galactinol et le raffinose s'accumulent dans des plantes d'*Arabidopsis* soumises à de basses températures (Taji *et al.*, 2002). De même, une accumulation de stachyose a été observée dans des graines de *Fagopyrum esculentum* placées à 18°C comparées à des graines placées à 25°C (Horbowicz *et al.*, 1998). *GOLS* est induit en parallèle à l'accumulation de RFOs dans les feuilles d'*Arabidopsis* et d'*Ajuga reptans* (Liu, 1998; Sprenger and Keller, 2000). Chez *Arabidopsis*, le promoteur d'*AtGOLS3* contient deux *CIS* éléments de type DRE (Dehydration

Responsive Element) et deux motifs DRE-like. Ce promoteur est la cible de DREB1A et des plantes transgéniques 35S :DREB1A présentent une accumulation de raffinose en corrélation avec une augmentation de l'expression de *AtGOLS3* (Taji *et al.*, 2002). Suite à une exposition à de basses températures, les feuilles d'*Arabidopsis* présentent une induction d'*AtGOLS3* et d'*AtRS5* précédant de quelques heures une accumulation de galactinol et de raffinose (Kaplan *et al.*, 2007). Une étude sur des lignées transgéniques 35S :DREB2A-CA a montré que ces lignées présentaient une surexpression d'*AtGOLS3* mais que les niveaux de galactinol et de raffinose étaient inchangés. Ces résultats suggèrent que des changements dynamiques dans l'expression des gènes peuvent être nécessaires pour accumuler les métabolites correspondants et que la tolérance au froid des lignées 35S :DREB1A dépend en partie de l'accumulation de RFOs (Maruyama *et al.*, 2009). Récemment, une étude a montré que des feuilles de riz exposées à de basses températures présentaient une forte accumulation en raffinose et une plus légère accumulation de galactinol ainsi qu'une induction de deux *GOLSs* (*OsGOLS1* et *wsi76*) et de quatre *RAFTs* (Saito and Yoshida, 2011). De plus, il a été reporté que le raffinose s'accumulait dans les chloroplastes en réponse au froid (Schneider and Keller, 2009) et qu'il jouait un rôle, chez *Arabidopsis*, dans la stabilisation du PSII durant les cycles de gel et de dégel (Knaupp *et al.*, 2011). Chez la Vigne, une étude menée sur différents génotypes plus ou moins résistants au froid a montré une plus forte accumulation de raffinose dans les feuilles des cultivars résistants au froid lors d'une période d'acclimatation (Grant *et al.*, 2009). Les auteurs suggèrent que l'accumulation de raffinose pourrait intervenir dans les premières étapes d'acclimatation au froid chez la Vigne et coïncider avec le ralentissement de la croissance.

4.3.3.3. Rôle des RFOs dans la tolérance au stress thermique

Chez *Arabidopsis*, il a été montré qu'*AtGOLS1* était régulé au niveau transcriptionnel par AtHSFA1b, un facteur de transcription inductible par la température, et que leurs niveaux d'expression ont montré une forte corrélation avec les concentrations en galactinol et raffinose dans les feuilles (Panikulangara *et al.*, 2004). Un autre HSF nommé AtHSFA2, est un régulateur clé dans l'induction de mécanismes de défense face à différents stress environnementaux (Nishizawa *et al.*, 2006). Chez des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* surexprimants *AtHsfA2*, la transcription d'*AtGOLS1*, *AtGOLS2* et *AtGOLS4* est fortement induite comparé aux plantes sauvages. (Nishizawa *et al.*, 2008). Cependant, l'inhibition de la transcription d'*AtGOLS1* et *AtGOLS2* n'a aucun effet sur le niveau de raffinose ou bien l'activité totale GOLS dans des plantes soumises à un stress thermique. Ces résultats

suggèrent que l'activité GOLS pourrait être compensée par d'autres isoformes de *GOLS* (Panikulangara *et al.*, 2004; Nishizawa *et al.*, 2008). Dans les feuilles de *Coffea arabica*, seule l'isoforme *CaGOLS1* est induite par l'action de la température et cette induction se reflète par l'accumulation de raffinose et de stachyose (dos Santos *et al.*, 2011).

5. La métabolomique chez les plantes

Le métabolome est défini comme l'ensemble des molécules de faibles poids moléculaires (les métabolites primaires et secondaires, les hormones, les molécules signal etc...) présent dans un échantillon biologique donné et la métabolomique consiste en l'étude de ce métabolome (Oliver *et al.*, 1998; Tweeddale *et al.*, 1998). Bien que la métabolomique soit l'analyse globale la plus proche du phénotype, il n'existe, à ce jour, aucun système analytique capable d'analyser l'ensemble du métabolome. En effet, ce métabolome représente un très large panel de composés qui appartiennent à de nombreuses familles de molécules différentes comme les acides aminés, les lipides, les acides organiques, les métabolites secondaires ou bien les nucléotides. Ces composés possèdent des propriétés physico-chimiques variées et peuvent être présents dans des gammes de concentrations extrêmement variables. Selon Weckwerth (2003), on peut rencontrer chez les plantes plus de 200 000 métabolites. Néanmoins la métabolomique reste une approche analytique en pleine expansion et est représentée par deux approches complémentaires : l'empreinte métabolique et le profilage métabolique (Dettmer and Hammock, 2004).

5.1. Empreinte métabolique versus profilage métabolique

L'empreinte métabolique est une approche sans *à priori* consistant à comparer des variables métaboliques dont la teneur varie en réponse à différents traitements. L'un des objectifs est de pouvoir regrouper et hiérarchiser ces variables dans des groupes distincts afin de pouvoir discriminer les traitements entre eux. Les différentes empreintes sont décrites en fonction de leur valeur masse/charge (m/z) et des intensités de l'ion détecté correspondant. Si une étape de séparation a également été effectuée, cette description des empreintes peut alors inclure le temps de rétention. La description de chaque empreinte est ensuite utilisée pour regrouper les différentes variables via l'utilisation d'analyses multivariées de données (ACP, PLS/DA...) (Sumner *et al.*, 2003). Ces empreintes peuvent être détectées en utilisant plusieurs techniques analytiques différentes comme par exemple la résonance magnétique nucléaire (Krishnan *et al.*, 2005), la spectrométrie de masse (Goodacre *et al.*, 2003) ou bien la spectrométrie de

masse à transformée de Fourier (Johnson *et al.*, 2003). Les résultats obtenus par ce genre d'approche peuvent donner un aperçu global des modifications engendrées par un traitement par rapport à un autre au sein des échantillons biologiques. Néanmoins la structure chimique des métabolites détectés demeure inconnue. Et bien que cette méthode permette de classifier les différents traitements, elle ne renseigne pas sur les mécanismes d'action intervenant au sein de ces traitements (Dettmer *et al.*, 2007).

Le profilage métabolique consiste quant à lui à se concentrer uniquement sur une voie métabolique ou une classe de métabolites particulière. Il s'agit là d'une approche avec *à priori* où l'on quantifie la réponse d'un certain nombre de composés supposés d'intérêt pour la problématique posée. On peut, par exemple, se focaliser uniquement sur la quantification de sucres, d'acides gras ou bien d'acides aminés. L'identification de ces métabolites au sein des échantillons biologiques nécessite principalement l'utilisation de standards ou bien de méthodes de fragmentation ou d'identification avancées comme la MS/MS ou bien la RMN. Cette méthode comporte deux limitations majeures :

- (1) La difficulté d'obtention des standards appropriés. En effet, peu de ces standards sont actuellement disponibles en comparaison du grand nombre de métabolites existants chez les plantes.
- (2) Le manque de bases de données de fragmentation MS/MS (aussi appelées bases spectrales) disponibles en libre accès (Scalbert *et al.*, 2009).

Dans le cadre de ce travail de thèse, un des objectifs a été de mieux comprendre les effets des différents stress (chaleur ou rayonnement) sur le métabolisme de la baie de raisin. Pour cela, une étude couplant les deux types d'approches a été envisagée. Il s'agit d'une étude des empreintes métaboliques des pellicules des baies de raisin soumises à deux stress abiotiques différents, tout en se focalisant principalement sur les métabolites secondaires. Il existe de nombreuses méthodes analytiques permettant d'étudier les empreintes métaboliques.

5.2. Méthodes analytiques utilisées en métabolomique

Les principales plateformes analytiques utilisées de nos jours pour la quantification et l'identification de métabolites sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (MS). Au sein de la MS, différentes techniques peuvent être utilisées en faisant varier la méthode d'introduction de l'échantillon (directement, après chromatographie gazeuse ou GC, ou après chromatographie liquide ou LC), la méthode

d'ionisation (électrospray, MALDI, impact électronique) ou bien la méthode de détection (Temps de vol, Transformée de Fourier ou encore Orbitrap). Chacune de ces méthodes possèdent ses avantages et ses inconvénients (Dettmer *et al.*, 2007).

5.2.1. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La RMN du proton a été la méthode analytique prédominante pendant de nombreuses années. Un de ces avantages est sa facilité d'utilisation. En effet, dans de nombreux cas, la préparation de l'échantillon est extrêmement simple et rapide (Kim *et al.*, 2011). Un autre avantage majeur de cette technique est sa capacité à quantifier les différents métabolites. L'intensité du signal détectée étant déterminée seulement par la concentration molaire, la RMN est capable d'obtenir des informations sur les quantités absolues en métabolites. De plus, elle est capable de fournir des informations structurales très précises, avec notamment les propriétés stéréochimiques des molécules détectées (Seger and Sturm, 2007). L'inconvénient principal de la RMN est son manque de sensibilité. Elle est incapable de détecter les métabolites présents en faible quantité dans les échantillons biologiques.

5.2.2. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

La haute résolution de la GC est souvent combinée avec une source d'ionisation basée sur l'impact électronique (EI) et une MS de type temps de vol ou quadripôle (Fiehn *et al.*, 2000; Roessner *et al.*, 2001). Il s'agit de la technique analytique la plus développée pour le profilage des métabolites chez les plantes. En utilisant la GC-MS, plusieurs centaines de composés appartenant à de nombreuses classes chimiques différentes peuvent être détectés (sucres, acides organiques, acides aminés ou bien acides gras) (Shulaev *et al.*, 2008). De plus, l'un des avantages indéniables de cette méthode est la disponibilité publique ou commerciale de nombreuses banques spectrales, indispensables pour l'identification des métabolites (Halket *et al.*, 2005). L'inconvénient majeur provient de sa limitation dans le nombre de catégories de composés qu'elle peut détecter. En effet, seuls les composés volatils ou qui peuvent devenir volatils après dérivatisation chimique peuvent être analysés par GC-MS (Shulaev *et al.*, 2008). Cette technique ne permet donc pas d'étudier une grande partie du métabolisme secondaire.

5.2.3. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Avec ce type d'analyse, des composés divers et variés peuvent être séparés en fonction des propriétés de la colonne de séparation avant d'être analysés par MS. La source d'ionisation employée est principalement l'électrospray (ESI) (Allwood *et al.*, 2009). Contrairement à la GC-MS, cette technique permet d'étudier les composés non volatils. De plus, l'apparition de la chromatographie d'ultra performance (UPLC) a considérablement augmenté l'efficacité de séparation des composés tout en réduisant la durée d'analyse (Giri *et al.*, 2007; Granger *et al.*, 2007). Néanmoins, les spectres de masses obtenus après ionisation par électrospray procurent moins d'informations que ceux obtenus par EI. Un autre problème dû à la source d'ionisation est la difficulté d'ionisation de certains composés même s'il est possible d'opérer en mode d'ionisation positive ou négative. De plus, il existe très peu de bases de données suffisamment riches pour identifier la majorité des composés analysés (Schripsema, 2010).

5.2.4. L'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse (EC-MS)

L'électrophorèse capillaire est une puissante technique de séparation de métabolites chargés. Néanmoins très peu d'études ont été menées jusqu'à présent. Cette technique permet d'analyser les composés non volatils et ne nécessite que très peu de quantité d'échantillons. De plus, elle présente la capacité de séparer simultanément et avec une grande résolution les anions, les cations et les molécules non chargées (Soga *et al.*, 2003). Cette méthode a notamment permis d'analyser les métabolites majoritairement présents dans les feuilles de riz (Sato *et al.*, 2004).

5.3. Etudes métabolomiques de la réponse des plantes au stress thermique

Depuis quelques années, des approches non ciblées ont été utilisées afin d'étudier l'impact de différents types de stress biotiques ou abiotiques sur le métabolisme des plantes. Certaines de ces études se sont intéressées à l'impact du stress thermique sur des feuilles d'*Arabidopsis* (Kaplan *et al.*, 2004; Rizhsky *et al.*, 2004). Ainsi, des approches GC-MS ont permis de révéler l'accumulation relative d'un certain nombre de sucres solubles comme le saccharose, le maltose, le tréhalose, le fructose et le glucose en réponse à un stress thermique couplé à un phénomène de déshydratation (Rizhsky *et al.*, 2004). La plupart de ces sucres solubles sont connus pour posséder des capacités d'osmoprotecteurs indispensables à la plante pour survivre

en condition de stress thermique et de déshydratation (Diamant *et al.*, 2001). Une autre étude par GC-MS chez *Arabidopsis* s'est attachée à étudier les effets sur le métabolome d'un stress « haute température » ou d'un stress « froid » (Kaplan *et al.*, 2004). De manière très intéressante cette étude a révélé que la majorité des réponses métaboliques obtenues après exposition à un stress « haute température » se retrouvait dans les réponses de la plante face à un stress « froid ». Ces plantes ont montré une accumulation conjointe de nombreux acides aminés dérivés du pyruvate et de l'oxaloacétate, de précurseurs de polyamines, de l'acide salicylique, du GABA ainsi que d'osmolytes compatibles. Parmi ces composés on retrouve également une accumulation de galactinol et de raffinose, accumulation cohérente avec le rôle potentiel de ces métabolites dans la cellule végétale (Taji *et al.*, 2002). Dix-huit composés ont réagi de manière spécifique au stress « haute température » et trois de ces composés ont pu être identifiés. Il s'agit de l'uracile, du citramalate et de l'acide quinique (Kaplan *et al.*, 2004). Une autre étude, également menée chez *Arabidopsis*, a comparé les réponses métaboliques et transcriptomiques de la plante face à différentes conditions de température et de lumière (Caldana *et al.*, 2011). Cette étude a mis en évidence une réponse métabolique plus rapide que la réponse transcriptomique. De plus, l'analyse multivariée des changements occurrents dans le métabolome dans les différentes conditions a révélé que la variation de l'intensité lumineuse entraînait un changement plus radical de ce métabolome que l'exposition à la chaleur. Ces analyses non ciblées du métabolome ont donc permis de révéler ou de confirmer l'implication de plusieurs métabolites en réponse à des stress spécifiques.

Néanmoins, la majorité de ces études ont été effectuée par GC-MS et chez une unique espèce, *Arabidopsis*. L'un des objectifs de cette thèse étant la meilleure compréhension du métabolisme secondaire en réponse aux stress abiotiques, le choix d'une approche non ciblée par LC-MS a été sélectionnée parmi les différentes techniques analytiques possibles. Dans cette optique, une LC-MS de dernière génération a été utilisée, l'UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™.

5.4. L'UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™

Cette LC-MS peut se décomposer en trois parties : le séparateur, la source d'ionisation et le spectromètre de masse comprenant le piège à ion et le détecteur.

5.4.1. Le séparateur (UPLC)

L'UPLC est une chromatographie d'ultraperformance. Le principe de l'UPLC est basé sur l'utilisation de colonnes remplies de particules de petit diamètre (dans notre cas, 1,9 µm de diamètre). En termes de performances, la diminution de la taille des particules entraîne une

augmentation du nombre de plateaux théoriques et une diminution du temps de rétention, ce qui améliore la qualité de la séparation tout en réduisant le temps d'analyse (Giri *et al.*, 2007; Granger *et al.*, 2007). Pour compenser l'augmentation de la pression, il est possible d'augmenter la température, ce qui a pour effet de diminuer la viscosité et donc la pression tout en augmentant la vitesse linéaire optimale et donc le débit. Les colonnes utilisées sont généralement de faible diamètre (1 à 2,1 mm) et doivent être particulièrement résistantes à la pression. L'utilisation de ce type de colonne permet d'obtenir une grande efficacité de séparation et une grande sensibilité (Wilson *et al.*, 2005).

5.4.2. La source d'ionisation (ESI)

L'électrospray (ou électronebulisation) est une source d'ions à pression atmosphérique qui peut facilement être couplée à la chromatographie liquide. Son principe repose sur la formation de gouttelettes de solutés à l'extrémité d'un fin capillaire porté à un potentiel élevé. La présence d'un champ électrique intense confère aux gouttelettes de solutés une densité de charge importante. Sous l'effet de ce champ électrique, le flux liquide se transforme en nuages de fines gouttelettes chargées suivant le mode d'ionisation (Figure 13). Sous l'effet d'un courant d'air ou de N₂ chauffé, les gouttelettes s'évaporent progressivement. Leur densité de charge devenant trop importante, les gouttelettes explosent en libérant des microgouttelettes constituées de molécules protonées ou déprotonées de l'analyte, porteuses d'un nombre de charges variable. Les ions ainsi formés sont ensuite guidés à l'aide de potentiels électriques appliqués sur deux cônes d'échantillonnage successifs faisant office de barrières avec les parties en aval maintenues sous un vide poussé ($<10^{-5}$ Torr). Durant ce parcours à pression élevée, les ions subissent de multiples collisions avec les molécules de gaz et de solvant, ce qui complète leur désolvatation. En faisant varier les potentiels électriques appliqués dans la source il est possible de provoquer des fragmentations plus ou moins importantes.

La source ESI offre les avantages énumérés ci-dessous :

- (1) Les analytes sont introduits en solution, ce qui favorise le couplage avec la LC ou l'EC
- (2) L'ionisation est dite "douce", ce qui permet d'observer des molécules intactes, et permet d'étudier des interactions non covalentes
- (3) Une bonne sensibilité
- (4) La possibilité de former des ions multichargés, ce qui permet l'analyse de molécules de très haute masse moléculaire

- (5) Il s'agit de la meilleure technique d'ionisation pour les molécules qui contiennent des groupements polaires

Le principal inconvénient d'une source ESI réside dans les phénomènes de suppression ionique liés à la présence d'autres composés (et plus particulièrement de sels) en solution. Ces

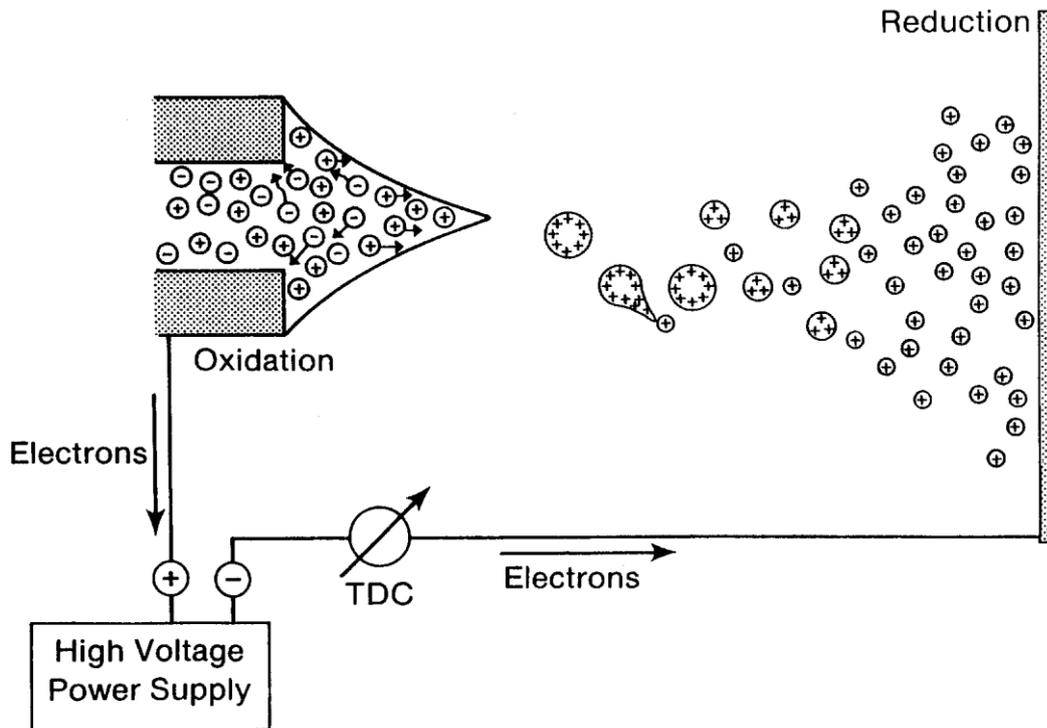


Figure 13. Schéma simplifié du fonctionnement d'une source électrospray en mode positif

phénomènes se traduisent par une diminution notable dans la qualité de la réponse chromatographique de l'analyte considéré. Un autre inconvénient majeur de cette source d'ionisation est la formation d'adduits complexifiant de manière significative l'analyse des ions détectés après le traitement analytique (Allwood *et al.*, 2009).

5.4.3. Le spectromètre de masse (LTQ-Orbitrap™)

Le spectromètre de masse utilisé dans notre étude est un LTQ-Orbitrap™. Il s'agit d'un spectromètre de masse hybride créé par la société Thermo Scientific et qui combine une trappe ionique linéaire (LTQ) et un détecteur de type Orbitrap. La résolution de cet analyseur atteint 100 000 FWHM (ou largeur à mi-hauteur, il s'agit de l'unité d'expression de l'amplitude d'une fonction, donnée par la différence entre les deux valeurs extrêmes de la variable indépendante pour lesquelles la variable dépendante est égale à la moitié de sa valeur maximale) à 400 m/z , et donne ainsi accès à la mesure de masses précises puisque, dans des

conditions de bonne calibration externe, l'exactitude est inférieure à 5 ppm, ce qui simplifie l'identification de peptides et de protéines lors d'expériences de protéomiques (Yates *et al.*, 2006) ou bien de métabolites lors d'approches métabolomiques (Hu *et al.*, 2005).

La trappe ionique linéaire aussi appelé piège quadripolaire 2D est un spectromètre de masse indépendant utilisé pour stocker, isoler et fragmenter les ions provenant de la source d'ionisation. Ces ions sont ensuite envoyés vers l'Orbitrap, chargé d'analyser, de calculer et d'enregistrer leur rapport m/z .

Le piège électrostatique ou « Orbitrap » a été développé par Alexander Makarov en 1999, et constitue une adaptation du piège à ions développé par Kingdon dans les années 1920 (Makarov, 2000; Kingdon, 1923). L'Orbitrap est constitué de deux électrodes coaxiales. L'électrode centrale a la forme d'un fuseau, et l'électrode extérieure a la forme de deux cloches identiques séparées par un espace étroit. Des tensions continues sont appliquées aux électrodes. Les ions sont injectés tangentiellement par l'interstice avec une énergie cinétique de quelques keV (kiloélectroVolt). Ils suivent alors une trajectoire circulaire autour de l'électrode centrale tout en oscillant latéralement suivant l'axe z (Figure 14). La fréquence de ces oscillations est liée au rapport m/z . Le courant induit par les ions est mesuré de manière différentielle entre les deux moitiés de l'électrode externe. Ce courant est converti en masse et en intensité par transformée de Fourier, produisant ainsi un spectre de masse (Hu *et al.*, 2005).

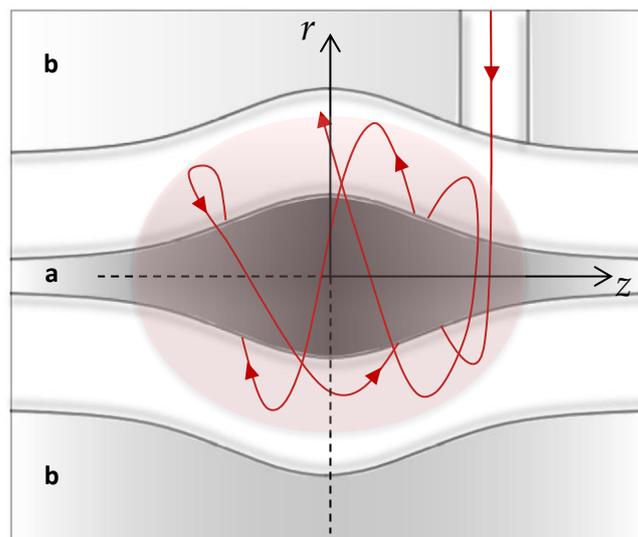


Figure 14. Exemple de trajectoire empruntée par un ion au sein de l'Orbitrap. La trajectoire de l'ion est symbolisée par le tracé rouge. Sous l'influence du champ électrostatique, l'ion oscille le long de l'axe z en fonction de son rapport m/z .

a, électrode centrale ; b, électrode creuse

6. Positionnements du travail de thèse

Une notion importante pouvant intervenir dans le développement des plantes concerne le microclimat qui désigne les conditions climatiques régnant au voisinage d'un organisme vivant, voire d'une partie précise de cet organisme. Les variations entre microclimats autour de l'organisme peuvent entraîner l'apparition à une échelle locale de conditions contrastées qui, selon leurs amplitudes, peuvent devenir des conditions de stress. Bien que de nombreuses études aient été menées sur les effets des stress abiotiques sur la Vigne, nous avons choisi de nous focaliser sur les effets du microclimat et plus précisément, sur deux points essentiels qui n'ont pas ou peu été traités :

- (1) Pour mieux comprendre le fonctionnement intrinsèque de la baie, nous avons décidé d'appliquer les différents stress uniquement au niveau de la grappe. Le reste de la plante (racines et feuilles) est placé dans les mêmes conditions que les plantes contrôles. Nous avons voulu ainsi limiter les phénomènes extérieurs à la baie, comme par exemple, l'inhibition de la photosynthèse foliaire par la température ou bien la présence d'un fort stress oxydatif dans la plante entière qui aurait eu pour effet de limiter le développement et la maturation de la baie.
- (2) Un des autres enjeux fondamentaux de la thèse a été de découpler les effets du stress thermique et du stress rayonnement. En effet, la majorité des études ayant eu lieu au champ, il est très difficile d'observer séparément les effets spécifiques de chaque stress. Par exemple, une pratique courante en viticulture, l'effeuillage, va entraîner chez la baie de raisin exposée une combinaison des deux stress. Dans ce contexte, il nous a semblé nécessaire d'analyser séparément les conséquences de ces deux stress.

Basé sur un système expérimental mis en place afin de pouvoir étudier les effets spécifiques de conditions contrastées du microclimat (que nous appellerons par commodité dans la suite du manuscrit, stress thermique et stress lumineux), ce travail de thèse se décompose en trois chapitres. Dans le premier chapitre, nous nous intéresserons à l'effet spécifique de ces stress sur le transcriptome de baies à mi-maturation, puis nous nous focaliserons sur une voie de biosynthèse particulière, la voie des flavonoïdes. Cette voie sera étudiée au niveau transcriptionnel ainsi qu'au niveau métabolique afin d'essayer d'établir une corrélation entre ces deux niveaux au sein de la baie et ce pour deux stades de développement, le stade véraison et un stade de mi-maturation. En parallèle, d'autres métabolites d'intérêt ont

également été dosés afin de mieux comprendre les effets de ces stress sur la qualité de la baie de raisin. Dans le second chapitre, une étude du métabolome des pellicules de baies exposées aux stress thermique et lumineux par UPLC-Orbitrap a été initiée. Les premiers résultats sont décrits ainsi que les possibilités d'évolution du protocole dans une optique d'optimisation de l'analyse non ciblée de métabolites dans la pellicule de baie de raisin. Enfin, dans le dernier chapitre, nous montrerons l'implication d'une voie méconnue chez la vigne, la voie des oligosaccharides de la famille du raffinose et plus précisément du précurseur de cette voie, le galactinol, dans la réponse de la baie au stress thermique.

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal et système expérimental

1.1. Matériel végétal

Des boutures fructifères de *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon (Ollat and Gaudillere, 1998) ont été cultivées en serre dans des pots de 0,5 L contenant un mélange de perlite, de sable et de vermiculite (rapport 1 :1 :1). Afin d'éviter toute limitation en eau ou nutriments, les racines ont été fournies en eau et solution nutritive 5 fois par jour pendant toute la durée de l'expérimentation. Toutes les boutures ne contenaient qu'une seule grappe, les bourgeons latéraux étant enlevés à chaque apparition durant la croissance. Avant l'expérimentation, l'apex des boutures a été retiré dès que 16 feuilles ont été produites afin de garantir une homogénéité dans la surface foliaire des différentes boutures (Ollat and Gaudillere, 1998). Les boutures fructifères ont ensuite été sélectionnées lorsque les grappes entraient en phase de véraison en se basant sur leurs similarités en termes de croissance végétative et de vigueur ainsi que sur la taille et la compacité de leur grappe.

1.2. Conditions d'expérimentation en serre

Deux expérimentations différentes ont été menées, une sur des boutures dont les grappes étaient à véraison et une sur des boutures dont les grappes étaient à trois semaines après véraison. Durant l'expérimentation « trois semaines après véraison », les températures minimale, maximale et moyenne enregistrées étaient respectivement 12,5°C, 42°C et 21,5°C. Vingt boutures ont été utilisées comme contrôle, la température de leur grappe étant proche de la température ambiante. Deux lots de vingt autres boutures ont été soumis à une élévation de la température produite par des ventilateurs de chauffage (modèle commun, utilisé à une puissance de 1000W). Les différentes intensités de chaleur ($\Delta T1=+6^\circ\text{C}$ et $\Delta T2=+9^\circ\text{C}$) entre les lots ont été obtenues en ajustant la distance entre les chauffages et les grappes. Deux autres lots de boutures ont été placés sous différentes intensités de rayonnement produites au moyen de lampes à sodium utilisant un spectre proche de la lumière solaire (SON-T AGRO, 400W, Philips). Les différentes intensités lumineuses ($\Delta I1=+600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons et $\Delta I2=+850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) ont été obtenues en ajustant la distance des lampes par rapport aux grappes. Afin d'éviter tout réchauffement des grappes provoqué par l'intensité

lumineuse, des ventilateurs ont été installés face aux grappes (un ventilateur pour trois boutures). De même, des ventilateurs ont été placés au niveau des boutures contrôles afin de simuler le flux d'air reçu par les autres boutures et ainsi éviter tout effet lié à un possible stress mécanique. Seules les grappes ont été exposées à ces stress thermiques et lumineux, le reste de la plante étant protégé par des déflecteurs composés de plaques de polystyrène extrudé. Les stress ont été appliqués 12h par jour de 7h à 19h pendant 21 j. Pour l'expérimentation « à véraison », le même système a été utilisé avec néanmoins deux petites différences : un seul poste « stress thermique » ($\Delta T1=+9^{\circ}\text{C}$) et un seul poste « stress lumineux » ($\Delta I1=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) ont été établis et les différents traitements ont été appliqués pendant 17j au lieu de 21j.

Les températures des baies dans les différents lots ont été mesurées de manière continue par des thermocouples de type cuivre-constantin insérés dans des baies. Les intensités lumineuses ont été mesurées par des pyranomètres et des capteurs de PAR. Les différents capteurs ont été reliés à une centrale d'acquisition CR1000™ (Campbell Scientific Ltd, Antony, France). Les baies récoltées tout au long de l'expérimentation ont été immédiatement congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C .

2. Méthodes de biologie moléculaire

2.1. Extraction des ARN totaux des baies de raisin

2.1.1. Extraction d'ARN

L'extraction des ARN totaux est réalisée selon le protocole de (Reid *et al.*, 2006). Les échantillons prélevés en serre sont broyés dans l'azote liquide. Un g de poudre est mélangé à environ 12 mL de tampon d'extraction préchauffé à 65°C [Tris HCl 300 mM pH 8, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, CTAB 2% (p/v), PVPP 2% (p/v) et spermidine trihydrochloride 0,05% (p/v), β -mercaptoéthanol 2% (v/v) ajouté extemporanément]. Le mélange est incubé pendant 10 min à 65°C et agité au vortex toutes les 2 min. L'ensemble est extrait à deux reprises avec un volume équivalent de chloroforme-alcool isoamylique (24:1 v/v). La phase aqueuse est récupérée après centrifugation (6000 rpm, 15 min, 4°C). On ajoute ensuite 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et 0,6 volume d'isopropanol et on laisse précipiter les acides nucléiques pendant 30 min à -80°C . Après centrifugation (6500 rpm, 30 min, 4°C), le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans 1 mL de tampon TE (pH 7,5). On ajoute ensuite 0,3 volume de LiCl 10 M et on laisse les ARN totaux précipiter toute la nuit à

4°C. Après centrifugation (13000 rpm, 30 min, 4°C), le surnageant est éliminé et le culot est lavé à l'éthanol 70% puis séché sous hotte. Le culot est ensuite remis en suspension dans 100 µl d'eau (certifiée DNase/RNase-free).

2.1.2. Traitement des ARN totaux à la DNase

L'ADN génomique contaminant est éliminé par traitement à la DNase RQ1 (Promega) en suivant le protocole du fournisseur. Entre 10 et 30 µg d'ARN totaux, 20 µL de tampon «10X DNase Buffer Free Rnase», 20 unités d'enzyme «RQ1 DNase » et 40 unités de «RNasin Ribonuclease inhibitor » (Promega). Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 min puis la réaction est stoppée par ajout de 50 µL de DNase stop (Promega). Les protéines du mélange sont ensuite éliminées par extraction phénol-chloroforme (1:1 v/v) suivi d'une extraction chloroforme-alcool isoamylique (24:1 v/v). Les acides nucléiques sont précipités une nuit à -20°C en présence de 2,5 volumes l'éthanol 95% froid et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,8. Après centrifugation (14000 rpm, 30 min à 4°C), le culot d'ARN est lavé à l'éthanol 70%, séché et repris dans 50 à 100 µL d'eau (certifiée DNase/RNase free).

2.2. PCR quantitative en temps réel

2.2.1. La transcription inverse

La synthèse des ADN complémentaires (ADNc) est réalisée selon le protocole du fournisseur de l'enzyme transcriptase inverse (Promega). Les ARN sont d'abord incubés pendant 10 min à 75°C en présence d'oligonucléotides désoxythymidine Oligo(dT)₁₈ selon le mélange suivant : 2 µg d'ARN, 3 µL d'Oligo(dT) (10 µM), Qsp 15 µL d'H₂O DEPC. Les ARN sont ensuite rapidement refroidis dans la glace, et la réaction de transcription inverse initiée dans l'ordre suivant : 15 µL d'ARN-oligo(dT), 5 µL de M-MLV reverse transcriptase buffer 5X, 2 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de DTT 100 mM, 1 µL de RNasin (40 Unités/µL) et 1 µL de M-MLV reverse transcriptase (200 Unités/µL). La réaction de transcription inverse se déroule pendant à 60 min à 42°C. L'enzyme est ensuite inactivée par une incubation supplémentaire de 10 min à 95°C. Les ADNc ainsi obtenus sont dilués 20 fois (addition de 475 µL d'H₂O).

2.2.2. Conception des amorces

Les amorces ont été soit extraites de publications scientifiques soit désignées à l'aide du logiciel Beacon Designer de Bio-Rad. Les différentes amorces utilisées sont récapitulées dans les tableaux 2 et 3. Leur efficacité a été déterminée d'après le protocole de Bio-Rad avec le logiciel CFX™ Manager.

Matériel et méthodes

Numéro d'accension	Nom de l'enzyme	amorces	sequences (5'-3')	longueur (pb)	%GC	Tm (°C)	fragment pcr (pb)
GSVIVT00013936001	PAL1	Sens	GCA GTG AGT GGG TGA TGG AGA G	22	59,1	65,9	139
		Antisens	CCA GCA TTC AAG AAC CTG ATG AGC	24	50	65,2	
GSVIVT00018175001	PAL2	Sens	CTC CTC CCC TCC ATT TTC CCT TAC	24	54,2	66,9	94
		Antisens	TGT GTG GCA GTG GTT TCC ATT TG	23	47,8	62,9	
GSVIVT00023932001	C4H1	Sens	ACT TGA ACC ACC TGA ACC TCT CC	23	52,2	64,6	150
		Antisens	TGC GTG ATC CGA ACT CCA CTC	21	57,1	63,6	
GSVIVT00017017001	C4H2	Sens	GCG TCG GAT TAT GAC TCT TCC ATT C	25	48	65,8	119
		Antisens	TCT TCA CAC TCT CCT TGT TCC TCA G	25	48	65,8	
GSVIVT00006341001	CHS1	Sens	AGA GAA GTT CAA GCG AAT GTG TGA C	25	44	64,1	145
		Antisens	CTC CAC CAC CAC CAT GTC CTG	21	61,9	65,2	
GSVIVT00037969001	CHS2	Sens	CAA GAC ATG GTG GTG GTT GAA GTA C	25	48	65,8	115
		Antisens	AGG TGG TGC AGA AGA CAA GGT G	22	54,5	64	
GSVIVT00029513001	CHI	Sens	AGG AGT TAG CGG ATT CGG TTG AC	23	52,2	64,6	136
		Antisens	AAG GCA ACA CAA TTC TCT GAC ACC	24	45,8	63,5	
GSVIVT00036784001	F3H1	Sens	GCA GAC TGT CCA TAG CAA CAT TCC	24	50	65,2	85
		Antisens	CAC TGC CTT CTC TCC CTC TCT TAT C	25	52	67,4	
GSVIVT00014419001	F3H2	Sens	CGG ATA TGA CTC GCC TCG CTA G	22	59,1	65,9	112
		Antisens	TGG AGA TGA CTG GAG ACG ATG AAT C	25	48	65,8	
GSVIVT00015342001	FLS1	Sens	AAT CCT CCT TCT TAC AGG GA	20	45	56,4	98
		Antisens	AGC CCT AAC CCT ACC GAC AA	20	55	60,5	
GSVIVT00015340001	FLS2	Sens	AAC CCA CCT TCG TAC AGG GC	20	60	62,5	95
		Antisens	CCT AAC CCT AAT GAC AGC AA	20	45	56,4	
GSVIVT00015339001	FLS3	Sens	ACC ATC TTA CAG GGA TGC TA	20	45	56,4	129
		Antisens	TCG CCA CCC ACA CTC TTC TT	20	55	60,5	
GSVIVT00015343001	FLS4	Sens	AAA CCA CCT ACT TAC AGA GC	20	45	56,4	96
		Antisens	ACC TAA CCC CAG TGA CAG AC	20	55	60,5	
GSVIVT00015347001	FLS5	Sens	GCA CTA TCC AGA GAT GAG CTT C	22	50	62,1	102
		Antisens	GAA GGG CAA CAA ATT GAA AAT TCC	24	37,5	60,1	
GSVIVT00030282001	LAR1	Sens	AGC GTA GGG TCC GAC AAT TAG TG	23	52,2	64,6	132
		Antisens	GGA AGA AAT CCG TTG GAG GAA GAA	25	45,8	63,5	
GSVIVT00017628001	LAR2	Sens	TGG CAT CAC TGT GGG AGA AGA AG	23	52,2	64,6	79
		Antisens	GGC AGC GGC TAG TAG GTC ATC	21	61,9	65,2	
GSVIVT00001063001	ANS	Sens	AAT GGT GAC TTC AGT GGC TCC TAG	24	50	65,2	139
		Antisens	CCC TTC ATC CTT CTT CTC CTC CTC	24	54,2	66,9	
GSVIVT00005344001	ANR	Sens	GCA GGT TGC GAC TTT GTC TTC C	22	54,5	64	99
		Antisens	CAC TAC TCC TTG AAT TGC TGG CTT G	25	48	65,8	
GSVIVT00014047001	UFGT	Sens	CCC TCC TTG CCG TCG TTC G	19	68,4	63,8	79
		Antisens	GTT GGA TTG GCT GGT GCT GAA G	22	54,5	64	
GSVIVT01028879001	AM1	Sens	AGA CGC CGC TGC TCA ACG	18	66,7	60,7	114
		Antisens	TCA CTG TCT CCT TCC ACA CCA TTG	24	50	65,2	
GSVIVT01028885001	AM3	Sens	GTG GCT CTA ATC CTG GAC ATT G	22	50	62,1	191
		Antisens	GCC CAA ATC TCC CTG AAA GC	20	55	60,5	
GSVIVT01010468001	AOMT	Sens	CAT TGC CGA TGG GAA AGA AGA AGG	24	50	65,2	125
		Antisens	CGT AAG CGA TTA TGC CTC CAA CTC	24	50	65,2	
GSVIVT01014960001	TAU1	Sens	TGG CAG ACG AGA TTA TCT TGT TGG	24	45,8	63,5	126
		Antisens	GAG GAC TCT TGT TGC TCG TGT C	22	54,5	64	
GSVIVT01024852001	TAU2.1	Sens	TCC TGA CCG AAG AGA AGT TTC CTG	24	50	62,7	193
		Antisens	GCA AGG CTC CTC TCC TAT CAA GTC	24	54,2	64,4	
GSVIVT01024284001	TAU2.2	Sens	GGA CAT TGT GCT AGG TTG GAT ATG	24	45,8	61	138
		Antisens	GGC TTG ATG AGA GGC ACC TC	20	60	61,4	
GSVIVT01023227001	EF1γ	Sens	CAA GAG AAA CCA TCC CTA GCT G	22	50	62,1	92
		Antisens	TCA ATC TGT CTA GGA AAG GAA G	22	40,9	58,4	
GSVIVT01007521001	GAPDH	Sens	TTC TCG TTG AGT GCT ATT CCA	21	42,9	57,4	70
		Antisens	CCA CAG ACT TCA TCG GTG ACA	21	52,4	61,3	

Tableau 2. Liste des amorces des gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et du transport des anthocyanes utilisées en PCR Quantitative.

Numéro d'accension	Nom de l'enzyme	amorces	sequences (5'-3')	longueur (pb)	%GC	Tm (°C)	fragment pcr (pb)
GSVIVT01028176001	VvGOLS1	Sens	TGA TTA CAG CAG CGT TTT GCC	21	47,6	59,4	127
		Antisens	CGA GAG TAC TGG CCT CTT CTA G	22	54,5	64	
GSVIVT01028176001	VvGOLS1 pleine longueur	Sens	TGT GGT GGC GGT GTT ACC GGA CGT G	25	64	69,5	1023
		Antisens	GAA TTC ACC GGT CAT CTG ATT GCA TG	26	46,2	63,2	
GSVIVT01034938001	VvGOLS2	Sens	AGA AGC CAA GCC AGG ATG	18	55,6	56,1	94
		Antisens	ATA GAA CAC TCG AAT CCC AAC	21	42,9	57,4	
GSVIVT01031274001	VvGOLS3	Sens	CAT TCA CGG TGG CGC TTT CAG AGG	24	58,3	68,7	74
		Antisens	AGC AAC CGA TCT AGG CAG CCG ATG	24	58,3	68,7	
GSVIVT01013763001	VvGOLS4	Sens	GGA GTG CCC GCA GAT GTG	18	66,7	60,7	135
		Antisens	ACC CTT AGC CAA CCC AAC AAC	21	52,4	61,3	
GSVIVT01032425001	VvRAF1	Sens	GGT ATA AGC AGC CGT TGA TC	20	50	58,4	97
		Antisens	GGA GTT GCC ACC ACA TTA G	19	52,6	57,3	
GSVIVT01007681001	VvRAF2	Sens	GGT TGG AGG ACG GTC AGT CAT C	22	59,1	65,9	126
		Antisens	CAG GAC TAG AGG GTG ATG GAA TGG	24	54,2	66,9	
GSVIVT01028143001	VvSTS1	Sens	AAG TCT CCC TTG GAT TGA AGA AGC	24	45,8	63,5	172
		Antisens	TGA TTA GCA GTG AAC ACG GAA CC	23	47,8	62,9	
GSVIVT01035385001	VvHSFA2	Sens	TGA TGT GGA GGT GGA GGA TTT G	22	50	62,1	166
		Antisens	GGC AGA GAC AGA GAC CAT AGC	21	57,1	63,3	

Tableau 3. Liste des amorces des gènes de la voie de biosynthèse des RFOS utilisées en PCR Quantitative.

2.2.3. Amplification des gènes candidats

Les profils d'expressions des gènes sélectionnés ont été obtenus en utilisant le fluorophore SYBR Green et le thermocycler CFX96™ Real-time PCR Detection System de Bio-Rad. Chaque réaction de PCR a été réalisée dans un volume final de 10 µL contenant 2 µL d'ADNc, 5 µL de iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 0,25 µL de chacune de deux amorces sens et antisens (10 µM chacune) et 2,5 µL d'H₂O (DNase/RNase free). Chaque amplification a été réalisée en duplicat. Les conditions de la réaction PCR sont 95°C pendant 3 min suivi de 40 cycles composés d'une étape à 95°C pendant 10 s et d'une étape à 60°C (+/- 4°C en fonction des amorces) pendant 10 s. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle.

Afin de s'assurer de la spécificité des amorces, chaque amplification est suivie d'une analyse de la courbe de fusion avec une mesure continue de la fluorescence lors d'une augmentation progressive de la température de 65 à 95°C (par pas de 0,05°C).

2.2.4. Calculs des niveaux relatifs d'expression

Les valeurs d'expression de chaque gène ont été déterminées par rapport à la plus faible expression du gène testé dans une condition donnée en utilisant la méthode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Deux gènes de référence (*EF1γ* et *GAPDH*) ont été systématiquement utilisés pour le calcul des facteurs de normalisation. La stabilité de l'expression des gènes de référence a été évaluée selon la méthode développée par Vandesompele *et al.* (2002).

2.3. Analyses microarrays

Toutes les étapes de préparation des échantillons et des lames ont été effectués en suivant le protocole décrit dans la thèse de Céline Camps (2008).

2.3.1. Utilisation de lames 14K Qiagen

Les analyses microarrays ont été effectuées à partir du jeu de sondes *Vitis vinifera* AROS™ (Qiagen/Operon Array Ready Oligo Set). Ce jeu contient 14562 sondes oligonucléotidiques d'une longueur de 70 mers. Ces sondes ont été conçues pour les séquences du *Vitis vinifera* Gene Index release 3 du 18/08/2003 (<http://compbio.dfci.harvard.edu>) et fixées sur des lames de type miroir époxy (Amersham, GE Healthcare) par le Génopole de Montpellier. La taille des spots est de 150-160 µm et la concentration des oligonucléotides est de 5 µM.

2.3.2. Synthèse et marquages des sondes

La synthèse des sondes a été effectuée selon les recommandations du kit « Amino allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification » (Ambion). Il s'agit d'un protocole de marquage indirect permettant l'amplification des ARN. Dans ce protocole, la génération d'ADNc doubles brins par transcription inverse est utilisée comme matrice pour la transcription *in vitro*. Cette transcription permet de générer des centaines de milliers de copies d'ARN antisens (ARNas) pour chaque ARNm présent au départ dans l'échantillon. Au cours de cette étape d'amplification, le nucléotide modifié aa-dUTP [5-(3-Aminoallyl)-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate] est incorporé. S'en suit une étape de marquage où des N- hydroxysuccinimidyl ester (NHS-ester) de la cyanine 3 (Cya3) ou de la cyanine 5 (Cy5) (« Cye™ Post Labelling Reactive Dey Pack », Amersham) sont couplés aux aa-dUTP des ARNas.

2.3.3. Dosage des sondes et détermination de l'efficacité d'incorporation des fluorochromes

Le dosage et l'évaluation de l'efficacité d'incorporation des fluorochromes dans les ARNas-amino allylés ont été effectués sur le spectrophotomètre Ultropec 3100 pro (Amersham) de la plateforme transcriptomique de l'INRA de Bordeaux. Une solution d'ARNas marqués est diluée au cinquantième dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). Un spectre d'absorption entre 200 nm et 700 nm est réalisé. L'absorbance à la longueur d'onde 260 nm ($A_{260\text{nm}}$) permet de doser les ARNas et les $A_{550\text{nm}}$ et $A_{650\text{nm}}$ permettent de doser respectivement les fluorochromes Cy3 et Cy5. L'efficacité de marquage est déterminée en

utilisant les formules ci-dessous. La quantité de fluorescence incorporée (pmol) doit être au minimum de 100 pmol par μg .

$$\text{Quantité de sonde } (\mu\text{g}) = (A_{260} \times U_{260} \times V \text{ élution} \times \text{Dilution})/1000$$

$$\text{Quantité de fluorescence Cy3 (pmole)} = (A_{550} / E \text{ Cy3}) \times W \times V \text{ élution} \times \text{Dilution}$$

$$\text{Quantité de fluorescence Cy5 (pmole)} = (A_{650} / E \text{ Cy5}) \times W \times V \text{ élution} \times \text{Dilution}$$

Les abréviations sont les suivantes:

- A: Absorbance
- V élution: Volume des ARNs après purification en μl (environ 20 μL)
- E: Coefficient d'extinction molaire: 150 000 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ pour Cy3 et 250 000 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ pour Cy5
- U_{260} : 1 unité d' A_{260} d'ARN simple brin qui correspond à 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$
- W: Trajet optique d'une cuve Eppendorf = 1 cm

2.3.4. Co-hybridation et lavages des lames

Le prétraitement des lames est effectué le jour même de l'hybridation. Les oligonucléotides sont d'abord fixés sur la lame par illumination aux UV (254 nm) à 100 mJ. L'élimination des oligonucléotides non fixés sur les lames est ensuite réalisée dans deux bains successifs de 1 min dans une solution de SDS 0,2% suivis de 2 rinçages à l'eau distillée de 1 min. Les lames sont alors séchées et rangées dans une boîte opaque jusqu'à utilisation.

Quatre μg de chaque sonde marquée sont mélangés puis fragmentés. La fragmentation est effectuée avec le kit « RNA fragmentation Reagents » (Ambion). Du tampon de fragmentation (1 μL) est ajouté à la solution de sondes avant une incubation de 15 min à 70°C. Après fragmentation, 1 μl d'ADN de sperme de saumon (dénaturé 5 min à 100°C, puis placé dans la glace pendant 1 min) et un volume de tampon d'hybridation [Formamide 50% v/v, Solution de Denhardt 5X, SSC 1X, SDS 0,05% p/v] nécessaire pour obtenir un volume final de 100 μl sont ajoutés à la solution. Le mélange est ensuite dénaturé à 95°C pendant 2 min, placé dans la glace pendant 2 min, puis transféré à 37°C jusqu'à l'injection.

Chaque lame est hybridée simultanément avec un couple de sondes (Cy3+Cy5). L'hybridation est effectuée à 37°C pendant 16 h, sur la station d'hybridation (Tecan-HS4800 Mastersystem) de la plateforme transcriptomique de l'INRA de Bordeaux. Les lames sont ensuite lavées dans des bains de stringence croissante: 20 min dans le tampon de lavage [SSC 1X, SDS 0,2%], deux fois 10 min dans le tampon [SSC 0,1X, SDS 0,2%] puis 10 min dans le tampon SSC

0,1X. Après l'hybridation, les lames sont maintenues à l'obscurité avant d'être placées dans le scanner pour la lecture.

2.3.5. Analyse et identification des gènes différentiellement exprimés

L'analyse bio-informatique effectuée sur les puces microarrays a été réalisée en suivant le protocole cité dans la thèse de Christian Kappel (2010). Les intensités de fluorescence des deux fluorophores ont été mesurées par lecture des puces sur le scanner GenePix 4000B (Axon Instruments, Canada). La quantification des sondes a été faite avec le logiciel Maïa 2.75 (Novikov and Barillot, 2007). Les mesures de mauvaise qualité ont été identifiées à l'aide des algorithmes de contrôle de qualité de Maïa et ont été éliminées. De plus, toutes les mesures saturées (intensité au dessus de 50000) ont été écartées pour la suite des analyses effectuées avec des outils R/Bioconductor (R Development Core Team, 2010; Gentleman *et al.*, 2004). La normalisation des intensités médianes de fluorescence des deux fluorophores sur chaque lame a été faite à l'aide de l'outil Goulphar (Lemoine *et al.*, 2006) : une normalisation lowess a été suivie d'une normalisation « print-tip median ». Les gènes différentiellement exprimés ont été identifiés avec l'outil Limma (Wettenhall and Smyth, 2004). Les p-values ont été ajustées avec la méthode Benjamini-Hochberg.

2.3.6. Mappage des sondes oligo-nucléotidiques et annotation des gènes cibles

Un programme développé par Christian Kappel a permis de cartographier automatiquement les séquences des sondes microarrays contre les séquences de la version 12X du génome de la Vigne (Jaillon *et al.*, 2007) par homologie de séquences en utilisant le programme BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Les séquences des gènes cibles ont été annotées par homologie en utilisant le programme BLAST (Altschul *et al.*, 1997) et la base de données de séquences protéiques uniref100 release 15.14 (Suzek *et al.*, 2007).

2.3.7. Utilisation de l'outil MapMan appliqué à la Vigne

L'outil MapMan (Thimm *et al.*, 2004) a été adapté à la Vigne dans le cadre d'un projet avec des chercheurs de France, de Slovénie, d'Italie, d'Allemagne et des Etats- Unis (Rotter *et al.*, 2009). Le projet avait démarré avant la publication du génome de la Vigne (Jaillon *et al.*, 2007). Les séquences du *Vitis vinifera* Gene Index release 5 du 21 juin 2006 ont été associées à l'ontologie MapMan. Les séquences des sondes microarrays ont été cartographiées contre

ces séquences permettant une utilisation du logiciel MapMan avec les fichiers d'analyse microarray.

2.4. Expression transitoire dans des protoplastes de tabac

2.4.1. Clonage de séquences d'ADN à partir d'échantillons biologiques

Les séquences d'ADN recherchées (gènes ou promoteurs) sont obtenues après amplification par PCR de ces séquences à partir d'une matrice d'ADNc. Les réactions de PCR sont réalisées dans un mélange réactionnel de 25 μ L comprenant le tampon d'activité 10X de la Taq polymérase, une combinaison d'amorces (à la concentration de 0,4 μ M chacune) correspondant à la séquence d'intérêt, les quatre dNTP à 0,4 mM et 2,5 U de « yellow Taq DNA polymerase ». Les amplifications de séquences géniques pour des réactions de clonage ont été réalisées avec une Taq polymérase de haute fidélité, la « Phusion™ » (Finnzymes, Ozyme) selon les recommandations du fournisseur.

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur (iCycler, Biorad). Les échantillons sont soumis à une dénaturation préalable à 95°C pendant 5 min, puis à plusieurs cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 95°C pendant 45 s, une étape d'hybridation des amorces sur la matrice à la température adéquate pendant 45 s, et une étape de synthèse d'ADN à 72°C dont la durée varie en fonction de la taille du fragment à amplifier. Une extension finale à 72°C pendant 7 min termine le programme de PCR.

Les 1000bp en amont de *VvGOLS1* ont été clonées dans le vecteur pAM35 (n°ATCC: 77186™, ATCC, Manassas, USA) par HindIII/PstI en amont du gène *uidA* codant une β -glucuronidase et la séquence pleine longueur de *VvHsfA2* a été clonée dans le pGEMt puis dans le vecteur d'expression pRT101 (Kiegerl *et al.*, 2000) par XbaI/XhoI et ainsi placée sous le contrôle du promoteur 35S en suivant les protocoles des fournisseurs.

2.4.2. Isolement et préparation des protoplastes de Tabac

Les protoplastes sont préparés à partir de feuilles de plantules de Tabac cultivées en phytotron pendant 5 à 7 semaines en alternance jour/nuit (16 h/8 h), à une température de 23°C le jour et de 18°C la nuit et avec une humidité relative de 75%. Les feuilles sont découpées puis incubées dans une solution 0,34 GM (Gamborg B5 (Duchefa), glucose 0,34 M, mannitol 0,34 M, pH 5,5) additionnée de cellulase (Duchefa) (1%) et de macérozyme (Duchefa) (0,2%) pendant 4 h à 22°C, sous agitation (50 rpm) et à l'obscurité. Les cellules digérées sont centrifugées 5 min à 800 g à température ambiante, puis lavées avec la solution 0,34 GM et

resuspendues dans une solution Gamborg B5 contenant du saccharose (0,28 M). Les protoplastes sont centrifugés 6 min à 110 rpm à température ambiante. Les protoplastes sont collectés, comptés et leur concentration est ajustée à 30000 protoplastes/50µL.

2.4.3. Transformation des protoplastes

Deux et demi à 5 µg d'ADN plasmidique, 150 µL de solution PEG (PEG 6000 25%, mannitol 0,45 M, Ca(NO₃)₂ 0,1 M) sont ajoutés à 50 µL de protoplastes. L'ensemble est incubé 30 min à température ambiante à l'obscurité, puis dilué dans 1 mL de Ca(NO₃)₂ (0,275 M). Les protoplastes sont collectés par centrifugation 7 min à 110 g, puis resuspendus dans 150 µL de milieu 0,34 GM, et incubés à 22°C, pendant 16 à 24 h à l'obscurité.

2.4.4. Test GUS de l'activité β-glucuronidase

Les activités GUS ont été dosées suivant la méthode de fluorescence établie par Jefferson (1987), en utilisant 1 mM de 4-méthyl-umbelliféryl-glucuronide (MUG). La fluorescence a été dosée à l'aide d'un fluoromètre Versafluor™ (Bio-Rad).

3. Méthodes biochimiques

3.1. Préparation

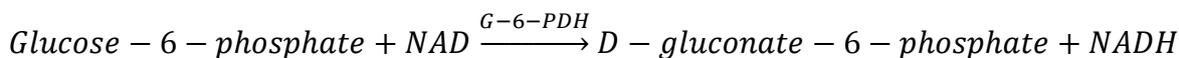
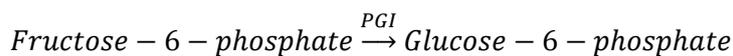
A partir des baies congelées, des pools de cinq baies sont constitués. Les pellicules, pulpes et pépins sont séparés, les pépins sont éliminés et chaque compartiment est pesé séparément. Les pellicules ont été lyophilisées puis broyées avec un broyeur à billes MM200 (Retsch, Haan, Allemagne). Les pulpes sont décongelées et le jus est filtré par pression à travers un filtre de 0,45µm.

3.2. Dosage des sucres

3.2.1. Dosage du glucose et du fructose par méthode enzymatique

Le dosage du glucose et du fructose a été effectué dans les jus de baie par une méthode enzymatique. Cette méthode se fonde sur des mesures de variance d'absorbance à 340 nm provoqués par des changements de concentration en NADH. Ces changements sont liés de façon stœchiométrique aux concentrations des produits d'intérêt à travers une cascade de réactions enzymatiques :





Où **HK**, hexokinase ; **PGI**, phosphoglucose isomérase ; **G-6-PDH**, glucose-6-phosphate déshydrogénase ; **ATP**, adénosine triphosphate ; **ADP**, adénosine diphosphate ; **NADH**, Nicotinamide adénine dinucléotide.

Les kits enzymatiques ont été achetés chez BioSenTec(Toulouse, France). Les standards chimiques ont été achetés chez Sigma (St Louis, MO, USA).

3.2.2. Dosage du glucose, du fructose, du saccharose, du galactinol et du raffinose par HPLC

Ces dosages ont été effectués par Aurélie Egert dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du professeur Felix KELLER (Institut of Plant Biology, University of Zürich). Cent mg de matière fraîche ont été congelés puis broyés dans l'azote liquide. Les carbohydrates ont été extraits en utilisant successivement un mélange composé à 80% d'éthanol (v/v) puis un mélange composé de 50% d'éthanol (v/v). L'extraction a été effectuée pour chaque mélange à 80°C pendant 10 min puis placée dans la glace pendant 2 min. Les surnageants ont ensuite été récupérés après centrifugation (12000g pendant 5min à 4°C) et rassemblés dans un seul tube. Les tubes ont été placés à -20°C sur la nuit. Les tubes ont ensuite été centrifugés (4000 rpm, 8 min) et évaporés. Le culot a été repris dans 100 µl d'eau.

Les échantillons ont été dessalés à l'aide d'une colonne de dessalage (« french column ») en suivant le protocole de (Bachmann *et al.*, 1994; Peters *et al.*, 2007; Peters and Keller, 2009) puis 15 µL ont été injectés dans l'HPLC. Les conditions de l'HPLC utilisées sont :

Degazage	Pompe	Injecteur	Phase stationnaire	Pré-colonne	Phase mobile
Ermac ERC-3510	Gynkotek modèle 480	Gynkotek Gina 50	Ca ²⁺ -Benson BC 100	Carbo-Ca ²⁺ Security guard cartridge	H ₂ O avec Ca/Na-EDTA (50mg.L ⁻¹)
Débit	Température	Elution	Addition post-colonne	Decteur	Intégration
0,6 mL.min ⁻¹	90°C	Isocratique	300 mM NaOH (0,6 mL.min ⁻¹)	PAD ESA 5040 analytic cell ESA Coulochem II	Chromeleon v6.4 Dionex

3.3. Dosage des acides organiques

Les teneurs en acide malique et acide tartrique ont été déterminées dans les mêmes jus de baies utilisées pour le dosage des sucres par la méthode enzymatique. La méthode utilisée est une méthode automatique de colorimétrie au moyen d'un autoanalyseur TRAACS 800 (Bran & Luebbe, Plaisir, France). Le TRAACS est un autoanalyseur à flux continu qui détermine la concentration de substances à l'aide d'un colorimètre qui mesure les changements de couleur en présence d'analytes. Les réactifs et standards chimiques ont été achetés chez Sigma (St Louis, MO, USE).

3.4. Dosage des flavonoïdes

Les pellicules de baie sont broyées puis séchées par lyophilisation. Les flavonoïdes sont extraits dans du méthanol contenant 0.1% de HCl (v/v). L'extrait est ensuite filtré dans une seringue en polypropylène à travers un filtre de 0,45 μ m (Pall Gelman Corp., Ann Harbor, USA). Un système HPLC Summit a été utilisé pour les analyses (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Vingt μ L d'échantillon sont injectés, la séparation est faite à température ambiante sur une colonne en phase inverse Ultrasphere ODS 25 cm x 4,6 mm (granulométrie de 5 mm) pourvue d'une pré-colonne Ultrasphere ODS 4,5 cm x 4,6 mm (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). Tous les réactifs sont de qualité analytique. De l'eau ultra pure 18 M est également utilisée (système de purification d'eau UHQ). L'acétonitrile et l'acide formique (99%) ont été achetés respectivement chez Baker (Mallinckrodt Baker France, Noisy-Le-Sec, France) et chez Merck (Merck Eurolab, Fontenay-sous-Bois, France). La séparation est faite pendant 70 min avec une vitesse d'élution de 0,6 mL.min⁻¹ dans un gradient linéaire : 80% d'éluant A (acide formique 10% dans de l'eau (v/v)) à 85% d'éluant B (acide formique 10% et acétonitrile 30% dans de l'eau (v/v)). Le logiciel Chromeleon version 6.60 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) est ensuite utilisé pour quantifier les composés en fonction de l'aire des pics comparée à des standards externes. L'identification des composés phénoliques est faite d'après leur temps de rétention et en comparant leurs spectres d'absorption à ceux de standards purs. La malvidine-3-glucoside a été utilisée comme référence pour la quantification des anthocyanes à 520 nm et la quercétine-3-glucoside pour la quantification des flavonols à 360 nm. Tous les standards ont été achetés chez Extrasynthese (Genay, France).

3.5. Dosage des acides aminés

La méthode utilisée pour doser les acides aminés a été décrite par Cohen et Michaud (1993). Les acides aminés contenus dans les jus de pulpe de baie ont été dérivatisés avec du 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate. Un système HPLC Waters 2695 pourvu d'un détecteur de fluorescence Waters 474 (Waters, Milford, MA, USA) a été utilisé pour analyser les acides aminés. La séparation est faite pendant 67 min sur une colonne Nova-Pack C18 AccQ-Tag (Waters, Milford, MA, USA) à 37°C avec une vitesse d'élution d'1 mL.min⁻¹ dans un gradient linéaire : 100% d'éluant A (tampon d'acétate de sodium, 140 mM à pH 7,5) à 100% d'éluant B (acétonitrile 60% dans de l'eau (v/v)). Les éluants sont filtrés à travers une membrane de polypropylène GHP (Pall Gelman Corporation, Ann Harbor, USA). Des chromatogrammes correspondant à une excitation à 250 nm et une émission à 395 nm ont été enregistrés. Le logiciel Chromeleon version 6.60 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) est utilisé pour quantifier les composés en fonction de l'aire des pics comparée à des standards externes. Les standards ont été achetés chez Sigma (St Louis, MI, USA). Dix-huit acides aminés ont ainsi été identifiés et quantifiés comme décrit par (Pereira *et al.*, 2006).

3.6. Empreinte métabolique par UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™

Les métabolites ont été extraits dans du méthanol (100%) contenant 1% d'acide formique (v/v) à partir de 100 mg de pellicules de baie broyées et lyophilisées. Après centrifugation (20000g pendant 2 min à 4°C), le surnageant a été récupéré et lyophilisé. La suite de l'analyse a été effectuée dans le laboratoire de Christophe JUNOT (LEMM, CEA Saclay, France). Les échantillons séchés ont été repris dans 200 µL d'H₂O contenant 1% d'acide formique (v/v). A cette étape, les échantillons utilisés en 2010 ont été dilués 10 fois. Les métabolites ont été analysés en utilisant un UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France). Dix µL de chaque échantillon ont été automatiquement injectés dans la colonne de séparation à l'aide d'un auto-sampler de 96 puits (pompe Accela™, Thermo Fisher Scientific). La colonne de séparation utilisée est une colonne hypersil gold C₁₈ (2.1×150 mm, taille des particules=1.9 µm). La colonne a été maintenue à 25°C durant toute l'expérimentation. La séparation est faite pendant 19 min avec une vitesse d'élution de 500 µL.min⁻¹ dans un gradient linéaire : 100% d'éluant A (acide formique 0.1% dans de l'eau (v/v)) à 100% d'éluant B (acide formique 0.1% dans de l'acétonitrile (v/v)). Les signaux de masse ont été enregistrés en mode full scan (75-1000 *m/z*) dans les deux modes d'ionisation,

positif et négatif (+/- 4 kV). La résolution de la masse du spectromètre a été définie à 30000 ($m/\Delta m$, FWHM à $m/z=400$).

4. Analyses bioinformatiques

4.1. Bases de données

Les bases de données utilisées pour les recherches de séquences sont :

- Genoscope (contient la séquence génomique de *Vitis vinifera* L. cv Pinot Noir)
<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis>
- Genbank (regroupe les séquences nucléotidiques publiquement disponibles, ainsi que leur séquence protéique)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- CRIBI (contient la séquence génomique de *Vitis vinifera* L. cv Pinot Noir publiée par (Jaillon *et al.*, 2007)
<http://genomics.cribi.unipd.it>

4.2. Logiciels utilisés pour la caractérisation de séquences d'ADN *in silico*

Les logiciels utilisés sont :

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, permet une recherche rapide dans les banques de données de séquences nucléotidiques ou protéiques sur la base de la recherche de similarités avec une séquence soumise; Altschul *et al.*, 1997)
- ClustalW (permet un alignement multiple de séquences nucléotidiques par combinaison des séquences deux à deux; Thompson *et al.*, 1994)
- MEGA (Alignement de séquences protéiques grâce au logiciel MUSCLE intégré et construction d'arbre phylogénétique; Edgar, 2004; Kumar *et al.*, 2008)
- MatInspector (Analyse de promoteur et recherche d'élément *cis*; Quandt *et al.*, 1995; Cartharius *et al.*, 2005)

4.3. Exploitation des données métabolomiques

Les données brutes ont été acquises par le logiciel XCalibur v2.0.7 (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) puis converties au format netCDF. Les données ont ensuite été importées

dans le logiciel XCMS v1.26.1 (Smith *et al.*, 2006) pour la déconvolution, la détection et l'alignement des pics entre les échantillons. XCMS est un package fonctionnant sous l'environnement R v2.13.2 (R Development Core Team, 2010). Le tableau 4 récapitule les différents paramètres utilisés dans l'analyse informatique.

