



Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2011

Thèse n° 1865

THÈSE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Végétale

Présentée et soutenue publiquement

Le 16 Décembre 2011

Par Philippe NICOLAS

Identification et caractérisation fonctionnelle de facteurs de transcription impliqués dans le développement de la baie de raisin

Membres du Jury :

Mme Rebecca STEVENS	Chargée de recherche, INRA AVIGNON	Rapporteur
M. Laurent TORREGROSA	Professeur, SUPAGRO MONTPELLIER	Rapporteur
M. Grant R. CRAMER	Professeur, UNIVERSITY OF NEVADA, RENO	Examineur
M. Christian CHEVALIER	Directeur de recherche, INRA BORDEAUX	Examineur
M. Serge DELROT	Professeur, UNIVERSITE de BORDEAUX	Invité
Mme Fatma LECOURIEUX	Chargée de recherche CNRS, INRA BORDEAUX	Directrice de thèse

Résumé

Le raisin (*Vitis vinifera* L.) est un fruit charnu non climactérique d'importance économique majeure. De nombreux paramètres, comme la taille, le métabolisme des acides organiques et des sucres, l'équilibre hydrique et la synthèse de métabolites secondaires, affectent la « qualité » de la baie. Les signaux affectant la reprogrammation du métabolisme cellulaire et l'expression des gènes codant des protéines clefs du développement et du mûrissement incluent les hormones et l'accumulation des sucres, présents à des taux variables au cours du développement de la baie. La régulation transcriptionnelle est l'élément essentiel qui contrôle ces modifications majeures. A ce jour, dans le contexte de la régulation du développement du raisin, très peu d'acteurs moléculaires ont pu être clairement caractérisés. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont donc eu pour objectif de mieux comprendre cette régulation par l'identification et la caractérisation de facteurs de transcription régulés transcriptionnellement par le saccharose et exprimés au cours du développement de la baie de raisin. Parmi les cinq facteurs de transcription identifiés, trois n'ont pu être étudiés que de manière préliminaire et deux, VvCEB1 et VvABF2, ont fait l'objet d'une caractérisation plus approfondie.

VvCEB1 (*Vitis vinifera* Cell Elongation bHLH) est exprimé préférentiellement dans la baie de raisin au cours de la phase de maturation. Une approche par transgénése chez la Vigne et la Tomate montre que la surexpression de ce facteur de transcription affecte à la fois le développement des embryons de Vigne et des fruits de Tomate, en modifiant notamment le nombre et la taille des cellules qui les constituent. Une analyse transcriptionnelle réalisée à partir de ce matériel biologique confirme le rôle de VvCEB1 dans la stimulation de l'expansion cellulaire et suggère l'implication de l'auxine.

VvABF2 est régulé transcriptionnellement par l'ABA, une hormone clef impliquée dans les processus de maturation des fruits non climactériques. Les transcrits *VvABF2* s'accumulent majoritairement pendant l'étape de maturation. Une approche transcriptomique sur génome complet de Vigne et réalisée à partir de suspensions cellulaires embryogènes surexprimant *VvABF2*, traitées ou non par l'ABA souligne la stimulation de l'expression des gènes codant les enzymes liées à la maturation du raisin. En effet, des gènes des voies de biosynthèse des composés phénoliques et du ramollissement sont affectés. Enfin, l'analyse phénotypique de plants de Tomate surexprimant *VvABF2* renforce l'hypothèse liant ce facteur de transcription au ramollissement : à partir du stade "turning" un ramollissement accéléré du fruit est observé.

Prise dans son ensemble cette thèse contribue à une meilleure compréhension des mécanismes de signalisation moléculaires impliqués dans le développement d'un fruit charnu non climactérique.

Mots clefs: *Vitis vinifera*, développement du fruit, facteurs de transcription, hormones

Abstract

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is the most economically important fruit crop in the world. The quality of this non climacteric fruit depends on numerous parameters such as size, organic acids and sugar metabolisms, water balance, and secondary metabolism. During fruit development and ripening, hormones and sugars can act as signals affecting cellular metabolism and expression of key regulatory genes. Up to now, little is known about the gene networks involved in these processes and therefore very few of these regulatory genes have been characterized.

The aim of this PhD work was to get a better insight in the mechanisms involved in grape berry development through the identification and characterization of sugar-dependent transcription factors (TFs) that were expressed during fruit development. We identified five TFs, and fully characterized two of them: VvCEB1 and VvABF2.

VvCEB1 (*Vitis vinifera* Cell Elongation bHLH) is preferentially expressed in the berry at the onset of ripening and during the ripening stage. Overexpression of *VvCEB1* in grapevine and tomato affected both grape embryo development and plant organ size by modifying their cell number and cell size. A transcriptional analysis performed on these transgenic lines confirmed that VvCEB1 stimulates cell expansion and suggests the involvement of the phytohormone auxin.

VvABF2 is transcriptionally regulated by abscisic acid (ABA), a phytohormone known to play a crucial role in non-climacteric fruit ripening. *VvABF2* transcripts accumulated more abundantly during the ripening stage. A whole-genome based transcriptomic approach performed on *VvABF2*-overexpressing grape cells treated or not with ABA emphasizes the up-regulation of genes linked to fruit ripening processes. Indeed, genes encoding enzymes involved in the biosynthesis of phenolic compounds and in softening were affected. Finally, phenotypic analysis of *VvABF2*-overexpressing tomato fruits reinforces the link between this transcription factor and fruit softening. Indeed, from the “turning” stage, an accelerated fruit softening was observed in the transgenic fruits.

Taken together, this PhD work contributed to a better understanding of the molecular mechanisms involved in the ripening of non climacteric fleshy fruit.

Key words: *Vitis vinifera*, fruit development, transcription factors, hormones

Table des matières

Contexte bibliographique	13
I. Cycle de développement de la Vigne.....	14
1.1 Généralités.....	14
I.2 Le cycle végétatif.....	14
I.3 Le cycle reproducteur.....	15
II. Morphologie et anatomie de la baie de raisin.....	17
III. Physiologie du développement de la baie de raisin.....	18
III.1 Phase de croissance « herbacée » ou stade vert.....	18
III.2 Phase de maturation.....	20
IV. La signalisation hormonale dans le développement du fruit charnu.....	25
IV.1. L'auxine.....	26
IV.1.1. Généralités.....	26
IV.1.2. La signalisation auxinique.....	27
IV.1.3. Fonctions de l'auxine dans le développement du fruit charnu.....	28
IV.1.4. Rôle de l'auxine dans le développement de la baie de raisin.....	31
IV.2. L'acide absissique.....	32
IV.2.1. La signalisation ABA.....	32
IV.2.2. Les facteurs de transcription du groupe AREB/ABF.....	33
IV.2.3. L'ABA dans le développement du fruit charnu.....	35
IV.2.4. Importance de l'interaction ABA/sucres dans le développement du fruit charnu.....	37
IV.3. Autres hormones impliquées dans le développement des fruits charnus.....	38
V. La régulation transcriptionnelle.....	40
V.1. Généralités.....	40
V.2. Les différentes familles de facteurs de transcription.....	41
V.2.1. Les facteurs de transcription de la famille bHLH.....	42

V.2.2. Les facteurs de transcription de la famille b-ZIP	44
V.3. Régulation transcriptionnelle du développement du fruit charnu	45
V.3.1. Généralités	45
V.3.2. Régulation transcriptionnelle du développement de la baie de raisin.....	46
VI. Objectif du travail de thèse	47

Chapitre I – Facteurs de transcription de Vigne sensibles au sucre - Etude préliminaire

I. Introduction.....	49
II. Clonage et analyse phylogénétique des trois facteurs de transcription	49
II. Analyse des profils d’expression chez la Vigne	52
III. Production d’outils moléculaires en vue de la caractérisation fonctionnelle des 3 FT.	52
III. Conclusions/perspectives	53

Chapitre II - Caractérisation fonctionnelle de *VvCEB1*

I. Introduction.....	57
II. Article	57
III. Résultats complémentaires	78
III.1. Profils d’expression des homologues de <i>VvCEB1</i> chez la Vigne.....	78
III.2. Profils d’expression de <i>VvCEB1</i> en réponse à différents traitements hormonaux	78
III.3. Analyse transcriptomique des suspensions cellulaires surexprimant <i>VvCEB1</i>	79
III.4. Analyse de la concentration en sucres des suspensions cellulaires surexprimant <i>VvCEB1</i>	80
III.5. Analyses complémentaires des plants de Tomate surexprimant <i>VvCEB1</i>	81
III.6. Caractérisation fonctionnelle de l’homologue de <i>VvCEB1</i> chez la Tomate.....	82
III.7. Variabilité génétique de <i>VvCEB1</i> au sein du genre <i>Vitis</i> - Etude préliminaire	83
III.8. Expériences d’agroinfiltration sur baies de raisin.....	84
III.9. Recherche des partenaires de <i>VvCEB1</i> - double hybride dans la levure	85
IV. Discussion/Conclusions	87

Chapitre III - Caractérisation fonctionnelle de *VvABF2*.....

I. Introduction.....	91
II. Article	92

Conclusions et perspectives	110
Références bibliographiques	118
Matériel et méthodes complémentaires détaillés	160
I. Outils bioinformatiques	161
I.1. Les banques de données, recherche de séquences nucléotidiques	161
I.1.1. GenBank	161
I.1.2. Génoscope	161
I.1.3. Sol Genomic Network (SGN).....	161
I.1.4. The Institute of Genomic Research (TIGR).....	
I.2. Recherche d'homologie, alignement des séquences nucléotidiques et protéiques	162
I.2.1. BLAST.....	162
I.2.2. ClustalW	162
I.2.3. MEGA4	162
I.3. Recherche de domaines protéiques in silico	162
II. Matériel biologique.....	163
II.1. Matériel végétal.....	163
II.1.1. Baies de raisin	163
II.1.2. Organes de Vigne	164
II.1.3. Plants de tabac	164
II.1.4. Plants de tomate	164
II.1.5. Culture de cellules	165
II.2. Les souches de bactéries.....	166
II.2.1. Souche d' <i>Escherichia Coli</i>	166
II.2.2. Souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	167
II.3. Les souches de levure.....	167
II.3.1. AH109	167
II.3.2. Y187	168
II.4. Vecteurs de clonage.....	168
II.4.1. Les vecteurs de sous-clonage	168
II.4.2. Les vecteurs de transformation transitoire de plantes	170
II.4.3. Les vecteurs de transformation stable de plantes	171
II.4.4. Les vecteurs de transformation de levures	173
III. Techniques de biologie moléculaire.....	174

III-1	Technique de clonage de gènes.....	174
III-1-1	Clonage par la technique dite “classique”.....	174
III.1.2.	Clonage par la technologie Gateway™ (Invitrogen).....	180
III.2.	Méthodes de manipulation et d’analyse des acides nucléiques.....	182
III.2.1.	Extraction d’ADN génomique de vigne.....	182
III.2.2.	Extraction d’ARN totaux et digestion DNase.....	182
III.2.3.	Réaction de transcription inverse (RT).....	183
III.2.4.	Analyse de l’expression d’un gène par RT-PCR semi-quantitative.....	184
III.2.5.	Analyse de l’expression d’un gène par RT-PCR quantitative.....	184
III.2.6.	Technique de microarray pour la caractérisation fonctionnelle de VvCEB1.....	187
IV.	Transformation des plantes.....	190
IV.1.	Transformation transitoire de protoplastes.....	190
IV.1.1.	Isolement et transformation de protoplastes de Tabac.....	190
IV.1.2.	Isolement et transformation de protoplastes de <i>d’Arabidopsis thaliana</i>	190
IV.2.	Transformation stable des plantes.....	190
IV.2.1.	Transformation d’A.tumefaciens par électroporation.....	190
IV.2.2.	Préparation de la suspension d’A.tumefaciens.....	191
IV.2.3.	Transformation de la suspension cellulaire embryogène 41B de Vigne.....	191
IV.2.4.	Transformation des cotylédons de tomate cv. WVA106.....	191
IV.2.5.	Méthodes de sélection et d’analyses des plantes transgéniques.....	192
IV.2.6.	Expériences d’agroinfiltration sur baies de raisin.....	193
V.	Technique du criblage double hybride chez la levure.....	193
V.1.	Principe de la technique du double hybride chez la levure.....	193
V.2.	Construction de la banque d’ADNc.....	195
V.3.	La transformation des levures.....	196
V.4.	Criblage double hybride par « Yeast mating ».....	196
V.5.	Isolation des clones positifs en double hybride chez la levure.....	197
VI.	Méthodes d’analyse microscopique.....	197
VI.1.	Observation des protoplastes.....	197
VI.2.	Analyse phénotypique des fruits de tomate à la loupe binoculaire.....	198
VI.3.	Analyse phénotypique des embryons de Vigne.....	198
VII.	Techniques de biochimie.....	199
VII.1.	Dosage des sucres solubles dans les suspensions cellulaires de Vigne 41B.....	199
VII.2.	Test de l’activité β-glucuronidase (GUS).....	200

VII.2.1. Dosage de l'activité β -glucuronidase par fluorimétrie	200
VII.2.2. Test histochimique de l'activité β -glucuronidase.....	201
Annexes	202

Contexte bibliographique



Photographie de rangs de Vigne (Domaine du Grand Parc, Latresne, Gironde)

I. Cycle de développement de la Vigne

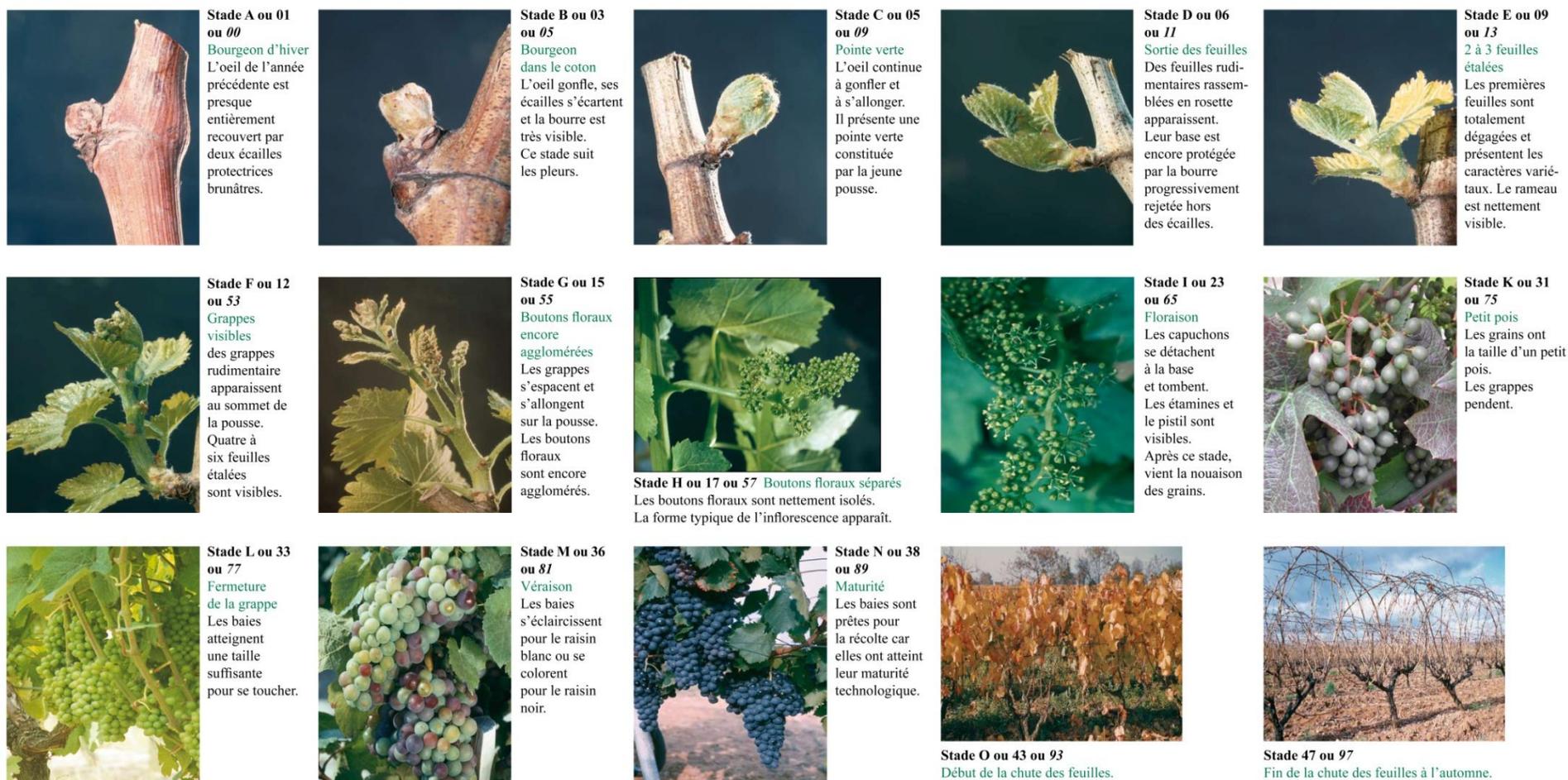
1.1 Généralités

La Vigne est une plante Angiosperme Dicotylédone, appartenant au genre *Vitis* et à la famille des Vitacées (ou Ampélidacées dans la littérature ancienne). Morphologiquement, cette famille est caractérisée par la présence de vrilles ou d'inflorescences opposées aux feuilles. La Vigne est une liane grimpante, ligneuse, rustique, pérenne, à croissance indéterminée, à fruits charnus et souvent cultivée en conditions limitantes d'eau et d'azote. *Vitis vinifera* L. est la famille la plus répandue dans le genre *Vitis* avec plus de 7 000 variétés connues (Mullins *et al.*, 1992), qu'il est difficile de classer. Sous sa forme originale et sauvage, la Vigne est une plante dioïque. Cependant, la plupart des cépages de *V. vinifera* L. sont actuellement hermaphrodites, les viticulteurs ayant cherché à rendre cette plante plus facilement cultivable (Mullins *et al.* 1992). La Vigne peut se multiplier par voie sexuée, par bouturage ou par greffage. Par ailleurs, la Vigne est cultivée selon des modes de conduite visant à maîtriser le feuillage et le rendement. Il s'agit de techniques de rognage, effeuillage, éclaircissage et taille qui contribuent à réguler la distribution des assimilats afin d'obtenir un bon équilibre entre le développement végétatif et le développement reproducteur, la vigne étant cultivée pour ses fruits charnus: les baies de raisin.

En tant qu'espèce pérenne, le développement de la Vigne est entrecoupé d'une période de repos, appelée dormance, correspondant dans l'hémisphère Nord à l'hiver. Un cycle annuel de développement est la superposition du cycle végétatif et du cycle reproducteur. Le cycle de développement de la Vigne est décrit morphologiquement par les stades dits phénologiques. En 1952, Baggioolini a décrit 16 stades, désignés par des lettres de A à O (Figure 1). Cette notation a été complétée en 1977 par Eichhorn et Lorenz qui proposèrent une classification plus précise suivant une échelle numérique de 1 à 47. L'enchaînement des phases de développement est perçu par l'observation des stades phénologiques majeurs que sont : le débourrement (B), la floraison (I), la véraison (M), la maturité ou récolte (N).

I.2 Le cycle végétatif

Au cours des 4 mois de repos hivernal (de Novembre à Février), le bourgeon en dormance est reconnaissable par son "œil" presque entièrement recouvert de deux écailles brunâtres : ce bourgeon d'hiver est le premier stade des classifications (A, Figure 1).



Depuis 1994, la notation des stades phénologiques de la vigne s'effectue suivant une échelle numérique s'étalant de 1 à 47, établie par **Eichhorn & Lorenz**. Cette échelle complète celle de **Baggiolini**, notée de A à O, surtout au niveau de la floraison. Enfin, il existe une échelle universelle pour toutes les monocotylédones et les dicotylédones, appelée **BBCH** (Biologische Bundesanstalt bundessortenamt and CHEmical industry). Chaque stade est défini par une lettre et deux chiffres dans l'ordre : Baggiolini, Eichhorn & Lorenz et **BBCH**.

Figure 1. Les stades phénologiques de la Vigne d'après Baggiolini (1952) et Eichhorn et Lorenz (1977) (d'après l'IFV, Institut Français de la Vigne et du Vin)

A la fin de l'hiver, le début du cycle végétatif se fait sous l'influence d'une hausse de la température du sol, qui doit atteindre 10 à 12°C. Les racines sont stimulées : elles absorbent l'eau et mobilisent les réserves accumulées l'année précédente stockées dans les parties pérennes sous forme d'amidon (Huglin 1986). La reprise de l'activité végétative se manifeste par des « pleurs » aux niveaux des plaies laissées par la taille. Ces « pleurs » correspondent à un écoulement de sève brute (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000) et précèdent le débourrement, première manifestation visible de la reprise de la croissance. La date de débourrement est fonction des cépages, de la température, de la latitude mais également de la vigueur du sarment et du système de taille utilisé (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000). Elle se situe de début mars à fin avril dans le vignoble bordelais (Blouin et Guimberteau, 2000). Le débourrement se caractérise par un gonflement du bourgeon latent et constitue le départ de la reprise d'activité du bourgeon. Il correspond au stade « bourgeon dans le coton » (stade B, Figure 1). L'œil continue à gonfler et à s'allonger jusqu'à laisser apparaître la jeune pousse, ou pointe verte, à travers la bourre (stade C, Figure 1). Les feuilles, dont la base est encore protégée par la bourre, apparaissent et forment des rosettes (stade D, Figure 1). Par la suite, alors que la bourre est rejetée hors des écailles, les premières feuilles se dégagent totalement (stade E, Figure 1) et présentent déjà les caractères spécifiques à chaque cépage. Au cours de leur développement, les feuilles, d'abord organes puits (utilisatrices de réserves carbonées), deviennent des organes sources (exportatrices de glucides) environ 2-3 semaines avant la floraison (Zapata, 1998; Zapata *et al.*, 2004). La croissance végétative ralentit au moment de la floraison puis s'arrête fin juillet - début août (Huglin et Schneider, 1998; Galet, 2000). Le mois d'août voit alors survenir l'aoûtement (O, Figure 1), qui s'accompagne d'une forte accumulation de réserves amylacées et de lignine dans les sarments. L'aoûtement se poursuit jusqu'à la fin de l'automne, avant les premières gelées. Le cycle végétatif se termine en novembre par la « défeuillaison » (Figure 1) et l'entrée en dormance des bourgeons.

Du stade F (grappes visibles) au stade O (aoûtement), les classifications ne se basent plus sur l'aspect végétatif, mais sur le développement des inflorescences puis des grappes. Elles correspondent aux étapes du cycle reproducteur.

I.3 Le cycle reproducteur

Les fruits de la Vigne sont regroupés en grappes et sont portés par les rameaux de l'année. Le développement reproducteur s'effectue sur 2 années successives et est interrompu pendant l'hiver. Les inflorescences sont tout d'abord initiées durant l'été « n-1 » à partir de *primordia* indifférenciés (appelés *Anlagen*) situés au niveau des bourgeons latents. Leur

développement s'arrête en hiver lorsque les *primordia* entrent en dormance (Mullins *et al.*, 1992; Boss *et al.*, 2003). La fertilité des bourgeons latents est maximale vers le milieu du sarment. Par ailleurs, des bourgeons ayant la capacité de se développer l'année de leur formation, appelés « prompt-bourgeons », peuvent également être fertiles, mais ils donneront naissance à des grappes plus petites.

La seconde phase a lieu l'année « n » et concerne des événements visibles. Après l'étalement des premières feuilles (stade E, Figure 1), les inflorescences apparaissent (stade F, Figure 1), puis se séparent grâce à l'allongement des entre-nœuds (stade G, Figure 1). Les fleurs composant les inflorescences sont encore agglomérées. Ensuite, les pédicelles des fleurs s'allongent, ce qui permet de différencier chaque fleur individuellement (stade H, Figure 1). La floraison apparente (Stade I, Figure 1) débute lorsque la corolle des boutons floraux (en forme de capuchon) tombe ; on parle de déhiscence « calyptrée ». La chute de la corolle met à nu l'ovaire et permet l'étalement des étamines autour de lui. La fécondation a lieu quelques jours après l'anthèse. Comme toutes les fleurs d'une inflorescence ne s'épanouissent pas en même temps, la fécondation s'étale sur plusieurs jours suivant les variétés et le climat (Galet, 2000). Elle se produit entre fin mai et début juin. La nouaison (stade J, Figure 1) correspond au début du développement de l'ovaire fécondé, lequel donnera la baie. Pendant cette période, les étamines flétrissent et tombent, ou restent fixées à leur point d'attache. La taille des fruits augmente jusqu'à atteindre celle d'un petit pois (stade K, figure 1) ; les grappes pendent alors progressivement sous le poids des baies. Les baies grossissent encore et se touchent, induisant la fermeture de la grappe (stade L, Figure 1). La véraison (stade M, figure 1) débute lorsque les baies deviennent moins fermes, s'éclaircissent et se colorent. Cette période correspond au début de l'accumulation de sucres et de la diminution de l'acidité dans les baies et se termine quand toutes les baies ont changé de couleur. Enfin, de début à fin septembre, selon le cépage et la localisation géographique, les baies arrivent à maturité. Elles atteignent leur taille maximale, leur taux en sucres et leur acidité est stabilisée, permettant ainsi la vendange (stade N, figure 1) (Coombe, 1992 ; Mullins *et al.*, 1992 ; Coombe et McCarthy, 2000 ; Ollat *et al.*, 2002).