Le traitement statistique des données a été effectué grâce au package RankProd exploitable sous R (Breitling *et al.*, 2004). Les analyses en composantes principales sont également réalisées sous R grâce au package amap. Toutes les données sont ensuite importées dans MSEXCEL 2007 (Microsoft France, Issy-les-Moulineaux, France) pour la mise en forme des résultats d'analyse.

fwhm	step	steps	mzdiff	sleep	max
4	0.05	2	0.01	0	50
snthresh	ppm	profmeth	metlin	sigma	perfwhm
3	10	bin	0	6	0.6
minfrac_GA	minsamp_GA	bw_GA	mzwid_GA	max_GA	sleep_GA
0.2	20	5	0.01	50	0
missing	extra	method	span	family	plotype
1	1	loess	0.2	gaussian	deviation
minfrac_GB	minsamp_GB	bw_GB	mzwid_GB	max_GB	sleep_GB
0.2	20	5	0.01	50	0
eicmax	eicwidth	sortpval	cor_eic_th	maxcharge	maxiso
50	200	TRUE	0.6	2	3

Tableau 4. Paramètres utilisés lors de l'analyse XCMS pour le traitement des données chromatographiques obtenues par UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™.

4.4. Tests statistiques réalisés sur les dosages de métabolites

Des tests statistiques ont été effectués sur tous les dosages réalisés. Cinq réplicats biologiques ont été utilisés et aucun réplicat technique. Dans le cas d'une distribution normale des mesures, un test de Holm-Sidak a été réalisé, confirmant les tendances observées. Toutefois, dans le cas où la distribution des mesures s'est révélée anormale, le test non paramétrique utilisé (Kruskall-Wallis) n'a pas été en mesure de clairement distinguer les conditions entre

Matériel et méthodes

elles. Afin de simplifier la lecture des graphiques, les significativités n'ont pas été montrées mais seuls les résultats significatifs sont discutés.

Chapitre I: Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Afin de mieux comprendre l'impact du microclimat sur la régulation des processus intervenant lors du développement de la baie de raisin, des stress thermique ou lumineux ont été appliqués sur les grappes de boutures fructifères (Cabernet-Sauvignon) et des baies ont été collectées après différents temps d'exposition. Dans un premier temps, une approche globale (microarrays, lames Qiagen 14K) a permis d'étudier le transcriptome des baies soumises aux stress lors de leur maturation. Dans un second temps, l'étude a été focalisée sur l'analyse de l'expression de gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes et la compartimentation des anthocyanes. Enfin, le travail a été complété par le dosage de métabolites d'intérêt (sucres, acides organiques, acides aminés, flavonoïdes) pour préciser la réponse métabolique des baies soumises aux différents stress.

I.1. Modalités d'application et caractérisation des stress thermiques et lumineux

Deux expérimentations ont été menées sur des baies à différents stades de développement. Lors de la première série d'expérience, les stress ont été appliqués à partir du stade «véraison». Pendant la seconde série, les stress ont été imposés à partir du stade «+3 semaines après véraison (+3SAV)». Pour chaque expérimentation, deux types de stress ont été appliqués, un stress thermique ou un stress lumineux.

Pour la première expérimentation, les stress ont été imposés chaque jour de 7:00 à 19:00 et ce de façon répétée pendant 14 j (Figures 15A et 16A). Pour les grappes exposées au stress thermique, la moyenne des températures reçues au cours de la journée pendant toute la durée du traitement s'élève à 35,3°C alors que la moyenne des températures des baies témoins s'élève à 26,6°C (Figure 15C). La variation maximale de température entre deux journées est de l'ordre de 6°C. Cette observation s'explique par les variations de températures extérieures, entraînant des fluctuations parfois importantes de la température ambiante dans la serre. La

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

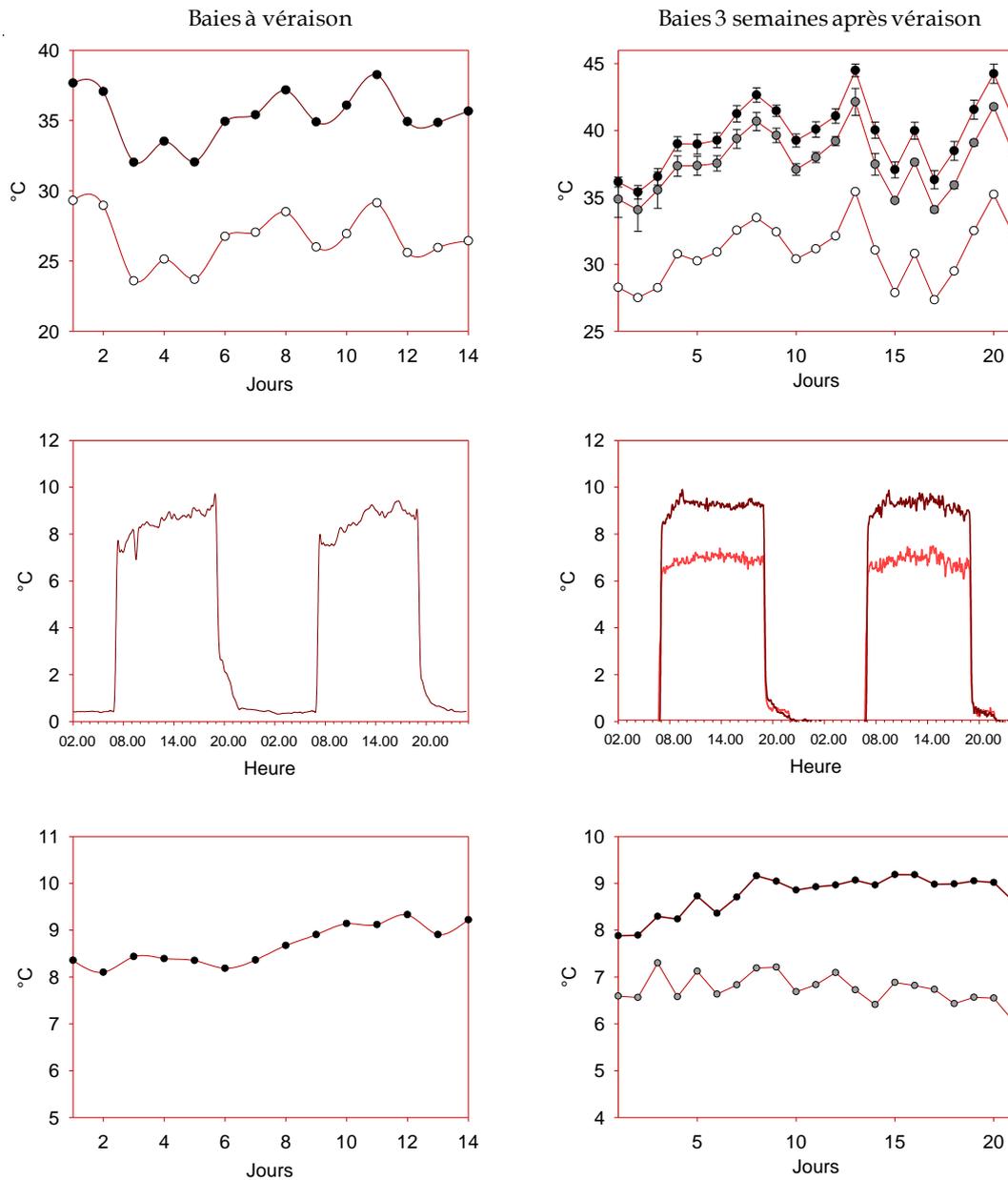


Figure 15. Relevé des températures perçues par les baies. A, C, E baies à véraison. B, D, F baies 3 semaines après véraison. A, B, moyenne des températures perçues par jour. C, D, températures perçues au cours de deux journées d'expérimentation. E, F, différence de températures perçues entre les baies stressées et les baies témoins par jour. (●) poste T1, (●) poste T2, (○) poste témoin.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

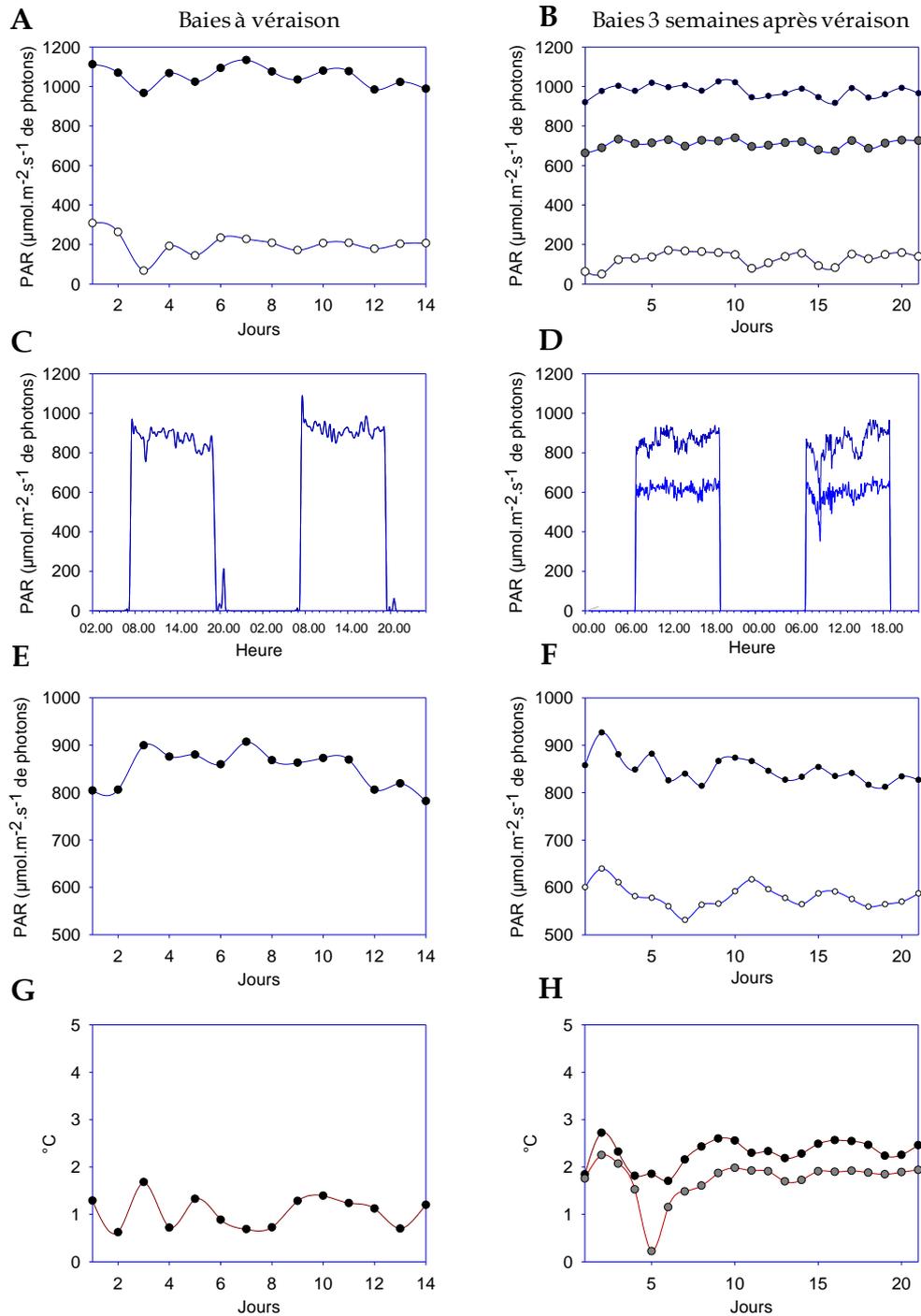


Figure 16. Relevé des intensités lumineuses et des températures perçues par les baies. A, C, E, G baies à véraison. B, D, F, H baies 3 semaines après véraison. A, B, moyenne des intensités lumineuses perçues par jour. C, D, intensités lumineuses perçues au cours de deux journées d'expérimentation. E, F, différences d'intensité lumineuse perçues entre les baies stressées et les baies témoins par jour. G, H, différence de températures perçues entre les baies stressées et les baies témoins par jour. (○) poste L1, (●) poste L2, (○) poste témoin.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

différence de température perçue entre les deux postes tout au long de l'expérimentation est en moyenne de 9°C (Figure 15E). Pour les grappes exposées au stress lumineux, la moyenne des fluences reçues tout au long du traitement s'élève à 1050 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons alors que celle reçue par les baies témoins s'élève seulement à 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons (Figure 16C). La différence d'intensité reçue entre les grappes exposées au rayonnement et les grappes témoins est donc de 850 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons (Figure 16E). L'échauffement des baies mesuré dans les baies exposées est de l'ordre de 1°C (Figure 16G). Des baies ont été collectées tout au long de l'expérimentation, à savoir après 1j, 7j et 14 j d'exposition aux stress.

Pour la seconde expérimentation, les stress ont été appliqués pendant 21j chaque jour de 7:00 à 19:00 (Figures 15B et 16B). Deux niveaux d'intensités ont été appliqués pour chaque type de stress (thermique ou lumineux). Pour les grappes exposées aux stress thermiques, la moyenne des températures perçues par les baies au cours de la journée durant toute l'expérimentation est de 30,9°C pour les baies témoins, 37,7°C pour le poste T1 et 39,7°C pour le poste T2 (Figure 15D). La variation maximale de températures observée entre deux journées s'élève à 9°C. La différence de température perçue entre les baies du poste 1 et les baies témoins est de 7°C tandis que la différence de température entre les baies du poste 2 et les baies témoins est de 9°C en moyenne (Figure 15F). Pour les grappes exposées aux différentes intensités lumineuses, la moyenne des fluences reçues pour les baies témoins, les baies du poste L1 et les baies du poste L2 s'élève respectivement à 150, 700 et 975 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons (Figure 16D). Comparée aux baies témoins, la différence d'intensité moyenne perçue est de l'ordre de 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons pour les baies du poste L1 et de 850 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons pour les baies du poste L2 (Figure 16F). Les baies du poste L1 et du poste L2 ont subi respectivement un échauffement d'environ 1,7°C et 2,2°C par rapport aux baies témoins (Figure 16H). Les baies ont été collectées au cours de la première journée (après 1h, 2h, 4h, 8h de traitement) puis tout au long de l'expérimentation, à savoir après 1j, 7j, 14j et 21j de traitement.

I.2. Analyse transcriptomique des baies de raisin exposées à un stress thermique ou lumineux pendant la maturation

Une analyse transcriptomique a été effectuée sur des baies de raisin exposées pendant 17j à un stress abiotique (température ou rayonnement), lorsqu'elles avaient atteint le stade véraison.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Des prélèvements ont été effectués le premier jour de l'application du stress, après 2h, 4h et 12h d'exposition et au dernier jour de l'expérimentation.

I.2.1. Effet de la température sur le transcriptome des baies de raisin

Les baies prélevées ont été soumises à une élévation de la température de 9°C par rapport aux baies témoins. Dans un premiers temps, une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été effectuée sur l'ensemble des gènes différentiellement exprimés (p-value ajustée < 0,01, niveaux d'expression > 1,7 ou < 0,6) pour chaque temps de prélèvement (Figure 17). Il en ressort que le transcriptome des baies ayant subi 14j d'exposition au stress thermique (T14J) est bien plus affecté que celui des baies soumises au stress pendant une période beaucoup plus courte comme le montre la répartition des échantillons le long de l'axe des abscisses représentant la composante principale 1. Cette composante explique 67% de la variation totale observée entre les échantillons. La composante principale 2, responsable de 26,7% de la variance, explique quant à elle la différence observée entre les transcriptomes des baies exposées au stress pendant 2h (T2H) par rapport aux autres temps de prélèvements. Inversement, les échantillons T4H et T12H ne se distinguent pas d'après leur profil transcriptomique.

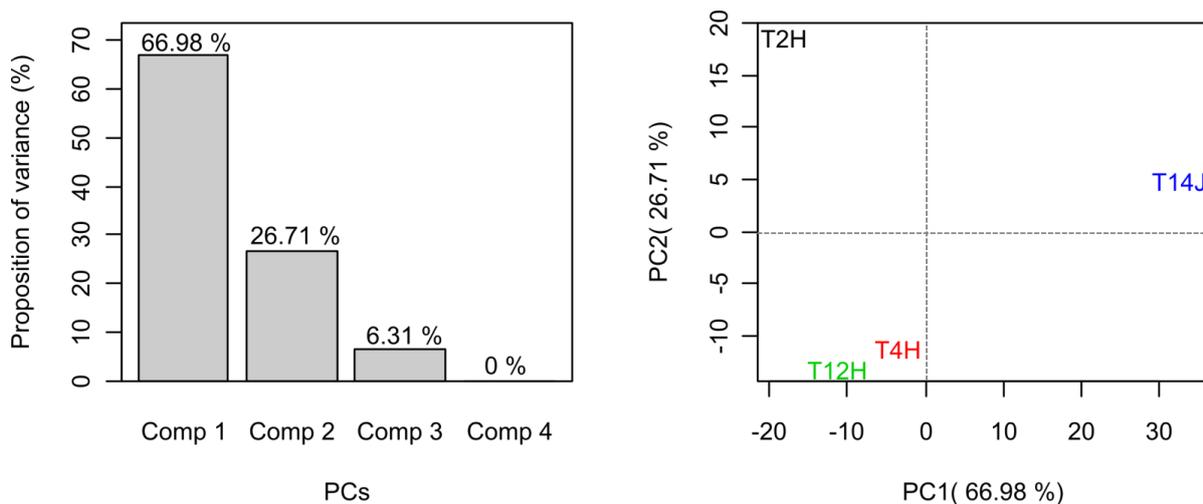


Figure 17. Analyse en composantes principales des gènes différentiellement exprimés (p.value ajustée <0.01) dans les baies de raisin exposées à un stress thermique par rapport à des baies témoins ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$).

exposition des baies pendant 2h (T2H), 4h (T4H), 12h (T12H) et 14j (T14J)

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

De manière plus précise, l'expression est significativement modifiée pour plus de 500 gènes après 14j de stress (238 gènes induits et 312 gènes réprimés) alors qu'au maximum, 229 gènes voient leur expression affectée pour des temps courts d'application du stress thermique (Tableau 5). Après 2h de traitement, 202 gènes sont surexprimés et seulement 27 gènes sont réprimés. Après 4h et 12h d'exposition au stress, une chute drastique du nombre de gènes surexprimés (20 et 32 gènes, respectivement) et une augmentation du nombre de gènes sous-exprimés (116 et 85 gènes, respectivement) sont observées.

Durée de traitement	2h	4h	12h	14j
Nombre de gènes induits	202	20	32	238
nombre de gènes réprimés	27	116	85	312
Total	229	136	117	550

Tableau 5. Nombre de gènes différentiellement exprimés (p.value ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies raisin exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) par rapport à des baies témoins.

De façon intéressante, parmi tous les gènes différentiellement exprimés, aucun ne présente une sur- ou sous-expression maintenue tout au long de la cinétique de traitement (Fig 18). Pour la condition T2H, les gènes différentiellement exprimés sont quasiment tous différents des gènes affectés dans les autres conditions. Il faut toutefois relever la présence de 23 gènes communs affectés par la température après 2h et de nouveau après 14j d'exposition. Parmi les gènes différentiellement exprimés dans les conditions T4H et T12H, 72 gènes réprimés sont communs aux deux conditions soit respectivement 53% et 61,5% du nombre total de gènes différentiellement exprimés dans chaque condition. L'exposition prolongée des baies au stress thermique (T14J) se traduit par un grand nombre de gènes spécifiquement induits ou réprimés (respectivement 204 et 246 gènes).

Une étude de la distribution de ces gènes par catégories fonctionnelles a été réalisée selon l'ontologie MapMan (Thimm *et al.*, 2004; Rotter *et al.*, 2009) (Figure 19). La catégorie fonctionnelle la plus affectée quelle que soit la durée d'exposition correspond aux gènes associés aux stress. Elle représente 12 à 20% du nombre total de gènes différentiellement exprimés selon la durée du traitement. Après 17j d'exposition à une température élevée, la deuxième catégorie la plus représentée (41 gènes) est constituée par des gènes intervenants dans la synthèse ou la dégradation de protéines ainsi que dans les modifications post-

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

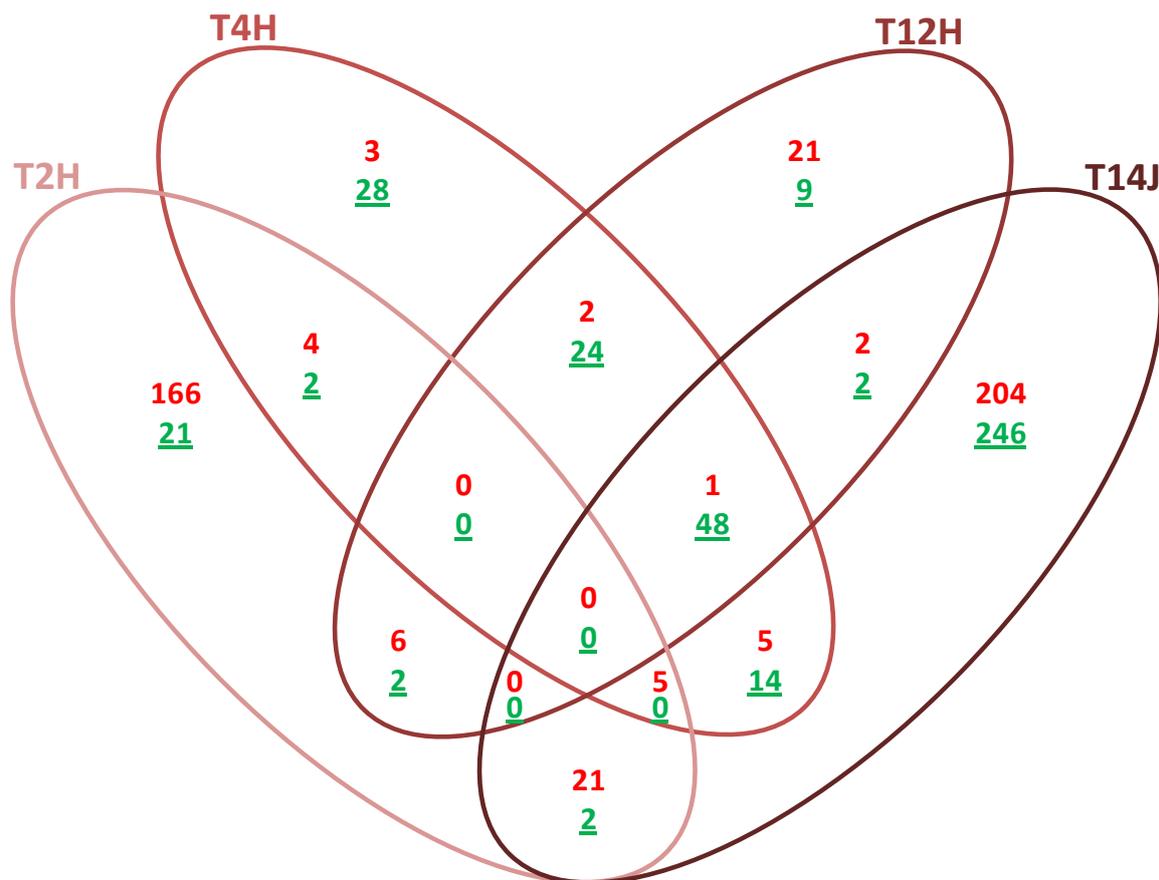


Figure 18. Diagramme d'Euler représentant les gènes induits (en rouge) et réprimés (en vert) (p.value ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) selon la durée d'exposition des baies au stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$)

exposition des baies pendant 2h (T2H), 4h (T4H), 12h (T12H) et 14j (T14J)

traductionnelles. Toutefois, cette catégorie est nettement moins représentée pour les temps courts avec moins d'une dizaine de gènes. Une autre catégorie de gènes affectée par le stress thermique est celle relative au développement, ce qui suggère qu'une trop longue exposition au stress thermique empêche le bon développement de la baie. D'autres catégories sont significativement affectées comme la synthèse et la régulation des ARNs, le métabolisme des hormones, les mécanismes de transports, l'intégrité de la paroi cellulaire ainsi que le métabolisme secondaire des baies.

Le tableau 6 répertorie les gènes classés dans la catégorie « stress ». Les similitudes avec des gènes connus d'autres espèces, les fonctions présumées, et les rapports d'expression sont indiqués. Ce tableau révèle la présence de nombreux gènes codant des protéines de la famille des Heat Shock Proteins (HSPs). Il s'agit d'une famille de protéines connue pour intervenir

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

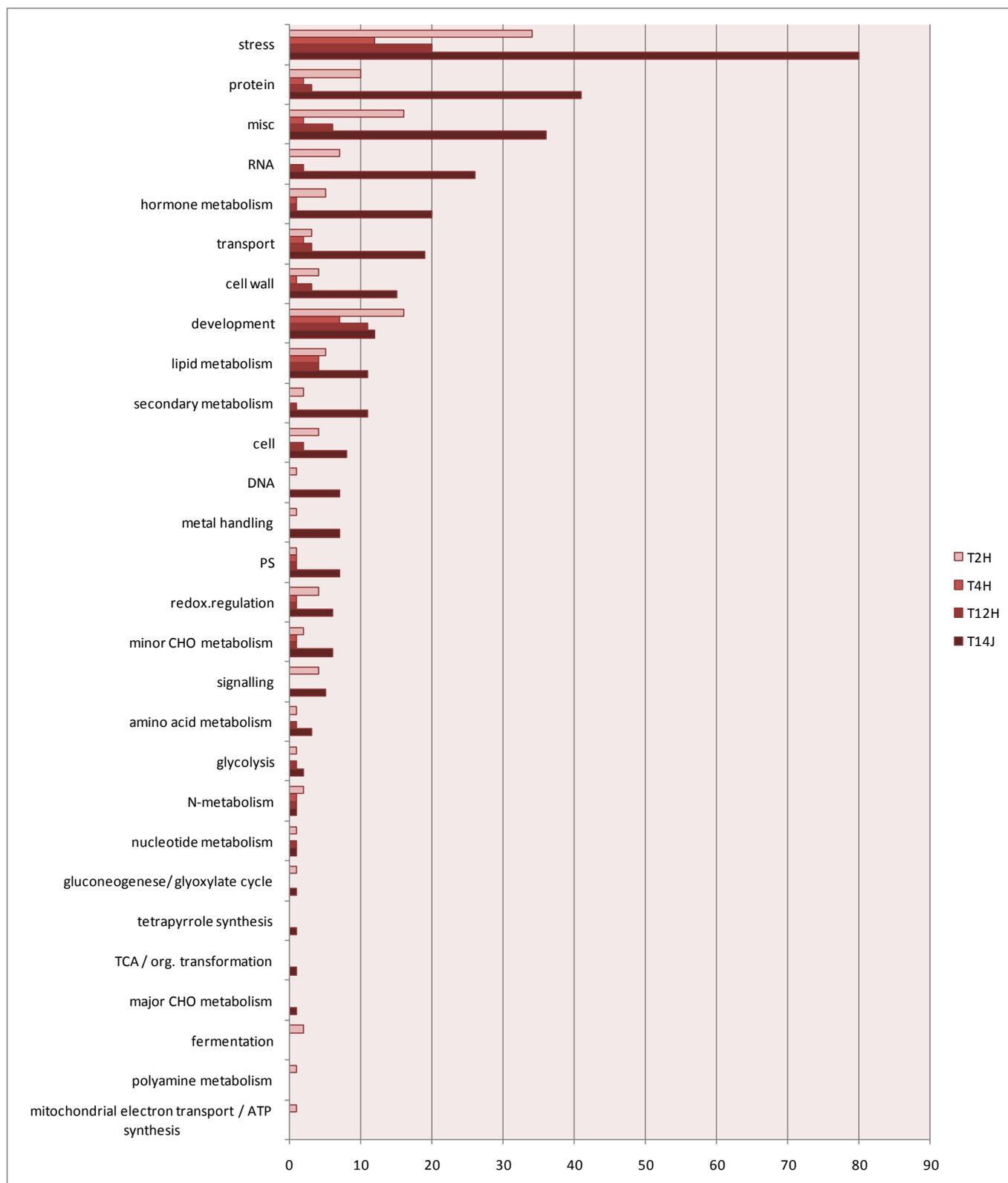


Figure 19. Regroupement par catégories fonctionnelles (Mapman) des gènes différentiellement exprimés (p.value ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) par rapport à des baies témoins.

exposition des baies pendant 2h (T2H), 4h (T4H), 12h (T12H) et 14j (T14J)

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

chez les plantes et d'autres organismes dans la réponse au stress thermique (Krishna, 2004).

On peut dégager deux clusters de gènes en fonction de leur profil d'expression :

1/ Un groupe de gènes contenant une majorité de gènes codant des HSPs, dont l'expression est induite seulement après 14j d'exposition à la chaleur

2/ Un groupe de gènes contenant également des *HSPs*, mais différents de ceux du premier groupe, et dont l'expression est transitoirement stimulée après 2h d'exposition

Le groupe 1 inclut le couple de chaperones HSP70/HSP40 autrement appelée DnaK/DnaJ chez *E.coli* (Szabo *et al.*, 1994). Le groupe 2 se caractérise aussi par la présence de *HSPs* mais on y trouve également d'autres gènes intéressants comme celui codant une protéine de type RD22, impliquée dans la réponse à la déshydratation et au stress salin chez la Vigne (Hanana *et al.*, 2008). On observe aussi la présence d'un gène possédant de fortes homologies avec *AtPMT10*, une méthyltransférase dépendante de la S-adénosylméthionine (SAM) (Joshi and Chiang, 1998).

Les gènes représentés dans la catégorie « protéine » interviennent principalement dans la synthèse ou la dégradation de protéines et dans les modifications post-traductionnelles (Tableau 7). On remarque un premier cluster de 9 gènes dont les transcrits s'accumulent tardivement (T17J). On note la présence dans ce cluster de gènes *HSPs* comme *HSP100*. On trouve également dans cette catégorie fonctionnelle des gènes réprimés après 17j d'exposition au stress. Parmi ces gènes, plusieurs codent des protéines possédant un domaine de fixation du zinc suggérant une capacité de fixation à l'ADN ou aux protéines. On trouve également des gènes codant des enzymes vacuolaires ainsi que des gènes présentant des profils d'expression similaires au groupe 2 des gènes de la catégorie « stress » définie dans le paragraphe précédent.

Afin d'étudier plus en détail l'impact potentiel du stress thermique sur le développement de la baie, les gènes différentiellement exprimés et qui interviendraient dans les processus liés au développement ont été regroupés (Tableau 8). Les gènes affectés possèdent à peu près tous le même profil d'expression, à savoir une forte induction après 2h d'exposition puis une répression quasiment constante tout au long de la durée du traitement. On peut faire le rapprochement avec le groupe 2 des gènes intervenant dans la réponse au stress (Tableau 6). Parmi les gènes les plus affectés, on retrouve un homologue de *preproMP73*, qui code chez *Cucurbita maxima* un précurseur de la protéine MP73. Il s'agit d'une protéine tonoplastique et intervenant dans la maturation des graines (Mitsuhashi *et al.*, 2001). Quatre autres gènes

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Gene	Homologies	T2H	T4H	T12H	T14J
GSVIVT01016572001	Peroxisomal small heat shock protein	0,82	1,02	0,99	6,65
GSVIVT01028856001	Heat shock protein 83	1,31	1,29	0,89	6,19
GSVIVT01021112001	Heat shock protein DnaJ (HSP40)	1,37	1,29	0,88	5,96
GSVIVT01017960001	70kD heat shock protein	1,79	0,60	0,81	3,33
GSVIVT01007880001	Heat shock protein 101	0,97	1,18	0,81	2,87
GSVIVT01017322001	26.5 kDa heat shock protein	3,50	0,25	0,65	2,33
GSVIVT01024994001	HSC70-1 (HEAT SHOCK COGNATE PROTEIN 70-1)	1,00	1,32	0,92	2,26
GSVIVT01003939001	Os03g0293000 protein	1,39	1,25	0,91	2,16
GSVIVT01009931001	Endoplasmic homolog (HSP90)	1,01	0,96	0,91	1,84
GSVIVT01024994001	HSC70-1 (HEAT SHOCK COGNATE PROTEIN 70-1)	1,61	1,75	0,81	1,81
GSVIVT01003469001	Heat shock protein 90	0,78	1,41	0,89	1,78
GSVIVT01017020001	Cc-nbs-Irr resistance protein	1,03	1,11	1,03	1,75
GSVIVT01004352001	Phosphosulfolactate synthase-related protein (Hsa32)	0,90	1,10	0,93	1,74
GSVIVT01038380001	Os02g0710900 protein (HSP70)	0,93	1,03	0,98	1,73
GSVIVT01011543001	Os10g0579100 protein	1,19	0,79	0,85	1,72
GSVIVT01017110001	ATP binding	1,03	1,08	0,90	1,66
GSVIVT01020123001	Tir-nbs-Irr resistance protein	0,82	0,99	1,03	0,49
GSVIVT01037910001	NtPRp27	0,89	1,51	2,06	0,35
GSVIVT01016413001	Chaperone	1,68	1,03	1,12	1,32
GSVIVT01021014001	DnaJ-like protein (HSP40)	1,76	1,00	1,01	1,24
GSVIVT01038631001	Heat shock protein 26	1,97	0,92	0,97	1,26
GSVIVT01013665001	HSP20	3,60	0,27	0,53	0,22
GSVIVT01008797001	SAM-dependent methyltransferase PMT10	4,37	0,20	0,36	0,72
GSVIVT01015390001	Rd22-b	5,12	0,33	0,30	0,67
GSVIVT01013663001	Seed maturation protein PM31	6,44	0,32	0,25	0,45
GSVIVT01035437001	18.8 kDa class II heat shock protein	22,27	0,05	0,08	0,18

Tableau 6. Liste de gènes classés dans la catégorie « stress » et différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}C$) par rapport à des baies témoins.

exposition des baies pendant 2h (T2H), 4h (T4H), 12h (T12H) et 14j (T14J)

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Gene	Homologies	T2H	T4H	T12H	T14J
GSVIVT01025404001	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1-like 2	1,00	0,88	0,84	3,17
GSVIVT01035900001	ClpB (HSP100)	0,84	1,00	1,11	2,65
GSVIVT01014737001	AT1G80400 protein	1,00	1,33	0,91	2,41
GSVIVT01029025001	GroEL-like chaperone (HSP60)	1,13	1,04	1,05	2,21
GSVIVT01003320001	Cystatin	1,18	0,94	1,14	1,93
GSVIVT01037416001	SNF1-related protein kinase regulatory beta subunit 1	1,10	1,15	1,16	1,73
GSVIVT01018023001	Centromere protein	0,71	1,23	0,93	1,73
GSVIVT01014167001	Gamma-glutamylhydrolase 1	0,89	1,06	0,93	1,67
GSVIVT01031195001	Protein phosphatase 2C-like	1,13	1,08	1,02	1,65
GSVIVT01021791001	emb2458 (embryo defective 2458); ATP binding / ATPase/ metalloendopeptidase/ nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding	0,53	0,73	1,01	1,08
GSVIVT01022083001	protein binding / zinc ion binding	0,71	0,78	0,94	0,60
GSVIVT01015569001	zinc finger (ubiquitin-hydrolase) domain-containing protein	0,88	0,94	0,99	0,61
GSVIVT01022146001	Methionine aminopeptidase	1,08	0,79	0,95	0,56
GSVIVT01024832001	Small zinc finger-like protein	1,11	0,84	1,08	0,58
GSVIVT01008107001	nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein / RNA	1,26	0,82	1,08	0,58
GSVIVT01037845001	Vacuolar-sorting receptor 3	1,29	0,89	1,06	0,51
GSVIVT01036582001	NBS-LRR resistance protein RGH1	1,33	0,75	0,94	0,55
GSVIVT01032557001	AAA-type ATPase	1,74	1,41	0,62	0,93
GSVIVT01021759001	WNdr1D-like protein kinase	1,81	0,40	0,63	0,78
GSVIVT01035019001	Mitochondrial import inner membrane translocase,	2,00	0,42	0,73	0,90
GSVIVT01026248001	protein binding / zinc ion binding	2,26	0,31	0,39	0,37
GSVIVT01006037001	Vacuolar-processing enzyme	5,58	0,29	0,51	0,55

Tableau 7. Liste de gènes classés dans la catégorie « protéine » et différenciellement exprimés (p.value ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) par rapport à des baies témoins.

exposition des baies pendant 2h (T2H), 4h (T4H), 12h (T12H) et 14j (T14J)

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Gene	Homologies	T2H	T4H	T12H	T14J
GSVIVT01025122001	senescence-associated protein	0,88	0,86	0,88	0,61
GSVIVT01033739001	LEA protein group 3	1,00	0,18	0,34	1,00
GSVIVT01015498001	Early nodulin 93 protein	1,04	0,72	1,06	0,59
GSVIVT01036170001	Protein HIRA	1,73	0,54	0,75	0,77
GSVIVT01013196001	Lea protein 2	1,95	0,60	0,78	0,98
GSVIVT01015039001	Expressed protein Q8GRN0	2,27	1,38	1,03	2,88
GSVIVT01012153001	Os06g0665100 protein	2,89	1,63	0,95	2,09
GSVIVT01001186001	Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g03100	3,63	0,33	0,57	1,02
GSVIVT01015207001	Expressed protein O80572	3,95	0,51	0,46	0,50
GSVIVT01025139001	7S globulin	6,30	0,39	0,41	0,55
GSVIVT01033504001	Seed maturation protein LEA 4	6,74	0,43	0,27	0,36
GSVIVT01017985001	Late embryogenesis abundant protein D-34	6,90	0,20	0,31	0,56
GSVIVT01019005001	PreproMP73	7,08	0,27	0,26	0,49

Tableau 8. Liste de gènes classés dans la catégorie « développement » et différemment exprimés (p.value ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) par rapport à des baies témoins.

exposition des baies pendant 2h (T2H), 4h (T4H), 12h (T12H) et 14j (T14J)

Gene	Homologies	T2H	T4H	T12H	T14J
GSVIVT01006396001	Anthocyanidin reductase	1,11	1,24	0,95	2,43
GSVIVT01026629001	Cinnamyl alcohol dehydrogenase-like protein	2,09	0,52	0,77	1,09
GSVIVT01025214001	Phenylalanine ammonia-lyase (Fragment)	0,88	0,99	0,70	0,57
GSVIVT01029183001	4-coumarate:CoA ligase 1	0,65	1,08	1,26	0,50
GSVIVT01024306001	Phenylalanine ammonia-lyase	1,12	1,73	0,98	0,49

Tableau 9. Liste de gènes classés dans la catégorie « métabolisme secondaire » et différemment exprimés (p.value ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) par rapport à des baies témoins.

exposition des baies pendant 2h (T2H), 4h (T4H), 12h (T12H) et 14j (T14J)

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

intervenants dans la maturation des graines, à savoir *D-34*, *LEA 2*, *LEA 4* et *7S GLOBULIN* sont également présents dans ce groupe (Foley *et al.*, 2011).

L'un des objectifs de cette thèse est de mieux comprendre l'impact du stress thermique sur le métabolisme secondaire du raisin. Nous avons donc regroupé au sein du tableau 9 les gènes différentiellement exprimés qui sont connus pour intervenir dans la synthèse de composés phénoliques. De façon surprenante, très peu de gènes associés au métabolisme phénolique sont différentiellement exprimés. Parmi les gènes annotés, on retrouve un gène codant une anthocyanine réductase, enzyme impliquée dans la synthèse des tanins (Figure 17; Xie *et al.*, 2003). Ce gène est surexprimé après 14j d'exposition à la chaleur. Deux gènes codant des enzymes très précoces de la voie des composés phénoliques, la PAL et la 4-coumarate:CoA ligase 1 (4CL) sont réprimés après 14j. En raison du peu d'information obtenue sur les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des composés phénoliques, nous avons choisi d'effectuer une analyse plus fine de l'expression de ces gènes par RT-PCR quantitative (voir chapitre I.3).

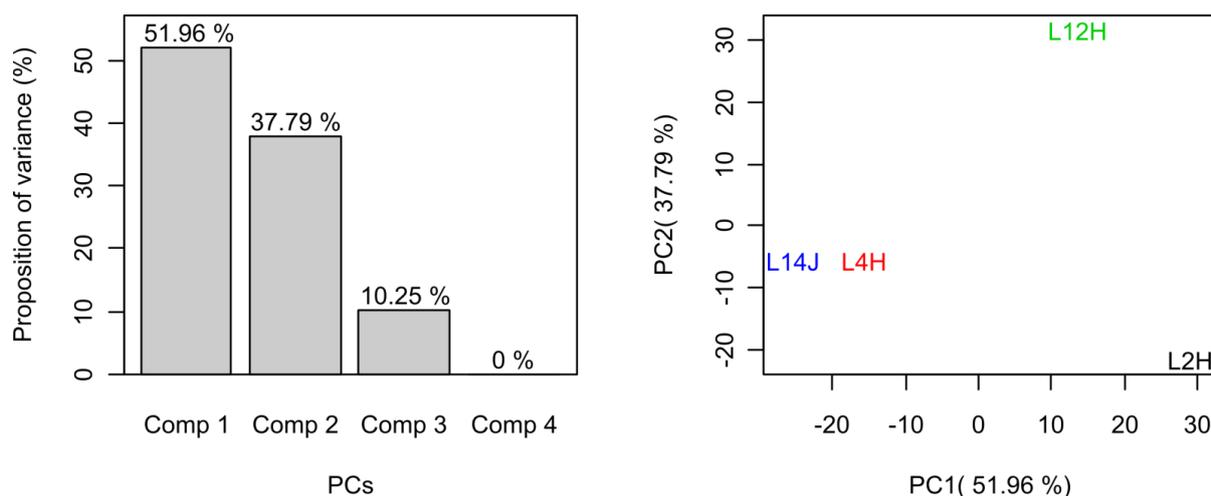
1.2.2. Effet de la lumière sur le transcriptome des baies de raisin

L'analyse transcriptomique est réalisée à partir d'ARNs totaux extraits de baies exposées à la lumière selon les modalités expérimentales décrites dans le paragraphe I.1.

Une ACP effectuée sur les gènes différentiellement exprimés (p -value ajustée < 0.01 , niveaux d'expression $> 1,7$ ou $< 0,6$) révèle une répartition des variations observées différente de celle obtenue en réponse au stress thermique (Figure 20). La composante principale 1 expliquant 52% de la variance permet de discriminer les baies ayant été exposées au stress lumineux pendant 4h (L4H) et pendant 14j (L14J) des baies soumises au stress pendant 2h (L2H) et 12h (L12H). La composante principale 2 permet de séparer les échantillons L2H et L12H en expliquant 37,8% de la variance totale observées.

Le nombre de gènes induits après 2h d'exposition à la lumière s'élève à 497 alors que 55 sont réprimés (Tableau 10). Cette tendance s'inverse après 4h avec 42 gènes sur-exprimés et 178 gènes sous-exprimés. Après 12h de traitement, un grand nombre de gènes affectés par le stress (395 induits et 223 réprimés) est à nouveau observé. Enfin, 44 gènes sont sur-exprimés et 109 gènes sous-exprimés après 14j de traitement. De façon remarquable, un seul gène voit son expression modifiée tout au long de la cinétique (Figure 21). L'expression de ce gène, qui code une métallothionéine, est stimulée pendant les 14 j de traitement. Quarante-trois

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt



Durée de traitement	2h	4h	12h	14j
Nombre de gènes induits	497	42	395	44
nombre de gènes réprimés	55	178	223	109
Total	552	220	618	153

Tableau 10. Nombre de gènes différentiellement exprimés (p.value ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies raisin exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) par rapport à des baies témoins.

pourcents des transcrits qui s'accumulent et 67% de ceux qui sont réprimés après 2h de traitement ne le sont plus après une exposition plus longues au stress lumineux. Néanmoins, on observe 69 gènes induits et 10 gènes réprimés après 2h et de nouveau après 12h de traitement. Parmi les gènes différentiellement exprimés après 4h d'exposition au stress lumineux, de nombreux gènes réprimés (52%) restent sous-exprimés après une période d'exposition au stress plus longue. Un grand nombre de gènes sont sur-exprimés (309 gènes) ou sous-exprimés (140 gènes) uniquement après 12h d'exposition lumineuse. Enfin, seul un petit nombre de gènes est induit (38 gènes) ou réprimé (35 gènes) après 14j de traitement.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

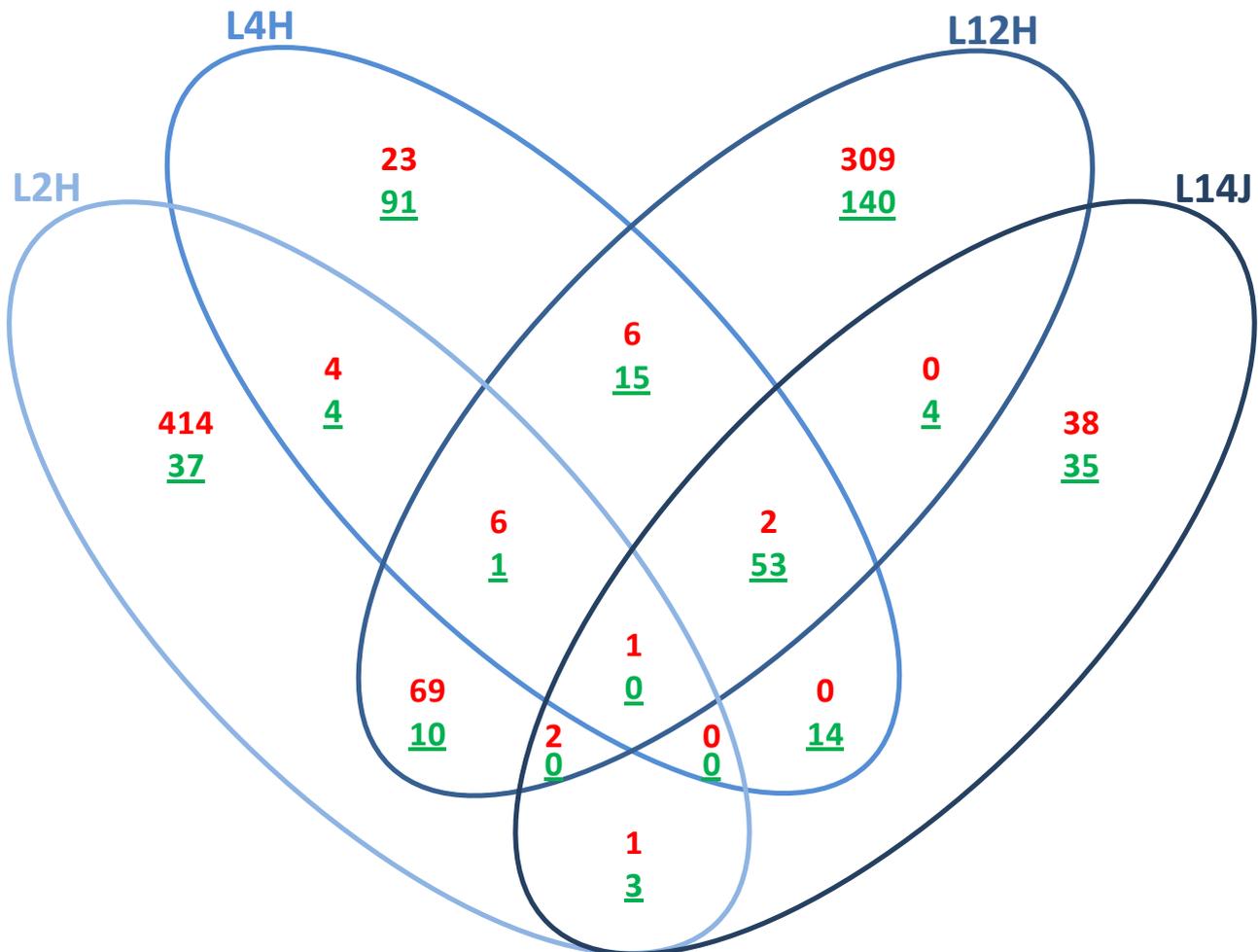


Figure 21. Diagramme d'Euler représentant les gènes induits (en rouge) et réprimés (en vert) (p .value ajustée < 0.01 , avec un niveau d'expression $>1,7$ ou $<0,6$) selon la durée d'exposition des baies au stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

exposition des baies pendant 2h (L2H), 4h (L4H), 12h (L12H) et 14j (L14J)

Afin d'affiner ces observations, une étude de la distribution de ces gènes par catégories fonctionnelles a été effectuée selon l'ontologie MapMan (Thimm *et al.*, 2004; Rotter *et al.*, 2009) (Figure 22). La catégorie la plus affectée par le traitement lumineux est la catégorie « gènes associés au stress ». Le pourcentage de gènes appartenant à cette catégorie par rapport au nombre total de gènes différentiellement exprimés oscille entre 5% pour la condition L2H et 16% pour la condition L14J. Les deux autres catégories fonctionnelles les plus affectées sont les gènes associés aux processus de développement (L4H : 17 gènes et L14J : 10 gènes) et les gènes associés aux modifications protéiques (L2H : 48 gènes et L12H : 53 gènes).

Parmi les gènes identifiés comme étant associés aux stress, on remarque la présence de nombreux gènes codant des HSPs et sensiblement les mêmes que ceux retrouvés dans les

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

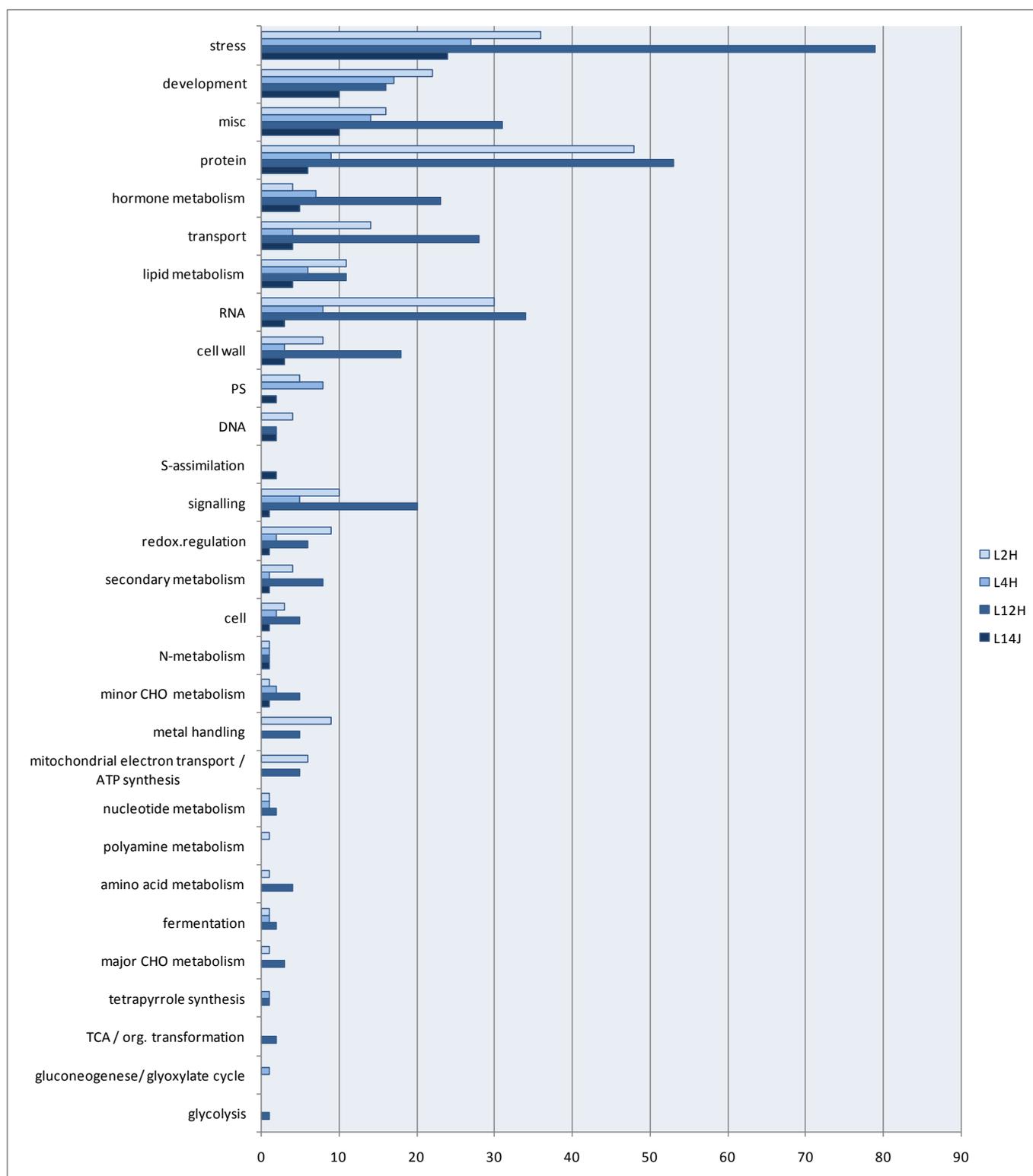


Figure 22. Regroupement par catégories fonctionnelles (Mapman) des gènes différentiellement exprimés (p .value ajustée $<0,01$, avec un niveau d'expression $>1,7$ ou $<0,6$) dans les baies de raisin exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons).

exposition des baies pendant 2h (L2H), 4h (L4H), 12h (L12H) et 14j (L14J)

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

baies exposées au stress thermique (tableau 11). Ainsi, on retrouve une accumulation rapide et transitoire des transcrits correspondant aux gènes du groupe 2 (voir tableau 6), à savoir les gènes codant les protéines HSP 18.8kDa, PM31, HSP20, PMT10 et RD22-b. D'autres *HSPs* voient leur expression induite uniquement après 12h de traitement tels que le couple *HSP70/HSP40* ou bien les *HSP90* et *HSP101*. Après 12h de traitement lumineux, plusieurs gènes sont fortement et transitoirement réprimés. Il s'agit notamment du gène *SNII* qui code un régulateur négatif de la réponse systémique acquise (SAR) (Li *et al.*, 1999), du gène *TUMOROUS SHOOT DEVELOPPEMENT 2* codant une pectine méthyltransférase intervenant dans l'adhésion cellulaire (Krupková *et al.*, 2007) et du gène *EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 4* (Lisso *et al.*, 2005).

Concernant les gènes classés dans la catégorie «développement», on retrouve de nouveau des gènes présentant des profils d'expression similaires à ceux observés dans les baies exposées au stress thermique (*preproMP73*, *D-34*, *LEA4* et *7S GLOBULIN*) (Tableau 12). D'autres gènes présentent également un profil d'accumulation rapide après 2h d'exposition, puis une répression plus ou moins longue pendant la suite du traitement. Parmi ces gènes, on peut citer un gène *EMB*, codant une protéine requise pour le développement de l'embryon (Tzafrir *et al.*, 2004), un gène *LEA* et un gène codant une protéine appelée EARLY NODULIN 93 (You *et al.*, 2003). De manière intéressante, le gène LATE BLOOMER 1 est induit après 14j d'exposition à la lumière. Hecht *et al.* (2007) ont montré que, chez le Pois, ce gène peut affecter l'expression d'autres gènes impliqués dans le cycle circadien de la plante.

Le tableau 13 regroupant les gènes de la catégorie fonctionnelle « protéine » met en évidence trois groupes. Le premier est formé par des gènes dont les transcrits s'accumulent rapidement et transitoirement après 2h d'exposition au stress lumineux. Ce groupe se caractérise par la présence de nombreux gènes codant des protéines présentant des domaines « finger », permettant les liaisons avec d'autres molécules de type ADN, ARN, protéines et même lipides (Berg, 1990; Joazeiro and Weissman, 2000). Ce groupe inclut *ATL3* qui code une ubiquitine ligase intervenant dans les réponses de défense chez *Arabidopsis thaliana* (Serrano and Guzmán, 2004). Un deuxième groupe inclut les gènes dont l'expression est élevée uniquement après 12h de traitement. Plusieurs gènes codant des HSPs (*HSP100*, *HSP60*) figurent dans ce cluster. Un troisième groupe, qui se caractérise par une répression transitoire après 12h d'exposition au stress lumineux, comprend notamment plusieurs gènes codant des protéines phosphatases telles que *PK11-C1*, dont l'expression est induite par l'ABA (Lee *et al.*, 1998).

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Gene	Homologies	L2H	L4H	L12H	L14J
GSVIVT01016426001	Small heat shock protein 17.1 kDa	0,75	1,24	27,67	NA
GSVIVT01016572001	Peroxisomal small heat shock protein	1,06	1,20	12,63	1,08
GSVIVT01028856001	Heat shock protein 83 n=1	0,67	0,98	12,23	1,01
GSVIVT01038631001	Heat shock protein 26 (Type I)	1,37	0,63	5,72	0,92
GSVIVT01016413001	Chaperone	1,76	0,97	4,45	0,71
GSVIVT01017322001	26.5 kDa heat shock protein	1,96	0,24	4,43	0,75
GSVIVT01017960001	70kD heat shock protein	1,10	0,47	4,10	0,95
GSVIVT01009931001	Endoplasmic homolog	0,84	1,12	2,83	1,30
GSVIVT01014782001	DnaJ-like protein (HSP40)	1,69	0,75	2,41	0,78
GSVIVT01028094001	ER DnaJ-like protein 1 (HSP40)	0,86	1,01	2,33	1,14
GSVIVT01017020001	Cc-nbs-Irr resistance protein	0,98	0,99	2,29	0,99
GSVIVT01021112001	Heat shock protein DnaJ (HSP40)	1,15	1,26	2,25	1,29
GSVIVT01038380001	Os02g0710900 protein	0,98	1,06	2,08	1,34
GSVIVT01037910001	NtPRp27	1,32	0,92	2,06	0,49
GSVIVT01005380001	Bax inhibitor	0,97	0,91	2,05	0,92
GSVIVT01004352001	Phosphosulfolactate synthase-related protein	0,66	0,92	2,03	0,90
GSVIVT01038380001	Os02g0710900 protein	0,88	1,07	1,99	1,25
GSVIVT01024994001	HSC70-1 (HEAT SHOCK COGNATE PROTEIN 70-1)	1,01	1,16	1,97	1,29
GSVIVT01003469001	Heat shock protein 90	0,88	1,05	1,82	1,26
GSVIVT01015389001	Heat stress transcription factor C-1	1,05	0,97	1,63	0,95
GSVIVT01007880001	Heat shock protein 101	0,96	1,02	1,60	1,14
GSVIVT01037015001	Basic form of pathogenesis-related protein 1	1,03	1,18	1,16	0,53
GSVIVT01038056001	Disease resistance protein	0,49	0,78	0,95	5,38
GSVIVT01037631001	Gag-pol polyprotein	0,59	0,77	0,67	1,12
GSVIVT01021562001	Early-responsive to dehydration 4	0,69	0,92	0,41	1,09
GSVIVT01022775001	AT4G19120 protein	0,72	0,95	0,40	1,45
GSVIVT01009043001	TSD2 (TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT 2)	0,77	1,08	0,61	1,00
GSVIVT01021150001	SNI1	0,82	0,94	0,28	1,81
GSVIVT01009646001	SCUTL2	1,09	1,17	0,52	0,90
GSVIVT01037631001	Gag-pol polyprotein	1,61	0,79	1,06	0,92
GSVIVT01023629001	Stress-induced hydrophobic peptide (Fragment)	1,69	0,98	1,05	0,87
GSVIVT01013665001	HSP20	2,59	0,23	0,57	0,97
GSVIVT01008797001	SAM-dependent méthyltransférase PMT10	2,92	0,22	0,51	0,69
GSVIVT01015390001	Rd22-b	2,08	0,30	0,43	0,57
GSVIVT01013663001	Seed maturation protein PM31	3,52	0,19	0,35	0,37
GSVIVT01035437001	18.8 kDa class II heat shock protein	11,94	NA	0,08	0,11

Tableau 11. Liste de gènes classés dans la catégorie « stress » et différenciellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) par rapport à des baies témoins.

exposition des baies pendant 2h (L2H), 4h (L4H), 12h (L12H) et 14j (L14J)

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Gene	Homologies	L2H	L4H	L12H	L14J
GSVIVT01008595001	N3 protein	0,31	0,91	0,74	1,21
GSVIVT01035651001	EMBYO FLOWERING 1-like protein (Fragment)	0,42	0,75	0,74	1,00
GSVIVT01020162001	EMB2016 (embryo defective 2016)	0,50	1,00	0,79	1,02
GSVIVT01015207001	Expressed protein O80572	1,68	0,35	0,46	0,56
GSVIVT01015039001	Expressed protein Q8GRN0	0,70	0,48	1,28	0,90
GSVIVT01012153001	Os06g0665100 protein	1,00	0,51	1,54	0,91
GSVIVT01001173001	Gb AAD31369.1	0,62	0,96	0,55	1,13
GSVIVT01025045001	Legumin-like protein	0,75	1,08	0,59	1,04
GSVIVT01011343001	Os05g0506000 protein	0,88	1,04	0,86	1,97
GSVIVT01001405001	LATE BLOOMER 1	0,82	1,12	0,75	1,76
GSVIVT01014742001	AT1G30475 protein	1,87	1,13	0,84	0,90
GSVIVT01033590001	Embryo-abundant protein EMB	1,93	0,89	1,37	0,88
GSVIVT01033739001	LEA protein group 3	2,88	0,17	0,55	0,76
GSVIVT01019005001	PreproMP73	2,89	0,25	0,39	0,56
GSVIVT01025139001	7S globulin	2,93	0,32	0,53	0,40
GSVIVT01001186001	Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g03100	2,96	0,30	0,73	0,91
GSVIVT01017985001	Late embryogenesis abundant protein D-34	3,54	0,12	0,32	0,52
GSVIVT01033504001	Seed maturation protein LEA 4	5,88	0,13	0,30	0,31
GSVIVT01015498001	Early nodulin 93 protein	11,49	0,15	0,97	0,88

Tableau 12. Liste de gènes classés dans la catégorie « développement » et différentiellement exprimés (p.value ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) par rapport à des baies témoins.

exposition des baies pendant 2h (L2H), 4h (L4H), 12h (L12H) et 14j (L14J)

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Gene	Homologies	L2H	L4H	L12H	L14J
GSVIVT01006037001	Vacuolar-processing enzyme	3,22	0,27	0,54	0,45
GSVIVT01018182001	Transport protein subunit-like	2,64	1,04	1,67	0,81
GSVIVT01017756001	Ribosomal protein S21e	2,36	1,07	1,37	0,99
GSVIVT01003320001	Cystatin	2,29	1,20	2,25	0,91
GSVIVT01008551001	Os06g0653900 protein	2,18	1,07	1,36	0,87
GSVIVT01028792001	AT5G52882 protein	1,99	1,02	1,25	0,94
GSVIVT01019698001	Os04g0581300 protein	1,89	0,98	1,28	0,83
GSVIVT01024832001	Small zinc finger-like protein	1,89	1,05	1,38	0,84
GSVIVT01032507001	RING-H2 finger protein ATL3I	1,87	1,05	1,34	0,83
GSVIVT01032507001	RING-H2 finger protein ATL3I	1,85	1,04	1,31	0,84
GSVIVT01028415001	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog 2	1,82	1,11	1,39	0,88
GSVIVT01007800001	RING-H2 finger protein ATL3I	1,80	1,00	0,96	0,82
GSVIVT01008600001	Small zinc finger-like protein (Fragment)	1,73	1,16	1,42	0,86
GSVIVT01017833001	50S ribosomal protein L33	1,72	0,94	1,09	0,99
GSVIVT01035019001	Mitochondrial import inner membrane translocase, subunit Tim17/22	1,72	0,44	0,87	0,92
GSVIVT01030430001	GmATG8d protein	1,71	1,04	1,06	0,85
GSVIVT01038617001	Polyubiquitin	1,65	1,07	1,34	0,91
GSVIVT01018312001	Tubulin-specific chaperone A	1,63	1,08	1,19	0,86
GSVIVT01031287001	Os07g0454700 protein	1,63	1,02	1,40	0,82
GSVIVT01036450001	F1N21.7	1,61	1,10	1,06	0,84
GSVIVT01010486001	F-box protein At1g67340	1,61	1,06	1,42	0,81
GSVIVT01015545001	Ribosomal protein L36	1,61	1,05	1,12	0,84
GSVIVT01021265001	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 276	1,26	0,93	9,68	0,98
GSVIVT01035900001	ClpB (HSP100)	0,91	1,00	4,06	1,06
GSVIVT01025741001	UBA-like	1,51	1,41	3,31	1,13
GSVIVT01034233001	CBL-interacting protein kinase 05	1,29	0,89	2,93	1,19
GSVIVT01029025001	GroEL-like chaperone (HSP60), ATPase	1,16	0,94	2,67	1,02
GSVIVT01029025001	GroEL-like chaperone (HSP60), ATPase	0,79	1,02	2,38	1,11
GSVIVT01031526001	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic	0,93	1,02	2,32	1,22
GSVIVT01025490001	GloEL protein (HSP60); chaperonin, 60 kDa	0,69	1,07	2,16	1,26
GSVIVT01033920001	40S ribosomal protein S17	1,41	0,97	2,01	0,80
GSVIVT01011496001	Heat shock protein	0,95	0,93	1,91	1,23
GSVIVT01035722001	AT1G80400 protein	1,10	0,88	1,84	0,94
GSVIVT01018077001	ADP ribosylation factor-like protein	1,04	0,95	1,83	0,89
GSVIVT01034358001	F14I3.4 protein	0,80	1,05	1,76	1,14
GSVIVT01023274001	transmembrane protein Mlo4	1,09	0,95	1,72	0,89
GSVIVT01013374001	At1g76360	1,06	0,99	1,66	1,08
GSVIVT01037416001	SNF1-related protein kinase regulatory beta subunit 1	0,96	1,28	1,63	1,20
GSVIVT01014777001	cytochrome oxidase assembly factor	0,82	0,94	1,63	1,13
GSVIVT01025673001	At3g09760/F8A24.19	0,85	0,58	1,10	0,84
GSVIVT01025673001	At3g09760/F8A24.19	0,83	0,58	1,06	0,84
GSVIVT01036694001	Chloroplast nucleoid DNA binding protein-like	0,56	0,94	0,82	1,31
GSVIVT01014171001	Sec61 transport protein	0,62	0,91	0,78	1,03
GSVIVT01006035001	Elongation factor G, chloroplastic	0,61	1,10	0,73	1,18
GSVIVT01007775001	Protein kinase	0,61	0,81	0,63	0,94
GSVIVT01032814001	Os01g0832900 protein	1,18	0,57	0,60	0,88
GSVIVT01031195001	Protein phosphatase 2C-like	0,86	1,19	0,60	1,04
GSVIVT01016735001	Cation/calcium exchanger 4	0,67	1,02	0,59	1,29
GSVIVT01026257001	Os12g0631200 protein	0,75	1,19	0,58	1,21
GSVIVT01004839001	PK11-C1	1,02	0,91	0,58	1,11
GSVIVT01025743001	Dual specificity protein phosphatase	0,95	0,82	0,56	0,95
GSVIVT01025743001	Dual specificity protein phosphatase	0,94	0,81	0,55	1,15
GSVIVT01017910001	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 58, chloroplastic	1,02	1,14	0,55	0,78
GSVIVT01026053001	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-3	0,78	0,77	0,53	0,97
GSVIVT01037059001	1-O-acylglucose:anthocyanin-O-acyltransferase-like protein	1,27	1,03	0,51	1,15
GSVIVT01021231001	CBL-interacting protein kinase 16	0,70	0,87	0,50	0,94
GSVIVT01022771001	Myb-binding protein	0,68	0,89	0,47	1,08
GSVIVT01031781001	Os07g0656900 protein (Fragment)	0,68	1,01	0,42	0,99

Tableau 13. Liste de gènes classés dans la catégorie « protéine » et différentiellement exprimés (p.valeur ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) par rapport à des baies témoins.

exposition des baies pendant 2h (L2H), 4h (L4H), 12h (L12H) et 14j (L14J)

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Gene	Homologies	L2H	L4H	L12H	L14J
GSVIVT01030112001	Acetyl-CoA C-acetyltransferase	0,79	0,89	0,62	1,12
GSVIVT01037077001	Isoflavone reductase-like protein 2	1,02	1,00	0,52	1,12
GSVIVT01026629001	Cinnamyl alcohol dehydrogenase-like protein	1,27	0,48	1,23	0,96
GSVIVT01019691001	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	1,29	0,92	1,89	0,95
GSVIVT01029183001	4-coumarate:CoA ligase 1	1,04	1,03	2,03	0,92
GSVIVT01006396001	Anthocyanidin reductase	1,31	1,13	3,74	1,06

Tableau 14. Liste de gènes classés dans la catégorie « métabolisme secondaire » et différenciellement exprimés (p.value ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) dans les baies de raisin exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) par rapport à des baies témoins.

exposition des baies pendant 2h (L2H), 4h (L4H), 12h (L12H) et 14j (L14J)

Comme dans le cas du stress thermique, peu de gènes associés au métabolisme secondaire sont affectés après exposition des baies à la lumière (Tableau 14). Seuls 3 gènes sont induits transitoirement après 12h de traitement : *ANR*, *4CL* et *caffeic acid 3-O-methyltransferase*. *A contrario*, 2 gènes sont réprimés transitoirement après 12h de traitement, un gène codant une acétyl-CoA C-acétyltransférase et un gène codant une isoflavone réductase. Enfin, un gène codant une cinnamyl alcohol déhydrogénase est sous-exprimé transitoirement après 4h d'exposition à la lumière.

1.2.3. Comparaison des effets «stress thermique – stress lumineux» sur le transcriptome de la baie de raisin

Afin de comparer les effets respectifs d'un stress thermique ou lumineux sur le transcriptome des baies de raisin, des diagrammes de Venn ont été réalisés pour recenser les gènes induits et réprimés en fonction des temps d'exposition et des stress appliqués (Figure 23). Après 2h de traitement, 110 gènes sont induits à la fois par le stress thermique et le stress lumineux, ce qui correspond respectivement à 49% et 22% des gènes affectés pour chacune des conditions. Au contraire, un seul gène est réprimé dans les deux conditions. Lorsque les durées d'exposition au stress sont prolongées, la tendance est inversée avec des gènes communs majoritairement réprimés (103 gènes réprimés après 4h de traitement, 65 gènes après 12h et 81 gènes après 14j). Il existe par ailleurs un décalage dans les cinétiques d'expression en fonction du stress. En effet, le stress lumineux affecte l'expression de nombreux gènes après 2h et 12h

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

d'exposition, alors que le stress thermique modifie surtout le transcriptome après une exposition prolongée (soit 14 j de traitement ; Tableaux 5 et 6).

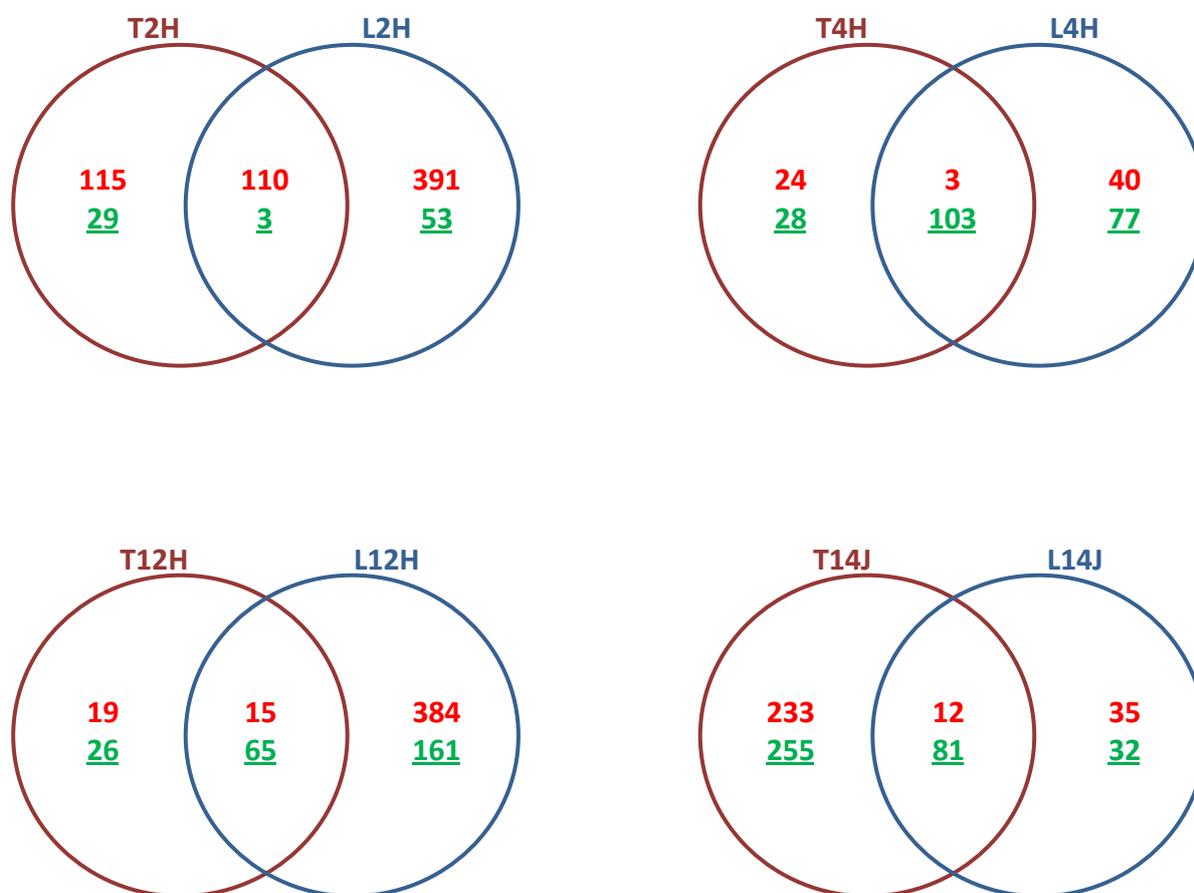


Figure 23. Diagrammes de Venn représentant le nombre de gènes différentiellement induits (en rouge) et réprimés (en vert) (p .value ajustée < 0.01 , avec un niveau d'expression $>1,7$ ou $<0,6$) présents dans les baies soumises à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou à une forte intensité lumineuse ($\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons).

exposition des baies au stress thermique pendant 2h (T2H), 4h (T4H), 12h (T12H) et 14j (T14J) et au stress lumineux pendant 2h (L2H), 4h (L4H), 12h (L12H) et 14j (L14J)

Le rassemblement des gènes annotés induits et réprimés de manière commune entre les deux stress met en évidence une réponse rapide des baies face à la perception d'un stress (Tableaux 15). Dans la catégorie fonctionnelle « stress », on retrouve principalement après 2h, 4h et 12h d'exposition aux stress, les gènes codant PM31, HSP 18,8kDa, RD22-b, PMT10 et HSP20. Il s'agirait donc de la mise en place rapide et transitoire d'un système d'adaptation contre la déshydratation et la dénaturation des protéines. Il est possible que la surexpression de ces gènes sur une courte période soit suffisante pour obtenir une réponse efficace sur le long terme. Le même constat peut être établi pour la catégorie « développement » avec le profil d'expression des gènes codant preproMP73, D-34, LEA4 et 7S GLOBULIN, mais cette fois

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

le mécanisme déclenché porterait sur la protection et la maturation des pépins. De manière intéressante, on trouve également un gène codant une glutamate deshydrogénase (GDH), enzyme qui serait impliquée, chez la Vigne et la Tomate, dans la protection contre le stress oxydatif (Skopelitis *et al.*, 2006). Parmi les gènes intervenant dans la biosynthèse de phénylpropanoïdes, seul un gène de cette voie codant une protéine cinnamyl-alcohol dehydrogenase-like est réprimé après 4h d'exposition à un des deux stress. Cette enzyme appartient à la famille des oxydoréductases et participe à la biosynthèse des phénylpropanoïdes (Halpin *et al.*, 1994).

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Gene	Homologie	Catégorie fonctionnelle	T2H	T4H	T12H	T14J	L2H	L4H	L12H	L14J
GSVIVT01035437001	18.8 kDa class II heat shock protein	stress	22,27	0,05	0,08	0,18	11,94	NA	0,08	0,11
GSVIVT01013663001	Seed maturation protein PM31	stress	6,44	0,32	0,25	0,45	3,52	0,19	0,35	0,37
GSVIVT01015390001	Rd22-b	stress	5,12	0,33	0,30	0,67	2,08	0,30	0,43	0,57
GSVIVT01008797001	SAM-dependant methyltransferase PMT10	stress	4,37	0,20	0,36	0,72	2,92	0,22	0,51	0,69
GSVIVT01013665001	HSP20	stress	3,60	0,27	0,53	0,22	2,59	0,23	0,57	0,97
GSVIVT01017322001	26.5 kDa heat shock protein	stress	3,50	0,25	0,65	2,33	1,96	0,24	4,43	0,75
GSVIVT01017960001	70kD heat shock protein	stress	1,79	0,60	0,81	3,33	1,10	0,47	4,10	0,95
GSVIVT01037910001	NtPRp27	stress	0,89	1,51	2,06	0,35	1,32	0,92	2,06	0,49
GSVIVT01033739001	LEA protein group 3	development	NA	0,18	0,34	NA	2,88	0,17	0,55	0,76
GSVIVT01019005001	PreproMP73	development	7,08	0,27	0,26	0,49	2,89	0,25	0,39	0,56
GSVIVT01017985001	Late embryogenesis abundant protein D-34	development	6,90	0,20	0,31	0,56	3,54	0,12	0,32	0,52
GSVIVT01033504001	Seed maturation protein LEA 4	development	6,74	0,43	0,27	0,36	5,88	0,13	0,30	0,31
GSVIVT01025139001	7S globulin	development	6,30	0,39	0,41	0,55	2,93	0,32	0,53	0,40
GSVIVT01015207001	Expressed protein O80572	development	3,95	0,51	0,46	0,50	1,68	0,35	0,46	0,56
GSVIVT01001186001	Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g03100	development	3,63	0,33	0,57	1,02	2,96	0,30	0,73	0,91
GSVIVT01011650001	Type-b response regulator	RNA	9,34	0,26	0,13	0,32	4,47	0,14	0,25	0,29
GSVIVT01027997001	Os07g0673500 protein	RNA	1,74	0,51	0,73	0,81	1,49	0,42	0,66	0,92
GSVIVT01022885001	Maturase K	RNA	1,16	0,76	1,76	1,96	1,13	0,76	1,44	3,24
GSVIVT01014291001	Ethylene response factor 3	RNA	0,94	0,54	0,67	0,81	1,47	0,58	2,18	0,93
GSVIVT01006037001	Vacuolar-processing enzyme	protein	5,58	0,29	0,51	0,55	3,22	0,27	0,54	0,45
GSVIVT01035019001	Mitochondrial import inner membrane translocase. subunit Tim17/22	protein	2,00	0,42	0,73	0,90	1,72	0,44	0,87	0,92
GSVIVT01032814001	Os01g0832900 protein	protein	1,93	0,43	0,86	0,80	1,18	0,57	0,60	0,88
GSVIVT01013467001	Calmodulin binding protein-like (Fragment)	signalling	2,26	1,32	0,76	2,75	2,18	1,22	4,48	0,95
GSVIVT01009065001	Phi-1 protein	signalling	0,80	1,90	0,88	1,18	0,74	2,14	1,39	0,93
GSVIVT01037212001	(1-4)-beta-mannan endohydrolase	cell wall	1,40	0,95	1,31	0,32	1,73	1,28	1,12	0,58
GSVIVT01032681001	Expansin	cell wall	NA	0,89	0,18	1,02	0,81	0,77	0,15	NA
GSVIVT01002062001	TSJT1-like protein	hormone metabolism	2,80	0,90	0,67	0,71	1,73	0,43	0,77	0,52
GSVIVT01011637001	Loganic acid methyltransferase	hormone metabolism	2,07	0,55	0,76	0,68	1,06	0,51	0,90	0,81
GSVIVT01026629001	Cinnamyl alcohol dehydrogenase-like protein	secondary metabolism	2,09	0,52	0,77	1,09	1,27	0,48	1,23	0,96
GSVIVT01009320001	Endoplasmic reticulum [ER]-type calcium ATPase	transport	4,01	0,19	0,35	0,56	1,84	0,26	0,59	0,65
GSVIVT01033402001	GDHb glutamate dehydrogenase	N-metabolism	7,91	0,35	0,25	0,49	10,43	0,10	0,39	0,31
GSVIVT01024740001	UPA14	minor CHO metabolism	12,06	0,07	0,13	0,12	14,22	0,09	0,18	0,09
GSVIVT01037706001	Aspartate carbamoyltransferase 2	nucleotide metabolism	2,23	0,41	0,49	0,57	1,65	0,34	0,60	0,65
GSVIVT01017666001	1-cys peroxiredoxin	redox regulation	7,40	0,13	0,20	0,47	6,36	0,13	0,24	0,31
GSVIVT01023133001	SAM binding motif	amino acid metabolism	0,71	1,56	2,14	1,19	NA	NA	1,89	1,09
GSVIVT01017850001	Pyruvate. phosphate dikinase	gluconeogenesis/ glyoxylate cycle	1,67	0,54	0,88	0,82	1,29	0,48	0,83	0,86
GSVIVT01011791001	GDSL esterase/lipase 6	misc	6,17	0,52	0,60	0,63	1,24	0,48	0,68	0,47
GSVIVT01036430001	STO-1	misc	4,01	0,59	0,48	0,62	2,09	0,34	0,65	0,55
GSVIVT01037131001	GDSL esterase/lipase At1g71250	misc	3,68	0,41	0,63	0,90	1,36	0,47	0,74	0,85
GSVIVT01005061001	AT3g50440/T20E23_40	misc	3,49	0,21	0,86	0,39	3,00	0,42	0,11	0,28
GSVIVT01008578001	Steroleosin	misc	3,45	0,38	0,56	0,69	1,83	0,37	0,72	0,64
GSVIVT01019420001	Cellulase (Fragment)	misc	2,47	0,36	1,11	0,86	1,30	0,53	0,63	0,85
GSVIVT01019420001	Cellulase (Fragment)	misc	2,43	0,42	1,09	0,83	1,20	0,47	0,58	0,81
GSVIVT01018598001	Ripening-related protein-like	misc	0,73	NA	2,91	5,98	NA	1,34	NA	4,56
GSVIVT01031627001	Os05g0569500 protein	not assigned	15,64	0,10	0,12	0,45	8,42	0,08	0,19	0,28
GSVIVT01021299001	Os01g0728700 protein	not assigned	9,10	0,20	0,25	0,57	5,88	0,11	0,42	0,52
GSVIVT01018974001	Os03g0723400 protein	not assigned	6,55	0,17	0,46	0,53	4,48	0,17	0,51	0,50
GSVIVT01001313001	Os10g0507500 protein	not assigned	4,34	0,36	0,40	0,76	2,03	0,31	0,59	0,60
GSVIVT01037708001	integral membrane protein	not assigned	4,15	0,42	0,63	0,83	2,10	0,39	0,82	0,77
GSVIVT01028976001	Low-temperature-induced 65 kDa protein	not assigned	3,60	0,42	0,57	0,72	1,78	0,36	0,78	0,62
GSVIVT01017731001	protein binding	not assigned	3,28	0,21	0,31	0,74	2,03	0,30	0,60	0,59
GSVIVT01027980001	Stress-related protein	not assigned	2,74	0,29	1,20	0,43	1,94	0,43	0,32	0,43
GSVIVT01011760001	DnaJ-like protein	not assigned	2,69	0,99	0,87	3,87	2,18	0,67	1,40	1,46
GSVIVT01029274001	Emb CAB10440.1	not assigned	2,59	0,44	0,73	0,91	3,69	0,34	0,72	0,86
GSVIVT01028976001	Low-temperature-induced 65 kDa protein	not assigned	2,45	0,44	0,74	0,79	1,42	0,53	0,85	0,66
GSVIVT01019149001	F16G16.9 protein (Fragment)	not assigned	2,35	0,56	0,81	1,04	1,20	0,57	0,70	0,94
GSVIVT01000923001	Bcl-2-associated athanogene-like protein	not assigned	2,35	1,88	0,50	9,15	1,89	1,01	2,52	1,45
GSVIVT01032348001	F4P13.22 protein	not assigned	2,20	0,68	0,60	0,78	0,87	0,64	0,24	0,91
GSVIVT01032743001	Protease inhibitor 2 (Fragment)	not assigned	1,88	0,66	0,92	0,47	4,79	1,04	1,43	0,83
GSVIVT01033785001	Phytosulfokine-beta	not assigned	1,17	0,91	0,84	0,46	2,05	1,27	1,31	0,58
GSVIVT01028227001	Catalytic/ hydrolase	not assigned	0,92	1,03	0,91	0,53	0,89	1,11	0,57	0,59
GSVIVT01022253001	Os05g0535500 protein	not assigned	0,60	2,03	1,97	NA	NA	2,50	1,91	0,72
GSVIVT01012636001	Thiamin biosynthetic enzyme	not assigned	0,57	1,05	0,80	2,43	0,54	1,14	0,88	1,34

Tableau 15. Liste de gènes différentiellement exprimés (p.value ajustée < 0.01, avec un niveau d'expression >1,7 ou <0,6) présents à la fois dans les baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}C$) ou à une forte intensité lumineuse ($\Delta I=+850 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ de photons) pour au moins un temps d'exposition.

exposition des baies au stress thermique pendant 2h (T2H), 4h (T4H), 12h (T12H) et 14j (T14J) et au stress lumineux pendant 2h (L2H), 4h (L4H), 12h (L12H) et 14j (L14J)

I.3. Approche ciblée : analyse des profils d'expression de gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes dans des baies exposées aux stress

Les données générées par l'approche transcriptomique n'ayant pas apportées d'informations précises sur le comportement des gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes dans les baies stressées, nous avons choisi d'étudier les profils d'expression de ces gènes par PCR quantitative en temps réel. Cette analyse a été réalisée à partir d'ARNs totaux extraits de baies exposées au stress soit à partir de la véraison, soit pendant la phase de maturation (trois semaines après la véraison). Dans le premier cas, le stress a été appliqué pendant 17j avec trois temps de prélèvement (1j, 7j et 17j). Dans le second cas, les baies ont subi un stress pendant 21j et des échantillons ont été prélevés après quatre durées de traitement (1J, 7J, 14J et 21J). En choisissant judicieusement les couples d'amorces, l'approche par RT-QPCR permet de bien discriminer différentes isoformes d'un même gène. Ainsi, les profils d'expression de 22 gènes (isoformes incluses) impliqués dans la voie ont pu être établis dans les différentes conditions testées. Ces gènes sont récapitulés dans le tableau 2.

I.3.1. Expression de gènes du métabolisme phénolique dans des baies (stade véraison) exposées à une température élevée

Quelle que soit la durée d'application du traitement, le stress thermique affecte significativement l'expression pour un nombre important des gènes étudiés (Figure 24). Les gènes *C4H2* et *F3H2* sont réprimés de façon transitoire mais importante après 7j de traitement, de même que le gène *ANR* après 1j et 7j. Les gènes *LARI* et *FLS4* sont quant à eux fortement réprimés tout au long du traitement. On peut également relever une légère induction transitoire du gène *UFGT* après 1j. Le stress thermique appliqué à la véraison semble donc réprimer certaines branches de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, ainsi que des gènes intervenant plus généralement dans la voie des composés phénoliques. En effet, les gènes *LARI* et *FLS4* codent des enzymes permettant respectivement la synthèse de tanins et de flavonols. Leur expression par le stress thermique pourrait se traduire par des teneurs moins importantes en tanins et flavonols dans les baies exposées. L'impact d'un stress thermique perçu par des baies au stade véraison pourrait affecter significativement la synthèse des tanins. En effet, l'accumulation de ces composés a lieu principalement pendant la phase herbacée jusqu'à la véraison, puis décroît lentement pendant la maturation (Kennedy, 2002).

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

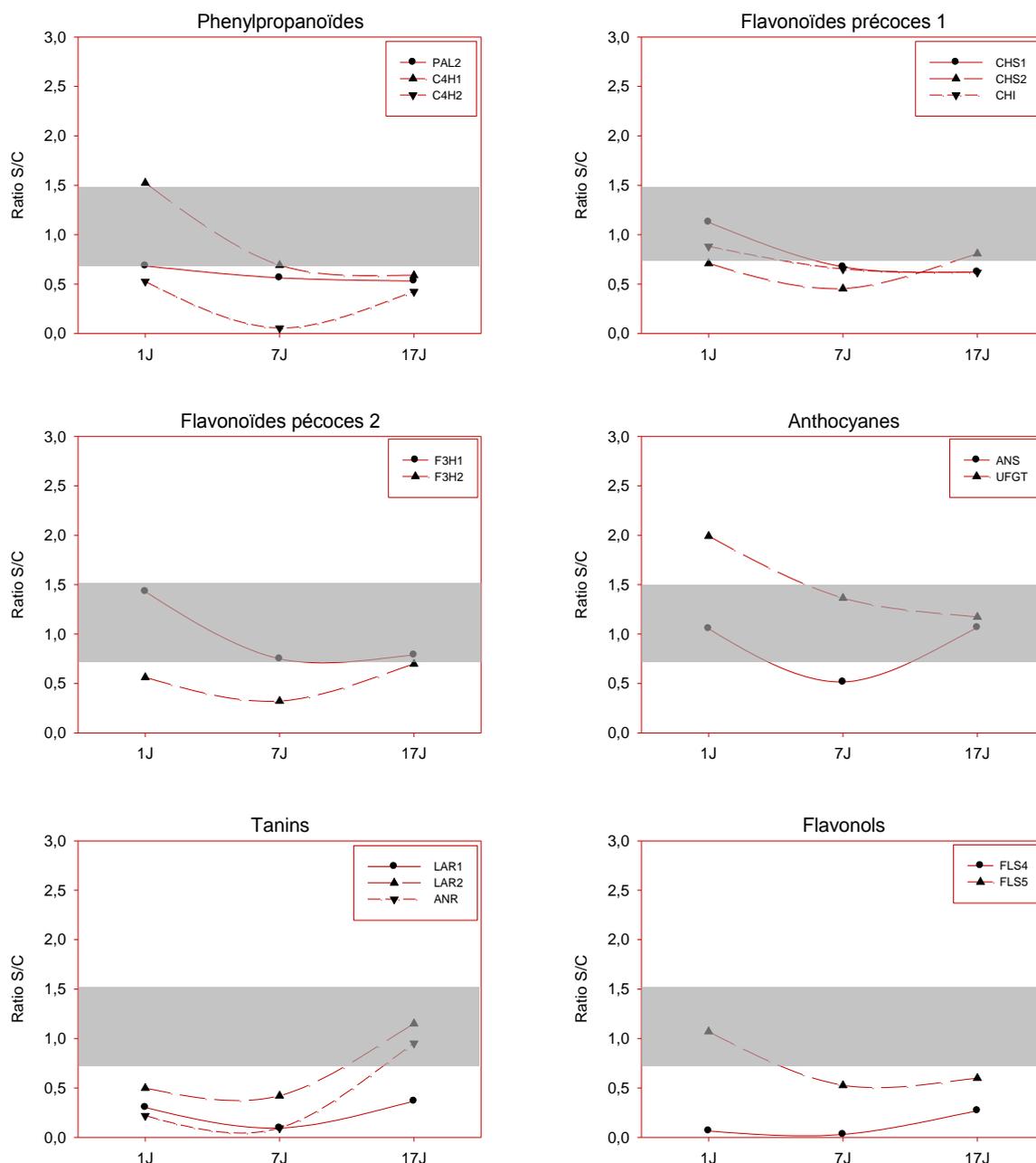


Figure 24. Profils d'expression des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes en réponse à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) appliqué sur les baies de raisin au stade « véraison ». Ces expressions sont exprimées en rapport de l'expression des gènes dans la condition stressée par rapport à la condition témoin (Ratio S/C) en fonction de la durée d'exposition au stress. Les différentes expressions relatives ont été normalisées par rapport à l'expression des gènes *EF1 γ* et *GAPDH*. La zone grisée correspond à la zone où la variation est considérée comme non significative.

PAL, Phénylalanine ammonia lyase; *C4H*, Cinnamate 4 hydrolase; *CHS*, Chalcone synthase; *CHI*, Chalcone isomérase; *F3H*, Flavanone 3 hydrolase; *FLS*, Flavonol synthase; *LAR*, Leucoanthocyanidine réductase; *ANR*, Anthocyanidine réductase; *ANS*, Anthocyanidine synthase; *UFGT*, UDP-Glucose flavonoïde glycosyl transférase

I.3.2. Expression de gènes du métabolisme phénolique dans les baies (stade «+3SAV») exposées à une température élevée

Les profils d'expression des différents gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes ont été étudiés sur des baies au stade «+3SAV» de leur développement. Le stress thermique appliqué pendant 3 semaines (Figure 25) induit de façon biphasique l'expression des gènes situés très en amont de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Ainsi, l'expression de *C4H2* suit une sigmoïde avec un premier pic équivalent à une expression du gène 8 fois plus importante dans les baies stressées que dans les baies témoins après 1j de traitement. Puis son expression se stabilise avant que les transcrits ne s'accumulent de nouveau fortement (plus de 14 fois) après 14j de traitement. Le gène *PAL2* présente le même profil d'expression, bien que les variations soient moins prononcées (gène sur-exprimé 3,5 fois après 14J). L'induction maximale de *C4H1* (x5) est observée après 21j de traitement. Le gène *CHS* marque le début de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. L'isoforme 1 de *CHS* présente un profil d'expression biphasique. Il est fortement exprimé dans les baies stressées pendant 1j, puis ses transcrits reviennent à un niveau basal après 7j et 14j de traitement, avant de s'accumuler de nouveau après 21j. L'expression de *CHS2* présente les mêmes variations avec toutefois une répression transitoire plus marquée, de l'ordre de 2,5 fois. Les transcrits *CHI* ne sont pas influencés par le stress thermique. L'expression de *F3H1* est stimulée 2,5 fois par le traitement thermique après 1j, puis elle est temporairement réprimée après 7j et 14j. La température n'affecte pas l'expression de *F3H2*. Les profils d'expression des gènes *UFGT* et *ANS*, qui codent des enzymes impliquées directement dans la synthèse des anthocyanes, suivent exactement la même tendance, mais avec des différences d'intensité. L'*UFGT* est plus sensible à la chaleur que l'*ANS* avec en moyenne une expression 3 fois supérieure dans les baies stressées jusqu'à 14j d'exposition, expression qui augmente après 21j de traitement. Concernant la voie de biosynthèse des tannins, l'expression de *LARI* est activée temporairement avec une sur-expression maximale après 14j de traitement dans les baies stressées suivie d'une répression après 21j. Les gènes *LAR2* et *ANR* ne semblent pas être influencés par la température même si une légère induction de l'*ANR* après 1j d'exposition est observée. Pour ce qui concerne la biosynthèse des flavonols, l'expression du gène *FLS4* est assez fortement stimulée après 14j de traitement (5,5 fois) et demeure élevée après 21j (3,5 fois). Une autre isoforme de ce gène, *FLS5*, est nettement réprimée à partir de 7j. Une répression du gène *FLS3* est également observée, bien que plus tardive (21J). Les autres gènes étudiés, à savoir *AMI*, *AM3*, *AOMT*, *TAU1*, *TAU2.1* et *TAU2.2* interviennent dans le transport

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

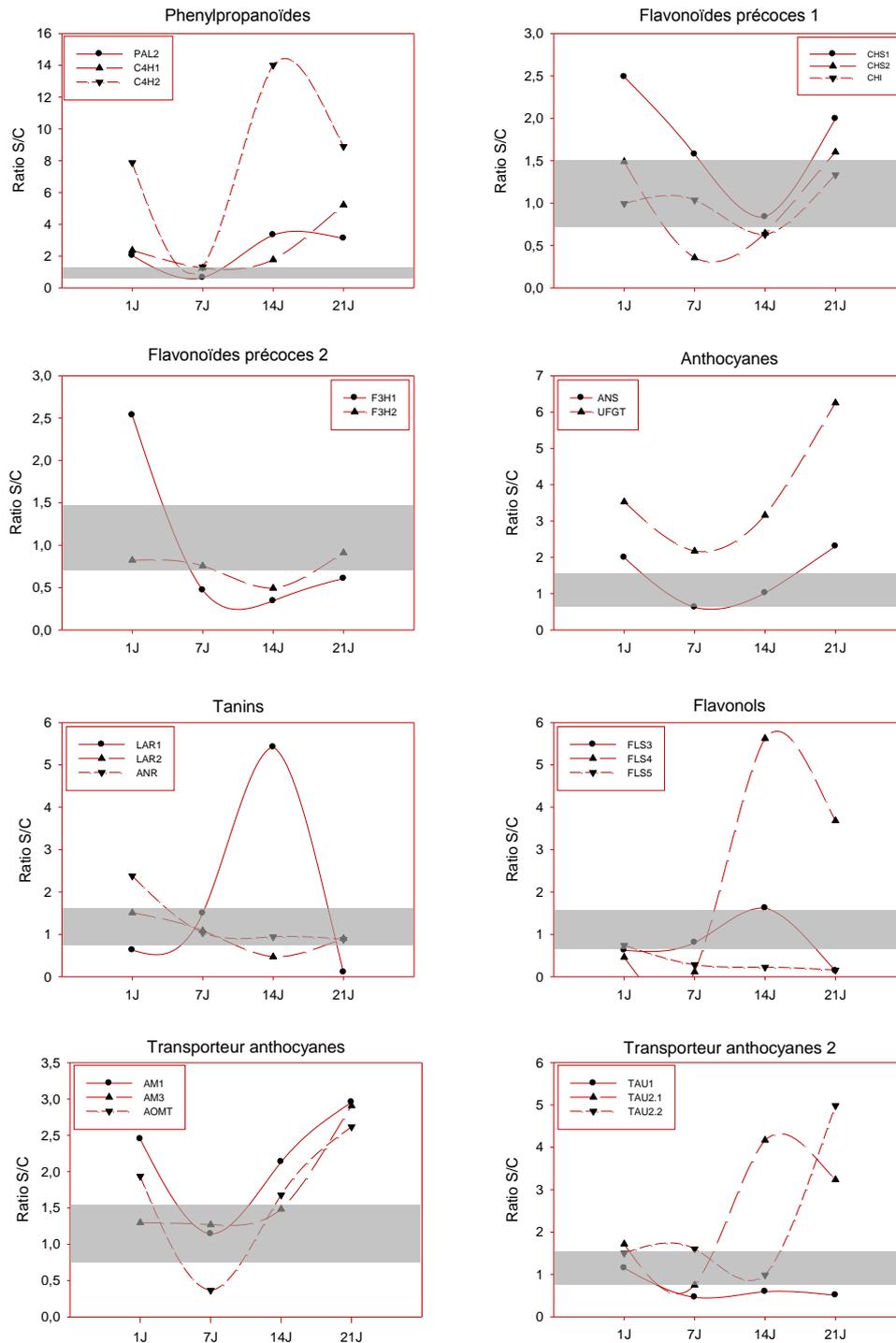


Figure 25. Profils d'expression des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes en réponse à un stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}\text{C}$) appliqué sur les baies de raisin au stade «+3SAV». Ces expressions sont exprimées en rapport de l'expression des gènes dans la condition stressée par rapport à la condition témoin (Ratio S/C) en fonction de la durée d'exposition au stress. Les différentes expressions relatives ont été normalisées par rapport à l'expression des gènes *EF1 γ* et *GAPDH*. La zone grisée correspond à la zone où la variation est considérée comme non significative.

PAL, Phénylalanine ammonia lyase; *C4H*, Cinnamate 4 hydrolase; *CHS*, Chalcone synthase; *CHI*, Chalcone isomérase; *F3H*, Flavanone 3 hydrolase; *FLS*, Flavonol synthase; *LAR*, Leucoanthocyanidine réductase; *ANR*, Anthocyanidine réductase; *ANS*, Anthocyanidine synthase; *UFGT*, UDP-Glucose flavonoïde glycosyl transférase; *AM*, transporteur AnthoMATE; *AOMT*, anthocyanin-O-méthyltransférase; *TAU*, Glutathion S-transférase

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

et l'accumulation vacuolaire des anthocyanes. L'expression du gène *AMI* suit une courbe parabolique. Son expression est induite après 1j, 14j et 21j d'exposition, malgré un retour à un niveau basal après 7j. L'expression du gène *AOMT* suit la même tendance que celle d'*AMI* avec une répression plus prononcée après 7j de traitement. Le gène *AM3* présente un profil différent avec une induction importante mais tardive (21j). Le gène *TAU1* voit son expression légèrement réprimée à partir de 7j d'exposition à la chaleur. Par contre les transcrits *TAU2.1* et *TAU2.2* s'accumulent significativement après une longue période d'exposition. L'ensemble de ces données montrent que le stress thermique, appliqué pendant 21j consécutifs sur des baies en cours de maturation, n'entraîne aucune répression drastique et/ou prolongée de l'expression des gènes de la voie, mis à part *FLS5* et *TAU1*. En revanche, de nombreux gènes montrent une induction comme *FLS4* ou une répression transitoire de leur expression, comme *CHS2*. Il apparaît donc clairement qu'un stress thermique va affecter la régulation transcriptionnelle de la biosynthèse des composés phénoliques au sein de la baie. Toutefois, les effets observés sont le plus souvent transitoires et donc peu susceptibles d'expliquer à eux seuls des variations dans la teneur des différents polyphénols. En revanche, ces observations soulignent la capacité de la baie à percevoir un stress thermique et à modifier son métabolisme en conséquence.

I.3.3. Expression de gènes du métabolisme phénolique dans des baies (stade véraison) exposées à une lumière intense

Pour la quasi-totalité des gènes testés et associés à la synthèse des composés phénoliques, le stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de photons) appliqué au stade véraison n'a que peu ou pas d'effet. Nos données suggèrent une tendance plus ou moins forte à la répression de ces gènes sur le long terme, avec des profils d'expression très proches pour la plupart des gènes étudiés. Seuls *FLS4* et *ANR* présentent des profils d'expression contrastés. Ainsi, le stress lumineux entraîne une forte accumulation des transcrits *FLS4* pendant toute la durée d'application du stress (Figure 26). Inversement, l'expression du gène *ANR* est réprimée après 7j d'exposition à un fort rayonnement, avant d'être induite après 17j. Seule la voie de biosynthèse des flavonols semble donc affectée de manière constante par le stress lumineux. La synthèse des tanins pourrait quant à elle être affectée de manière transitoire.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

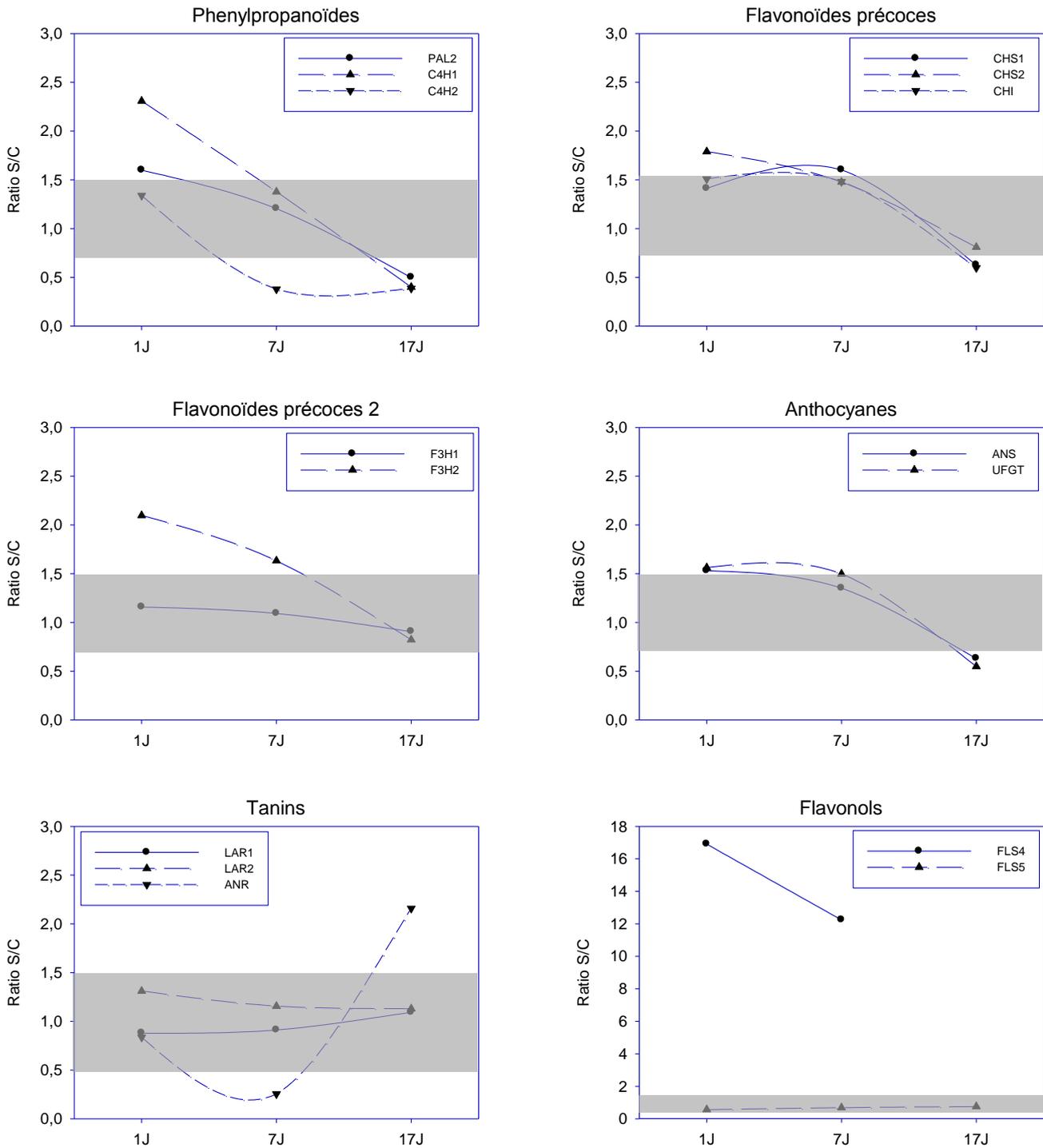


Figure 26. Profils d'expression des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes en réponse à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) appliqué sur les baies de raisin au stade « véraison ». Ces expressions sont exprimées en rapport de l'expression des gènes dans la condition stressée par rapport à la condition témoin (Ratio S/C) en fonction de la durée d'exposition au stress. Les différentes expressions relatives ont été normalisées par rapport à l'expression des gènes *EF1 γ* et *GAPDH*. La zone grisée correspond à la zone où la variation est considérée comme non significative.

PAL, Phénylalanine ammonia lyase; *C4H*, Cinnamate 4 hydrolase; *CHS*, Chalcone synthase; *CHI*, Chalcone isomérase; *F3H*, Flavanone 3 hydrolase; *FLS*, Flavonol synthase; *LAR*, Leucoanthocyanidine réductase; *ANR*, Anthocyanidine réductase; *ANS*, Anthocyanidine synthase; *UFGT*, UDP-Glucose flavonoïde glycosyl transférase
(Note: l'expression de *VvFLS4* après 17j de traitement n'a pas été établi.)

I.3.4. Expression de gènes du métabolisme phénolique dans des baies (stade «+3SAV») exposées à une lumière intense

Les profils d'expression des gènes sélectionnés (Tableau 2) ont été établis suite à l'application d'une forte intensité lumineuse ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) pendant la période de maturation de la baie (Figure 27). Cette analyse révèle que la plupart des gènes testés présentent un profil d'expression sinusoïdal (*C4H1*, *CHS1*, *CHS2*, *CHI*, *F3H1*, *ANS*, *UFGT*, *LARI*, *LAR2*, *ANR*, *FLS3*, *AMI*, *AM3*, *AOMT*, *TAU1* et *TAU2.1*). Pour la majorité de ces gènes, l'expression augmente après 21j de traitement mais dans des proportions relativement faibles (facteur 1,5 à 2,5). Inversement, une intensité lumineuse élevée réprime (entre 3 et 6 fois) les gènes *LARI* et *FLS3* pendant toute la durée du traitement. De nouveau, le gène *FLS4* se révèle être le plus sensible à l'action de la lumière. En effet, ses transcrits s'accumulent très rapidement pour atteindre une induction maximale de l'ordre de 120 fois après 14j d'application du stress. Cette induction est beaucoup plus importante au stade « +3SAV » que dans le cas d'un stress lumineux perçu à la véraison.

Pour quantifier l'impact des changements constatés dans l'expression de nombreux gènes de biosynthèse des composés phénoliques, les concentrations des métabolites correspondants ont été déterminées dans les baies exposées à un stress thermique ou lumineux.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

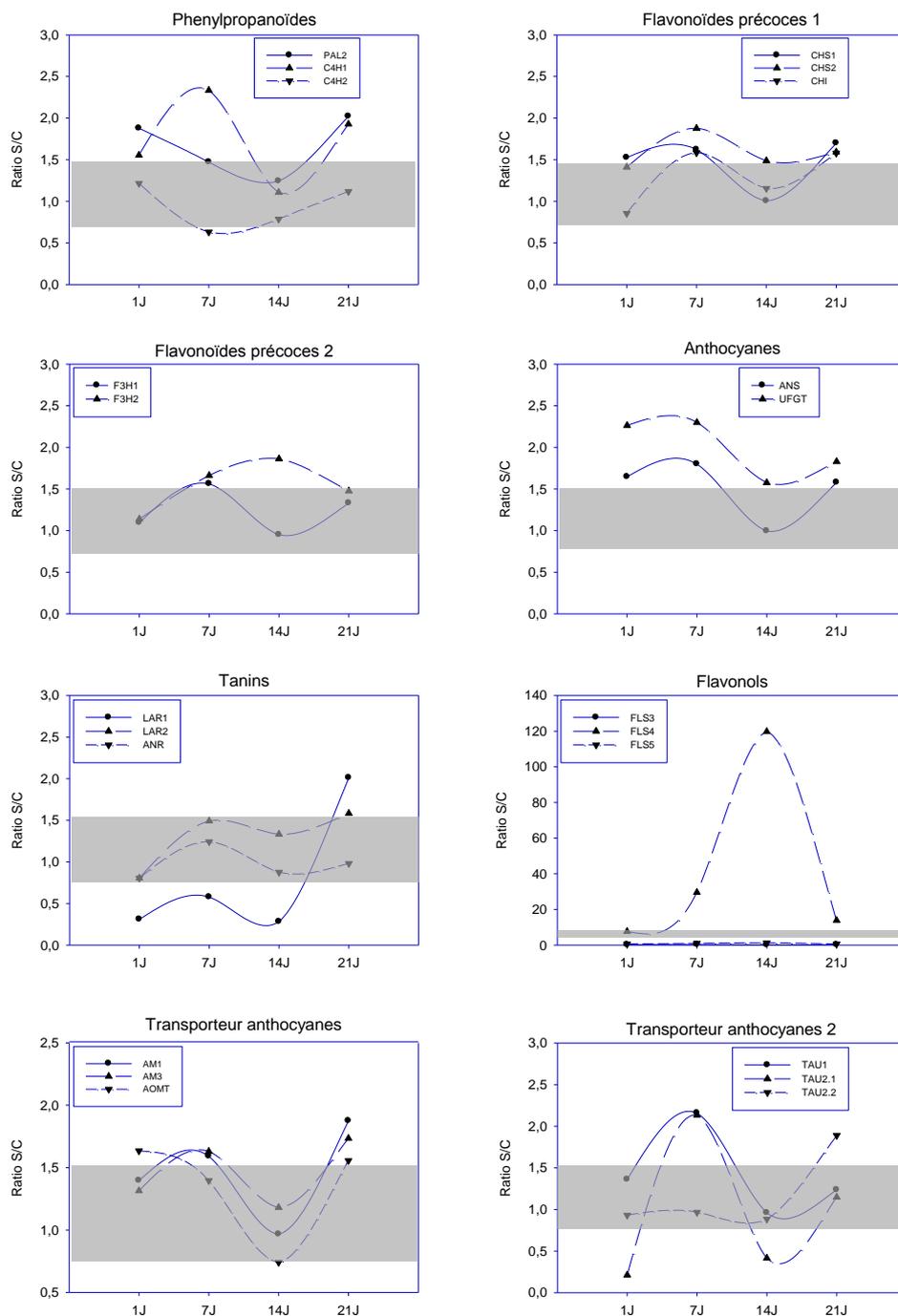


Figure 27. Profils d'expression des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes en réponse à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) appliqué sur les baies de raisin au stade «+3SAV». Ces expressions sont exprimées en rapport de l'expression des gènes dans la condition stressée par rapport à la condition témoin (Ratio S/C) en fonction de la durée d'exposition au stress. Les différentes expressions relatives ont été normalisées par rapport à l'expression des gènes *EF1γ* et *GAPDH*. La zone grisée correspond à la zone où la variation est considérée comme non significative.

PAL, Phénylalanine ammonia lyase; *C4H*, Cinnamate 4 hydrolase; *CHS*, Chalcone synthase; *CHI*, Chalcone isomérase; *F3H*, Flavanone 3 hydrolase; *FLS*, Flavonol synthase; *LAR*, Leucoanthocyanidine réductase; *ANR*, Anthocyanidine réductase; *ANS*, Anthocyanidine synthase; *UFGT*, UDP-Glucose flavonoïde glycosyl transférase; *AM*, transporteur AnthoMATE; *AOMT*, anthocyanin-O-méthyltransférase; *TAU*, Glutathion S-transférase

I.4. Analyse de la composition de la baie de raisin en anthocyanes

L'une des voies qui semblent particulièrement affectées au niveau transcriptionnel par les différents stress appliqués est la biosynthèse des anthocyanes. Ces métabolites ont donc été analysés par HPLC sur des baies ayant subi un stress thermique ou lumineux au moment de la véraison ou trois semaines après la véraison. Le stress a été appliqué respectivement sur 17j et sur 21j, le prélèvement ayant eu lieu dès la fin de l'expérimentation. De façon générale, ces analyses ont révélé la présence de cinq anthocyanidines majeures : delphinidine, cyanidine, pétunidine, péonidine et malvidine. Chacune de ces molécules est présente sous trois formes : glucosidée, acylée et coumarylée. L'impact des stress thermiques et lumineux sur ces molécules dans les baies est décrit ci-dessous.

I.4.1. Composition en anthocyanes des baies exposées à un stress thermique ou lumineux à partir de la véraison

Les anthocyanes sont principalement présentes sous leur forme glucosidée (Figure 28). Le stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}\text{C}$) a entraîné une forte diminution des quantités des cinq formes d'anthocyanidines glycosilées (ou anthocyanosides). Les métabolites les plus touchés sont la cyanidine glucoside (teneur réduite de 88%) et la delphinidine glucoside (teneur réduite de 78%). Les mêmes observations sont valables pour les formes acylée et coumarate des anthocyanidines, hormis la malvidine acylée et la malvidine coumarate dont les concentrations augmentent (respectivement +39% et +66%). A *contrario*, le stress lumineux n'a aucun effet sur l'ensemble des métabolites dosés dans le cadre de notre étude. Parmi tous les gènes codant des enzymes du métabolisme phénolique et dont l'expression a été analysée dans le cadre de notre étude (cf chapitre 1 partie 2), seul le gène *C4H2* est affecté par le stress thermique. Dès lors, il est possible mais peu probable que la répression de *C4H2* soit suffisante pour diminuer aussi drastiquement les quantités de toutes ces molécules. L'expression de l'isoforme *C4H1*, pas ou peu affectée par ce même stress, rend *a fortiori* cette hypothèse peu envisageable.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

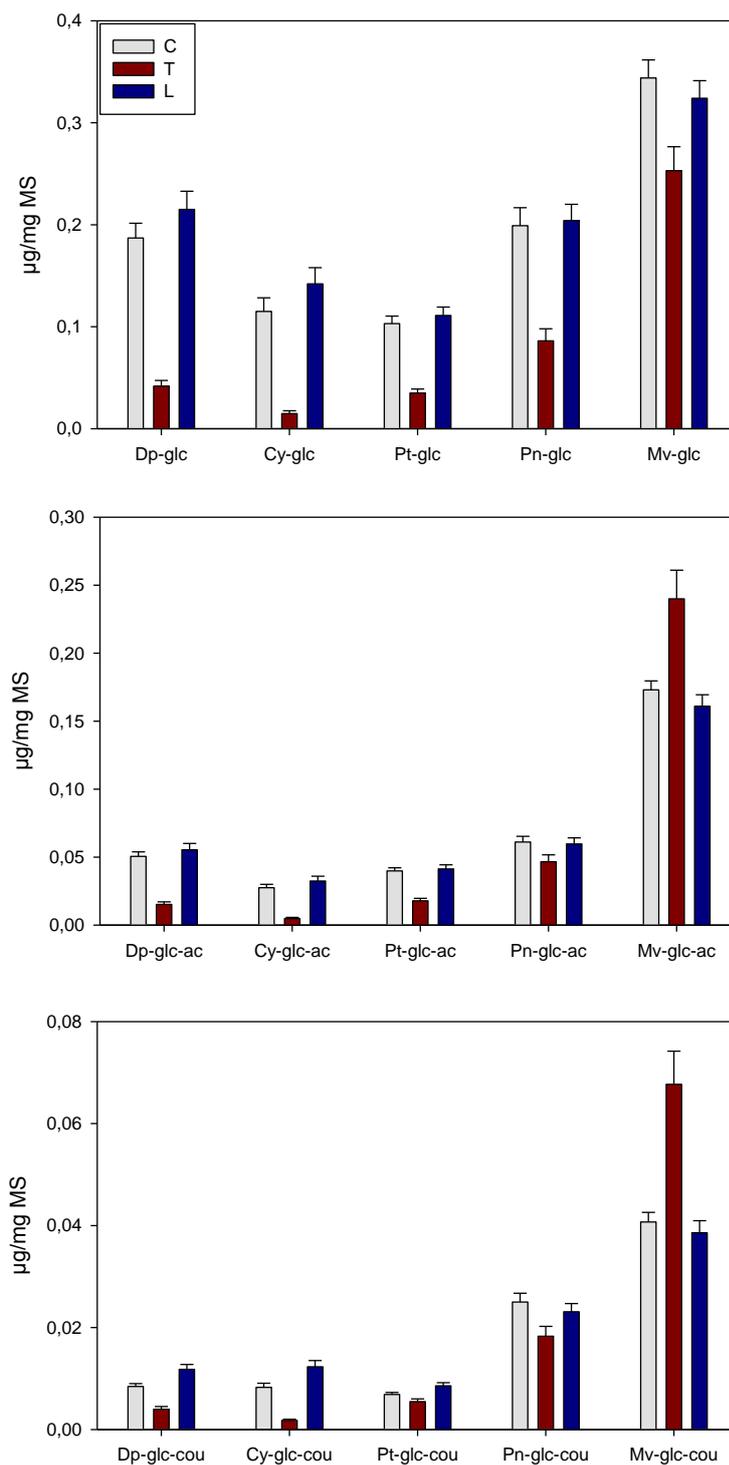


Figure 28. Profils d'accumulation des anthocyanes dans la pellicule de baies soumises à un stress thermique (T, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (L, $\Delta I=+850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 17j à partir du stade « véraison ». La malvidine-3-glucoside a été utilisée comme référence pour la quantification des anthocyanes.

MS, matière sèche; C, échantillons témoins; **Dp-glc**, delphinidine glucoside; **Cy-glc**, cyanidine glucoside; **Pt-glc**, pétunidine glucoside; **Pn-glc**, péonidine glucoside; **Mv-glc**, malvidine glucoside; **Dp-glc-ac**, delphinidine acétyl-glucoside; **Cy-glc-ac**, cyanidine acétyl-glucoside; **Pt-glc-ac**, pétunidine acétyl-glucoside; **Pn-glc-ac**, péonidine acétyl-glucoside; **Mv-glc-ac**, malvidine acétyl-glucoside; **Dp-glc-cou**, delphinidine coumaryl-glucoside; **Cy-glc-cou**, cyanidine coumaryl-glucoside; **Pt-glc-cou**, pétunidine coumaryl-glucoside; **Pn-glc-cou**, péonidine coumaryl-glucoside; **Mv-glc-cou**, malvidine coumaryl-glucoside

I.4.2. Composition en anthocyanes des baies exposées à un stress thermique ou lumineux trois semaines après la véraison

Pour cette étude au stade «+3SAV», des stress de différentes intensités ont été imposés aux grappes. Des stress thermiques équivalents à des températures perçues par les baies de 6°C et 9°C supérieures à la température ambiante ($\Delta T1=+6^\circ\text{C}$ et $\Delta T2=+9^\circ\text{C}$) ont été appliqués sur deux groupes différents de boutures. Pour le stress lumineux, deux lots de boutures ont reçu respectivement 700 et 950 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons alors que les baies témoins recevaient en moyenne 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons. Tous les métabolites étudiés dans les baies témoins (baies 6 semaines après véraison) sont présents en plus grande quantité que dans les baies témoins de l'expérimentation précédente (prélevées 3 semaines après véraison, voir paragraphe précédent) (Figure 29). Cette observation traduit bien un stade plus avancé de maturation et le fait que les anthocyanes s'accumulent dans des conditions normales pendant cette période de 3 semaines. La malvidine 3-glucoside est l'anthocyane très nettement majoritaire dans les baies étudiées. Ses formes acylée et coumarate sont également majoritaires par rapport aux autres familles d'anthocyanes. Un stress « $\Delta T+6^\circ\text{C}$ » est suffisant pour entraîner une chute drastique des différents métabolites à l'exception de la pétunidine 3-glucoside-coumarate et de la malvidine 3-glucoside-coumarate. Un stress « $\Delta T+9^\circ\text{C}$ » entraîne l'absence totale de nombreux métabolites dont la delphinidine 3-glucoside et la cyanidine 3-glucoside. Les métabolites encore détectés sont néanmoins présents en très faible quantité avec par exemple une teneur en malvidine 3-glucoside qui chute d'environ 5 fois passant de 5,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ MS à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ MS. Il faut remarquer que la pétunidine 3-glucoside-coumarate n'est à nouveau pas affectée par un stress thermique de forte intensité. *A contrario*, les différentes intensités lumineuses perçues n'entraînent pas ou très peu de modifications sur les quantités des différentes anthocyanes.

I.5. Analyse de la composition de la baie de raisin en flavonols

La teneur en flavonols a été déterminée pour les baies soumises à un stress thermique ($\Delta T=+9^\circ\text{C}$) ou un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) appliqués pendant 17j à partir de la véraison. Les analyses ont aussi porté sur des baies soumises à un stress à partir de 3 semaines après la véraison. Dans ce cas, deux stress thermiques ($\Delta T1=+6^\circ\text{C}$ et $\Delta T2=+9^\circ\text{C}$) et deux stress lumineux ($\Delta I1=+600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons et $\Delta I2=+850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) ont été appliqués pendant 21j. L'analyse des échantillons

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

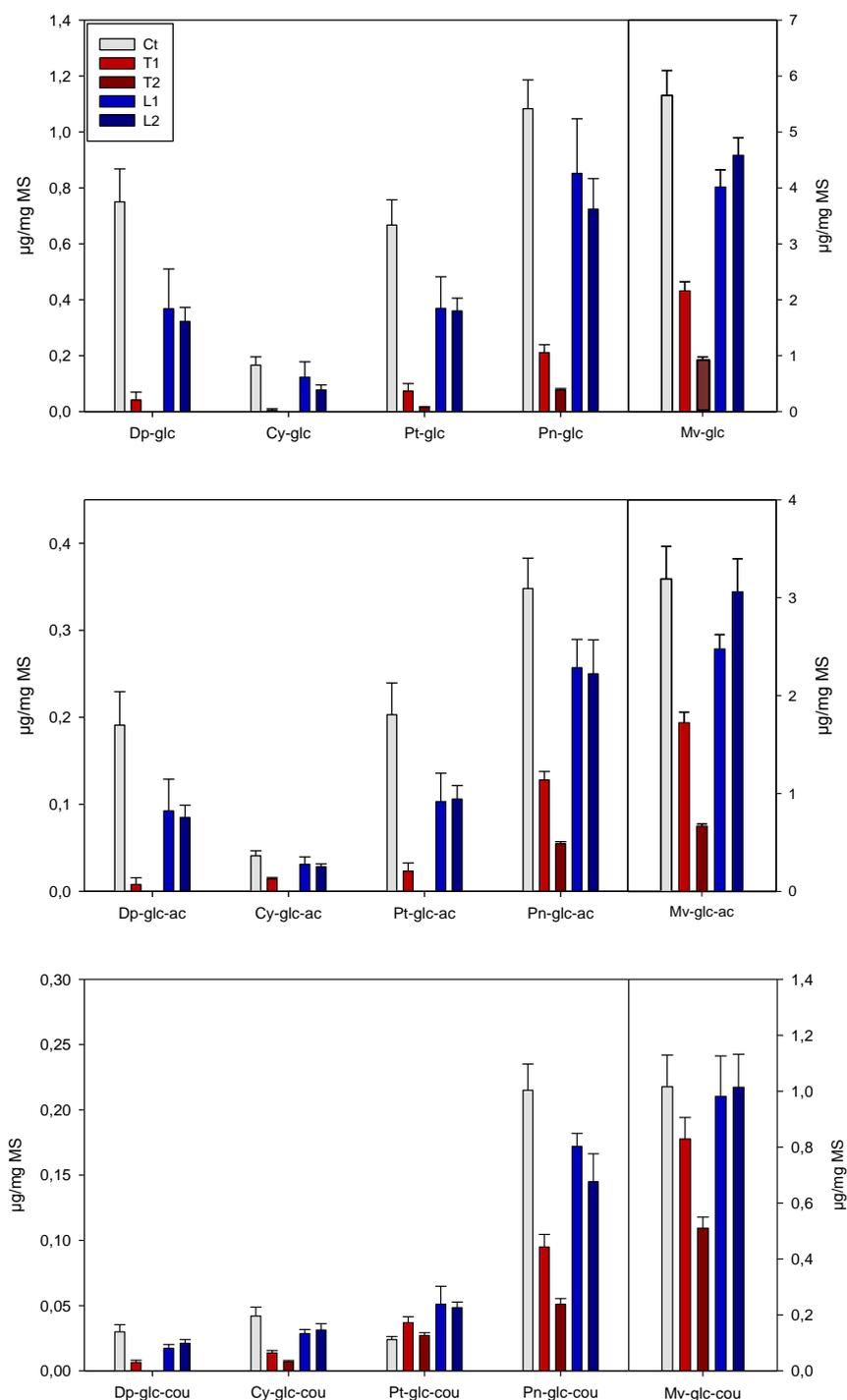


Figure 29. Profils d'accumulation des anthocyanes dans la pellicule de baies soumises à des stress thermiques (T1, $\Delta T=+6^{\circ}\text{C}$; T2, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (L1, $\Delta I=+600\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons ; L2, $\Delta I=+850\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ». La malvidine-3-glucoside a été utilisée comme référence pour la quantification des anthocyanes.

MS, matière sèche; C, échantillons témoins; **Dp-glc**, delphinidine glucoside; **Cy-glc**, cyanidine glucoside; **Pt-glc**, pétunidine glucoside; **Pn-glc**, péonidine glucoside; **Mv-glc**, malvidine glucoside; **Dp-glc-ac**, delphinidine acétyl-glucoside; **Cy-glc-ac**, cyanidine acétyl-glucoside; **Pt-glc-ac**, pétunidine acétyl-glucoside; **Pn-glc-ac**, péonidine acétyl-glucoside; **Mv-glc-ac**, malvidine acétyl-glucoside; **Dp-glc-cou**, delphinidine coumaryl-glucoside; **Cy-glc-cou**, cyanidine coumaryl-glucoside; **Pt-glc-cou**, pétunidine coumaryl-glucoside; **Pn-glc-cou**, péonidine coumaryl-glucoside; **Mv-glc-cou**, malvidine coumaryl-glucoside

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

par HPLC associé à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) a permis d'identifier sans ambiguïté 3 flavonols. Il s'agit de la myricétine 3-glucoside, de la quercétine 3-glucoside et de la quercétine 3-glucoside-6-acyl. De part leur spectre d'absorption, 5 autres molécules ont pu être assimilées comme membre de la famille des flavonols, sans que leur identification complète ait été faite : nous les appellerons flav1 à flav5.

I.5.1. Composition en flavonols des baies exposées à un stress thermique ou lumineux à partir de la véraison

Les pellicules de baies (stade véraison) soumises à un stress thermique pendant 17j présentent une diminution de teneur de la majeure partie des flavonols dosés (Figure 30). Les composés les plus affectés sont la quercétine glucoside (85% de perte), la flav1 (70% de perte) et la myricétine glucoside (65% de perte). Le kaempférol glucoside est totalement absent des baies ayant subi un stress thermique. Inversement, le stress lumineux entraîne l'accumulation de certains flavonols comme la quercétine glucoside (+500%), la myricétine glucoside (+200%) ou bien la flav2 (+240%).

I.5.2. Composition en flavonols des baies exposées à un stress thermique ou lumineux trois semaines après la véraison

Lorsqu'il est appliqué 3 semaines après véraison, le stress thermique entraîne globalement les mêmes modifications pour les flavonols que pour les anthocyanes (Figure 31). Ainsi, une augmentation de la température de 6°C entraîne une diminution des teneurs en flavonols (sauf pour la flav2), diminution qui est accentuée par un stress thermique plus intense ($\Delta T_2 = +9^\circ\text{C}$). Inversement, un stress lumineux de forte intensité ($\Delta I_2 = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) entraîne une augmentation de concentration en myricétine 3-glucoside et quercétine 3-glucoside. Il est également intéressant de noter la disparition du kaempférol glucoside dans les baies à maturité contrairement aux baies à véraison.

En conclusion, les analyses de la composition en anthocyanes et en flavonols de baies soumises à des stress thermiques ou lumineux ont permis de dissocier l'impact respectif de ces 2 stress. Une augmentation de la température entraîne une réduction voire une disparition quasi-totale de la majeure partie de ces composés alors que la lumière n'exerce un effet ciblé que sur certains flavonols, entraînant une accumulation de myricétine 3-glucoside et de quercétine 3-glucoside.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

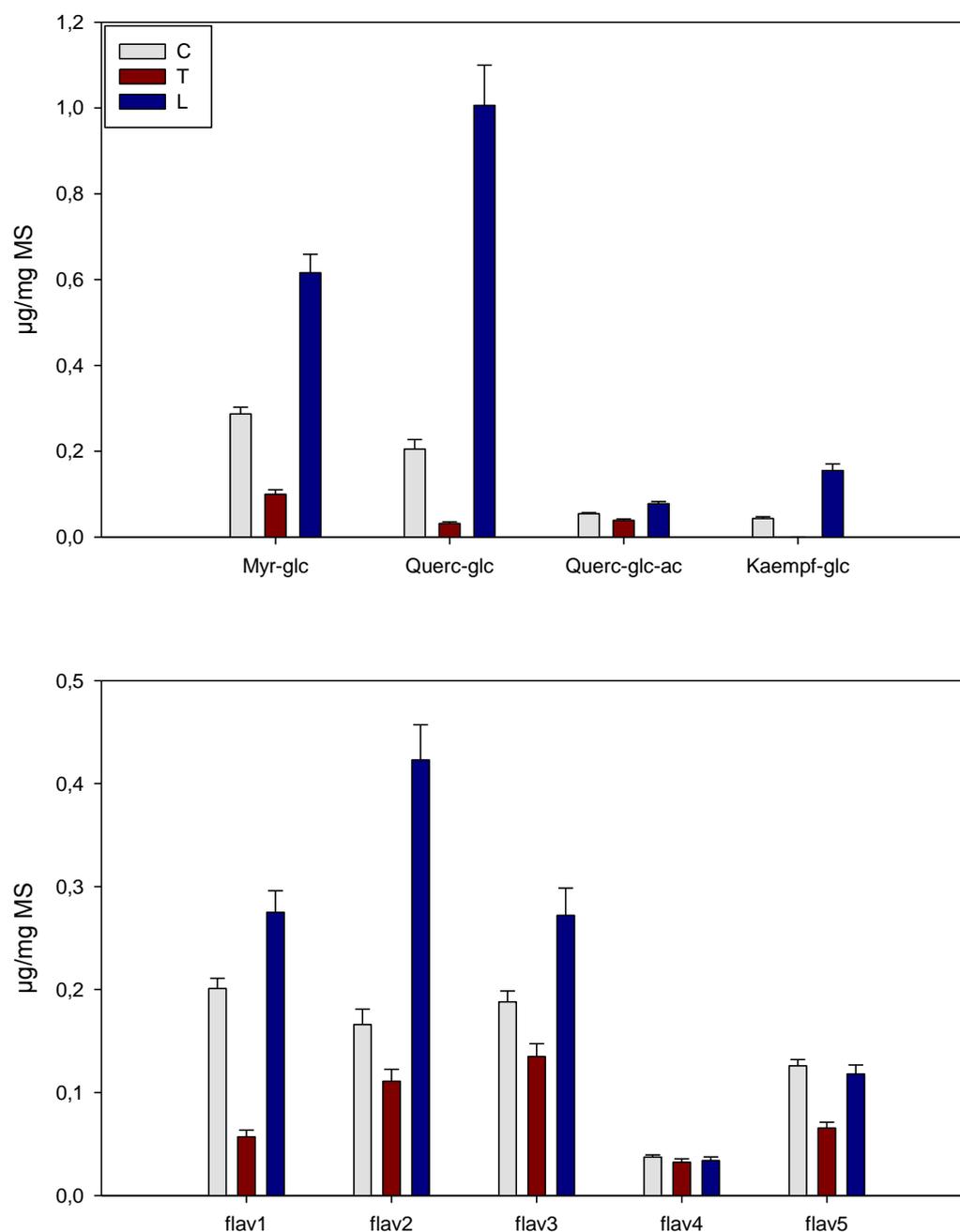


Figure 30. Profils d'accumulation des flavonols dans la pellicule de baies soumises à un stress thermique (T, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (L, $\Delta I=+850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 17j à partir du stade « véraison ». La quercétine-3-glucoside a été utilisée comme référence pour la quantification des flavonols.

MS, matière sèche; C, échantillons témoins; **Myr-glc**, myricétine glucoside; **Querc-glc**, quercétine glucoside; **Querc-glc-ac**, quercétine acétyl-glucoside; **Kaempf-glc**, kaempférol glucoside; **flav1-5**, flavonols à l'identité incertaine

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

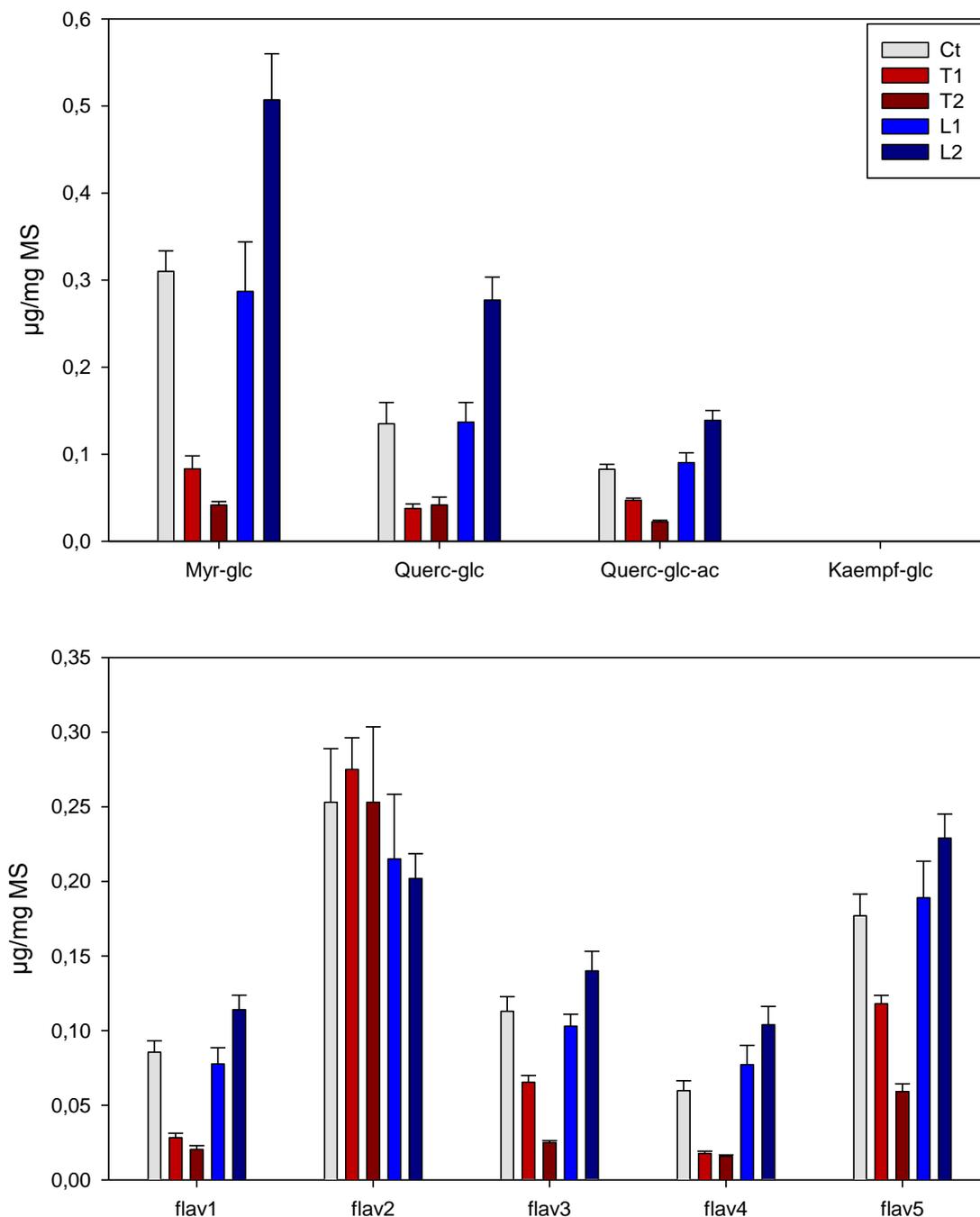


Figure 31. Profils d'accumulation des flavonols dans la pellicule de baies soumises à des stress thermiques (T1, $\Delta T=+6^{\circ}\text{C}$; T2, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (L1, $\Delta I=+600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons ; L2, $\Delta I=+850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ». La quercétine-3-glucoside a été utilisée comme référence pour la quantification des flavonols.