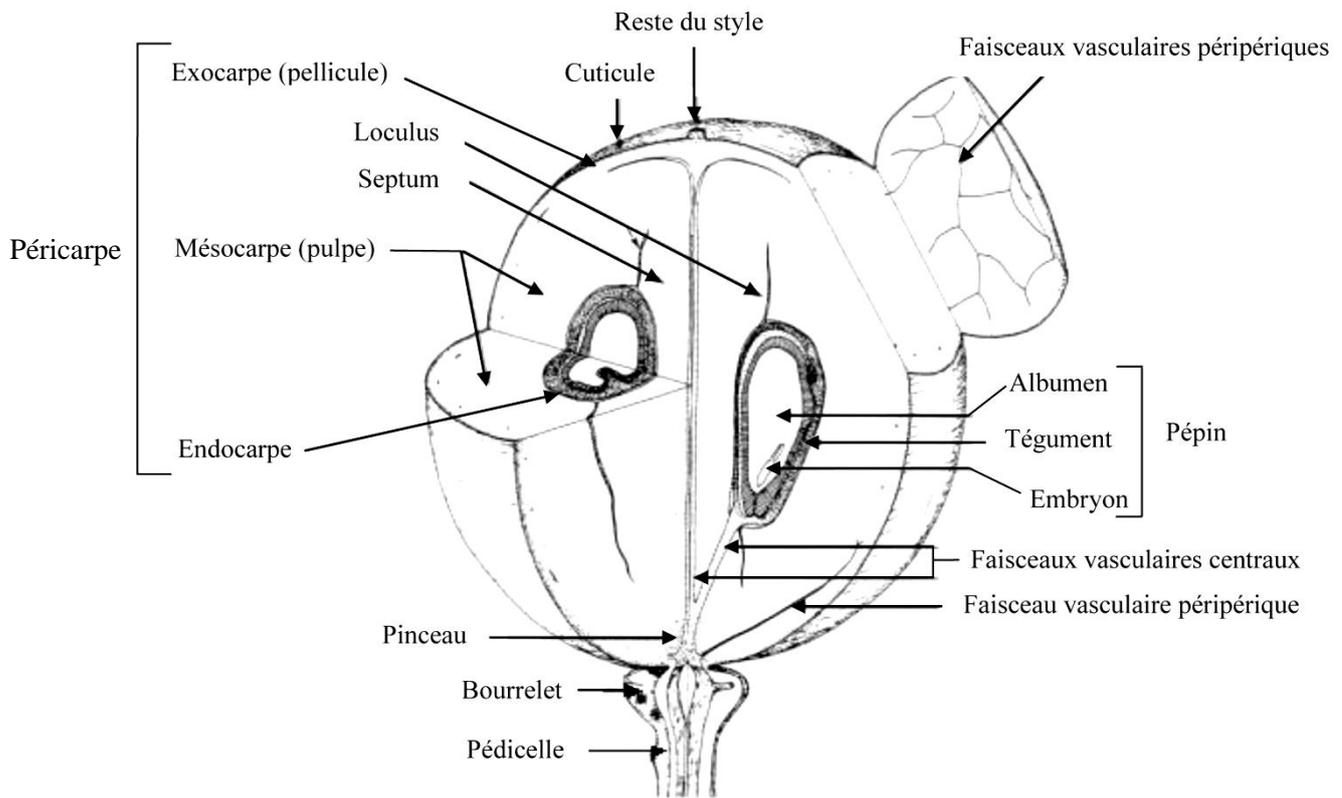


Figure 2. Structure détaillée d'une baie de raisin (d'après Coombe *et al.*, 1987).

II. Morphologie et anatomie de la baie de raisin

Le raisin est une baie charnue, car son péricarpe est issu des tissus constituant la paroi de l'ovaire (Esau, 1965). Le caractère commun des fruits charnus est l'importante accumulation d'eau et de matière sèche conduisant à un caractère juteux et attractif (Coombe, 1976). Le raisin peut avoir plusieurs formes possibles en fonction des variétés. Les fruits sont toujours regroupés en grappe. Celle-ci est rattachée au sarment par un rachis (ou rafle), partie ligneuse plus ou moins ramifiée, dont les ultimes ramifications (appelées pédicelles) portent les baies. La rafle est essentiellement constituée d'eau, de fibres, de tannins et de matières minérales. Le pinceau, formé de tissus vasculaires, constitue le prolongement du pédicelle à l'intérieur de la baie. La baie de raisin est constituée d'un péricarpe et de graines appelées pépins. De l'extérieur vers l'intérieur, le péricarpe est successivement constitué de l'exocarpe (appelé pellicule), du mésocarpe (appelé pulpe), et de l'endocarpe (Figure 2). L'exocarpe est formé de la cuticule, d'une assise cellulaire constituant l'épiderme, et d'un hypoderme formé par 10 à 12 couches de cellules à maturité (Hardie *et al.*, 1996; Carmona *et al.*, 2008). Les cellules de l'hypoderme sont plus grandes et possèdent des parois plus épaisses que les cellules épidermiques (Alleweldt *et al.*, 1981; Fougère-Rifot *et al.*, 1996). Enfin, la pellicule possède également des stomates qui, après véraison, ne sont plus fonctionnels (Bessis, 1972). Le mésocarpe est constitué par 25 à 30 couches de cellules pouvant représenter jusqu'à 90 à 95 % du poids du raisin à maturité (Diakou and Carde, 2001). Les cellules du mésocarpe sont caractérisées par une paroi fine et leur très grande taille, certaines pouvant atteindre 400 µm de diamètre (Ojeda *et al.*, 1999). De plus, ces cellules présentent également la particularité de posséder des vacuoles représentant la quasi totalité (99%) de leur volume (Diakou et Carde, 2001). L'endocarpe correspond au tissu le plus profond du péricarpe. Il est réduit à 2 à 3 couches de cellules délimitant les loges carpellaires qui contiennent les pépins. Les pépins atteignent leur taille maximale avant la véraison et peuvent représenter entre 3 et 10 % du poids final de la baie (Ojeda *et al.*, 1999). Le nombre de pépins est en moyenne de 2 par baie, avec un maximum de 4 et ce pour la majorité des cépages. Dans certains cas, les raisins ne possèdent aucun pépin et sont dits apyrènes. On distingue deux types d'apyrénie. L'apyrénie sultanienne ou sténocarpie qui est le cas le plus répandu, correspond à une fécondation suivie de l'avortement de l'embryon et de l'albumen (Ledbetter et Ramming, 1989). L'apyrénie corinthienne, quant à elle, est liée à une parthénocarpie (Huglin et Schneider, 1998). Elle résulte d'une production endogène suffisante d'hormones de croissance dans l'ovaire qui permet la croissance du fruit sans fécondation. Enfin, les faisceaux conducteurs de la baie

dérivent de la vascularisation de l'ovaire (Pratt, 1971). Ils sont constitués d'un large faisceau central alimentant les pépins et la partie centrale de la baie, et d'un réseau de petits faisceaux vasculaires périphériques (20 à 30 en fonction du cépage) situés à une vingtaine d'assises au-dessous de l'épiderme (Combe, 1987; Ollat, 2002). Au début du développement, les faisceaux vasculaires périphériques délimitent l'exocarpe et le mésocarpe. Plus tard, ils sont entourés de cellules du mésocarpe et ne marquent plus la frontière exocarpe - mésocarpe (Park, 1995). Ces faisceaux conducteurs périphériques contiennent peu de xylème, mais possèdent un pôle phloémien important.

III. Physiologie du développement de la baie de raisin

Comme pour d'autres fruits charnus (la fraise, la figue, la groseille, la pêche ou encore l'olive) la croissance des baies de raisin se caractérise par une évolution du poids et du volume selon une double sigmoïde (Coombe, 1976, 1992). Le développement de la baie de raisin peut ainsi être découpé en trois phases (Figure 3; Kennedy *et al.*, 2002) qui sont : la phase de croissance herbacée, le plateau herbacé et la phase de maturation. En outre, bien que le nombre et le volume des cellules déterminent la taille finale d'un organe en croissance (Coombe, 1976 ; 1992), chez les fruits charnus comme le raisin et la tomate, la croissance est surtout due à un grandissement cellulaire important, lié aux importations d'eau et de matière sèche (Coombe, 1976).

III.1 Phase de croissance « herbacée » ou stade vert

Le premier stade de développement de la baie, appelée « phase de croissance herbacée », est caractérisé à la fois par des phénomènes de divisions et de grandissement cellulaire. Le développement du fruit débute par des phénomènes de multiplication cellulaire intenses accompagnant les 2 premières étapes de cette phase de croissance, qui sont le gonflement de l'ovaire après fécondation et la nouaison (Ollat *et al.*, 2002). C'est au cours de ces 2 étapes précoces que se fixe le nombre quasi-définitif de cellules de la baie, lequel déterminera la taille potentielle de la baie à maturité (Kennedy, 2002). En effet, 90 % de la multiplication cellulaire a lieu durant les 8 à 10 j suivant le début du gonflement de l'ovaire (Ojeda *et al.*, 2001). Après la nouaison, la croissance de la baie se fait essentiellement par grandissement cellulaire même si une faible activité de multiplication cellulaire se poursuit jusqu'à la fin de l'étape de croissance herbacée. Cette phase de croissance dure environ 40 j à partir de la nouaison (Champagnol, 1984).

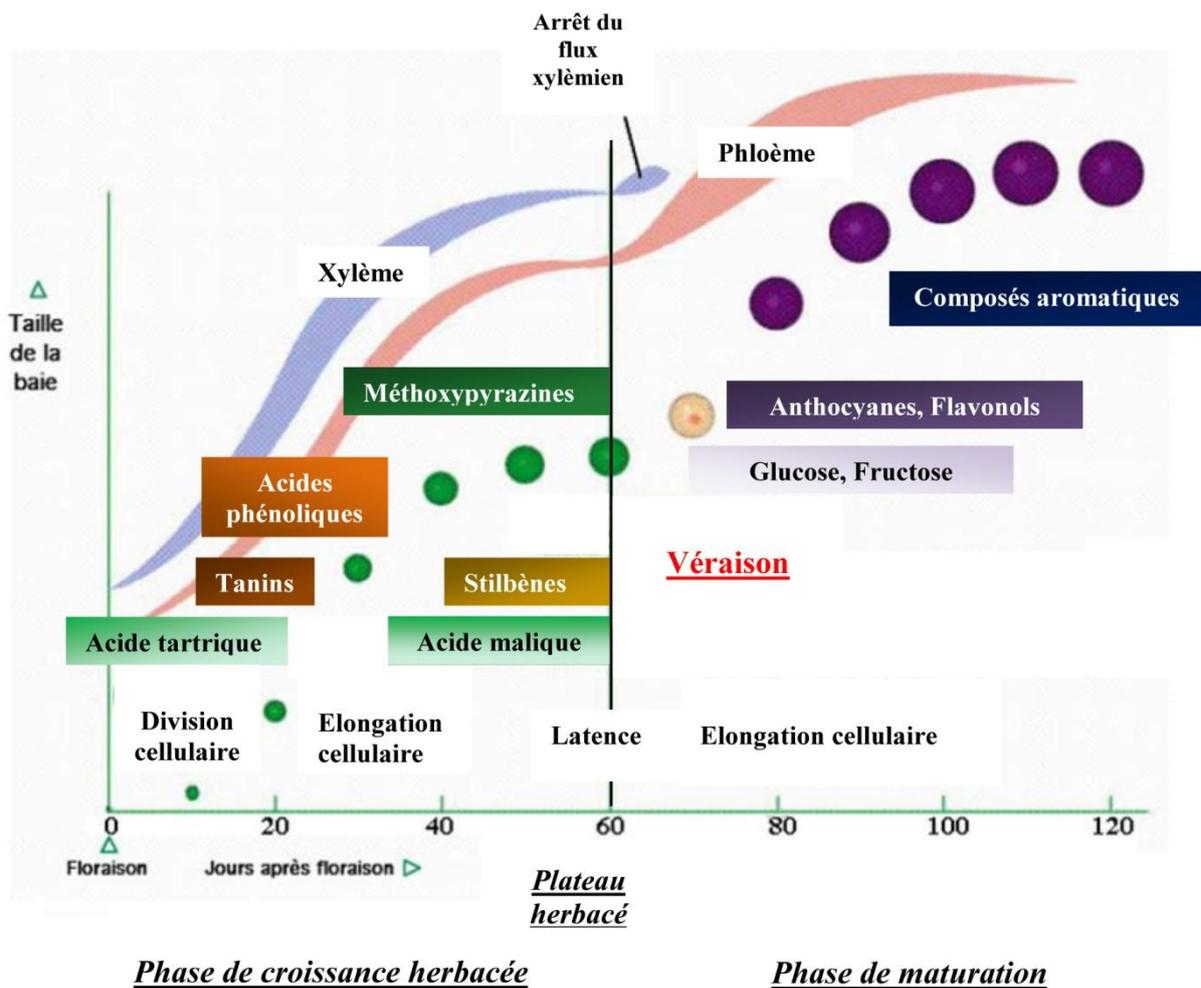


Figure 3. Physiologie du développement de la baie de raisin (d'après Kennedy *et al.*, 2002). Les flux xylémiens et phloémiens sont respectivement représentés par les aires bleues et roses. La taille et la couleur relative des baies sont représentées tous les 10 j à partir de la floraison.

La phase herbacée est également caractérisée par des baies vertes qui se comportent comme des organes chlorophylliens en croissance et qui présentent une photosynthèse active. La production de sucres résultant de cette activité s'ajoute au saccharose importé par les jeunes baies pour couvrir leurs besoins métaboliques (Reynier, 2007). Ce phénomène entraîne un faible stockage d'amidon au niveau des plastes des cellules de la baie (Ollat *et al.*, 2002). Durant cette période, la concentration en sucres est très faible ; elle n'excède pas 150 mM d'hexoses (Fillion *et al.*, 1999). En revanche, les acides organiques (acides malique et tartrique) s'accumulent dans la vacuole des cellules du mésocarpe (Kliewer, 1966), ce qui, couplé à une entrée d'eau, favorise les processus d'élongation cellulaire (Figure 3). Le pH vacuolaire est alors inférieur à 3 (Hrazdina *et al.*, 1984). Les concentrations en tartrate et malate sont généralement comprises entre 30 et 50 mM, mais ceci varie en fonction du cépage : l'acide tartrique pouvant atteindre des concentrations de 100 mM chez certains cépages (Terrier et Torregrosa, 2001). D'autres acides organiques sont présents en plus petite quantité dans la baie de raisin. Ce sont par exemple l'acide citrique (10 mM) et l'acide succinique (inférieur à 1 mM) (Ollat *et al.*, 2002). Les acides de la baie sont importants car ils participent notamment aux qualités organoleptiques du vin, à son acidité, et à sa stabilité. L'acide citrique, par exemple, peut être utilisé pour remonter l'acidité fixe et ainsi améliorer l'acidité gustative des vins blancs secs (Conde *et al.*, 2007).

Des composés phénoliques sont également synthétisés au cours de cette première phase de croissance. Il s'agit des acides phénoliques, des tanins et des stilbènes (Figure 3).

Les acides phénoliques regroupent les acides hydroxybenzoïques, tels que l'acide gallique ou l'acide salicylique, et les acides hydroxycinnamiques comme l'acide p-coumarique (Romeyer *et al.*, 1983). Chez la Vigne, ils sont généralement présents sous leur forme glycosylée (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Ces composés sont localisés principalement dans les vacuoles de la pellicule de la baie, mais aussi celles de la pulpe. Ils sont importants en raison de leur participation dans des réactions de brunissement, et parce qu'ils sont des précurseurs des phénols volatils (Licker *et al.*, 1999).

Les tanins présentent un pic d'accumulation 3 à 5 semaines avant véraison (Figure 3). Ils sont présents dans le raisin sous forme de monomères flavan-3-ol (catécines et épicatechines) et de structures polymérisées, appelées proanthocyanidines ou tannins condensés (Dixon *et al.*, 2005). Ils sont présents dans les vacuoles et la paroi des cellules de la pellicule de la baie ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales des téguments des pépins (Kennedy *et al.*, 2001). La synthèse des tanins condensés dans la pellicule a lieu uniquement avant véraison. Des travaux récents montrent qu'ils sont aussi présents dans la pulpe, mais en

très faible quantité (Verries *et al.*, 2008). Les tanins sont responsables des propriétés organoleptiques du vin telles que l'astringence et l'amertume. Associés aux anthocyanes, les tanins sont importants pour la stabilité de la couleur des vins (Cheynier *et al.*, 1998 ; Kennedy *et al.*, 2000 ; 2001).

Les stilbènes sont essentiellement synthétisés lors de la phase de croissance herbacée dans la pellicule, et en quantité moindre dans la pulpe. Cette synthèse diminue fortement avant véraison (Figure 3) (Bavaresco et Frigoni, 2001). Ils peuvent exister sous leur forme aglycone comme le resvératrol (principal stilbène chez la Vigne), ou encore sous leur forme glycosylée (picéïdes), ou méthylée (ptérostilbènes). Le resvératrol peut également former des oligomères, tels que les viniférines (spécifiques de la Vigne) (Jeandet *et al.*, 2002). Bien que présents dans les baies saines, les stilbènes sont davantage synthétisés lors d'attaques fongiques afin de stimuler les réponses de défense de la baie (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001).

Par ailleurs, au cours de la phase de croissance herbacée, d'autres éléments s'accumulent, tels que des éléments minéraux comme le potassium (Possner et Kliwer, 1985), des acides aminés (Stines *et al.*, 2000), des micronutriments et certains composés aromatiques comme les méthoxypyrazines (Allen *et al.*, 1989; Allen et Lacey, 1999). Les méthoxypyrazines, produits du métabolisme des acides aminés, sont accumulées sous forme libre pendant la croissance herbacée et sont ensuite progressivement dégradées au cours de la maturation (Figure 3) (Lund et Bohlmann., 2006). Elles donnent le caractère végétal avec des notes de poivrons et de fruits rouges aux vins de Cabernet sauvignon.

Enfin, environ 40 j après la nouaison, la baie entre dans une phase de latence correspondant à un fort ralentissement de la croissance, nommée « plateau herbacé ». Cette étape qui s'étend sur une quinzaine de jours et prépare un moment crucial du développement: la véraison.

III.2 Phase de maturation

La véraison correspond à l'entrée du fruit dans la phase de maturation. Elle est détectable par un changement de coloration pour les cépages rouges et un brusque ramollissement de la baie. Ces phénomènes traduisent la mise en place de nombreux changements physiologiques et métaboliques liés à la maturation : l'accumulation de sucres et de métabolites secondaires, ainsi que la reprise de la croissance par grandissement cellulaire. Cette augmentation du volume cellulaire est provoquée par l'accumulation massive d'eau et

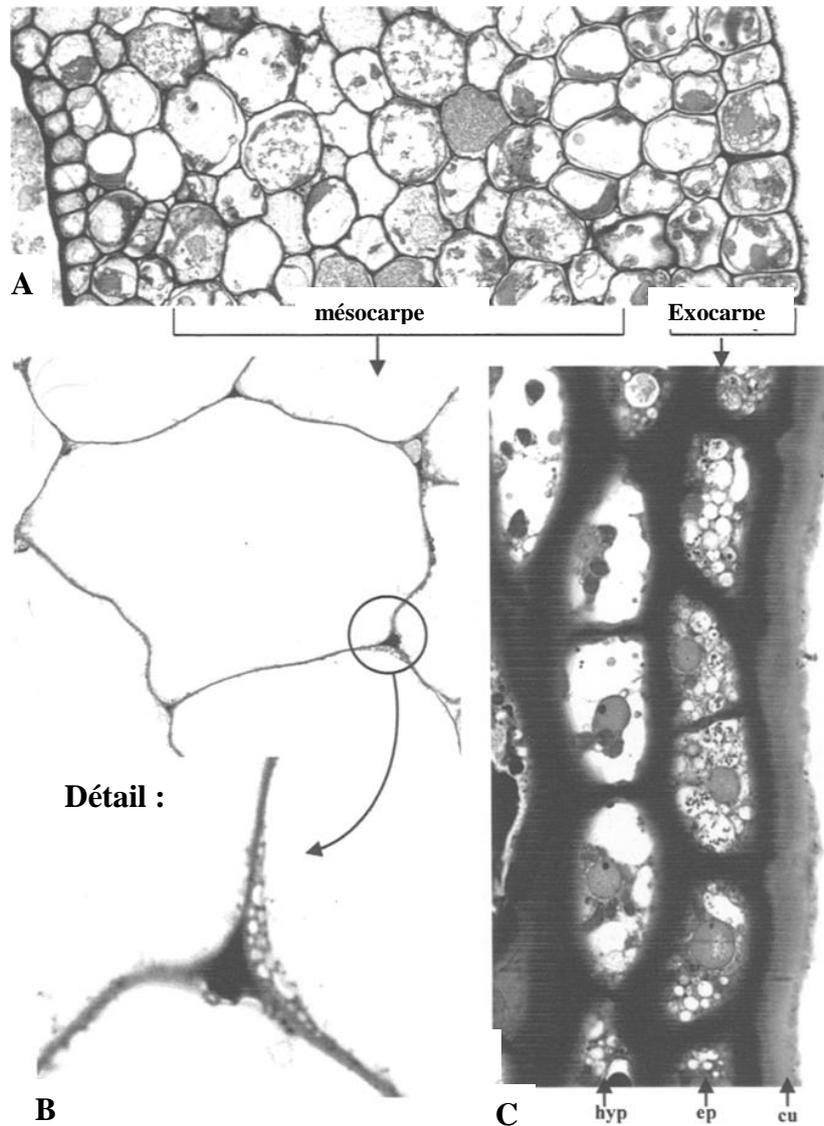


Figure 4. Evolution de la taille et de la structure des cellules au cours du développement du raisin : de la phase de développement précoce du fruit (A, grossissement : x 1200), au début du stade de maturation (B, grossissement : x 1200 ; détail x 2400) et (C, grossissement x 2100). Hyp = hypoderme, ep = epiderme, cu = cuticule (d'après Diakou et Carde, 2001).

de sucres au niveau des cellules (Coombe, 1992). Le ramollissement de la baie initié à la véraison est dû à la mise en place de changements structuraux importants des parois des cellules de la pulpe, dont une diminution de la concentration en pectines (Silacci et Morrison, 1990; Odeja *et al.*, 1999). Il favorise également le grandissement cellulaire. Les cellules de la zone pelliculaire sont étirées mécaniquement et leur largeur est diminuée par « écrasement » de la croissance des cellules sous-jacentes de la pulpe (Figure 4) (Diakou et Carde, 2001). Par ailleurs, à la fin de la maturation, plus de 100 j après anthèse, le poids des baies est environ 2 fois supérieur à celui observé pendant la phase de latence (Harris *et al.*, 1968; Kennedy, 2002) et l'eau représente 90 % du poids frais de la baie (Picaud *et al.*, 2003). La véraison étant marquée par un arrêt du flux xylémien au niveau du fruit, c'est le phloème qui apporte l'eau dans la baie au cours de la maturation (Figure 3) (Lang et Thorpe, 1989; Greenspan *et al.*, 1994, 1996). A la fin de la phase de maturation, les flux d'eau s'interrompent complètement, ce qui entraîne une diminution du volume de la baie et un flétrissement très marqué. Cette phase est appelée sur-maturation.

Parmi tous les changements se produisant pendant le développement de la baie de raisin, c'est l'accumulation rapide des sucres dans la vacuole des cellules du mésocarpe dès la véraison qui reste la modification la plus marquante (Figure 3). Le sucre importé depuis les organes sources (feuilles) vers les organes puits (fruits et jeunes feuilles) par le phloème est le saccharose (Delrot et Bonnemain, 1989), mais les sucres accumulés dans les baies sont des hexoses (glucose et fructose). La concentration vacuolaire en hexoses pouvant atteindre 1,5 M (Fillion *et al.*, 1999) pendant la phase de maturation du raisin, les baies de raisins sont considérées comme les fruits les plus sucrés (Coombe, 1976). Cependant, cette accumulation de sucres n'est pas uniforme au sein de la baie. En effet, la concentration en hexoses est maximale dans la partie médiane de la baie (Coombe, 1987). Le déchargement des sucres dans la baie s'arrête vers la fin de la maturation, lorsque leur quantité devient constante. Les sucres sont l'*osmoticum* principal participant au gonflement de la baie, mais ils constituent également le déterminant majeur caractérisant le degré de maturité du raisin.

La phase de maturation est caractérisée par une diminution de la concentration globale en acides organiques, qui deviennent majoritairement présents dans les cellules de la pellicule (Iland et Coombe, 1988). Cette diminution est due à une consommation d'acide malique par la respiration (Conde *et al.*, 2007) et à un effet de dilution liée au grossissement de la baie (Reynier, 2007). En fin de maturité, le pH atteint 3,5.

Outre la modification du rapport sucre/acide, la synthèse de composés phénoliques est également un phénomène important pour la qualité de la baie. Les composés phénoliques constituent une vaste famille de métabolites secondaires, caractérisés par la présence d'un noyau phényl avec un groupement hydroxyl: le phénol. Ces composés et leurs voies de biosynthèse, sont largement décrits dans la littérature (Ribéreau-Gayon, 1964; Lepiniec *et al.*, 2006). Dans la baie de raisin mature, les composés phénoliques les plus abondants appartiennent au groupe des flavonoïdes (anthocyanes, tanins et flavonols). Parmi eux, les anthocyanes et les flavonols (dans une moindre mesure) s'accumulent en grande quantité dans la pellicule, alors que la biosynthèse de stilbènes décroît brusquement à partir de la véraison (Figure 3) (Creasy et Coffee, 1998). Bien qu'essentiellement synthétisés au cours de la phase de croissance herbacée (cf. § III.1), la synthèse de tanins se poursuit au début de la maturation, uniquement dans les pépins, puis diminue. Ces tanins peuvent alors subir des réactions d'oxydation, brunir et se dessécher (Kennedy *et al.*, 2000; Downey *et al.*, 2003a). Au niveau de la pellicule, les tanins de la vacuole s'associent pour former des amas condensés au niveau du tonoplaste, tandis que les tanins présents dans la paroi cellulaire se lient avec des polysaccharides pariétaux ou des molécules de lignine (Downey *et al.*, 2003a; Gagné *et al.*, 2006).