MS, matière sèche; Ct, échantillons témoins; Myr-glc, myricétine glucoside; Querc-glc, quercétine glucoside; Querc-glc-ac, quercétine acétyl-glucoside; Kaempf-glc, kaempférol glucoside; flav1-5, flavonols à l'identité incertaine

I.6. Analyse de la teneur des baies stressées à maturité en sucres et acides organiques

Les sucres (glucose et fructose) et les acides organiques (acides malique et tartrique) ont été dosés dans les pulpes des baies soumises aux stress thermiques ($\Delta T1=+6^{\circ}\text{C}$ et $\Delta T2=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux ($\Delta I1=+600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons et $\Delta I2=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade «+3SAV».

Les sucres ne sont pas affectés par les différents stress appliqués (Figure 32) contrairement aux acides organiques (Figure 33). La teneur en acide malique diminue sous l'effet des stress thermiques ainsi que sous l'effet d'un rayonnement intense. La teneur en acide tartrique diminue sous l'effet d'un stress thermique modéré ($\Delta T1$) ou d'un rayonnement intense ($\Delta I2$). De manière surprenante, on observe une augmentation d'acide tartrique dans les pulpes des baies soumises à un stress thermique fort ($\Delta T2$).

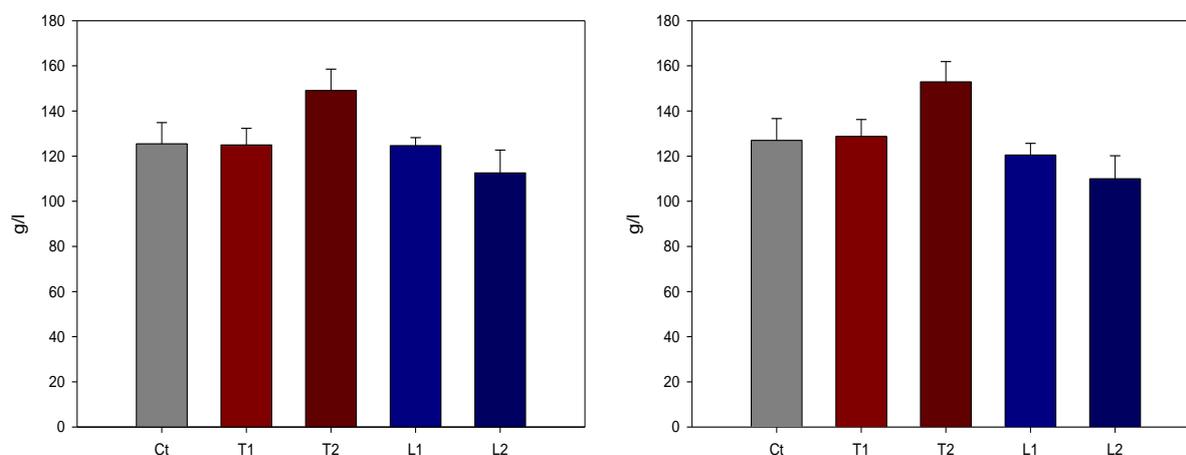


Figure 32. Profils d'accumulation du glucose (A) et du fructose (B) dans la pulpe de baies soumises à des stress thermiques (T1, $\Delta T=+6^{\circ}\text{C}$; T2, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (L1, $\Delta I=+600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons ; L2, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ». Code couleur : (gris) échantillons témoins, (rouge clair) T1, (rouge foncé) T2, (bleu clair) L1, (bleu foncé) L2.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

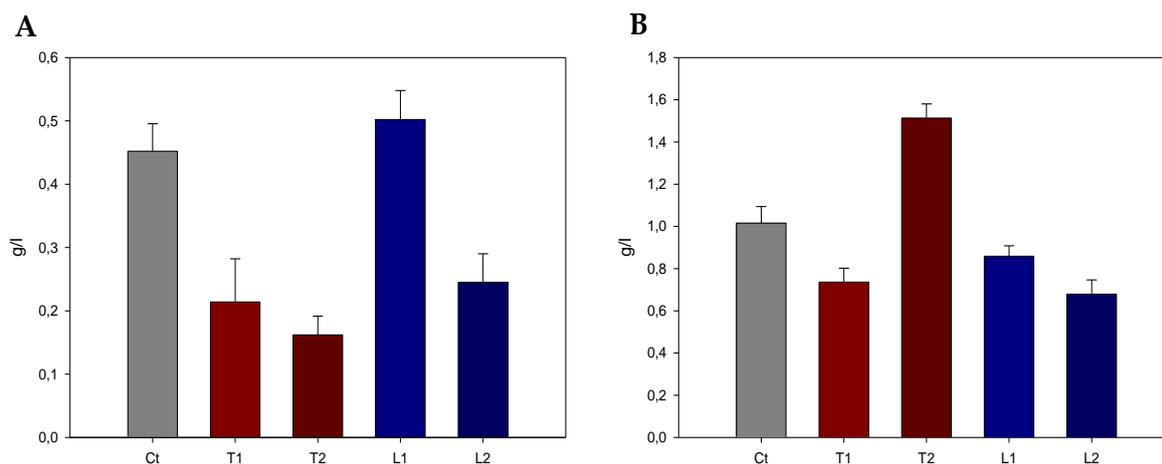


Figure 33. Profils d'accumulation de l'acide malique (A) et de l'acide tartrique (B) dans la pulpe de baies soumises à des stress thermiques (T1, $\Delta T=+6^{\circ}\text{C}$; T2, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (L1, $\Delta I=+600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons ; L2, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ». Code couleur : (gris) échantillons témoins, (rouge clair) T1, (rouge foncé) T2, (bleu clair) L1, (bleu foncé) L2.

I.7. Analyse de la composition en acides aminés de la baie de raisin stressée

L'analyse de la composition en acides aminés (aa) de baies de raisin soumises à des stress thermique ou lumineux a été réalisée de manière séparée sur les pellicules et pulpes. Le stress thermique appliqué équivaut à une augmentation de la température de 9°C par rapport à la température ambiante et le stress lumineux à une différence de $850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons. Dix-huit aa ont pu être dosés par la méthode de dérivation employée. Seuls la cystéine et le tryptophane ne peuvent pas être dosés par cette méthode (Cohen and Michaud, 1993).

I.7.1. Les acides aminés acides

Parmi les aa de nature acide, l'acide aspartique (ASP) et l'acide glutamique (GLU) ont pu être dosés (Figure 34A). L'ASP est présent en plus grande quantité dans la pellicule et c'est dans ce compartiment que l'impact du stress thermique et du stress lumineux est le plus marqué. Ainsi, les deux stress provoquent une nette diminution de la quantité d'aspartate dans la pellicule alors qu'aucun effet n'est observé dans la pulpe. De manière intéressante, la même constatation est faite avec le GLU.

I.7.2. Les acides aminés basiques

Concernant les acides aminés de nature basique, l'arginine (ARG), la lysine (LYS) et l'histidine (HIS) ont été dosés (Figure 34B). Dans les conditions témoins, l'arginine est

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

naturellement plus abondante dans la pellicule que dans la pulpe des baies de raisin. Le stress thermique n'a pas d'effet sur la concentration en ARG dans la pellicule, mais le stress lumineux réduit de moitié sa teneur dans le même compartiment alors qu'aucun effet n'est observé dans la pulpe. Le stress thermique entraîne dans la pellicule uniquement une augmentation de la teneur en LYS dans la pellicule uniquement ainsi qu'une faible augmentation de la teneur en HIS.

I.7.3. Les acides aminés apolaires

Les acides aminés apolaires dosés sont la phénylalanine (PHE), la méthionine (MET), l'isoleucine (ILEU), l'alanine (ALA), la proline (PRO), la valine (VAL), la leucine (LEU) et la glycine (GLY) (Figure 35). La PHE s'accumule dans la pellicule suite à l'action du stress thermique, ainsi que dans la pulpe, mais de manière moins prononcée. Dans des conditions normales, la concentration de cet acide aminé est similaire dans les deux compartiments. Le stress thermique entraînerait également une augmentation de la teneur en MET mais cette observation reste à confirmer. En revanche, les concentrations d'ILEU/LEU, ALA, PRO et VAL ne sont pas affectées par les différents types de stress. La glycine n'a pas été détectée dans nos échantillons (témoin, stress thermique ou stress lumineux).

I.7.4. Les acides aminés polaires

Les acides aminés polaires (tyrosine -TYR-, thréonine -THR-, glutamine -GLN-, sérine -SER- et asparagine -ASN-) ont pu être dosés par la méthode utilisée. Seule la concentration en TYR augmente dans les baies exposées à un stress thermique, et plus particulièrement dans la pellicule (Figure 36). La teneur des 4 autres acides aminés n'est pas modifiée par une température élevée. Un stress lumineux diminue significativement la concentration de THR dans la pellicule alors que son effet sur la GLN reste à confirmer.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

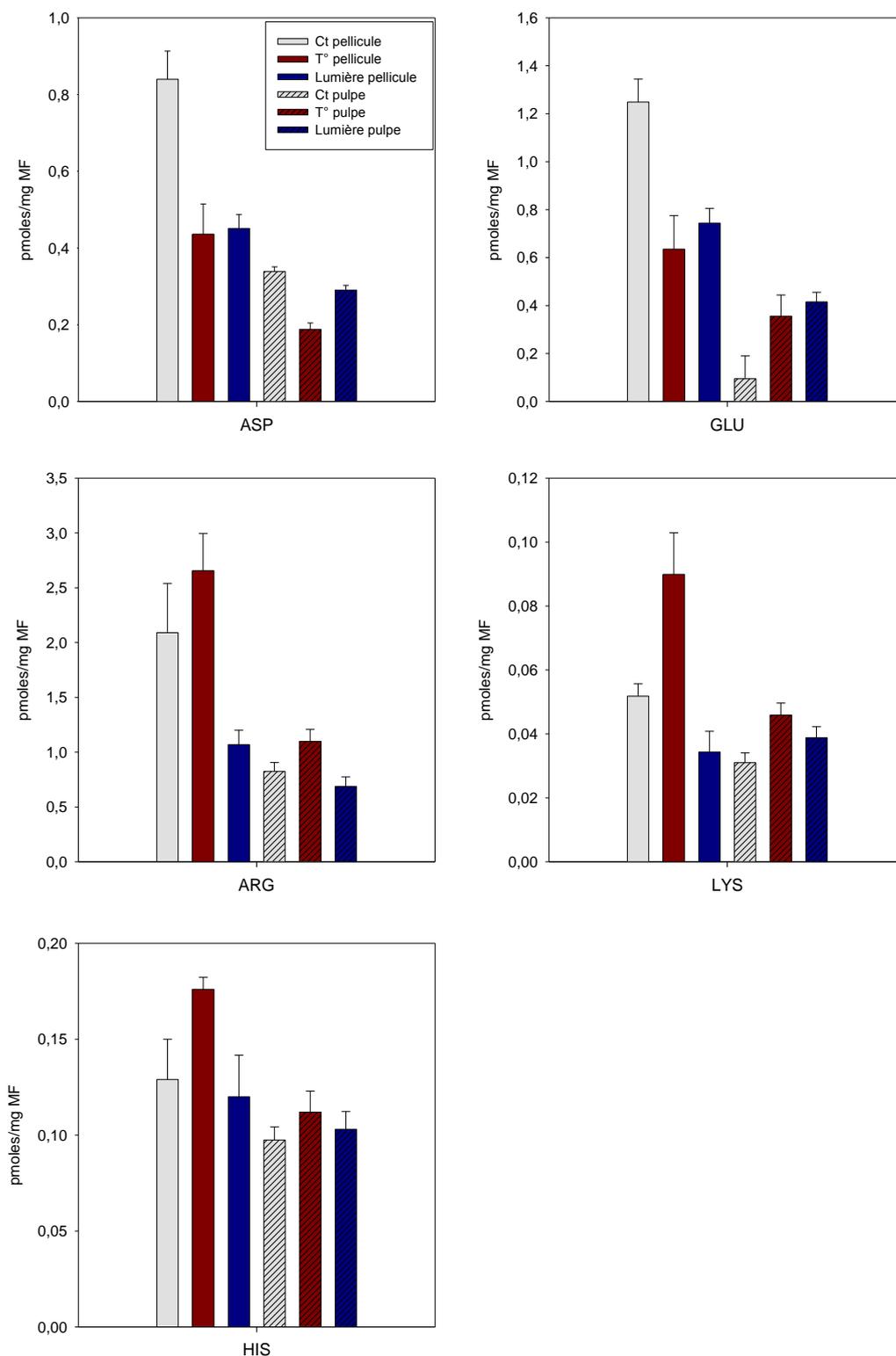


Figure 34. Profils d'accumulation des acides aminés acides (A) et basiques (B) dans la pellicule et la pulpe de baies soumises à des stress thermiques (T° , $\Delta T=+9^\circ C$) ou lumineux (Lumière, $\Delta I=+850 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ».

MF, matière fraîche; Ct, échantillons témoins; ASP, acide aspartique; GLU, acide glutamique; ARG, arginine; LYS, lysine; HIS, histidine

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

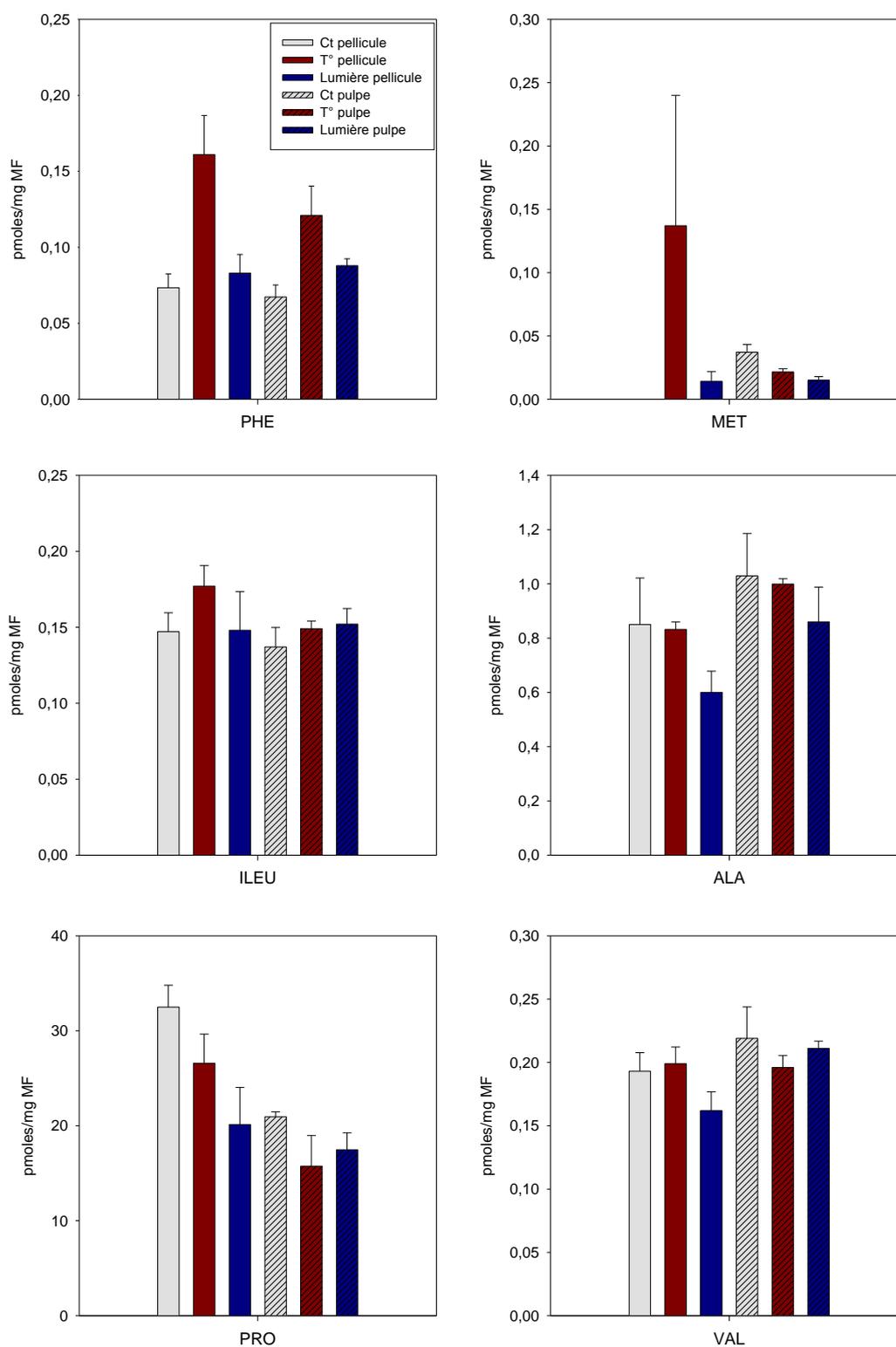


Figure 35. Profils d'accumulation des acides aminés apolaires dans la pellicule et la pulpe de baies soumises à des stress thermiques (T°, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ou lumineux (Lumière, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ».

MF, matière fraîche; **Ct**, échantillons témoins; **PHE**, phénylalanine; **MET**, méthionine; **ILEU**, isoleucine; **ALA**, alanine; **PRO**, proline; **VAL**, valine

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

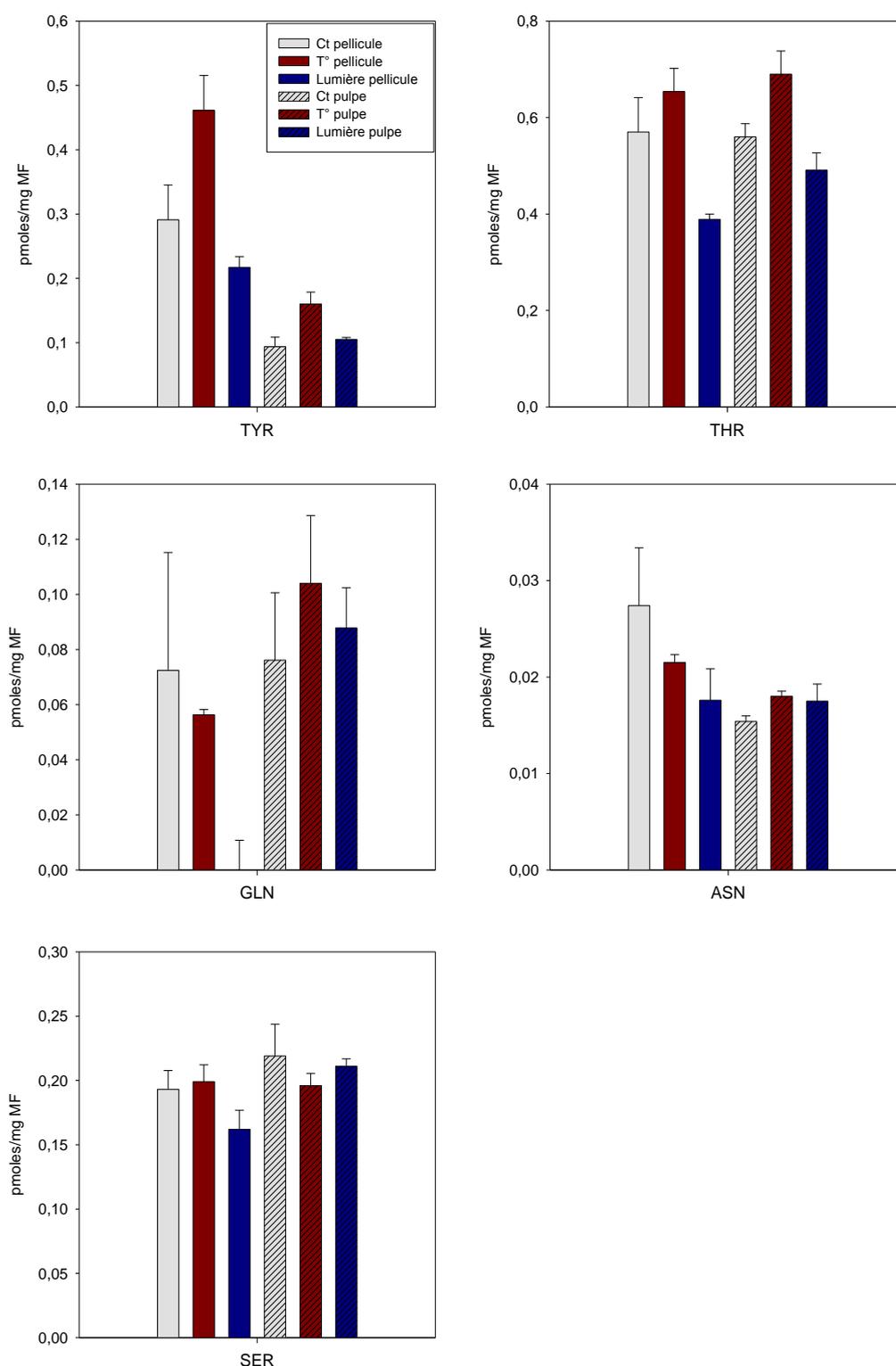


Figure 36. Profils d'accumulation des acides aminés polaires dans la pellicule et la pulpe de baies soumises à des stress thermiques (T° , $\Delta T=+9^\circ C$) ou lumineux (Lumière, $\Delta I=+850 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ de photons) pendant 21j à partir du stade « 3 semaines après véraison ».

MF, matière fraîche; Ct, échantillons témoins; TYR, tyrosine; THR, thréonine; GLN, glutamine; ASN, asparagine; SER, sérine

I.8. Discussion

- **Réponses du transcriptome des baies de raisin soumises à un stress thermique**

En préambule, il faut souligner que l'analyse transcriptomique réalisée dans le cadre de ce travail sur les baies exposées à un stress thermique ou lumineux ne peut être considérée que comme une étude préliminaire. En effet, il sera nécessaire de répéter cette expérience, sur plusieurs années et d'y inclure un plus grand nombre de réplicats techniques et biologiques. De plus, l'utilisation de lames microarrays d'ancienne génération contenant moins de la moitié du génome de la Vigne ne peut apporter la vue d'ensemble souhaitée concernant l'impact global des stress thermique et lumineux sur le transcriptome des baies. Cette analyse pose néanmoins des bases non négligeables pour l'élucidation des effets du microclimat sur le métabolisme de la baie. C'est dans ce contexte que s'inscrit le programme ANR DURAVITIS (2011-2014) dont une partie, développée dans le laboratoire, visera à étudier les conséquences d'une température élevée perçue localement (microclimat) par les baies de raisin. Pour ce faire, le projet ANR bénéficiera des nouvelles générations de lames microarrays représentatives du génome complet de *Vitis vinifera* (Lames Roche Nimblegen contenant 29550 gènes). Ceci dit, l'analyse transcriptomique effectuée dans le cadre de cette thèse a permis de valider le système expérimental utilisé, permettant ainsi de le reconduire, tout en l'affinant, lors du projet DURAVITIS.

Cette analyse a surtout apporté un important jeu de données contribuant à mieux dissocier les effets induits par un stress thermique de ceux provoqués par un stress. Ainsi, le stress thermique, même lorsqu'il n'est perçu que par les baies, entraîne des modifications significatives du transcriptome. Parmi les gènes affectés, figurent de façon attendue une batterie de *HSPs*. Les *HSPs* codent une famille de protéines impliquées dans les réponses adaptatives de nombreux organismes en réponse à des températures anormalement élevées (Krishna, 2004). Toutes les *HSPs* sont dotées d'une fonction de type chaperone qui facilite le repliement et le transport des protéines à travers la membrane, la régulation de l'activité ou de la dégradation protéique et la prévention de l'agrégation des protéines dénaturées. Parmi les gènes induits après 14j d'exposition au stress thermique figurent des gènes codant des protéines de la famille des *HSP70* et des *HSP40* qui sont parmi les protéines les plus conservées dans le règne végétal (Kultz, 2003). La protéine *HSP70* est assistée par *HSP40* qui accroît son activité et sa consommation d'ATP. Bien que les mécanismes précis restent encore à éclaircir, *HSP70* établit des liaisons de haute affinité avec les protéines non-repliées quand

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

elle est liée à l'ADP, et de faible affinité quand elle est liée à l'ATP. De nombreuses molécules d'HSP70 se rassembleraient autour des substrats non-repliés, qui les stabiliseraient et éviteraient les phénomènes d'agrégation avant que la protéine ait terminé tous ses repliements. À ce moment seulement, HSP70 perd son affinité pour le substrat et s'éloigne (Mayer and Bukau, 2005). L'accumulation des transcrits correspondant à ce duo de gènes *HSP70/HSP40* montre donc que les baies perçoivent le stress thermique même après 14j de traitement continu, et y répondent. *HSP100 (ClpB)*, *HSP60 (GroEl)* et *HSP101* présentent le même profil d'expression que ceux décrits précédemment. Les protéines de la famille HSP100 agissent en coopération avec HSP70 ou avec des HSPs de faible poids moléculaire (sHSPs). Elles sont capables de resolubiliser les protéines agrégées en coopération avec HSP70 ou avec des HSPs de faible poids moléculaire (sHSPs) (Mogk, Deuerling, *et al.*, 2003; Mogk, Schlieker, *et al.*, 2003; Maurizi and Xia, 2004). De plus, une étude menée sur Arabidopsis, avec des mutants d'insertion de *HSP101* (mutant *hot1*) ainsi qu'avec des plantes transgéniques sous-exprimant ce gène a révélé que ces mutants ne pouvaient plus acquérir de tolérance au stress thermique, et ce à différents stades de développement (Hong and Vierling, 2000; Queitsch *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2003). Chez les cyanobactéries, les chaperones de la famille GroEl (HSP60) sont inductibles par la chaleur et jouent un rôle dans la tolérance à ce stress (Kovács *et al.*, 2001; Asadulghani *et al.*, 2003). Chez les plantes aucune étude n'a directement démontré le rôle de ces protéines dans l'acclimatation au stress thermique même si certaines de ces protéines ont une localisation membranaire suggérant un rôle dans le maintien de la stabilité et de la perméabilité membranaire (Trent *et al.*, 2003).

Un autre groupe de gènes ressort de notre analyse transcriptomique. Il s'agit de gènes induits très rapidement (après 2h d'exposition au stress) et de manière transitoire. Ce groupe inclut notamment, un gène codant RD22, protéine impliquée dans la réponse à la déshydratation et au stress salin chez la Vigne (Hanana *et al.*, 2008). On peut supposer que ce gène répond au risque de déshydratation entraîné par le stress thermique

Les deux groupes de gènes identifiés lors de l'analyse transcriptomique, à savoir celui regroupant des gènes dont l'expression est stimulée de manière très rapide mais transitoire (induction après 2h, puis répression après 4h de traitement), et celui composé de gènes uniquement induits après 14j d'exposition au stress, suggère qu'il existe au moins deux types de réponses des baies de raisin exposées à un stress thermique. Le premier groupe participerait à la mise en place d'un système de défense à court terme, rapide et temporaire et le second groupe contribuerait à la réponse adaptative de la plante sur le long terme. La

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

répression prolongée qui fait suite à l'expression transitoire de certains gènes du second groupe pourrait faire penser à un mécanisme de réorientation des flux métaboliques vers la synthèse de métabolites pour la protection contre le stress thermique. Cela pourrait également traduire l'effet très néfaste pour la baie d'une exposition prolongée à la chaleur.

- **Réponses du transcriptome des baies de raisin soumises à une forte intensité lumineuse**

L'analyse du transcriptome des baies de raisin exposées à une forte intensité lumineuse révèle une modification de l'expression d'un groupe de gènes composés d'éléments communs avec ceux observés suite à l'application d'un stress thermique. Parmi ceux-ci figurent des gènes codant les protéines HSP 18.8kDa, PM31, T3F20.15, AT1G77260, RD22-b, HSP70, HSP40, HSP90, HSP101, preproMP73, D-34, LEA4 et 7S GLOBULIN (cf. Tableaux 11-14). Deux hypothèses peuvent expliquer leur présence. Premièrement, il s'agit d'un groupe de gènes intervenant dans une réponse générale de la plante face à un stress abiotique. Ils participeraient à la mise en place d'un état de vigilance de la plante face à une modification de son environnement. Deuxièmement, l'induction des gènes *HSPs* en particulier, pourrait résulter de la perception d'un stress thermique à l'échelle de la baie. En effet, l'exposition à une forte intensité lumineuse a entraîné une élévation de la température interne de la baie de 2°C environ. Il est possible que cet écart de température soit suffisant pour induire les gènes intervenant dans la protection contre la dénaturation des protéines.

Un seul gène, qui code une métallothionéine, est induit durant toute la durée de l'exposition au stress lumineux. Les métallothionéines sont des protéines jouant un rôle dans la détoxification des métaux lourds et durant la sénescence (Memon and Schröder, 2009). Une étude chez le Riz a montré un rôle potentiel des métallothionéines dans la réponse au stress oxydatif (Zhou *et al.*, 2005). La caractérisation de la métallothionéine induite dans la baie durant un stress lumineux est donc une piste intéressante pour de futures recherches. Plus récemment, le gène *FeMT3* codant une métallothionéine chez *Fagopyrum esculentum* voit son expression stimulée en réponse aux stress hydrique et oxydatif. Exprimée dans la levure, la protéine FeMT3 présente des propriétés anti-oxydantes, soulignant sa probable implication dans les réponses anti-stress (Samardzić *et al.*, 2010).

Notre étude a également permis de mettre en évidence l'induction lumière-spécifique d'un gène codant une GIBBERELLIN 2 OXIDASE (GA2ox). Ce gène est induit dès 4h d'exposition au stress lumineux et cette induction se maintient tout au long du traitement.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Cette protéine est une des enzymes majeures du catabolisme des gibbérellines, hormones de la famille des diterpènes (Schomburg *et al.*, 2003). La sur-expression d'un gène *GA2ox* entraîne, chez *Arabidopsis* et chez le Riz, une réduction de la teneur en gibbérelline (Schomburg *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2010). L'absence de gibbérelline chez *Arabidopsis* entraîne une altération dans le développement de la graine (Singh *et al.*, 2010). Il serait intéressant d'étudier l'implication de ce gène et l'impact du stress lumineux sur le développement des pépins chez la Vigne. De plus, chez la Tomate, l'accumulation de gibbérellines est une étape importante dans le déclenchement de la nouaison et la croissance du fruit (Serrani *et al.*, 2007). La sous-expression de *GA2ox* chez la Vigne dans les ovaires pollinisées suggèrent également un rôle des gibbérellines dans le développement du fruit (Dauelsberg *et al.*, 2011).

- **Impact des stress thermiques et lumineux sur la voie de biosynthèse des composés phénoliques**

Les données transcriptomiques obtenus révèlent qu'un faible nombre de gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des composés phénoliques sont significativement affectés dans les réponses aux stress thermique et lumineux. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse ciblée (approche RT-PCR) de l'expression de ces gènes dans les baies exposées aux stress pendant leur maturation. Néanmoins, leur expression dans des baies exposées au stress au stade véraison diffère énormément des profils obtenus au stade «mi-maturation». Les stress affectent donc différemment l'expression du génome selon le stade de développement des baies. Ces observations ont été confirmées par une étude transcriptomique effectuée sur des baies au stade véraison, et montrant que de nombreux gènes de synthèse des composés phénoliques sont réprimés par un stress thermique (Lecourieux et Pieri, données non publiées). Le stade de développement de la baie est donc un paramètre important à prendre en compte lors de l'étude d'un stress abiotique.

De plus, une perte d'information peut avoir lieu durant l'analyse des données transcriptomiques car sur les lames Qiagen (14K) une trop forte surexpression d'un gène peut entraîner la saturation du spot associé et entraîner son élimination lors de la normalisation des données. On peut supposer que ce fut le cas pour *VvFLS4* qui a montré une surexpression très importante lors de l'analyse ciblée (Figure 27) et mais non apparente dans les données transcriptomiques.

L'étude des profils d'expression et l'analyse biochimique de différents acteurs de la voie de biosynthèse des composés phénoliques en réponse aux stress thermiques ou lumineux ont

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

révélé différents niveaux d'impact sur la biosynthèse de ces composés. En premier lieu, elles ont mis en évidence une différence d'effet des deux stress sur les concentrations en anthocyanes et en flavonols dans les pellicules de baie. Le stress thermique entraîne une réduction drastique de la majeure partie des anthocyanes et des flavonols, alors que le stress lumineux entraîne une accumulation de certains flavonols. La diminution de la teneur en anthocyanes et en flavonols par le stress thermique peut être expliquée de plusieurs manières. Une première hypothèse laisserait supposer une synthèse réduite de ces composés par les stress, entraînant ainsi la diminution de la teneur totale en ces composés. L'étude des profils d'expression des gènes intervenant dans cette voie de biosynthèse a révélé que lorsque le stress thermique est imposé à partir de la véraison, la majorité des gènes étudiés est réprimée. Cette observation est particulièrement vraie pour les voies de biosynthèse des flavonols et des tanins. Ainsi, l'expression de gènes spécifiques de ces deux voies (respectivement, *VvFLS4*, *VvFLS5* et *VvLARI*, *VvLAR2*, *VvANR*) est significativement réduite pendant une grande partie, voire la totalité, du traitement. Néanmoins cette répression n'est pas observée lorsque le stress est appliqué 3 semaines après la véraison alors que la diminution de la teneur en anthocyanes et en flavonols est toujours observée. *A contrario*, on observe plutôt une induction de gènes spécifiques de la synthèse des flavonols (*VvFLS4*) et surtout de la synthèse et du transport des anthocyanes (*VvUFGT*, *VvAMI*, *VvAM3*, *VvAOMT*). La régulation transcriptionnelle des gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes ne semble donc pas être la cause principale, ou la seule cause, de la diminution des métabolites correspondants dans la pellicule de baie de raisin pendant la maturation mais cette hypothèse ne peut être exclue pour les baies à véraison. Une deuxième hypothèse laisserait imaginer l'existence de régulations post-transcriptionnelles, traductionnelles ou post-traductionnelles des enzymes de biosynthèse. A notre connaissance, de tels mécanismes n'ont pas encore été décrits pour ce type d'enzymes. Une troisième hypothèse supposerait que la capacité de transport et/ou d'accumulation des composés phénoliques dans la vacuole serait affectée par les stress. Enfin, une dernière hypothèse envisagerait une dégradation des flavonoïdes sous l'effet de la chaleur. Une étude effectuée sur des baies de Cabernet Sauvignon a montré que la teneur en anthocyanes marquées au ^{13}C diminuait sous l'effet d'un stress thermique de 10°C (baies à 35°C comparée à des baies à 25°C) 1 semaine avant véraison et ce jusqu'à la maturation (Mori *et al.*, 2007). Les auteurs suggèrent que la diminution de l'accumulation d'anthocyanes sous l'effet d'un stress thermique résulterait de la dégradation de ces composés. Observée dans notre étude, la stimulation de l'expression des gènes intervenant dans la synthèse des anthocyanes résulterait d'une compensation (insuffisante) des anthocyanes dégradées par le

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

stress thermique. De manière intéressante, Mori *et al.* (2007) ont également remarqué que les dérivés issus de la malvidine (glucoside, acétyl glucoside et coumaryl glucoside) sont moins affectés par ce stress. Nous avons fait la même observation avec les baies exposées à partir de la véraison. Toutefois, comme celle des autres anthocyanes, la concentration de ces dérivés chute de manière drastique lorsque le stress est imposé 3 semaines après la véraison. L'intensité du stress est également un facteur important car nos travaux montrent que plus la température des baies est élevée, plus la teneur en anthocyanes et en flavonols diminue. Certains métabolites comme la delphinidine et la cyanidine (glucoside et acétyl glucoside) disparaissent totalement de la pellicule. Les mécanismes de dégradation des composés phénoliques sont actuellement peu connus, et une recherche plus approfondie sur ces mécanismes mérite d'être conduite.

Une des originalités de ce travail de thèse a été d'établir les profils d'expression de différentes isoformes d'un même gène sous l'effet des différents stress. La différence de comportement entre les gènes codant les isoformes de la FLS a ainsi été mise en évidence. Il existe cinq isoformes de cette enzyme chez la Vigne (Fujita *et al.*, 2006) et seulement trois sont exprimées dans la baie de raisin. En effet, *VvFLS1* est exprimé dans les fleurs et *VvFLS2* dans les feuilles, les fleurs et les jeunes baies vertes (Fujita *et al.*, 2006). Contrairement à cette dernière étude, nous avons pu détecter les transcrits de *VvFLS3* dans les fruits mais uniquement dans les baies en phase de maturation et de surcroît, en très faible quantité. Dans la baie, *VvFLS3*, *VvFLS4* et *VvFLS5* présentent 3 profils d'expression complètement différents en réponse au stress thermique, suggérant des rôles et/ou des localisations distincts de la FLS au sein de la baie. Le gène *VvFLS4* a été décrit comme un élément de réponse aux fortes intensités lumineuses perçues par les baies de raisin (Matus *et al.*, 2009). Nos données montrent que ce gène peut également être mobilisé après exposition à un stress thermique.

L'exposition à une forte intensité lumineuse entraîne une augmentation de certains flavonols (myricétine glucoside et quercétine glucoside) dans les pellicules des baies. L'accumulation de ces flavonols sous l'effet de la lumière pourrait s'expliquer par la très forte surexpression du gène *VvFLS4* observée dans ces mêmes conditions. La stimulation de ce gène est beaucoup plus importante lorsque le stress lumineux est appliqué pendant la phase de maturation. En conditions normales, les flavonols commencent à s'accumuler dans la pellicule des baies de raisin pendant la phase de maturation (Downey, Harvey, and Robinson, 2003b). Un stress lumineux survenant durant cette période pourrait donc accélérer la synthèse de ces molécules, *via* une sur-expression de *VvFLS4*.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Certains gènes (*VvANS* et *VvUFGT*; *VvAMI* et *VvAOMT*) présentent des profils d'expression similaires. Il est possible que leur expression soit régulée par les mêmes facteurs de transcription. En effet, chez *Arabidopsis*, le *Pétunia*, ou encore *Antirrhinum majus*, des études ont montré que certains complexes transcriptionnels associant des facteurs de type MYB et bHLH peuvent mobiliser des pools de gènes particuliers (Pelletier and Shirley, 1996; Mol *et al.*, 1998; Quattrocchio *et al.*, 1998). Chez *Arabidopsis*, l'hypothèse de la co-régulation de certains gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes a conduit à proposer un modèle avec une régulation de deux unités distinctes : un groupe de gènes positionnés en amont de la voie (*AtCHS*, *AtCHI*, *AtF3H*) appelée "Early Biosynthetic Genes" (EBGs) et un groupe de gènes agissant en aval de la voie appelée "Late Biosynthetic Genes" (LBGs) (Pelletier *et al.*, 1997). On peut donc supposer un mécanisme similaire chez la Vigne, le stress scindant en plusieurs groupes l'unité LBGs. Un de ces groupes serait constitué entre autres par les gènes *VvANS* et *VvUFGT* et un autre groupe incluerait les gènes *VvAMI* et *VvAOMT*. Les gènes étudiés ici et se classant dans l'unité « EBGs » suivent également des profils d'expression très proches malgré les différences dans l'intensité des réponses.

Bien que nous ayons analysé un grand nombre de gènes et isoformes, l'étude de la voie de biosynthèse des composés phénoliques et plus précisément de flavonoïdes n'est pas exhaustive. En effet, certains gènes se déclinent à travers un nombre très important d'isoformes. Par exemple, l'analyse *in silico* du génome de la Vigne suggère qu'il existe 10 isoformes potentielles codant la flavonol 3'5' hydrolase et 13 isoformes codant la PAL (Velasco *et al.*, 2007). Au vu des différences observées dans le comportement des isoformes de la FLS, il serait intéressant d'établir les profils d'expression de toutes ces isoformes dans le contexte d'un stress thermique ou lumineux. Le gène *VvDFR* n'a pas été testé lors de notre étude car il n'a pas été possible de définir des amorces de Q-PCR répondant à nos critères de qualité. Il s'agira de remédier à ce problème car il semble judicieux de déterminer le profil d'expression du gène *VvDFR* en condition de stress, et plus particulièrement sous l'influence d'un stress lumineux. En effet, la DFR est en compétition avec la FLS pour le même substrat afin de synthétiser respectivement des leucoanthocyanidines (précurseurs des tanins et des anthocyanes) et des flavonols (Martens, 2002). Pour rendre notre étude plus complète, il faudrait également analyser les profils d'expression, en condition de stress, des régulateurs transcriptionnels connus de la voie de biosynthèse des composés phénoliques. Si plusieurs facteurs de transcription MYB et bHLH sont connus pour réguler certains gènes de cette voie chez la Vigne (voir Introduction 2.3.4.4), peu de données sont disponibles concernant le

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

comportement de ces régulateurs dans les baies sous l'influence d'un stress. Seul le gène *VvMYBF1*, régulateur de l'expression de *VvFLS4*, a été décrit comme sensible à un stress lumineux, avec une accumulation de ses transcrits sous l'effet du stress (Czemmel *et al.*, 2009). Certains des facteurs de transcription MYB et bHLH, tels que *VvMYB5a*, *VvMYB5b* et *VvMYC1* sont capables de réguler l'expression de plusieurs gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Deluc *et al.*, 2006, 2008; Hichri *et al.*, 2010). Leurs profils d'expression sous l'effet d'un stress thermique ou lumineux pourraient nous renseigner sur l'origine des profils d'expression communs observés pour certains gènes de la voie.

Les gènes *VvLARI*, *VvLAR2* et *VvANR*, spécifiques de la voie de biosynthèse des tanins sont fortement réprimés par le stress thermique appliqué sur les baies pendant la véraison (Figure 24). Il conviendrait donc de doser les tanins correspondants pour déterminer si le stress thermique peut entraîner une diminution de ces composés importants pour la qualité de la baie. Une étude au vignoble a montré que l'élévation de la température des baies peut avoir un effet bénéfique sur la concentration en tanins des pellicules de baie (Cohen *et al.*, 2008). Néanmoins les températures perçues par les baies étaient inférieures à 40°C, à la différence de notre étude (Figure 15). Des températures plus élevées pourraient donc avoir un effet répresser sur les teneurs en tanins dans la baie.

- **Impact des stress thermiques et lumineux sur la teneur en acides organiques des pulpes de baies**

La diminution de la teneur en acide malique suite par le stress thermique ou lumineux pourrait être expliquée par la respiration. En effet, la respiration de la baie est un processus affecté par la température ou le rayonnement et l'augmentation de la respiration peut entraîner la diminution d'acide malique, précurseur intervenant dans ce processus (Dokoozlian, 1996; Sweetman *et al.*, 2009).

L'accumulation d'acide tartrique dans les baies soumises à un stress thermique prononcé est assez difficile à interpréter. Une hypothèse ferait intervenir la perte d'eau engendrée par une forte transpiration des baies chauffées. Ainsi l'augmentation observée dans les baies serait plutôt due à un phénomène de concentration de l'acide tartrique s'expliquant par un plus petit volume d'eau. Cette hypothèse est appuyée par la légère augmentation de la teneur en sucres dans ces mêmes échantillons.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

- **Impact des stress thermiques et lumineux sur la composition en acides aminés des pellicules et pulpes**

La comparaison de l'influence des stress thermique et lumineux sur la pellicule et la pulpe des baies révèle des différences dans la teneur en certains acides aminés, variables selon le compartiment étudié. En effet, les différents stress n'influencent pratiquement pas la composition en acides aminés dans la pulpe, à part la PHE et la THR. *A contrario*, dans la pellicule, le stress thermique entraîne une accumulation de certains acides aminés polaires ou apolaires (TYR, LYS et PHE) et une diminution d'ASP et GLU. Le stress lumineux a peu d'effets sur ces mêmes acides aminés. Notre étude montre donc que le stress thermique modifie les teneurs en acides aminés de la pellicule mais pas de la pulpe.

La PHE est un acide aminé important car il est le précurseur principal de la synthèse des composés phénoliques. Son accumulation suite à l'action de la température et la diminution observée de la majeure partie des anthocyanes et des flavonols suggèrent un arrêt dans le flux métabolique dépendant de la PHE. La chaleur trop intense a pu dénaturer certaines enzymes clé catalysant la synthèse des composés phénoliques. En effet, l'étude des transcrits *PAL* ou *C4H* par exemple ne permet pas de savoir si les enzymes correspondantes sont bien présentes dans la cellule ou si elles le sont encore sous une forme active. Une future étude protéomique sur des baies exposées à un stress thermique, prévue dans le cadre du projet DURAVITIS, permettra de tester cette hypothèse. Un autre point en faveur de cette hypothèse concerne l'accumulation de TYR. Comme la PHE, cet acide aminé dérive de l'arogénate et peut servir de précurseur pour former de l'acide coumarique. Chez le Maïs, la PAL possède une activité tyrosine ammonia lyase (Rösler *et al.*, 1997; Schiavon *et al.*, 2010) et peut synthétiser directement de l'acide coumarique à partir de la TYR (Dixon and Paiva, 1995; Watts *et al.*, 2006). Néanmoins cette propriété de la PAL n'a pas encore été établie chez la Vigne et nécessite de plus amples recherches. La synthèse de ces deux acides aminés s'effectue principalement dans les feuilles (Bush, 1999) et n'est donc pas affectée par le stress thermique dans notre étude. L'accumulation proviendrait donc d'un blocage de la voie en aval de l'acide coumarique. On ne peut toutefois exclure la possibilité de l'envoi d'un signal de la baie vers les feuilles entraînant une augmentation de la synthèse de PHE. Il serait donc intéressant, dans le cadre du projet DURAVITIS, d'étudier l'expression et l'activité de l'4-coumarate ligase (4CL) en conditions témoin et en conditions de stress thermique.

Exposition de la baie de raisin à un stress thermique ou lumineux, impact sur le transcriptome et sur la teneur en métabolites d'intérêt

Les conséquences d'une accumulation en LYS sont très difficiles à interpréter. Peu de données sont actuellement disponibles sur la fonction de cet acide aminé dans la baie de raisin. La LYS étant synthétisée à partir de l'ASP (Bush, 1999), la diminution observée de ce dernier dans les pellicules soumises au stress thermique pourrait être due à l'accumulation de LYS.

L'absence d'accumulation de PRO en réponse aux stress thermique et lumineux est intéressante. En effet, la PRO est un acide aminé pouvant agir comme osmorégulateur en réponse à certains stress abiotiques (stress hydrique ou salin; Cramer *et al.*, 2007). Dans la baie de raisin, cet acide aminé n'intervient donc pas dans la réponse aux stress thermique et lumineux lorsque ceux-ci sont directement et uniquement appliqués au niveau des baies.

Chapitre II: Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin

Les conséquences des stress thermiques et lumineux sur la voie de biosynthèse des flavonoïdes ayant été étudiées de façon ciblée au niveau transcriptionnel et métabolique, nous avons ensuite cherché à avoir une meilleure vue d'ensemble des modifications du métabolisme de la baie de raisin engendrées par ces deux stress en utilisant une approche globale. A cette fin, grâce à une collaboration avec Christophe JUNOT, directeur du Laboratoire du Métabolisme des Médicaments (CEA Saclay), nous avons étudié le métabolome des pellicules de baies par UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™. Il s'agit d'une étude à grande échelle menée sans *a priori*, fondée sur l'association de la chromatographie UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) et de la spectrométrie de masse de type Orbitrap. Cette analyse a été effectuée sur des échantillons prélevés au cours de deux années en utilisant deux protocoles différents. Le chapitre décrit les résultats obtenus en fonction du protocole utilisé.

II.1. Similarités et différences dans les protocoles utilisés entre les deux expérimentations

En 2009, les métabolites ont été extraits de pellicule broyée (≈ 100 mg MS) dans un mélange méthanol/acide formique (v/v 99/1), lyophilisés puis repris dans un mélange eau/acide formique (0,1%). Les échantillons ont ensuite été injectés dans l'UPLC. Lors de ces premiers essais, la source d'ionisation semblait avoir été saturée par la trop forte concentration de certains métabolites. En conséquence, les échantillons de la seconde expérimentation (échantillons prélevés en 2010) ont été dilués 10 fois avant l'injection. Après séparation, fragmentation et analyse dans le spectromètre de masse, les données brutes ont été acquises avec le logiciel du constructeur (Xcalibur). Les résultats ont ensuite été compilés par une analyse XCMS/CAMERA. Le package XCMS est un package exploitable sous R qui contient plusieurs fonctions ayant pour but d'extraire et de filtrer les signaux (m/z) à partir des

chromatogrammes puis de réaligner ces signaux entre les différents chromatogrammes. Cette étape a pour but d'homogénéiser les données collectées et d'éliminer un éventuel décalage dans les temps de rétention des chromatogrammes de chaque échantillon (Smith *et al.*, 2006). Les résultats obtenus à l'issue de cette analyse informatique dépendent de paramètres sous-jacents fixés arbitrairement par l'utilisateur (Tableau 3). Deux de ces paramètres, le « *snthresh* » et le « *bandwidth* », peuvent fortement influencer le résultat final (Dunn *et al.*, 2008). Le « *snthresh* » correspond au rapport seuil signal/bruit de fond fixé pour chaque pic. En 2010, ce seuil a été fixé à 3. Le « *bandwidth* » détermine la largeur de bande autorisée sur le signal chromatographique équivalent à une déviation standard autorisée pour chaque pic analysé. Dans notre cas, ce facteur a été fixé à 5. Un troisième paramètre, « *minfrac* », peut jouer un rôle important car il s'agit du pourcentage minimal d'échantillons où le pic est mesuré afin de le définir comme un groupe à part entière. En 2010, cette fraction a été fixée à 20%. Ce facteur est susceptible d'influencer fortement le nombre de pics validés et donc le nombre de métabolites détectés en fin d'analyse.

II.2. Validation de la méthode de quantification des métabolites

Afin de suivre le bon déroulement de la séquence chromatographique et d'évaluer l'état d'encrassement progressif de la source d'ionisation, un mélange d'étalons est régulièrement injecté (dans les échantillons) au cours de la séquence d'analyse. Servant de contrôle qualité, cet échantillon est composé d'un mélange de plusieurs composés xénobiotiques judicieusement choisis pour couvrir au mieux les fenêtres LC et MS d'analyse dans les deux modes d'ionisation. En 2009, ce mélange a été injecté plusieurs fois de manière aléatoire dans la séquence d'analyse. La variation moyenne des aires de pics enregistrés pour ces étalons internes s'élève à 8,4% et la variation moyenne du temps de rétention s'élève à 0,2% (Tableau 16A). En 2010, ce mélange d'étalons a été ajouté à tous les échantillons permettant ainsi une meilleure précision sur la variation inter-échantillons induite par le matériel utilisé. La variation des aires de pics s'élève en moyenne à 17,6%, mais une grande partie de cette variation provient d'un seul échantillon (T1). Si cet échantillon est supprimé de l'analyse, une variation moyenne de 10% est obtenue, soit équivalente à celle obtenue en 2009 (Tableau 16B). La variation moyenne du temps de rétention est de l'ordre de 0,5%.

A

Standard interne	Aire moyenne	SD aire	RT moyen	SD RT
Atropine sulfate	3,2E+10	9,7%	6,11	0,2%
Imipramine	3,4E+10	6,1%	8,37	0,1%
Amiloride	8,5E+09	9,3%	4,89	0,2%
Colchicine	1,4E+10	8,5%	7,32	0,1%

B

Standard interne	Aire moyenne	SD aire	SD aire sans T1	RT moyen	SD RT
Atropine sulfate	4,0E+09	16,4%	7,8%	6,47	0,3%
Imipramine	3,8E+09	14,6%	9,1%	9,18	0,5%
Amiloride	4,7E+08	16,6%	7,3%	5,14	0,2%
Colchicine	1,9E+09	22,8%	16,7%	8,03	0,9%

Tableau 16. Quantification des étalons internes ajoutés lors de l'expérimentation 2009 (A) et 2010 (B).

SD, déviation standard ; RT, temps de rétention (min)

II.2.1. Elimination des signaux parasites

Avant de réaliser les analyses statistiques, les différents jeux de données ont été traités pour vérifier que les signaux observés correspondent bien à des signaux biologiques.

II.2.1.1. Elimination des signaux retrouvés dans les échantillons « blancs »

Des échantillons « blancs » ont été injectés au cours de la séquence, soit de manière aléatoire en 2009, soit toutes les 10 à 15 injections en 2010 de façon à pouvoir s'affranchir d'un éventuel effet mémoire dans l'analyse. Ces blancs contiennent uniquement de l'eau acidifiée (correspondant à la phase mobile). Quatre « blancs » ont été injectés en début de séquence. Les deux premiers ne sont pas exploitables et permettent le conditionnement de la colonne. Pour terminer la séquence d'analyse, trois injections successives de « blancs » sont effectuées. Ces témoins analytiques sont ensuite utilisés pour le traitement des données. Les pics ont été triés en partant du principe qu'une variable non liée au blanc doit avoir une intensité au moins deux fois plus intense dans les échantillons biologiques que dans les blancs. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 17. En 2009, en mode d'ionisation positive, 9284 variables ont été détectées et ce tri a permis d'éliminer 615 variables ne répondant pas aux critères de sélection. En 2010, toujours en mode d'ionisation positive, 7371 variables ont été

détectées et 5345 entrées ont été supprimées. Ce grand nombre de variables supprimées en 2010 pourraient s'expliquer par la trop forte dilution des échantillons.

II.2.1.2. Elimination des signaux propres au système analytique

Pour pouvoir éliminer toute variable liée à une contamination due au système analytique utilisé, un mélange témoin représentatif du milieu biologique étudié a été injecté régulièrement au cours de la séquence. Ce mélange témoin est constitué d'une proportion identique de chaque échantillon biologique analysé. Partant du principe qu'une variable liée au système analytique n'est pas affectée par la concentration de l'échantillon, le mélange témoin est injecté à différentes concentrations au cours de la séquence. En 2009, le témoin a été dilué 1, 2 et 4 fois. En 2010, il a été dilué 1, 2, 4 et 8 fois. Nous avons ensuite calculés le coefficient de corrélation de l'intensité de chaque variable avec le coefficient de dilution du mélange témoin. Seules les variables possédant un coefficient de corrélation $>0,5$ ont été sélectionnées. En 2009, 2819 entrées ont ainsi été éliminées portant à 5850 le nombre final de variables. En 2010, ce sont 650 entrées qui ont été supprimées amenant ainsi un total de 1376 variables finales (Tableau 17). A ce stade de l'analyse, toutes les variables sont à présents considérées comme des signaux biologiques (ou signaux de masse).

Année	Mode d'ionisation	Nombre de variables brutes	Nombre de variables éliminées par le traitement "signal blanc"	Nombre de variables éliminées par le traitement "signal analytique"	Nombre final de variables considérées comme biologiques
2009	Positif	9284	615	2819	5850
	Négatif	6502	1613	2244	2645
2010	Positif	7371	5345	650	1376
	Négatif	2259	874	300	1085

Tableau 17. Récapitulatifs du nombre de variables détectées dans chaque expérimentation suite à l'application des différents filtres statistiques. Le traitement « signal blanc » correspond au nombre de variables dont le rapport de l'intensité entre les échantillons biologiques et les blancs est >2 . Le traitement « signal analytique » correspond au nombre de variables dont l'intensité diminue en fonction du coefficient de dilution appliqué dans le mélange témoin (coefficient de corrélation $>0,5$).

SD, déviation standard ; RT, temps de rétention (min)

II.3. Comportement des signaux de masse issus des pellicules exposées ou non aux stress

Une fois l'ensemble des signaux obtenu, leur comportement au sein de différents échantillons a été analysé. Une analyse en composantes principales (ACP) sur ces jeux de données ne discrimine que faiblement les échantillons entre eux, notamment pour l'année 2009 (données non montrées). En effet, la variation totale existant dans nos échantillons est le reflet des

sommes de différents types de variations (van den Berg *et al.*, 2006). Ces différentes variations sont :

- La variation biologique induite (c'est la variation d'intérêt, induite par nos traitements)
- La variation biologique non induite (présente naturellement entre chaque échantillon biologique)
- La variation technique (due aux différentes manipulations effectuées : récolte, extraction, erreurs analytiques...)

Pour répondre à la question biologique, il fallait donc réduire au maximum l'influence de la variation biologique non induite ainsi que de la variation technique. Pour cela, différentes méthodes statistiques ont été utilisées.

II.3.1. Identification des signaux de masse réagissant de manière significative aux différents traitements

Pour limiter le nombre de variables à considérer pour l'analyse et diminuer ainsi l'impact de variations parasites provenant de métabolites n'intervenant pas dans l'effet du traitement, nous avons recherché les signaux biologiques dont la teneur était statistiquement différente entre les traitements par la méthode de production de rangs (RP). Cette méthode statistique est un test non paramétrique utilisé pour détecter les métabolites avec une différence d'abondance significative entre deux traitements (Breitling *et al.*, 2004). Contrairement au classique *t*-test, le test RP est particulièrement robuste et puissant pour un jeu de données issu d'un faible nombre de réplicats et se révèle donc mieux adapté pour apporter des réponses à la question biologique. Cette méthode a permis de sélectionner les métabolites dont la variation entre les traitements présente une *p*.value < 0,05. En mode d'ionisation positive (2009), 865 signaux biologiques ont été identifiés comme étant significativement influencés par la température et 628 par le rayonnement. Cette méthode a donc permis d'éliminer 79% des variables n'intervenant pas dans la variation biologique induite par le traitement expérimental (Figure 37A). Dix pourcent des variables totales (soit 577 signaux de masse) réagissent de manière température-spécifique et 6% soit 340 signaux de masse réagissent de manière lumière-spécifique. Parmi les variables intervenant indifféremment dans les deux types de stress, 4% (216 signaux biologiques) s'accumulent ou diminuent de manière commune et seulement 1% (72 signaux biologiques) présentent une réaction différentielle selon le type de stress perçu (accumulation pour un des stress et diminution pour l'autre) (Figure 37C). Lorsque la même

analyse statistique est appliquée à l'expérimentation 2010, expérimentation où le nombre de signaux de masse affectés diminue drastiquement par rapport à 2009, on remarque que les signaux de masse réagissant aux différents stress se répartissent en proportions similaires (Figures 37B et 37D).

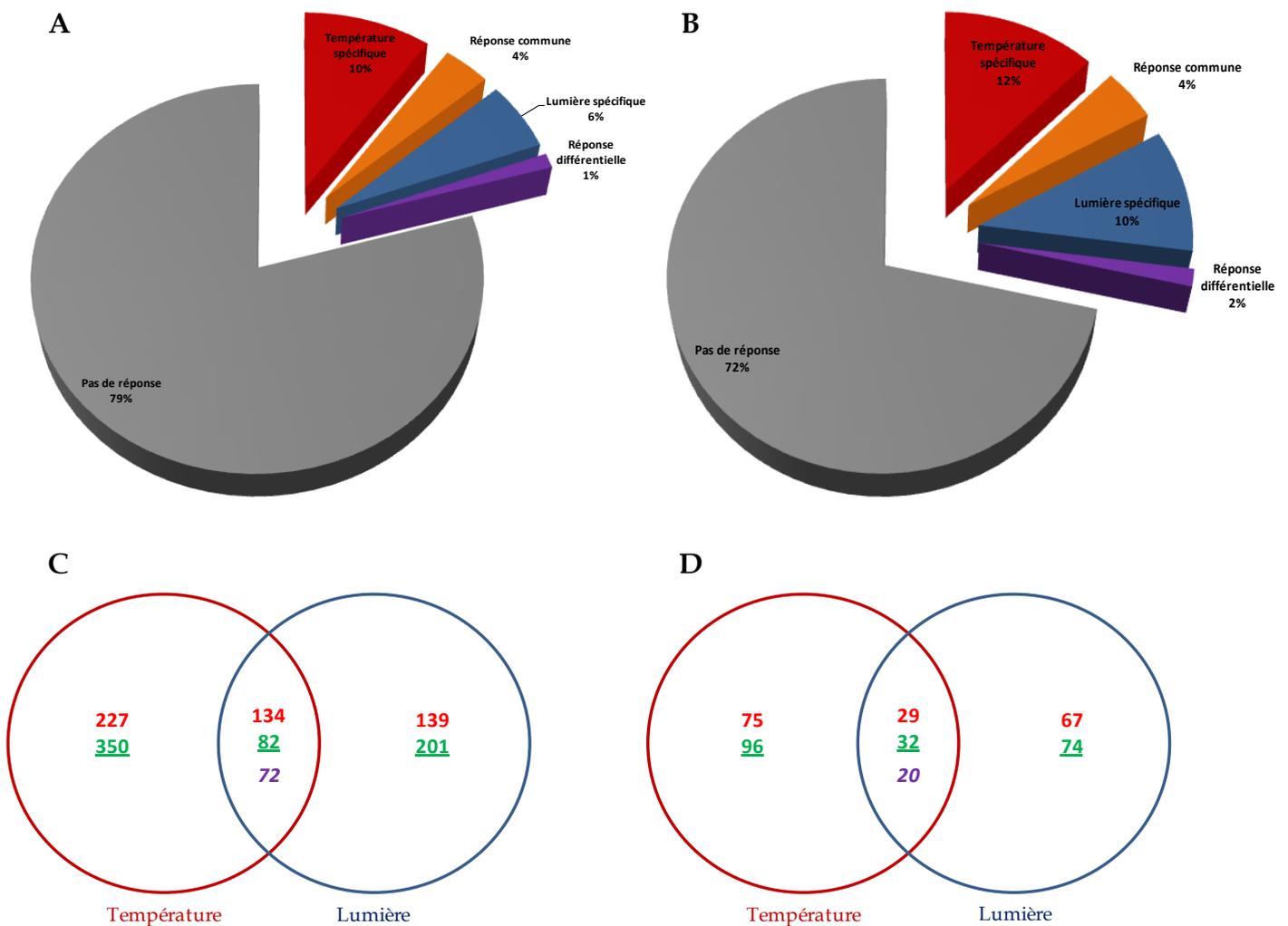


Figure 37. Répartition des signaux de masse réagissant de manière significative (p .value > 0,05) dans les pellicules de baies exposées aux différents types de stress (Stress thermique, $\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$ et stress lumineux, $\Delta I=+850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons). La catégorie « réponse commune » regroupe les signaux réagissant de la même manière (augmentation ou diminution) dans les deux stress et la catégorie « réponse différentielle » regroupe les signaux de masse réagissant de manière inverse entre les deux stress. (A) Répartition des signaux de masse suite à l'expérimentation 2009. (B) Répartition des signaux de masse suite à l'expérimentation 2010. (C) Nombre de signaux différentiellement accumulés ou diminués suite à l'expérimentation 2009. (D) Nombre de signaux différentiellement accumulés ou diminués suite à l'expérimentation 2010. Les chiffres rouges indiquent les signaux accumulés dans les échantillons exposés au stress, les chiffres verts et soulignés indiquent les signaux diminués dans les échantillons exposés et les chiffres violets indiquent les signaux variant de manière inverse entre les deux traitements.

II.3.2. Autres propriétés intrinsèques aux jeux de données métabolomiques

Les propriétés intrinsèques aux données métabolomiques nécessitent d'autres modifications du jeu de données afin de rendre l'information rendue par l'ACP réellement pertinente au niveau de la question biologique posée. En effet dans notre cas, d'autres facteurs peuvent masquer l'implication réelle de la variation biologique induite au sein des échantillons (van den Berg *et al.*, 2006). Ces facteurs sont :

- Les variations parasites (la variation biologique non induite et la variation technique). Elles sont réduites suite au traitement décrit précédemment mais toujours présentes au sein des pools de signaux sélectionnés
- La différence dans l'ordre de grandeur des concentrations entre les différents signaux de masse dosés. En effet, d'un point de vue biologique, un métabolite présent en grandes concentrations n'est pas nécessairement plus important qu'un métabolite présent en faible concentration
- La différence dans l'intensité de variation selon la famille du métabolite. En effet, bien qu'une induction forte soit généralement significative au niveau biologique, il ne faut pas pour autant négliger ou masquer une faible induction. Les molécules intervenant au niveau du métabolisme primaire présentent souvent une plus grande stabilité face aux changements de conditions environnementales contrairement aux métabolites secondaires. Toutefois rien n'indique qu'une faible variation de ces métabolites primaires ne soit pas importante pour la question biologique posée

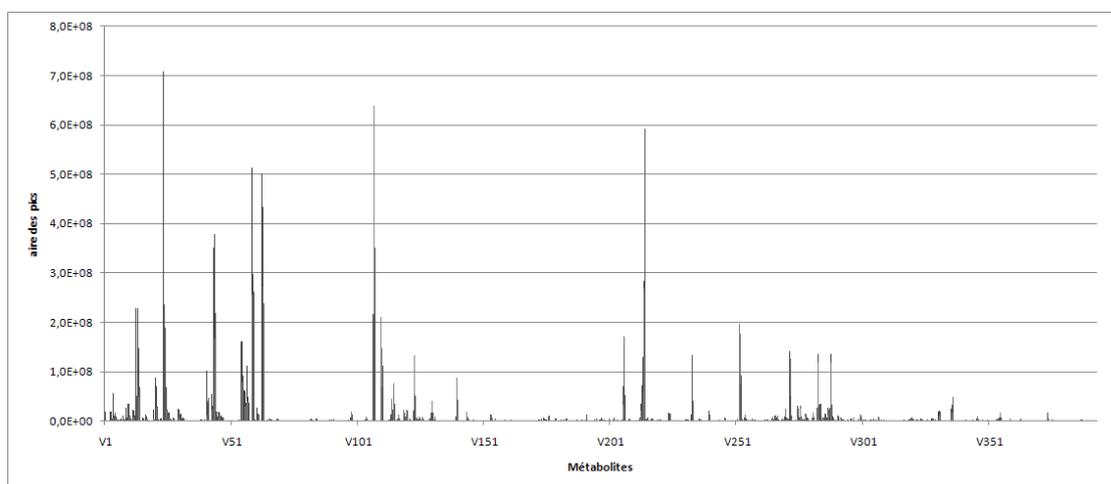
Pour limiter ces effets, deux manipulations mathématiques ont été effectuées sur les jeux de données générés ci-dessus. Premièrement, toutes les variables ont été centrées selon la méthode de Bro et Smilde (2003). Cette méthode ajuste les différences de variation biologique non induite entre les métabolites fortement et faiblement présents dans les échantillons. Elle permet donc de limiter les facteurs énoncés au point 2. Les données transformées ont ensuite été pondérées par la méthode dite de l'« autoscaling » aussi appelée « unit scaling » (van den Berg *et al.*, 2006). Cette manipulation permet d'ajuster les différences d'induction par rapport à un facteur pondérant propre à chaque variable, les rendant donc relatives à ce facteur. Cette technique limite les facteurs énoncés au point 3 ci-dessus. Le facteur pondérant utilisé est la déviation standard. Pour résumer, toutes les variables ont donc subi la transformation suivante :

$$\tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{s_i}$$

Où x_{ij} est la donnée mesurée de coordonnées i et j dans la matrice $(I \times J)$, \bar{x}_i est la moyenne des données mesurées pour chaque métabolite (rang i) et s_i est la déviation standard des données sur chaque rang i .