L'accumulation des anthocyanes débute à la véraison de façon simultanée à celle des sucres, puis se stabilise ou diminue légèrement vers le stade vendange (Boss *et al.*, 1996). Elles ne sont détectées que dans la pellicule des cépages rouges, et plus précisément dans les 3 à 4 premières assises cellulaires de l'hypoderme (Boss *et al.*, 1996). Dans le cas des cépages dits "teinturiers", on observe aussi une accumulation des anthocyanes au niveau de la pulpe. Les anthocyanes s'accumulent en grande quantité dans la baie de raisin, où elles constituent 20 à 40 % de la fraction totale des composés phénoliques (Boss *et al.*, 1996; Gagné *et al.*, 2006). Elles ont une structure de base commune, le cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrilium. L'aglycone de l'anthocyane est appelé anthocyanidine. Les anthocyanes sont des pigments solubles dans l'eau qui, du fait de leur instabilité, n'existent pratiquement que sous leur forme glycosylée (liaison 3-glucoside chez la vigne), le plus fréquemment par des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose) (Dangles *et al.*, 1993). Cette conjugaison aux sucres jouerait un rôle dans le transport et le stockage des anthocyanes dans la vacuole. Le terme « anthocyanes » désigne donc en réalité la forme glycosylée des anthocyanidines, que l'on appelle aussi anthocyanines. La glycosylation et la méthylation participent à la stabilisation des anthocyanes en les protégeant de l'oxydation. La famille des anthocyanines comprend au moins 400 molécules, présentant une palette de

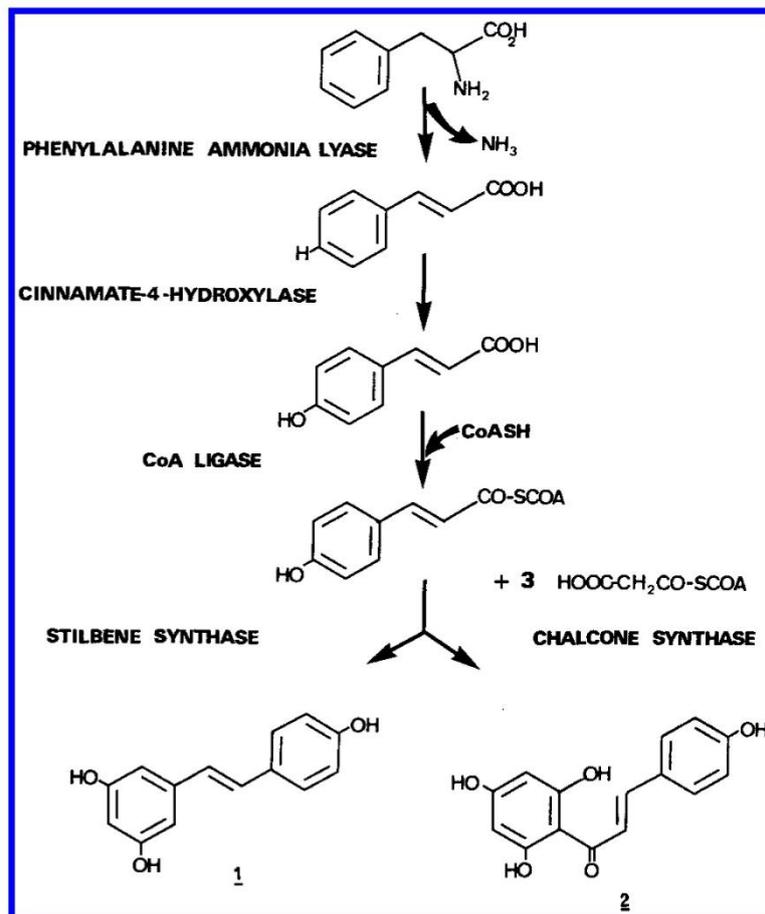


Figure 5. Biosynthèse du 1/ resvératrol et de la 2/ chalcone à partir de la phénylalanine (d'après Jeandet *et al.*, 2002).

couleurs différentes allant de l'orange-rouge à pH acide au mauve-bleu à pH basique (Kong *et al.*, 2003; Grotewold, 2006). La couleur des anthocyanes peut aussi varier suivant les modifications subies par le cation flavylum : hydroxylation, méthylation ou encore acylation (Macheix *et al.*, 2005; Grotewold, 2006). Dans les baies de l'espèce *V. vinifera*, seulement cinq anthocyanidines (delphinidine, cyanidine, péonidine, pétunidine et malvidine) sont présentes. La proportion des différentes formes d'anthocyanes synthétisées caractérise chaque variété et peut être utilisée comme critère taxonomique (Roggero *et al.*, 1988). Néanmoins la malvidine 3-O-glucoside reste l'anthocyane majoritaire du raisin.

De leur côté, les flavonols sont des pigments jaunes plus ou moins clairs, parfois non colorés, dérivant des dihydroflavonols. Ils s'accumulent dans les baies à maturité, 3 à 4 semaines après véraison, notamment en réponse à l'exposition au rayonnement UV (Downey *et al.*, 2003b). Chez la Vigne, la famille des flavonols comprend principalement 4 molécules, le kaempférol, la myricétine, la quercétine et l'isorhamnetine, qui sont présents en proportions différentes selon le cépage. Ils s'accumulent sous forme glycosylée, majoritairement quercétine-3-glucoside et quercétine-3-glucuronide (Price *et al.*, 1995; Downey *et al.*, 2003b). La biosynthèse des flavonols a lieu uniquement dans la pellicule de la baie. Toutefois, les glucosides de kaempférol peuvent aussi s'accumuler dans les inflorescences, où les flavonols contribueraient à la fertilité du pollen (Downey *et al.*, 2003b). Dans le raisin, les flavonols se trouvent globalement en quantité inférieure aux proanthocyanidines (tanins) et aux anthocyanes (Downey *et al.*, 2003b).

Chez la Vigne, la voie métabolique des flavonoïdes est bien caractérisée (Sparvoli *et al.*, 1994; Goto-Yamamoto *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2004, 2006, 2008; Bogs *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2006; Velasco *et al.*, 2007). Ces différents travaux ont permis d'identifier et de caractériser les différentes enzymes de cette voie de biosynthèse, dont la plupart sont présentes en plusieurs isoformes. La biosynthèse des flavonoïdes débute à partir d'un acide aminé aromatique issu du métabolisme primaire (voie de l'acide shikimique) : la phénylalanine. Par ailleurs, la phénylalanine ammonia lyase (PAL) est généralement la première enzyme impliquée dans la synthèse des composés phénoliques. La PAL, la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) et la p-coumarate CoA ligase (4CL) synthétisent, à partir de la phénylalanine, le précurseur commun à tous les composés phénoliques : le 4-coumaroyl-CoA. La biosynthèse des flavonoïdes et des stilbènes est initiée par la condensation de trois molécules de malonylCoA (ayant pour origine la voie de l'acétate-malonate), avec une molécule de p-coumarylCoA. Cette étape de condensation est réalisée par deux enzymes clés : la chalcone synthase (CHS) et la stilbène synthase (STS) qui conduisent respectivement à la

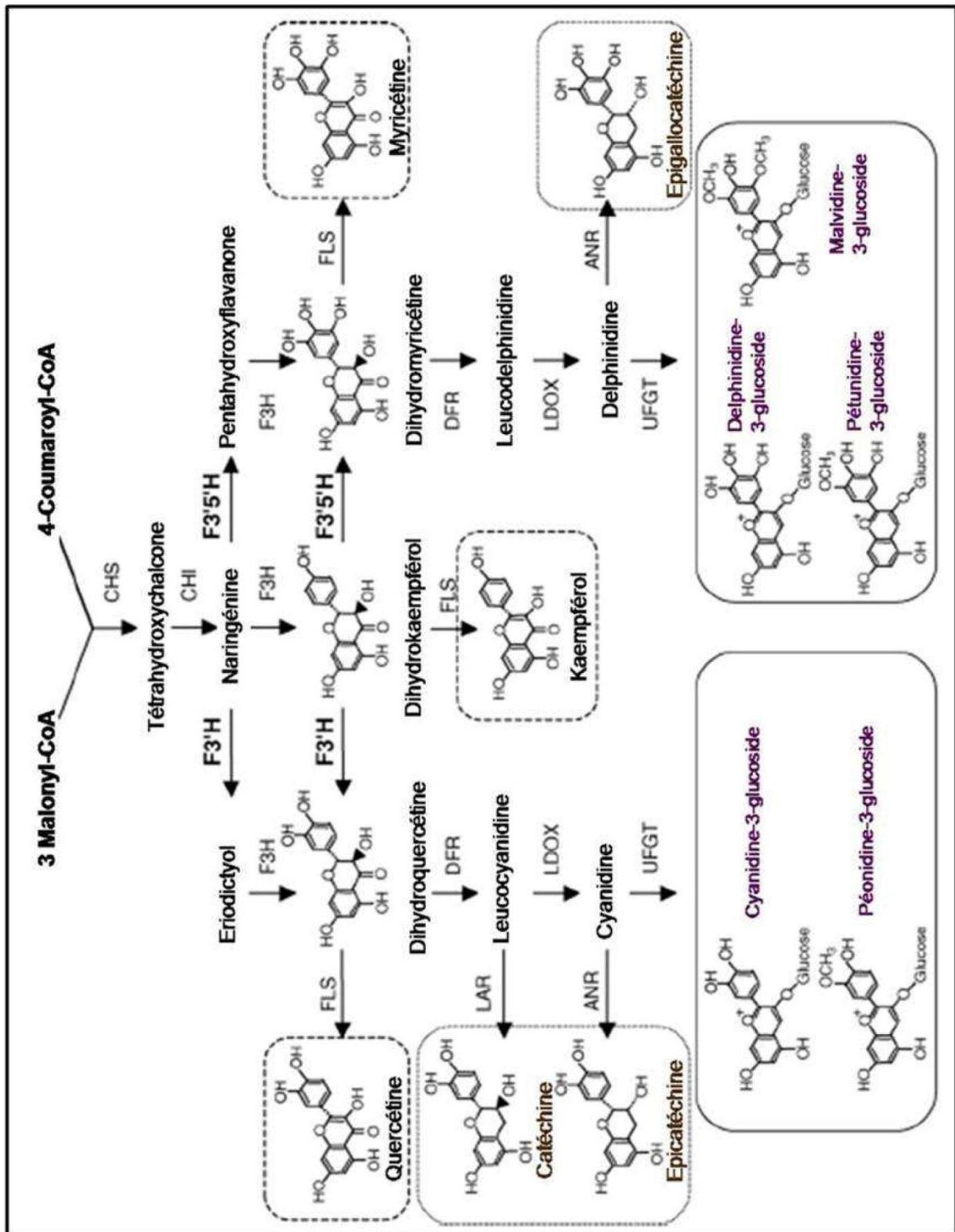


Figure 6. Voie de biosynthèse des principales classes de flavonoïdes chez la Vigne (d'après Jeong *et al.*,2006).

synthèse des flavonoïdes et des stilbènes (Figure 5). La chalcone est le premier flavonoïde produit après action de la CHS. Cette molécule subira ensuite une isomérisation *via* la chalcone isomérase (CHI) pour donner la naringénine, qui sera ensuite hydroxylée (*via* la flavanone 3-hydroxylase, F3H) pour aboutir à la production de dihydroflavonols (Figure 6). Ces derniers peuvent alors être pris en charge par la flavonol synthase (FLS) pour aboutir aux flavanols, ou subir une réduction *via* la dihydroflavonol réductase (DFR) pour former les flavan-3, 4-diols (ou leucoanthocyanidines) (Figure 6). La première enzyme qui engage les flavan-3, 4-diols vers la production d'anthocyanes est la leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX) (aussi appelée anthocyanidine synthase (ANS)) qui permet la synthèse des anthocyanidines (Figure 6). Très instables, celles-ci sont généralement transformées en anthocyanines après glycosylation. Cette dernière étape est réalisée par l'UDP glucose-flavonoïde 3-O-glucosyl transférase (UGFT), enzyme clef de la production d'anthocyanes chez la Vigne (Figure 6). En effet, cette enzyme caractéristique des cépages colorés n'est pas exprimée dans les cépages blancs (Boss *et al.*, 1996). La formation des tanins condensés est réalisée à partir des leucoanthocyaninides et anthocyanidines qui sont pris en charge respectivement par la leucoanthocyaninide réductase (LAR) et l'anthocyanidine réductase (ANR) (Figure 6). La synthèse des différents flavonoïdes nécessite donc l'intervention d'enzymes diverses et variées. Les données actuelles indiquent que ces enzymes sont principalement régulées au niveau transcriptionnel, en particulier par des facteurs de transcription de type MYB et bHLH (cf. § V.2.1 et V.3.1).

D'autre part, les anthocyanes sont transportées jusqu'à la vacuole grâce à des enzymes comme les Glutathion *S*-Transférases (GST). Lors de la réaction de conjugaison, les GST se lient notamment aux 3-glucosides d'anthocyanidine pour transférer le glutathion hydrophile à leur co-substrat (formation d'une liaison covalente), rendant ainsi la molécule soluble et inactive (Dixon *et al.*, 2002). Chez la vigne, deux GST potentiellement impliquées dans la régulation du transport des flavonoïdes ont été identifiées (Conn *et al.*, 2008). La forme conjuguée des anthocyanes est ainsi transportée jusqu'à la vacuole au pH acide, grâce à une pompe spécifique, dépendante de l'ATP. Les transporteurs de type ABC, tels que les MRPs (Multidrug Resistance-associated Proteins) sont ATP-dépendants et permettent le transport de flavonoïdes conjugués au glutathion (Kitamura, 2006). Les transporteurs de type MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) sont des transporteurs de flavonoïdes très récemment identifiés et caractérisés chez la vigne (Gomez *et al.*, 2009, 2011).

Enfin, des composés aromatiques sont également synthétisés lors de la phase de maturation (Figure 3). Ils appartiennent à de nombreuses familles chimiques et sont le plus

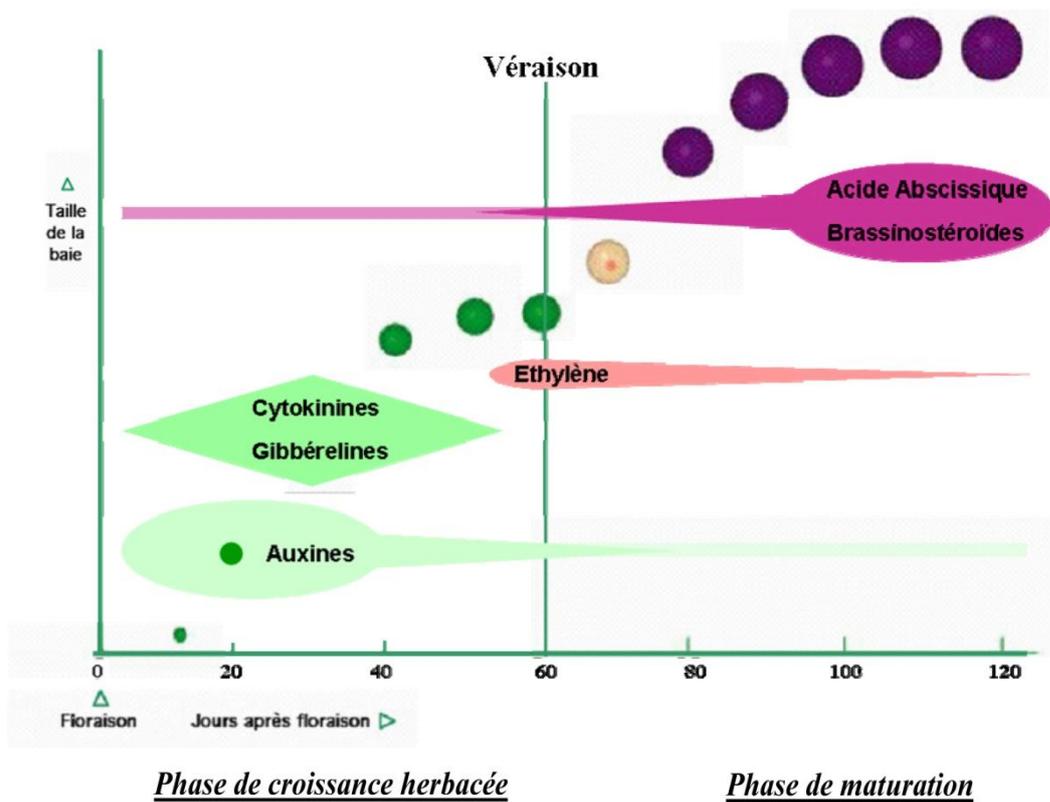


Figure 7. Régulation hormonale du développement de la baie de raisin. La taille et la couleur relative des baies sont représentées tous les 10 j à partir de la floraison. Les variations des teneurs en hormones sont indiquées par des volumes arbitraires (d'après Conde *et al.*, 2007).

souvent présents à des concentrations faibles dans la pulpe ainsi que dans la pellicule (Park *et al.*, 1991; Lund et Bohlmann., 2006; Forde *et al.*, 2011). Ces substances sont spécifiques du cépage et sont présentes dans le fruit à l'état libre ou sous forme de précurseurs glycosylés (Luan et Wust, 2002). Le potentiel aromatique du raisin est constitué de 2 groupes de composés: les précurseurs d'arômes non volatils, non odorants (glycosides, acides gras ou encore acides phénols) et les composés volatils odorants (terpènes, isoprénoïdes). La famille des terpènes a été particulièrement étudiée ces dernières années. Une cinquantaine de composés terpéniques ont été identifiés dans le raisin (Conde *et al.*, 2007). La pellicule est plus riche en composés terpéniques que la pulpe. Leurs taux augmentent au cours du développement, mais de façon beaucoup plus significative au cours de la maturation de la baie et même parfois au-delà du stade mûr.

IV. La signalisation hormonale dans le développement du fruit charnu

Les hormones végétales (phytohormones) sont des molécules endogènes aux tissus végétaux qui agissent à de très faibles concentrations (de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-5} M). Elles véhiculent l'information apportée à une « cellule cible » d'un organe ou tissu sensible à son action, dont elle va influencer le fonctionnement et le développement. Cette définition implique une communication intercellulaire, qui couplée à la régulation endocellulaire, va conduire au contrôle du développement de la plante (Kende et Zeevaart, 1997). Dans un organe, l'homéostasie d'une hormone dépend d'un équilibre entre sa biosynthèse, sa dégradation, son importation et son exportation.

Les principales hormones décrites à ce jour dans la baie de raisin sont : l'auxine, l'acide abscissique (ABA), les gibbérélines (GA), les cytokinines (CK), l'éthylène, et plus récemment les brassinostéroïdes (BR) (Conde *et al.*, 2007). L'auxine, les gibbérélines et les cytokinines sont à leur concentration maximale dans la baie avant le plateau herbacé. Leur concentration diminue ensuite de façon drastique avant la véraison (Figure 7). A l'opposé, la concentration en ABA demeure faible pendant la phase herbacée, pour ensuite augmenter fortement juste avant la véraison. Les brassinostéroïdes sont eux aussi préférentiellement accumulés durant la phase de maturation du raisin (Figure 7) (Conde *et al.*, 2007). A l'inverse des fruits climactériques, pour lesquels le déclenchement de la maturation est caractérisé par une crise respiratoire liée à une brusque stimulation de la synthèse d'éthylène, chez les fruits non climactériques comme le raisin, le taux respiratoire et la synthèse d'éthylène évoluent peu au cours du développement (Figure 7). Un pic de production d'éthylène a été décrit dans la littérature, mais les concentrations produites sont négligeables (de l'ordre de $0,4 \mu\text{L/L}$) par

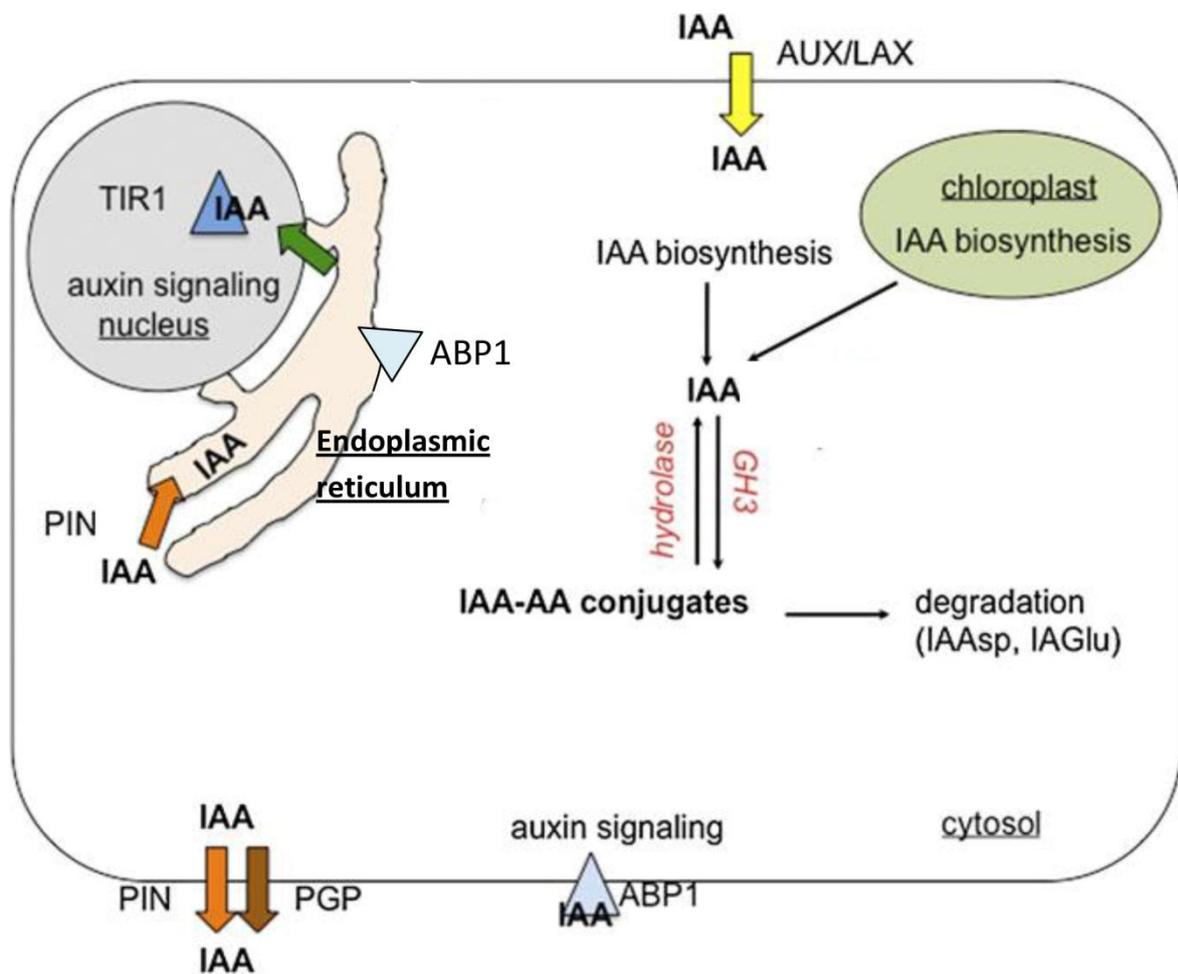


Figure 8. Schéma simplifié de la localisation subcellulaire de différents composants du métabolisme, du transport et de la perception auxinique (d'après Ludwig-Muller, 2011).

rapport aux valeurs observées dans les fruits climactériques (500 µL/L) (Alleweldt et Koch, 1977).

Contrairement aux fruits climactériques pour lesquels l'implication des hormones dans le développement et la maturation du fruit a largement été étudiée (Gillaspy *et al.*, 1993; Adams-Phillips *et al.*, 2004 ; Srivastava et Handa, 2005 ; Mariotti *et al.*, 2011), les données concernant le contrôle hormonal et sa régulation au cours du développement et de la maturation du fruit non climactérique restent encore fragmentaires. Néanmoins, s'il est généralement admis que le rôle de l'éthylène dans le développement des fruits non climactériques est faible, d'autres hormones comme l'auxine et l'ABA semblent avoir une fonction prépondérante dans le développement du raisin. En effet, l'auxine stimule le développement précoce du raisin, alors qu'elle inhibe la maturation (Davies *et al.*, 1997). A l'inverse, une application d'ABA favorise les processus de maturation (Coombe, 1992). Par ailleurs, des résultats similaires ont été obtenus chez un autre fruit non climactérique : la fraise (Kano et Asahira, 1981; Archbold et Dennis, 1984; Perkins-Veazie, 1995).

IV.1. L'auxine

IV.1.1. Généralités

L'acide indole 3-acétique (AIA) est la molécule d'auxine la plus couramment retrouvée chez les végétaux supérieurs. Elle se caractérise par son rôle dans la croissance des plantes. La mise en place de gradients d'auxine dans les tissus permet de réguler de manière très fine de nombreux aspects du développement (Tromas et Perrot Rechenmann, 2010). Aussi, le contrôle de son métabolisme et de sa distribution est fondamental pour que l'auxine assure sa pleine fonction. La régulation du métabolisme de l'auxine regroupe les processus de biosynthèse et de conjugaison (Bajguz et Piotrowska, 2009), la production de formes conjuguées de l'auxine permettant en particulier le stockage temporaire ou la dégradation de cette molécule (Cohen *et al.*, 1982). Cette conjugaison est réalisée notamment par des protéines de la famille *GH3* (*GRETCHENHAGEN-3*), qui lient l'auxine avec des acides aminés (Figure 8) (Staswick *et al.*, 2002, 2005). D'autre part, la distribution de l'auxine est assurée par des transporteurs d'influx (*AUX1/LAX*) et d'efflux (*PIN* et *MDR/PGP* (multidrug resistance/P-glycoproteins)) (Figure 8) (Vieten *et al.*, 2007). Les *PIN* (*pin formed*) présentent une localisation cellulaire polarisée et asymétrique qui va déterminer la direction du flux d'auxine (Goldsmith *et al.*, 1977 ; Wisniewska et al, 2006). Par ailleurs, il a longtemps été admis que l'apex de la tige, plus précisément les méristèmes et jeunes feuilles des bourgeons terminaux était la seule source de production d'auxine et que les autres organes étaient

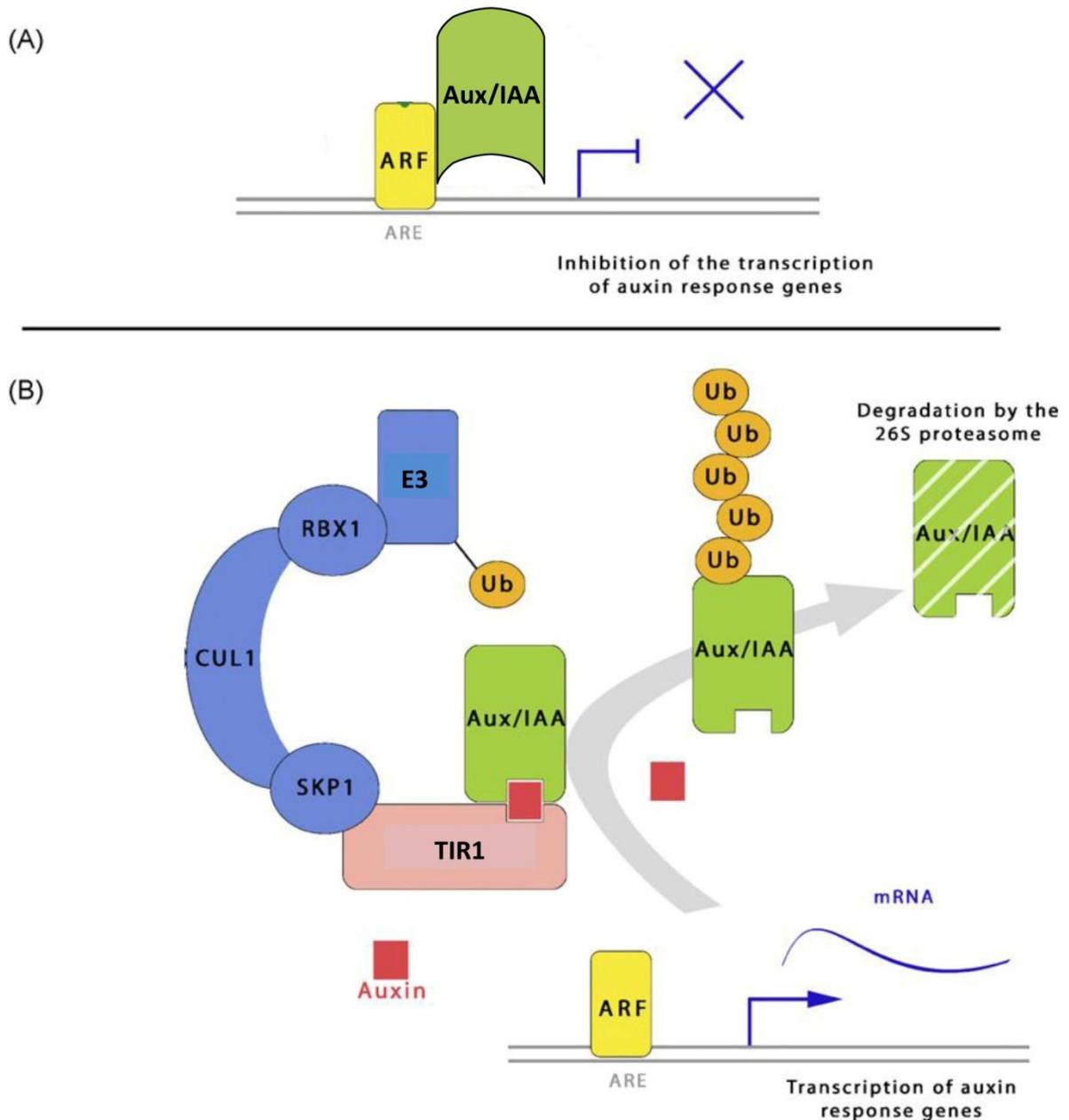


Figure 9. Schématisation de la voie de signalisation auxinique et du contrôle de la transcription en réponse à l’auxine : (A) en l’absence ou présence de faibles concentrations d’auxine, (B) en présence de concentrations élevées d’auxine (d’après Tromas et Perrot-Rechenmann, 2010).

dépendants du transport polarisé de l'auxine (Ljung *et al.*, 2001). Cependant, des travaux récents ont montré que la plupart des tissus et notamment les racines, les feuilles ou les fruits, étaient capables de synthétiser de l'auxine (Cheng *et al.*, 2007). Cette biosynthèse localisée jouerait également un rôle clef dans la mise en place des gradients locaux d'auxine (Tao *et al.*, 2008, Ikeda *et al.*, 2009) et donc dans le développement de ces tissus. Enfin, un autre élément déterminant dans la fonction de l'auxine est la transmission de son signal au niveau cellulaire. Les mécanismes de signalisation impliquent notamment des protéines kinases (MAPK, Mockaitis *et al.*, 2000), ainsi que des récepteurs (TIR1 et ABP1, Ruegger *et al.*, 1997) et des facteurs de transcriptions de type AUX/IAA et ARF (Okushima *et al.*, 2005 ; Overvoorde *et al.*, 2005), lesquels sont décrits ci-après.

IV.1.2. La signalisation auxinique

Deux récepteurs à l'auxine ont été identifiés : il s'agit d'ABP1 (AUXIN BINDING PROTEIN 1) et de TIR1 (Transport Inhibitor Response 1). ABP1 est un transporteur membranaire localisé niveau du plasmalemme et du réticulum endoplasmique des cellules (Figure 8) (Henderson *et al.*, 1997; Diekmann *et al.*, 1995). A l'opposé, TIR1 (Ruegger *et al.*, 1997; Dharmasiri *et al.*, 2005; Leyser *et al.*, 2005) est un récepteur nucléaire appartenant à une sous-famille de F-box riche en domaine LRR, nommée ABF « Auxin signalling F-Box » (Dharmasiri *et al.*, 2005) impliquée dans les voies de dégradation par le protéasome (Figure 9). TIR1 s'associe avec les protéines SKP1 et CULLIN pour former le complexe ubiquitine ligase E3 nommé SCF/TIR1 (SKP1-CULLIN1-Fbox-TIR1). Le complexe SCF est composé de 4 sous-unités : CULLIN/Cdc53, Skp1/ASK1, RBX1/ROC/Hrt1 et TIR1. Ce récepteur TIR1 qui confère sa spécificité au complexe est un élément clef de la voie de signalisation auxinique en amont de la régulation de l'expression des gènes (Mockaitis et Estelle, 2008).

Les mécanismes de signalisation assurés par TIR1 font intervenir 2 autres protéines que sont les facteurs ARF (Auxin response factors) (Okushima *et al.*, 2005; Guilfoyle et Hagen, 2007) et AUX/IAA (Auxin/IAA) (Overvoorde *et al.*, 2005). Les ARF sont des facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation de l'expression des gènes de réponse à l'auxine. En général, les ARF agissent comme des activateurs de la transcription, bien que certains d'entre eux possèdent une activité de répresseur (Tiwari *et al.*, 2003; Guilfoyle et Hagen, 2007). De leur côté, les AUX/IAA régulent l'action des ARF en les « piégeant » (Santner and Estelle, 2009). Dans ce contexte, en absence ou en présence de faibles concentrations en auxine, des dimères entre les ARF-AUX/IAA se forment (Tiwari *et al.*, 2004) (Figure 9). Les ARF ainsi piégés ne peuvent plus assurer leur activité transcriptionnelle

liée à l'auxine. A l'inverse, de fortes concentrations en auxine induisent la liaison de l'hormone sur son récepteur TIR1. Celui-ci interagit en retour avec la séquence consensus GWPPV/I du domaine II du facteur AUX/IAA (Gray *et al.*, 2001) afin de le recruter au niveau du complexe SCF/TIR1 et de conduire à sa dégradation par le protéasome 26S (Figure 9) (Gray *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2007). Les ARFs sont alors libres de jouer leur rôle de régulateurs transcriptionnels des gènes auxine-dépendants. Les gènes induits de façon précoce par l'auxine sont reconnus par les ARF grâce à la présence d'éléments cis-régulateurs au niveau de leur promoteur appelés « Auxin Response Elements » (ARE). Ces gènes sont regroupés en 3 familles (Abel et Theologis, 1996) : les gènes *GH3*, les gènes *Small Auxin Up RNA (SAUR)* et les gènes *AUX/IAA* (Chapman et Estelle, 2009). Les gènes *SAUR* codent pour de petits transcrits très conservés à demi-vie courte (McClure et Guilfoyle, 1987) dont la fonction est encore inconnue (Yang et Poovaiah, 2000). Les *GH3* et les *AUX/IAA* participeraient respectivement au rétrocontrôle négatif de la voie en maîtrisant la quantité d'auxine active libre (par conjugaison) (Staswick *et al.*, 2005) et à l'inactivation des ARF afin de réprimer l'expression des gènes de réponses à l'auxine (Benjamins et Scheres, 2008). Outre ces 3 familles, des analyses récentes suggèrent la présence de nombreux autres régulateurs de la réponse précoce à l'auxine (Pufky *et al.*, 2003; Paponov *et al.*, 2008).

IV.1.3. Fonctions de l'auxine dans le développement du fruit charnu

De nombreuses réponses environnementales et développementales sont liés à des « mouvements » de l'auxine dans la plante. L'une des actions les plus importantes de l'auxine est le contrôle de la division et de l'élongation cellulaire. Généralement, de fortes concentrations en auxine stimulent la division cellulaire, alors que de faibles concentrations provoquent l'élongation et la différenciation cellulaire (Zazimalova *et al.*, 1995; Winicur *et al.*, 1998).

La mise en place du fruit est définie comme la transition entre un ovaire quiescent et un jeune fruit grossissant rapidement. Chez de nombreuses espèces, cette mise en place et les étapes précoces de développement du fruit (reprise de la division et de l'élongation cellulaire au niveau de l'ovaire) sont gouvernés par des signaux de croissance impliquant notamment l'auxine (Wittwer *et al.*, 1957; Gillaspay *et al.*, 1993; Srinivasan *et al.*, 1996; Vivian-Smith *et al.*, 1999; Ozga *et al.*, 2002, 2003). Chez la Tomate, la fécondation entraîne l'augmentation de la teneur en auxine dans le carpelle (Sastry et Muir, 1963) et de fortes concentrations en auxine sont retrouvées dans le fruit en développement (Crane, 1964). L'application d'auxine exogène sur des fleurs émasculées permet le développement du fruit en l'absence de

fécondation. Les fruits ainsi obtenus, dépourvus de graines viables, sont dits « parthénocarpiques » (Gustafson, 1937; Nitsch, 1970). Chez la tomate, les fruits parthénocarpiques sont généralement plus petits que les fruits présentant des graines (Mapelli *et al.*, 1978), la phase de division cellulaire étant plus intense mais moins longue que chez les fruits sauvages. Ces fruits parthénocarpiques présentent un nombre identique de cellules, mais ces dernières ont une taille inférieure par rapport aux fruits sauvages (Bunger-Kibler et Bangerth, 1983). Chez l'aubergine, la parthénocarpie a également été observée par expression ectopique du gène bactérien *iaaM* codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'auxine (Rotino *et al.*, 1997). Des résultats similaires ont été obtenus chez la Tomate (Ficcadenti *et al.*, 1999), le Concombre (Yin *et al.* 2006), le framboisier, le fraisier (Mezzetti *et al.*, 2004) et la Vigne (Costantini *et al.*, 2007).

De nombreuses études suggèrent que les graines sont la principale source d'auxine (Sundberg et Østergaard, 2009). En effet, contrairement aux fruits parthénocarpiques qui ne possèdent qu'un pic de production d'auxine au cours de leur développement (Mapelli *et al.*, 1978), le fruit de tomate présente 2 pics de production à 8 jours et 30 jours après pollinisation (Gillaspy *et al.*, 1993). De façon intéressante, les travaux de Lemaire-Chamley *et al.* (2005) ont révélé que, chez la Tomate, il existe un gradient d'expression de gènes clefs de la biosynthèse, du transport, et de la signalisation auxinique, depuis la partie centrale du fruit (placenta et tissu loculaire) vers les parties plus externes. Ce phénomène pourrait être la conséquence, après fécondation, du transport de l'auxine nouvellement synthétisée dans la partie centrale du fruit (ovules en développement et tissus adjacents) vers les parties plus externes (péricarpe). Ce transport est responsable de la formation d'un gradient d'auxine dans le fruit qui se traduit par des processus de divisions et d'élongation cellulaires. D'autres travaux plus récents confirment que l'auxine est transportée de façon basipète depuis l'ovaire vers le pédoncule et montrent qu'une inhibition de ce transport d'auxine se traduit par la croissance du fruit en l'absence de fécondation (Serrani *et al.*, 2010). Le transporteur d'efflux d'auxine PIN7-like (AW647801), pourrait jouer un rôle crucial dans la mise en place de ce gradient, et donc dans la morphogénèse du fruit (Benkova *et al.*, 2003; Lemaire-Chamley *et al.*, 2005). Des résultats récents confirment le rôle important joué par PIN7-like (SIPIN2) dans le transport de l'auxine au niveau du fruit et montrent que son expression est localisée au niveau des graines (Nishio *et al.*, 2010).

La signalisation auxinique médiée par le complexe TIR1-AUX/IAA-ARF joue également un rôle clef dans le développement du fruit charnu. En effet, la fécondation a un effet significatif sur les gènes de réponse à l'auxine tels que les Aux/IAA et les ARF (Kim *et*

al., 1997; Guilfoyle *et al.*, 1998). Chez la Tomate *IAA2*, *IAA14* et *ARF9* sont spécifiquement induits dans les tissus du placenta et des ovules des ovaires fécondés (Vriezen *et al.*, 2008). D'autre part, la sous-expression de *SIARF7* et de *SIIAA9* chez la Tomate conduit à la formation de lignées parthénocarpiques (Wang *et al.*, 2005; de Jong *et al.*, 2009). Ces gènes apparaissent donc comme des régulateurs négatifs de la mise en place du fruit. Par ailleurs, Ren *et al.* (2011) ont récemment démontré que TIR1 pouvait jouer le rôle de régulateur positif de la mise en place du fruit. En effet, sa surexpression chez la Tomate provoque la formation de fruits parthénocarpiques et affecte l'expression de certains gènes impliqués dans la signalisation auxinique tels que *SIIAA3*, *SIIAA9*, et *SIARF7*. Enfin, la sous-expression du gène *AUCSIA* chez la Tomate entraîne une altération du développement des feuilles et du transport polarisé de l'auxine au niveau des racines (Molesini *et al.*, 2009). Dans ce contexte, la quantité d'auxine est anormalement élevée dans les bourgeons floraux, ce qui aboutit à la formation de fruits parthénocarpiques. L'origine de cette forte accumulation d'auxine n'est pas encore élucidée, tout comme le rôle exact de ce gène dans la transduction du signal auxinique (Molesini *et al.*, 2009).

L'auxine joue un rôle majeur dans la mise en place et le développement précoce du fruit, mais elle apparaît aussi comme un régulateur négatif des processus de maturation. Le niveau d'auxine est élevé dans les jeunes fruits, puis il décline progressivement jusqu'à l'initiation de la maturation. Cette baisse de la concentration en auxine s'accompagne également d'une diminution de l'expression des gènes régulés par l'auxine peu avant la mise en place de la phase de maturation. Ces résultats ont été observés à la fois pour les fruits charnus climactériques comme la tomate (Mapelli *et al.*, 1978; Buta et Spaulding, 1994; Catala *et al.*, 2000), la banane (Purgatto *et al.*, 2002), la datte (Abbas *et al.*, 2000) et non climactériques comme la fraise (Archbold et Dennis, 1984 ; Given *et al.*, 1988; Perkins-Veazie, 1995; Liu *et al.*, 2011) et le raisin (Inaba *et al.*, 1976; Cawthon et Morris, 1982; Zhang *et al.*, 2003; Deytieux-Belleau *et al.*, 2007; Böttcher *et al.*, 2010a). L'apport exogène d'auxine retarde le déclenchement de la maturation du fruit et réprime l'expression des gènes impliqués dans la maturation chez les fruits climactériques (Vendrell 1969, 1985; Frenkel et Dyck, 1973; Tingwa et Young, 1975; Manning 1994; Purgatto *et al.*, 2002; Fabbioni *et al.*, 2006) et non climactériques (Manning, 1998; Harpster *et al.*, 1998; Aharoni *et al.*, 2002). Par exemple, chez la fraise, l'application d'auxine se traduit par la répression de gènes impliqués dans le ramollissement (polygalacturonase), la synthèse d'arômes (enone oxidoreductase) et la coloration (Anthocyanidin-3-O-glucosyltransférase) (Klein *et al.*, 2007; Griesser *et al.*, 2008; Quesada *et al.*, 2009). A l'opposé, chez le Fraisier, la suppression des akènes (source

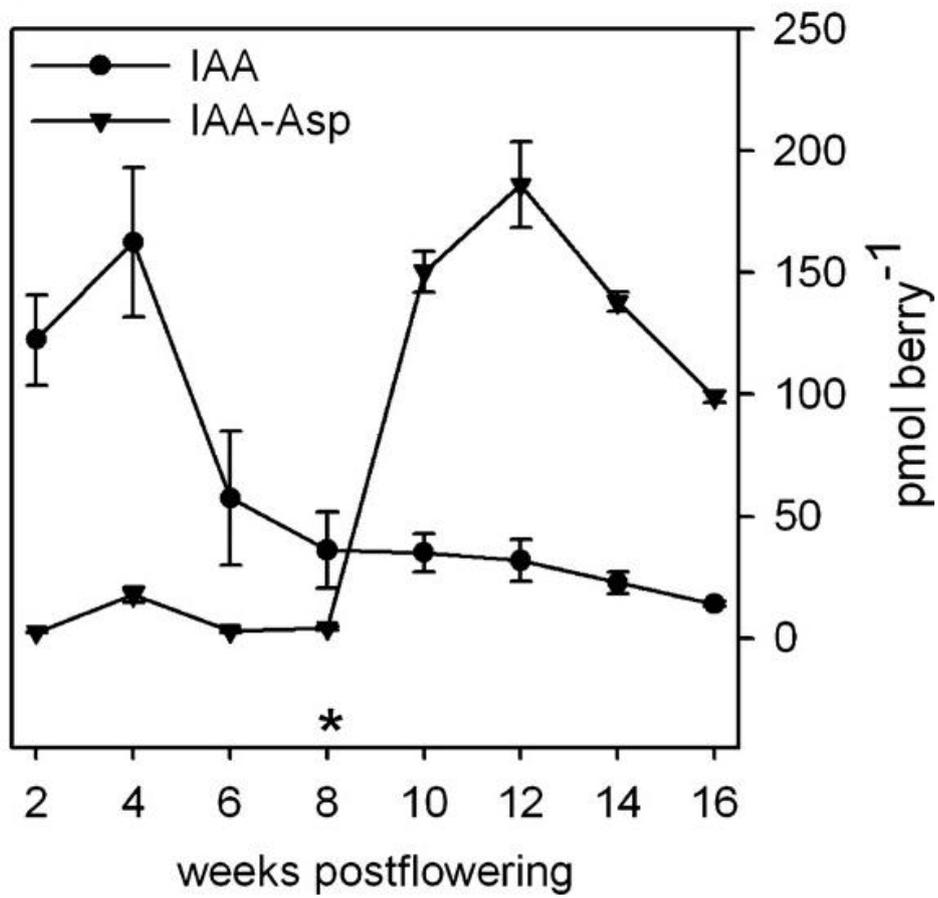


Figure 10. Quantification des taux d'auxine (AIA) et de son conjugué AIA-Asp au cours du développement de la baie de raisin. L'astérisque indique la véraison (d'après Böttcher *et al.*, 2010b).

d'auxine), provoque une accélération du processus de maturation de la fraise comme la dégradation de la chlorophylle, le ramollissement du fruit et l'accumulation d'anthocyanes (Given *et al.*, 1988). Ces résultats confirment donc le rôle très important de l'auxine dans les processus de mise en place de la maturation du fruit, au cours duquel une réduction de la concentration en auxine est pré-requise (Frenkel, 1972; Given *et al.*, 1988; Buta et Spaulding, 1994; Purgatto *et al.*, 2002).

IV.1.4. Rôle de l'auxine dans le développement de la baie de raisin

L'auxine joue un rôle important dans le développement du raisin. En effet, l'addition d'auxine exogène se traduit par un retard de maturation (Weaver, 1962; Hale, 1968; Hale *et al.*, 1970; Davies *et al.*, 1997; Yakushiji *et al.*, 2001; Ban *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2006; Deytieux-Belleau *et al.*, 2007; Böttcher *et al.*, 2010a). Ainsi, quand elle est appliquée juste avant véraison, l'auxine retarde la diminution de l'acidité et celle de la synthèse de chlorophylle, et elle réduit l'accumulation des sucres, des anthocyanes et de l'ABA (régulateur positif de la maturation de la baie de raisin) (Coombe and Hale, 1973; Davies *et al.*, 1997; Ban *et al.*, 2003; Wheeler *et al.*, 2009).

Les données relatives aux mécanismes moléculaires impliquant l'auxine dans le développement de la baie sont encore très fragmentaires. Des études transcriptomiques réalisées au cours du développement de la baie de raisin soulignent que les gènes impliqués dans l'homéostasie et la signalisation auxinique sont principalement exprimés au cours des stades précoces (Deluc *et al.*, 2007; Pilati *et al.*, 2007). Récemment, Böttcher *et al.* (2010b, 2011) ont montré que les protéines de type GH3 jouaient un rôle dans le développement du fruit. Ces protéines contribueraient au maintien de la concentration en auxine à un niveau faible afin de permettre la mise en place des processus de maturation. Ainsi, ces auteurs ont démontré chez la tomate et la vigne, une corrélation entre la réduction de la teneur en auxine libre et l'augmentation des formes conjuguées de l'auxine (Figure 10). Sur les six GH3 étudiées au cours du développement de la baie de raisin, quatre présentent une expression préférentielle lors des stades précoces du développement du fruit (lorsque la teneur en auxine est plus élevée) et deux sont exprimés plus tardivement: 6 semaines après floraison (*GH3-2*) et 10 semaines après floraison (*GH3-1*). Les auteurs suggèrent que les quatre premières GH3 participeraient à la régulation de l'homéostasie de l'auxine et que les deux dernières permettraient le maintien de l'auxine à des concentrations faibles avant et après véraison. De façon très intéressante, un traitement AIA juste avant la véraison provoque l'induction de l'expression de *GH3-2* ainsi qu'une augmentation de la teneur en AIA-Asp conjointement à

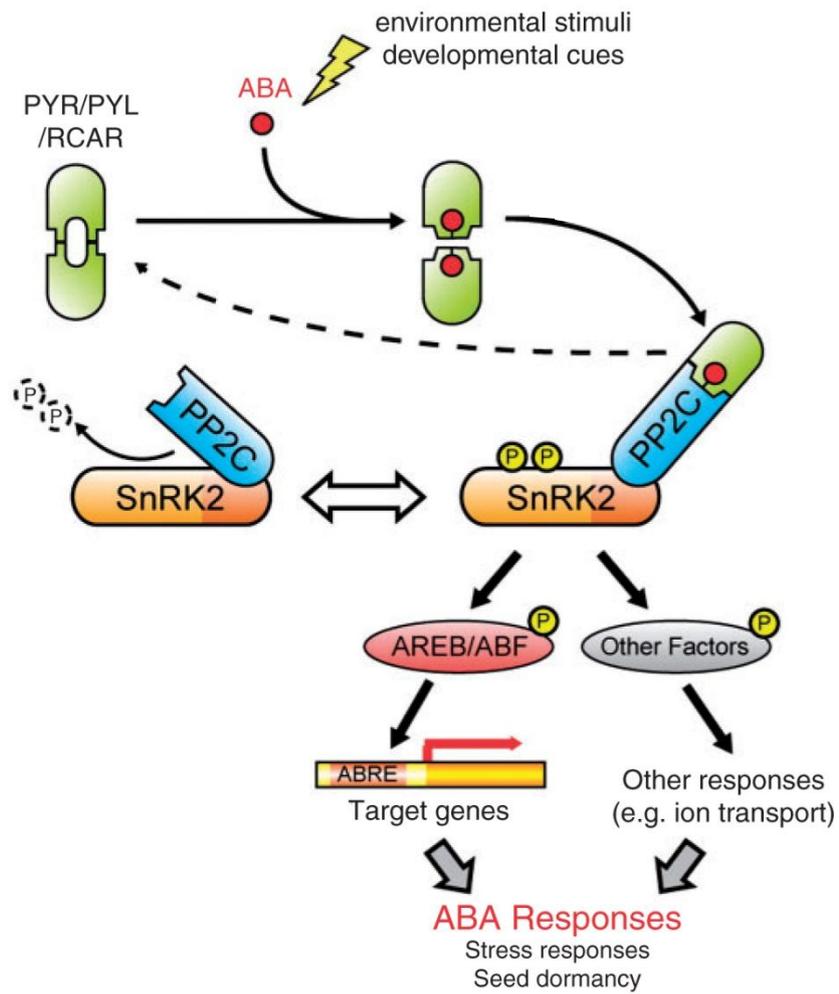


Figure 11. Schéma de la voie de signalisation ABA impliquant les récepteurs PYR/PYL/RCAR (d'après Umezwa *et al.*, 2010).

une diminution de l'AIA libre. Ces conjugués AIA-Asp ne peuvent pas être pris en charge par les hydrolases, et donc être restitués sous forme d'AIA libre (LeClere *et al.*, 2002). Ils ne servent donc pas au stockage de l'AIA, mais conduiraient à l'inactivation des molécules d'AIA par oxydation (Östin *et al.*, 1998; Staswick *et al.*, 2005). Enfin, des travaux récents ont permis d'identifier un facteur de transcription, appelé IAA19 et appartenant à la famille des régulateurs transcriptionnels AUX/IAA. Le gène correspondant n'est pas inductible par l'auxine et est exprimé préférentiellement à partir de la véraison et durant la phase de maturation du raisin. Lorsque IAA19 est surexprimé chez *Arabidopsis*, il provoque une augmentation de la vitesse de croissance de la plante. Les auteurs suggèrent donc un rôle clef de ce FT dans la régulation de la croissance (Kohnno *et al.*, 2011).

IV.2. L'acide absissique

L'ABA joue majoritairement un rôle dans l'adaptation aux stress biotiques et abiotiques (Christmann *et al.*, 2006, 2007; Adie *et al.*, 2007; Ton *et al.*, 2009), mais également dans différents aspects développementaux des plantes tels que la maturation et la germination des graines (Leung et Giraudat, 1998), ou le développement et la maturation du fruit (cf. § IV.2.3).

IV.2.1. La signalisation ABA

De nombreux progrès ont récemment été réalisés dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la signalisation ABA (Cutler *et al.*, 2010; Hubbard *et al.*, 2010; Klingler *et al.*, 2010; Raghavendra *et al.*, 2010).