Un exemple de résultat est présenté dans la figure 38. Il s'agit des données obtenues en mode d'ionisation positive avec les échantillons de l'expérimentation 2010. Cette visualisation permet de s'assurer qu'il n'y a pas de variables marginales dont le comportement ne reflèterait pas la transformation voulue. On remarque donc que chaque variable a été correctement centrée et pondérée entre 2,5 et -2.

A



B

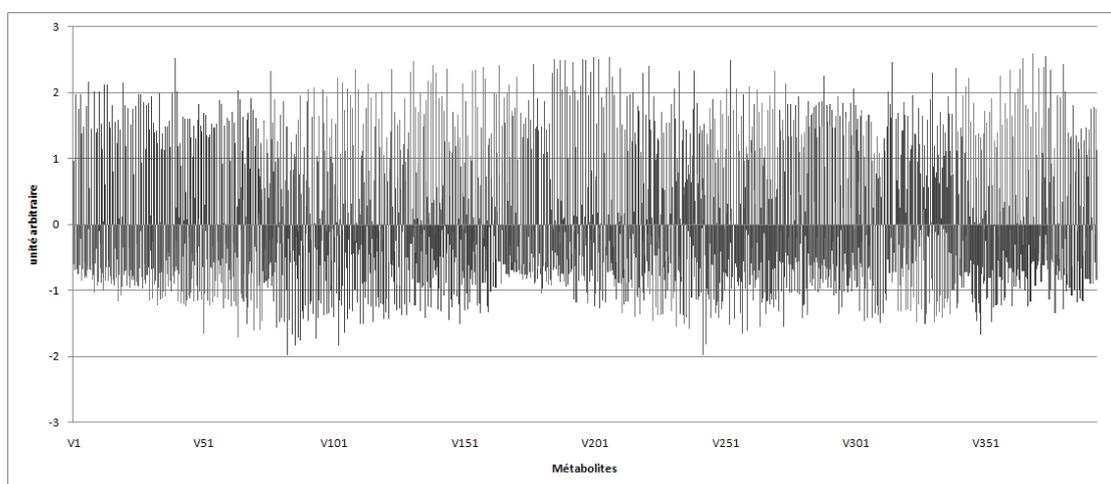


Figure 38. Exemple de transformation du jeu de données obtenu suite à l'expérimentation 2010 en mode positif afin d'éliminer les variations parasites intrinsèques aux données métabolomiques. (A) Données brutes d'intensité de signal en fonction des signaux biologiques. (B) Données transformées après centrage et pondération selon la méthode de l'«autoscaling».

II.3.3. Distinction des traitements grâce aux empreintes métaboliques des différents échantillons

Les variations parasites ainsi que les propriétés interférentes du jeu de données étant à présent limitées au maximum, une ACP a été effectuée pour visualiser la part de variation biologique induite par chaque stress comparée à la variation totale mesurée dans nos échantillons. En mode positif en 2009, les deux premières composantes calculées permettent d'expliquer 50% de la variation totale (Figure 39A). La première composante (PC1, 31,5%) discrimine principalement les échantillons ayant subi un stress thermique des autres échantillons. La seconde composante (PC2, 18,0%) discrimine les échantillons exposés à un stress lumineux du reste des échantillons. Néanmoins, les réplicats biologiques montrent encore une forte variabilité biologique non induite et la discrimination par les effets traitements n'est pas très nette. Les résultats obtenus pour l'expérimentation 2010 sont beaucoup plus clairs (Figure 39B). Les deux premières composantes expliquent environ 65% de la variation totale observée entre les échantillons. La première représente 36,19% de la variation et discrimine nettement les traitements thermiques des autres échantillons. La seconde composante explique 28,19% de la variation totale et discrimine les échantillons exposés à la lumière et les échantillons témoins. Le stress thermique et le stress lumineux affectent le métabolome des pellicules de baie de raisin, et ce de façon propre à chaque stress.

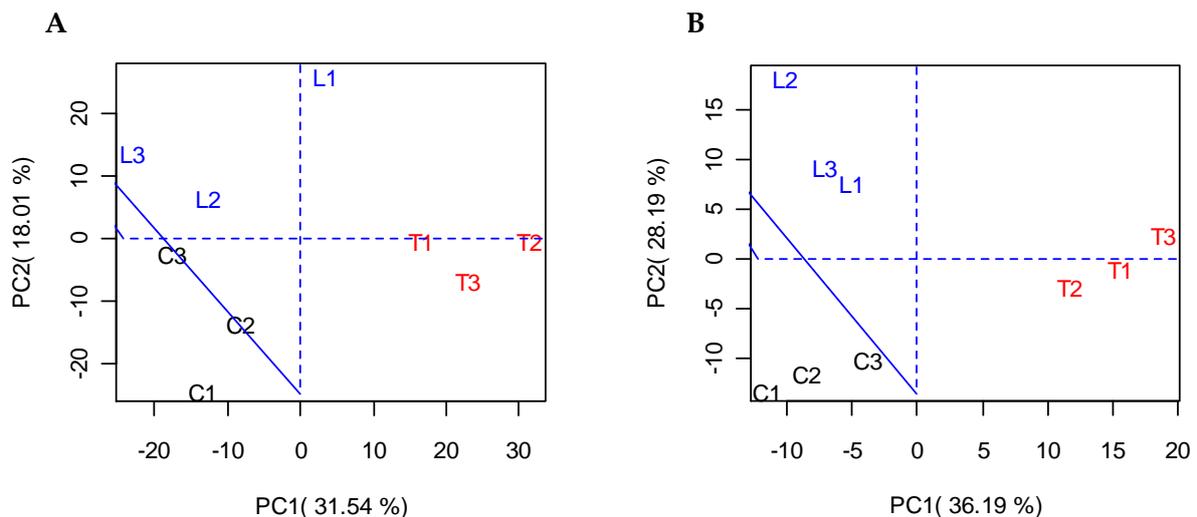


Figure 39. Analyses en composantes principales de la répartition des différents échantillons en fonction de leur variabilité au niveau du métabolome. (A) Répartition des échantillons suite à l'expérimentation 2009. (B) Répartition des échantillons suite à l'expérimentation 2010.

C, pellicules de baies témoins ; T, pellicules de baies exposées à un stress thermique pendant 21j ($\Delta T = +9^{\circ}\text{C}$) ; L, pellicules de baies exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons). Les chiffres correspondent aux réplicats biologiques. PC, composante principale.

II.4. Annotations des signaux de masse variant de manière statistiquement significative sous l'effet d'un des traitements

Pour mieux comprendre les réactions du métabolisme des baies après une exposition de longue durée à un stress thermique ou lumineux, les signaux biologiques réagissant de manière significative à ces traitements ont été annotés à l'aide d'une base de données publique.

II.4.1. Utilisation de la base de données KEGG

L'utilisation d'un spectromètre de masse de type Orbitrap permet d'obtenir la masse exacte des différents composés analysés. A partir de ces masses, une analyse bioinformatique a été entreprise pour annoter automatiquement les différents métabolites présents dans les échantillons. La précision maximale a été fixée à 7ppm. Cette précision est voulue relativement large afin de pouvoir identifier un nombre maximal de composés. Les incohérences ont ensuite été éliminées. Tous modes confondus, 298 métabolites ont ainsi pu être annotés en 2009, soit 16% du nombre total de composés sélectionnés. En 2010, 157 métabolites ont été annotés ce qui représente 23% du nombre total de composés retenus à l'issue de l'analyse. Le tableau 18 récapitule le nombre de variables sélectionnées selon chaque étape pour arriver au nombre final de composés annotés.

Année	Mode d'ionisation	Nombre de variables brutes	Nombre final de variables considérées comme biologiques	Nombre de variables réagissant à la température	Nombre de variables réagissant à la lumière	Nombre de métabolites annotés réagissant à la température	Nombre de métabolites annotés réagissant à la lumière
2009	Positif	9284	5850	865	628	200	160
	Négatif	6502	2645	452	385		
2010	Positif	7371	1376	252	222	114	82
	Négatif	2259	1085	201	164		

Tableau 18. Récapitulatif du nombre de signaux biologiques détectées et réagissant de manière significative (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies de raisin exposées soit à un stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}\text{C}$) soit à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons).

II.4.2. Classement des métabolites putatifs annotés

Les différents métabolites putatifs annotés ont été classés selon leur comportement. Quatre catégories ont été choisies :

- « Température spécifique », catégorie regroupant les métabolites putatifs dont la teneur varie exclusivement en réponse à la température

- « Lumière spécifique », catégorie regroupant les métabolites putatifs dont la teneur varie exclusivement en réponse au rayonnement
- « Commun », catégorie regroupant les métabolites dont la teneur varie de façon similaire (augmentation ou diminution) à l'issue des 2 stress
- « Différentiel », catégorie regroupant les métabolites dont la teneur s'inverse entre les 2 traitements

Ces résultats sont présentés dans les tableaux 19 à 24 pour l'expérimentation 2009 et 25 à 28 pour l'expérimentation 2010.

II.4.2.1. Expérimentation 2009

Les métabolites annotés ont été classés en différents groupes chimiques :

- Alcaloïdes
- Terpènes
- Lipides (comprends les lipides non polykétides comme les acides gras, les phospholipides etc...)
- Phénylpropanoïdes
- Acides aminés
- Autres (comprennent les métabolites n'ayant pu être classés dans un des groupes chimiques pré-cités, ex : acides nucléiques et dérivés)

De plus, le groupe des phénylpropanoïdes a été subdivisé en plusieurs sous-familles pour mettre en évidence les effets des traitements sur cette catégorie particulière de composés (Figure 40). Un intérêt particulier a donné aux sous-familles des anthocyanes et des flavonols en raison de leur importance dans la qualité de la baie de raisin.

Dans la catégorie « température spécifique » (Tableaux 19 et 20), 7% des métabolites annotés se réfèrent à des alcaloïdes dont la teneur augmente (3,43 et 2,69 fois plus) ou diminue (0,38 et 0,37 fois) sous l'effet de la température. Sept pourcent des métabolites putatifs appartiennent au groupe des terpènes dont un métabolite identifié comme l'ABA avec une teneur qui diminue sous l'effet de la température. On trouve également certains lipides (4%) comme des acides gras dont la teneur augmente 3,19 fois ou diminue 0,67 fois dans les échantillons traités. Parmi les 23% de métabolites annotés appartenant au groupe des phénylpropanoïdes, 5 composés appartiennent à la sous-famille des anthocyanes et ces 5

molécules présentent une teneur réduite sous l'effet de la température. Il s'agit de la delphinidine 3-O-glucoside, de la pétunidine 3-O-glucoside, de la cyanidine 3-O-galactoside,

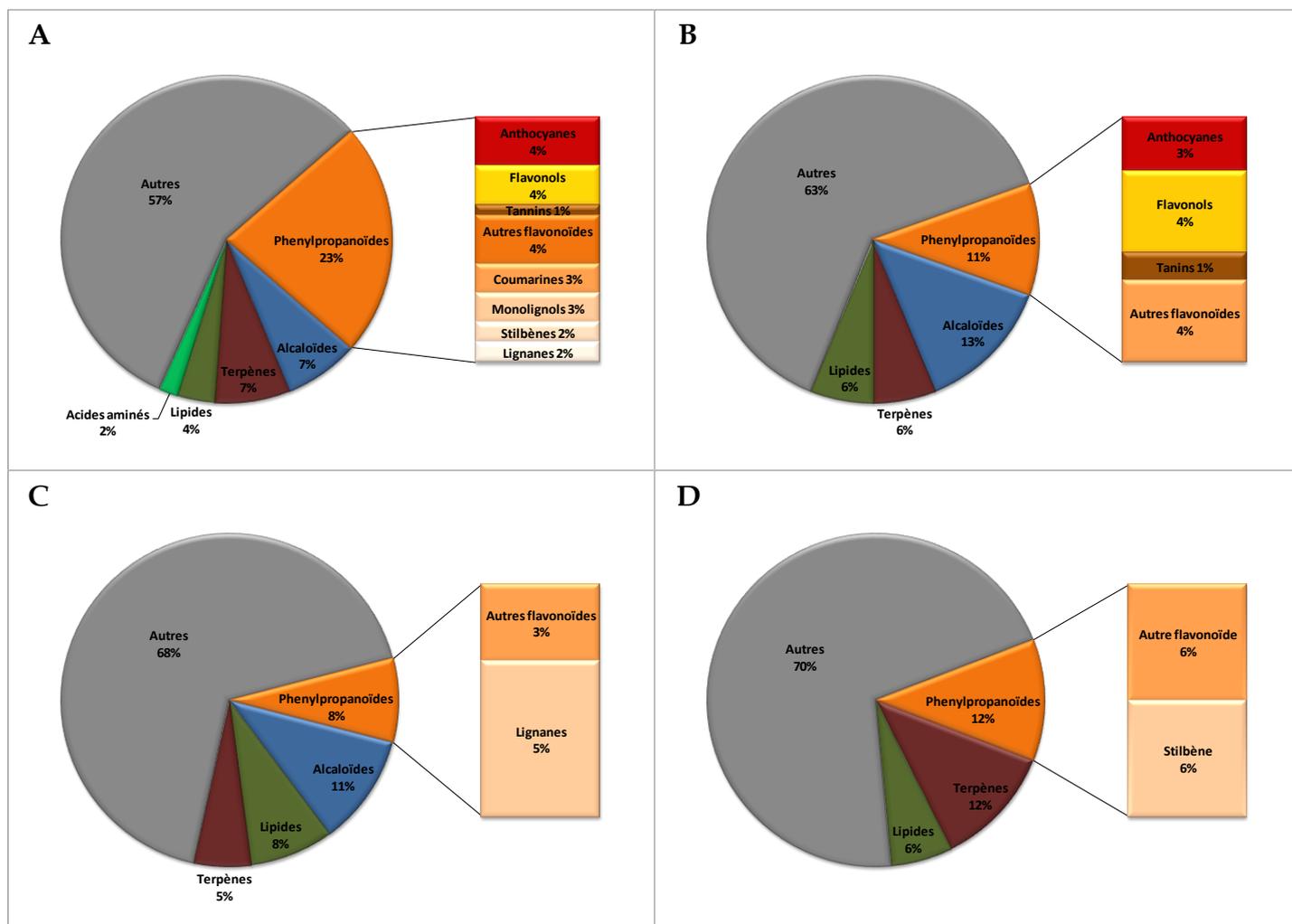


Figure 40. Répartition des métabolites putatifs annotés automatiquement suivant la base de données KEGG et différenciellement accumulés ou diminués (p .value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}\text{C}$) ou un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2009. (A) Répartition des métabolites différenciellement accumulés ou diminués uniquement dans les échantillons exposés au stress thermique. (B) Répartition des métabolites différenciellement accumulés ou diminués uniquement dans les échantillons exposés au stress lumineux. (C) Répartition des métabolites différenciellement accumulés ou diminués de manière similaire entre les échantillons exposés au stress thermique et ceux exposés au stress lumineux. (D) Répartition des métabolites différenciellement accumulés ou diminués de manière inverse entre les échantillons exposés au stress thermique et ceux exposés au stress lumineux.

de la cyanidine 3-(6-p-cafféoyl)-glucoside et de la cyanidine 3-O-(6-O-p-coumaroyl)-glucoside. Les teneurs en deux flavonols (myricétine et kaempférol) et un tanin condensé (gallocatéchine-(4 α ->8)-epigallocatéchine) sont également diminuées. Parmi les autres phénylpropanoïdes, le stress thermique entraîne une augmentation de monolignols, de coumarines et de lignanes et une réduction de stilbènes (resvératrol). Le groupe « Autres » comprend notamment un monosaccharide (L-rhamnose) et deux acides aminés (L-tryptophane et L-proline). Les teneurs en ces trois composés sont augmentées de 2,5 à 12 fois dans les échantillons soumis au stress thermique.

Dans la catégorie « Lumière spécifique » (Tableaux 21 et 22), l'annotation automatique a permis d'identifier 11 alcaloïdes, 9 phénylpropanoïdes, 5 terpènes, 5 lipides, 1 polykétide non phénylpropanoïde et 1 acide nucléique. Parmi les alcaloïdes, figurent deux composés dont la teneur est augmentée 2,11 fois ou réduite 0,38 fois dans les échantillons traités. Dans le groupe terpènes, le linalool (2,71) et l'allamandine (2,15), sont tous deux présents en plus grande quantité dans les échantillons traités. Le stress rayonnement entraîne un effet inverse concernant les anthocyanes et les flavonols. Son impact a pour conséquence une diminution de la teneur en certains métabolites de la famille des anthocyanes, (deux composés présents 0,91 et 0,25 fois dans les échantillons traités) et une augmentation de la teneur en certains flavonols. On remarque également une augmentation d'acide 3,4,3'-tri-O-methylellagique (2,37), un tanin hydrolysable. Parmi les autres phénylpropanoïdes présents (3 composés identifiés), il faut remarquer l'absence de composés non flavonoïdes. Dans le groupe « Autres » un polyketide non phénylpropanoïde (0,3) et un acide nucléique (0,06) sont présents.

Parmi les composés réagissant de manière similaire aux deux stress (Tableau 23), le groupe le plus représenté est celui des alcaloïdes avec 4 composés identifiés. Deux terpènes ont également été identifiés, un mono-terpène et un di-terpène ainsi que 3 lipides non polykétides, un acide gras, un glycérolipide et une vitamine. Tous ces composés voient leur teneur augmentée sous l'influence des deux stress. Parmi les phénylpropanoïdes identifiés (3 composés), il n'y a pas d'anthocyanes, de flavonols, ni de tanins. Il s'agit soit de flavonoïdes ne faisant pas partie de ces sous-familles (augmentés sous l'effet de ces stress) ou bien un lignane dont la teneur est diminuée par ces stress.

Dix-sept composés réagissant de manière différente aux facteurs « température » et « rayonnement » ont pu être annotés (Tableau 24), mais seulement 5 ont pu être classés dans

Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δ ppm	KEGG ID	Annotation	Formule brute	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Phenylpropanoïdes</i>									
+	192,1000487	1,432175634	C05851	Coumarin	C9H6O2	6,53	0,97	0,0005	x
+	78,04720572	3,274051761	C10547	Burseran	C22H26O6	6,05	1,82	0,0015	x
+	137,084871	5,886729632	C09123	Athamantin	C24H30O7	2,81	1,24	0,0344	x
+	120,057959	3,699450271	C10707	Neoisostegane	C23H26O7	2,43	1,05	0,0379	x
+	632,3734501	1,278833409	C05619	5-Hydroxyferulate	C10H10O5	2,36	1,12	0,036	x
+	244,1217678	2,416793092	C00852	Chlorogenate	C16H18O9	2,28	1,29	0,0416	x
<i>Alcaloïdes</i>									
+	312,0764962	-4,794955192	C12452	Acetyltryptine	C10H17NO2	3,43	1,01	0,0047	x
+	265,1171645	-1,225534784	C01004	N-Methylnicotinate	C7H9NO2	2,69	1,06	0,0218	x
+	258,0672312	5,38031333	C06091	Aconitine	C34H47NO11	2,05	0,84	0,0404	x
+	387,1780497	4,536180766	C00483	Tyramine	C8H11NO	1,75	0,94	0,0422	x
+	266,1213244	1,804297296	C08532	Lycorine	C16H17NO4	1,28	0,43	0,0449	x
<i>Acides aminés</i>									
-	204,0886701	-5,916632385	C00078	L-Tryptophan	C11H12N2O2	12,40	0,90	0,0013	x
+	118,0423803	4,366788672	C00148	L-Proline	C5H9NO2	2,57	0,56	0,0473	x
<i>Terpènes</i>									
+	287,1145787	-4,107447627	C08971	Propapyriogenin A2	C30H44O5	2,23	1,62	0,0356	x
+	586,3540102	5,86963491	C09788	Monotropein	C16H22O11	1,59	0,37	0,0433	x
<i>Lipides</i>									
+	245,0806293	-2,263568286	C12027	2-Amino-9,10-epoxy-8-oxodecanoic acid	C10H17NO4	3,19	1,60	0,0273	x
+	142,0828644	3,737140359	C03017	O-Propanoylcarnitine	C10H19NO4	3,01	0,58	0,0215	x
<i>Autres</i>									
+	164,0681825	-1,773617533	C14512	Benzofuran	C8H6O	10,85	1,03	0,0001	x
+	153,0795257	3,5737166	C17396	Epithienamycin B	C13H16N2O5S	8,98	1,95	0,0003	x
+	135,0685137	0,738857794	C03795	N6-Methyl-2'-deoxyadenosine	C11H15N5O3	7,83	0,93	0,0101	x
+	131,0455757	-6,003851221	C07083	Styrene	C8H8	7,67	1,66	0,0008	x
+	177,0503352	-2,054434992	C00659	2-Aceto-2-hydroxybutanoate	C6H10O4	6,64	0,91	0,0005	x
+	386,1743477	3,648973412	C00507	L-Rhamnose	C6H12O5	5,60	1,63	0,0024	x
+	388,1798576	6,885104069	C03758	Dopamine	C8H11NO2	4,91	3,12	0,0067	x
+	88,10007897	0,347074836	C02505	2-Phenylacetamide	C8H9NO	3,93	0,58	0,0025	x
+	229,036472	5,822704107	C16483	4-Fluorocyclohexadiene-cis,cis-1,2-diol	C6H7FO2	3,80	1,31	0,0039	x
+	109,0527319	-0,292605893	C07416	Penbutolol	C18H29NO2	3,79	1,80	0,0155	x
+	146,0579749	0,45232818	C00134	Putrescine	C4H12N2	3,47	0,89	0,0041	x
+	285,9514131	1,694976352	C03090	5-Phosphoribosylamine	C5H12NO7P	3,28	1,88	0,005	x
+	215,1170396	5,957747583	C01987	2-Aminophenol	C6H7NO	3,22	1,91	0,0063	x
+	283,9543806	1,76802648	C16723	Pumiloside	C26H28N2O9	3,21	2,04	0,0087	x
+	165,0515861	5,375059846	C14445	Tris(2-chloroethyl)phosphate	C6H12Cl3O4P	3,15	1,52	0,009	x
+	195,0899352	2,009043509	C03081	4-Methylumbelliferone	C10H8O3	3,10	2,04	0,0077	x
+	456,2138862	-2,010358167	C03404	L-Tyrosine methyl ester	C10H13NO3	3,05	0,84	0,012	x
+	141,0795323	3,924966286	C17444	Kurarinol	C26H32O7	2,98	1,30	0,0446	x
-	430,2006784	3,545026028	C07505	Ethosuximide	C7H11NO2	2,97	1,37	0,0213	x
+	145,1104876	1,439473152	C05543	Tetrahydrofolyl-[Glu](n)	C7H15NO2	2,69	0,89	0,0307	x
+	139,0640607	5,26474807	C06580	2,3-Dihydroxy-p-cumate	C10H12O4	2,50	1,63	0,0173	x
+	115,0638574	4,596472714	C09903	Spirolucidine	C30H49N3O2	2,47	1,25	0,0142	x
+	348,1344184	1,42498612	C06727	cis-1,2-Dihydro-3-ethylcatechol	C8H12O2	2,46	1,81	0,0242	x
+	196,0739278	1,881774299	C17507	Palmatoside G	C25H32O10	2,39	1,20	0,0381	x
+	140,084538	5,770923546	C11647	Deoxyloganic acid tetraacetate	C24H32O13	2,37	1,30	0,0488	x
-	414,170472	6,323128731	C11118	N-Methyl-2-pyrrolidinone	C5H9NO	2,36	2,05	0,0198	x
+	355,1000139	4,440886179	C00472	p-Benzoquinone	C6H4O2	2,30	1,33	0,0401	x
+	146,0371739	2,701122758	C08338	Proacacetalin	C11H17NO6	2,22	0,51	0,0398	x
-	492,1988446	-1,427547884	C00193	Aromatic aldehyde	C7H6O	2,21	1,28	0,0256	x
-	457,2207074	5,575390884	C06326	(2S)-2-[[1-(R)-Carboxyethyl]amino]pentanoate	C8H15NO4	2,19	1,06	0,0473	x
-	528,1831854	-2,093370953	C16635	5'-Deoxy-5-fluorocytidine	C9H12FN3O4	2,16	1,06	0,0487	x
+	99,06890592	4,966272328	C05399	Melibiiitol	C12H24O11	2,07	2,17	0,0497	x
+	108,021115	-0,133240885	C11913	D-Mycnose	C8H16O5	2,03	0,42	0,0354	x
+	354,0963446	3,565208151	C01407	Benzene	C6H6	1,91	1,11	0,0396	x
+	484,3212564	4,91800983	C00601	Phenylacetaldehyde	C8H8O	1,62	1,15	0,0395	x
+	259,1070995	5,836235703	C09200	Geissospermine	C40H48N4O3	1,59	0,72	0,0193	x
+	106,042259	3,717129169	C07522	Etomidate	C14H16N2O2	1,35	0,62	0,0286	x
+	189,1007498	3,393945613	C11969	6,8a-Seco-6,8a-deoxy-5-oxoavermectin "2a" aglycone	C34H50O8	1,06	1,04	0,0026	x

Tableau 19. Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^\circ C$) suite à l'expérimentation 2009.

Δ ppm, variation de la masse observée par rapport à la masse théorique ; KEGG ID, numéro d'identifiant KEGG ; Ratio T, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress thermique et les échantillons témoins ; Ratio L, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress lumineux et les échantillons témoins ; X, p.value > 0,05

Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin

Mode d'ionisation	Masse exacte	Appm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Phenylpropanoïdes</i>									
+	356,164169	5,04009311	C09308	Rutamarin	C21H24O5	0,60	0,83	0,0378	x
-	518,180728	3,697989241	C09808	Phellamurin	C26H30O11	0,43	0,65	0,0366	x
+	479,1157578	-6,665210126	C12139	Petunidin 3-O-glucoside	C22H23O12	0,37	0,89	0,0255	x
+	446,1234234	4,766582902	C16195	Glycitin	C22H22O10	0,37	0,96	0,0063	x
+	432,107425	4,115189772	C01460	Vitexin	C21H20O10	0,31	0,82	0,0131	x
+	208,073832	1,312821057	C05610	Sinapoyl aldehyde	C11H12O4	0,31	0,61	0,0152	x
+	318,038039	1,483214245	C10107	Myricetin	C15H10O8	0,31	1,16	0,0221	x
+	228,0784086	-1,033087399	C03582	Resveratrol	C14H12O3	0,27	1,96	0,0107	x
+	286,0487832	3,653725233	C05903	Kaempferol	C15H10O6	0,25	0,80	0,0059	x
+	532,1252755	6,736480833	C12625	Biochanin A 7-O-(6-O-malonyl-beta-D-glucoside)	C25H24O13	0,25	1,25	0,011	x
+	465,1003295	-6,389270514	C12138	Delphinidin 3-O-glucoside	C21H21O12	0,24	0,84	0,0039	x
-	436,1345264	-5,549989263	C01604	Phlorizin	C21H24O10	0,24	1,65	0,0102	x
+/-	595,143233	-3,247787057	C12095	Cyanidin 3-O-(6-O-p-coumaroyl)glucoside	C30H27O13	0,22	1,23	0,005	x
-	320,051546	-5,221965457	C02906	Dihydromyricetin	C15H12O8	0,21	1,01	0,0023	x
+	611,1378804	-3,60002465	C16369	Cyanidin 3-(6-p-caffeoyl)glucoside	C30H27O14	0,21	1,05	0,0064	x
+	449,1060168	-5,276482816	C08647	Cyanidin 3-O-galactoside	C21H21O11	0,19	0,86	0,0026	x
+	610,1363256	6,670741907	C10227	Gallocatechin-(4alpha->8)-epigallocatechin	C30H26O14	0,17	0,98	0,0033	x
+	354,1105942	0,722694373	C10498	Luteone	C20H18O6	0,14	2,43	0,0016	x
+	454,1439829	5,16233253	C10289	epsilon-Viniferin	C28H22O6	0,12	2,94	0,0009	x
<i>Terpènes</i>									
+	392,1455792	-3,923317677	C09443	Eupatoroxin	C20H24O8	0,36	1,32	0,0251	x
+	330,148211	4,504528429	C11854	Gibberellin A51-catabolite	C19H22O5	0,35	1,09	0,0211	x
+	264,1370888	3,519706366	C06082	Abscisate	C15H20O4	0,32	0,87	0,0142	x
+	366,1693313	4,036833794	C09521	Orizabin	C19H26O7	0,32	0,75	0,0118	x
+	434,0891787	-1,681048424	C09359	Chlorohyssopifolin A	C19H24Cl2O7	0,18	0,89	0,0023	x
+	440,1119594	-4,871382691	C09105	Hallactone B	C20H24O9S	0,18	2,27	0,0002	x
<i>Alcaloïdes</i>									
+	351,1460878	-2,763357599	C09597	Ochotensine	C21H21NO4	0,38	0,56	0,0234	x
+	632,2887133	0,1206246	C09608	Phaeantharine	C39H40N2O6	0,37	0,47	0,0345	x
+	506,121204	4,682170076	C17272	Glucosarabin	C17H32NO10S3	0,31	0,73	0,0108	x
<i>Lipides</i>									
-	116,0468462	-4,290437373	C00141	3-Methyl-2-oxobutanoic acid	C5H8O3	0,67	2,03	0,0227	x
+	288,2305137	1,575651187	C08285	10,16-Dihydroxyhexadecanoic acid	C16H32O4	0,31	1,05	0,0074	x
<i>Autres</i>									
-	100,0520082	-4,21066162	C02240	5-Valerolactone	C5H8O2	0,46	1,02	0,026	x
+	203,1184141	6,492301003	C04083	N6-(delta2-Isopentenyl)-adenine	C10H13N5	0,44	0,73	0,0352	x
-	494,1228296	3,101892481	C10492	Salvianolic acid A	C26H22O10	0,44	0,65	0,0293	x
-	610,2051645	-2,45369755	C11831	Divinylprotochlorophyllide	C35H30MgN4O5	0,43	1,98	0,0383	x
+	373,8412347	5,092656669	C14197	2,2',3,3',6,6'-Hexachloro-4-biphenylol	C12H4Cl6O	0,42	1,18	0,0448	x
+	403,1504636	4,843032198	C07427	Perphenazine	C21H26ClN3OS	0,42	2,13	0,0408	x
+	424,1432334	-5,764220969	C07467	Eprosartan	C23H24N2O4S	0,42	0,84	0,022	x
-	334,0663045	-0,579351453	C01225	sn-glycero-3-Phospho-1-inositol	C9H19O11P	0,41	1,32	0,0412	x
+	315,2061635	5,045829337	C12946	Butoctamide hydrogen succinate	C16H29NO5	0,41	0,91	0,0398	x
+	519,0967803	-5,18803544	C06884	Ceforanide	C20H21N7O6S2	0,38	0,95	0,0274	x
-	404,2018244	-0,757284202	C14922	15beta-Hydroxy-7alpha-mercapto-pregn-4-ene-3,20-dione 7-acetate	C23H32O4S	0,38	0,66	0,0235	x
+	301,1688878	3,633176332	C06967	Dobutamine	C18H23NO3	0,37	0,90	0,0274	x
+	293,1174711	3,562999855	C15040	GYKI 52466	C17H15N3O2	0,37	0,96	0,0205	x
-	318,0347733	-1,335223563	C04478	3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate	C8H15O11P	0,36	1,17	0,0417	x
+	661,2146384	5,697964113	C03580	3''-Adenylylspectinomycin	C24H36N7O13P	0,32	0,53	0,0129	x
+	498,2231736	-4,404564585	C09004	Drummondin A	C28H34O8	0,31	0,69	0,0009	x
+	278,1378837	-0,024412913	C07424	Pentoxifylline	C13H18N4O3	0,31	0,74	0,0135	x
-	774,2503083	3,864830207	C05927	7,8-Dihydromethanopterin	C30H43N6O16P	0,28	0,83	0,0085	x
+	299,1336699	-1,778937671	C13757	Saxitoxin	C10H17N7O4	0,25	0,62	0,0057	x
+	299,1395152	-1,80329607	C07868	Metoclopramide	C14H22ClN3O2	0,25	0,59	0,0057	x
+	258,0892911	0,318369432	C08465	Wyerone	C15H14O4	0,24	1,37	0,0048	x
+	466,102141	4,16810006	C03293	N-Adenylylanthranyl	C17H19N6O8P	0,20	1,09	0,0028	x
+	594,1383116	1,633754352	C17140	Tribuloside	C30H26O13	0,19	1,12	0,0028	x
+	396,1591656	4,738224037	C10063	Gartanin	C23H24O6	0,13	1,20	0,0009	x

Tableau 20. Liste des métabolites putatifs annotés et significativement diminués (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) suite à l'expérimentation 2009.

Appm, variation de la masse observée par rapport à la masse théorique ; **KEGG ID**, numéro d'identifiant KEGG ; **Ratio T**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress thermique et les échantillons témoins ; **Ratio L**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress lumineux et les échantillons témoins ; **X**, p.value > 0,05

Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin

Mode d'ionisation	Masse exacte	Appm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Phenylpropanoïdes</i>									
+	302,0795569	1,717355849	C01709	Hesperetin	C16H14O6	1,28	3,07	x	0,0046
+	304,0586112	1,014479237	C01617	Taxifolin	C15H12O7	1,60	2,97	x	0,0057
+	346,0698196	2,751535999	C04581	3',4',5,6-Tetrahydroxy-3,7-dimethoxyflavone	C17H14O8	1,46	2,65	x	0,0125
-	450,1135451	-5,923812775	C16408	2',3,4,4',6'-Peptahydroxychalcone 4'-O-glucoside	C21H22O11	1,40	2,60	x	0,0202
+	344,053285	0,196610734	C10836	3,4,3'-Tri-O-methylellagic acid	C17H12O8	1,44	2,37	x	0,0137
+	300,0635566	0,561452517	C04293	5,7,4'-Trihydroxy-3'-methoxyflavone	C16H12O6	1,42	2,11	x	0,0453
+	288,0641975	2,809845281	C00974	Dihydrokaempferol	C15H12O6	1,20	2,07	x	0,0474
<i>Terpènes</i>									
+	276,1362806	0,439765013	C09548	Scorpioidin	C16H20O4	0,60	3,86	x	0,0021
+	154,1359037	0,89888674	C11388	(-)-Linalool	C10H18O	1,80	2,71	x	0,0146
+	562,2417748	0,645135031	C08865	Eriocarpin	C29H38O11	1,30	2,48	x	0,0355
+	404,1838333	0,816567277	C09117	Isodonal	C22H28O7	1,07	2,21	x	0,0253
+	308,0905118	2,950388217	C09766	Allamandin	C15H16O7	1,26	2,15	x	0,0396
<i>Lipides</i>									
+	540,4937286	5,730539298	C02530	Cholesterol ester (see HMDB HMDB03603)	C37H64O2	1,43	2,32	x	0,0365
+	206,1309934	1,521281743	C02185	Plastoquinol-1	C13H18O2	1,73	2,01	x	0,0311
+	659,4484022	-6,372783249	C00350	Phosphatidylethanolamine	C35H66NO8P	0,85	1,79	x	0,025
<i>Alcaloïdes</i>									
+	347,1374864	1,72549341	C08524	Cavinine	C18H21NO6	0,17	3,34	x	0,0024
+	459,1642831	-3,727403219	C10286	Doronine	C21H30ClNO8	1,17	2,11	x	0,0442
<i>Autres</i>									
+	176,1052026	1,951386131	C11917	L-Cladinose	C8H16O4	0,37	17,95	x	0
-	265,0793027	-6,794957524	C11500	5'-Dehydroadenosine	C10H11N5O4	3,27	4,44	x	0,0033
+	222,0894207	0,953743601	C10429	Apiole	C12H14O4	0,43	3,62	x	0,004
+	324,1070807	4,424092553	C04333	Bis-D-fructose 2',1:2,1'-dianhydride	C12H20O10	2,14	3,42	x	0,0187
+	202,2167395	4,90885914	C00750	Spermine	C10H26N4	1,41	3,03	x	0,0128
+	581,2919096	1,871275303	C02856	N3'-Acetylpramycin	C23H43N5O12	1,79	2,82	x	0,0102
+	345,0859439	-6,604215159	C17240	p-Hydroxybenzylsulphoglucosinolate	C14H19NO7S	0,88	2,80	x	0,0076
+	440,2345415	0,109664196	C07965	Tirofiban	C22H36N2O5S	1,55	2,78	x	0,0053
-	128,0831409	-4,596542339	C08487	Ethyl 2-methylbut-2-enoate	C7H12O2	0,62	2,58	x	0,0015
-	158,0569401	-6,128998756	C02631	2-Isopropylmaleate	C7H10O4	0,61	2,42	x	0,0416
-	548,0810632	0,404770703	C03319	dTDP-6-deoxy-L-mannose	C16H26N2O15P2	0,84	2,33	x	0,0157
+	208,146433	0,495195078	C14236	4-Heptyloxyphenol	C13H20O2	0,90	2,33	x	0,038
+	154,0271693	3,639628493	C00196	2,3-Dihydroxybenzoate	C7H6O4	1,58	2,30	x	0,0478
+	362,0673054	1,470959706	C07840	Fosphenytoin	C16H15N2O6P	0,71	2,29	x	0,0298
-	208,0183238	-5,246337035	C16201	1-Naphthalenesulfonic acid	C10H8O3S	0,88	2,28	x	0,0462
+/-	582,1607442	3,906078594	C11655	Asperuloside tetraacetate	C26H30O15	1,55	2,21	x	0,0269
+	183,0898343	1,58948791	C05589	L-Normetanephrine	C9H13NO3	1,54	2,16	x	0,0324
+	516,2023301	6,061623721	C08440	Phaseolotoxin	C14H33N10O7PS	0,64	2,13	x	0,0439
+	166,0271704	3,383432378	C01606	Phthalate	C8H6O4	1,39	2,13	x	0,0385
+	701,3949454	-5,268894891	C13103	Leucomycin V	C35H59NO13	0,76	1,84	x	0,0128
+	343,0893449	-2,874543695	C15772	DIBOA-glucoside	C14H17NO9	0,77	1,18	x	0,0348

Tableau 21. Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2009.

Appm, variation de la masse observée par rapport à la masse théorique ; **KEGG ID**, numéro d'identifiant KEGG ; **Ratio T**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress thermique et les échantillons témoins ; **Ratio L**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress lumineux et les échantillons témoins ; **X**, p.value > 0,05

Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin

Mode d'ionisation	Masse exacte	Appm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Alcaloïdes</i>									
+	141,1519137	1,162601496	C10159	(+)-N-Methylconiine	C9H19N	1,09	0,98	x	0,0208
-	229,0738495	-0,190927511	C10676	gamma-Fagarine	C13H11NO3	1,49	0,59	x	0,0059
+	171,0901373	3,472065908	C10284	Crotanecine	C8H13NO3	1,25	0,52	x	0,0491
+	151,1000731	2,376025972	C02442	N-Methyltyramine	C9H13NO	1,61	0,46	x	0,0393
+	155,0945764	-0,337068247	C06177	Retronecine	C8H13NO2	0,99	0,38	x	0,0363
+	464,2690357	3,291284235	C09612	Psychotrine	C28H36N2O4	0,52	0,37	x	0,0458
+	235,1213697	2,238543258	C09573	Lophophorine	C13H17NO3	1,17	0,35	x	0,01
+	614,3612226	-1,39020635	C09246	Toxiferine I	C40H46N4O2	1,80	0,33	x	0,0144
-	259,0847392	1,085581524	C10701	Kokusaginine	C14H13NO4	0,44	0,26	x	0,0082
<i>Phenylpropanoïdes</i>									
-	255,0658623	0,50385698	C08574	Apigeninidin	C15H11O4	0,59	0,91	x	0,0482
-	315,0862932	-1,809017607	C08729	Rosinidin	C17H15O6	0,83	0,25	x	0,0152
<i>Lipides</i>									
+	116,0840543	2,797143293	C01585	Hexanoic acid	C6H12O2	1,28	0,28	x	0,0093
+	187,1220426	6,40856056	C01092	8-Amino-7-oxononanoate	C9H17NO3	2,06	0,22	x	0,0033
<i>Autres</i>									
-	168,0179919	-4,571684838	C02527	Butanoylphosphate	C4H9O5P	0,73	0,45	x	0,0358
+	211,0371907	6,55649394	C02305	Phosphocreatine	C4H10N3O5P	0,67	0,45	x	0,0274
+	110,0370243	2,225520533	C00090	Catechol	C6H6O2	1,24	0,45	x	0,04
-	170,0572874	-3,654139893	C07123	2-Hydroxy-6-oxo-octa-2,4-dienoate	C8H10O4	0,72	0,44	x	0,0285
+	152,0476862	2,249864931	C00642	4-Hydroxyphenylacetate	C8H8O3	1,21	0,44	x	0,0238
+	164,0473488	0,028592239	C00166	Phenylpyruvate	C9H8O3	1,24	0,40	x	0,0207
+	213,0646059	4,146184259	C15503	N,N-Dihydroxy-L-tyrosine	C9H11NO5	1,14	0,40	x	0,0242
+	161,084083	0,118099285	C00955	Indole-3-ethanol	C10H11NO	1,52	0,37	x	0,0197
-	312,1040971	-4,965439789	C07285	Arabino-galactose	C11H20O10	0,79	0,36	x	0,044
+	98,07321558	0,516396349	C00414	Cyclohexanone	C6H10O	1,68	0,35	x	0,0204
+	251,1169021	4,556029301	C01657	Ac-Tyr-OEt	C13H17NO4	1,50	0,33	x	0,0192
-	257,0810653	-3,134148868	C08195	Meclofenoxate	C12H16ClNO3	0,82	0,32	x	0,0228
+	251,0790907	-1,122545132	C02564	N-Feruloylglycine	C12H13NO5	0,94	0,31	x	0,0241
-	406,0871776	-6,942174218	C10075	Lancerin	C19H18O10	1,74	0,30	x	0,0192
+	273,1247254	-6,854406811	C11565	8-Allyl-2-phenyl-8H-1,3a,8-triaza-cyclopenta[a]indene	C18H15N3	0,89	0,29	x	0,0182
-	474,1866014	-5,021474052	C09968	Robustol A	C25H30O9	1,04	0,27	x	0,0189
-	430,1271192	1,71335685	C03033	beta-D-Glucuronoside	C22H22O9	1,47	0,26	x	0,0286
-	212,0677085	-3,607028902	C10674	Danielone	C10H12O5	0,76	0,26	x	0,0146
+	248,0547809	-5,753946637	C00647	Pyridoxamine phosphate	C8H13N2O5P	1,79	0,26	x	0,0199
-	162,0165795	0,874010768	C01127	4-Hydroxy-2-oxoglutarate	C5H6O6	0,82	0,25	x	0,0162
+	257,0681856	-2,420636313	C04207	N-Benzoyl-4-hydroxyanthranilate	C14H11NO4	1,69	0,25	x	0,0022
+	573,329851	-2,884655805	C09997	Amphibine A	C33H43N5O4	1,72	0,25	x	0,0018
+	378,0418379	5,109008516	C16615	6-Methylthiopurine 5'-monophosphate ribonucleotide	C11H15N4O7PS	0,65	0,24	x	0,03
-	138,0309116	-5,668997272	C00805	Salicylate	C7H6O3	0,49	0,23	x	0,0032
+	232,1050557	-3,730847118	C03415	N2-Succinyl-L-ornithine	C9H16N2O5	0,72	0,22	x	0,0022
-	334,0548786	-5,159173191	C00455	Nicotinamide D-ribonucleotide	C11H15N2O8P	1,67	0,14	x	0,0052
+	127,0997659	0,40781725	C11519	N-Cyclohexylformamide	C7H13NO	0,52	0,12	x	0,0039
+	339,0471157	1,032397955	C15667	5-carboxyamino-1-(5-phospho-D-ribose)imidazole	C9H14N3O9P	1,30	0,10	x	0,0015
-	306,0237304	-5,135390138	C02355	2',3'-Cyclic UMP	C9H11N2O8P	1,37	0,06	x	0,0004
+	329,0715526	-4,757016344	C11229	Epoxiconazole	C17H13ClFN3O	1,28	0,01	x	0
-	173,1045553	-3,68600501	C02710	N-Acetyl-L-leucine	C8H15NO3	1,48	0,00	x	0

Tableau 22. Liste des métabolites putatifs annotés et significativement diminués (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2009.

Δppm, variation de la masse observée par rapport à la masse théorique ; **KEGG ID**, numéro d'identifiant KEGG ; **Ratio T**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress thermique et les échantillons témoins ; **Ratio L**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress lumineux et les échantillons témoins ; **X**, p.value > 0,05

Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin

A

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δ ppm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Alcaloïdes</i>									
+	652,3103434	-6,911401451	C09461	Hernandezine	C39H44N2O7	3,41	2,93	0,0026	0,0226
+	83,07393646	5,262397689	C06181	Piperidine	C5H9N	2,03	1,37	0,0127	0,0235
+	139,100599	6,361842469	C00783	Tropinone	C8H13NO	1,96	1,38	0,0083	0,0284
+	608,2848137	-6,28544334	C09357	Berberamine	C37H40N2O6	1,88	1,95	0,0193	0,0254
<i>Terpènes</i>									
+	360,1414492	-1,619265726	C11636	7-Deoxyloganate	C16H24O9	15,29	7,65	0	0
+	544,2302394	-1,117073373	C11700	10-Deacetylbaocatin III	C29H36O10	3,66	6,40	0,0033	0,0003
<i>Lipides</i>									
+	213,137602	5,201178851	C11844	N-Heptanoylhomoserine lactone	C11H19NO3	29,97	3,53	0	0,0017
+	964,8505808	4,860320043	C00422	Triacylglycerol	C63H112O6	4,51	6,93	0,0033	0,0002
+	410,3200713	3,876783758	C14154	beta-Tocotrienol	C28H42O2	1,71	1,56	0,0419	0,0474
<i>Phenylpropanoïdes</i>									
+	564,1504148	4,447739013	C04858	Apigenin 7-O-[beta-D-apsiosyl-(1->2)-beta-D-glucoside]	C26H28O14	3,41	5,59	0,0034	0,0003
+	328,0590177	2,179559916	C10198	(-)-Acanthocarpin	C17H12O7	1,68	6,33	0,024	0,0001
<i>Autres</i>									
+	368,163251	2,382497877	C15145	4,4-Bis[4-(acetyloxy)phenyl]3-hexanone	C22H24O5	8,34	2,68	0,0007	0,0137
-	513,2013533	2,867765008	C12429	13-Deoxydaunorubicin	C27H31NO9	7,72	2,70	0,0009	0,0139
+	244,1794488	3,096666418	C01255	N-(6-Aminohexanoyl)-6-aminohexanoate	C12H24N2O3	7,46	1,81	0,0028	0,0036
+	659,4218181	-1,964966753	C13929	Argiotoxin 659	C31H53N11O5	5,34	3,32	0,0001	0,0004
+	840,3072447	-4,754589239	C12007	Mureidomycin A	C38H48N8O12S	5,33	1,94	0,0004	0,0273
+	116,0108577	-0,870232451	C00122	Fumarate	C4H4O4	5,20	3,22	0,0032	0,0106
-	293,0883598	-5,381989701	C12256	(+)-2,7-Dideoxypancratistatin	C14H15NO6	4,84	5,39	0,0004	0,0012
+	284,1055584	2,461662859	C10484	Phenethyl caffeate	C17H16O4	4,58	1,64	0,0009	0,0036
+	572,3715926	0,504182347	C03033	beta-D-Glucuronoside	C34H52O7	2,97	2,72	0,0091	0,0077
+	150,0324858	5,27751313	C02137	alpha-Oxo-benzeneacetic acid	C8H6O3	2,53	4,34	0,0146	0,0368
-	215,0784977	-4,06734863	C11711	Succinyl proline	C9H13NO5	2,43	1,91	0,02	0,0256
+	300,0277373	2,448761347	C10394	Pseudopurpurin	C15H8O7	2,32	3,84	0,0435	0,0028
+	113,0847584	6,141018981	C06593	epsilon-Caprolactam	C6H11NO	2,31	1,10	0,0063	0,0194
+	487,1212265	2,124209233	C02555	Luciferyl sulfate	C26H21N3O5S	2,19	1,65	0,0059	0,0499

B

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δ ppm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Phenylpropanoïdes</i>									
-	398,1346547	-4,768201554	C10556	Deoxypodophyllotoxin	C22H22O7	0,16	0,29	0,0021	0,0101
<i>Autres</i>									
+	291,0340215	3,406258419	C06604	Parathion	C10H14NO5PS	0,52	0,31	0,0062	0,0014
+	284,1362239	5,294173648	C07379	Promazine	C17H20N2S	0,40	0,52	0,0394	0,036
+	661,2320253	0,037908447	C01138	Streptomycin 6-phosphate	C21H40N7O15P	0,31	0,40	0,0113	0,0272
+	141,9945963	-4,394354647	C14688	Bis(2-chloroethyl)ether	C4H8Cl2O	0,30	0,46	0,0174	0,0242
-	867,1733693	6,608641192	C03237	5-Hydroxypentanoyl-CoA	C26H44N7O18P3S	0,24	0,00	0,0236	0
+	262,0145461	-0,677599021	C05582	Homovanillate	C9H10O7S	0,21	0,37	0,0022	0,0336
-	388,1551206	-0,643506353	C07778	Cetirizine	C21H25ClN2O3	0,21	0,18	0,0042	0,0058
-	112,0520585	-3,311355214	C01066	Cyclohexane-1,3-dione	C6H8O2	0,11	0,03	0,0005	0,0004
-	430,2340688	-3,416827942	C15425	21-Hydroxypregn-4-ene-3,20-dione hydrogen succinate	C25H34O6	0,08	0,22	0,0205	0,0316
-	265,0894171	3,46816455	C01779	Albendazole	C12H15N3O2S	0,00	0,72	0	0,0077
-	502,1560089	5,225442344	C12082	alpha-L-Rhamnopyranosyl-(1->2)-beta-D-galactopyranosyl-(1->2)-beta-D-glucuronopyranoside	C18H30O16	0,00	0,00	0	0

Tableau 23. Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (A) et diminués (B) (p.value < 0,05) de manière commune dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}\text{C}$) et celles exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2009.

Δ ppm, variation de la masse observée par rapport à la masse théorique ; KEGG ID, numéro d'identifiant KEGG ; Ratio T, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress thermique et les échantillons témoins ; Ratio L, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress lumineux et les échantillons témoins

Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin

A

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δ ppm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Autres</i>									
+	379,14413	5,689695565	C09336	Angoline	C22H21NO5	3,60	0,00	0,001	0
+	100,088898	0,829040769	C00854	Cyclohexanol	C6H12O	3,33	0,40	0,0072	0,0368
-	276,014002	5,762073066	C11570	2-(2-Chloro-phenyl)-5-(5-methylthiophen-2-yl)-[1,3,4]oxadiazole	C13H9ClN2OS	3,33	0,24	0,0194	0,0337
+	159,0901603	3,878594212	C02636	3-Dehydrocarnitine	C7H13NO3	3,03	0,09	0,0073	0,0002
+	288,1454545	-6,725636353	C11494	Methyl 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-p-toluate	C16H20N2O3	1,90	0,36	0,0357	0,0052
+	690,3282163	-2,366881288	C08033	Dalfopristin	C34H50N4O9S	1,49	0,93	0,0102	0,0227
+	431,0572815	0,79237067	C10952	Rimsulfuron	C14H17N5O7S2	1,21	0,00	0,0287	0

B

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δ ppm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Phenylpropanoïdes</i>									
+/-	390,1331908	4,416785215	C10275	Piceïd	C20H22O8	0,27	2,68	0,0136	0,0405
+	372,1211364	0,627175313	C10186	Sinensetin	C20H20O7	0,26	2,60	0,0077	0,0436
<i>Terpènes</i>									
+	618,2675489	-0,126032458	C08853	Bryotoxin A	C32H42O12	0,40	2,67	0,0038	0,0207
+/-	420,144154	5,049841146	C09500	Melampodin A	C21H24O9	0,18	2,45	0,0024	0,0485
<i>Lipides</i>									
-	780,2517956	4,479213678	C04537	N,N'-Diacetylchitobiosyldiphosphodolichol	C28H50N2O19P2	0,00	2,80	0	0,0176
<i>Autres</i>									
+	474,2237301	-3,453932111	C17049	Picrasin A	C26H34O8	0,66	1,96	0,0293	0,0273
+	480,0671989	-4,296090234	C06773	11-O-Demethylpradinone II	C24H16O11	0,42	2,93	0,0362	0,0306
-	205,0730425	-4,14824181	C02043	Indolelactate	C11H11NO3	0,23	3,21	0,0004	0,0114
+	544,1613388	5,99549069	C12384	Premithramycin A1	C27H28O12	0,19	1,48	0,0405	0,0454
-	641,2045801	6,686647944	C12057	Cyclothialidine	C26H35N5O12S	0,00	2,33	0	0,0326

Tableau 24. Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (A) et diminués (B) (p.value < 0,05) de manière inverse dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) et celles exposées à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2009.

Δ ppm, variation de la masse observée par rapport à la masse théorique ; **KEGG ID**, numéro d'identifiant KEGG ; **Ratio T**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress thermique et les échantillons témoins ; **Ratio L**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress lumineux et les échantillons témoins

un groupe chimique. Il s'agit de 2 terpènes, 1 lipide, 1 stilbène et 1 flavone. Le stress thermique provoque une diminution des teneurs pour chacun de ces composés, alors que le stress lumière entraîne l'effet inverse.

Ce classement par groupes chimiques a permis d'attribuer à 38% des métabolites annotés une signification biologique réaliste pour la réponse de la baie de raisin à différents stress abiotiques. Néanmoins, ces métabolites ne représentent qu'environ 5% des signaux de masse totaux identifiés comme réagissant de manière significative aux facteurs température et rayonnement, et qu'un certain nombre de ces signaux ne correspondent pas à des métabolites mais à des fragmentations de ces derniers lors de l'ionisation.

II.4.2.2. Expérimentation 2010

Les différents groupes chimiques utilisés pour le classement des métabolites dosés pour l'expérimentation 2010 diffèrent légèrement de ceux employés pour l'expérimentation 2009. En effet, aucun alcaloïde n'a pu être identifié, ce qui entraîne la disparition de ce groupe dans les différentes catégories testées. De plus, de nombreux acides aminés ont été identifiés dans ces échantillons, ce qui induit une forte représentation du groupe « acides aminés », qui réagit principalement de manière spécifique à la température (Figure 41).

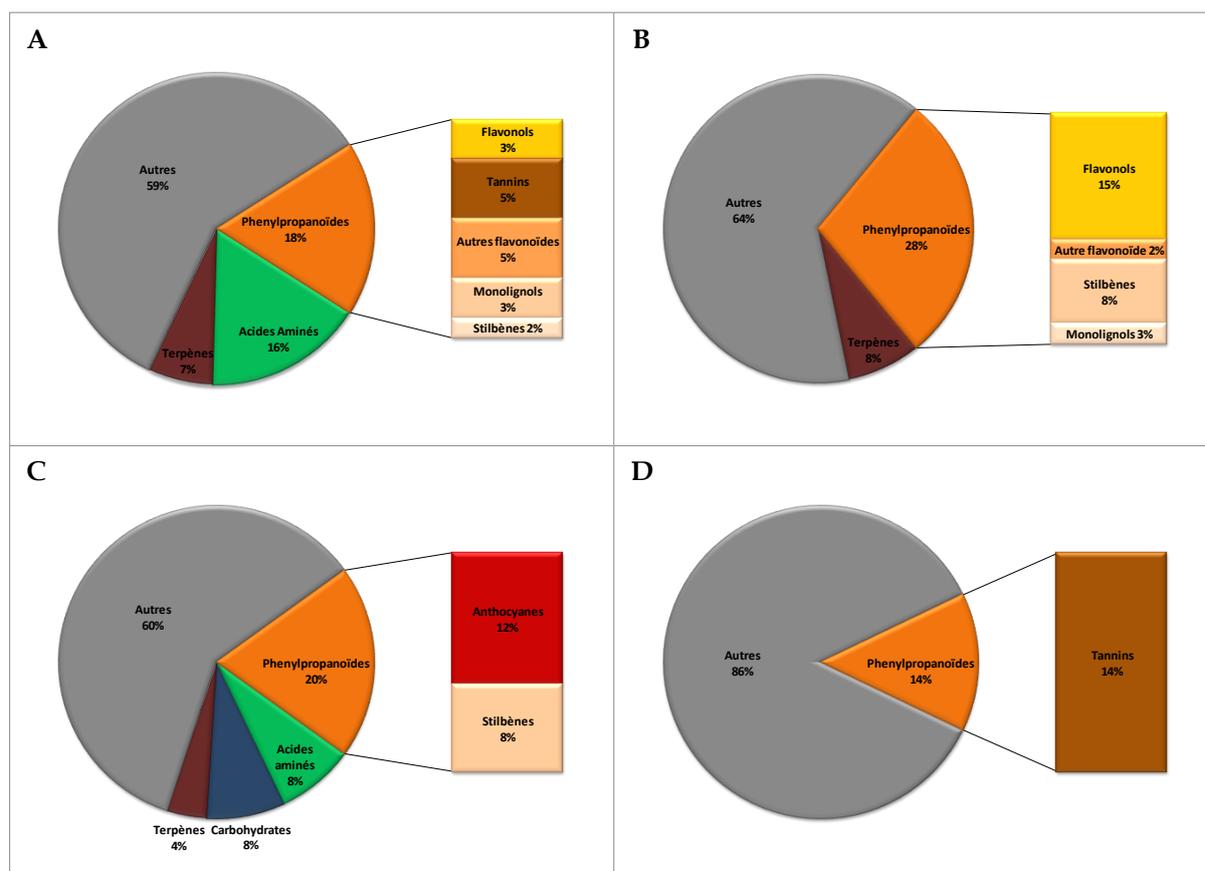


Figure 41. Répartition des métabolites putatifs annotés automatiquement suivant la base de données KEGG et différenciés différenciellement accumulés ou diminués ($p.value < 0,05$) dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}C$) ou un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2010. (A) Répartition des métabolites différenciellement accumulés ou diminués uniquement dans les échantillons exposés au stress thermique. (B) Répartition des métabolites différenciellement accumulés ou diminués uniquement dans les échantillons exposés au stress lumineux. (C) Répartition des métabolites différenciellement accumulés ou diminués de manière similaire entre les échantillons exposés au stress thermique et ceux exposés au stress lumineux. (D) Répartition des métabolites différenciellement accumulés ou diminués de manière inverse entre les échantillons exposés au stress thermique et ceux exposés au stress lumineux.

Parmi les métabolites réagissant spécifiquement au stress thermique, figurent de nombreux acides aminés (Tableaux 25 et 26). Neuf acides aminés voient leur teneur augmentée par ce stress. Il s'agit par ordre croissant d'augmentation de : SER, TRP, VAL, ALA, LEU, HIS, PHE, TYR et MET. Les teneurs de ces acides aminés augmentent de 1,7 fois à 4,4 fois dans

nos échantillons. On trouve également des terpènes, principalement des monoterpènes (4 composés). Tous les phenylpropanoïdes identifiés (flavonols, catéchine et gallocatéchine, monolignols) présentent une teneur diminuée sous l'influence du stress thermique. Il faut relever l'absence d'anthocyanes dans cette catégorie. Le groupe « Autres » est constitué de glucosides cyanogéniques, un glucosinolate, un sucre et un acide nucléique.

Dans la catégorie « Lumière spécifique » (Tableau 27), le groupe le plus représenté est celui des phénylpropanoïdes avec 11 composés annotés. La moitié de ces molécules appartiennent à la famille des flavonols et toutes sont présentes en plus grande quantité dans les échantillons exposés au stress lumineux. Il est intéressant de noter que la quercitrine (21 fois plus abondante dans les échantillons traités) est le composé s'accumulant le plus fortement parmi tous les métabolites putatifs identifiés et réagissant de manière significative au stress lumineux. L'alcool sinapylique, un monolignol, réagit de la même manière (2,36). La concentration des stilbènes picéatannol et isorhapontine est diminuée sous l'effet de ce stress. De nouveau, l'absence de représentant de la famille des anthocyanes est notée. Parmi les autres composés annotés, on retrouve des terpènes, présents en plus grande ou en plus petite quantité selon les cas. Enfin dans le groupe « Autres », figurent l'acide ascorbique (0,37), la prunasine (0,23) et un xanthène (0,60).

La catégorie « Commun » regroupe les métabolites réagissant de manière similaire face aux deux stress étudiés (Tableaux 28A et 28B). L'apigéninidine, précurseur de la famille des anthocyanes, est présente en moins grande quantité sous l'effet des deux stress. Les différents stress appliqués diminuent les quantités de deux stilbènes, le resvératrol et le picéide. Inversement, la teneur de deux acides aminés, THR et ARG, augmentent après exposition à un stress thermique ou lumineux. Deux monosaccharides sont également présents en plus grande quantité dans les échantillons traités.

Six composés réagissant de manière différentielle au stress lumineux ou thermique même si un seul de ces composés a pu être classé (Tableaux 28C et 28D). Il s'agit d'un tanin condensé (épicatéchine-(4 β ->8)-ent-épicatéchine), présent de manière plus abondante dans les échantillons exposés au stress lumineux.

Pour cette seconde expérimentation, l'étude des groupes chimiques a permis de classer 38% des métabolites putatifs annotés, donnant ainsi un aperçu des altérations du métabolisme des pellicules de baie induites par un stress thermique ou lumineux. Ces métabolites représentent

Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin

environ 7% des métabolites totaux réagissant de manière significative aux deux stress abiotiques testés.

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δ ppm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Acides Aminés</i>									
+	149,0509753	-0,498458127	C00073	L-Methionine	C5H11NO2S	4,43	1,43	0,0002	x
+	181,0738921	-0,0061645	C00082	L-Tyrosine	C9H11NO3	4,38	1,06	0,0002	x
+	165,0790483	0,422242136	C00079	L-Phenylalanine	C9H11NO2	3,50	1,04	0,0012	x
-	155,0694023	-0,478535752	C00135	L-Histidine	C6H9N3O2	2,75	1,37	0,0008	x
+	131,0946626	0,258890708	C00123	L-Leucine	C6H13NO2	2,44	1,22	0,0099	x
+	89,04768037	0,021354964	C00041	L-Alanine	C3H7NO2	2,40	1,58	0,0118	x
+	117,0788971	-0,696083342	C00183	L-Valine	C5H11NO2	2,07	0,97	0,0276	x
-/+	204,0895167	-1,768620348	C00078	L-Tryptophan	C11H12N2O2	1,96	1,15	0,0111	x
-	105,042655	0,589634706	C00065	L-Serine	C3H7NO3	1,71	1,26	0,0183	x
<i>Terpènes</i>									
-	408,1781219	-0,725135144	C09579	Vernoflexuoside	C21H28O8	3,88	1,42	0,0005	x
-	356,1097016	-2,89398126	C09782	Gentiopicrin	C16H20O9	1,88	0,82	0,0263	x
-	374,1197653	-4,093798382	C11673	Geniposidic acid	C16H22O10	1,73	1,00	0,0295	x
<i>Phenylpropanoïdes</i>									
+	209,0843004	1,130753909	C16604	2-Hydroxyiminostilbene	C14H11NO	2,77	0,71	0,0047	x
<i>Autres</i>									
+	187,1686653	1,084543877	C00612	N1-Acetylspermidine	C9H21N3O	7,74	0,49	0	x
+	85,05267081	-1,09389663	C02659	Acetone cyanohydrin	C4H7NO	4,99	0,95	0,0002	x
+	164,0471197	-1,367992565	C00166	Phenylpyruvate	C9H8O3	4,93	1,14	0,0001	x
+	265,116995	-1,864699885	C03795	N6-Methyl-2'-deoxyadenosine	C11H15N5O3	4,64	1,34	0,0005	x
+	86,03683744	0,674228176	C00741	Diacetyl	C4H6O2	4,00	0,67	0,0004	x
-	375,1600872	1,739876152	C07661	Gatifloxacin	C19H22FN3O4	3,39	1,65	0,0014	x
-	100,0525786	1,489883491	C02240	5-Valerolactone	C5H8O2	3,10	1,00	0,0029	x
+	281,0900475	0,392389595	C05595	4-Hydroxyphenylacetylglutamic acid	C13H15NO6	3,06	1,08	0,0029	x
+	261,1218078	2,184683596	C08334	Lotaustralin	C11H19NO6	2,88	1,43	0,0113	x
-	254,0996819	-1,911064781	C05401	3-beta-D-Galactosyl-sn-glycerol	C9H18O8	2,56	0,62	0,0028	x
+	85,08914854	-0,009608158	C01746	Piperidine	C5H11N	2,47	1,17	0,0087	x
-	129,0425246	-0,531011473	C01877	4-Oxoproline	C5H7NO3	2,44	1,19	0,0028	x
-	278,1359962	-6,810491809	C03001	N-Benzoyl-D-arginine	C13H18N4O3	2,42	1,01	0,0267	x
+	187,0633748	0,247335803	C00331	Indolepyruvate	C11H9NO2	2,19	1,25	0,0215	x
+	260,0306365	3,529884257	C00085	D-Fructose 6-phosphate	C6H13O9P	1,91	1,09	0,0336	x
-	146,0212881	-1,610351497	C00026	2-Oxoglutarate	C5H6O5	1,87	1,54	0,0138	x
+/-	247,1058865	1,210949177	C01594	Linamarin	C10H17NO6	1,83	1,12	0,0483	x
-	174,016737	1,718798393	C00417	cis-Aconitate	C6H6O6	1,68	1,54	0,0297	x
-	420,1267192	-0,13557381	C11674	Secogalioside	C17H24O12	1,67	1,44	0,0354	x
-	208,1463412	0,054549549	C14236	4-Heptyloxyphenol	C13H20O2	1,34	1,16	0,025	x

Tableau 25. Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^\circ C$) suite à l'expérimentation 2010.

Δ ppm, variation de la masse observée par rapport à la masse théorique ; **KEGG ID**, numéro d'identifiant KEGG ; **Ratio T**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress thermique et les échantillons témoins ; **Ratio L**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress lumineux et les échantillons témoins ; **X**, p.value > 0,05

Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δ ppm	KEGG ID	Annotations	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Phenylpropanoïdes</i>									
-	434,1213212	0,055954937	C09099	Naringenin 7-O-beta-D-glucoside	C21H22O10	0,39	1,11	0,0493	x
-	354,0940559	-2,898237115	C00852	Chlorogenate	C16H18O9	0,39	0,90	0,0438	x
+	290,0798252	2,713162349	C06562	(+)-Catechine	C15H14O6	0,27	1,26	0,0044	x
-	336,0830615	-4,332048724	C10434	5-O-Caffeoylshikimic acid	C16H16O8	0,27	1,02	0,0133	x
-/+	346,0678392	-2,9711008	C04581	3',4',5,6-Tetrahydroxy-3,7-dimethoxyflavone	C17H14O8	0,24	0,81	0,0097	x
+	274,0840507	-0,265782631	C12124	Apiforol	C15H14O5	0,23	1,40	0,0077	x
+/-	306,0743924	1,436298204	C05906	Leucocyanidin	C15H14O7	0,16	1,12	0,0021	x
+	610,1316724	-0,955707901	C10227	Galocatechin-(4 α ->8)-epigallocatechin	C30H26O14	0,11	0,45	0,0018	x
-	306,07313	-2,688137361	C12127	(+)-Galocatechin	C15H14O8	0,10	0,95	0,0014	x
-	318,0375212	-0,144972583	C10107	Myricetin	C15H10O8	0,04	0,52	0,0003	x
<i>Terpènes</i>									
-	482,1426257	0,413552568	C09775	Catalposide	C22H26O12	0,28	1,29	0,0251	x
<i>Autres</i>									
-	336,1411165	4,718997883	C02590	Steroid O-sulfate	C18H24O4S	0,51	0,93	0,0234	x
+	350,1046476	-0,652586652	C11268	Biapenem	C15H18N4O4S	0,40	1,54	0,0398	x
-	363,0873572	-4,22609849	C06878	Cefadroxil	C16H17N3O5S	0,39	1,02	0,0414	x
+	428,1484241	3,05121721	C15181	Wortmannin	C23H24O8	0,38	1,09	0,0409	x
+	309,0853095	1,48074734	C03033	beta-D-Glucuronoside	C14H15NO7	0,38	1,37	0,0489	x
+	331,0664059	-5,327992235	C00360	dAMP	C10H14N5O6P	0,36	1,83	0,0287	x
+	496,1248832	-3,056012491	C14803	1-Nitro-7-hydroxy-8-glutathionyl-7,8-dihydronaphthalene	C20H24N4O9S	0,35	0,77	0,0295	x
-	255,0227064	3,674452229	C14333	Pronamide	C12H11Cl2NO	0,33	0,60	0,0215	x
-	426,1878511	-2,654869214	C15970	Abcisic acid glucose ester	C21H30O9	0,28	0,51	0,025	x
-	596,1356896	-3,430728624	C12637	Quercetin 3-O-[beta-D-xylosyl-(1->2)-beta-D-glucoside]	C26H28O16	0,26	0,96	0,0104	x
-	404,0709023	5,913326662	C08406	Glucocleomin	C12H22NO10S2	0,26	1,10	0,0221	x
-	169,074005	0,660941823	C00314	Pyridoxine	C8H11NO3	0,26	0,82	0,0022	x
+	608,1727154	-2,310066868	C10382	Physcion 8-gentiobioside	C28H32O15	0,24	0,64	0,0109	x
-	651,1478968	2,689231822	C06767	Hemine	C34H32ClFeN4O4	0,18	0,59	0,0017	x
+	226,0631459	0,671142655	C11446	4-Dihydroxyethyl-8,9-epoxy-enediynes	C14H10O3	0,15	0,72	0,0009	x

Tableau 26. Liste des métabolites putatifs annotés et significativement diminués (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}C$) suite à l'expérimentation 2010.