Les principaux composants du complexe de signalisation par l'ABA sont : les récepteurs solubles PYR/PYL/RCARs (PYRABACTIN RESISTANCE/PYR-like/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR), les PP2CA (protéines phosphatases de type 2C et de groupe A) et les SnRK2 (SNF1-related proteine kinase 2) (Figure 11) (Fujii *et al.*, 2009, Umezawa *et al.*, 2009). Les protéines PYR/PYL/RCAR et les SnRK2, sont des régulateurs positifs de la signalisation ABA, alors que les PP2CA sont des régulateurs négatifs de la voie (Hirayama et Shinozaki, 2007). Les PP2CA sont impliquées dans la régulation en amont de la réponse à l'ABA médiée par les SnRK2. Sans ABA, les PP2CA inactivent les SnRK2 par déphosphorylation, inhibant ainsi la réponse à l'ABA (Figure 11). En présence d'ABA, cette hormone se lie aux récepteurs PYR/PYL/RCAR, provoquant ainsi leur changement de conformation. Ceux-ci interagissent alors directement avec les PP2CA et inhibent leur activité phosphatase (Figure 11). Les SnRK2 sont alors

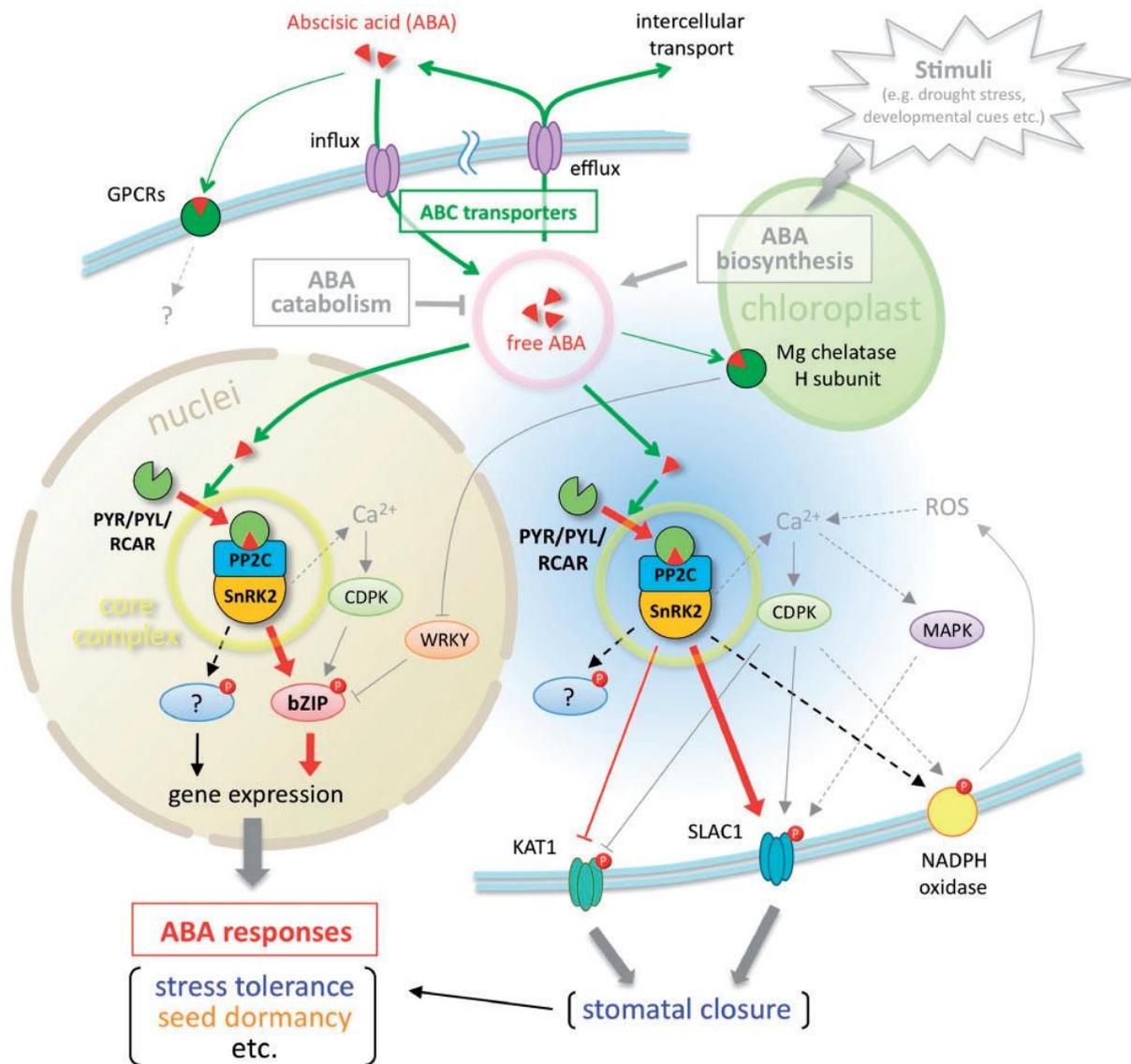


Figure 12. Schéma global des interactions entre les différents composants impliqués dans la signalisation par l'ABA (d'après Umezwa *et al.*, 2010).

libérées et vont permettre la transduction du signal ABA en phosphorylant soit des protéines nucléaires tels que des facteurs de transcription AREB/ABF de la famille « basic-domain leucine zipper » (b-ZIP), soit des protéines membranaires telles que des canaux ioniques (KAT1, SLAC1) (Figure 11 et 13) (Fujii *et al.*, 2009; Umezwa *et al.*, 2010). Outre les SnRK2, d'autres protéines kinases telles que des CDPK (calcium dépendant protéine kinase) peuvent également intervenir dans ces processus de phosphorylation (Figure 12) (Umezawa *et al.*, 2010).

D'autres protéines liant l'ABA ont été identifiées et caractérisées. Il s'agit de récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) localisés au niveau de la membrane plasmique (GCR2, Liu *et al.*, 2007; GTG1/GTG2, Pandey *et al.*, 2009) et de sous-unités H de Mg chélatase localisées au niveau des plastes (Figure 12) (ABAR/CHLH/GUN5 : Shen *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2010). Selon le modèle proposé par Shang *et al.* (2010), en présence d'ABA, le récepteur plastidique ABAR/CHLH se lie à des facteurs de transcription de type WRKY (WRKY40, WRKY18, et WRKY60). Ces facteurs de transcription sont des régulateurs négatifs de la signalisation ABA qui bloquent l'expression de certains gènes de réponse à l'ABA comme le facteur de transcription de type b-ZIP ABI5 (Shang *et al.*, 2010) (Figure 12). L'interaction ABAR/CHLH-WRKY40 libère ce gène de l'effet inhibiteur de WRKY40 (Figure 12) (Shang *et al.*, 2010).

IV.2. 2. Les facteurs de transcription du groupe AREB/ABF

La régulation transcriptionnelle est un phénomène majeur de la signalisation ABA. La comparaison des transcriptomes d'*Arabidopsis* et de Riz exposés à l'ABA ainsi qu'à différents stress abiotiques révèle que 5 à 10 % du génome de ces espèces est affecté, la moitié de ces changements étant communs au stress hydrique, au stress osmotique et au traitement par l'ABA (Nakashima *et al.*, 2009; Shinozaki *et al.*, 2003). D'autres études transcriptomiques ont mis en évidence les réponses physiologiques et biochimiques induites par l'addition d'ABA exogène (Seki *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2007; Matsui *et al.*, 2008). Plus de 200 gènes codant des facteurs de transcription représentant au moins 20 familles protéiques ont été identifiés (Nemhauser *et al.*, 2006). Le rôle spécifique de la plupart de ces protéines dans la réponse à l'ABA est encore inconnu. Néanmoins, pour certains d'entre eux, l'implication dans la réponse à l'ABA a été clairement démontrée (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2006). Il s'agit de facteurs de transcription de type b-ZIP tels que les AREB/ABFs (ABRE binding protein/ABRE binding factors) (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000), bHLH (Li *et al.*, 2007; Abe *et al.*, 2003), B3 domain (ABI3/VP1; Khandelwal *et al.*, 2010),

AP2/DREB (dehydration responsive elements binding proteins (ABI4; Finkelstein, 1994), homeodomain–leucine zipper (HD-ZIP) (ATHB6, Himmelbach *et al.*, 2002; Ariel *et al.*, 2007), NAC (RD-26 ; Fujita *et al.*, 2004), WRKY (Xie *et al.*, 2005 ; WRKY2, Jiang *et al.*, 2009) ou encore MYB (Abe *et al.*, 2003).

Les protéines AREB/ABF codent pour des facteurs de transcriptions du groupe A de la famille b-ZIP (Jakoby *et al.*, 2002). Parmi les b-ZIP du groupe A, *AREB1/ABF2*, *AREB2/ABF4* et *ABF3* sont induits par l'ABA et par les stress hydrique et osmotique (Fujita *et al.*, 2005). Ces facteurs de transcriptions sont capables d'interagir avec les boîtes ABREs (ABA Response Element ; PyACGTGG/TC) présentes au niveau du promoteur des gènes régulés par l'ABA (Zhang *et al.*, 2005; Gomez-Porrás *et al.*, 2007). Une analyse transcriptomique réalisée à partir de triples mutants *areb1 areb2 abf3* a permis d'identifier de nouveaux gènes intervenant en aval des AREB/ABF (Yoshida *et al.*, 2010). Il s'agit de gènes codant des protéines de type LEA (late embryogenesis abundant protein) (LEA), PP2CA ou encore d'autres facteurs de transcription. Ce triple mutant *areb1 areb2 abf3* présente une très forte insensibilité à l'ABA et une tolérance à la sécheresse très réduite, suggérant un rôle majeur d'AREB1, AREB2 et ABF3 dans la régulation de l'expression des gènes de réponse à l'ABA (Yoshida *et al.*, 2010).

Les facteurs de transcriptions AREB/ABF sont régulés à différents niveaux en réponse à l'ABA. Tout d'abord, l'activation des protéines AREB/ABF peut se faire par phosphorylation, essentiellement par des protéines de type SnRK2 (Uno *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Kagaya *et al.*, 2002; Furihata *et al.*, 2006). Ainsi, chez *Arabidopsis*, différents travaux ont montré que SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/OST1/SnRK2.6 et SRK2I/SnRK2.3 (SRK2D/E/I) interagissent et phosphorylent *in vitro* les protéines AREB/ABFs (Furihata *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2007) au niveau de la séquence conservée « R-X-X-S/T » (Dale *et al.*, 1995). D'autres protéines kinases peuvent phosphoryler les AREB/ABF. Ce sont des CDPK, comme par exemple CPK4 et CPK11 (Zhu *et al.*, 2007). Les protéines AREB/ABF peuvent également être régulées en réponse à l'ABA par interaction avec des protéines de type 14-3-3 (Schoonheim *et al.*, 2007) ou une protéine ARIA (arm repeat protein) (Kim *et al.*, 2004). Enfin au niveau transcriptionnel, des facteurs de transcription de type WRKY peuvent interagir avec des séquences spécifiques des promoteurs des gènes *AREB/ABF* (W-box) (Jiang *et al.*, 2009; Ren X. *et al.*, 2010; Shang *et al.*, 2010). Ainsi, WRKY63 régule positivement l'expression d'*ABF2* en se fixant sur une séquence W-box au niveau du promoteur de ce gène, alors que WRKY40 réprime l'expression d'*ABI5* (Ren X. *et al.*, 2010; Shang *et al.*, 2010).

IV.2.3. L'ABA dans le développement du fruit charnu

Chez le raisin, bien que le contenu en ABA soit beaucoup plus important dans les graines que dans la pulpe (Coombe *et al.*, 1973), il semble qu'au cours de la maturation du fruit, il soit synthétisé de façon indépendante dans ces deux tissus. L'ABA produit par la pulpe ou les graines régulerait respectivement la maturation du fruit et celle des graines (Sun *et al.*, 2010). Autour de la véraison, l'accumulation d'ABA est corrélée à un changement de l'expression des gènes impliqués dans son métabolisme. C'est le cas de l'enzyme *NCED* (9-cis-époxy-caroténoïde dioxygénase, enzyme clef de la biosynthèse d'ABA), qui s'accumule parallèlement à l'ABA et dont l'expression est fortement stimulée par l'ABA (Zhang *et al.*, 2009a). Des résultats similaires ont été obtenus chez le cerisier (Ren J. *et al.*, 2010). L'augmentation de la concentration en ABA autour à la véraison affecte également l'expression d'autres gènes spécifiquement impliqués dans la signalisation ABA tels que des gènes de réponses à la déshydratation et des aquaporines, (Deluc *et al.*, 2007, Pilati *et al.*, 2007).

Chez les espèces non climactériques, l'ABA semble jouer un rôle majeur dans la maturation du fruit. En effet, l'apport d'ABA au niveau du fruit favorise la mise en place des processus de maturation tels que : la coloration, l'accumulation de sucres et le ramollissement. Ceci a été clairement montré chez la fraise (Kano et Asahira, 1981; Manning, 1994; Perkins-Veazie, 1995; Jiang et Joyce, 2003), le raisin (Coombe, 1992; Davies *et al.*, 1997; Giovannoni *et al.*, 2001; Yakushiji *et al.*, 2001; Rodrigo *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2005; Peppi *et al.*, 2007; Wheeler *et al.*, 2009; Lacampagne *et al.*, 2010) et la cerise (Kondo et Gemma, 1993 ; Kondo et Inoue, 1997; Setha *et al.*, 2005). A l'opposé, des expériences de silencing de l'enzyme *NCED* chez la fraise, conduisent à l'inhibition de la maturation et plus particulièrement à celle de la synthèse d'anthocyanes (Jia *et al.*, 2011). Enfin, des études transcriptomiques et protéomiques récentes réalisées à partir d'échantillons traités par l'ABA ont permis de mettre en évidence l'implication de cette hormone dans la régulation d'un grand nombre de gènes et protéines participant aux processus de maturation (Koyama *et al.*, 2010; Giribaldi *et al.*, 2010).

Bien que l'ABA soit considéré comme un régulateur commun des processus de maturation du fruit, les mécanismes moléculaires impliqués sont encore peu connus. Toutefois, deux études récentes réalisées chez la fraise ont clairement montré l'implication de 2 récepteurs à l'ABA, CHLH/ABAR (Jia *et al.*, 2011) et PYR (Chai *et al.*, 2011). En effet, les auteurs ont mis en évidence que la maturation de la fraise en réponse à l'ABA était assurée au moins en partie par le récepteur FaCHLH/ABAR. Cette réponse impliquerait les régulateurs

ABI3 (facteur de transcription à domaine B3), ABI4 (facteur de transcription AP2-DREB), ABI5 (facteur de transcription b-ZIP), SnRK2, PP2CA/ABI1 et des protéines impliquées dans la biosynthèse des sucres (AMY; Hoecker *et al.*, 1999) et des pigments (CHS; Peters *et al.*, 1986). La même équipe a montré que le silencing du récepteur soluble PYR1 de la fraise (FaPYR1) provoque une insensibilité à l'ABA, l'apport d'ABA exogène ne pouvant restaurer le phénotype (Chai *et al.*, 2011). Le silencing de FaPYR1 s'accompagne également d'une inhibition de l'expression des gènes impliqués dans la signalisation ABA et dans la maturation du fruit (notamment les gènes impliqués dans la coloration). Par ailleurs, Li *et al.* (2011) ont étudié la fonctionnalité du récepteur PYL1 chez la Vigne. Ces auteurs ont démontré que VvPYL1 peut se lier à l'ABA, puis inhiber l'activité phosphatase d'ABI1 *in vitro* en interagissant avec elle. Ces résultats suggèrent que VvPYL1 est un récepteur fonctionnel de l'ABA. D'autres gènes de signalisation dont l'expression est sensible à l'ABA ont été identifiés chez la vigne. Il s'agit de ACPK1, une CDPK exclusivement exprimée dans le mésocarpe et les graines de raisin (Yu *et al.*, 2006).

Dans les fruits climactériques, le processus de maturation est principalement gouverné par l'éthylène (Adams-Phillips *et al.*, 2004). Cependant, des études récentes ont permis de mettre en évidence le rôle de l'ABA dans ce phénomène. Ainsi, chez la Tomate, la teneur en ABA augmente juste avant la production d'éthylène (Sheng *et al.*, 2008). De façon générale, la concentration en ABA augmente au cours de la maturation de nombreux fruits climactériques (Vendrell et Buesa, 1989 ; Buesa *et al.*, 1994 ; Martínez-Madrid *et al.*, 1996). De plus, l'application exogène d'ABA induit l'expression des 2 gènes majeurs de la synthèse d'éthylène : l'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) synthase et l'ACO (ACC oxidase). Cette induction a pour conséquence d'accélérer la maturation du fruit (Zhang *et al.*, 2009b; Leng *et al.*, 2009). A l'inverse, le traitement par un inhibiteur de la synthèse d'ABA provoque un retard de la maturation (Zhang *et al.*, 2009b; Leng *et al.*, 2009). Cet effet inducteur de l'ABA sur les processus de maturation impliquant l'éthylène ont également été mis en évidence pour la banane (Jiang *et al.*, 2000). D'autre part, Bastias *et al.*, (2011) ont étudié le rôle de 2 AREB/ABFs, AREB1 et AREB2, au cours du développement du fruit de tomate. La surexpression d'*AREB1* induit une augmentation des teneurs en glucose et fructose dans le fruit. Cette plus forte concentration en hexoses est corrélée à une induction de l'expression de la saccharose synthase cytosolique SUS et de l'invertase vacuolaire TIV1. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Pan *et al.* (2005) montrant que l'ABA peut induire la transcription des gènes d'invertases au cours du développement du fruit. De plus, la surexpression d'*AREB1* provoque aussi une augmentation de la teneur en acides organiques

(acide malique et acide citrique) et en acide glutamique (acide aminé le plus abondant dans les fruits de tomate mûres) (Petro-Turza, 1987 ; Ho, 1996). Ces données suggèrent donc un rôle pour AREB1 dans la régulation de la balance entre acides organiques, acides aminés et contenu en sucre (Bastias *et al.*, 2011). Enfin, 23 gènes appartenant aux familles de gènes *PYL*, *PP2C*, et *SnRK2* ont été très récemment identifiés chez la Tomate (Sun *et al.*, 2011). Leurs profils d'expression ont été étudiés au cours du développement du fruit et en condition de stress hydrique (Sun *et al.*, 2011).

IV.2.4. Importance de l'interaction ABA/sucres dans le développement du fruit charnu

De nombreuses études ont mis en évidence des interconnexions entre sucres et ABA au cours du développement du fruit. En effet, différents travaux ont montré que l'ABA induisait le métabolisme et l'accumulation des sucres dans les fruits charnus (Yamaki et Asakura, 1991; Kobashi *et al.*, 1999; Richings *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2005) et que le silencing du récepteur à l'ABA *FaCHLH/ABAR* diminue le taux de glucose et de saccharose chez la fraise (Jia *et al.*, 2011). A l'inverse, le glucose et le saccharose ont un effet positif sur l'expression de *FaCHLH/ABAR* (Jia *et al.*, 2011). D'autre part, Gambetta *et al.* (2010) ont montré que l'expression de plusieurs composants des voies de signalisation sucres et ABA est induite à la véraison, lors de l'accumulation d'ABA et de sucres. Par ailleurs, un traitement par les sucres et l'ABA induit également des événements associés à la maturation du raisin tels que le changement de couleur, le ramollissement (Parikh *et al.*, 1990; Lohani *et al.*, 2004; Koyama *et al.*, 2010) et l'expression de gènes codant des régulateurs clés des voies de signalisation ABA et sucres (Gambetta *et al.*, 2010). Cet effet synergique de l'ABA et des sucres dans l'induction de la synthèse de composés phénoliques suggère des mécanismes de régulation communs (Gambetta *et al.*, 2010). De telles corrélations ABA/sucres/composés phénoliques avait déjà été soulignées par des études réalisées chez *Arabidopsis* (Solfanelli *et al.*, 2006; Loreti *et al.*, 2008) et à partir de cultures cellulaires de vigne (Pirie et Mullins 1976; Matsushima *et al.*, 1989; Larronde *et al.*, 1998; Hiratsuka *et al.*, 2001). Enfin, le lien entre les mécanismes de signalisations sucre et ABA est également illustré par les protéines ASR (ABA-, stress- and ripening-induced) de vigne et de tomate, lesquelles interviennent en aval d'une voie de signalisation commune au sucre et à l'ABA (Cakir *et al.*, 2003; Shkolnik *et al.*, 2008). En effet, au niveau de la baie de raisin, une protéine ASR appelée *VvMSA* est induite à la fois par les sucres et l'ABA, et peut réguler positivement l'expression du transporteur d'hexose *VvHT1* (Cakir *et al.*, 2003). *VvMSA* est exprimé préférentiellement au cours de la

phase de croissance herbacée. De plus, des travaux récents ont permis de mettre en évidence l'implication chez la fraise d'une protéine ASR dans les processus de maturation de la fraise médiés par l'ABA (Chen *et al.*, 2011).

IV.3. Autres hormones impliquées dans le développement des fruits charnus

Comme mentionné précédemment, les fruits peuvent être classés en 2 groupes (Giovannoni, 2001). Si une forte accumulation d'éthylène a lieu lors de la mise en place de la phase de maturation, les fruits sont dits climactériques (tomate, la pomme, le melon ou encore banane). Pour ces fruits, une production d'éthylène est nécessaire au déclenchement de la maturation (Giovannoni, 2001, 2004). La compréhension des mécanismes de maturation impliqués chez les fruits climactériques a été possible grâce à l'étude de nombreux mutants de tomate (colorless non-ripening (*Cnr*), ripening-inhibitor (*rin*), Never-ripe (*Nr*), Green-ripe (*Gr*) et high-pigment (*hp-1* and *hp-2*)) (pour revue : Adams-Phillips *et al.*, 2004; Giovannoni *et al.*, 2004, 2007; Barry et Giovannoni, 2007; Bapat *et al.*, 2010). En l'absence de pic majeur de production d'éthylène au cours du développement, les fruits sont dits non climactériques (Seymour *et al.*, 1993). Cependant, des études récentes suggèrent que l'éthylène pourrait jouer un rôle dans le développement des ces fruits (Bouzayen *et al.*, 2009). Une augmentation transitoire du niveau endogène d'éthylène juste avant la véraison et une induction de l'expression des gènes des voies de biosynthèse et de la signalisation de l'éthylène ont été rapportés chez des fruits non climactériques tel que le raisin (Chervin *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2010), l'orange (Katz *et al.*, 2004; Rodrigo *et al.*, 2006) et la fraise (Trainotti *et al.*, 2006). Cela suggère que la synthèse d'éthylène et la transduction de son signal sont actives aux alentours du déclenchement de la maturation et peuvent y être associées. De plus, chez le raisin, l'application exogène d'éthylène au début de la maturation stimule l'accumulation d'anthocyanes et l'élongation cellulaire, ainsi que l'expression de nombreux gènes associés à la maturation dont des gènes associés à l'élongation cellulaire parmi lesquels des PG (polygalacturonases), des PME (pectine méthylestérases), ou encore des expansines (Chervin *et al.*, 2004 ; 2008). D'autre part, certains auteurs suggèrent des interactions entre ABA et éthylène lors de la mise en place des processus de maturation des fruits non climactériques. Ainsi, selon Sun *et al.* (2010), l'augmentation transitoire d'éthylène juste avant la véraison pourrait induire l'expression de *VvNCED1* chez le raisin. Des interactions entre éthylène et ABA ont également été mises en évidence lors de la coloration des litchis (Wang *et al.*, 2007).

Hormis l'éthylène, plusieurs études mentionnent l'implication d'autres phytohormones

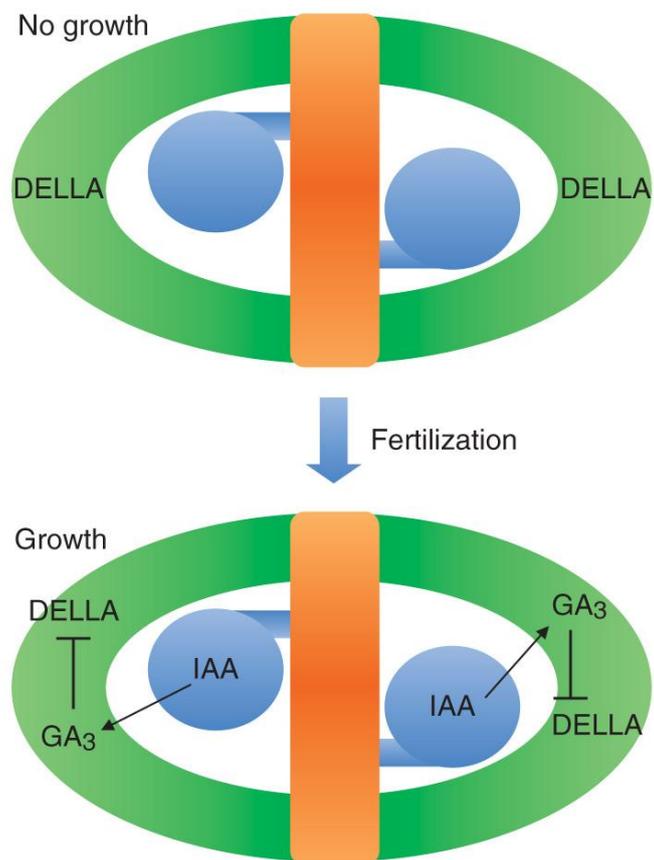


Figure 13. Modèle schématisant les interactions auxines / gibbérellines lors de la mise en place du fruit après fécondation. Les graines sont représentées en bleu et le péricarpe en vert (d'après Sundberg et Østergaard, 2009)

comme les gibbérellines (GA) et les brassinostéroïdes lors des processus de développement du fruit.