Δ ppm, variation de la masse observée par rapport à la masse théorique ; **KEGG ID**, numéro d'identifiant KEGG ; **Ratio T**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress thermique et les échantillons témoins ; **Ratio L**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress lumineux et les échantillons témoins ; **X**, p.value > 0,05

Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin

A

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δppm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Phenylpropanoïdes</i>									
-/+	448,0993822	-2,631680343	C01750	Quercitrin	C21H20O11	1,53	21,15	x	0
-	464,0950174	-0,988217393	C05623	Quercetin 3-O-glucoside	C21H20O12	0,98	7,82	x	0,0001
+	316,0588017	1,578751287	C04443	3',4',5,7-Tetrahydroxy-3-methoxyflavone	C16H12O7	1,44	5,14	x	0,0002
-	610,1530085	-0,616934942	C05625	Rutin	C27H30O16	1,36	3,55	x	0,0023
+	304,0589463	2,116623266	C01617	Taxifolin	C15H12O7	0,91	3,36	x	0,0129
+	210,0894838	1,30836049	C02325	Sinapyl alcohol	C11H14O4	0,66	2,36	x	0,0216
+	450,1168148	1,340272747	C16408	2',3,4,4',6'-Peptahydroxychalcone 4'-O-glucoside	C21H22O11	0,81	1,95	x	0,0385
<i>Terpènes</i>									
+	152,1200961	-0,125116145	C00808	(+)-Camphor	C10H16O	1,44	2,07	x	0,0195
+	134,1094837	-0,497720058	C06575	p-Cymene	C10H14	1,28	2,03	x	0,024
<i>Autres</i>									
+	179,057851	-2,190085985	C01586	Hippurate	C9H9NO3	4,06	8,45	x	0,0001
-	232,0346495	-0,66605127	C01068	D-Ribitol 5-phosphate	C5H13O8P	1,28	4,19	x	0,002
-	490,22562	1,282713892	C07669	Glimepiride	C24H34N4O5S	0,50	3,98	x	0,0006
+	177,0901158	-0,54315098	C16452	N'-Nitrosornicotine	C9H11N3O	0,56	2,89	x	0,0046
-	316,0781908	4,633824857	C14893	2-(4-Chlorophenyl)-3-phenyl-3-(2-pyridinyl)acrylonitrile	C20H13ClN2	0,70	2,19	x	0,0284
+	184,0367427	-2,340045546	C05580	3,4-Dihydroxymandelate	C8H8O5	0,53	2,13	x	0,0179
+	142,0742353	0,05441254	C06231	Ectoine	C6H10N2O2	1,71	1,98	x	0,0297
+	360,1049891	-1,826514544	C03033	beta-D-Glucuronoside	C15H20O10	0,72	1,93	x	0,0349
+	81,98195593	-0,300723369	C06701	Phosphonate	PH3O3	0,85	1,85	x	0,0422
-	158,0577562	-0,965764121	C02631	2-Isopropylmaleate	C7H10O4	0,46	1,83	x	0,0423
-	594,1372713	-0,117154625	C17140	Tribuloside	C30H26O13	0,22	1,76	x	0,0032

B

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δppm	KEGG ID	Annotations	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Phenylpropanoïdes</i>									
+	244,0742238	2,724322584	C05901	Piceatannol	C14H12O4	0,57	0,35	x	0,0156
-	436,1348495	-4,80922792	C01604	Phlorizin	C21H24O10	0,45	0,31	x	0,0071
+/-	420,1434109	3,281151731	C10266	Isorhapontin	C21H24O9	0,78	0,14	x	0,0002
<i>Terpènes</i>									
-	466,1465963	-1,96368541	C09765	Agnuside	C22H26O11	0,75	0,18	x	0,0008
<i>Autres</i>									
-	414,0558706	0,791490777	C11170	Sulbenicillin	C16H18N2O7S2	1,46	0,63	x	0,0458
-	422,0874104	5,920588583	C10077	Mangiferin	C19H18O11	0,78	0,60	x	0,0474
-	480,1273958	5,073382816	C08111	Cefepime	C19H24N6O5S2	0,45	0,50	x	0,0454
+	134,073292	0,947688672	C02394	Cinnamyl alcohol	C9H10O	1,06	0,48	x	0,0292
+	176,0321123	0,13819115	C00072	Ascorbate	C6H8O6	0,53	0,37	x	0,0204
+	214,0390873	-2,731246229	C13700	Clofibrac acid	C10H11ClO3	0,50	0,32	x	0,0085
+	461,1693252	1,612755336	C16578	Morphine-6-glucuronide	C23H27NO9	1,37	0,25	x	0,0014
+	295,1052986	-0,978184165	C00844	(R)-Prunasin	C14H17NO6	1,04	0,23	x	0,0003
+	242,0582435	1,382729442	C10322	Cyperaquinone	C14H10O4	1,28	0,18	x	0,0007
+	270,0716381	-4,749652866	C01726	D-Lombricine	C6H15N4O6P	0,93	0,12	x	0,0001

Tableau 27. Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (A) et diminués (B) (p.value < 0,05) dans les pellicules de baies exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2009.

Δppm, variation de la masse observée par rapport à la masse théorique ; **KEGG ID**, numéro d'identifiant KEGG ; **Ratio T**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress thermique et les échantillons témoins ; **Ratio L**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress lumineux et les échantillons témoins ; **X**, p.value > 0,05

Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin

A

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δ ppm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Acides aminés</i>									
+/-	119,0581187	-1,045305363	C00188	L-Threonine	C4H9NO3	2,17	1,78	0,0193	0,0447
-/+	174,1113965	-1,603447825	C00062	L-Arginine	C6H14N4O2	1,94	2,97	0,0104	0,0057
<i>Carbohydrates</i>									
+	221,0900838	0,663063705	C00140	N-Acetyl-D-glucosamine	C8H15NO6	6,44	1,64	0	0,0181
+	251,1005641	0,247761729	C06470	Muramic acid	C9H17NO7	2,92	2,12	0,0079	0,0331
<i>Autres</i>									
-	335,1324904	-1,116597601	C04540	N4-(Acetyl-beta-D-glucosaminyl)asparagine	C12H21N3O8	5,30	1,86	0	0,0467
+	202,0772478	-4,961076573	C14335	Pyrene	C16H10	2,72	2,76	0,0103	0,0044
-	184,0139442	1,464875226	C15556	3,4-Dihydroxy-2-butanone 4-phosphate	C4H9O6P	2,41	5,22	0,0122	0,0003
+	250,0240522	5,864558418	C16152	Blue pigment	C10H6N2O6	2,40	2,92	0,0138	0,0058
+	212,0676789	-3,746835181	C10674	Danielone	C10H12O5	2,37	2,90	0,0128	0,0064
-	156,0186611	-0,63401826	C03894	Propane-1,2-diol 1-phosphate	C3H9O5P	2,06	5,57	0,0498	0,0004
+	176,1048634	0,025034175	C11917	L-Cladinose	C8H16O4	1,46	1,56	0,0144	0,0128

B

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δ ppm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Phenylpropanoïdes</i>									
+	255,0655578	-0,690140259	C08574	Apigeninidin	C15H11O4	0,35	0,41	0,0315	0,0316
+/-	390,1319307	1,186875371	C10275	Piceid	C20H22O8	0,31	0,42	0,0197	0,0341
+	228,0790713	1,872405379	C03582	Resveratrol	C14H12O3	0,31	0,39	0,0188	0,0232
<i>Terpènes</i>									
-	454,2012877	4,699243646	C08775	Obacunone	C26H30O7	0,30	0,04	0,0345	0
<i>Autres</i>									
+	304,0714988	-6,774929871	C12397	Tetrangulol	C19H12O4	0,35	0,18	0,0232	0,0007
-	253,0194576	2,227739377	C07452	Tizanidine	C9H8ClN5S	0,32	0,50	0,0459	0,0461
-	640,1761102	-4,835385808	C09181	Chartreusin	C32H32O14	0,28	0,38	0,0262	0,0058
+/-	862,1925412	-3,598261259	C10404	Sennoside A	C42H38O20	0,27	0,17	0,0303	0,0005
-	298,0539758	-0,416767173	C11030	Quinalphos	C12H15N2O3PS	0,00	0,13	0	0,0001

C

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δ ppm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Autres</i>									
+/-	457,1583901	-0,044944963	C08325	Amygdalin	C20H27NO11	2,07	0,26	0,0048	0,0004
-	970,2886918	0,464883538	C11502	Mycothione	C34H58N4O24S2	1,55	0,64	0,0335	0,0015

D

Mode d'ionisation	Masse exacte	Δ ppm	KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L	p.valueT	p.valueL
<i>Phenylpropanoïde</i>									
+	578,142427	0,00126519	C10221	Epicatchin-(4beta->8)-ent-epicatechin	C30H26O12	0,21	1,20	0,0278	0,0256
<i>Autres</i>									
-	332,0523886	0,611937646	C05325	Purine mononucleotide	C10H13N4O7P	0,34	2,19	0,0416	0,0101
-	198,052411	-2,082614758	C01207	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)lactate	C9H10O5	0,32	2,25	0,0037	0,037
-	274,0091427	0,582265002	C01218	6-Phospho-2-dehydro-D-gluconate	C6H11O10P	0,21	1,82	0,0038	0,0111

Tableau 28. Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (A) et diminués (B) (p.value < 0,05) de manière commune ou de manière inverse (C et D) dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}\text{C}$) et celles exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2010.

Δ ppm, variation de la masse observée par rapport à la masse théorique ; **KEGG ID**, numéro d'identifiant KEGG ; **Ratio T**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress thermique et les échantillons témoins ; **Ratio L**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress lumineux et les échantillons témoins

II.5. Discussion

L'analyse par UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™ utilisée dans cette étude a permis de détecter dans les pellicules de baie 5850 signaux de masse en mode positif (+) et 2645 en mode négatif (-) pour l'expérimentation 2009. A titre de comparaison, seulement 1376 signaux biologiques (+) et 1085 signaux (-) ont été détectés à l'issue de l'expérimentation 2010. Ces analyses ayant été faites à partir de deux jeux de données obtenus séparément, la corrélation entre les comportements des différents signaux de masse détectés chaque année ne peut être étudiée. En effet, la légère variation entre les masses exactes induite par les deux traitements analytiques différents empêche toute analyse sur le jeu de données globales. Pour comparer en toute rigueur les deux années, une analyse commune doit être menée à partir des extractions de métabolites brutes. Une alternative pour établir cette corrélation consiste à se fonder sur les masses théoriques des molécules annotées dans l'étude, à savoir 245 métabolites putatifs en 2009 et 134 en 2010. Par cette méthode, 25 métabolites putatifs sont communs aux deux années. Parmi ces 25 composés, seulement la moitié présente un comportement similaire (une augmentation ou une réduction significative de leur teneur).

Une étude réalisée sur la grappe entière a montré que le nombre de signaux biologiques détectés (mode d'ionisation négative) en utilisant différents solvants d'extraction oscille entre 3000 et 4500 signaux (Theodoridis *et al.*, 2011). Cette étude visait à définir la composition du solvant d'extraction optimal pour une analyse UPLC-TOF MS (chromatographie d'ultra performance couplée à un spectromètre de masse à temps de vol). Chez l'Orge, ce sont 1970 signaux de masse qui ont été détectés par LC-ESI-LTQ-Orbitrap (Bollina *et al.*, 2010). Le plus faible nombre de composés détectés dans cette analyse vient peut-être de l'utilisation d'une chromatographie liquide standard en phase inverse plutôt que de l'UPLC. Dans un autre fruit charnu, la tomate, 2944 signaux de masse ont été détectés en mode négatif et 4059 en mode positif (Moco *et al.*, 2006). Pour cette étude, une chromatographie en phase reverse couplée à un spectromètre de masse à temps de vol avait été utilisée. Ces différents travaux donnent une indication sur la quantité de métabolites que l'on peut espérer détecter à l'issue d'une analyse non ciblée par LC-MS. Ces études suggèrent donc que le nombre de signaux de masse détectés en 2009 est important pour correspondre à une réalité biologique. Il semble en effet peu probable de retrouver plus de métabolites dans la pellicule que dans la baie entière. Ainsi le nombre de composés détectés sur les échantillons 2010 paraît plus pertinent.

En 2009 et en 2010, pour focaliser l'analyse sur le métabolisme secondaire, nous avons choisi un solvant d'extraction adapté : un mélange méthanol/acide formique (v/v, 99/1). Toutefois, ce solvant d'extraction ne doit pas être optimal pour analyser de manière la plus exhaustive possible le métabolome des pellicules de baie de raisin. D'après De Vos *et al.* (2007), le mélange permettant l'extraction la plus efficace d'une large variété de composés (principalement des métabolites secondaires) est le mélange méthanol/eau (75/25) avec 0,1% d'acide formique. Chez la Vigne, une étude a montré que le mélange d'extraction optimal pour une chromatographie à interaction hydrophile doit contenir 60% minimum de méthanol et jusqu'à 40% de chloroforme. Pour une chromatographie en phase inverse, ce mélange se situe plutôt autour de 40% de méthanol, 60% de chloroforme avec un maximum de 20% d'eau. De plus, il est important d'analyser les différentes fractions obtenues (phase organique et phase aqueuse) et une extraction sur phase solide (SPE) pour la phase aqueuse est également recommandée. Chacune de ces fractions contient différentes familles de composés, avec par exemple, une fraction méthanolique qui contient principalement des métabolites secondaires (Theodoridis *et al.*, 2011). Ces résultats expliquent le grand nombre de métabolites secondaires détectés et annotés dans notre analyse. De plus, avec l'importante diversité de métabolites possédant des propriétés physico-chimiques différentes, il est actuellement impossible d'analyser le métabolome entier d'une plante en n'utilisant qu'une seule méthode analytique. La figure 42, tirée de Kusano *et al.* (2011), résume les différentes capacités de détection de plusieurs systèmes analytiques. On s'aperçoit que l'Orbitrap (*a fortiori* couplé à une UPLC) permet de détecter un large éventail de composés sans toutefois détecter les composés volatils, les acides gras et les vitamines. Pour avoir une vision complète du métabolome de la pellicule de la baie, il faudrait donc analyser les deux fractions issues d'une extraction chloroforme/méthanol (+SPE) grâce à l'UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap™ mais également analyser ces échantillons *via* une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse Orbitrap ou à temps de vol. Les différents métabolites détectés donneraient ainsi un bon aperçu du métabolome, bien que la fusion des analyses provenant de différents systèmes analytiques doive être effectuée avec certaines précautions (Smilde *et al.*, 2005).

Un autre facteur peut expliquer la grande différence dans le nombre de métabolites détectés entre les deux années. En 2010, les échantillons ont été dilués 10 fois pour éviter une éventuelle saturation de la source d'ionisation alors que les échantillons 2009 ont été injectés sans dilution. Il est possible que cette dilution entraîne une perte d'information importante due

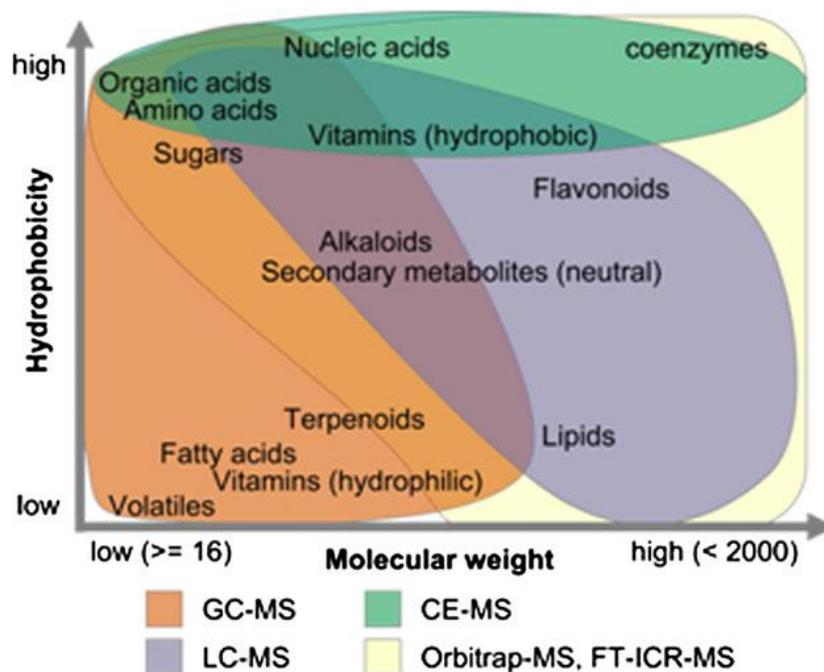


Figure 42. Capacité de détection des différentes familles de métabolites selon le système analytique utilisé (d'après Kusano et al., 2011).

GC-MS, chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse ; LC-MS, chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse ; CE-MS, électrophorèse capillaire couplée à un spectromètre de masse ; FT-ICR-MS, cyclotron à résonance ionique à transformée de Fourier couplé à un spectromètre de masse.

au seuil de sensibilité de la machine. Le nombre de variables considérées comme des artefacts (« signaux blancs ») obtenu pour l'année 2010 (6219 variables) par rapport à l'année 2009 (2228 variables) corrobore cette hypothèse. L'intensité de ces variables en 2010 était peut être insuffisante pour dépasser le seuil fixé (>2). Néanmoins, Theodoridis *et al.* (2011) ont montré qu'une dilution au dixième des échantillons de baies entières (en mêmes proportions que nos échantillons) n'entraînait que peu de variations dans le nombre total de métabolites détectables.

Les analyses statistiques employées peuvent également être discutées. En effet, le choix a été fait pour cette analyse globale d'utiliser comme test de significativité, le test de production de rangs (appelé en anglais « Rank Products »). A l'origine, cette méthode statistique a été conçue pour l'analyse de gènes différentiellement exprimés au sein de données transcriptomiques. Néanmoins, son champ d'application peut très facilement s'élargir pour des analyses protéomiques ou comme dans notre cas, pour des approches métabolomiques. L'un des points forts de la méthode est qu'elle reste fiable et robuste même dans le cas d'un petit nombre de réplicats (Breitling *et al.*, 2004). Communément employé dans le cadre d'analyses

globales, le *t*-test (et ses dérivés, exemple la méthode SAM, Tusher *et al.*, 2001) permet de déterminer la significativité de la différence observée entre deux échantillons. Toutefois, ce test repose sur deux principes :

- (1) Il assume la normalité des erreurs calculées pour chaque variable
- (2) Il assume que la distribution de ces erreurs est symétrique

Il est possible que ces postulats ne soient pas toujours vérifiés notamment dans le cas d'expérimentations avec un faible nombre de réplicats (Pan, 2002). Prenons par exemple le jeu de données obtenues en 2010 en mode d'ionisation positif. Si l'on compare la méthode RP et le *t*-test pour obtenir les signaux de masse dont les intensités varient de manière significative entre nos traitements, on constate que sur les 384 signaux sélectionnés par la méthode RP, seuls 194 sont également sélectionnés par le *t*-test (Figure 43). Plus important, 190 signaux sont sélectionnés uniquement par la méthode RP et 236 par le *t*-test. Cette différence peut être due à deux facteurs. Le premier vient de l'importance relative accordée par chaque test à la variation entre les échantillons. Le *t*-test (et ses dérivés) choisit en priorité :

- (1) Une variable stable entre les réplicats mais dont la différence entre les traitements est plus faible
- (2) Puis une variable moins stable mais avec une variation inter-traitement forte

La méthode RP accorde quant à elle moins d'importance aux réplicats déviants (Breitling *et al.*, 2004). Le second facteur serait la moins grande robustesse du *t*-test sur un faible nombre de réplicats et donc l'apparition de faux positifs. Dans nos expérimentations, compte tenu du petit nombre de réplicats utilisés (3 réplicats) et de la grande variabilité existante entre différentes baies de raisin, la méthode de production de rangs nous a semblé la plus pertinente.

Nous avons également choisi d'utiliser les p-value du test RP ($p\text{-value} < 0,05$) pour sélectionner les signaux biologiques dont l'intensité varie de manière significative entre les traitements. Ce choix faiblement stringent a été fait pour extraire un nombre maximal de signaux de masse de l'analyse et d'avoir ainsi une vue globale sur les modifications engendrées par les stress. La méthode RP permet d'estimer le taux de fausses découvertes (FDR) (Storey and Tibshirani, 2003) à l'aide du pourcentage de faux positifs (Breitling *et al.*, 2004). Nous avons testé ce



Figure 43. Diagramme de Venn représentant le nombre de signaux de masse dont l'intensité varie de manière significative ($p.value < 0,05$) soit selon la méthode de production de rangs soit selon le t -test.

RP, méthode de production de rangs.

paramètre FDR très stringent, la conséquence étant que le nombre de signaux de masse conservés chute de manière drastique. Pour l'expérimentation 2010 par exemple, le nombre de signaux dont l'intensité varie de manière significative passe de 684 dans le cas d'une sélection par $p.value < 0,05$ à 178 pour une sélection par $FDR < 0,05$ soit une perte de 74% des composés. Le tableau 29 montre les métabolites putatifs annotés après l'application d'une $FDR < 0,05$ pour l'expérimentation 2010. Ces métabolites putatifs ne représentent plus que 5% des signaux de masse identifiés au départ comme variant de manière significative. Cette perte drastique d'information peut s'expliquer par le faible nombre de réplicats biologiques employés. Pour utiliser ce genre de test, un grand nombre de réplicats est nécessaire pour assurer une stabilité dans les mesures. Ce test statistique paraît donc peu adapté à notre dispositif expérimental. Nous avons donc choisi d'utiliser les p .values du test RP $< 0,05$ comme test de significativité.

La comparaison de la variation biologique induite par les différents traitements par rapport à la variation totale mesurée (à savoir la somme des variations biologiques et techniques) a également nécessité l'utilisation de formules mathématiques. La méthode dite «auto scaling» a été utilisée pour donner la même importance à tous les métabolites quelque soit l'intensité du signal de masse initiale. Toutefois, cette méthode a tendance à accentuer l'influence des erreurs de mesure. Une autre méthode est souvent employée, celle du «Pareto scaling» (Xie *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009). Elle réduit seulement l'influence prépondérante des variables à haute intensité, permettant ainsi d'être plus proche du jeu de données initial. Néanmoins cette

Influence des stress thermiques et lumineux sur le métabolome des pellicules de baie de raisin

KEGG ID	Annotation	Formule	Ratio T	Ratio L
Commun				
<i>Autres</i>				
C11030	Quinalphos	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	0.00	0.13
Temperature spécifique				
<i>Phenylpropanoïdes</i>				
C10107	Myricetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	0.04	0.52
C12095	Cyanidin 3-O-(6-O-p-coumaroyl)glucoside	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₃	0.00	0.50
C16369	Cyanidin 3-(6-p-caffeoyl)glucoside	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₄	0.00	0.24
<i>Acides Aminés</i>				
C00073	L-Methionine	C ₅ H ₁₁ N ₂ S	4.43	1.43
C00082	L-Tyrosine	C ₉ H ₁₁ N ₃ O	4.38	1.06
<i>Carbohydrates</i>				
C00140	N-Acetyl-D-glucosamine	C ₈ H ₁₅ N ₂ O ₆	6.44	1.64
<i>Autres</i>				
C00612	N1-Acetylspermidine	C ₉ H ₂₁ N ₃ O	7.74	0.49
C04540	N4-(Acetyl-beta-D-glucosaminyl)asparagine	C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₈	5.30	1.86
C02659	Acetone cyanohydrin	C ₄ H ₇ NO	4.99	0.95
C00166	Phenylpyruvate	C ₉ H ₈ O ₃	4.93	1.14
C03795	N6-Methyl-2'-deoxyadenosine	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃	4.64	1.34
C00741	Diacetyl	C ₄ H ₆ O ₂	4.00	0.67
C11446	4-Dihydroxyethyl-8,9-epoxy-enediynes	C ₁₄ H ₁₀ O ₃	0.15	0.72
C10483	Phaseolic acid	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	0.10	0.45
Lumière spécifique				
<i>Phenylpropanoïdes</i>				
C01750	Quercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	1.53	21.15
C00389	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	0.99	9.62
C05623	Quercetin 3-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	0.98	7.82
C04443	3',4',5,7-Tetrahydroxy-3-methoxyflavone	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	1.44	5.14
C10266	Isorhapontin	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	0.78	0.14
<i>Terpènes</i>				
C09765	Agnuside	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₁	0.75	0.18
C08775	Obacunone	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	0.30	0.04
<i>Autres</i>				
C08325	Amygdalin	C ₂₀ H ₂₇ N ₂ O ₁₁	2.07	0.26
C00844	(R)-Prunasin	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₆	1.04	0.23
C10404	Sennoside A	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀	0.27	0.17
C01586	Hippurate	C ₉ H ₉ N ₃ O	4.06	8.45
C00644	D-Mannitol 1-phosphate	C ₆ H ₁₅ O ₉ P	1.32	6.47
C03894	Propane-1,2-diol 1-phosphate	C ₃ H ₉ O ₅ P	2.06	5.57
C15556	3,4-Dihydroxy-2-butanone 4-phosphate	C ₄ H ₉ O ₆ P	2.41	5.22
C07669	Glimepiride	C ₂₄ H ₃₄ N ₄ O ₅ S	0.50	3.98
C15095	Coumestrol diacetate	C ₁₉ H ₁₂ O ₇	0.36	2.42
C12397	Tetragulol	C ₁₉ H ₁₂ O ₄	0.35	0.18
C10322	Cyperaquinone	C ₁₄ H ₁₀ O ₄	1.28	0.18
C08465	Wyerone	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	0.79	0.13
C01726	D-Lombricine	C ₆ H ₁₅ N ₄ O ₆ P	0.93	0.12

Tableau 29. Liste des métabolites putatifs annotés et significativement accumulés (FDR < 0,05) de manière commune ou spécifique dans les pellicules de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^\circ\text{C}$) et celles exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) suite à l'expérimentation 2010.

KEGG ID, numéro d'identifiant KEGG; **Ratio T**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress thermique et les échantillons témoins; **Ratio L**, différence d'intensité du signal entre les échantillons exposés au stress lumineux et les échantillons témoins

réduction n'empêche pas les variables à forte intensité d'altérer l'importance des variables à faible intensité (Cloarec *et al.*, 2005). Un autre phénomène, l'hétéroscédasticité, n'a pas été pris en compte lors de notre analyse de données. Il est souvent admis que la variation non induite (biologique et/ou technique) est symétrique autour de zéro avec des déviations standards égales. Or ce principe n'est pas toujours respecté en biologie et souvent la déviation standard due à la variation biologique naturelle dépend de la valeur moyenne de la mesure. Ce phénomène s'appelle l'hétéroscédasticité (van den Berg *et al.*, 2006). Cette dernière n'a pas été analysée dans nos échantillons en raison du petit nombre de réplicats biologiques et de l'absence de réplicats techniques. Il existe néanmoins certaines méthodes mathématiques pouvant réduire l'influence de ce phénomène, comme la transformation de puissance (van den Berg *et al.*, 2006).

Une des limitations de la LC-MS provient du nombre d'ions potentiellement formés à partir d'un seul métabolite. En effet, un seul métabolite peut générer plusieurs signaux de masse en fonction de son ionisation et d'adduits pouvant se lier à cet ion. Deux analyses parallèles sont actuellement en cours avec nos jeux de données afin d'éliminer un maximum de ces signaux de masse parasites en utilisant les packages CAMERA (Tautenhahn *et al.*, 2007) et mzMatch (Scheltema *et al.*, 2011). Ces packages regroupent les signaux issus d'un même métabolite en calculant la corrélation de la forme des pics à un même temps de rétention et annotent les pics isotopiques, adduits et fragments à partir de la liste de pics générée par XCMS.

Un des problèmes majeurs associés aux approches non ciblées concerne l'identification des métabolites détectés. L'absence de bases de données en accès libre contenant les masses exactes de métabolites spécifiques à la Vigne nécessite l'utilisation de bases de données plus divergentes. La diversité des molécules existantes étant considérable, cette annotation automatique peut être biaisée par l'identification de composés possédant une masse extrêmement proche (voire identique) mais n'existant pas dans l'organisme considéré. Une étape importante de l'annotation consiste à vérifier si possible la pertinence de ces identifications dans le contexte de l'étude. Parmi les différentes bases de données testées (KEGG, HMDB, Metlin), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ; <http://www.genome.jp/kegg/>) est celle qui a fourni le plus d'annotations pertinentes. Cette base de données, initialement créée pour l'analyse de gène, intègre de nombreuses fonctionnalités pour rattacher ces gènes à des voies de biosynthèse. Ainsi, elle intègre de nombreux métabolites avec leur masse exacte (Kanehisa and Goto, 2000). L'utilisation parallèle de la plateforme MassTRIX (Suhre and Schmitt-Kopplin, 2008) a grandement

facilité cette étape d'annotation. MassTRIX permet l'identification de composés à partir de leur masse exacte et classe les identifiants par rapport au contexte biologique étudié. En d'autres termes, il renseigne sur la pertinence des annotations par rapport à un organisme donné. Dans notre étude, chaque identité potentielle attribuée à un signal de masse correspond en priorité à un métabolite décrit comme étant présent chez la Vigne. Quand aucune des identités n'est rapportée présente chez la Vigne, le nom attribué correspond en priorité à une molécule présente chez les plantes. Cette démarche a permis d'éliminer un certain nombre d'annotations aberrantes et renforce ainsi la pertinence de l'identification potentielle. Néanmoins, cette identification n'est ni absolue ni définitive et nécessite d'autres analyses afin de confirmer les identités putatives, comme par exemple l'obtention de spectres de fragmentation par l'intermédiaire d'analyse MS/MS. Mais dans ce cas, le problème réside dans le manque de bases de données spectrales disponibles et en accès libre (Moco *et al.*, 2006). Une autre limitation de l'utilisation de la masse exacte est qu'elle ne permet pas de discriminer les isomères entre eux. Cette discrimination nécessite à nouveau une analyse MS/MS pour étudier le profil de fragmentation du métabolite considéré (Madalinski *et al.*, 2008).

Dans le cadre d'une approche non ciblée, l'identification à grande échelle par l'intermédiaire de la masse exacte renseigne en partie sur les grandes voies métaboliques modifiées en réponse aux traitements subis. L'analyse des données métaboliques produites dans le cadre de ce travail de thèse n'est pas encore achevée, et à ce stade il est encore difficile d'interpréter les résultats obtenus. Les analyses multivariées ont néanmoins permis de valider notre approche expérimentale visant à découpler les stress thermiques et lumineux. Elles ont également permis de montrer que le stress thermique entraîne une modification du métabolome plus importante que le facteur rayonnement. Elles révèlent aussi qu'un excès de rayonnement modifie le métabolome d'une manière qui lui est propre. Cette validation permet d'exploiter ce dispositif expérimental dans le cadre du projet ANR DURAVITIS (2011-2014) dont un des axes de recherche est le prolongement de l'étude menée pendant ce travail de thèse.

Une des suites prévues pour cette analyse va consister à s'intéresser plus précisément aux métabolites différenciellement accumulés en réponse aux différents stress. La première étape repose sur une analyse MS/MS, actuellement en cours, qui validera différents signaux principalement ceux affiliés par leur masse exacte à des phénylpropanoïdes. La seconde étape visera à identifier de nouveaux composés intervenant dans la réponse aux différents stress. En

effet, l'approche non ciblée permettra d'isoler des signaux de masse non identifiés mais fortement affectés par les différents traitements. Ces signaux seront ensuite identifiés par fragmentation MS/MS et/ou analyse RMN. Employée chez l'Homme, cette stratégie a permis d'identifier un biomarqueur associé au risque de diabète (Chen *et al.*, 2008).

.

Chapitre III: Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique

Les ARNs totaux extraits de baies de raisin (*Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon) exposées ou non à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) ont été hybridés sur des lames microarrays contenant un jeu de sondes de 14 562 unigènes (Qiagen Operon Array-Ready Oligo Set). Environ 1000 gènes ont vu leur expression significativement augmentée par le stress thermique (voir chapitre I paragraphe 1). Parmi ces gènes induits, un gène correspondant à la séquence EST TC62106 présente de fortes homologies avec un gène codant une galactinol synthase de Soja (*Glycine max*) (Q7XZ08). Cette enzyme catalyse la synthèse de galactinol, précurseur de la voie de synthèse des oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs). Les RFOs ont été décrits pour être impliqués dans la réponse aux stress abiotiques chez différentes espèces (voir tableau 1). Dans le contexte de ce travail de thèse, il nous a donc semblé intéressant d'initier une étude détaillée de la voie de biosynthèse des RFOs chez la Vigne.

III.1. Identification et analyse *in silico* des gènes intervenant dans la voie des RFOs dans le génome de la vigne

La séquence EST TC62106 a été utilisée pour récupérer la séquence complète correspondante sur le site du Génoscope. L'ADNc pleine longueur correspondant, appelé *VvGOLS1* (Numéro d'accèsion CRIBI: Vv07s0005g01970), a été amplifié par RT-PCR à partir de baies soumises à un stress thermique. *VvGOLS1* comprend 1029 nucléotides et code pour une protéine de 342 acides aminés possédant une masse prédite de 39,3 kDa et un pI de 5,39. Une recherche par alignement de séquences protéiques (BLASTP) a ensuite été effectuée à l'aide de la base de données protéiques non redondante GenBank pour s'assurer d'une bonne homologie avec les séquences GOLS d'autres espèces. Toutes les séquences ainsi récupérées ont été utilisées pour effectuer un alignement multiple (Figure 44). *VvGOLS1* partage un fort degré d'homologie (entre 77 et 82%) avec de nombreux polypeptides GOLS appartenant à d'autres espèces. Des caractéristiques communes aux GOLS ont été retrouvées chez

Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique

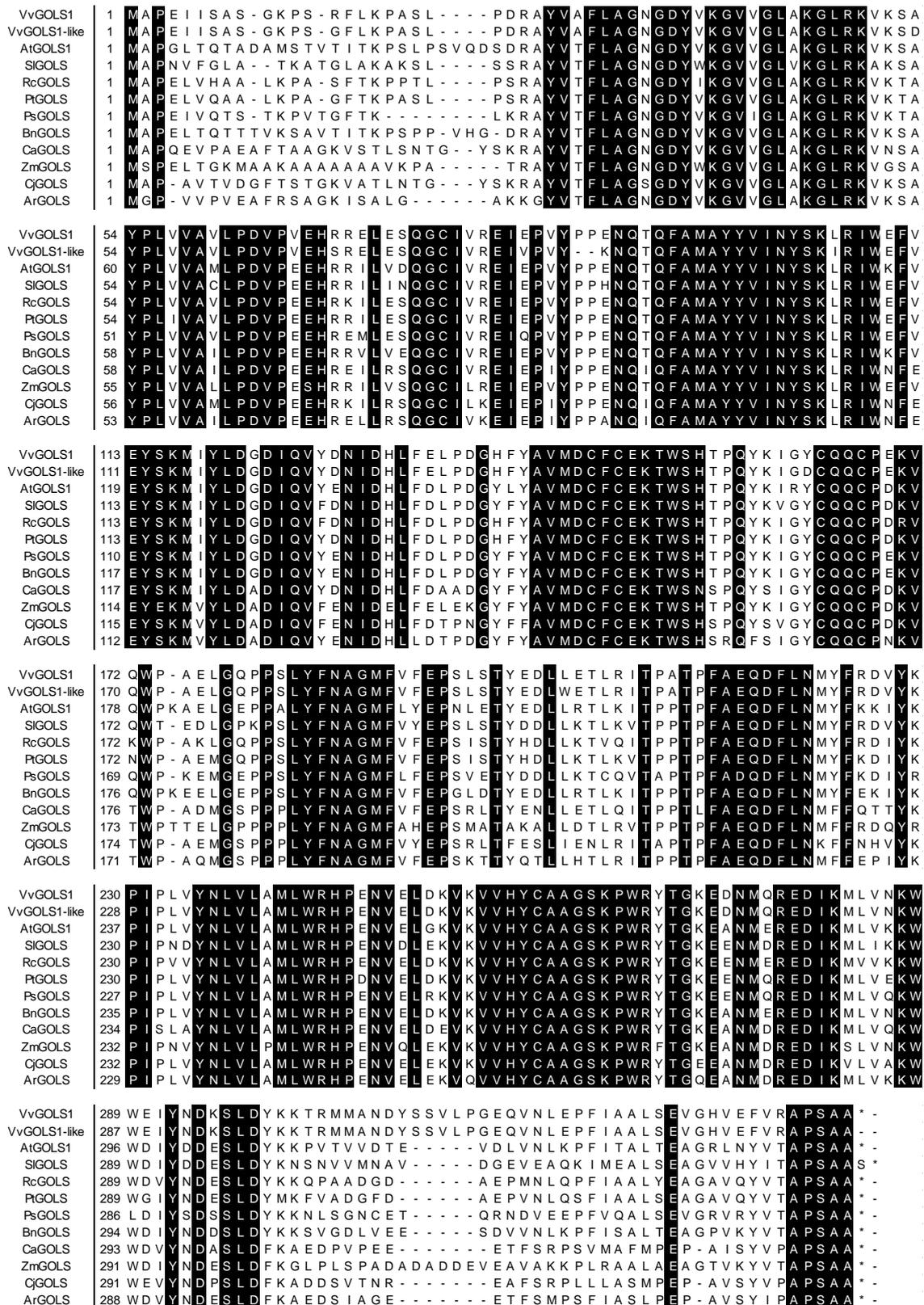


Figure 44. Alignement des séquences protéiques de GALACTINOL SYNTHASE chez différentes espèces.

GOLS, GALACTINOL SYNTHASE; Vv, *Vitis vinifera*; At, *Arabidopsis thaliana*; Sl, *Solanum lycopersicum*; Rc, *Ricinus communis*; Pt, *Populus trichocarpa*; Ps, *Pisum sativum*; Bn, *Brassica napus*; Ca, *Coffea arabica*; Zm, *Zea mays*; Cj, *Coptis japonica*; Ar, *Ajuga Reptans*

Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique

VvGOLS1, à savoir un domaine glycosyltransférase (famille 8) et un pentapeptide hydrophobe APSS dans la région carboxy-terminal (Sprenger and Keller, 2000). De plus, une recherche sur le génome de la Vigne (Jaillon *et al.*, 2007) a permis d'identifier trois isoformes supplémentaires de la famille des GOLS (appelées VvGOLS2, VvGOLS3 et VvGOLS4) partageant de 68 à 71% d'identité avec VvGOLS1 pleine longueur (Tableau 30). Un autre gène très proche de VvGOLS1 a également été identifié et nommé VvGOLS1-like (Vv07s0005g01980). VvGOLS1 et VvGOLS1-like sont situés sur le même scaffold (chromosome 7, scaffold 5) selon le site du Génoscope et les protéines correspondantes partagent 97% d'identité (Figure 45). De plus les régions flanquantes non codantes (5' et 3' UTR) de ces deux gènes possèdent aussi un très fort degré d'identité. Le même phénomène a été retrouvé pour la séquence de VvGOLS3, avec cette fois la présence de deux autres gènes sur le scaffold 60 du chromosome 14 et partageant un très fort degré d'identité (> 96%). Ces gènes ont été appelés VvGOLS3-like 1 et VvGOLS3-like 2 (Figure 45). Toutefois, toutes nos tentatives de clonage de VvGOLS1-like par RT-PCR ont échoué suggérant que ce gène n'est pas exprimé à un niveau détectable dans les baies soumises à un stress thermique, ou qu'il s'agit d'un pseudogène. Pour la suite de l'étude, nous nous sommes donc intéressés uniquement à VvGOLS1, VvGOLS2, VvGOLS3 et VvGOLS4. Par comparaison, le génome d'Arabidopsis contient 7 isoformes de GOLS (AtGOLS1 à AtGOLS7) et 3 gènes putatifs (Nishizawa *et al.*, 2008). Une analyse phylogénétique des membres de la famille GOLS parmi différentes espèces montre que les protéines GOLS de Vigne sont réparties dans différents clusters (Figure.46). VvGOLS1 est très proche d'une GOLS de *Pisum sativum* et appartient à un groupe contenant AtGOLS1 et BnGOLS1 (Panikulangara *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2011).

Accession Genoscope	Accession Cribi	Protéine	Longueur (aa)	Pourcentage d'identité (%)			
				VvGOLS1	VvGOLS2	VvGOLS3	VvGOLS4
GSVIVT01028174001	Vv07s0005g01970	VvGOLS1	340	100	68,6	69,1	70,7
GSVIVT01034938001	Vv05s0077g00430	VvGOLS2	319		100	73,3	67,6
GSVIVT01031274001	Vv14s0060g00810	VvGOLS3	325			100	67,4
GSVIVT01013763001	Vv01s0127g00470	VvGOLS4	337				100

Tableau 30. Pourcentage d'identité entre les séquences protéiques de VvGOLS1, VvGOLS2, VvGOLS3 et VvGOLS4.

Aa, acides aminés

Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique

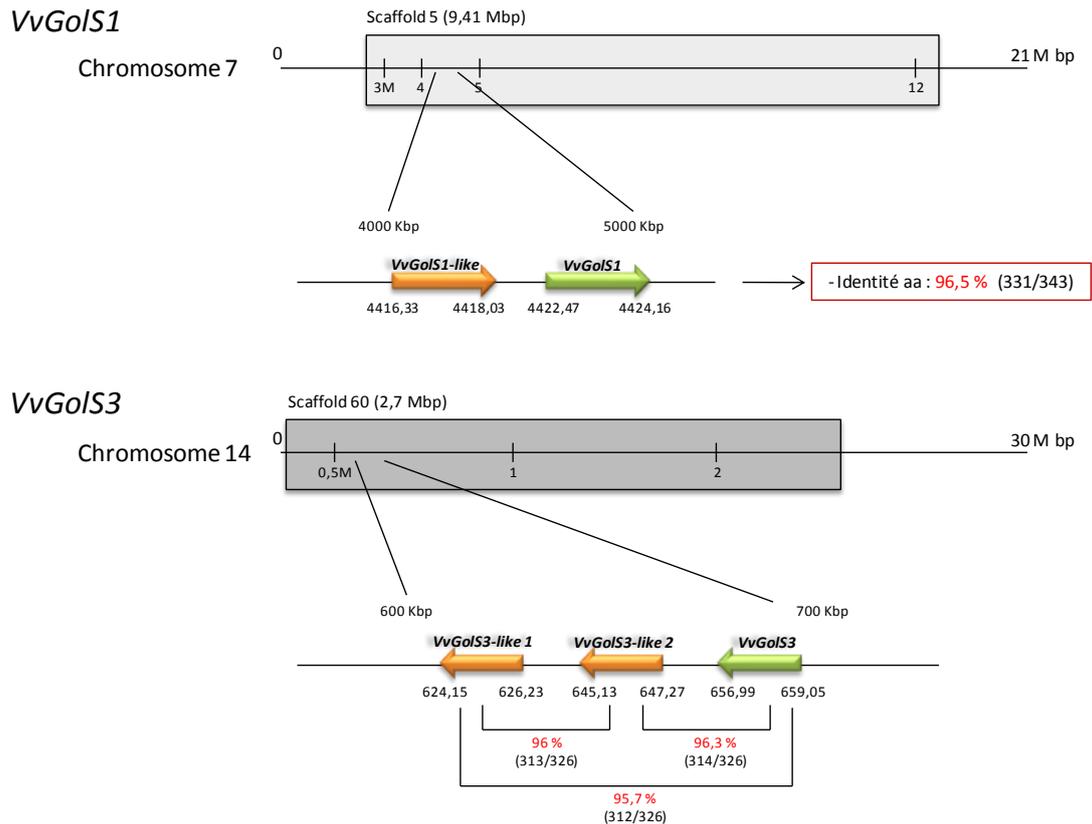


Figure 45. Positionnement sur le chromosome de différents gènes putatifs codant une GALACTINOL SYNTHASE et présentant un pourcentage d'identité très élevé. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'acides aminés communs par rapport au nombre d'acides aminés total entre les séquences protéiques putatives correspondantes aux séquences génomiques étudiées.

Afin d'étendre notre étude aux autres gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des RFOs, nous avons recherché dans la séquence génomique de la Vigne (Jaillon *et al.*, 2007) les plus proches homologues de raffinose synthase (RAF) et stachyose synthase (STS) d'autres espèces en se fondant sur les travaux de Tapernoux-Lüthi *et al.* (2004). Deux gènes de vigne homologues des RAFs et un gène codant une protéine de la famille des STS ont été identifiés et appelés respectivement *VvRAF1* (Vv14s0066g00810), *VvRAF2* (Vv17s0000g08960) et *VvSTS1* (Vv07s0005g01680). Une analyse phylogénétique effectuée à partir des séquences protéiques montre que *VvRAF1*, *VvRAF2* et *VvSTS1* se répartissent dans des clusters différents (Figure 47).

Après avoir isolé les différents gènes de la voie de biosynthèse des RFOs, nous avons étudié leur comportement dans les baies de raisin exposées à des stress thermiques ($\Delta T1=+6^{\circ}\text{C}$ et $\Delta T2=+9^{\circ}\text{C}$) ou à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons).

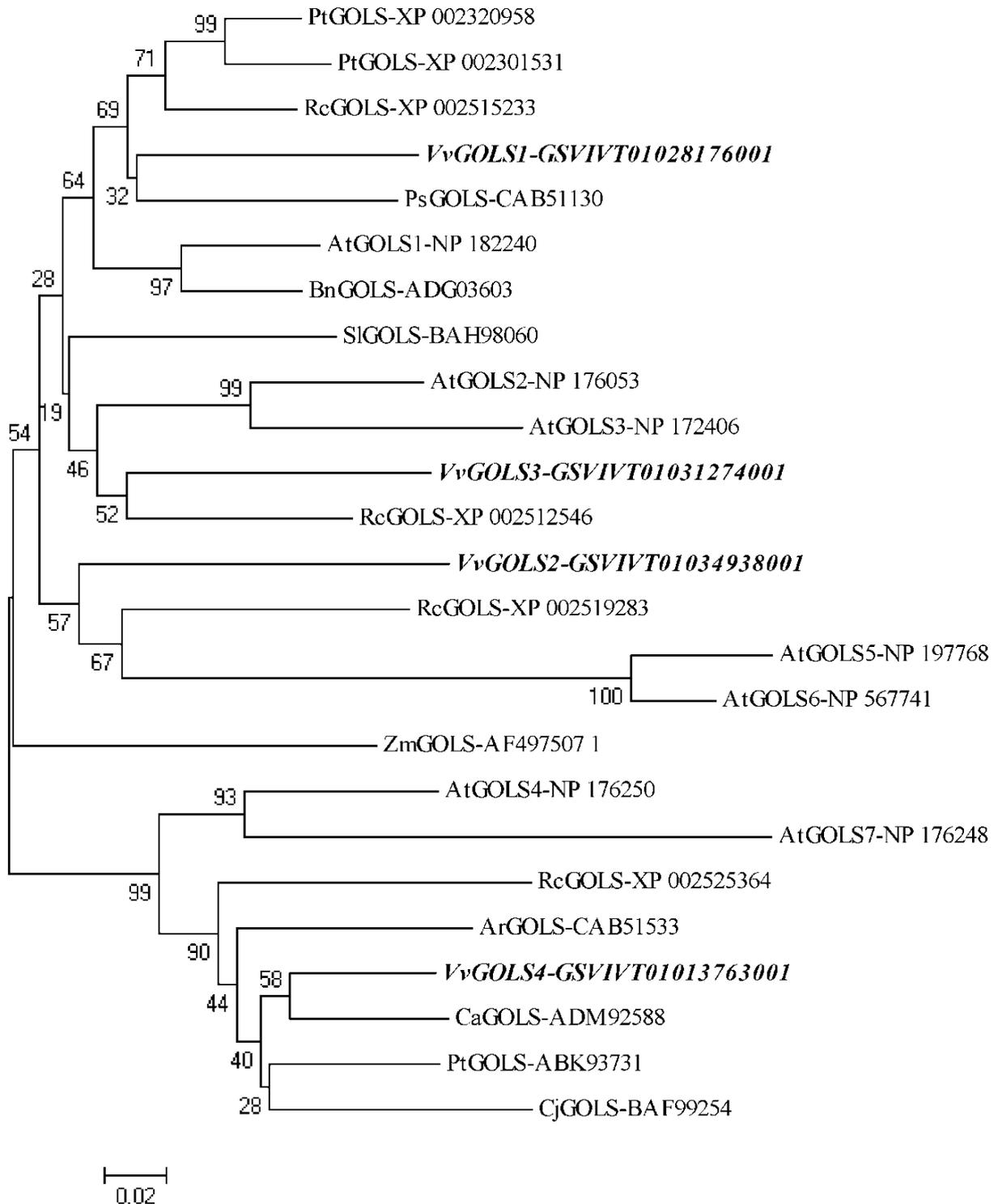


Figure 46. Arbre phylogénétique représentant les différentes GALACTINOL SYNTHASE présentes chez différentes espèces (Bootstrap = 1000).

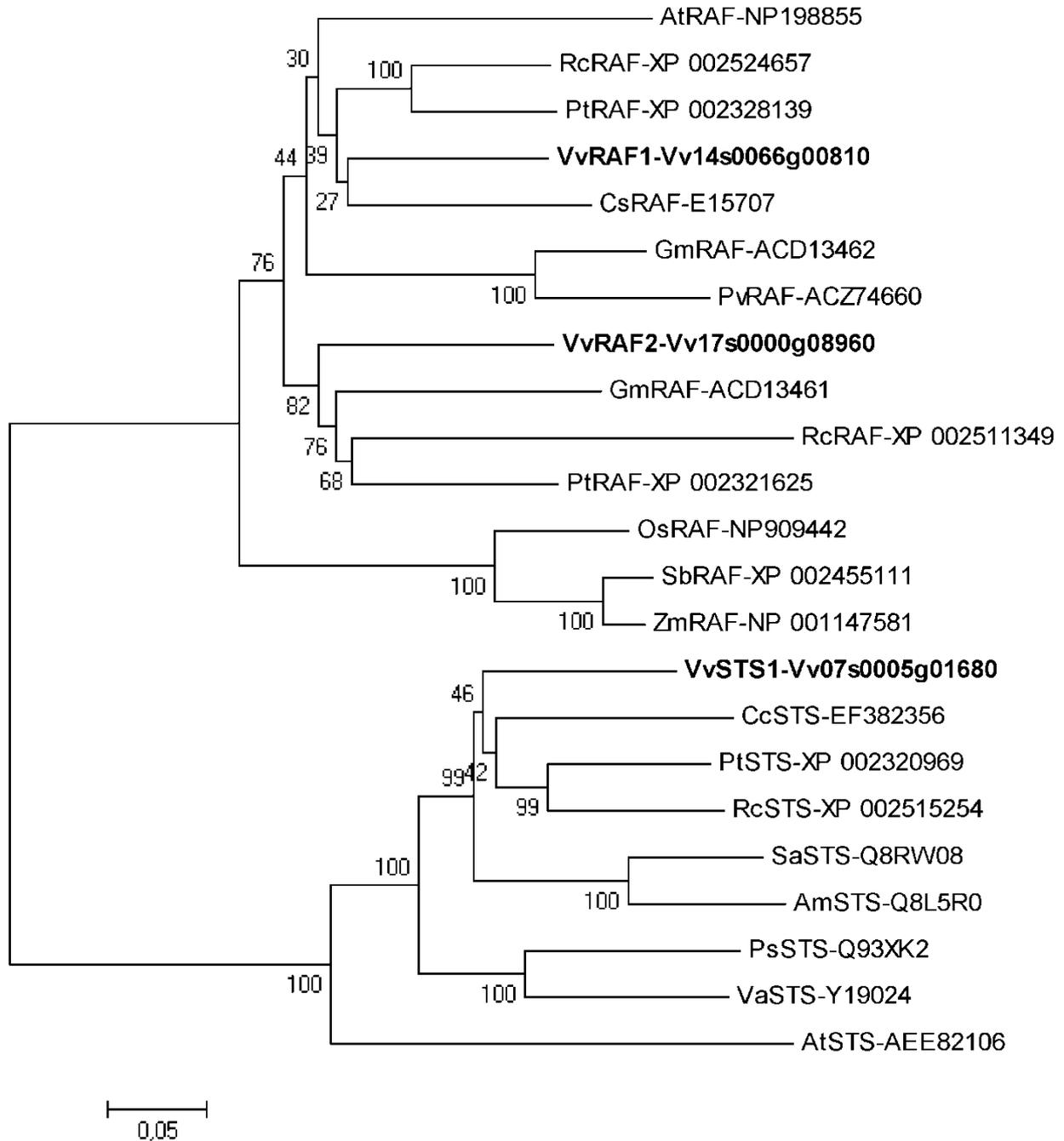


Figure 47. Arbre phylogénétique représentant les différentes RAFFINOSE SYNTHASE et STACHYOSE SYNTHASE présentes chez différentes espèces (Bootstrap = 1000).

III.2. Expression des différents gènes de la voie de synthèse des RFOs dans les baies de raisin soumises à un stress thermique ou lumineux

III.2.1. Profils d'expression des différentes isoformes de *VvGOLS*

Le profil d'expression de *VvGOLS1* dans des baies soumises à un stress thermique a été établi par RT-QPCR sur des ARNs totaux extraits de baies exposées à une température plus élevée que la température ambiante de la serre ($\Delta T1=+6^{\circ}\text{C}$ et $\Delta T2=+9^{\circ}\text{C}$) ainsi que de baies témoins. L'expression de *VvGOLS1* a été déterminée pour des durées d'exposition brèves et longues au stress thermique. Dans les deux conditions de stress, les transcrits *VvGOLS1* s'accumulent rapidement et fortement dès la première heure de traitement (Figure 48A). De manière intéressante, le niveau d'expression de *VvGOLS1* reste élevé tout au long des trois semaines d'exposition au stress (Figure 48B). Les transcrits *VvGOLS1* sont détectés dans tous les tissus de la baie (pellicule, pulpe et pépin) et s'accumulent fortement sous l'influence du stress thermique (Figure 48C). De plus, l'effet du stress thermique sur l'expression de *VvGOLS1* est retrouvé dans les baies soumises au stress pendant la véraison ou 3 semaines après véraison (Figure 48D). Par contre, le niveau d'expression de *VvGOLS1* est inchangé dans les baies exposées à un stress lumineux, à l'exception d'une accumulation transitoire à la fin du premier jour d'exposition (Figure 48E). De manière intéressante, l'accumulation de transcrits *VvGOLS1* est corrélée aux variations de température observées au sein de la baie au cours de la journée (Figure 49). *A contrario*, le stress thermique n'affecte pas les transcrits *VvGOLS2*, *VvGOLS3* et *VvGOLS4* par rapport aux baies témoins (Figure 50). Toutefois, les transcrits de ces trois isoformes sont détectés dans les baies quelle que soit la condition. Les 4 isoformes de *GOLS* sont exprimés de manière constitutive dans la baie mais seul *VvGOLS1* est sur-exprimé de manière forte et constante en réponse à un stress thermique.

III.2.2. Profils d'expression des gènes *RAF* et *STS*

Le stress thermique n'affecte pas les profils d'expression des trois gènes de la voie des RFOs, à savoir *VvRAF1*, *VvRAF2* et *VvSTS1* (Figure 51). De plus, ces 3 gènes sont exprimés dans les baies de façon constitutive, mais dans des proportions très réduites par rapport aux gènes *VvGOLS*.

Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique

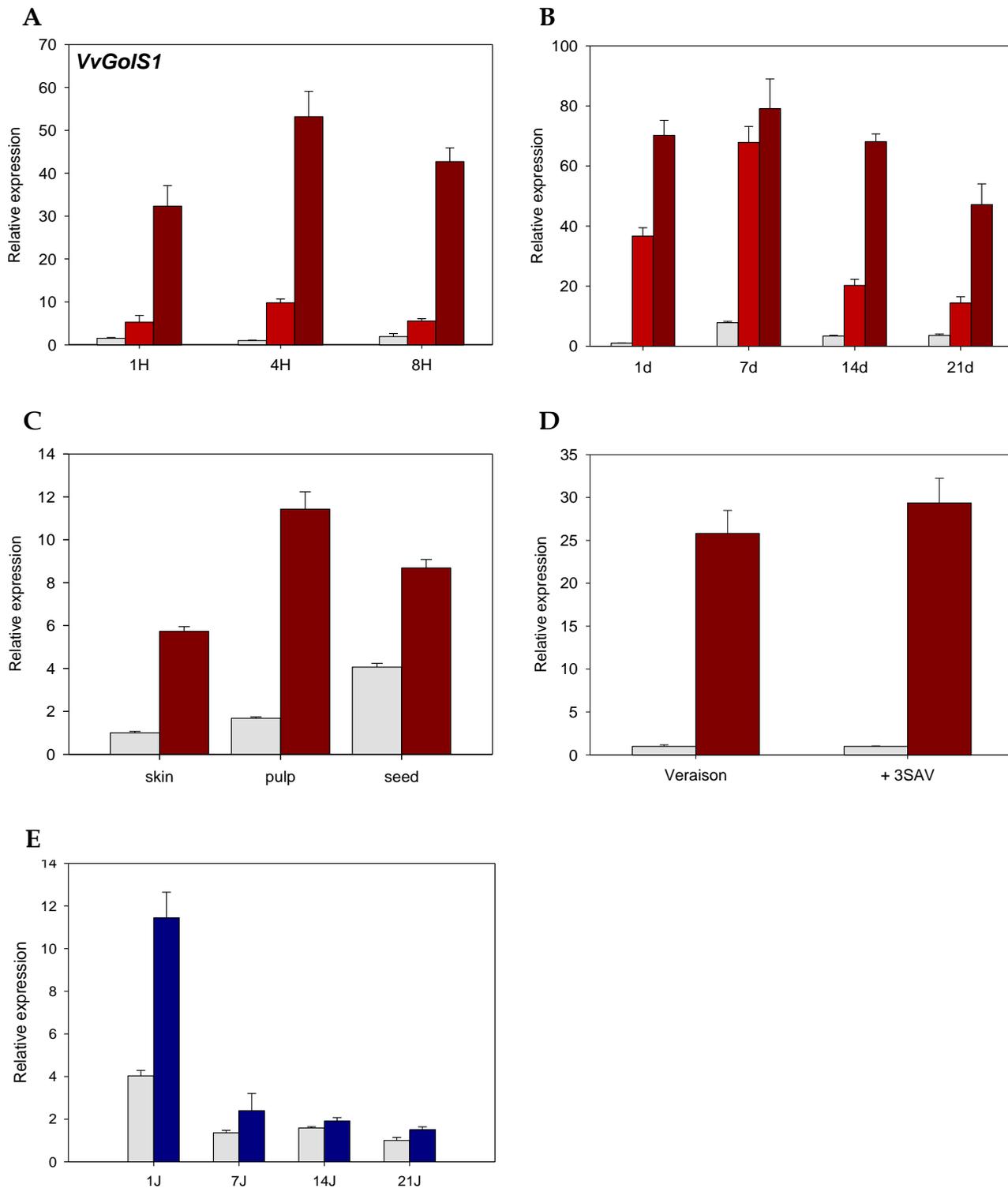


Figure 48. Profils d'expression de *VvGOLS1*. (A) dans les baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^\circ\text{C}$) sur une journée. (B) dans les baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^\circ\text{C}$) pendant 21j. (C) dans différents compartiments de la baie après 21j d'exposition au stress thermique ($\Delta T = +9^\circ\text{C}$). (D) dans des baies exposées au stress thermique ($\Delta T = +9^\circ\text{C}$) pendant une journée soit pendant la véraison soit trois semaines après véraison. (E) dans des baies exposées à un stress lumineux ($\Delta I = +850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j.

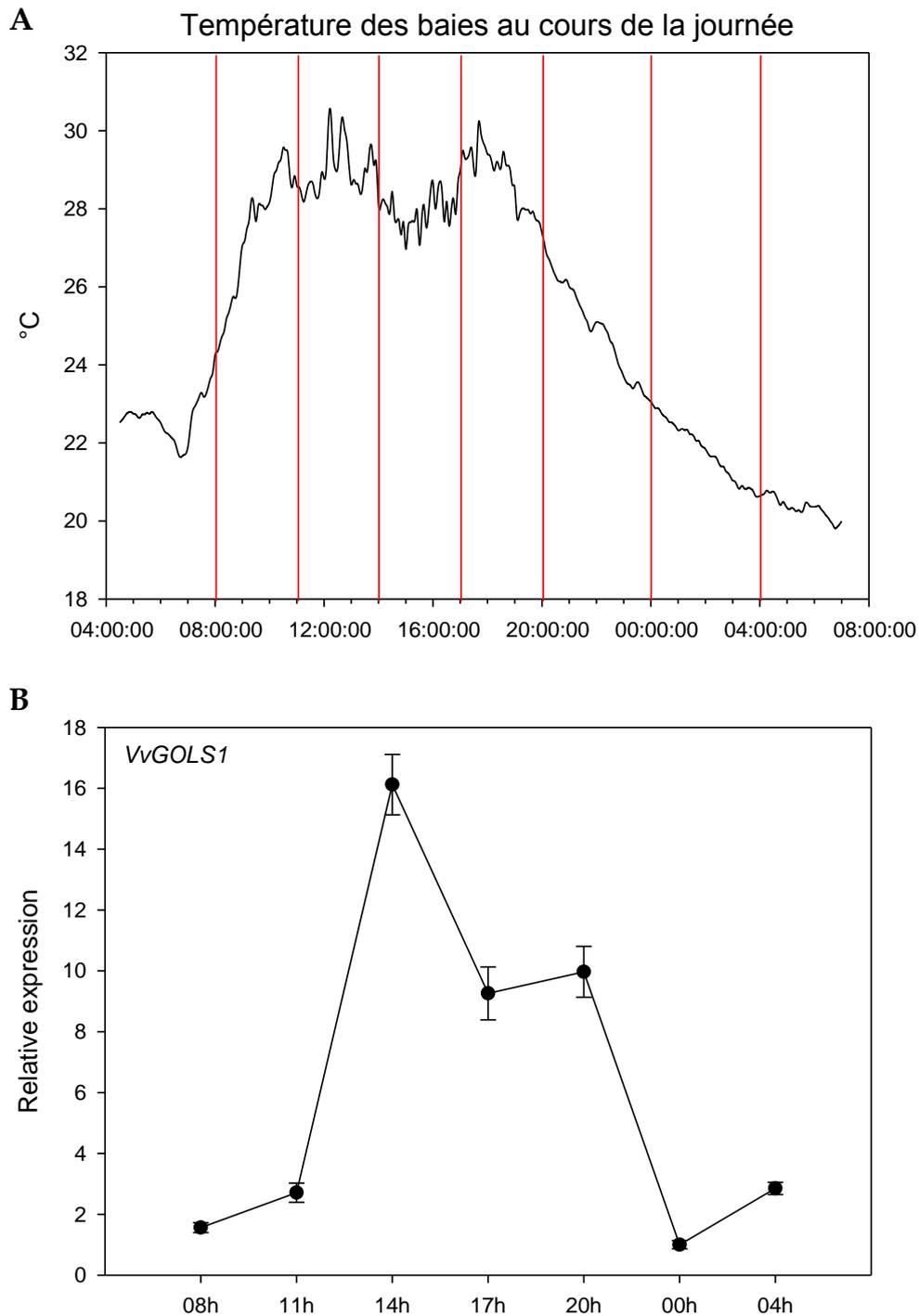


Figure 49. Relevé des températures perçues dans la baie sur 24h (A) et profil d'expression de *VvGOLS1* durant ces 24h (B). Les barres rouges indiquent les heures de prélèvement des baies utilisées pour établir le profil d'expression de *VvGOLS1*.

Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique

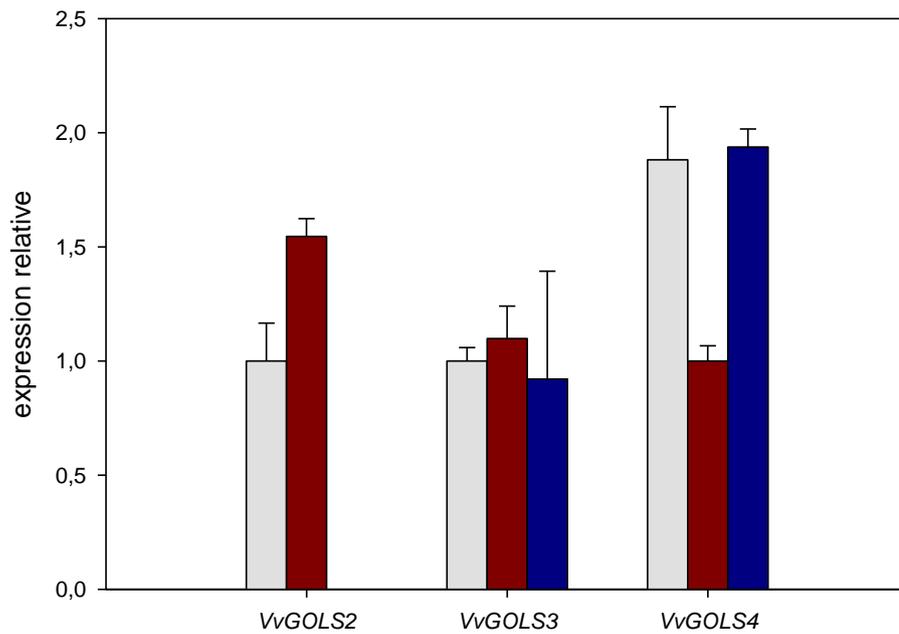


Figure 50. Profils d'expression de *VvGOLS2*, *VvGOLS3* et *VvGOLS4* dans des baies témoins (gris), dans des baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) pendant 21j (rouge) et dans des baies exposées à un stress lumineux ($\Delta I=+850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photons) pendant 21j (bleu).

Remarque : l'expression de *VvGOLS2* dans les baies exposées au stress lumineux n'a pas été mesurée

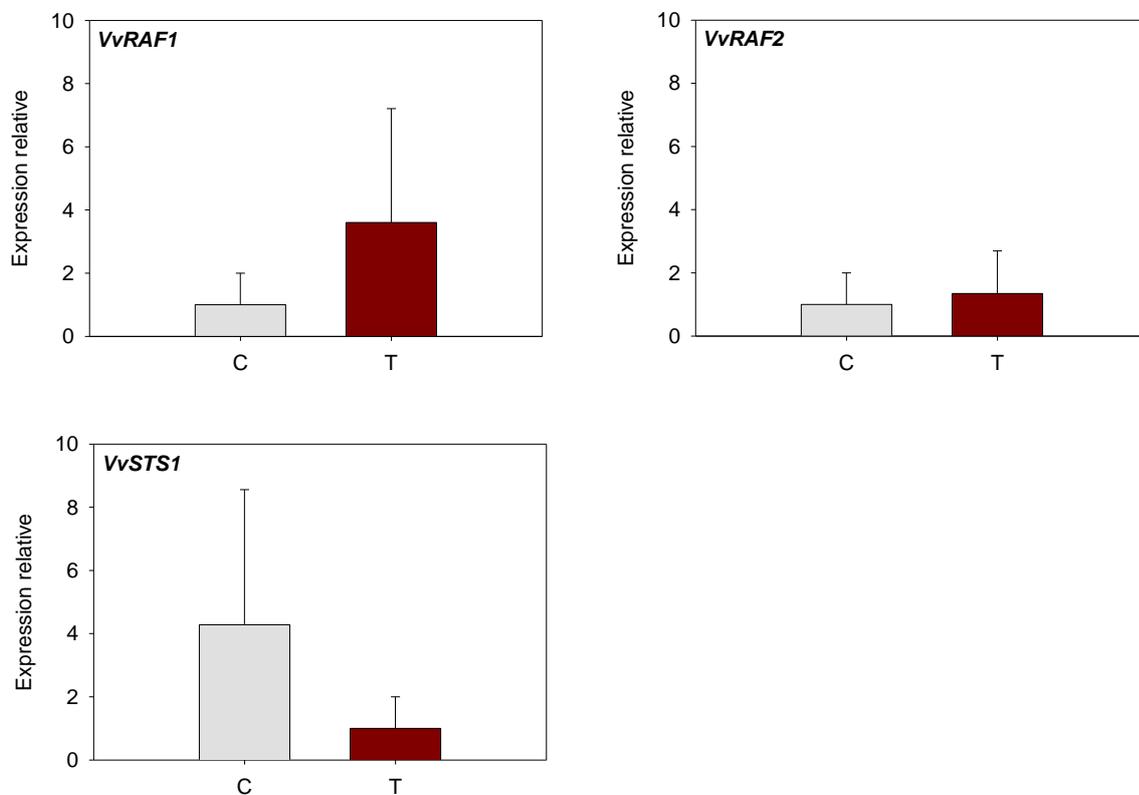


Figure 51. Profils d'expression de *VvRAF1*, *VvRAF2* et *VvSTS1* dans des baies témoins (C) et dans des baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$) pendant 21j (T).

III.3. Teneurs en sucres dans les baies exposées au stress thermique

Pour déterminer si le niveau d'accumulation des transcrits *VvGOLS1* est corrélé avec une augmentation de la production de galactinol dans les baies, la teneur en galactinol des différents tissus de la baie a été mesurée par HPLC-PAD. Pour les témoins, le galactinol n'a pas été détecté dans la pellicule, la pulpe ou les pépins (Figure 52). Toutefois, l'exposition au stress thermique entraîne une accumulation significative de galactinol dans les trois tissus de la baie, avec une plus forte accumulation observée dans la pellicule et la pulpe par rapport aux pépins. Aucune trace de raffinose ou de stachyose n'a été détectée dans les baies stressées ou témoins. Les sucres majeurs ont également été mesurés dans les mêmes conditions. Les teneurs en saccharose, glucose et fructose restent inchangées dans les différents tissus de la baie après exposition au stress thermique (Figure 52).

L'activité GOLS a été mesurée dans les différentes conditions, mais aucune activité n'a pu être détectée. De nouveaux tests doivent être effectués car les conditions enzymatiques utilisées n'étaient peut-être pas optimales ou bien que la concentration en protéine extraite ait été trop faible pour la détection.

III.4. Régulation de l'expression de *VvGOLS1* par *VvHsfA2*

Les réponses des cellules eucaryotes exposées à un stress thermique sont principalement régulées au niveau transcriptionnel par des Heat Shock transcription Factors (Hsfs), déjà isolés chez de nombreuses espèces végétales (von Koskull-Döring *et al.*, 2007). Parmi les Hsfs d'*Arabidopsis*, *AtHsfA2* a été récemment décrit comme un activateur majeur du système de défense de la plante en réponse à différents stress environnementaux, parmi lesquels le stress thermique (Nishizawa *et al.*, 2006). Le même groupe a montré que *AtHsfA2* peut induire l'expression de nombreux gènes, dont *AtGOLS1* (Nishizawa-Yokoi *et al.*, 2009). Dans ce contexte, notre hypothèse a été qu'un système de régulation similaire pourrait être effectif dans les baies de raisin exposées à un stress thermique.

III.4.1. Identification de *VvHsfA2* dans le génome de la Vigne

Pour identifier les homologues possibles de Hsfs dans le génome de la Vigne, la séquence conservée en acides aminés du domaine DBD (DNA Binding Domain) spécifique des Hsfs

Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique

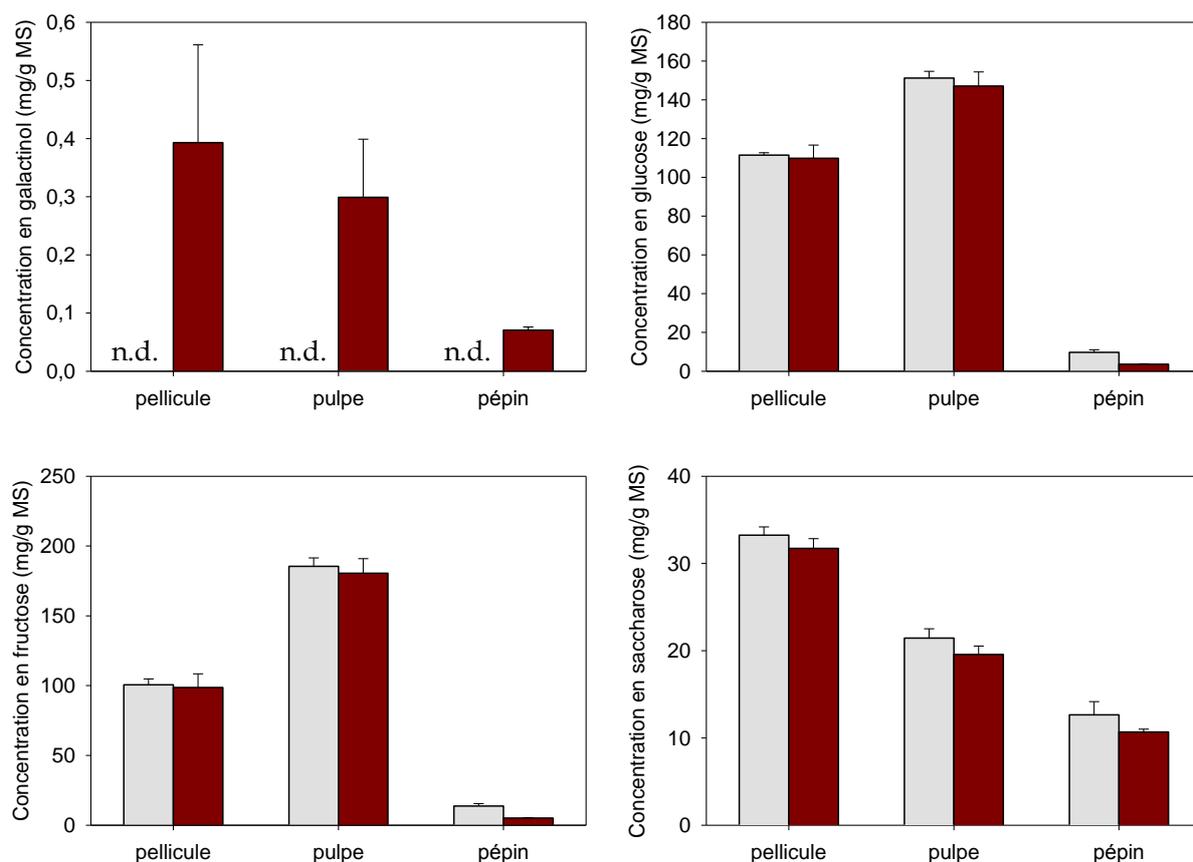


Figure 52. Teneur en galactinol et en carbohydrates majeurs dans différents compartiments de baies témoins (gris) ou de baies exposées à un stress thermique ($\Delta T=+9^{\circ}\text{C}$, rouge) pendant 21j.

n.d., non détecté; MS, matière sèche

(Pfam : PF00447) a été utilisée pour effectuer une recherche par alignement protéique (BlastP) contre le génome de la Vigne. Quinze protéines VvHsf putatives et non redondantes ont ainsi été identifiées. Ce nombre paraît cohérent en regard des 21 Hsfs identifiés chez *Arabidopsis* (Nover *et al.*, 2001), des 25 Hsfs chez le Riz (Guo *et al.*, 2008), des 18 Hsfs chez la Tomate et des 25 Hsfs chez le Maïs (Lin *et al.*, 2011). Un arbre phylogénétique a été réalisé après alignement des séquences protéiques pleine longueur des différents VvHsfs et des Hsfs d'*Arabidopsis* précédemment décrites (von Koskull-Döring *et al.*, 2007). D'autres protéines de la famille des HsfA2-like d'autres espèces ont également été incluses dans l'analyse (Figure 53). L'arbre phylogénétique indique clairement qu'une séquence protéique de Vigne appartient au cluster contenant AtHsfA2. L'ADNc pleine longueur correspondant (1164 bp, 388 aa) a été isolé à partir des baies de Cabernet Sauvignon exposées au stress thermique et dénommé VvHsfA2 (XP_002278709 ; Vv04s0008g01110). L'analyse de la séquence protéique indique que VvHsfA2 contient tous les domaines et motifs typiques des Hsfs selon

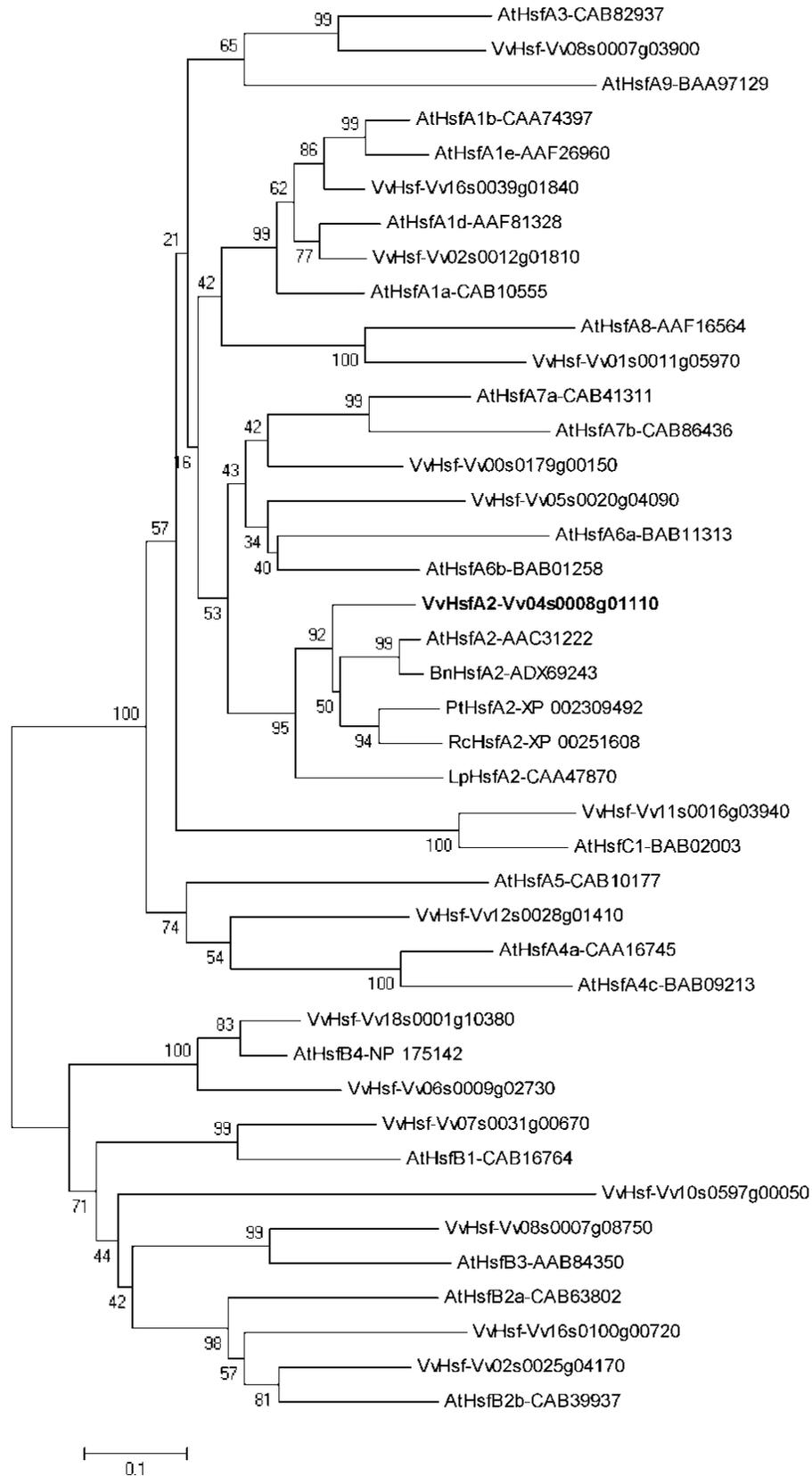


Figure 53. Arbre phylogénétique représentant les différents Hsfs identifiés chez la Vigne et ceux présents chez différentes espèces (Bootstrap = 1000).

Les numéro d'accèsion des gènes de Vigne renvoie à la base de données CRIBI.

III.4.2. Expression de *VvHsfA2* dans les baies exposées au stress thermique

Dans les baies exposées au stress thermique, l'expression de *VvHsfA2*, induite dès la première heure de traitement, est maximale après 8h d'exposition (données non montrées). De manière intéressante, le niveau de transcrits *VvHsfA2* reste élevé durant les trois semaines de traitement (Figure 55). Le profil d'expression de *VvHsfA2* durant l'exposition au stress thermique est nettement corrélé avec celui de *VvGOLS1*. Cela indique que *VvHsfA2* pourrait jouer un rôle d'activateur de la transcription en réponse au stress thermique et que *VvGOLS1* pourrait être une de ses cibles.

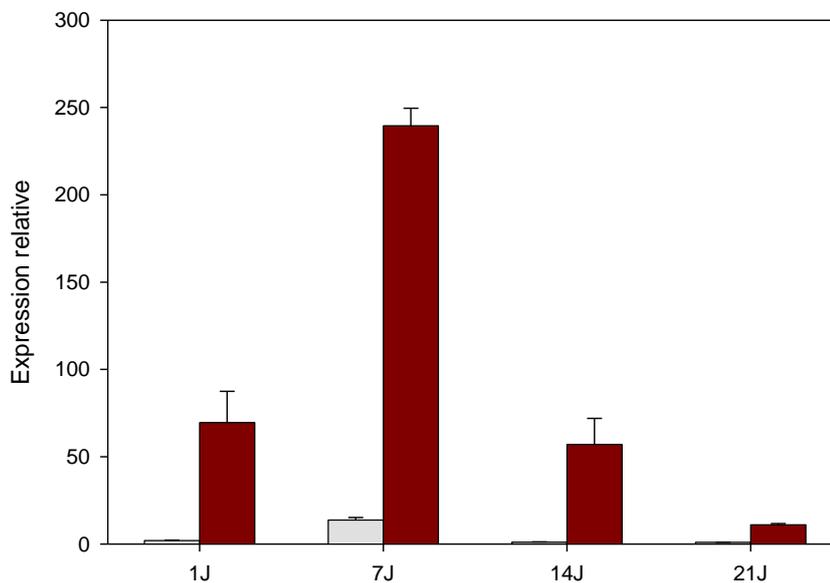


Figure 55. Profils d'expression de *VvHsfA2* dans des baies témoins (gris) et dans des baies exposées à un stress thermique ($\Delta T = +9^{\circ}\text{C}$, rouge) sur une journée (A) et pendant 21j (B).

III.4.3. Etude de l'interaction de *VvHsfA2* avec le promoteur de *VvGOLS1*

Pour déterminer si la transcription de *VvGOLS1* est régulée par *VvHsfA2*, des expériences d'expression transitoire ont été conduites dans des protoplastes de Tabac en utilisant le gène rapporteur codant une β -glucuronidase (GUS). Pour cela, *VvHsfA2* a été cloné dans le vecteur pRT101 et ainsi placé sous le contrôle du promoteur 35S du *Cauliflower mosaic virus* (CMV). L'analyse de la région putative du promoteur de *VvGOLS1* (via MATInspector) a révélé la présence de deux séquences HSE (Heat Shock Element) en amont de la boîte TATA putative (Figure 56). Les Hsfs sont capables de reconnaître et de se lier à ces HSE, formés par une

Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique



Figure 56. Localisation des boîtes HSE (Heat Shock Elements) sur le promoteur de *VvGOLS1*.

répétition de motifs de liaison palindromique (5'-nGAAnnTTCT-3') et conservés chez tous les gènes inductibles par le stress thermique chez les eucaryotes (Nover *et al.*, 2001). Un fragment contenant environ les 1000 bp en amont du codon start du gène *VvGOLS1*, incluant les séquences HSEs, a été inséré en amont de la séquence rapportrice *uidA* du vecteur pAM35 (Guerineau *et al.*, 2003). L'expression transitoire des deux vecteurs dans les protoplastes de tabac a été réalisée et la trans-activation potentielle du promoteur de *VvGOLS1* par *VvHsfA2* a été analysée en mesurant l'activité GUS résultante. A température ambiante, *VvHsfA2* n'active pas le promoteur de *VvGOLS1* (Figure 57). Par contre, l'activité GUS est bien plus importante lorsque les protoplastes transformés sont incubés à 35°C pendant 2h puis placés en repos pendant 4h à température ambiante. *VvHsfA2* est donc capable d'activer *in vivo* le promoteur de *VvGOLS1* suite à une exposition à un stress thermique.

III.5. Discussion

Parmi les gènes différentiellement exprimés dans les baies de raisin exposées à des températures élevées, nous avons sélectionné un gène sur-exprimé et codant potentiellement une galactinol synthase (*VvGOLS1*). Ce choix a été effectué d'après les données de la littérature qui décrivent l'implication du galactinol, précurseur de la synthèse des RFO, dans les réponses de différentes espèces exposées à des stress abiotiques variés. Ainsi, la synthèse de galactinol et ses dérivés RFO est décrite chez les plantes en réponse à des stress thermiques, hydriques, salins, ou encore oxydatifs (voir tableau 1). En revanche, et à notre connaissance, très peu de données relatives à l'accumulation de ces métabolites sont disponibles à ce jour chez la Vigne. Kliewer (1966) a décrit la présence de raffinose, stachyose et verbascose dans les racines, feuilles et baies de *V. vinifera* var. Sultanine au vignoble. Hamman *et al.* (1996) ont montré que les teneurs élevées en raffinose, stachyose, glucose et fructose, sont corrélées à une meilleure résistance au froid des cépages Chardonnay et Riesling. Plus récemment, Kang et Lee (2001) ont purifié et caractérisé une α -galactosidase à partir de pulpe de *V. vinifera* cv. Muscat d'Alexandrie. Les essais enzymatiques réalisés *in*

Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique

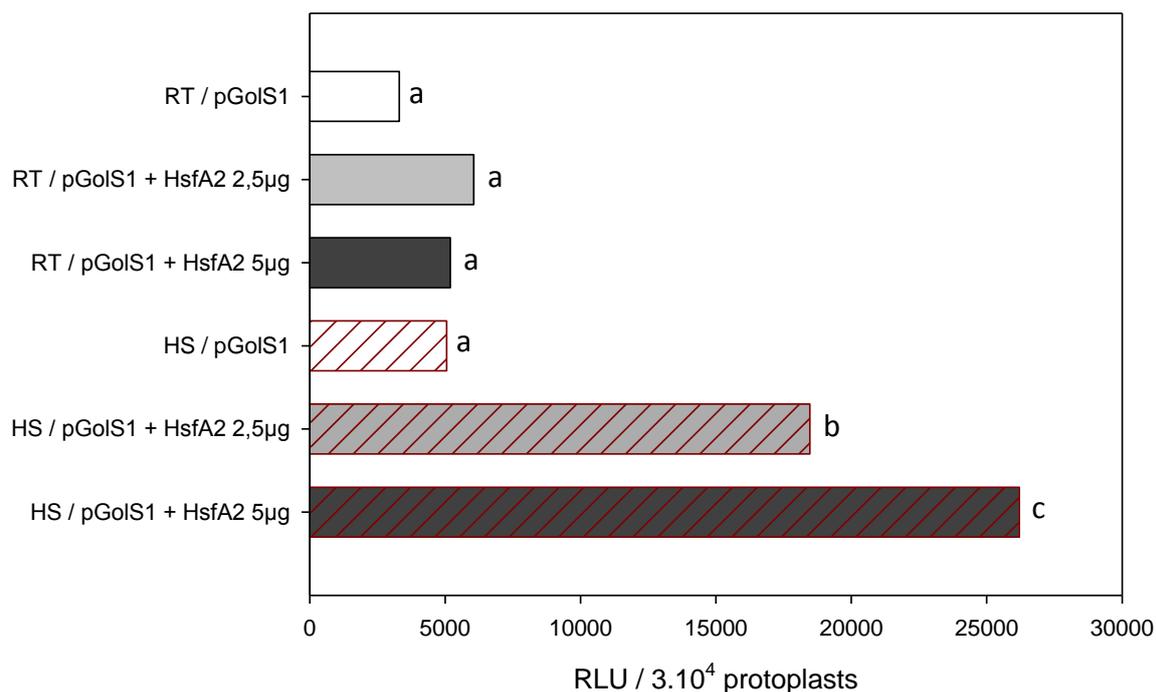


Figure 57. Analyse de l'activité GUS placée sous le contrôle du promoteur de *VvGOLS1* seul ou co-transformé avec la construction *35S-VvHsfA2* dans des protoplastes de Tabac. Les lettres indiquent si les mesures sont statistiquement significatives (n=3, p.value < 0,05, test de Holm-Sidak).

RT, essais réalisés à température ambiante; HS, essais réalisés après exposition des protoplastes transformés 2H à 35°C puis laissés 4H au repos à température ambiante; RLU, Relative Luminescence Unit

in vitro ont révélé une forte activité hydrolytique de cette enzyme vis-à-vis du raffinose et du stachyose. Enfin, des données transcriptomiques générées à partir d'ARNs extraits de feuilles de vigne exposées à des stress salin, hydrique ou au gel, ont révélé la sur-expression d'un gène codant une RAF quel que soit le stress appliqué (Tattersall *et al.*, 2007). Ces données, bien que très fragmentaires, renforcent l'idée de l'existence d'une voie RFO (synthèse et dégradation) fonctionnelle chez la Vigne, et potentiellement dans la baie de raisin. De façon plus générale, aucune donnée n'est disponible à ce jour concernant l'implication des RFOs dans la protection des fruits charnus contre les stress abiotiques. Seules des données obtenues chez la Tomate rapportent l'intervention de *LeGOLS1* lors du développement des pépins, et ce en l'absence de stress (Downie *et al.*, 2003), le rôle des RFOs dans la tolérance des graines à la dessiccation étant désormais bien établi (Li *et al.*, 2011).

L'analyse du génome de la vigne a révélé la présence de 4 gènes *VvGOLS*, 2 gènes *VvRAF* et 1 gène *VvSTS*. Un doute demeure concernant l'existence d'une isoforme très proche de *VvGOLS1* et de 2 isoformes proches de *VvGOLS3*. Dans chaque cas, ces isoformes présentent des homologies très élevées avec *VvGOLS1* ou *VvGOLS3*, toujours supérieures à 96%

Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique

d'identité en nucléotides, que ce soit dans la séquence codante, mais également et de façon plus surprenante, dans les régions non codantes (5'UTR, 3'UTR et introns). Dans les deux cas (*VvGOLS1* et *VvGOLS3*), les copies respectives sont présentes sur le même chromosome et positionnées en tandem (voir Figure 45). Ces observations pourraient s'expliquer par des problèmes d'assemblage suite au séquençage du génome de la Vigne, aboutissant à des prédictions erronées de gènes. La présence d'isoformes très conservées pourrait également s'expliquer par des phénomènes de duplication de gènes. En effet, le génome de la Vigne est largement dupliqué (60%, Jaillon *et al.*, 2007). Giannuzzi *et al.* (2011) ont récemment démontré l'existence et l'importance des duplications segmentales (SDs) dans ce génome. Ce processus contribue à la plasticité des génomes et représente un des moteurs de l'évolution (Taylor and Raes, 2004). Ainsi, des SDs (>94% d'identité et pour des tailles de segments ≥ 10 kb) composent 17 % du génome de la Vigne (soit 85 Mb) dont environ 10 % de gènes. De façon intéressante, plusieurs gènes issus de SDs interviennent dans la biosynthèse de molécules généralement impliquées dans les réponses des plantes aux contraintes de l'environnement (Taylor and Raes, 2004). Toutefois, toutes nos tentatives pour cloner *VvGOLS1-like* à partir d'ADNc de baies (avec ou sans stress) ont échoué. Ce constat suggère que ce gène n'est pas exprimé dans les baies de raisin, *a fortiori* en condition de stress thermique, ou qu'il s'agit d'un pseudogène. Pour définitivement conclure, il faudrait obtenir et séquencer l'ADNg correspondant à ce gène potentiel. L'expression de *VvGOLS3* n'étant pas affectée dans les baies stressées, nous n'avons pas entrepris une analyse plus poussée concernant ses deux plus proches isoformes.

L'expression des gènes de la voie RFO dans la baie de raisin en condition de stress a été étudiée par RT-QPCR. Ainsi, la sur-expression de *VvGOLS1* observée dans les jeux de données transcriptomiques a pu être confirmée et affinée. Nos résultats révèlent une accumulation rapide, intense et prolongée des transcrits *VvGOLS1* dans les baies exposées au stress thermique (Figure 48), alors que l'expression des autres gènes *VvGOLS* n'est pas affectée par le traitement. Ces données sont en accord avec la spécificité de réponse des gènes *GOLS* observée chez d'autres espèces en fonction du stress perçu. Ainsi, chez *Arabidopsis*, seuls 3 des 7 gènes *AtGOLS* sont mobilisés en réponse à différents stress abiotiques. Alors que les transcrits *AtGOLS1* et *AtGOLS2* s'accumulent après perception d'un stress hydrique ou salin, un stress « froid » mobilise spécifiquement *AtGOLS3* (Taji *et al.*, 2002). De la même façon, dos Santos *et al.* (2011) décrivent des niveaux d'expression qui diffèrent pour 3 isoformes *GOLS* chez le Caféier (*Coffea arabica* L.) en fonction des stress abiotiques

Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique

appliqués (stress hydrique, salin ou thermique). Il est intéressant de noter que l'expression différentielle des *CaGOLS* a été observée dans les feuilles mais que les transcrits correspondants sont peu ou pas détectés dans les racines, les fleurs, les fruits et le noyau. Ces expressions différentielles de gènes *GOLS* indiquent des rôles précis pour chacune des isoformes *GOLS* au sein d'une même plante. Ainsi, Sprenger et Keller (2000) ont suggéré que chez la bugle rampante (*Ajuga reptans*), *GOLS1* serait impliqué dans la synthèse de RFOs impliqués dans le stockage du carbone, alors que *GOLS2* interviendrait dans la synthèse de RFOs facilitant le transport de carbone dans la plante. *VvGOLS1* semble intervenir dans les processus d'adaptation au stress thermique, alors que les rôles respectifs de *VvGOLS2*, *VvGOLS3* et *VvGOLS4* restent à définir dans la baie de raisin, et de manière plus générale chez la Vigne.

La forte expression de *VvGOLS1* suggère son implication dans les processus d'adaptation déclenchés au sein des baies pour faire face à un stress thermique de grande ampleur. Cette expression est significativement corrélée avec l'accumulation de galactinol dans la pellicule, la pulpe et les pépins des baies. Nos premières tentatives pour doser l'activité galactinol synthase correspondante dans les baies de raisin (dosages réalisés en collaboration avec A. Egert et F. Keller; Université de Zürich, Suisse) n'ont pas été couronnées de succès. L'utilisation d'échantillons congelés ou de trop faibles concentrations en protéines lors des essais enzymatiques pourrait expliquer cette absence d'activité *GOLS*. En conséquence, le protocole expérimental devra être affiné pour mettre en évidence l'activation de l'enzyme *GOLS* dans les baies exposées à un stress thermique.

Contrairement à d'autres espèces végétales où la perception d'un stress abiotique entraîne la synthèse de galactinol, mais également de raffinose et de stachyose (Sprenger and Keller, 2000; Taji *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2007; Nishizawa *et al.*, 2008; Peters and Keller, 2009; dos Santos *et al.*, 2011), le stress thermique ne semble pas déclencher l'accumulation de ces deux RFOs dans la baie de raisin. Cette observation est en accord avec le fait que les niveaux d'expression de *VvRAFI*, *VvRAF2* et *VvSTS1* ne sont pas significativement modifiés dans nos échantillons stressés. Toutefois, il est important de noter que ces 3 transcrits sont présents de manière constitutive dans les baies de raisin. De plus, les dosages de RFOs, réalisés en collaboration avec A. Egert et F. Keller, laissent planer une incertitude concernant la présence de RFOs dans les baies stressées. Deux séries de dosages ont été réalisées à partir d'échantillons prélevés en 2010 et 2011, et issus de conditions expérimentales très proches (baies au stade « mi-maturation », +10°C pendant 21j en 2010, +8°C pendant 14j en 2011).

Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique

Dans les deux cas, l'accumulation de galactinol dans les baies exposées à un stress thermique a pu être établie sans ambiguïté. En revanche, le raffinose a été détecté dans les baies stressées de 2011 alors qu'il est absent des échantillons issus de 2010. Ce contraste dans les résultats pourrait s'expliquer par des extractions menées sur du matériel lyophilisé en 2010 et du matériel frais en 2011. Une décongélation, même partielle, avant ou durant la lyophilisation des échantillons (2010) pourrait avoir entraîné la dégradation de certains sucres comme le raffinose. Toutefois, nous ne pouvons exclure l'impact d'une différence dans les modalités de stress, comme un stress moins intense ou sur une durée plus courte. Pour valider cette hypothèse, il s'agira de tester l'expression des gènes *VvRAF1* et *VvRAF2* dans les baies présentant des teneurs significatives en raffinose (e.g. 2011). Une autre hypothèse consisterait à envisager une dégradation des RFOs néo-synthétisés très importante dans les baies de raisin, entraînant la disparition de raffinose après 21 J de traitement. Cette dégradation de raffinose pourrait être réalisée par des α -galactosidases présentes dans les baies (Kang and Lee, 2001). Enfin, la synthèse du précurseur galactinol conjuguée à l'absence de RFOs ouvre une autre possibilité: le galactinol pourrait agir en tant que molécule « signal » dans la baie suite à la perception du stress thermique. En effet, le rôle des sucres comme molécules de signalisation est bien établi (Rolland *et al.*, 2006; Hanson and Smeekens, 2009) et a été décrit chez la Vigne (Çakir *et al.*, 2003; Lecourieux *et al.*, 2010). Récemment, Kim *et al.* (2008) ont démontré que le galactinol agissait comme molécule « signal » lors de la mise en place de la résistance systémique induite chez le concombre (*Cucumis sativus*). Les transcrits *CsGOLS1* et le galactinol s'accumulent lors de la colonisation des racines de concombre par *Pseudomonas chlorophasis* O6. Des plants de tabac sur-exprimant *CsGOLS1* ou des plants de tabac sauvages traités avec du galactinol exogène présentent une résistance constitutive contre des agents pathogènes tels que *Botrytis cinerea*.

De nombreuses études ont démontré que la synthèse de galactinol, précurseur des RFOs, était contrôlée principalement au niveau transcriptionnel, *via* l'expression des gènes *GOLS*. Chez des plantes d'*Arabidopsis* exposées à un stress froid, l'expression d'*AtGOLS3* est régulée positivement par DREB1A, un facteur de transcription de la famille CBF/DREB (C-repeated binding factors/dehydratation-responsive element binding proteins; Taji *et al.*, 2002). Les Hsfs, une autre famille de facteurs de transcription (von Koskull-Döring *et al.*, 2007), interviennent également dans la régulation de la synthèse de galactinol. Ainsi, l'expression d'*AtGOLS1*, *AtGOLS2* et *AtGOLS4* est régulée par les facteurs de transcription AtHsfA1a, AtHsfA1b et/ou AtHsfA2 (Panikulangara *et al.*, 2004; Busch *et al.*, 2005; Nishizawa *et al.*,

Implication du galactinol, précurseur de la voie des RFOs dans la réponse des baies de raisin au stress thermique

2006; Schramm *et al.*, 2006; Nishizawa *et al.*, 2008). De plus, des lignées transgéniques sur-exprimant *AtHsfA2* présentent des teneurs élevées en galactinol et raffinose, et sont plus résistantes à des stress « froid », salin ou oxydatifs (Nishizawa *et al.*, 2008). Pour savoir si un mécanisme de régulation similaire existe chez la Vigne, et plus précisément dans les baies soumises à un stress thermique, nous avons entrepris la caractérisation de *VvHsfA2*. Ce gène est fortement induit dans les baies suite à un stress thermique (Figure 55). De plus il régule *in vivo* l'expression du promoteur *VvGOLS1*, celui-ci présentant deux éléments *CIS* de type HSE (Figure 57). Ces données suggèrent que l'accumulation de galactinol dans les baies stressées pourrait se réaliser après régulation positive de *VvGOLS1* par *VvHsfA2*. A ce jour, aucune donnée n'est disponible relative aux facteurs de transcription de type Hsf chez la Vigne. L'analyse *in silico* du génome a révélé l'existence de 15 gènes *VvHsf* potentiels. Ce nombre putatif de *VvHsf* chez la vigne correspond aux nombres d'Hsfs présents chez d'autres espèces (Nover *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2011). Une observation marquante concerne la sur-représentation des *Hsfs* dans les génomes de plantes, en comparaison du gène *Hsf* unique chez *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* et chez la levure, ou des 4 gènes *Hsf* dans le génome des vertébrés (von Koskull-Döring *et al.*, 2007). Quelle est la signification fonctionnelle d'une telle famille multigénique chez les plantes ? Des travaux menés sur *Arabidopsis*, la Tomate, le Riz ou le Maïs (von Koskull-Döring *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2011) révèlent une remarquable diversité de structures et de profils d'expression. Dans le contexte de ce travail de thèse, l'analyse a été ciblée sur *VvHsfA2*, mais il sera particulièrement intéressant d'étudier le comportement des autres *VvHsfs* dans la baie de raisin stressée. En effet, si *HsfA2* est décrit comme un régulateur fort de la thermotolérance chez différentes plantes (Schramm *et al.*, 2006; Charng *et al.*, 2007; von Koskull-Döring *et al.*, 2007), son action s'effectue en synergie avec d'autres Hsfs. Ainsi, sa solubilité, sa localisation nucléaire et son activité sont contrôlées par d'autres Hsfs et Hsps (von Koskull-Döring *et al.*, 2007). Récemment, Nishizawa-Yokoi *et al.* (2011) ont montré que la régulation transcriptionnelle d'*AtHsfA2* impliquait *AtHsfA1d* et *AtHsfA1e*, faisant de ces derniers des régulateurs clés des processus de signalisation Hsf-dépendants déclenchés par les stress environnementaux. Enfin, la régulation de l'activité d'*HsfA2* peut impliquer des modifications post-traductionnelles de la protéine, telles que des événements de sumoylation (Cohen-Peer *et al.*, 2010) et de phosphorylation (Lecourieux D. communication personnelle). Il serait intéressant d'étudier ce type d'événements dans la baie de raisin et en particulier dans un contexte de stress abiotiques.

Conclusions générales et perspectives

Le travail de thèse présenté à travers ce manuscrit avait pour objectif de mieux comprendre l'effet du microclimat et plus précisément de la température et de la lumière sur le métabolisme de la baie. Pour ce faire, nous avons dû mettre en place un système expérimental original, permettant d'exposer uniquement les baies de raisin à un stress thermique ou lumineux, et de bien contrôler l'intensité des deux stress appliqués. Pour définir les conséquences respectives de ces deux stress sur les baies exposées, des approches globales (moléculaire et biochimique) ont été employées et les résultats obtenus ont été analysés et comparés. Une étude plus fine a été réalisée sur les acteurs moléculaires intervenant respectivement dans la synthèse des composés phénoliques et dans la synthèse des oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs).

Les analyses transcriptomiques des baies exposées aux stress thermique ou lumineux ont permis de mettre en évidence la présence de deux mécanismes de réponses des baies, quel que soit le stress appliqué. Le premier mécanisme est représenté par une batterie de gènes dont l'expression est induite très rapidement (dès 2H d'exposition au stress) et de manière transitoire. Parmi ces gènes, de nombreux *HSPs* sont présents témoignant d'une modification importante de l'état cellulaire suite à l'exposition aux stress. Cette mobilisation rapide et transitoire peut être assimilée à une réponse à court terme et temporaire de la baie aux variations environnementales. Le deuxième mécanisme est caractérisé par la réquisition d'un éventail de gènes après une longue période d'exposition aux stress. Ce mécanisme semble donc faire partie de la mise en place d'une réponse adaptative de la plante face à une modification durable de son environnement. Ces deux réponses distinctes, révélées par ce travail, vont être étudiées de manière plus fine dans le cadre du projet ANR DURAVITIS. Parmi les différents objectifs visés par ce projet réunissant des équipes montpelliéraines et l'UMR EGFV, un axe de recherche consistera à mieux comprendre les conséquences d'une température élevée et uniquement localisée sur les baies de raisin. Ces conséquences seront ensuite comparées à celles observées sur des baies après exposition de la plante entière à des températures élevées. Pour ces futurs travaux, des lames comprenant le génome complet de *Vitis vinifera* (Lames Roche Nimblegen contenant 29550 gènes) seront utilisées permettant ainsi une étude plus fine et complète de la réponse de baie au niveau transcriptomique. En ce qui concerne les conséquences du stress rayonnement au niveau des baies, il serait intéressant

de caractériser la méthallothionéine qui voit son expression induite tout au long de l'exposition à une forte intensité lumineuse car nous sommes peut être en présence d'un nouveau bio-marqueur de l'intensité lumineuse. Aucune donnée ne relie à ce jour des méthallothionéines à des stress lumineux. En revanche, quelques travaux associent les méthallothionéines aux stress oxydatifs (Zhou *et al.*, 2005; Samardzić *et al.*, 2010). La comparaison des données transcriptomiques obtenues à partir des baies exposées soit à un stress thermique soit à un stress lumineux a également permis de montrer des différences fondamentales dans la réponse de la baie en fonction du stress perçu. L'étude de ces stress appliqués séparément associée à une étude où les deux stress seraient appliqués simultanément pourrait permettre de mettre à jour les effets combinatoires ou antinomiques de ces stress dans la baie de raisin. Ainsi, cela permettrait une meilleure compréhension des mécanismes impliqués et leur éventuelle interaction. Cela permettrait également de mieux appréhender les conséquences d'une pratique viticole qu'est l'effeuillage. En effet, l'effeuillage peut se traduire par la combinaison de deux stress susceptibles d'affecter les baies : des stress thermiques et lumineux. La comparaison avec un stress appliqué sur la plante entière pourrait également donner des clés pour mieux comprendre l'interaction entre la baie et le reste de la plante. Par exemple, dans notre système, les feuilles n'étant pas exposées au stress abiotique, l'influx de sucres dans les baies n'a donc pas été modifié. Il serait intéressant d'étudier l'impact de cet influx en conditions de stress localisé par rapport à un stress généralisé. Cette observation est également valable pour d'autres métabolites d'intérêt comme les composés phénoliques ou les RFOs. Ainsi, il serait particulièrement intéressant d'étudier le rôle potentiel des RFOs dans le stockage et le transport de carbone chez la Vigne, la baie de raisin étant un organe puits accumulant des quantités massives de sucres. Comment un stress thermique perçu à l'échelle de la plante entière pourrait affecter le métabolisme des RFOs?

L'étude de la voie de biosynthèse des flavonoïdes dans les baies exposées au stress thermique ou lumineux a montré tout d'abord l'importance d'étudier la baie sous des angles différents, moléculaire et biochimique. En effet, alors qu'au niveau métabolique, la diminution drastique des teneurs en anthocyanes et en flavonols a pu être observée, au niveau transcriptionnel, les profils d'expression des gènes codant les enzymes intervenant dans cette voie ne reflètent pas automatiquement les résultats obtenus par les analyses biochimiques. La détermination de la teneur pour chacune des protéines de la voie de biosynthèse, et plus idéalement la mesure des activités enzymatiques correspondantes pourrait permettre de faire le lien entre les observations transcriptionnelles et les dosages biochimiques réalisés dans le cadre de cette

thèse. Les résultats décrits par Mori *et al.* (2007) et les données issues de ce travail indiquent clairement que le stress thermique a un impact direct et très prononcé sur la teneur en anthocyanes dans la pellicule. Cet effet drastique et négatif ne peut s'expliquer uniquement par des événements transcriptionnels. Pour mieux comprendre l'impact du stress thermique sur l'accumulation des anthocyanes, il s'agira de définir dans quelle mesure les activités de transport des anthocyanes, récemment décrites chez la Vigne (Gomez *et al.*, 2009, 2011), peuvent être la cible de ce stress. Les processus de dégradation des anthocyanes, suggérés par Mori *et al.* (2007) devront également être abordés dans ce contexte. D'autre part, l'étude des profils d'expression des gènes codant les différentes enzymes a révélé l'importance du stade de développement auquel la baie se trouve lors de la perception d'un stress thermique. Ainsi, l'exposition au stress thermique de la baie au stade véraison entraîne une répression de la quasi-totalité des gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, alors que dans une baie exposée au stade mi-maturation, les variations d'expression de ces gènes sont beaucoup moins marquées. Pour compléter ce constat, il serait intéressant d'étudier l'impact du stress thermique ou lumineux sur des baies pendant la phase herbacée. En effet, pendant cette période les tanins sont accumulés dans la baie (Downey, Harvey, and Robinson, 2003a) et il se pourrait que le stress thermique entraîne une diminution de leurs teneurs comme le suggère la répression des gènes spécifiques de cette voie à un stade plus tardif. Une diminution de tanins aurait un impact conséquent sur la qualité organoleptique de la baie et du vin. De plus, la baie est toujours douée de photosynthèse au stade mi-vert, il serait donc intéressant d'étudier l'effet du stress rayonnement sur ces baies et sur le processus photosynthétique. Enfin, dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes employés à étudier d'une manière approfondie les profils d'expression des gènes associés au métabolisme phénolique. La distinction entre les isoformes codant une même protéine s'est révélé être importante. En effet, plusieurs isoformes présentent des profils d'expression différents voire opposés en réponse aux différents stress perçus. Toutefois, la liste établie n'est pas exhaustive et différentes isoformes restent à être caractérisées pour compléter cette étude. D'autres acteurs pourraient également se révéler important dans la régulation transcriptionnelle de la voie de biosynthèse des flavonoïdes en condition de stress. Il s'agit des facteurs de transcription régulant les gènes de la voie (voir Introduction 2.2.4.4). Par exemple, il serait particulièrement judicieux de déterminer le profil d'expression des régulateurs de la synthèse des anthocyanes, comme par exemple *VvMYBA1* ou *VvMYB5a* (Kobayashi *et al.*, 2004; Deluc *et al.*, 2006) afin de voir si ces derniers corrèlent avec la répression de différents profils d'expression observés.

Le dosage de dix-huit acides aminés dans les pellicules et les pulpes de baies exposées aux stress thermiques et lumineux a révélé une différence de sensibilité de ces deux compartiments face aux stress. La teneur en PHE, TYR et LYS est augmentée dans les pellicules de baies exposées au stress thermique. Aucune variation n'est observée dans les pulpes. La phénylalanine et la tyrosine étant les précurseurs des phénylpropanoïdes, il serait intéressant d'étudier le comportement de la 4-coumarate ligase (4CL), une enzyme catalysant la synthèse de p-coumaroyl CoA à partir de l'acide coumarique. En effet, la PHE et la TYR sont des précurseurs de l'acide coumarique. L'accumulation de ces acides aminés pourrait provenir d'un blocage du flux métabolique via l'inhibition de la 4-CL.

L'initiation de la caractérisation métabolomique des pellicules de baies en réponse aux stress thermiques et lumineux a révélé un effet différent de ces deux stress sur le métabolisme de la baie. Nos données transcriptomiques suggéraient un impact différent des stress selon le stade de développement où se trouvaient les baies au moment de l'application du stress. Ces données corroborées par l'étude métabolomique réalisée sur des baies stressées pendant le stade «véraison» ou au stade «mi-maturation». Certes nos résultats préliminaires montrent que le métabolome des pellicules de baies diffère de manière significative selon le stress appliqué (Chapitre II.3.3), mais également selon le stade de développement où le stress est appliqué. De la même façon, l'analyse métabolomique réalisée à partir des pellicules, pulpes et pépins révèle de fortes discriminations dans les contenus métaboliques. L'ensemble de ces expériences seront à approfondir tout en affinant le protocole expérimental. Ainsi, un plus grand nombre de réplicats biologiques et techniques devra être utilisé afin de s'assurer de la pertinence des analyses multivariées. L'élimination des fragments ioniques et des adduits potentiels provoqués par le système analytique doit être une des priorités de la prochaine étude. La confirmation des signaux de masse par une analyse supplémentaire par MS/MS ou RMN doit être envisagée afin de confirmer les changements métaboliques observés et d'identifier de nouveaux composés intervenant dans la réponse des baies aux stress thermiques et lumineux. Cette étude s'est principalement concentrée sur le métabolisme secondaire en raison de la question biologique posée et de la faible disponibilité des bases de données. Il serait intéressant d'élargir l'étude à un maximum de composés *via* l'utilisation de solvants d'extraction appropriés et en incluant une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

L'étude de la voie de biosynthèse des oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs) a permis d'identifier différents acteurs de cette voie présents dans les baies de raisin. Cependant,

seule l'expression de l'isoforme *VvGOLS1* est stimulée par le stress thermique. Cette expression est corrélée à une accumulation de galactinol dans les différents compartiments de la baie. A notre connaissance, il s'agit de la première description d'une synthèse de galactinol lors des réponses adaptatives d'un fruit charnu exposé à un stress abiotique. La synthèse de galactinol suggère l'implication de ce composé en tant que molécule «signal» dans la baie suite à la perception du stress thermique. Il serait intéressant d'étudier la sensibilité des baies à *Botrytis* ou au mildiou après les avoir préalablement exposées à un stress thermique. En effet, le galactinol a récemment été décrit comme molécule «signal» nécessaire à la mise en place de la résistance systémique induite chez le Concombre (Kim *et al.*, 2008). Ce processus pourrait être conservé dans la baie de raisin et stimulé après perception d'un stress thermique. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait doser le galactinol dans les autres organes de la plantes. Il faudrait également réaliser des plants de Vigne sur-exprimant *VvGOLS1* afin de vérifier si ces boutures présentent une résistance constitutive contre d'autres facteurs biotiques ou abiotiques.

Un facteur de transcription, *VvHsfA2*, a été identifié dans le génome de la Vigne et sa capacité à réguler l'expression de *VvGOLS1* suite à une exposition au stress thermique a été démontrée par expression transitoire dans des protoplastes de Tabac. Chez *Arabidopsis*, *AtHsfA2* est un régulateur fort des réponses déclenchées suite à un stress thermique. L'activité et l'expression d'*AtHsfA2* sont également dépendantes d'autres Hsfs, comme *AtHsfA1d* et *AtHsfA1e* (Nishizawa-Yokoi *et al.*, 2011), révélant la complexité des mécanismes impliquant les Hsfs. Dans ce contexte et étant donné l'absence totale chez la Vigne de travaux sur la famille des Hsfs, il serait donc particulièrement intéressant d'approfondir nos connaissances sur les Hsfs et leur rôle dans les réponses observées dans les baies stressées. Ce travail de thèse a permis d'identifier *in silico* 15 Hsfs putatifs chez la Vigne. La suite du travail consistera, dans un premier temps, à caractériser ces différents *VvHsfs* en regardant notamment leurs profils d'expression dans les baies de raisin ainsi que sous l'influence de différents stress abiotiques. Les Hsfs mobilisés dans les baies pourront ensuite être sélectionnés pour une étude plus approfondie. Par exemple, leurs capacités d'interaction avec *VvHsfA2* ainsi que leurs activités trans-activatrices sur les promoteurs de *VvHsfA2* ou de *VvGOLS1* pourront être testées.

Références bibliographiques

- Abrahams, S., Lee, E., Walker, A.R., Tanner, G.J., Larkin, P.J., Ashton, A.R., 2003. The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *The Plant Journal* 35, 624-636.
- Adamse, P., Reed, H.E., Krizek, D.T., Britz, S.J., Mirecki, R.M., 1997. An inexpensive setup for assessing the impact of ambient solar ultraviolet radiation on seedlings. *Journal of Natural Resources & Life Sciences Education* 26, 139-144.
- Ahn, T.K., Avenson, T.J., Ballottari, M., Cheng, Y.-C., Niyogi, K.K., Bassi, R., Fleming, G.R., 2008. Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein. *Science (New York, N.Y.)* 320, 794-7.
- Albert, K.R., Mikkelsen, T.N., Ro-Poulsen, H., 2005. Effects of ambient versus reduced UV-B radiation on high arctic *Salix arctica* assessed by measurements and calculations of chlorophyll a fluorescence parameters from fluorescence transients. *Physiologia Plantarum* 124, 208-226.
- Alfonso, M., Yruela, I., Almárcegui, S., Torrado, E., Pérez, M. a, Picorel, R., 2001. Unusual tolerance to high temperatures in a new herbicide-resistant D1 mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell cultures deficient in fatty acid desaturation. *Planta* 212, 573-82.
- Allakhverdiev, S.I., Kreslavski, V.D., Klimov, V.V., Los, D. a, Carpentier, R., Mohanty, P., 2008. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis research* 98, 541-50.
- Allwood, J.W., Erban, A., de Koning, S., Dunn, W.B., Luedemann, A., Lommen, A., Kay, L., Löscher, R., Kopka, J., Goodacre, R., 2009. Inter-laboratory reproducibility of fast gas chromatography-electron impact-time of flight mass spectrometry (GC-EI-TOF/MS) based plant metabolomics. *Metabolomics* 5, 479-496.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, a a, Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25, 3389-402.
- Anderson, C.M., Kohorn, B.D., 2001. Inactivation of Arabidopsis SIP1 leads to reduced levels of sugars and drought tolerance. *Journal of Plant Physiology* 158, 1215-1219.
- Aniszewski, T., 2007. Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role, first edit. ed.
- Arimura, G.-ichiro, Ozawa, R., Kugimiya, S., Takabayashi, J., Bohlmann, J., 2004. Herbivore-Induced Defense Response in a Model Legume. Two-Spotted Spider Mites Induce Emission of (E) -b-Ocimene and Transcript Accumulation of (E) -b-Ocimene Synthase in *Lotus japonicus* 1. *Plant physiology* 135, 1976-1983.
- Aron, P.M., Kennedy, J., 2008. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular nutrition & food research* 52, 79-104.
- Asadulghani, Suzuki, Y., Nakamoto, H., 2003. Light plays a key role in the modulation of heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306, 872-879.
- Avigad, G., Dey, P., 1997. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates, in: Dey, P., Harborne, J.B. (Eds.), *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, pp. 143-204.

- Bachmann, M., Keller, F., 1995. Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of *Ajuga reptans* L. (Inter- and Intracellular Compartmentation). *Plant physiology* 109, 991-998.
- Bachmann, M., Matile, P., Keller, F., 1994. Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of *Ajuga reptans* L. (Cold Acclimation, Translocation, and Sink to Source Transition: Discovery of Chain Elongation Enzyme). *Plant physiology* 105, 1335-1345.
- Bais, A.J., Murphy, P.J., Dry, I.B., 2000. The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, 723-723.
- Baker, N.R., Nogués, S., Allen, D.J., 1997. Photosynthesis and photoinhibition, in: Lumsden, P.J. (Ed.), *Plants and UV-B: Responses to Environmental Change*. Cambridge University Press, pp. 95-111.
- Baniwal, S.K., Bharti, K., Chan, K.Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S., Mishra, S.K., Nover, L., Port, M., Scharf, K.-D., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D., von Koskull-Döring, P., 2004. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *Journal of biosciences* 29, 471-87.
- Banzet, N., Richaud, C., Deveaux, Y., Kazmaier, M., Gagnon, J., Triantaphylidès, C., 1998. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 13, 519-27.
- Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., Pellerin, P., 2000. Analysis of cell wall neutral sugar composition, Beta-galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant physiology and biochemistry* 38, 289-300.
- Barnes, P.W., Searles, P.S., Ballaré, C.L., Ryel, R.J., Caldwell, M.M., 2000. Non-invasive measurements of leaf epidermal transmittance of UV radiation using chlorophyll fluorescence: field and laboratory studies. *Physiologia Plantarum* 109, 274-283.
- Baroli, I., Niyogi, K.K., 2000. Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Philosophical transactions of The Royal Society* 355, 1385-1394.
- Bartels, D., Singh, M., Salamini, F., 1988. Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. *Planta* 175, 485-492.
- Barua, D., Downs, C.A., Heckathorn, S.A., 2003. Variation in chloroplast small heat-shock protein function is a major determinant of variation in thermotolerance of photosynthetic electron transport among ecotypes of *Chenopodium album*. *Functional Plant Biology* 30, 1071-1079.
- Baudry, A., Heim, M. a, Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B., Lepiniec, L., 2004. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal* 39, 366-80.
- Bauwe, H., Hagemann, M., Fernie, A.R., 2010. Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in plant science* 15, 330-6.
- Bavaresco, L., Fregoni, C., 2001. Physiological role and molecular aspects of grapevine stilbenic compounds, in: Roubelakis-Angelakis, K.A. (Ed.), *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*. pp. 153-182.
- Baxter, I.R., Young, J.C., Armstrong, G., Foster, N., Bogenschutz, N., Cordova, T., Peer, W.A., Hazen, S.P., Murphy, A.S., Harper, J.F., 2005. A plasma membrane H⁺-ATPase is required for the formation of proanthocyanidins in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2649-54.

- Berg, J.M., 1990. zinc Fingers and Other Metal-binding Domains. *The Journal of biological chemistry* 265, 6513-6516.
- van den Berg, R. a, Hoefsloot, H.C.J., Westerhuis, J. a, Smilde, A.K., van der Werf, M.J., 2006. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC genomics* 7, 142.
- Berli, F.J., Moreno, D., Piccoli, P., Hespanhol-Viana, L., Silva, M.F., Bressan-Smith, R., Cavagnaro, J.B., Bottini, R., 2010. Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant, cell & environment* 33, 1-10.
- Bewley, J.D., Black, M., 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. New York: Plenum Press.
- Bharti, K., Schmidt, E., Lyck, R., Heerklotz, D., Bublak, D., Scharf, K.D., 2000. Isolation and characterization of HsfA3, a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum*. *The Plant journal* 22, 355-65.
- Bieza, K., Lois, R., 2001. An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant physiology* 126, 1105-15.
- Bilger, W., Johnsen, T., Schreiber, U., 2001. UV-excited chlorophyll fluorescence as a tool for the assessment of UV-protection by the epidermis of plants. *Journal of experimental botany* 52, 2007-14.
- Blackman, S. a, Wettlaufer, S.H., Obendorf, R.L., Leopold, a C., 1991. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant physiology* 96, 868-74.
- Blum, A., 1988. *Plant Breeding for Stress Environments*. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida.
- Blöchl, A., Peterbauer, T., Richter, A., 2007. Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. *Journal of plant physiology* 164, 1093-6.
- Bogs, J., Downey, M.O., Harvey, J.S., Ashton, A.R., Tanner, G.J., Robinson, S.P., 2005. Proanthocyanidin Synthesis and Expression of Genes Encoding Leucoanthocyanidin Reductase and Anthocyanidin Reductase in Developing Grape Berries and Grapevine Leaves. *Plant physiology* 139, 652-663.
- Bogs, J., Ebadi, A., McDavid, D., Robinson, S.P., 2006. Identification of the Flavonoid Hydroxylases from Grapevine and Their Regulation during Fruit Development. *Plant physiology* 140, 279-291.
- Bogs, J., Jaffé, F.W., Takos, A.M., Walker, A.R., Robinson, S.P., 2007. The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant physiology* 143, 1347-61.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., Croteau, R., 1998. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4126-33.
- Bollina, V., Kumaraswamy, G.K., Kushalappa, A.C., Choo, T.M., Dion, Y., Rioux, S., Faubert, D., Hamzehzarghani, H., 2010. Mass spectrometry-based metabolomics application to identify quantitative resistance-related metabolites in barley against *Fusarium* head blight. *Molecular Plant Pathology* 11, 769-782.
- Booij-James, I.S., Dube, S.K., Jansen, M. a, Edelman, M., Mattoo, a K., 2000. Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in Arabidopsis mutants altered in phenolic metabolism. *Plant physiology* 124, 1275-84.

- Boss, P.K., Davies, C., 2001. Molecular biology of sugar and anthocyanin accumulation in grape berries, in: *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-33.
- Boss, P.K., Davies, C., Robinson, S.P., 1996. Analysis of the Expression of Anthocyanin Pathway Genes in Developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz Grape Berries and the Implications for Pathway Regulation. *Plant physiology* 111, 1059-1066.
- Boston, R.S., Viitanen, P.V., Vierling, E., 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant molecular biology* 32, 191-222.
- Bourquelot, H., Bridel, M., 1910. New sugar verbascose obtained from mullein root. *CR Acad. Sri.* 151, 760.
- Braun, R., Keller, F., 2000. Vacuolar chain elongation of raffinose oligosaccharides in *Ajuga reptans*. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, 743-746.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., 2000. Responses to abiotic stresses, in: Grissem, W., Buchanan, B., Jones, R. (Eds.), *Responses to Abiotic Stresses*. Rockville, pp. 1158-1249.
- Breitling, R., Armengaud, P., Amtmann, A., Herzyk, P., 2004. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS letters* 573, 83-92.
- Britt, A.B., 2004. Repair of DNA Damage Induced by Solar UV. *Photosynthesis Research* 81, 105-112.
- Bro, R., Smilde, A.K., 2003. Centering and scaling in component analysis. *Journal of Chemometrics* 17, 16-33.
- Brouillard, R., Dangles, O., 1993. Flavonoids and flower colour, in: Hall, C.& (Ed.), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. London.
- Brouillard, R., Dubois, J.E., 1977. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society* 99, 1359-1364.
- Bryant, G., Wolfe, J., 1989. Can hydration forces induce lateral phase separations in lamellar phases? *European biophysics journal: EBJ* 16, 369-74.
- Burchard, P., Bilger, W., Weissenböck, G., 2000. Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant, Cell and Environment* 23, 1373-1380.
- Busch, A., Rimbauld, B., Naumann, B., Rensch, S., Hippler, M., 2008. Ferritin is required for rapid remodeling of the photosynthetic apparatus and minimizes photo-oxidative stress in response to iron availability in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 55, 201-11.
- Busch, C., Hofmann, F., Selzer, J., Munro, S., Jeckel, D., Aktories, K., 1998. A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. *The Journal of biological chemistry* 273, 19566-72.
- Busch, W., Wunderlich, M., Schöffl, F., 2005. Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal* 41, 1-14.
- Bush, D.R., 1999. Amino Acid TRansport, in: Singh, B.K. (Ed.), *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. Dekker, M., New York, pp. 305-318.
- Calabrese, V., Scapagnini, G., Catalano, C., Bates, T.E., Dinotta, F., Micali, G., Giuffrida, S.A.M., 2001. Induction of heat shock protein synthesis in human skin fibroblasts in response to oxidative stress: regulation by a natural antioxidant from rosemary extract. *International journal of tissue reactions* 23, 51-58.
- Caldana, C., Degenkolbe, T., Cuadros-Inostroza, A., Klie, S., Sulpice, R., Leisse, A., Steinhauser, D., Fernie, A.R., Willmitzer, L., Hannah, M. a, 2011. High-density kinetic

- analysis of the metabolomic and transcriptomic response of Arabidopsis to eight environmental conditions. *The Plant journal* 869-884.
- Caldwell, M.M., Bornman, J.F., Ballaré, C.L., Flint, S.D., Kulandaivelu, G., 2007. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochemical & Photobiological Sciences* 6, 252-266.
- Camejo, D., 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology* 162, 281-289.
- Campbell, M.M., Sederoff, R.R., 1996. Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). *Plant physiology* 110, 3-13.
- Camps, C., 2008. Etude transcriptomique de la réponse de la Vigne (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) au champignon ascomycète vasculaire *Eutypa lata*, responsable de l'eutypiose. *Vitis*.
- Carbonneau, A., 2007. Théorie de la maturation et de la typicité du raisin. *Le Progrès agricole et viticole* 124, 275-284.
- Carmona, M.J., Chaïb, J., Martínez-Zapater, J.M., Thomas, M.R., 2008. A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of experimental botany* 59, 2579-96.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, a, Frisch, M., Bayerlein, M., Werner, T., 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21, 2933-42.
- Casati, P., Campi, M., Morrow, D.J., Fernandes, J.F., Walbot, V., 2011. Transcriptomic, proteomic and metabolomic analysis of UV-B signaling in maize. *BMC genomics* 12, 321.
- Castellarin, S.D., Di Gaspero, G., Marconi, R., Nonis, A., Peterlunger, E., Paillard, S., Adam-Blondon, A.-F., Testolin, R., 2006. Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC genomics* 7, 12.
- Celimene, C.C., Smith, D.R., Young, R. a, Stanosz, G.R., 2001. In vitro inhibition of *Sphaeropsis sapinea* by natural stilbenes. *Phytochemistry* 56, 161-5.
- Chalker-Scott, L., 2002. Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues? *Advances in Botanical Research* 37, 103-106.
- Champagnol, F., 1984. Eléments de physiologie de la Vigne et de viticulture générale, in: *Eléments de Physiologie de la Vigne et de Viticulture Générale*. p. 351.
- Charng, Y.-Y., Liu, H.-C., Liu, N.-Y., Chi, W.-T., Wang, C.-N., Chang, S.-H., Wang, T.-T., 2007. A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in Arabidopsis. *Plant physiology* 143, 251-62.
- Chen, J., Zhao, X., Fritsche, J., Yin, P., Schmitt-Kopplin, P., Wang, W., Lu, X., Häring, H.U., Schleicher, E.D., Lehmann, R., Xu, G., 2008. Practical approach for the identification and isomer elucidation of biomarkers detected in a metabolomic study for the discovery of individuals at risk for diabetes by integrating the chromatographic and mass spectrometric information. *Analytical chemistry* 80, 1280-1289.
- Chen, T.H.H., Shen, Z.Y., Lee, P.H., 1982. Adaptability of crop plants to high temperature stress. *Crop Science* 22, 719-725.
- Chervin, C., El-Kereamy, A., Roustan, J.-P., Latché, A., Lamon, J., Bouzayen, M., 2004. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science* 167, 1301-1305.

- Cheynier, V., Rigaud, J., 1986. Identification et dosage de flavonols du raisin, in: Proceedings of the 9th International Conference of Group Polyphenols. Royal Society of Chemistry, Montpellier, France.
- Chorti, E., Guidoni, S., Ferrandino, A., Novello, V., 2010. Effect of Different Cluster Sunlight Exposure Levels on Ripening and Anthocyanin Accumulation in Nebbiolo Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 61, 23-30.
- Cloarec, O., Dumas, M.E., Trygg, J., Craig, A., Barton, R.H., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Holmes, E., 2005. Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in 1H NMR spectroscopic metabonomic studies. *Analytical chemistry* 77, 517-26.
- Coelho, E., Rocha, S.M., Delgado, I., Coimbra, M.A., 2006. Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. "Baga" ripening. *Analytica chimica acta* 563, 204-214.
- Cohen, S.A., Michaud, D.P., 1993. Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and Its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino Acids via High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* 211, 279-287.
- Cohen, S.D., Tarara, J.M., Kennedy, J. a, 2008. Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism. *Analytica chimica acta* 621, 57-67.
- Cohen-Peer, R., Schuster, S., Meiri, D., Breiman, A., Avni, A., 2010. Sumoylation of Arabidopsis heat shock factor A2 (HsfA2) modifies its activity during acquired thermotolerance. *Plant molecular biology* 74, 33-45.
- Cominelli, E., Gusmaroli, G., Allegra, D., Galbiati, M., Wade, H.K., Jenkins, G.I., Tonelli, C., 2008. Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology* 165, 886-94.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., Gerós, H., 2007. Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. *Food*.
- Coombe, B.G., 1976. The Development of Fleshy Fruits. *Annual Review of Plant Physiology* 27, 507-28.
- Coombe, B.G., Hale, C.R., 1973. The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant physiology* 51, 629-34.
- Coombe, B.G., McCarthy, M.G., 2000. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6, 131-135.
- Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, a, Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R., Boulay, M., 2001. In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *Journal of experimental botany* 52, 901-10.
- Crafts-Brandner, S.J., Law, R.D., 2000. Effect of heat stress on the inhibition and recovery of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation state. *Planta* 212, 67-74.
- Cramer, G.R., Ergül, A., Grimplet, J., Tillett, R.L., Tattersall, E. a R., Bohlman, M.C., Vincent, D., Sonderegger, J., Evans, J., Osborne, C., Quilici, D., Schlauch, K. a, Schooley, D., Cushman, J.C., 2007. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional & integrative genomics* 7, 111-34.
- Cravero, M.C., Guidoni, S., Schneider, A., Distefano, R., 1994. Morphological and Biochemical Characterization of Colored Berry-Muscat Grapevine Cultivars. *Vitis* 33, 75-80.

- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural Products (Secondary Metabolites), in: Biochemistry and Molecular Biology of Plants.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M., 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. Annual review of physiology 60, 73-103.
- Culligan, K., Tissier, A., Britt, A., 2004. ATR Regulates a G2-Phase Cell-Cycle Checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. The Plant cell 16, 1091-1104.
- Culligan, K.M., Robertson, C.E., Foreman, J., Doerner, P., Britt, A.B., 2006. ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. The Plant journal 48, 947-61.
- Cybulski III, W.J., Peterjohn, W.T., 1999. Effects of ambient UV-B radiation on the above-ground biomass of seven temperate-zone plant species. Plant Ecology 145, 175-181.
- Czemmel, S., Stracke, R., Weisshaar, B., Cordon, N., Harris, N.N., Walker, A.R., Robinson, S.P., Bogs, J., 2009. The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYBF1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries. Plant Physiology 151, 1513-30.
- Dat, J., Foyer, C., Scott, I., 1998. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. Plant physiology 118, 1455-61.
- Dat, J., Lopez-Delgado, H., Foyer, C., Scott, I., 1998. Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. Plant Physiology 116, 1351-7.
- Dauelsberg, P., Matus, J.T., Poupin, M.J., Leiva-Ampuero, A., Godoy, F., Vega, A., Arce-Johnson, P., 2011. Effect of pollination and fertilization on the expression of genes related to floral transition, hormone synthesis and berry development in grapevine. Journal of plant physiology 168, 1667-1674.
- Day, T. a, Neale, P.J., 2002. Effects of UV-B Radiation on Terrestrial and Aquatic Primary Producers. Annual Review of Ecology and Systematics 33, 371-396.
- Debeaujon, I., Peeters, a J., Léon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M., 2001. The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. The Plant cell 13, 853-71.
- Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T., Carde, J.-P., Merillon, J.-M., Hamdi, S., 2006. Characterization of a Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor That Regulates the Phenylpropanoid Pathway. Plant Physiology 140, 499-511.
- Deluc, L., Bogs, J., Walker, A.R., Ferrier, T., Decendit, A., Merillon, J.-M., Robinson, S.P., Barrieu, F., 2008. The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. Plant physiology 147, 2041-53.
- Deluc, L.G., Grimplet, J., Wheatley, M.D., Tillett, R.L., Quilici, D.R., Osborne, C., Schooley, D. a, Schlauch, K. a, Cushman, J.C., Cramer, G.R., 2007. Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. BMC genomics 8, 429.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., 1992. PHOTOPROTECTION AND OTHER RESPONSES OF PLANTS TO HIGH LIGHT STRESS. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 43, 599-626.
- Dettmer, K., Aronov, P.A., Hammock, B.D., 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrometry Reviews 26, 51-78.
- Dettmer, K., Hammock, B.D., 2004. Metabolomics - A New Exciting Field within the "omics" Sciences. Environmental Health Perspectives 112, 396-397.
- Devic, M., Guillemintot, J., Debeaujon, I., Bechtold, N., Bensaude, E., Koornneef, M., Pelletier, G., Delseny, M., 1999. The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. The Plant journal 19, 387-98.