Les gibbérellines régulent principalement la croissance cellulaire lors du développement du fruit (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005; Conde *et al.*, 2007 ; Csukasi *et al.*, 2011). Une application de gibbérellines affecte de manière positive la croissance du raisin (Coombe et Hale, 1973) et de la fraise (Thompson, 1969). D'autre part, l'apport d'acide gibbérellique (Vriezen *et al.*, 2008) et la sous-expression des protéines DELLA (régulateurs négatifs de la signalisation par les gibbérellines) (Marti *et al.*, 2007; Dorcey *et al.*, 2009) provoquent l'obtention de fruits parthénocarpiques chez la Tomate. La parthénocarpie induite par l'acide gibbérellique diffère de celle qui est induite par l'auxine. En effet, bien que les fruits parthénocarpiques obtenus après addition de GA soient également plus petits que les fruits sauvages, l'activité de division cellulaire est moins importante et l'expansion est supérieure (Bunger-Kibler et Bangerth, 1983; Serrani *et al.*, 2007a et 2007b; Vriezen *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'application simultanée d'auxine et de gibbérellines provoque la formation de fruits similaires en termes d'aspect et de taille aux fruits sauvages (Bunger-Kibler et Bangerth, 1983; Serrani *et al.*, 2007). Ce résultat suggère que les processus de divisions et d'élongation cellulaires sont étroitement coordonnés par l'équilibre entre ces 2 hormones (Sastry et Muir, 1963; Koshioka *et al.*, 1994; Lemaire-Chamley *et al.*, 2005; de Jong *et al.*, 2009). L'auxine agirait en amont des gibbérellines dans les processus de mise en place du fruit (Vriezen *et al.*, 2008; Serrani *et al.*, 2008). Ainsi, selon le modèle proposé par Sundberg et Østergaard, (2009) (Figure 13), l'auxine (AIA) synthétisée au niveau des ovules fécondés lors de l'initiation du fruit est transportée au niveau du péricarpe, où elle induit la synthèse de gibbérellines (GA₃). En retour, cette néo-synthèse de gibbérellines provoque la dégradation des protéines DELLA et l'arrêt de la répression de la croissance pour permettre le grandissement du fruit. Par la suite, lors de la croissance du fruit, les activités de divisions et d'élongation cellulaires sont finement coordonnées par la balance AIA/GA (de Jong *et al.*, 2009). Enfin, les gibbérellines peuvent également intervenir dans la régulation de l'expression de gènes associés à la maturation (de la Fuente *et al.*, 2006; Bustamante *et al.*, 2009)

Les brassinostéroïdes (BR) régulent eux aussi le développement des fruits charnus. En effet, les BR peuvent jouer un rôle dans les stades précoces du développement chez la Tomate (Montoya *et al.*, 2005) et le Concombre (Fu *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'apport exogène de BR chez la tomate favorise sa maturation grâce à l'augmentation de la teneur en éthylène (Vardhini et Rao, 2002). Chez le raisin, l'induction de l'expression des gènes de biosynthèse des BR à la véraison est corrélée à une forte augmentation de la teneur en BR. De plus, une

application exogène de BR favorise également la maturation, alors qu'à l'inverse les inhibiteurs de la synthèse de BR provoquent un retard de maturation du raisin (Symons *et al.*, 2006). Les auteurs suggèrent que les BR pourraient induire l'élongation du fruit en ciblant notamment les XET (Xyloglucan endotransglycosylases), dont certaines sont connues pour être induites par les BR (Zurek et Clouse, 1994; Oh *et al.*, 1998).

V. La régulation transcriptionnelle

V.1. Généralités

La signalisation cellulaire est un aspect majeur des systèmes de communication complexes coordonnant les activités cellulaires et leur interaction avec l'environnement. Les réseaux de régulations transcriptionnelles sont des acteurs importants de cette signalisation cellulaire. Chez les eucaryotes, la transcription est contrôlée par l'activité de facteurs de transcription (FT) qui reconnaissent et lient des séquences cis-régulatrices spécifiques en amont du promoteur basal des gènes (Maston *et al.*, 2006). Les FT sont des protéines nucléaires dont l'abondance, la disponibilité et l'accessibilité à leurs séquences cibles vont réguler le niveau de transcription. Ils contiennent typiquement : un site de fixation à l'ADN, un domaine de régulation de la transcription (activateur ou inhibiteur) qui est spécifique, un site d'oligomérisation et un signal de localisation nucléaire (Liu *et al.*, 2000). Les FT n'agissent généralement pas de façon isolée, mais ils forment des homo- ou des hétérodimères avec d'autres protéines afin stimuler ou réprimer la transcription de gènes cibles (Katagiri *et al.*, 1992; Guiltinan *et al.*, 1994; Wray *et al.*, 2003; Davidson et Erwin, 2006). Les FT peuvent être régulés via l'interaction avec d'autres protéines, mais aussi au niveau transcriptionnel (par miRNA), et post traductionnel (par phosphorylation ou dégradation) (Mitsuda et Ohme-Takagi, 2009).

Chez les plantes, les collections de mutants ont permis de mettre en évidence l'importance de nombreux FT dans des processus physiologiques variés (Mitsuda et Ohme-Takagi, 2009). L'importance de la régulation transcriptionnelle, en tant qu'événement majeur associé aux processus de développement et d'adaptation des plantes, est également soulignée par la diversité et le nombre de gènes codant des FT chez les végétaux supérieurs. En effet, chez *Arabidopsis* et chez la Vigne, dont les génomes ont été entièrement séquencés (Theologis *et al.*, 2000 ; Jaillon *et al.*, 2007 ; Velasco *et al.*, 2007), ce phénomène met en œuvre plus de 2000 FT (Riechmann et Ratcliffe, 2000 ; Davuluri *et al.* 2003, Guo *et al.*, 2005,

RARTF		AGRIS		DATF		PlnTFDB	
Family	Loci	Family	Loci	Family	Loci	Family	Loci
1. ABI3/VP1	51	ABI3VP1	11	ABI3-VP1	60	ABI3VP1	56
		REM	21				
2. Alfin-like	47	Alfin-like	7	Alfin	7	Alfin-like	7
3. AP2/EREBP	93	AP2-EREBP	136	AP2-EREBP	146	AP2-EREBP	146
4. ARF	71	ARF	22	ARF	23	ARF	23
		RAV	11				
5. ARID	6	ARID	7	ARID	10	ARID	10
6. AT-hook	31	-	-	-	-	-	-
7. -	-	-	-	AS2	42	-	-
8. Aux/IAA	21	-	-	AUX-IAA	28	AUX/IAA	27
9. -	-	BBR/BPC	7	BBR-BPC	7	BBR/BPC	7
10. -	-	BZR	6	BES1	8	BES1	8
11. bHLH	157	bHLH	162	bHLH	127	bHLH	134
12. -	-	-	-	-	-	bHSH	1
13. bZIP	56	bZIP	73	bZIP	72	bZIP	71
14. C2C2(Zn)-CO-like	51	C2C2-CO-like	30	C2C2-CO-like	37	C2C2-CO-like	17
						Pseudo ARR-B	5
15. C2C2(Zn)-Dof	33	C2C2-Dof	36	C2C2-Dof	36	C2C2-Dof	36
16. C2C2(Zn)-GATA	37	C2C2-Gata	30	C2C2-GATA	26	C2C2-GATA	29
17. C2C2(Zn)-YABBY	5	C2C2-YABBY	6	C2C2-YABBY	5	C2C2-YABBY	6
18. C2H2(Zn)	177	C2H2	211	C2H2	134	C2H2	96
19. C3H-type 1(Zn)	37	C3H	165	C3H	59	C3H	67
20. -	-	CAMTA	6	CAMTA	6	CAMTA	6
21. CBF5	2	-	-	-	-	-	-
22. CCAAT	37	CCAAT-DR1	2	CCAAT-Dr1	2	CCAAT	43
		CCAAT-HAP2	10	CCAAT-HAP2	10		
		CCAAT-HAP3	10	CCAAT-HAP3	11		
		CCAAT-HAP5	13	CCAAT-HAP5	13		
23. CPP(ZN)	8	CPP	8	CPP	8	CPP	8
24. -	-	-	-	-	-	CSD	4
25. -	-	-	-	-	-	DBP	4
26. -	-	-	-	-	-	DDT	4
27. E2F/DP	8	E2F-DP	8	E2F-DP	8	E2F-DP	7
28. EIL	6	EIL	6	EIL	6	EIL	6
29. -	-	-	-	FHA	16	FHA	17
30. GARP	51	G2-like	40	GARP-G2-like	42	G2-like	39
		ARR-B	15	GARP-ARR-B	10	ARR-B	13
31. -	-	GeBP	16	GeBP	21	GeBP	20
32. -	-	-	-	GIF	3	-	-
33. GRAS	32	GRAS	31	GRAS	33	GRAS	33
34. -	-	GRF	9	GRF	9	GRF	9
35. HB	97	Homeobox	91	HB	87	HB	91
36. HMG-box	11	-	-	HMG	11	HMG	11

Figure 14. Répartition des différents facteurs de transcription de plante au sein de leurs familles respectives, selon 4 bases de données : RARTF, AGRIS, DATF et PlnTFDB (d'après Mitsuda et Ohme-Takagi, 2009)

RARTF		AGRIS		DATF		PlnTFDB	
Family	Loci	Family	Loci	Family	Loci	Family	Loci
37.	-	HRT	3	HRT-like	2	HRT	2
38.	HSF	HSF	21	HSF	23	HSF	23
39.	C3H-type 2(Zn) JUMONJI	JUMONJI	5	JUMONJI	17	Jumonji	17
40.	LFY	LFY	1	LFY	1	LFY	1
41.	LIM-domain	-	-	LIM	13	LIM	6
42.	-	-	-	LUG	2	LUG	2
43.	MADS	MADS	109	MADS	102	MADS	102
44.	-	-	-	MBF1	3	MBF1	3
45.	MYB superfamily	MYB	130	MYB	149	MYB	145
		MYB-related	67	MYB-related	49	MYB-related	64
46.	NAC	NAC	94	NAC	105	NAC	101
47.	Nin-like	NLP	9	Nin-like	14	RWP-RK	14
		AtRKD	5				
48.	-	-	-	NZZ	1	NOZZLE	1
49.	PcG; E(z) class			PcG	34	SET	33
	PcG; Esc class						
50.	PHD-finger	PHD	11	PHD	55	PHD	43
51.	-	-	-	PLATZ	10	PLATZ	11
52.	-	-	-	-	-	RB	1
53.	-	-	-	S1Fa-like	3	S1Fa-like	3
54.	-	-	-	SAP	1	SAP	1
55.	SBP	SBP	16	SBP	16	SBP	16
56.	Sir2	-	-	-	-	-	-
57.	-	-	-	-	-	Sigma70-like	6
58.	-	-	-	SRS	10	SRS	10
59.	-	-	-	-	-	SNF2	38
60.	SW13	-	-	-	-	-	-
61.	Swi4/Swi6	-	-	-	-	-	-
62.	-	-	-	TAZ	9	TAZ	8
63.	TCP	TCP	26	TCP	23	TCP	24
64.	Trihelix	Trihelix	29	Trihelix	26	Trihelix	23
65.	TUB	TUB	10	TLP	11	TUB	10
66.	-	-	-	ULT	2	ULT	2
67.	-	VOZ	2	VOZ	2	VOZ	2
68.	VIP3	-	-	-	-	-	-
69.	-	Whirly	3	Whirly	2	PBF-2-like	3
70.	WRKY(Zn)	WRKY	72	WRKY	72	WRKY	72
71.	-	ZF-HD	15	ZF-HD	16	zf-HD	17
72.	-	ZIM	2	ZIM	18	ZIM	15
	Other	Other	1			Other	69
	Total	Total	1837	Total	1914	Total	1949

Figure 14. (suite)

Iida *et al.*, 2005; Riano-Pachon *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007), lesquels représentent 5 à 10% de leur génome. Chacun de ces FT contrôle l'expression de dizaines à plusieurs milliers de gènes cibles au sein des réseaux de signalisation (Reichmann *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2008). La régulation transcriptionnelle est donc une étape importante de la réponse des cellules à leur environnement. Les analyses transcriptomiques sur génome complet sont dorénavant possibles grâce au séquençage complet de certains génomes dont *Arabidopsis*, la vigne et la tomate. Ces avancées technologiques devraient donc nous permettre d'accélérer l'identification et la caractérisation de plusieurs de ces FT dans des processus aussi variés que le développement, l'adaptation à l'environnement ou encore la maturation du fruit.

V.2. Les différentes familles de facteurs de transcription

Les séquences de fixation à l'ADN, ainsi que les domaines d'oligomérisation, sont très conservés et servent généralement de base à la classification des différentes familles de FT. Chez les plantes, les FT sont regroupés en différentes familles dont le nombre approximatif est de 70 tant chez *Arabidopsis* que chez la Vigne. Par ailleurs, le nombre total de FT et la taille de chaque famille de FT varient légèrement en fonction des bases de données. Cinq bases de données principales répertorient les différents FT et leur répartition dans les différentes familles. Chez *Arabidopsis*, il s'agit de : RARTF (<http://rarge.gsc.riken.jp/rartf/>) (Iida *et al.*, 2005), AGRIS (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtTFDB/> ; Davuluri *et al.*, 2003), DATF (<http://datf.cbi.pku.edu.cn/> ; Guo *et al.*, 2005) et chez d'autres espèces dont *Vitis vinifera* : PlantTFDB (<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>; Zhang *et al.*, 2011) et PlnTFDB (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v2.0/>; Riano-Pachon *et al.*, 2007) (Figure 14). Parmi ces différentes familles, certaines sont communes aux animaux et aux plantes. C'est le cas des familles MYB et MYB-related (198 chez la vigne), bHLH (102), MADs box (60), b-ZIP (45) ou encore HB (81) (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v2.0/>), qui regroupent de nombreux membres jouant des rôles très importants dans la croissance et le développement. Par ailleurs, d'autres familles n'existent que spécifiquement chez les plantes. Ce sont les familles AP2-ERF (124 chez la vigne), NAC (79), WRKY (59), TCP (19), SBP (18), ABI3-VP1 (B3) (21), EIL (4) ou encore LFY (1) (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v2.0/>).

Parmi ces nombreux FT je ne détaillerai ci-après, que les FT des familles bHLH et b-ZIP qui ont été l'objet principal de mon travail de thèse.

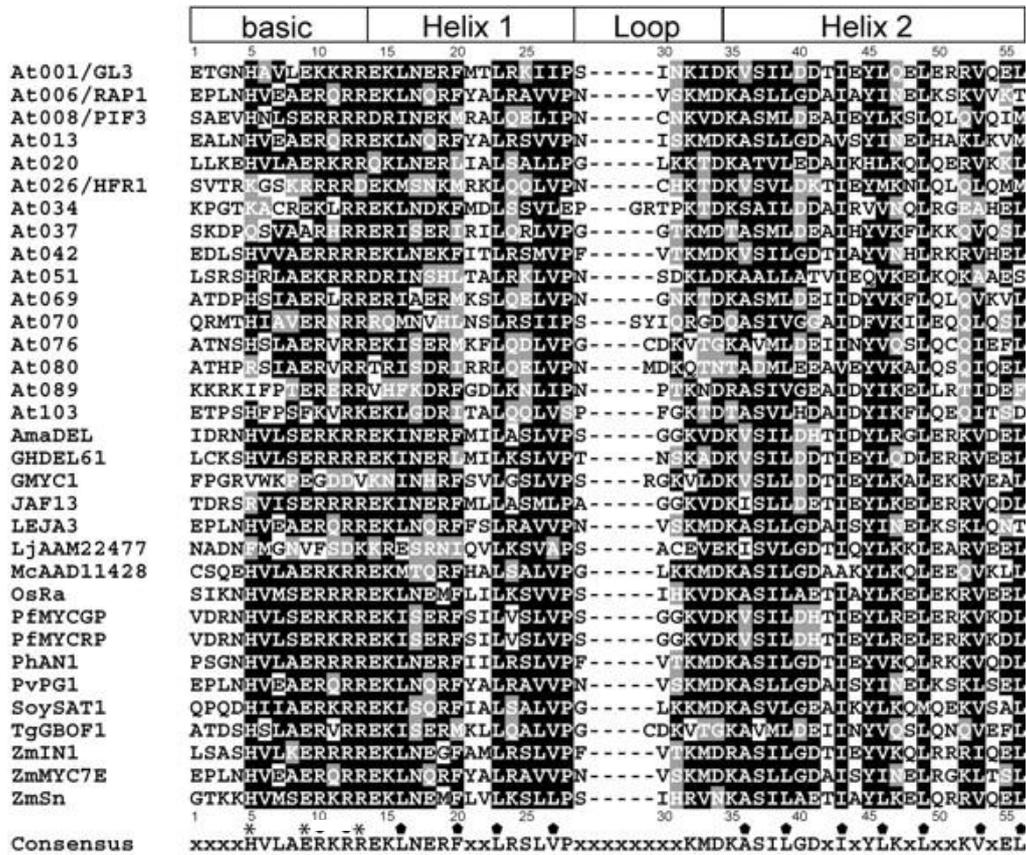


Figure 15. Alignement des domaines bHLH de différentes espèces végétales. Les acides aminés importants pour la liaison à l'ADN et les interactions protéines-protéines sont respectivement indiqués par des astérisques et des points (d'après Heim *et al.*, 2003).

V.2.1. Les facteurs de transcription de la famille bHLH

Les protéines bHLH appartiennent à une vaste famille multigénique de régulateurs transcriptionnels présents à la fois chez les animaux et les plantes (Pires et Dolan, 2010). Cette famille est caractérisée par une « signature » bHLH comprenant environ 60 acides aminés (aa) localisés en N-terminale. Ce domaine bHLH comprend un domaine basique de fixation à l'ADN (b) d'une quinzaine d'acides aminés dont 6 aa basiques (Figure 15), qui se fixe au niveau d'une séquence *cis* appelée « E-box » (CANNTG). Parmi ces boîtes E, la plus fréquente correspond à la séquence consensus « CACGTG » (boîte G). La propriété de liaison à la « E box » semble conférée par deux acides aminés particuliers, l'acide glutamique en position 9 (E-9) et l'arginine en position 13 (R-13) du domaine basique (Figure 15) (Atchley et Fitch, 1997 ; Pires et Dolan, 2010). Aussi, la substitution du E-9 par un autre acide aminé provoque une perte de la capacité de liaison à l'ADN (Figure 15) (Fisher et Goding, 1992). Chez les plantes, les arginines en position 10 et 12 sont aussi très conservées au sein de ce domaine basique (Figure 15). Elles auraient un rôle indirect de stabilisation de la liaison à l'ADN (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003 ; Pires et Dolan, 2010). La région HLH est formée par deux hélices α amphipathiques riches en acides aminés hydrophobes qui sont séparées par une boucle de longueur variable (Figure 15). Cette région est impliquée dans l'homo- et l'hétéro-dimérisation (Bailey *et al.*, 2003; Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Li *et al.* 2006), mais peut également jouer un rôle dans la capacité et la spécificité de liaison à l'ADN (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006). Au niveau des hélices α , les leucines en position 23 et 49, très conservées, semblent jouer un rôle important dans la dimérisation (Figure 15) (Li *et al.*, 2006 ; Pires et Dolan, 2010). Au niveau de la boucle, la lysine en position 32 est également très conservée (Figure 15). D'autre part, certains bHLHs impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes peuvent également présenter en N-term un domaine d'interaction avec des FT de type MYB (Grotewold *et al.*, 2000; Payne *et al.*, 2000 ; Pattanaik *et al.*, 2006 ; 2008). Ce domaine d'interaction, tout comme le domaine HLH, peut influencer l'activité de trans-activation des protéines bHLH conjointement à un domaine d'activation riche en aa acides, également localisé en position N-terminale (Gong *et al.* 2000 ; Pattanaik *et al.*, 2006 ; 2008).

Des analyses phylogénétiques ont permis la classification des diverses protéines bHLH au sein de groupes distincts. Plus de 50 bHLH sont présents dans le génome de la plupart des animaux et sont typiquement classés en 6 groupes majeurs (A à F) selon leur capacité et spécificité de fixation aux séquences *cis*-régulatrices (Atchley et Fitch, 1997; Ledent et Vervoort, 2001; Jones, 2004). Chez les plantes, la majorité des protéines bHLH sont

apparentées au groupe B de la classification animale. Une étude phylogénétique récente (Pires et Dolan, 2010) a révélé la présence de 26 sous-familles bHLH. De manière intéressante, cette étude, comme d'autres réalisées antérieurement (Heim *et al.* 2003; Li *et al.* 2006), a mis en évidence des motifs spécifiques à chaque sous-famille. Ces motifs sont localisés majoritairement en position C-terminale tout comme le motif de dimérisation leucine zipper (ZIP) (sous-famille *IVb* et *IVc*) ou le motif ABP (sous-famille *VII(a + b)*) qui permet l'interaction avec le phytochrome B (Pires et Dolan, 2010). Aussi, les membres d'une même sous-famille sont généralement impliqués dans le même processus biologique et certains ont des fonctions partiellement ou totalement redondantes (protéines BEE ou HEC) (Pires et Dolan, 2010). A l'opposé, les membres de la sous-famille *Ia*, MUTE, SPEECHLESS, et FAMA, qui sont impliqués la différenciation des stomates, exercent chacun une fonction différente (Nadeau, 2009; Serna, 2009). Par ailleurs, comme pour la plupart des FT, il existe chez les bHLH des activateurs et des inhibiteurs de la transcription. Ces derniers appartiennent au groupe D des animaux et au groupe VIII et X des plantes (Pires et Dolan, 2010). Ils peuvent agir de diverses façons, notamment en interagissant avec une histone déacétylase (Massari et Murre, 2000).

Les FT bHLH sont impliqués dans divers processus développementaux, à la fois chez les animaux et les plantes. Par exemple, chez l'homme, les bHLHs sont des acteurs de la prolifération et de la différenciation des cellules humaines, de la myogenèse et de la neurogenèse. Chez les plantes, leur fonction est liée à la biosynthèse de métabolites secondaires (les flavonoïdes), à la différenciation des cellules épidermiques (stomates, trichomes et poils absorbants) (Ramsay et Glover 2005), aux réponses à des facteurs environnementaux comme la lumière (Castillon *et al.*, 2007 ; Leivar *et al.*, 2010), au transport du fer (Long *et al.*, 2010), mais également à la voie de signalisation de certaines hormones comme les BRs (Friedrichsen *et al.*, 2002) ou l'ABA (Abe *et al.*, 2003). Les bHLH impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes ont été largement étudiés. Par exemple, les facteurs bHLH, AN1 et DELILA, stimulent la production d'anthocyanes respectivement chez le Pétunia et *Antirrhinum*, alors que TT8 favorise la synthèse de proanthocyanidines chez *Arabidopsis* (Lepiniec *et al.*, 2006). La fonction des bHLH, notamment lors du contrôle de la synthèse de flavonoïdes ou encore de la formation des trichomes et des poils absorbants est exercée en relation avec d'autres facteurs de transcription, notamment au sein du complexe transcriptionnel MYB-bHLH-WD40 (Ramsay et Glover 2005).

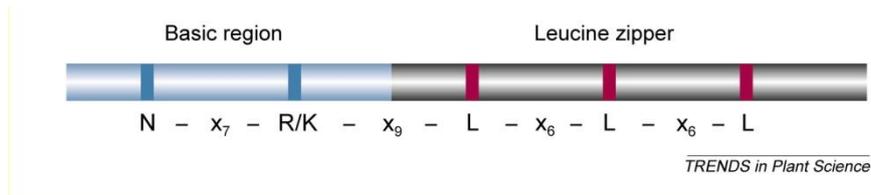


Figure 16. Domaine conservé (région basique et région leucine zipper) des protéines b-ZIP (d'après Jacoky *et al.*, 2002).

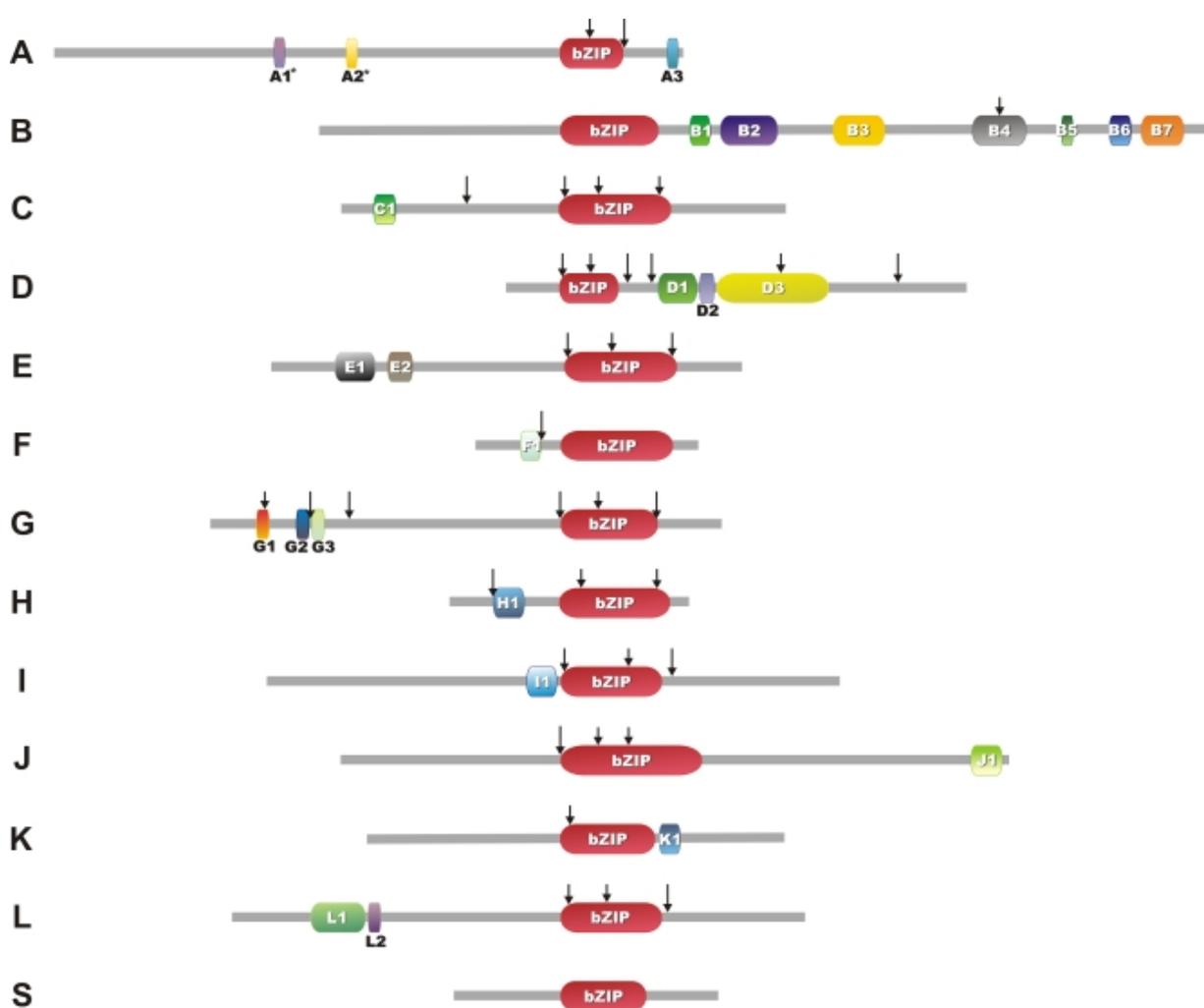


Figure 17. Position des autres motifs conservés chez les protéines b-ZIP des angiospermes. Les flèches indiquent les introns conservés parmi les membres de chaque groupe. Les sites de phosphorylation potentiels sur les motifs A1 et A2 sont représentés par des astérisques (D'après Corrêa *et al.*, 2008).