- Dey, P., 1990. Oligosaccharides, in: H, J.B. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, pp. 189-218.
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., Goloubinoff, P., 2001. Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *The Journal of biological chemistry* 276, 39586-91.
- Dierking, E.C., Bilyeu, K.D., 2009. Raffinose and stachyose metabolism are not required for efficient soybean seed germination. *Journal of plant physiology* 166, 1329-35.
- Dimitriadis, E., Williams, P.J., 1987. The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavorants of grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 35, 66-71.
- Dixon, R. a, Paiva, N.L., 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant cell* 7, 1085-1097.
- Dixon, R. a, Xie, D.-Y., Sharma, S.B., 2005. Proanthocyanidins--a final frontier in flavonoid research? *The New phytologist* 165, 9-28.
- Dokoozlian, N.K., 1996. Influence of Light on Grape Berry Growth and Composition Varies during Fruit Development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121, 869-874.
- Downey, M.O., Dokoozlian, N.K., Krstic, M.P., 2006. Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. *American Journal of Enology and Viticulture* 57, 257-268.
- Downey, M.O., Harvey, J.S., Robinson, S.P., 2003a. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9, 15-27.
- Downey, M.O., Harvey, J.S., Robinson, S.P., 2003b. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9, 110-121.
- Downie, B., Bewley, J.D., 2000. Soluble sugar content of white spruce (*Picea glauca*) seeds during and after germination. *Physiologia Plantarum* 110, 1-12.
- Downie, B., Gurusinge, S., Dahal, P., Thacker, R.R., Snyder, J.C., Nonogaki, H., Yim, K., Fukunaga, K., Alvarado, V., Bradford, K.J., 2003. Expression of a GALACTINOL SYNTHASE Gene in Tomato Seeds Is Up-Regulated before Maturation Desiccation and Again after Imbibition whenever Radicle Protrusion Is Prevented. *Plant Physiology* 131, 1347-1359.
- Du, H., Liang, Y., Pei, K., Ma, K., 2011. UV radiation-responsive proteins in rice leaves: a proteomic analysis. *Plant & cell physiology* 52, 306-16.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D.A., Orlova, I., 2006. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25, 417-440.
- Dunn, W.B., Broadhurst, D., Brown, M., Baker, P.N., Redman, C.W.G., Kenny, L.C., Kell, D.B., 2008. Metabolic profiling of serum using Ultra Performance Liquid Chromatography and the LTQ-Orbitrap mass spectrometry system. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 871, 288-98.
- D'Surney, S.J., Tschaplinski, T.J., Edwards, N.T., Shugart, L.R., 1993. Biological responses of two soybean cultivars exposed to enhanced UVB radiation. *Environmental and Experimental Botany* 33, 347-356.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32, 1792-7.
- El-Kereamy, A., Chervin, C., Roustan, J.-P., Cheynier, V., Souquet, J.-M., Moutounet, M., Raynal, J., Ford, C., Latche, A., Pech, J.-C., Bouzayen, M., 2003. Exogenous ethylene

- stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiologia Plantarum* 119, 175-182.
- Vom Endt, D., Kijne, J.W., Memelink, J., 2002. Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry* 61, 107-14.
- Fadzillah, N.M., Gilp, V., Finch, R.P., Burdon, R.H., 1996. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Planta* 199, 552-556.
- Ferrer, J.-L., Austin, M.B., Stewart, C., Noel, J.P., 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* 46, 356-70.
- Feussner, K., Feussner, I., Leopold, I., Wasternack, C., 1997. Isolation of a cDNA coding for an ubiquitin-conjugating enzyme UBC1 of tomato -- the first stress-induced UBC of higher plants. *FEBS letters* 409, 211-215.
- Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N., Willmitzer, L., 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature biotechnology* 18, 1157-61.
- Foley, R.C., Gao, L.-L., Spriggs, A., Soo, L.Y.C., Goggin, D.E., Smith, P.M.C., Atkins, C. a, Singh, K.B., 2011. Identification and characterisation of seed storage protein transcripts from *Lupinus angustifolius*. *BMC plant biology* 11, 59.
- Fong, R.A., Kepner, R.E., Webb, A.D., 1971. Acetic-acid-acylated anthocyanin pigments in the grape skins of a number of varieties of *Vitis vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture* 22, 150-155.
- Ford, C.M., Boss, P.K., Hoj, P.B., 1998. Cloning and characterization 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 vivo. *The Journal of biological chemistry* 273, 9224-33.
- Forkmann, G., Heller, W., Grisebach, H., 1980. Anthocyanin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana*. Flavanone 3- and flavonoid 3'-hydroxylases. *Zeitschrift für Naturforschung, Teil C* 35, 691-695.
- Froemel, S., Vlaming, P., Stotz, G., Wiering, H., Forkmann, G., Schram, a W., 1985. Genetic and biochemical studies on the conversion of flavanones to dihydroflavonols in flowers of *Petunia hybrida*. *Theoretical and Applied Genetics* 70, 561-568.
- Frohnmeier, H., Staiger, D., 2003. Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants . Balancing Damage and Protection. *Plant Physiology* 133, 1420-1428.
- Frydman, R.B., Neufeld, E.F., 1963. Synthesis of galactosylinositol by extracts from peas. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 12, 121-125.
- Fujibe, T., Saji, H., Arakawa, K., Yabe, N., Takeuchi, Y., Yamamoto, K.T., 2004. A Methyl Viologen-Resistant Mutant of *Arabidopsis* , Which Is Allelic to Ozone-Sensitive *rcd1* , Is Tolerant to Supplemental Ultraviolet-B Irradiation. *Plant physiology* 134, 275-285.
- Fujita, A., Goto-Yamamoto, N., Aramaki, I., Hashizume, K., 2006. Organ-specific transcription of putative flavonol synthase genes of grapevine and effects of plant hormones and shading on flavonol biosynthesis in grape berry skins. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 70, 632-8.
- Fujiwara, H., Tanaka, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Nakao, M., Fukui, Y., Yamaguchi, M., Ashikari, T., Kusumi, T., 1998. cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. *The Plant journal* 16, 421-31.
- Gagné, S., Saucier, C., Gény, L., 2006. Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 9465-71.

- Garcia, V., Bruchet, H., Comesca, D., Granier, F., Bouchez, D., Tissier, A., 2003. AtATM Is Essential for Meiosis and the Somatic Response to DNA Damage in Plants. *The Plant cell* 15, 119-132.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y.H., Zhang, J., 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* 5, R80.
- Giannuzzi, G., D'Addabbo, P., Gasparro, M., Martinelli, M., Carelli, F.N., Antonacci, D., Ventura, M., 2011. Analysis of high-identity segmental duplications in the grapevine genome. *BMC genomics* 12, 436.
- Giordano, C.V., Galatro, a, Puntarulo, S., Ballaré, C.L., 2004. The inhibitory effects of UV-B radiation (280-315 nm) on *Gunnera magellanica* growth correlate with increased DNA damage but not with oxidative damage to lipids. *Plant, Cell & Environment* 27, 1415-1423.
- Giri, S., Krausz, K.W., Idle, J.R., Gonzalez, F.J., 2007. The metabolomics of (+/-)-arecoline 1-oxide in the mouse and its formation by human flavin-containing monooxygenases. *Biochemical pharmacology* 73, 561-73.
- Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N., Ageorges, A., 2011. In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *The Plant journal* 67, 960-70.
- Gomez, C., Terrier, N., Torregrosa, L., Vialet, S., Fournier-Level, A., Verriès, C., Souquet, J.-M., Mazauric, J.-P., Klein, M., Cheynier, V., Ageorges, A., 2009. Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters. *Plant physiology* 150, 402-15.
- Gong, M., Luit, A. van der, Knight, M.R., Trewavas, A.J., 1998. Heat-Shock-Induced Changes in Intracellular Ca²⁺ Level in Tobacco Seedlings in Relation to Thermotolerance. *Plant Physiology* 116, 429-437.
- Gonzalez, A., Zhao, M., Leavitt, J.M., Lloyd, A.M., 2008. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings. *The Plant journal* 53, 814-27.
- Goodacre, R., York, E.V., Heald, J.K., Scott, I.M., 2003. Chemometric discrimination of unfractionated plant extracts analyzed by electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry* 62, 859-863.
- Goodman, C.D., Casati, P., Walbot, V., 2004. A Multidrug Resistance – Associated Protein Involved in Anthocyanin Transport in *Zea mays*. *The Plant Cell* 16, 1812-1826.
- Granger, J.H., Williams, R., Lenz, E.M., Plumb, R.S., Stumpf, C.L., Wilson, I.D., 2007. A metabonomic study of strain- and age-related differences in the Zucker rat. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21, 2039-2045.
- Grant, T.N., Dami, I.E., Ji, T., Scurlock, D., Streeter, J., 2009. Variation in leaf and bud soluble sugar concentration among *Vitis* genotypes grown under two temperature regimes. *Canadian Journal of Plant Science*.
- Greenberg, B.M., 1997. The effects of ultraviolet-B radiation on higher plants, in: Wang, W., Gorsuch, J., Hughes, J.S. (Eds.), *Plants For Environmental Studies*. pp. 1-35.
- Greutert, H., Keller, F., 1993. Further Evidence for Stachyose and Sucrose/H⁺ Antiporters on the Tonoplast of Japanese Artichoke (*Stachys sieboldii*) Tubers. *Plant Physiology* 101, 1317-1322.
- Grotewold, E., 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual review of plant biology* 57, 761-80.

- Guerineau, F., Benjdia, M., Zhou, D.X., 2003. A jasmonate-responsive element within the *A. thaliana* vsp1 promoter. *Journal of Experimental Botany* 54, 1153-1162.
- Gunata, Z.Y., Bayonove, C.L., Baumes, R.L., Cordonnier, R.E., 1985. The aroma of grapes. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma composants. *Journal of chromatography* 331, 83-90.
- Guo, J., Wu, J., Ji, Q., Wang, C., Luo, L., Yuan, Y., Wang, Y., Wang, J., 2008. Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and Arabidopsis. *Journal of genetics and genomics* 35, 105-18.
- Haldimann, P., Feller, U., 2005. Growth at moderately elevated temperature alters the physiological response of the photosynthetic apparatus to heat stress in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Plant, Cell and Environment* 28, 302-317.
- Halket, J.M., Waterman, D., Przyborowska, A.M., Patel, R.K.P., Fraser, P.D., Bramley, P.M., 2005. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of experimental botany* 56, 219-43.
- Halpin, C., Knight, M.E., Foxon, G.A., Campbell, M.M., Boudet, A.M., Boon, J.J., Chabbert, B., Tollier, M., Schuch, W., 1994. Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *The Plant Journal* 6, 339-350.
- Hamman Jr, R.A., Dami, I.E., Walsh, T.M., Stushnoff, C., 1996. Seasonal Carbohydrate Changes and Cold Hardiness of Chardonnay and Riesling Grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 31-36.
- Hanana, M., Deluc, L., Fouquet, R., Daldoul, S., Léon, C., Barrieu, F., Ghorbel, A., Mliki, A., Hamdi, S., 2008. Identification and characterization of “rd22” dehydration responsive gene in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Comptes rendus biologiques* 331, 569-78.
- Hanson, J., Smeekens, S., 2009. Sugar perception and signaling--an update. *Current opinion in plant biology* 12, 562-7.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2001. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports* 18, 310-333.
- Hardie, W., O'Brien, T., Audzems, J., 1996. Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape. *Australian Journal Of Grape And Wine Research* 2, 97-142.
- Hare, P.D., Cress, W. a, Van Staden, J., 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* 21, 535-553.
- Hartl, U.F., 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-580.
- Hartmann, U., Sagasser, M., Mehrrens, F., Stracke, R., Weisshaar, B., 2005. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant molecular biology* 57, 155-71.
- Havaux, M., 1992. Stress Tolerance of Photosystem II in Vivo: Antagonistic Effects of Water, Heat, and Photoinhibition Stresses. *Plant physiology* 100, 424-32.
- Havaux, M., 1998. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in plant science* 3, 147-151.
- Hecht, V., Knowles, C.L., Vander Schoor, J.K., Liew, L.C., Jones, S.E., Lambert, M.J.M., Weller, J.L., 2007. Pea LATE BLOOMER1 is a GIGANTEA ortholog with roles in photoperiodic flowering, deetiolation, and transcriptional regulation of circadian clock gene homologs. *Plant physiology* 144, 648-61.
- Heerklotz, D., Döring, P., Bonzelius, F., Winkelhaus, S., Nover, L., 2001. The Balance of Nuclear Import and Export Determines the Intracellular Distribution and Function of

- Tomato Heat Stress Transcription Factor HsfA2. *Molecular and cellular biology* 21, 1759-1768.
- Heller, W., Forkmann, G., 1988. Biosynthesis of flavonoids, in: Hall, C.& (Ed.), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*. London, pp. 399-425.
- Hichri, I., Heppel, S.C., Pillet, J., Léon, C., Czemmél, S., Delrot, S., Lauvergeat, V., Bogs, J., 2010. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor MYC1 Is Involved in the Regulation of the Flavonoid Biosynthesis Pathway in Grapevine. *Molecular plant* 3, 509-23.
- Hoch, G., Peterbauer, T., Richter, a, 1999. Purification and characterization of stachyose synthase from lentil (*Lens culinaris*) seeds: galactopinitol and stachyose synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* 366, 75-81.
- Hong, S.-whan, Lee, U., Vierling, E., 2003. Arabidopsis hot Mutants Define Multiple Functions Required for Acclimation to High Temperatures. *Plant Physiology* 132, 757-767.
- Hong, S.W., Vierling, E., 2000. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4392-7.
- Hopf, N., Plesofsky-Vig, N., Brambl, R., 1992. The heat shock response of pollen and other tissues of maize. *Plant molecular biology* 19, 623-30.
- Horbowicz, M., Brenac, P., Obendorf, R.L., 1998. Fagopyritol B1, O- α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-chiro-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. *Planta* 205, 1-11.
- Horbowicz, M., Obendorf, R.L., 1994. Seed desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols— review and survey. *Seed Science Research* 4, 385-405.
- Horton, P., 2002. Crop Improvement Through Alteration In The Photosynthetic Membrane. *ISB News Report* 1-3.
- Howarth, C.J., 2005. Genetic improvements of tolerance to high temperature, in: Ashraf, M., Harris, P.J.C. (Eds.), *Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches*. Howarth Press Inc., New York.
- Hrazdina, G., Parsons, G.F., Mattick, L.R., 1984. Physiological and Biochemical Events During Development and Maturation of Grape Berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 35, 220-227.
- Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham Cooks, R., 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of mass spectrometry* 40, 430-43.
- Huang, J., Tang, D., Shen, Y., Qin, B., Hong, L., You, A., Li, M., Wang, X., Yu, H., Gu, M., Cheng, Z., 2010. Activation of gibberellin 2-oxidase 6 decreases active gibberellin levels and creates a dominant semi-dwarf phenotype in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of genetics and genomics* 37, 23-36.
- Huglin, P., Schneider, C., 1998. *Biologie et écologie de la Vigne*. 2e édition, Lavoisier., ed.
- Hugueney, P., Provenzano, S., Verriès, C., Ferrandino, A., Meudec, E., Batelli, G., Merdinoglu, D., Cheynier, V., Schubert, A., Ageorges, A., 2009. A novel cation-dependent O-methyltransferase involved in anthocyanin methylation in grapevine. *Plant physiology* 150, 2057-70.
- Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I., Tanaka, K., 2003. The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *The EMBO journal* 22, 3557-67.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., *et al.*, 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449, 463-7.

- Jarillo, J. a, Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Cashmore, a R., 2001. Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 410, 952-4.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., Adrian, M., 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 2731-41.
- Jeong, S., 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* 167, 247-252.
- Jiang, Y., Huang, B., 2001. Plants and the environment. Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. *Journal of experimental botany* 52, 341-349.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, a, Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., Martin, C., 2000. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis. *The EMBO journal* 19, 6150-61.
- Joazeiro, C. a, Weissman, a M., 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-52.
- Johnson, H.E., Broadhurst, D., Goodacre, R., Smith, A.R., 2003. Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Phytochemistry* 62, 919-928.
- Jonsson, L.M., Donker-Koopman, W.E., Uitslager, P., Schram, a W., 1983. Subcellular Localization of Anthocyanin Methyltransferase in Flowers of *Petunia hybrida*. *Plant Physiology* 72, 287-90.
- Joscelyne, V.L., Downey, M.O., Mazza, M., Bastian, S.E.P., 2007. Partial shading of Cabernet Sauvignon and Shiraz vines altered wine color and mouthfeel attributes, but increased exposure had little impact. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 10888-96.
- Joshi, C.P., Chiang, V.L., 1998. Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant molecular biology* 37, 663-74.
- Jørgensen, K., Rasmussen, A.V., Morant, M., Nielsen, A.H., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Bak, S., Møller, B.L., 2005. Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Current opinion in plant biology* 8, 280-91.
- Kanehisa, M., Goto, S., 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 28, 27-30.
- Kang, H.C., Lee, S.H., 2001. Characteristics of an alpha-galactosidase associated with grape flesh. *Phytochemistry* 58, 213-9.
- Kao, W.-Y., Forseth, I.N., 1992. Responses of gas exchange and phototropic leaf orientation in soybean to soil water availability, leaf water potential, air temperature, and photosynthetic photon flux. *Environmental and Experimental Botany* 32, 153-161.
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D.W., Zhao, W., Schiller, K.C., Gatzke, N., Sung, D.Y., Guy, C.L., 2004. Exploring the Temperature-Stress Metabolome. *Plant Physiology* 136, 4159-4168.
- Kaplan, F., Kopka, J., Sung, D.Y., Zhao, W., Popp, M., Porat, R., Guy, C.L., 2007. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *The Plant journal* 50, 967-81.
- Kappel, C.D., 2010. Biologie intégrative du métabolisme de la baie de raisin. Thèse, Université de Bordeaux 2.
- Kasahara, M., Swartz, T.E., Olney, M.A., Onodera, A., Mochizuki, N., Fukuzawa, H., Asamizu, E., Tabata, S., Kanegae, H., Takano, M., Christie, J.M., Nagatani, A., Briggs,

- W.R., 2002. Photochemical Properties of the Flavin Mononucleotide- Binding Domains of the Phototropins from Arabidopsis , Rice , and Chlamydomonas reinhardtii. *Plant physiology* 129, 762-773.
- Kataoka, I., Sugiyama, A., Beppu, K., 2003. Role of Ultraviolet Radiation in Accumulation of Anthocyanin in Berries of “Gros Colman” Grapes (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Japanese Society for Horticultural Science* 72, 1-6.
- Keller, F., 1992a. Galactinol Synthase is an Extravacuolar Enzyme in Tubers of Artichoke (*Stachys sieboldii*). *Plant physiology* 99, 1251-1253.
- Keller, F., 1992b. Transport of Stachyose and Sucrose by Vacuoles of Japanese Artichoke (*Stachys sieboldii*) Tubers. *Plant physiology* 98, 442-5.
- Keller, F., Pharr, D.M., 1996. Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosylsucrose oligosaccharides, in: Zamski, E., Schaffer, A.A. (Eds.), *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-sink Relationships*. Dekker, M., New York, pp. 157-183.
- Kennedy, B.Y.J., 2002. Understanding grape berry development. *Practical Winery & Vineyard*.
- Kennedy, J. a, Matthews, M. a, Waterhouse, a L., 2000. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 55, 77-85.
- Kiegerl, S., Cardinale, F., Siligan, C., Gross, a, Baudouin, E., Liwosz, a, Eklöf, S., Till, S., Bögre, L., Hirt, H., Meskiene, I., 2000. SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *The Plant cell* 12, 2247-58.
- Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte, R., 2011. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends in biotechnology* 29, 267-75.
- Kim, M.S., Cho, S.M., Kang, E.Y., Im, Y.J., Hwangbo, H., Kim, Y.C., Ryu, C.-M., Yang, K.Y., Chung, G.C., Cho, B.H., 2008. Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. *Molecular plant-microbe interactions* 21, 1643-53.
- Kingdon, K.H., 1923. A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. *Physical Review* 21, 408-418.
- Kinnersley, A.M., Turano, F.J., 2000. Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Plant Responses to Stress. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19, 479-509.
- Kishor, P.B.K., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N., 2005. Regulation of proline biosynthesis , degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88, 424-438.
- Kitamura, S., 2006. Transport of Flavonoids: From Cytosolic Synthesis to Vacuolar Accumulation, in: *The Science of Flavonoids*. pp. 123-146.
- Kitamura, S., Shikazono, N., Tanaka, A., 2004. TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in Arabidopsis. *The Plant Journal* 37, 104-114.
- Kliwer, W.M., 1966. Sugars and Organic Acids of *Vitis vinifera*. *Plant Physiology* 41, 923-31.
- Knaupp, M., Mishra, K.B., Nedbal, L., Heyer, A.G., 2011. Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze-thaw cycles. *Planta* 477-486.
- Kobayashi, S., Goto-yamamoto, N., Hirochika, H., 2004. Mutations in Grape Skin Color. *Science* 304, 982.
- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Ding, C.K., Yakushiji, H., Goto, N., 2001. Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white

- grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant science* (Shannon, Ireland) 160, 543-550.
- Kolb, C. a, Pfundel, E.E., 2005. Origins of non-linear and dissimilar relationships between epidermal UV absorbance and UV absorbance of extracted phenolics in leaves of grapevine and barley. *Plant, Cell and Environment* 28, 580-590.
- Kong, J., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64, 923-933.
- Korotaeva, N.E., Antipina, A.I., Grabelynch, O.I., Varakina, N.N., Borovskii, G.B., Voinikov, V.K., 2001. Mitochondrial low-molecular-weight heat shock proteins and tolerance of crop plant's mitochondria to hyperthermia. *Fiziol. Biokhim Kul'turn. Rasten* 29, 271-276.
- von Koskull-Döring, P., Scharf, K.-D., Nover, L., 2007. The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in plant science* 12, 452-7.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., Scharf, K.-D., 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current opinion in plant biology* 10, 310-6.
- Kotiguda, G., Peterbauer, T., Mulimani, V.H., 2006. Isolation and structural analysis of ajugose from *Vigna mungo* L. *Carbohydrate research* 341, 2156-60.
- Koukol, J., Conn, E.E., 1961. the Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants. *The Journal of Biological Chemistry* 236, 2692-2698.
- Kovács, E., van der Vies, S.M., Glatz, a, Török, Z., Varvasovszki, V., Horváth, I., Vígh, L., 2001. The chaperonins of *Synechocystis* PCC 6803 differ in heat inducibility and chaperone activity. *Biochemical and biophysical research communications* 289, 908-15.
- Kramer, G.F., Norman, H.A., Krizek, D.T., Mirecki, R.M., 1991. influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry* 30, 2101-2108.
- Krause, G., Schmude, C., Garden, H., Koroleva, O., Winter, K., 1999. Effects of solar ultraviolet radiation on the potential efficiency of photosystem II in leaves of tropical plants. *Plant Physiology* 121, 1349-58.
- Krishna, P., 2004. Plant Responses to Heat Stress, in: Hirt, H., Shinozaki, K. (Eds.), *Plant Responses to Abiotic Stress*. pp. 73-102.
- Krishnan, P., Kruger, N.J., Ratcliffe, R.G., 2005. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of experimental botany* 56, 255-65.
- Krizek, D.T., Britz, S.J., Mirecki, R.M., 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. *Physiologia plantarum* 103, 1-7.
- Krizek, D.T., Mirecki, R.M., Britz, S.J., 1997. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cucumber. *Physiologia plantarum* 100, 886-893.
- Krupková, E., Immerzeel, P., Pauly, M., Schmülling, T., 2007. The TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT2 gene of *Arabidopsis* encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development. *The Plant journal* 50, 735-50.
- Kucera, B., Leubner-metzger, G., Wellmann, E., 2003. Distinct Ultraviolet-Signaling Pathways in Bean Leaves . DNA Damage Is Associated with B-1,3-Glucanase Gene Induction , But Not with Flavonoid Formation. *Plant Physiology* 133, 1445-1452.
- Kultz, D., 2003. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *Journal of Experimental Biology* 206, 3119-3124.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K., 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics* 9, 299-306.

- Kusano, M., Fukushima, A., Redestig, H., Saito, K., 2011. Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. *Journal of experimental botany* 62, 1439-53.
- Landry, L.G., Chapple, C.C., Last, R.L., 1995. Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant physiology* 109, 1159-66.
- Larkindale, J., Huang, B., 2004. Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *Journal of plant physiology* 161, 405-13.
- Larkindale, J., Knight, M.R., 2002. Protection against Heat Stress-Induced Oxidative Damage in Arabidopsis Involves Calcium , Abscisic Acid , Ethylene , and Salicylic Acid. *Plant Physiology* 128, 682-695.
- Larsen, E.S., Alfenito, M.R., Briggs, W.R., Walbot, V., 2003. A carnation anthocyanin mutant is complemented by the glutathione S-transferases encoded by maize Bz2 and petunia An9. *Plant cell reports* 21, 900-4.
- Law, R., Crafts-Brandner, S., 1999. Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Plant Physiology* 120, 173-82.
- Lecourieux, F., Lecourieux, D., Vignault, C., Delrot, S., 2010. A sugar-inducible protein kinase, VvSK1, regulates hexose transport and sugar accumulation in grapevine cells. *Plant Physiology* 152, 1096-106.
- Lee, B.H., Won, S.H., Lee, H.S., Miyao, M., Chung, W.I., Kim, I.J., Jo, J., 2000. Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice. *Gene* 245, 283-90.
- Lee, J.H., Hübel, a, Schöffl, F., 1995. Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic Arabidopsis. *The Plant journal* 8, 603-12.
- Lee, S.H., Lee, M.H., Chung, W.I., Liu, J.R., 1998. WAPK, a Ser/Thr protein kinase gene of *Nicotiana tabacum*, is uniquely regulated by wounding, abscisic acid and methyl jasmonate. *Molecular & general genetics* 259, 516-22.
- Lee, Y.W., Jin, S., Sim, W.S., Nester, E.W., 1995. Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 12245-9.
- Lehle, L., Tanner, W., 1973. The function of myo-inositol in the biosynthesis of raffinose. Purification and characterization of galactinol:sucrose 6-galactosyltransferase from *Vicia faba* seeds. *European journal of biochemistry / FEBS* 38, 103-10.
- Lemoine, S., Combes, F., Servant, N., Le Crom, S., 2006. Goulphar: rapid access and expertise for standard two-color microarray normalization methods. *BMC bioinformatics* 7, 467.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., Caboche, M., 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual review of plant biology* 57, 405-30.
- Li, S., Li, T., Kim, W.-D., Kitaoka, M., Yoshida, S., Nakajima, M., Kobayashi, H., 2007. Characterization of raffinose synthase from rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare). *Biotechnology letters* 29, 635-40.
- Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y., Dong, X., 1999. Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SN11, through a screen for suppressors of npr1-1. *Cell* 98, 329-39.

- Li, X., Zhuo, J., Jing, Y., Liu, X., Wang, X., 2011. Expression of a GALACTINOL SYNTHASE gene is positively associated with desiccation tolerance of *Brassica napus* seeds during development. *Journal of plant physiology* 168, 1761-70.
- Lin, Y.-X., Jiang, H.-Y., Chu, Z.-X., Tang, X.-L., Zhu, S.-W., Cheng, B.-J., 2011. Genome-wide identification, classification and analysis of heat shock transcription factor family in maize. *BMC genomics* 12, 76.
- Lisso, J., Steinhäuser, D., Altmann, T., Kopka, J., Müssig, C., 2005. Identification of brassinosteroid-related genes by means of transcript co-response analyses. *Nucleic acids research* 33, 2685-96.
- Liu, H.-T., Gao, F., Li, G.-L., Han, J.-L., Liu, D.-L., Sun, D.-Y., Zhou, R.-G., 2008. The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat-shock signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal* 55, 760-73.
- Liu, J., 1998. Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. *Plant Science* 134, 11-20.
- Liu, J.J., Odegard, W., de Lumen, B.O., 1995. Galactinol synthase from kidney bean cotyledon and zucchini leaf. Purification and N-terminal sequences. *Plant physiology* 109, 505-11.
- Liu, X., Huang, B., 2000. Heat Stress Injury in Relation to Membrane Lipid Peroxidation in Creeping Bentgrass. *Crop Science* 40, 503-510.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25, 402-8.
- Loewus, F., Murthy, P.P.N., 2000. myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Science* 150, 1-19.
- Loiseau, D., 1876. Correspondenzen von A. Henninger aus Paris, 9. Mai 1876 (Akademie, Sitzung vom 1. Mai). *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 9, 732.
- Loreto, F., Forster, a, Durr, M., Csiky, O., Seufert, G., 1998. On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus ilex* L. fumigated with selected monoterpenes. *Plant, Cell and Environment* 21, 101-107.
- Luan, F., Hampel, D., Mosandl, A., Wüst, M., 2004. Enantioselective analysis of free and glycosidically bound monoterpene polyols in *Vitis vinifera* L. cvs. Morio Muscat and Muscat Ottonel: evidence for an oxidative monoterpene metabolism in grapes. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 2036-41.
- Ma, C., Wang, H., Lu, X., Wang, H., Xu, G., Liu, B., 2009. Terpenoid metabolic profiling analysis of transgenic *Artemisia annua* L. by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Metabolomics* 5, 497-506.
- Machado, S., Paulsen, G.M., 2001. Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum. *Plant and Soil* 233, 179-187.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux.
- Madalinski, G., Godat, E., Alves, S., Lesage, D., Genin, E., Levi, P., Labarre, J., Tabet, J.-C., Ezan, E., Junot, C., 2008. Direct introduction of biological samples into a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer as a tool for fast metabolome analysis. *Analytical chemistry* 80, 3291-303.
- Madronich, S., McKenzie, R.L., Björn, L.O., Caldwell, M.M., 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 46, 5-19.
- Makarov, a, 2000. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical chemistry* 72, 1156-62.

- Markstädter, C., Queck, I., Baumeister, J., Riederer, M., Schreiber, U., Bilger, W., 2001. Epidermal transmittance of leaves of *Vicia faba* for UV radiation as determined by two different methods. *Photosynthesis research* 67, 17-25.
- Marles, M., Ray, H., Gruber, M., 2003. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry* 64, 367-383.
- Marrs, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M., Walbot, V., 1995. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature* 375, 397-400.
- Martens, S., 2002. Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants. *FEBS Letters* 531, 453-458.
- Martin-Cabrejas, Maria, A., Diaz, M.F., Aguilera, Y., Benitez, V., Molla, E., Esteban, R.M., 2008. Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. *Food Chemistry* 107, 1045-1052.
- Martineau, K.B., Specht, J.E., Williams, J.H., Sullivan, C.Y., 1979. Temperature tolerance in soybean. I. Evaluation of technique for assessing cellular membrane thermostability. *Crop Science* 19, 75-78.
- Maruyama, K., Takeda, M., Kidokoro, S., Yamada, K., Sakuma, Y., Urano, K., Fujita, M., Yoshiwara, K., Matsukura, S., Morishita, Y., Sasaki, R., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2009. Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant physiology* 150, 1972-80.
- Mateo, J.J., Jiménez, M., 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of chromatography. A* 881, 557-67.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R., 2006. Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 7692-702.
- Matus, J.T., Loyola, R., Vega, A., Peña-Neira, A., Bordeu, E., Arce-Johnson, P., Alcalde, J.A., 2009. Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *Journal of experimental botany* 60, 853-67.
- Matus, J.T., Poupin, M.J., Cañón, P., Bordeu, E., Alcalde, J. a, Arce-Johnson, P., 2010. Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant molecular biology* 72, 607-20.
- Maurizi, M.R., Xia, D., 2004. Protein binding and disruption by Clp/Hsp100 chaperones. *Structure (London, England: 1993)* 12, 175-83.
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences* 62, 670-84.
- Mazorra, L.M., Nunez, M., Hechavarria, M., Coll, F., Sanchez-Blanco, M.J., 2002. Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. *Biologia Plantarum* 45, 593-596.
- Mazza, C. a, Boccacandro, H.E., Giordano, C.V., Battista, D., Scopel, a L., Ballaré, C.L., 2000. Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant physiology* 122, 117-26.
- McEvoy, J.P., Brudvig, G.W., 2006. Water-splitting chemistry of photosystem II. *Chemical reviews* 106, 4455-83.
- Memon, A.R., Schröder, P., 2009. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental science and pollution research international* 16, 162-75.
- Menting, J.C.T., Scopes, R.K., Stevenson, T.W., 1994. Microsomal Membrane Fraction of *Petunia hybrida* Flowers. *Plant physiology* 106, 633-642.

- Miroshnichenko, S., Tripp, J., Nieden, U.Z., Neumann, D., Conrad, U., Manteuffel, R., 2005. Immunomodulation of function of small heat shock proteins prevents their assembly into heat stress granules and results in cell death at sublethal temperatures. *The Plant journal* 41, 269-81.
- Mitsuhashi, N., Hayashi, Y., Koumoto, Y., Shimada, T., Fukasawa-Akada, T., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., 2001. A novel membrane protein that is transported to protein storage vacuoles via precursor-accumulating vesicles. *The Plant cell* 13, 2361-72.
- Mittler, R., 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science* 11, 15-9.
- Moco, S., Bino, R.J., Vorst, O., Verhoeven, H.A., Groot, J.D., Beek, T.A.V., Vervoort, J., Vos, C.H.R.D., 2006. A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolome Database for Tomato. *Plant physiology* 141, 1205-1218.
- Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwülbecke, S., Vierling, E., Bukau, B., 2003. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Molecular Microbiology* 50, 585-595.
- Mogk, A., Schlieker, C., Friedrich, K.L., Schönfeld, H.-J., Vierling, E., Bukau, B., 2003. Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *The Journal of biological chemistry* 278, 31033-42.
- Mol, J., Grotewold, E., Koes, R., 1998. How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* 3, 212-217.
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., Hashizume, K., 2007. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of experimental botany* 58, 1935-45.
- Mori, K., Sugaya, S., Gemma, H., 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* 105, 319-330.
- Moustafa, E., Wong, E., 1967. Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed. *Phytochemistry* 6, 625-632.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et biophysica acta* 1767, 414-21.
- Nakamoto, H., Hiyama, T., 1999. Heat-shock proteins and temperature stress, in: Pessarakli, M. (Ed.), *Handbook of Plant and Crop Stress*. Marcel Dekker, New York, pp. 399-416.
- Neus, J.D., Fehr, W.R., Schnebly, S.R., 2005. Agronomic and Seed Characteristics of Soybean with Reduced Raffinose and Stachyose. *Crop Science* 45, 589-592.
- Nieto-sotelo, J., Martínez, L.M., Ponce, G., Cassab, G.I., Alagón, A., Meeley, R.B., Ribaut, J.-marcel, Yang, R., 2002. Maize HSP101 Plays Important Roles in Both Induced and Basal Thermotolerance and Primary Root Growth. *The Plant Cell* 14, 1621-1633.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Murata, N., 2006. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et biophysica acta* 1757, 742-9.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Shigeoka, S., 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant physiology* 147, 1251-63.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Yoshida, E., Maruta, T., Yoshimura, K., Shigeoka, S., 2006. Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *The Plant journal* 48, 535-47.
- Nishizawa-Yokoi, A., Nosaka, R., Hayashi, H., Tainaka, H., Maruta, T., Tamoi, M., Ikeda, M., Ohme-Takagi, M., Yoshimura, K., Yabuta, Y., Shigeoka, S., 2011. HsfA1d and HsfA1e involved in the transcriptional regulation of HsfA2 function as key regulators for the Hsf signaling network in response to environmental stress. *Plant & cell physiology* 52, 933-45.

- Nishizawa-Yokoi, A., Yoshida, E., Yabuta, Y., Shigeoka, S., 2009. Analysis of the Regulation of Target Genes by an Arabidopsis Heat Shock Transcription Factor, HsfA2. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73, 890-895.
- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S.K., Ganguli, a, Scharf, K.D., 2001. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell stress & chaperones* 6, 177-89.
- Novikov, E., Barillot, E., 2007. Software package for automatic microarray image analysis (MAIA). *Bioinformatics* 23, 639-40.
- Obendorf, R.L., 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7, 63-74.
- Obendorf, R.L., Zimmerman, A.D., Zhang, Q., Castillo, A., Kosina, S.M., Bryant, E.G., Sensenig, E.M., Wu, J., Schnebly, S.R., 2009. Accumulation of Soluble Carbohydrates during Seed Development and Maturation of Low-Raffinose, Low-Stachyose Soybean. *Crop Science* 49, 329.
- Oelze, M.-L., Kandlbinder, A., Dietz, K.-J., 2008. Redox regulation and overreduction control in the photosynthesizing cell: complexity in redox regulatory networks. *Biochimica et biophysica acta* 1780, 1261-72.
- Ohnishi, N., Allakhverdiev, S.I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y., Murata, N., 2005. Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry* 44, 8494-9.
- Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B., Baganz, F., 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in biotechnology* 16, 373-8.
- Ollat, N., Gaudillere, J.-P., 1998. The Effect of Limiting Leaf Area During Stage I of Berry Growth on Development and Composition of Berries of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 251-258.
- Pal, M., Sharma, A., Abrol, Y.P., Sengupta, U.K., 1997. Exclusion of UV-B radiation from normal solar spectrum on growth of mung bean and maize. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 61, 29-34.
- Pan, W., 2002. A comparative review of statistical methods for discovering differentially expressed genes in replicated microarray experiments. *Bioinformatics* 18, 546-554.
- Panikulangara, T.J., Eggers-schumacher, G., Wunderlich, M., Stransky, H., Schöfl, F., 2004. Galactinol synthase1 . A Novel Heat Shock Factor Target Gene Responsible for Heat-Induced Synthesis of Raffinose Family Oligosaccharides in Arabidopsis. *Plant physiology* 136, 3148-3158.
- Parker, T.L., Wang, X.-H., Pazmiño, J., Engeseth, N.J., 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of grapes, sun-dried raisins, and golden raisins and their effect on ex vivo serum antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 8472-7.
- Pastenes, C., Horton, P., 1996. Effect of High Temperature on Photosynthesis in Beans (I. Oxygen Evolution and Chlorophyll Fluorescence). *Plant physiology* 112, 1245-1251.
- Pelletier, M.K., Murrell, J.R., Shirley, B.W., 1997. Characterization of Flavonol Synthase and Leucoanthocyanidin Dioxygenase Genes in Arabidopsis. *Plant physiology* 113, 1437-1445.
- Pelletier, M.K., Shirley, B.W., 1996. Analysis of flavanone 3-hydroxylase in Arabidopsis seedlings. Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase. *Plant physiology* 111, 339-45.
- Pereira, G.E., Gaudillere, J.-P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, a, Rolin, D., 2006. Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 6765-75.

- Peterbauer, T., Lahuta, L.B., Blo, A., Mucha, J., Jones, D.A., Hedley, C.L., Go, R.J., Richter, A., 2001. Analysis of the Raffinose Family Oligosaccharide Pathway in Pea Seeds with Contrasting Carbohydrate Composition. *Plant physiology* 127, 1764-1772.
- Peterbauer, T., Mach, L., Mucha, J., Richter, A., 2002. Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis. *Planta* 215, 839-46.
- Peterbauer, T., Mucha, J., Mach, L., Richter, A., 2002. Chain Elongation of raffinose in pea seeds. Isolation, characterization, and molecular cloning of multifunctional enzyme catalyzing the synthesis of stachyose and verbascose. *The Journal of biological chemistry* 277, 194-200.
- Peterbauer, T., Mucha, J., Mayer, U., Popp, M., Glössl, J., Richter, a, 1999. Stachyose synthesis in seeds of adzuki bean (*Vigna angularis*): molecular cloning and functional expression of stachyose synthase. *The Plant journal* 20, 509-18.
- Peterbauer, T., Richter, a, 1998. Galactosylononitol and stachyose synthesis in seeds of adzuki bean. Purification and characterization of stachyose synthase. *Plant physiology* 117, 165-72.
- Peterbauer, T., Richter, A., 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11, 185-197.
- Peters, S., Keller, F., 2009. Frost tolerance in excised leaves of the common bugle (*Ajuga reptans* L.) correlates positively with the concentrations of raffinose family oligosaccharides (RFOs). *Plant, cell & environment* 32, 1099-107.
- Peters, S., Mundree, S.G., Thomson, J. a, Farrant, J.M., Keller, F., 2007. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *Journal of experimental botany* 58, 1947-56.
- Planta, A., Schultze, E., 1890. No Title. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 23, 1692.
- Pontin, M. a, Piccoli, P.N., Francisco, R., Bottini, R., Martinez-Zapater, J.M., Lijavetzky, D., 2010. Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaves induced by ultraviolet-B radiation. *BMC plant biology* 10, 224.
- Poustka, F., Irani, N.G., Feller, A., Lu, Y., Pourcel, L., Frame, K., Grotewold, E., 2007. A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein-sorting route in Arabidopsis and contributes to the formation of vacuolar inclusions. *Plant physiology* 145, 1323-35.
- Prasinos, C., Krampis, K., Samakovli, D., Hatzopoulos, P., 2005. Tight regulation of expression of two Arabidopsis cytosolic Hsp90 genes during embryo development. *Journal of experimental botany* 56, 633-44.
- Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M., Watson, B.T., 1995. Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot noir Grapes and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 187-194.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M., 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 36, 781-784.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T., 1995. Matlnd and Matlnspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic acids research* 23, 4878-4884.
- Quattrocchio, F., Wing, J.F., van der Woude, K., Mol, J.N., Koes, R., 1998. Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *The Plant journal* 13, 475-88.

- Queitsch, C., Hong, S.W., Vierling, E., Lindquist, S., 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant cell* 12, 479-92.
- Ralston, L., Yu, O., 2006. Metabolons involving plant cytochrome P450s. *Phytochemistry Reviews* 5, 459-472.
- Ramsay, N. a, Glover, B.J., 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in plant science* 10, 63-70.
- Rao, M.V., Ormrod, D.P., 1995. Ozone Exposure Decreases UVB Sensivity in a UVB-Sensitive Flavonoid Mutant of Arabidopsis. *Photochemistry and Photobiology* 2 61, 71-78.
- Rapp, a, 1998. Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Die Nahrung* 42, 351-63.
- Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., Lund, S.T., 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC plant biology* 6, 27.
- Reimold, U., Kroger, M., Kreuzaler, F., Hahlbrock, K., 1983. Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme. *EMBO Journal* 2, 1801 - 1805.
- Reynier, A., 2007. Manuel de viticulture. 10e edition., TEC&DOC, L. ed.
- Reynolds, A.G., Wardle, D.A., 1997. Flavour Development in the Vineyard: Impact of Viticultural Practices on Grape Monoterpenes and their Relationship to Wine Sensory Response. *South African Journal of Enology and Viticulture* 18, 3-18.
- Ribeiro, M., Felix, C.R., Lozzi, S.D.P., 2000. Soybean seed galactinol synthase activity as determined by a novel colorimetric assay. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 1998. *Traité d'oenologie, Vol. 2: Chimie du vin stabilisation et traitements*, Dunod. ed.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2006. *The chemistry of wine stabilization and treatments (Vol. 2)*. Chichester, England.
- Ristic, R., Iland, P.G., 2005. Relationships between seed and berry development of *Vitis Vinifera* L . cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Australian Journal Of Grape And Wine Research* 11, 43-58.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., García, P.C., López-Lefebvre, L.R., Sánchez, E., Romero, L., 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant science (Shannon, Ireland)* 160, 315-321.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R., 2004. When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant physiology* 134, 1683-1696.
- Roessner, U., Luedemann, a, Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L., Fernie, a, 2001. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *The Plant cell* 13, 11-29.
- Roggero, J., Larice, J., Rocheville-Divorne, C., Archier, P., Cohen, S., 1988. Composition anthocyanique des cépages: essai de classification par analyse en composantes principales et analyse factorielle discriminante. *Cahiers scientifiques RFOE* 112, 277-284.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J., 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual review of plant biology* 57, 675-709.
- Romo, S., Labrador, E., Dopico, B., 2001. Water stress-regulated gene expression in *Cicer arietinum* seedlings and plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 1017-1026.
- Rotter, A., Camps, C., Lohse, M., Kappel, C., Pilati, S., Hren, M., Stitt, M., Coutos-Thévenot, P., Moser, C., Usadel, B., Delrot, S., Gruden, K., 2009. Gene expression profiling in

- susceptible interaction of grapevine with its fungal pathogen *Eutypa lata*: extending MapMan ontology for grapevine. *BMC plant biology* 9, 104.
- Rowan, D.D., Hunt, M.B., Dimouro, A., Alspach, P. a, Weskett, R., Volz, R.K., Gardiner, S.E., Chagné, D., 2009. Profiling fruit volatiles in the progeny of a “Royal Gala” x “Granny Smith” apple (*Malus x domestica*) cross. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 7953-61.
- Russel, D.W., Conn, E.E., 1967. the cinnamic acid 4-hydrolase of pea seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 122, 256-258.
- Rösler, J., Krekel, F., Amrhein, N., Schmid, J., 1997. Maize Phenylalanine Ammonia-myase Has Tyrosine Ammonia-Lyase Activity. *Plant physiology* 113, 175-179.
- Sairam, R.K., Tyagi, A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* 86, 407-421.
- Saito, K., Kasai, Z., 1978. Conversion of labeled substrates to sugars, cell wall polysaccharides, and tartaric Acid in grape berries. *Plant physiology* 62, 215-9.
- Saito, M., Yoshida, M., 2011. Expression analysis of the gene family associated with raffinose accumulation in rice seedlings under cold stress. *Journal of plant physiology* 2-5.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M., Okada, K., 2001. Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6969-74.
- Sakamoto, a, Murata, N., 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant, cell & environment* 25, 163-171.
- Salvucci, M.E., Crafts-Brandner, S.J., 2004. Relationship between the Heat Tolerance of Photosynthesis and the Thermal Stability of Rubisco Activase in Plants from Contrasting Thermal Environments. *Plant physiology* 134, 1460-1470.
- Samardžić, J.T., Nikolić, D.B., Timotijević, G.S., Jovanović, Z.S., Milisavljević, M.Đ., Maksimović, V.R., 2010. Tissue expression analysis of FeMT3, a drought and oxidative stress related metallothionein gene from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Journal of plant physiology* 167, 1407-11.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. a, Unsal-Kaçmaz, K., Linn, S., 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* 73, 39-85.
- Sangwan, V., Orvar, B.L., Beyerly, J., Hirt, H., Dhindsa, R.S., 2002. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *The Plant journal* 31, 629-38.
- dos Santos, T.B., Budzinski, I.G.F., Marur, C.J., Petkowicz, C.L.O., Pereira, L.F.P., Vieira, L.G.E., 2011. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant physiology and biochemistry* 49, 441-8.
- Sato, S., Soga, T., Nishioka, T., Tomita, M., 2004. Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *The Plant journal* 40, 151-63.
- Savchenko, G.E., Klyuchareva, E.A., Abramchik, L.M., Serdyuchenko, E.V., 2002. Effect of Periodic Heat Shock on the Inner Membrane System of Etioplasts. *Russian Journal of Plant Physiology* 49, 349-359.
- Scalbert, A., Brennan, L., Fiehn, O., Hankemeier, T., Kristal, B.S., van Ommen, B., Pujos-Guillot, E., Verheij, E., Wishart, D., Wopereis, S., 2009. Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics* 5, 435-458.

- Scharf, K.D., Heider, H., Höhfeld, I., Lyck, R., Schmidt, E., Nover, L., 1998. The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Molecular and cellular biology* 18, 2240-51.
- Scheltema, R. a, Jankevics, A., Jansen, R.C., Swertz, M. a, Breitling, R., 2011. PeakML/mzMatch: a file format, Java library, R library, and tool-chain for mass spectrometry data analysis. *Analytical chemistry* 83, 2786-93.
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., Nardi, S., 2010. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of chemical ecology* 36, 662-9.
- Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., van Tunen, A.J., Bovy, A.G., 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65, 2631-48.
- Schlosser, J., Olsson, N., Weis, M., Reid, K., Peng, F., Lund, S., Bowen, P., 2008. Cellular expansion and gene expression in the developing grape (*Vitis vinifera* L.). *Protoplasma* 232, 255-65.
- Schmidlin, L., Poutaraud, A., Claudel, P., Mestre, P., Prado, E., Santos-Rosa, M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Karst, F., Merdinoglu, D., Huguency, P., 2008. A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant physiology* 148, 1630-9.
- Schneider, T., Keller, F., 2009. Raffinose in chloroplasts is synthesized in the cytosol and transported across the chloroplast envelope. *Plant & cell physiology* 50, 2174-82.
- Schomburg, F.M., Bizzell, C.M., Lee, D.J., Zeevaart, J.A.D., Amasino, R.M., 2003. Overexpression of a Novel Class of Gibberellin 2-Oxidases Decreases Gibberellin Levels and Creates Dwarf Plants. *The Plant cell* 15, 151-163.
- Schramm, F., Ganguli, A., Kiehlmann, E., Englich, G., Walch, D., von Koskull-Döring, P., 2006. The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology* 60, 759-72.
- Schripsema, J., 2010. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. *Phytochemical analysis* 21, 14-21.
- Schultz, H., 2000. Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Australian Journal Of Grape And Wine Research* 6, 2-12.
- Schöffl, F., Prändl, R., 1999. De-repression of heat shock protein synthesis in transgenic plants, in: Smallwood, M.F., Calvert, C.M., Bowles, D. (Eds.), *Plant Responses to Environmental Stress*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 65-73.
- Schöffl, F., Prändl, R., Reindl, A., 1998. Update on Signal Transduction Regulation of the Heat-Shock Response. *Plant physiology* 117, 1135-1141.
- Schöffl, F., Prändl, R., Reindl, A., 1999. Molecular responses to heat stress, in: Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (Eds.), *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*. R.G. Landes Co., Austin, Texas, pp. 81-98.
- Searles, P.S., Flint, S.D., Caldwell, M.M., 2001. A meta-analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. *Oecologia* 127, 1-10.
- Seger, C., Sturm, S., 2007. Analytical aspects of plant metabolite profiling platforms: current standings and future aims. *Journal of proteome research* 6, 480-97.
- Serrani, J.C., Sanjuán, R., Ruiz-Rivero, O., Fos, M., García-Martínez, J.L., 2007. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant physiology* 145, 246-57.
- Serrano, M., Guzmán, P., 2004. Isolation and gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* mutants with constitutive expression of ATL2, an early elicitor-response RING-H2 zinc-finger gene. *Genetics* 167, 919-29.

- Shaked-Sachray, L., Weiss, D., Reuveni, M., Nissim-Levi, A., Oren-Shamir, M., 2002. Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment. *Physiologia plantarum* 114, 559-565.
- Sharkey, T.D., 2005. Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant, Cell and Environment* 28, 269-277.
- Shibata, M., Amano, M., Kawata, J., Uda, M., 1988. Breeding process and characteristics of “Summer Queen”, a spray-type chrysanthemum. *Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea. Series A* 2, 245-255.
- Shikanai, T., 2007. Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annual review of plant biology* 58, 199-217.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., Mittler, R., 2008. Metabolomics for plant stress response. *Physiologia plantarum* 132, 199-208.
- Simões-Araújo, J.L., Rumjanek, N.G., Margis-Pinheiro, M., 2003. Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15, 33-41.
- Singh, D.P., Filardo, F.F., Storey, R., Jermakow, A.M., Yamaguchi, S., Swain, S.M., 2010. Overexpression of a gibberellin inactivation gene alters seed development, KNOX gene expression, and plant development in *Arabidopsis*. *Physiologia plantarum* 138, 74-90.
- Skopelitis, D.S., Paranychianakis, N.V., Paschalidis, K. a, Pliakonis, E.D., Delis, I.D., Yakoumakis, D.I., Kouvarakis, A., Papadakis, A.K., Stephanou, E.G., Roubelakis-Angelakis, K. a, 2006. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *The Plant cell* 18, 2767-81.
- Smilde, A.K., van der Werf, M.J., Bijlsma, S., van der Werff-van der Vat, B.J.C., Jellema, R.H., 2005. Fusion of mass spectrometry-based metabolomics data. *Analytical chemistry* 77, 6729-36.
- Smith, C. a, Want, E.J., O’Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry* 78, 779-87.
- Smith, H., 1982. Light Quality, Photoperception, and Plant Strategy. *Annual Review of Plant Physiology* 33, 481-518.
- Soar, C.J., 2004. *Vitis vinifera* cv. Shiraz: molecular and physiological studies investigating their source. *Functional Plant Biology* 31, 659.
- Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., Nishioka, T., 2003. Quantitative Metabolome Analysis Using Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research* 2, 488-494.
- Souquet, J.-marc, Cheyner, V.I.R., Brossaud, F., Moutounet, M., 1996. Polymeric Proanthocyanidins from Grape Skins. *Phytochemistry* 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., Ferguson, J.C., 2002. Separation of Sunlight and Temperature Effects on the Composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 53, 171-182.
- Sprenger, N., Keller, F., 2000. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases. *The Plant Journal* 21, 249-258.
- Springob, K., Nakajima, J.-I., Yamazaki, M., Saito, K., 2003. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Natural Product Reports* 20, 188-303.

- Stafford, H., Lester, H.H., 1982. Enzymic and nonenzymic reduction of (+)-dihydroquercetin to its 3,4,-diol. *Plant physiology* 70, 695-8.
- Stapleton, E., Walbot, V., 1994. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant physiology* 105, 881-9.
- Storey, J.D., Tibshirani, R., 2003. Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9440-5.
- Suhre, K., Schmitt-Kopplin, P., 2008. MassTRIX: mass translator into pathways. *Nucleic acids research* 36, W481-4.
- Sullivan, J.H., Gitz, D.C., Peek, M.S., McElrone, A.J., 2003. Response of three eastern tree species to supplemental UV-B radiation: leaf chemistry and gas exchange. *Agricultural and Forest Meteorology* 120, 219-228.
- Sullivan, J.H., Teramura, A.H., Dillenburg, L.R., 1994. Growth and photosynthetic responses of field-grown sweetgum (*Liquidambar styraciflua*; Hamamelidaceae) seedlings to UV-B radiation. *American Journal of Botany* 81, 826-832.
- Sumner, L.W., Mendes, P., Dixon, R. a., 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62, 817-836.
- Sung, D.-Y., Kaplan, F., Lee, K.-J., Guy, C.L., 2003. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science* 8, 179-187.
- Suzek, B.E., Huang, H., McGarvey, P., Mazumder, R., Wu, C.H., 2007. UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters. *Bioinformatics (Oxford, England)* 23, 1282-8.
- Suzuki, H., Sawada, S., Watanabe, K., Nagae, S., Yamaguchi, M.-A., Nakayama, T., Nishino, T., 2004. Identification and characterization of a novel anthocyanin malonyltransferase from scarlet sage (*Salvia splendens*) flowers: an enzyme that is phylogenetically separated from other anthocyanin acyltransferases. *The Plant journal* 38, 994-1003.
- Sweetman, C., Deluc, L.G., Cramer, G.R., Ford, C.M., Soole, K.L., 2009. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry* 70, 1329-1344.
- Symons, G.M., Davies, C., Shavrukov, Y., Dry, I.B., Reid, J.B., Thomas, M.R., 2006. Grapes on Steroids . Brassinosteroids Are Involved in Grape Berry Ripening 1. *Plant physiology* 140, 150-158.
- Szabo, a, Langer, T., Schröder, H., Flanagan, J., Bukau, B., Hartl, F.U., 1994. The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10345-9.
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal* 29, 417-26.
- Takahashi, S., Badger, M.R., 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in plant science* 16, 53-60.
- Takahashi, S., Milward, S.E., Yamori, W., Evans, J.R., Hillier, W., Badger, M.R., 2010. The solar action spectrum of photosystem II damage. *Plant physiology* 153, 988-93.
- Takahashi, S., Murata, N., 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in plant science* 13, 178-82.
- Takahashi, T., Inoue-Kashino, N., Ozawa, S.-I., Takahashi, Y., Kashino, Y., Satoh, K., 2009. Photosystem II complex in vivo is a monomer. *The Journal of biological chemistry* 284, 15598-606.

- Tamagnone, L., Merida, a, Stacey, N., Plaskitt, K., Parr, a, Chang, C., Lynn, D., Dow, J., Roberts, K., Martin, C., 1998. Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *The Plant cell* 10, 1801-16.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A., 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 54, 733-49.
- Tang, Y., Wen, X., Lu, Q., Yang, Z., Cheng, Z., Lu, C., 2007. Heat stress induces an aggregation of the light-harvesting complex of photosystem II in spinach plants. *Plant physiology* 143, 629-38.
- Tanner, G.J., Francki, K.T., Abrahams, S., Watson, J.M., Larkin, P.J., Ashton, A.R., 2003. Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *The Journal of biological chemistry* 278, 31647-56.
- Tanner, W., Kandler, O., 1968. Myo-inositol, a cofactor in the biosynthesis of stachyose. *European journal of biochemistry / FEBS* 4, 233-9.
- Tanner, W., Lehle, L., Kandler, O., 1967. Myo-Inositol, a cofactor in the biosynthesis of verbascose. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 29, 166-171.
- Tapernoux-Lüthi, E.M., Böhm, A., Keller, F., 2004. Cloning , Functional Expression , and Characterization of the Raffinose Oligosaccharide Chain Elongation Enzyme , Galactan : Galactan Galactosyltransferase , from Common Bugle Leaves. *Plant physiology* 134, 1377-1387.
- Tarara, J.M., Lee, J., Spayd, S.E., Scagel, C.F., 2008. Berry Temperature and Solar Radiation Alter Acylation , Proportion , and Concentration of Anthocyanin in Merlot Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 59, 235-247.
- Tattersall, E. a R., Grimplet, J., DeLuc, L., Wheatley, M.D., Vincent, D., Osborne, C., Ergül, A., Lomen, E., Blank, R.R., Schlauch, K. a, Cushman, J.C., Cramer, G.R., 2007. Transcript abundance profiles reveal larger and more complex responses of grapevine to chilling compared to osmotic and salinity stress. *Functional & integrative genomics* 7, 317-33.
- Tautenhahn, R., Bottcher, C., Neumann, S., 2007. Annotation of LC/ESI-MS mass signals., in: *Proceedings of BIRD 2007 – 1st International Conference on Bioinformatics Research and Development*. Springer, Berlin, Germany.
- Taylor, J.S., Raes, J., 2004. Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annual review of genetics* 38, 615-43.
- Teramura, A.H., Sullivan, J.H., 1994. Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research* 39, 463-473.
- Tevini, M., 2000. UV-B effects on plants, in: Agrawal, S.B., Agrawal, M. (Eds.), *Environmental Pollution and Plant Responses*. Lewis Pubs, Boca Raton, Florida, pp. 83-97.
- Tevini, M., Braun, J., Fieser, G., 1991. The Protective Function of the Epidermal Layer of Rye Seedlings Against Ultraviolet-B Radiation. *Photochemistry and Photobiology* 53, 329-333.
- Theodoridis, G., Gika, H., Franceschi, P., Caputi, L., Arapitsas, P., Scholz, M., Masuero, D., Wehrens, R., Vrhovsek, U., Mattivi, F., 2011. LC-MS based global metabolite profiling of grapes: solvent extraction protocol optimisation. *Metabolomics* DOI 10.1007/s11306-011-0298-z.
- Thimm, O., Blasing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. a, Rhee, S.Y., Stitt, M., 2004. Mapman: a User-Driven Tool To Display Genomics Data Sets Onto Diagrams of Metabolic Pathways and Other Biological Processes. *The Plant Journal* 37, 914-939.

- Tholen, D., Boom, C., Noguchi, K., Ueda, S., Katase, T., Terashima, I., 2008. The chloroplast avoidance response decreases internal conductance to CO₂ diffusion in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, cell & environment* 31, 1688-700.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Timperio, A.M., Egidi, M.G., Zolla, L., 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of proteomics* 71, 391-411.
- Tomana, T., Yamada, H., 1988. Relationship between temperature and fruit quality of apple cultivars grown at different locations. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 56, 391-397.
- Trent, J.D., Kagawa, H.K., Paavola, C.D., McMillan, R.A., Howard, J., Jahnke, L., Lavin, C., Embye, T., Henze, C.E., 2003. Intracellular localization of a group II chaperonin indicates a membrane-related function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15589-94.
- Tsukaguchi, T., Kawamitsu, Y., Takeda, H., Suzuki, K., Egawa, Y., 2003. Water Status of Flower Buds and Leaves as Affected by High Temperature in Heat-Tolerance and Heat-Sensitive Cultivars of Snap Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Production Science* 6, 24-27.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G., 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5116-21.
- Tweeddale, H., Notley-mcRobb, L., Ferenci, T., 1998. Effect of Slow Growth on Metabolism of *Escherichia coli*, as Revealed by Global Effect of Slow Growth on Metabolism of *Escherichia coli*, as Revealed by Global Metabolite Pool ("Metabolome") Analysis. *Journal of Bacteriology* 180, 5109.
- Tyystjarvi, E., 2008. Photoinhibition of Photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chemistry Reviews* 252, 361-376.
- Tzafrir, I., Pena-muralla, R., Dickerman, A., Berg, M., Rogers, R., Hutchens, S., Sweeney, T.C., Mcelver, J., Aux, G., Patton, D., Meinke, D., 2004. Identification of Genes Required for Embryo Development in Arabidopsis. *Plant physiology* 135, 1206-1220.
- Vacca, R.A., Pinto, M.C.D., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E., Gara, L. de, 2004. Production of Reactive Oxygen Species, Alteration of Cytosolic Ascorbate Peroxidase, and Impairment of Mitochondrial Metabolism Are Early Events in Heat Shock-Induced Programmed Cell Death in Tobacco Bright-Yellow 2 Cells. *Plant physiology* 134, 1100-1112.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3, RESEARCH0034.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D. a, Cestaro, A., *et al.*, 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PloS one* 2, e1326.
- Velikova, V., Loreto, F., 2005. On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress. *Plant, Cell and Environment* 28, 318-327.
- Versari, a, Parpinello, G.P., Tornielli, G.B., Ferrarini, R., Giulivo, C., 2001. Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 5531-6.
- Vierling, E., 1991. The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 579-620.

- Vinebrooke, R.D., Cottingham, K.L., Norberg, J., Marten, S., Dodson, S.I., Maberly, S.C., Sommer, U., 2004. Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance. *Oikos* 104, 451-457.
- Voirin, S.G., Baumes, R.L., Bitteur, S.M., Gunata, Z.Y., Bayonove, C.L., 1990. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. *Journal of agricultural and food chemistry* 38, 1373-1378.
- De Vos, R.C.H., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J.J.B., Bino, R.J., Hall, R.D., 2007. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols* 2, 778-91.
- Wahid, a, Close, T.J., 2007. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum* 51, 104-109.
- Wahid, A., 2007. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *Journal of plant research* 120, 219-28.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M., 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61, 199-223.
- Wahid, A., Ghazanfar, A., 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *Journal of plant physiology* 163, 723-30.
- Wahid, A., Shabbir, A., 2005. Induction of Heat Stress Tolerance in Barley Seedlings by Pre-Sowing Seed Treatment with Glycinebetaine. *Plant Growth Regulation* 46, 133-141.
- Walker, A.R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D. a J., Thomas, M.R., Robinson, S.P., 2007. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant journal* 49, 772-85.
- Walker, A.R., Lee, E., Robinson, S.P., 2006. Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. *Plant molecular biology* 62, 623-35.
- Waterhouse, A.L., 2002. Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957, 21-36.
- Watts, K.T., Mijts, B.N., Lee, P.C., Manning, A.J., Schmidt-Dannert, C., 2006. Discovery of a substrate selectivity switch in tyrosine ammonia-lyase, a member of the aromatic amino acid lyase family. *Chemistry & biology* 13, 1317-26.
- Weckwerth, W., 2003. Metabolomics in systems biology. *Annual review of plant biology* 54, 669-89.
- Wen, P., Chen, J., Kong, W., Pan, Q., Wan, S., Huang, W., 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science* 169, 928-934.
- Wen, P.-F., Chen, J.-Y., Wan, S.-B., Kong, W.-F., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J.-C., Pan, Q.-H., Huang, W.-D., 2008. Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Plant Growth Regulation* 55, 1-10.
- Wettenhall, J.M., Smyth, G.K., 2004. limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. *Bioinformatics* 20, 3705-6.
- Whetten, R., Sederoff, R.R., 1995. Lignin Biosynthesis. *Plant Cell* 7, 1001-1013.
- Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, B., 1980. New Linalool derivatives in Muscat of Alexandria grapes and wines. *Phytochemistry* 19, 1137-1139.
- Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, B., Massy-Westropp, R.A., 1982. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry* 21, 2013-2020.
- Wilson, I.D., Plumb, R., Granger, J., Major, H., Williams, R., Lenz, E.M., 2005. HPLC-MS-based methods for the study of metabolomics. *Journal of chromatography B* 817, 67-76.

- Winkel, B.S.J., 2006. The biosynthesis of Flavonoids, in: *The Science of Flavonoids*. pp. 71-95.
- Winkel-Shirley, B., 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant physiology* 126, 485-93.
- Winkler, A.J., 1974. *General Viticulture*.
- Wood, C., Siebert, T.E., Parker, M., Capone, D.L., Elsey, G.M., Pollnitz, A.P., Eggers, M., Meier, M., Vössing, T., Widder, S., Krammer, G., Sefton, M. a, Herderich, M.J., 2008. From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 3738-44.
- Xie, D.-Y., Sharma, S.B., Paiva, N.L., Ferreira, D., Dixon, R. a, 2003. Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science (New York, N.Y.)* 299, 396-9.
- Xie, G.X., Ni, Y., Su, M.M., Zhang, Y.Y., Zhao, A.H., Gao, X.F., Liu, Z., Xiao, P.G., Jia, W., 2008. Application of ultra-performance LC-TOF MS metabolite profiling techniques to the analysis of medicinal Panax herbs. *Metabolomics* 4, 248-260.
- Xiong, F.S., Day, T. a, 2001. Effect of solar ultraviolet-B radiation during springtime ozone depletion on photosynthesis and biomass production of Antarctic vascular plants. *Plant physiology* 125, 738-51.
- Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H., Cui, L., 2006. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environmental and Experimental Botany* 56, 274-285.
- Yalpani, N., León, J., Lawton, M.A., Raskin, I., 1993. Salicylic Acid Biosynthesis in Healthy and Virus-Inoculated Tobacco. *Plant physiology* 103, 315-321.
- Yang, K., Lim, C., Hong, J., Park, C., Cheong, Y., Chung, W., Lee, K., Lee, S., Cho, M., 2006. Identification of cell wall genes modified by a permissive high temperature in Chinese cabbage. *Plant Science* 171, 175-182.
- Yates, J.R., Cociorva, D., Liao, L., Zabrouskov, V., 2006. Performance of a linear ion trap-Orbitrap hybrid for peptide analysis. *Analytical chemistry* 78, 493-500.
- Yoshioka, M., Uchida, S., Mori, H., Komayama, K., Ohira, S., Morita, N., Nakanishi, T., Yamamoto, Y., 2006. Quality control of photosystem II. Cleavage of reaction center D1 protein in spinach thylakoids by FtsH protease under moderate heat stress. *The Journal of biological chemistry* 281, 21660-9.
- You, M.K., Hur, C.G., Ahn, Y.S., Suh, M.C., Jeong, B.C., Shin, J.S., Bae, J.M., 2003. Identification of genes possibly related to storage root induction in sweetpotato. *FEBS Letters* 536, 101-105.
- Zhang, H., Wang, L., Deroles, S., Bennett, R., Davies, K., 2006. New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC plant biology* 6, 29.
- Zhang, X.-Y., Wang, X.-L., Wang, X.-F., Xia, G.-H., Pan, Q.-H., Fan, R.-C., Wu, F.-Q., Yu, X.-C., Zhang, D.-P., 2006. A shift of Phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant physiology* 142, 220-32.
- Zhou, G.-K., Xu, Y.-F., Liu, J.-Y., 2005. Characterization of a rice class II metallothionein gene: Tissue expression patterns and induction in response to abiotic factors. *Journal of Plant Physiology* 162, 686-696.
- Zhuang, Y., Ren, G., Yue, G., Li, Z., Qu, X., Hou, G., Zhu, Y., Zhang, J., 2007. Effects of water-deficit stress on the transcriptomes of developing immature ear and tassel in maize. *Plant cell reports* 26, 2137-47.

Références bibliographiques

Çakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S., Atanassova, R., 2003. A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Abscisic Acid Signaling. *Society* 15, 2165-2180.