V.2.2. Les facteurs de transcription de la famille b-ZIP

Les FT de la famille b-ZIP (basique leucine-zipper) possèdent un domaine très conservé de 40 à 80 acides aminés, contenant une région basique et une région leucine zipper (Hurst, 1994). La région basique contient le motif N-x7-R/K (Figure 16) permettant la liaison à l'ADN et un signal de localisation nucléaire. Les FTs b-ZIP se fixent de façon préférentielle au niveau de séquences contenant le motif ACGT, comme par exemple les séquences palindromiques TACGTA (A-box) et GACGTC (G-box). La spécificité de fixation est conférée par les nucléotides bordant le motif ACGT. Par ailleurs, la région leucine zipper est formée par une répétition d'heptade d'acides aminés hydrophobes (leucine (L), isoleucine (I), valine (V), phénylalanine (F) ou méthionine (M)), créant une hélice amphipathique nécessaire à la dimérisation (Figure 16) (Jakoby *et al.*, 2002).

Corrêa *et al.* (2008) proposent 13 sous-familles de protéines b-ZIP chez les angiospermes, nommées A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, et S, et présentant chacune des motifs spécifiques (Figure 17). Les FT AREB/ABFs, impliqués dans la signalisation ABA (cf. § IV.2. 2.), appartiennent à la sous-famille A (Jakoby *et al.*, 2002). La sous-famille S est notamment représentée par ATB2 (aussi appelé b-ZIP11) (Rook *et al.*, 1998a et 1998b).

Chez les plantes, les membres de la famille b-ZIP sont des régulateurs importants de nombreux processus physiologiques tels que la différenciation et le développement de tissus et d'organes (Walsh *et al.*, 1997; Chuang *et al.*, 1999; Walsh et Freeling, 1999; Strathmann *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 2005; Thurow *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Muszynski *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2007), l'élongation cellulaire (Yin *et al.*, 1997 ; Fukazawa *et al.*, 2000), le contrôle de l'équilibre carbone/azote (Ciceri *et al.*, 1999 ; Weltmeier *et al.*, 2006), le métabolisme énergétique (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007), les stress et la signalisation hormonale (de Vetten et Ferl, 1995; Fukazawa *et al.*, 2000; Niggeweg *et al.*, 2000; Lopez-Molina *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2005; Nieva *et al.*, 2005), les interactions entre voies de signalisation des sucre et des hormones (Finkelstein *et al.*, 2000 ; Uno *et al.*, 2000), la réponse à la lumière et la photomorphogénèse (Wellmer *et al.*, 1999; Osterlund *et al.*, 2000; Holm *et al.*, 2002; Mallappa *et al.*, 2006), la régulation des gènes de stockage des graines (Lara *et al.*, 2003) et les réactions de défense (Despres *et al.*, 2000; Niggeweg *et al.*, 2000 ; Pontier *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Thurow *et al.*, 2005 Kaminaka *et al.*, 2006).

V.3. Régulation transcriptionnelle du développement du fruit charnu

V.3.1. Généralités

De nombreux FT impliqués dans les processus de croissance et/ou de maturation du fruit ont été décrits chez le fruit climactérique de tomate (pour revue : Giovannoni, 2007). Ces FTs appartiennent majoritairement à la famille MADS box (pour MINICHROMOSOME MAINTENANCE1, AGAMOUS, DEFICIENS, et SERUM RESPONSE FACTOR) (Vrebalov *et al.*, 2002, 2009; Manning *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011), mais aussi aux familles APETALA2/ERF (Chung *et al.*, 2010 ; Karlova *et al.*, 2011), MYB (Machemer *et al.*, 2011) ou encore HB (Lin *et al.*, 2008). Acteurs clefs du développement des fruits climactériques, les FT MADS box peuvent également jouer un rôle dans le développement des fruits non climactériques. En effet, chez le fraisier, le silencing de *FaMADS9* provoque une perturbation du développement et une inhibition de la maturation du fruit (Seymour *et al.*, 2011). Chez la myrtille, le FT VmTDR4 est associé à la biosynthèse d'anthocyanes au cours du mûrissement du fruit (Jaakola *et al.*, 2010). D'autres FT sont également connus pour leur implication dans la synthèse de flavonoïdes au cours de la maturation du fruit charnu. Il s'agit des FT de la famille MYB tels que FaMYB1, FaMYB2 et FaMYB10 chez le fraisier (Aharoni *et al.*, 2001 ; Lin-Wang *et al.*, 2010), ou encore MdMYB10 chez le pommier (Espley *et al.*, 2007). Les FT de la famille AP2-ERF participent à la maturation du fruit dans un contexte éthylène dépendant. Parmi eux, LeERF2 de Tomate (Tournier *et al.*, 2003), MdERF1 de pomme (Wang *et al.*, 2007), et PsERF2a et PsERF2b de prune (El-Sharkawy *et al.*, 2009) voient leurs transcrits s'accumuler pendant le mûrissement du fruit.

L'implication des FT de type bHLH et b-ZIP dans le développement et la maturation des fruits charnus est encore très peu documentée. Parmi les bHLH, une approche cDNA-AFLP a permis d'identifier *FaSTP*, un gène associé au mûrissement des fraises (Tisza *et al.*, 2010). *FaSTP* est un orthologue de SPATULA (STP) connu pour jouer un rôle majeur dans le développement du fruit et des carpelles chez *Arabidopsis*. L'expression de *FaSTP* est réprimée par un traitement auxine au stade vert et son expression au cours du développement du fruit est sensible à l'application d'éthylène (Tisza *et al.*, 2010). Comme décrit précédemment (cf. § IV.2. 2.), les FT b-ZIP de la sous-famille A sont impliqués dans la signalisation ABA et peuvent jouer un rôle dans la maturation du fruit. Dans ce contexte, Bastias *et al.*, (2011) ont montré la médiation du signal ABA *via* SIAREB1 pour la régulation du métabolisme des composés déterminant la qualité du fruit au cours du développement (acides organiques, aa et sucres). Par ailleurs, les effets de la sous-expression de HY5 (groupe H de la classification) ont été étudiés chez la Tomate. Ce facteur b-ZIP semble impliqué dans

la régulation positive de la pigmentation du fruit et de la synthèse de caroténoïdes (Liu *et al.*, 2004).

V.3.2. Régulation transcriptionnelle du développement de la baie de raisin

Chez la Vigne comme chez les autres fruits non climactériques, rares sont les travaux qui ont réellement permis de mettre en évidence l'implication de FT dans le développement et la qualité de la baie. Des analyses transcriptomiques réalisées à l'aide de lames Affymetrix de première génération ont cependant permis de montrer que 8,5% des gènes différentiellement exprimés au cours du développement et de la maturation du raisin correspondaient à des FT (Pilati *et al.*, 2007). Parmi ces FT, Boss *et al.*, (2002) ont montré que les transcrits de *VvMADS1* et *VvMADS4* s'accumulent fortement au cours du développement de la baie alors que ceux correspondant à *VvMADS2* et *VvMADS5* s'accumulent préférentiellement au cours des étapes plus précoces (Boss *et al.*, 2002). L'implication de trois autres FT de type MADS box (*VvTM6*, *VvPISTILLATA* et *VvAP3*) dans le développement de la fleur et du fruit a été suggérée par Poupin *et al.* (2007). D'autres transcrits correspondants à des gènes habituellement associés à la réponse à la lumière tels que : *CONSTANS-like* et *VvFT*, ou aux interconnexions auxine/lumière sont également induits au cours du développement de la baie (Sreekantan et Thomas, 2006). Enfin, un dernier FT de la famille HB, *VvHB13*, interviendrait plus particulièrement dans la croissance de la pulpe lors des stades de développement précoce de la baie (Fernandez *et al.*, 2007).

Les FT de la famille MYB semblent plus particulièrement impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes. Ainsi, la production d'anthocyanines chez *Vitis labruscana*, nécessite l'intervention de *VvMYBA1* (Kobayashi *et al.*, 2002). *VvMYB5a* (Deluc *et al.*, 2006), *VvMYBA2* (Walker *et al.*, 2007), *VvMYBPA1* (Bogs *et al.*, 2007), *VvMYB5b* (Deluc *et al.*, 2008), *VvMYBPA2* (Terrier *et al.*, 2009) et *VvMYBF1* (Czemmel *et al.*, 2009) ont également été décrits comme des régulateurs positifs du métabolisme phénolique de la baie de raisin.

Un FT de type bHLH participerait aussi à la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes. Il s'agit de *VvMYCA1* qui interviendrait dans la synthèse d'anthocyanines et de proanthocyanidines au cours du développement de la baie de raisin (Ichri *et al.*, 2010; Matus *et al.*, 2010).

Enfin, le rôle d'une protéine ASR (ABA, stress and ripening induced), appelé *VvMSA* dans la régulation du transport des sucres a été mis en évidence par Cakir *et al.*, (2003). *VvMSA*, dont l'expression est stimulée, à la fois par les sucres et l'ABA, régule directement

l'expression du transporteur de sucre *VvHT1*. De plus, cette protéine est capable d'interagir avec un facteur de transcription de la famille AP2-ERF, également exprimé dans la baie de raisin (Saumonneau *et al.*, 2007).

VI. Objectif du travail de thèse

Un des thèmes de recherche développé dans notre UMR concerne l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la qualité de la baie de raisin. Aussi, parmi les nombreux changements se produisant au cours du développement de la baie, les variations des concentrations en hormones et l'accumulation importante de sucres à partir de la véraison sont des phénomènes importants pour la croissance et la qualité de la baie. Ces molécules peuvent également jouer un rôle de signal affectant la reprogrammation du métabolisme cellulaire et ainsi l'expression de nombreux gènes codant des protéines clefs du développement et du mûrissement de la baie. A ce jour, très peu de ces acteurs moléculaires ont été clairement caractérisés (cf. § V.3.).

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse a été d'identifier et de caractériser certains de ces acteurs moléculaires et plus particulièrement des FT régulés par les sucres et pouvant affecter le métabolisme phénolique et/ou être impliqués dans le développement de la baie de raisin. Ainsi, une analyse transcriptomique réalisée antérieurement au laboratoire (F. Lecourieux, résultats non publiés) et comparant des suspensions cellulaires de baie de raisin (CSB) traitées ou non par 58 mM de saccharose nous a permis de sélectionner 5 gènes candidats présentant des profils d'expression intéressants au cours du développement de la baie de raisin. Ces gènes appartiennent aux familles de FT de type bHLH, MYB, b-ZIP et AP2-ERF. Parmi ces candidats, deux seulement ont été sélectionnés pour poursuivre leur caractérisation fonctionnelle. Il s'agit des FT de type bHLH (appelé *VvCEB1*) et b-ZIP membre de la sous-famille AREB/ABF (appelé *VvABF2*).

Ce manuscrit de thèse s'articulera donc autour de trois chapitres. Le premier décrira l'analyse préliminaire réalisée pour 3 des 5 facteurs de transcription identifiés. Le deuxième sera consacré à la caractérisation fonctionnelle de *VvCEB1*. Le troisième et dernier chapitre concernera l'étude détaillée de *VvABF2*. Ces 2 derniers chapitres seront présentés sous la forme d'articles scientifiques.

Chapitre I

Facteurs de transcription de Vigne sensibles au sucre – Etude préliminaire.



Photographie de grappes de raisin (Vitis vinifera cv.Koshu)

I. Introduction

Les sucres, en plus de leur rôle structurel, peuvent agir dans des processus de signalisation variés (Rolland *et al.*, 2006; Gibson, 2005). Ainsi, le saccharose affecte le délai de floraison (Bernier *et al.*, 1993), la mise en place de processus de sénescence (Paul et Pellny, 2003), la synthèse d'anthocyanes (Larronde *et al.*, 1998 ; Teng *et al.*, 2005 ; Solfanelli *et al.*, 2006) et l'accumulation des sucres eux-mêmes (Cakir *et al.*, 2003). Comme décrit l'analyse bibliographique, les sucres s'accumulent en grande quantité dans la baie de raisin à partir de la véraison. Cependant, bien que cette étape soit cruciale pour la mise en place des processus de maturation, les acteurs moléculaires permettant son initiation sont peu connus. La pré-véraison est décrite comme une étape de reprogrammation du métabolisme cellulaire, caractérisée par l'expression de nombreux gènes impliqués notamment dans la régulation transcriptionnelle (Pilati *et al.*, 2007). Toutefois, à ce jour, très peu de facteurs de transcription contrôlant le développement de la baie de raisin ont été identifiés et caractérisés. Dans ce contexte, nous avons recherché des facteurs de transcription sensibles au sucre qui pourraient affecter le développement et/ou la maturation de la baie. Ainsi, le croisement de données transcriptomiques concernant : i) l'étude de la réponse des suspensions cellulaires de Vigne au traitement par 58 mM de saccharose (F. Lecourieux *et al.*, unpublished) et ii) l'étude de l'expression différentielle des gènes au cours du développement du raisin (Glissant et Delrot, unpublished), nous a permis d'identifier et isoler 5 facteurs de transcription à la fois sensibles au saccharose et exprimés au cours du développement du raisin. Ces FT correspondent à : un FT de la famille MYB, deux FT de la famille b-ZIP (dont VvABF2), un FT de la famille AP2-ERF et un FT de la famille bHLH (VvCEB1). Ce chapitre concernera une caractérisation préliminaire de 3 d'entre eux, VvCEB1 et VvABF2 étant caractérisés de façon approfondie dans les chapitres 2 et 3.

II. Clonage et analyse phylogénétique des trois facteurs de transcription (MYB, b-ZIP et AP2-ERF)

Ces 3 FT appartenant respectivement aux familles MYB, b-ZIP et AP2-ERF ont d'abord été clonés à partir d'une banque d'ADNc issue de baies *Vitis vinifera* cv. cabernet sauvignon au stade véraison. Leur séquence codante pleine longueur a été obtenue après séquençage (Figure 18 A, B, C).

A

		Motif R2				
1	MAATRKDVDR	IKGPWSPEED	DALQKLVQKH	GPRNWSLISK	SIPGRSGKSC	RLRWCNQLSP
		Motif R3				
61	QVEHRAFTSE	EDDTIMRAHA	RFGNKWATIA	RLLSGRTDNA	IKNHWNSTLK	RKCSAITEDG
		Motif 22.1				
121	SFGGDYPPHP	LKRSVSAGAA	APV SGLYLSP	SSPCGSDVSD	SSLPVVSSSH	VYRPVARTGG
181	IIPPETTSSS	NDPPTSLSLS	LPGVDSCEVS	NRAPEPNHAP	PANPIQMIPA	MAPLQQIPMH
		Motif 22.2				
241	QHNQPATVPA	TVLSQGEKPF	IPFSAELLAV	MQEMIRKEVR	NYMAGLEQNG	VCLQADGIRN
301	AAVKRIGISK	IE				

B

		Domaine basique				
1	MASSSGTSSG	STLLQNSGSE	EDLQALMDQR	KRKRMISSRE	SARRSRMRKQ	KHLDDLMAQA
		Motif « leucine zipper »				
61	AQLRKENSQI	ITSMNVTTQH	YFNIEAENS	LRAQFSELSN	RLQYLVEIIS	FLNTSNGGFE
121	SGEPWTLPEP	TTSDSLMNPL	SLLYLSQPIM	ASDIFQY		

C

1	MKALEPFMKD	STQPNMYPDF	CSTSTTHMFS	QGFSGYDQMG	LEQTGSIGLN	HITPAQILQI
61	QAQIQFQQQQ	QORMAAVATA	SSIQNQRLSQ	WQQQQQQQQH	TLNFLGPKAI	PMKQVGTTPPK
		Domaine AP2/ERF				
121	PAKLYRGVRQ	RHWGKWVAEI	RLPKNTRLW	LGTFTDAEEA	ALAYDKAAFK	LRGEFARLNF
181	PNLRHQGSLV	AGEFGDYKPL	HSSVDAKLQA	ICQNLAISQK	QGN SGKPLV	SDAKIESSTH
241	QAEMVLDNSS	DPESGFLGLE	DCKVEISSSS	SSPSPSESS	AGSSSPESDI	SFLDFTDSQW
301	NDSECLTLEK	FPSVEIDWAS	I			

Figure 18. Séquences protéiques et domaines conservés des 3 FT identifiés : (A) FT de la famille MYB, (B) FT de la famille (b-ZIP) et (C) FT de la famille AP2-ERF.

Facteur de transcription de la famille MYB : La séquence codante de ce gène a une longueur de 936 pb. La protéine correspondante comprend 312 aa et possède dans sa portion N-terminale deux motifs conservés de 50 aa chacun (Figure 18A). Ces motifs conservés correspondent aux domaines R2 et R3 qui permettent la formation d'une structure tridimensionnelle «helix-turn-helix » caractéristique de la famille MYB (Rosinsky et Atchley, 1998; Stracke *et al.*, 2001). Chez les animaux, les protéines MYB comprennent généralement 3 motifs (R1, R2 et R3) (Lipsick, 1996). En revanche, les membres de la sous-famille MYB R2-R3 sont majoritaires chez les plantes (Yanhui *et al.*, 2006). Par ailleurs, les facteurs de transcriptions MYB impliqués dans la biosynthèse des composés phénoliques appartiennent à cette sous-famille (Hichri *et al.*, 2011). Le FT MYB (AY953543) étudié ici avait précédemment été isolé à partir du cépage chardonnay. Du fait de sa forte homologie avec le gène *StSREBP* de pomme de terre, il a été nommé VvSREBP pour *Vitis vinifera* *Sucrose Responsive Element Binding Protein* (Thèse, D. Glissant (2005)).

L'analyse phylogénétique réalisée au sein de la sous-famille R2-R3 MYB a révélé que VvSREBP appartient au sous-groupe 22 de la classification proposée par Stracke *et al.* (2001) (Figure 19). Les membres de ce sous-groupe possèdent 2 motifs conservés: XGLYXSPXSP et VXQEMIXXEVRXYM, respectivement appelés motifs 22.1 et 22.2 (Figure 18A) (Stracke *et al.*, 2001). Les gènes de ce sous-groupe, dont *AtMYB44* et *AtMYB73* (Figure 19) semblent impliqués dans les réponses aux stress abiotiques (Fowler et Thomashow, 2002 ; Cheong *et al.*, 2002 ; Ma *et al.*, 2005 ; Kamei *et al.*, 2005). *AtMYB44* est connu pour être induit par les sucres et par de nombreuses phytohormones dont l'ABA et l'éthylène (Chen *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2008, 2010; Liu *et al.*, 2011). Lorsqu'il est surexprimé chez *Arabidopsis*, *AtMYB44* stimule la réponse à l'ABA (Jung *et al.*, 2008, 2010). VvSREBP est en revanche assez éloigné des sous-groupes de FT MYB connus pour être impliqués dans la synthèse des flavonoïdes que ce soit chez la Vigne (VvMYBA1, VvMYBA2, VvMYB5a, VvMYB5b) ou chez *Arabidopsis* (*AtMYBPAP1*) (Figure 19).

FT de la famille b-ZIP : La séquence codante du gène a une longueur de 471 pb. La protéine correspondante possède 157 aa et un domaine conservé « basic-leucine zipper » (b-ZIP) (Jacoby *et al.*, 2002) (Figure 18B). Ce domaine est constitué d'une région basique (aa 29 à 49) et d'un long motif « leucine zipper » (aa 30 à 112) formé de 9 répétitions d'un résidu leucine tous les 7 aa (représenté en rouge, Figure 18B). Parfois, la leucine est remplacée par un autre acide aminé hydrophobe comme l'isoleucine ou la valine (Jacoby *et al.*, 2002) (Figure 18B).

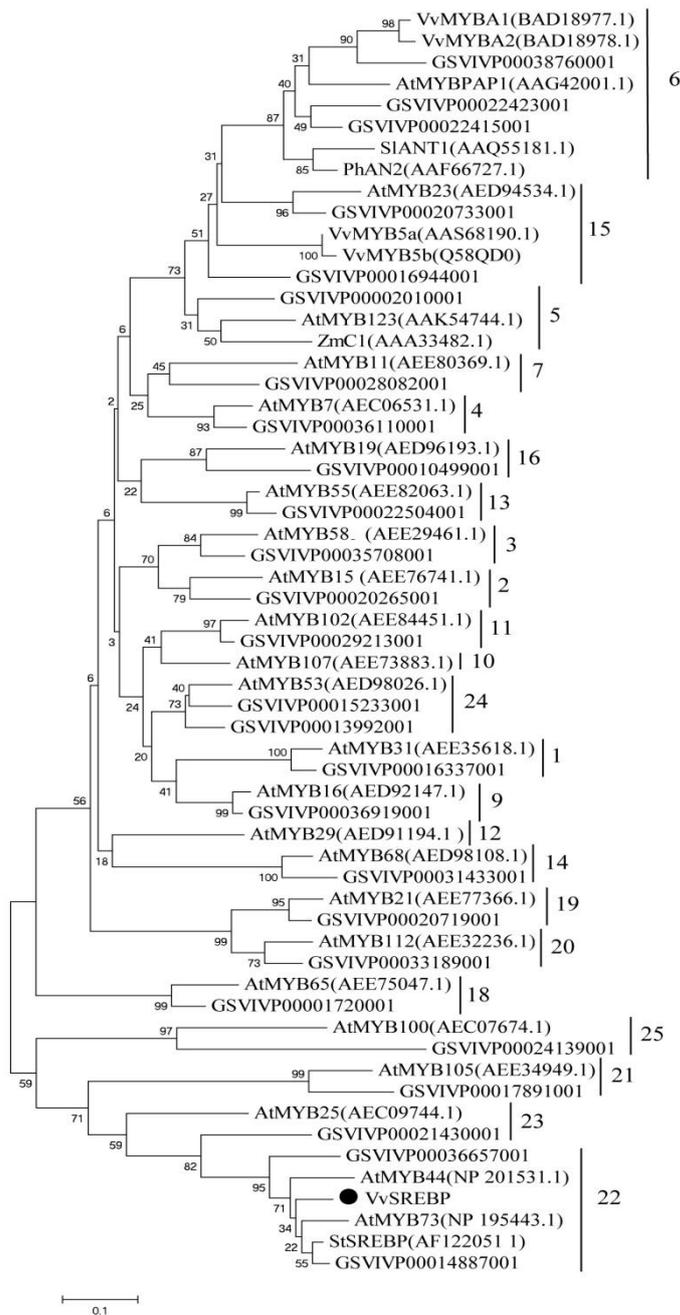


Figure 19. Analyse phylogénique de VvSREBP (rond noir) parmi les différents sous-groupes de la famille MYB (R2R3). Un membre représentatif de chaque sous-groupe de la famille MYB (R2R3) d'*Arabidopsis thaliana* (At) est représenté, selon Stracke *et al.* (2001). Les sous-groupes 6, 15 et 5 ont été enrichis avec des protéines de *Solanum lycopersicum* (SIANT1), *Petunia hybrida* (PhAN2), *Zea mays* (ZmC1) et *Vitis vinifera* (VvMYBA1, VvMYBA2, VvMYB5a, VvMYB5b) connus pour intervenir dans la synthèse de flavonoïdes. D'autres membres de *Vitis vinifera* appartenant aux différents sous groupes de facteurs MYB (R2R3) sont également représentés (identifiants « GSVIVP », <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>). Les homologues de VvSREBP chez *Solanum tuberosum* (StSREBP) et *Arabidopsis thaliana* (AtMYB73 et AtMYB44) sont également représentés. L'arbre phylogénétique a été réalisé avec le logiciel MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007) et la méthode Neighbor Joining (2000 bootstrap replicates).

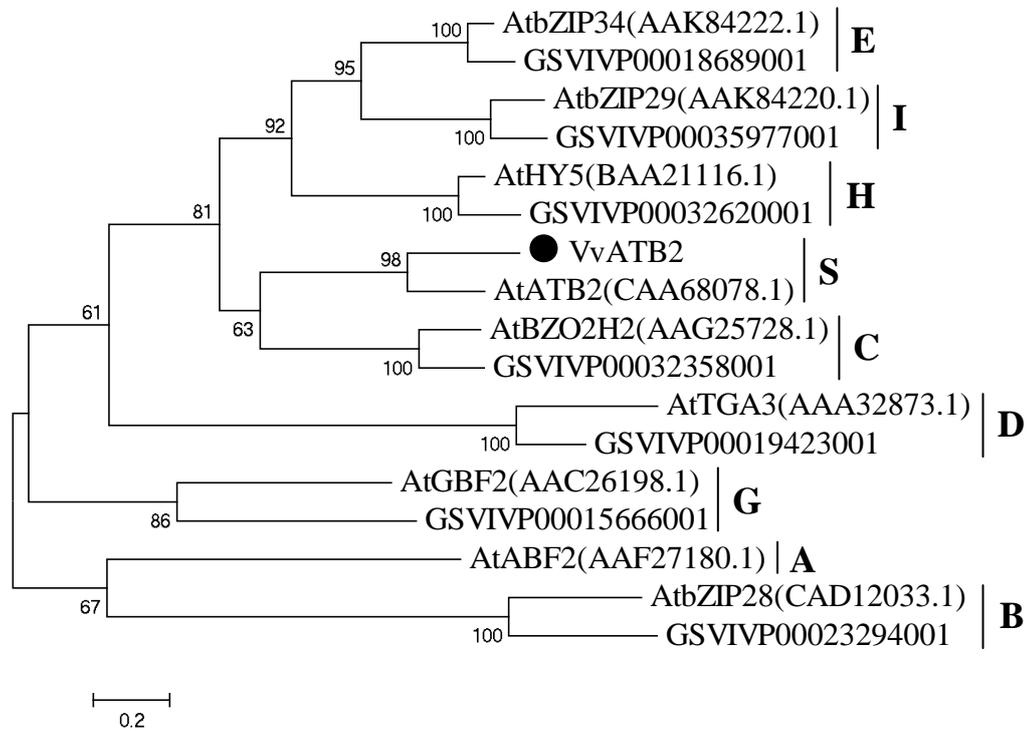


Figure 20. Analyse phylogénique de VvATB2 (rond noir) parmi les différents sous-groupes de la famille b-ZIP. Un membre représentatif de chaque sous-groupe de la famille b-ZIP d'*Arabidopsis thaliana* est représenté, comme décrit par Jacoby *et al.* (2002). Quelques membres b-ZIP de *Vitis vinifera* appartenant à ces différents sous-groupes sont également représentés (identifiants « GSVIVP », <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>). L'arbre phylogénétique a été réalisé avec le logiciel MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007) et la méthode Neighbor Joining (2000 bootstrap replicates).

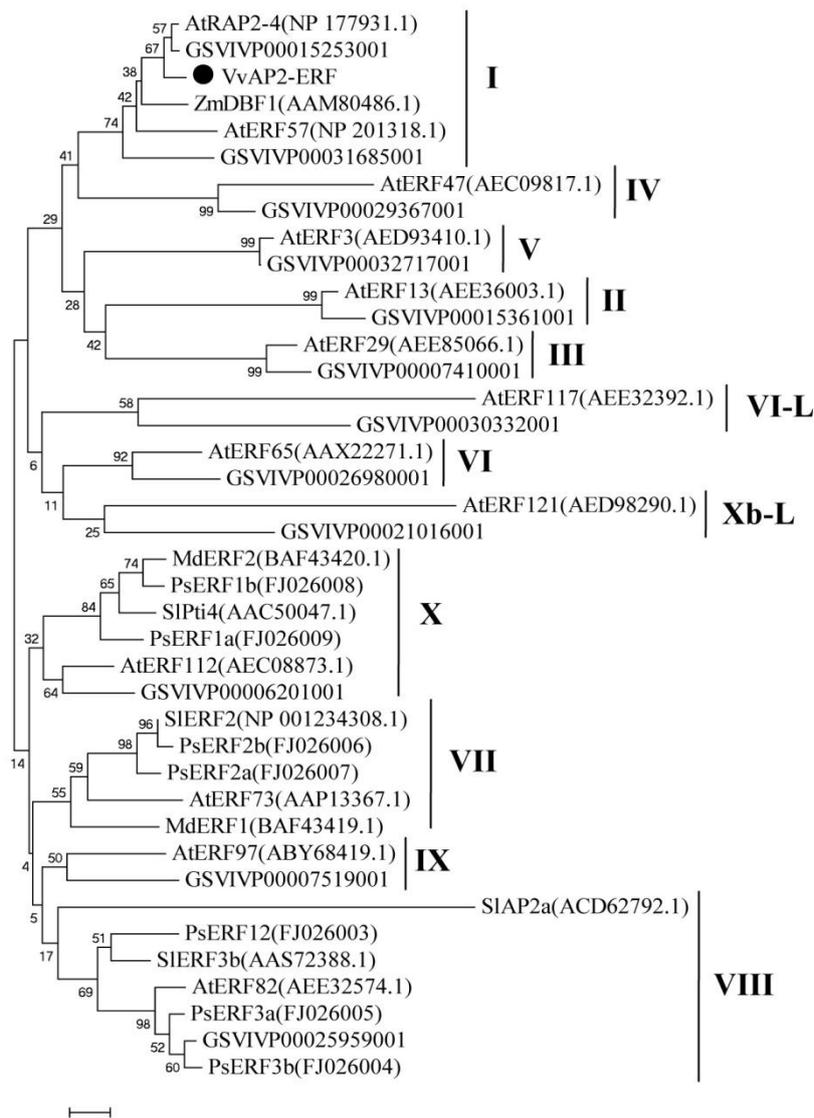


Figure 21. Analyse phylogénique de VvAP2-ERF (rond noir) parmi les différents sous-groupes de la famille AP2-ERF. Un membre représentatif de chaque sous-groupe de la famille AP2-ERF d'*Arabidopsis thaliana* est représenté, comme décrit par Nakano *et al.* (2006). Les sous-groupes VII, VIII et X ont été enrichis avec des protéines de *Solanum lycopersicum* (SIPit4, SIERF3b et SIAP2a), *Prunus salicina* (PsERF1a, PsERF1b, PsERF2a, PsERF2b, PsERF3a, PsERF3b et PsERF12) et *Malus domestica* (MdERF1 et MdERF2) potentiellement impliqués dans les processus de maturation du fruit. Les homologues de VvSREBP chez *Arabidopsis thaliana* (AtRAP2-4) et *Zea mays* (ZmBDF1) ainsi que quelques membres AP2-ERF de *Vitis vinifera* appartenant à ces différents sous-groupes sont également représentés (identifiants « GSVIVP », <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>). L'arbre phylogénétique a été réalisé avec le logiciel MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007) et la méthode Neighbor Joining (2000 bootstrap replicates).

L'analyse phylogénique que nous avons réalisée montre que ce facteur b-ZIP appartient au sous-groupe S des protéines b-ZIP proposée par Jacoby *et al.* (2002) (Figure 20). Chez les angiospermes, les protéines du groupe S constituent un des sous-groupes les plus représentés au sein de la famille b-ZIP (Jacoby *et al.*, 2002 ; Correa *et al.*, 2008). Une partie de ces protéines semble impliquée dans la signalisation et le contrôle du métabolisme énergétique (Jacoby *et al.*, 2002 ; Correa *et al.*, 2008). Chez *Arabidopsis*, le plus proche homologue du FT b-ZIP que nous avons identifié est AtATB2/AtbZIP11 (Rook *et al.*, 1998) (Figure 20), ce qui nous a conduit à nommer ce FT, VvATB2. AtATB2 est régulé de façon post-transcriptionnelle par le saccharose grâce à une séquence conservée située en 5'UTR (Rook *et al.*, 1998 ; Wiese *et al.*, 2004 ; Rhamani *et al.* 2009). AtATB2 est impliqué dans la régulation du métabolisme des acides aminés, ce qui suggère que chez *Arabidopsis* le métabolisme des acides aminés est régulé par les sucres à travers l'action d'AtATB2 (Hanson *et al.*, 2008). Enfin, une étude récente a mis en évidence l'effet d'ATB2 sur la régulation du métabolisme des sucres, plus particulièrement sur celui du raffinose et du tréhalose-6-P (Ma *et al.*, 2011).

FT de la famille AP2-ERF : La séquence codante de ce FT a une longueur de 963 pb et la protéine correspondante, qui comprend 321 aa, possède un domaine conservé AP2-ERF situé entre les aa 121 et 172 (Figure 18C) (Allen *et al.*, 1998 ; Nakano *et al.*, 2006). Ce domaine est constitué par la répétition de 3 feuilletts β (aa 121 à 153) responsables de la liaison à l'ADN, et d'une hélice α (aa 153 à 172) (Figure 18C) (Allen *et al.*, 1998).

L'analyse phylogénétique suggère que cette protéine appartient au sous-groupe I de la classification des protéines AP2-ERF proposée par Nakano *et al.* (2006) (Figure 21). Chez les espèces ligneuses comme la Vigne et le Peuplier, les protéines du sous-groupe I sont généralement moins nombreuses que celles des autres sous-groupes de cette famille (Licausi *et al.*, 2010). De plus, la fonction des AP2-ERF du sous-groupe I est encore très peu connue. Parmi eux, trois ont fait l'objet d'une caractérisation fonctionnelle : DBF1, WXP1 et Rap2.4f (Kizis et Pages, 2002 ; Zhang *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2010). DBF1 (Figure 21) est capable d'activer un facteur de transcription impliqué dans la réponse à la sécheresse médiée par l'ABA chez le Maïs (Kizis et Pages, 2002). Pour sa part, MtWXP1 contribue à la tolérance à la sécheresse, en régulant l'accumulation de cires cuticulaires chez *Medicago truncatula* (Zhang *et al.*, 2007). Enfin, AtRap2.4f (Figure 21) est régulé par un stress osmotique et sa surexpression chez *Arabidopsis* accélère les processus de sénescence, parmi lesquels la dégradation de la chlorophylle dans les feuilles (Xu *et al.*, 2010). Concernant le développement et la maturation du fruit, aucun des AP2-ERF du groupe I caractérisé à ce jour

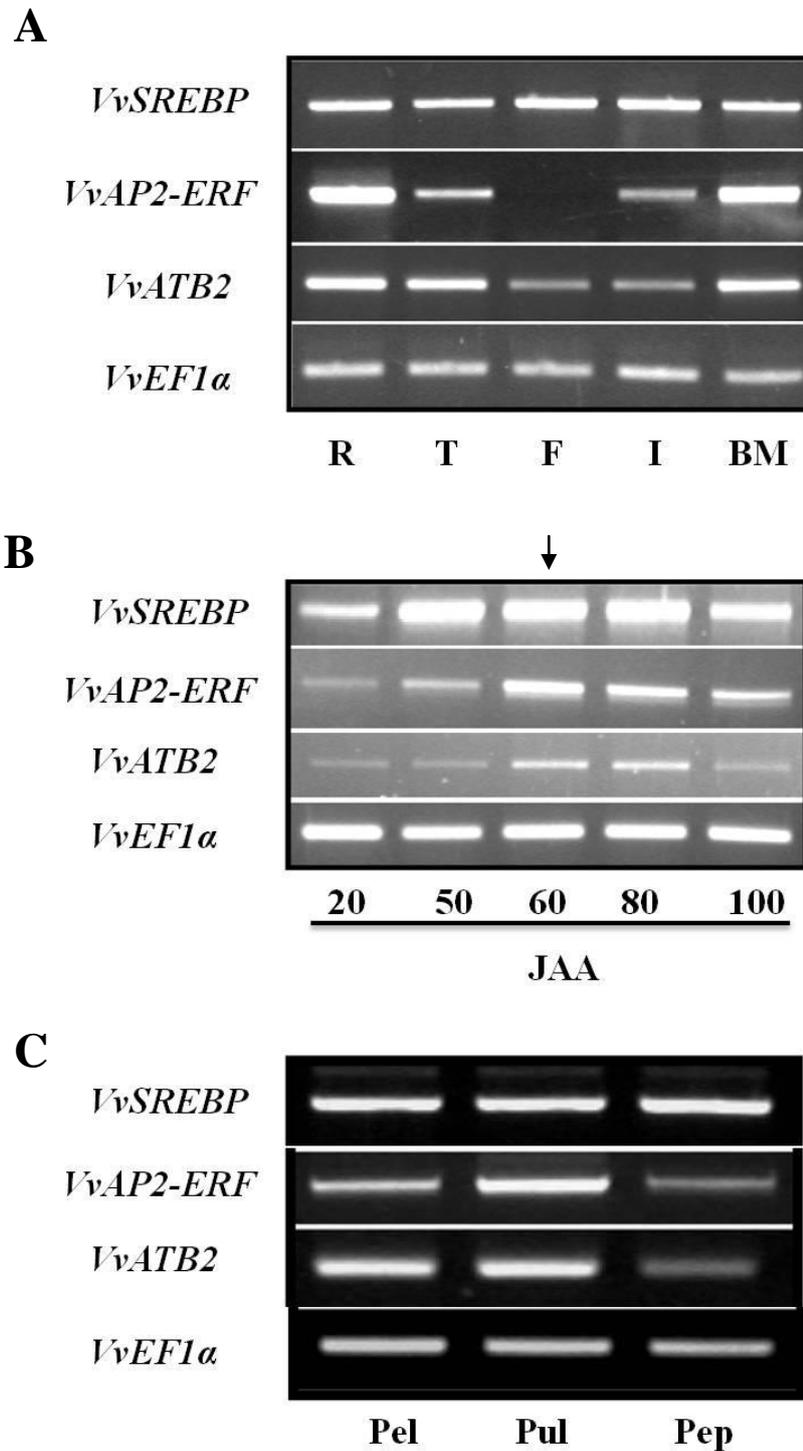


Figure 22. Analyse par PCR semi-quantitative des profils d'expression de *VvSREBP*, *VvAP2-ERF* et *VvATB2* dans différents organes de Vigne (*Vitis vinifera* cv. cabernet-sauvignon) (A), au cours du développement de la baie de raisin (B) et dans les différents tissus de la baie (à 80 JAA, jours après anthèse) (C). (A) : Racines (R), Tiges (T), Feuilles (F), Inflorescences (I) et baies mûres (80 JAA) (BM). (B) : Jours après anthèse (JAA). (C) : Pellicule (Pel), Pulpe (Pul) et Pépins (Pep). *VvEF1α* est utilisé comme contrôle. La flèche indique la véraison.

n'a été impliqué dans ces processus (Tournier *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2007 ; El-Sharkawy *et al.*, 2007, 2009 ; Chen *et al.*, 2008 ; Chung *et al.*, 2010 ; Karlova *et al.*, 2011) (Figure 21).

II. Analyse des profils d'expression chez la Vigne (*Vitis vinifera* cv. cabernet sauvignon)

L'analyse des profils d'expression de ces 3 facteurs de transcription a été réalisée par PCR-semi quantitative à partir d'ARN extraits de différents organes de Vigne (racines, tiges, feuilles, inflorescences et baies mûres) (Figure 22A), de baies récoltées à différents stades de développement (Figure 22B), et de différents tissus de baies mûres (pellicule, pulpe et pépins) (Figure 22C). Les résultats montrent que *VvSERBP* et *VvATB2* sont exprimés de façon ubiquitaire dans les différents organes de Vigne, même si les transcrits *VvATB2* s'accumulent préférentiellement dans les racines, les tiges et les baies mûres, par rapport aux feuilles et aux inflorescences (Figure 22A). *VvAP2-ERF* présente pour sa part un profil d'expression préférentiel dans les racines et les baies mûres (Figure 22A). Il est plus faiblement exprimé dans les tiges et les inflorescences et ses transcrits ne semblent pas s'accumuler dans les feuilles (Figure 22A). De façon très intéressante, lors du développement de la baie de raisin, les transcrits de ces 3 FT s'accumulent majoritairement autour de la véraison et au cours de la première partie de la phase de maturation (Figure 22B). Dans les baies mûres, *VvSREBP* est exprimé de façon similaire dans la pellicule, la pulpe et les pépins, alors que *VvAP2-ERF* et *VvATB2* s'expriment préférentiellement dans la pulpe et la pellicule par rapport aux pépins (Figure 22C).

III. Production d'outils moléculaires en vue de la caractérisation fonctionnelle des 3 FT.

Afin de réaliser leur analyse fonctionnelle, ces 3 FT ont été d'abord été clonés dans un vecteur d'expression transitoire (pRT101). Lors de ce clonage, une étiquette GFP a été ajoutée à l'extrémité C-term des ADNc, afin de déterminer la localisation subcellulaire des 3 FT. Pour des raisons de temps, seule la localisation de *VvSREBP* a été observée après transformation transitoire de protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* au microscope à épifluorescence. Les résultats sont présentés en figure 23. La protéine GFP (témoin) est exprimée très fortement dans le cytosol et le noyau des protoplastes d'*Arabidopsis*. La protéine recombinante *VvSREBP*-GFP est en revanche présente uniquement dans le noyau. Cette localisation

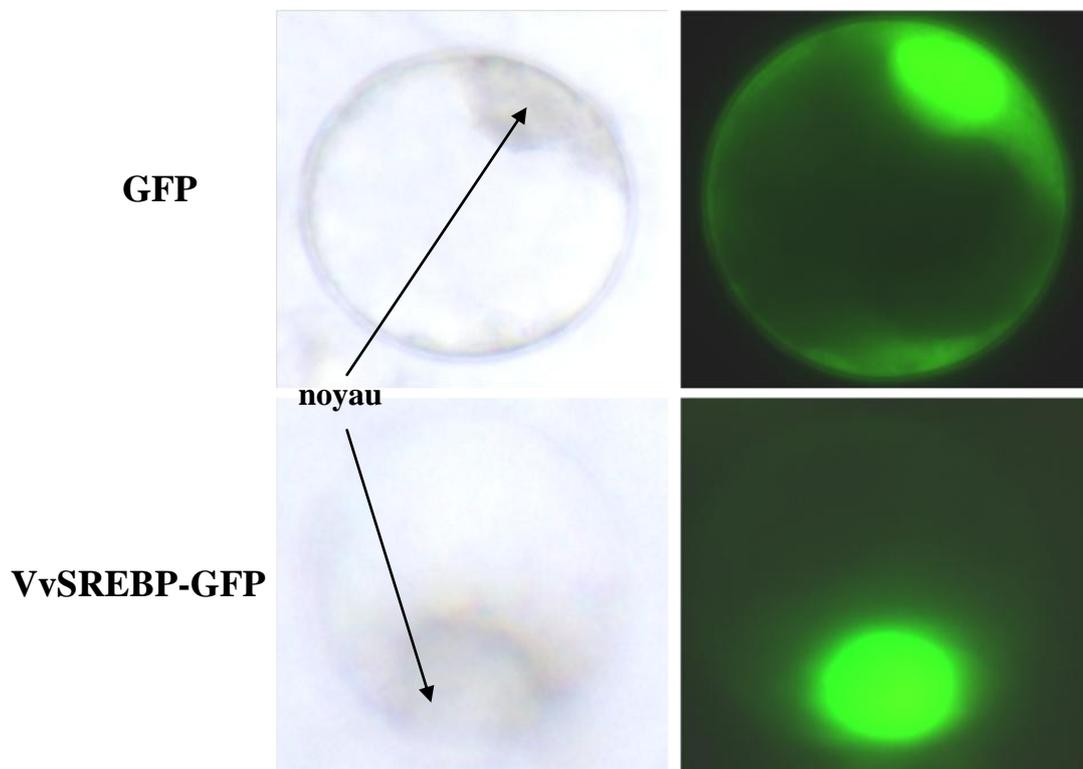


Figure 23. Localisation sub-cellulaire des protéines GFP et VvSREBP-GFP dans des protoplastes *d'Arabidopsis thaliana*, après observation sous lumière transmise (colonne de gauche) et sous fluorescence (excitation 395 nm) (colonne de droite). Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence (Nikon), 20 heures après transformation des protoplastes.

nucléaire de la protéine VvSREBP est en accord avec sa fonction supposée de régulateur transcriptionnel.

Les 3 FT ont également été clonés dans un vecteur d'expression stable (pFB8) afin d'être surexprimés de manière stable. Ces constructions ont été intégrées dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 qui a été utilisée pour transformer des suspensions cellulaires embryogènes de Vigne (41B) et des plants de Tomate (cv. WVA106). Des lignées Vigne et Tomate surexprimant VvSREBP ont ainsi pu être obtenues.

III. Conclusions/perspectives

L'exploitation de données transcriptomiques obtenues à partir de cellules de vigne traitées par le saccharose et de baies à différents stades de développement, nous a permis d'identifier 3 facteurs de transcription de type MYB, b-ZIP et AP2-ERF, dont la caractérisation fonctionnelle a été initiée. Les profils d'expression obtenus au cours de cette étude indiquent que ces 3 FT sont exprimés de façon ubiquitaire dans la plante, excepté VvAP2-ERF qui ne semble pas être exprimé dans les feuilles. Dans la baie de raisin, leurs transcrits s'accumulent tous fortement aux alentours de la véraison, suggérant un rôle possible dans le processus de maturation. Néanmoins, l'analyse phylogénétique que nous avons réalisée n'a pas révélé d'homologies de ces FT avec des protéines impliquées dans le développement du fruit.

Cette analyse a quand même révélé des homologies de VvSERBP et VvATB2 avec des FT impliqués dans la réponse à l'ABA, ainsi que dans la régulation du métabolisme des sucres et des acides aminés (Jung *et al.*, 2008, 2010 ; Hanson *et al.*, 2008 ; Ma *et al.*, 2011). Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la surexpression de VvATB2 sur le métabolisme des sucres et des acides aminés, deux processus affectant la qualité de la baie, dans des suspensions cellulaires de Vigne (41B) et les plants de tomates transgéniques. Comme décrit dans l'analyse bibliographique, l'ABA joue un rôle majeur dans les processus de maturation des fruits non-climactériques. Le lien potentiel entre VvSREBP et la signalisation ABA, suggéré par sa forte homologie avec AtMYB44 (Jung *et al.*, 2008, 2010) est donc intéressant dans le contexte du développement du fruit. L'effet de la surexpression de VvSREBP sur la régulation de la transcription des gènes impliqués dans la réponse à l'ABA pourra être étudié. De plus, les travaux de thèse de David Glissant suggéraient la régulation de l'expression du transporteur de saccharose VvSUTI (s'accumulant préférentiellement à partir de la véraison, Ageorges *et al.*, 2000), par VvSREBP. Dans ce contexte, l'effet de la surexpression de

VvSREBP sur l'expression de *VvSUT1* et d'autres transporteurs de sucres pourra être testé. De manière complémentaire, un dosage global des sucres devra également être réalisé afin de tester si la surexpression de *VvSREBP* affecte réellement le métabolisme associé. D'autre part, pour être fonctionnels, les facteurs de transcription MYB doivent souvent être intégrés au sein de complexes protéiques, notamment avec des FT de type bHLH (Grotewold *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2004; Ramsey et Glover, 2005 ; Quattrocchio *et al.*, 2006). La recherche de partenaires pour *VvSREBP* devra être envisagée par la technique du double hybride chez la levure par exemple.

De façon générale, l'expression des gènes *AP2-ERF* est associée à une réponse à l'éthylène. De ce fait, la caractérisation fonctionnelle de ces FT concerne jusqu'alors uniquement les fruits climactériques (Tournier *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2007 ; El-Sharkawy *et al.*, 2007, 2009 ; Chen *et al.*, 2008 ; Chung *et al.*, 2010 ; Karlova *et al.*, 2011). Chez le raisin, une synthèse d'éthylène faible mais significative se produit à la véraison (Chervin *et al.*, 2004), ce qui pourrait expliquer la stimulation de l'expression de *VvAP2-ERF* à ce moment (Figure 22B). De plus, une étude récente des profils d'expression de l'ensemble des membres de la famille AP2-ERF chez la Vigne a montré qu'une partie des membres de cette famille est induite à la véraison (Licausi *et al.*, 2010). Les travaux de Chervin *et al.* (2004, 2008) suggèrent également un rôle de l'éthylène dans divers processus impliqués dans la maturation du fruit: synthèse d'anthocyanes, ramollissement et diminution de l'acidité.

L'expression préférentielle de ces 3FT au moment de la véraison et le lien que suggèrent les analyses phylogéniques avec différents acteurs de la maturation du raisin corrobore l'implication possible de ces protéines dans le mûrissement du fruit. Il semble donc utile de poursuivre leur caractérisation fonctionnelle pour préciser leur rôle dans ce processus. Dans ce contexte, les profils d'expression de ces FT chez la Vigne devront être affinés par une analyse en PCR Quantitative. De plus, l'étude des lignées "surexprimeurs" permettra l'identification de gènes cibles potentiels, de façon ciblée par PCR quantitative, ou à plus grande échelle par des analyses microarrays ou RNAseq. D'autre part, les données concernant les processus de mobilisation et de régulation des FT demeurent encore fragmentaires (Vom Endt *et al.*, 2002). Dans le cas présent, il s'agira d'essayer de comprendre comment les régulateurs transcriptionnels que sont *VvSREBP*, *VvATB2* et *VvAP2-ERF* sont eux-mêmes régulés. Une régulation transcriptionnelle par les sucres est envisagée pour ces FT, mais il faut aussi étudier leur expression en réponse aux différentes hormones (ABA, BR, auxine, éthylène) jouant un rôle dans le développement de la baie de raisin (Conde *et al.*, 2007). Une

approche simple hybride permettrait par ailleurs d'identifier des régulateurs transcriptionnels se fixant sur le promoteur de chacun de ces gènes.

Chapitre II

Caractérisation fonctionnelle de VvCEB1



Photographie de détail de baies de raisin (Vitis vinifera cv.Koshu)

I. Introduction

Chez la Vigne, la taille de la baie est considérée comme un paramètre déterminant de sa qualité au moment de la récolte (Champagnol, 1998). Cette taille finale est définie par le nombre de cellules multiplié par la taille moyenne de chacune d'elles (Cowan *et al.*, 2001; Rapoport *et al.*, 2001). La division cellulaire est donc un facteur essentiel de l'organogenèse, même si l'expansion cellulaire reste l'élément majeur de la croissance en volume du fruit charnu (Cong *et al.* 2002). En effet, en étudiant les mécanismes de croissance de la baie (dynamique de croissance cellulaire et élargissement du péricarpe), Fernandez *et al.* (2006a) ont montré que chez les cépages *Vitis vinifera* L., la variabilité de la taille des baies dépend essentiellement de la phase d'expansion cellulaire. Au contraire, chez les vignes sauvages cette variabilité dépend à la fois de la phase de multiplication et de la phase d'expansion cellulaire. Les mécanismes moléculaires contrôlant ce processus développemental ne sont pas encore clairement élucidés.

Dans cette seconde partie de mon travail de thèse, nous avons identifié et caractérisé un facteur de transcription de vigne appartenant à la famille bHLH que nous avons appelé VvCEB1 pour « Cell Elongation bHLH1 » et qui semble impliqué dans le processus d'expansion cellulaire déterminant la taille du fruit.

Les résultats principaux concernant cette partie de mon travail de thèse seront décrit et discutés sous la forme d'un article qui sera prochainement soumis pour publication. Cet article sera suivi d'une partie de résultats complémentaires. Enfin, une partie discussion/conclusions sur l'ensemble des résultats présentés terminera ce chapitre.

II. Article

TITLE:

Identification and characterisation of VvCEB1 a bHLH transcription factor affecting cell size during grape berry development

Authors:

Philippe Nicolas, David Lecourieux, Eric Gomès, Serge Delrot and Fatma Lecourieux*

*Corresponding author:

Address:

UMR Ecophysiology and Grape Functional Genomics, University of Bordeaux, INRA, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France

ABSTRACT

Grape berry development is a coordinated process involving a combination of hormonal signals which control complex physiological and biochemical changes. After anthesis and fruit set, berry growth begins with both cell division and cell expansion, and ends with cell expansion only. The molecular mechanisms controlling grape berry growth are far from being fully understood. The present work identifies and characterizes a new bHLH transcription factor, called VvCEB1, which was isolated from grape (*Vitis vinifera* L.) berry. *VvCEB1* transcripts accumulate almost exclusively in the berry with a maximum around veraison stage. Overexpression of *VvCEB1* disturbs development and affects organ size by affecting cell number and cell size. The study of *VvCEB1* promoter expression in tomato confirmed that *VvCEB1* is specifically expressed in the fruit and more particularly during its expansion phase. A transcriptional analysis performed on the grape transgenic cell lines confirmed that VvCEB1 stimulates cell expansion and suggested that this transcription factor probably acts by affecting auxin homeostasis and signalling. Altogether these data indicate that VvCEB1 plays a key role in grape berry development.

INTRODUCTION

In a context of decreasing land and water resources available for agriculture, the control of fruit size and content is of paramount importance to respond to the need of the increasing human population. In this context, deciphering the molecular basis of growth and development of dry and fleshy fruits is a major challenge.

Grape berry is a non-climacteric fleshy fruit that follows a characteristic double sigmoidal growth pattern interrupted by a lag phase marking the transition from herbaceous development to ripening (Coombe 1992). After anthesis and fruit set, both cell division and cell expansion are responsible for berry growth. The last part of the first growth phase is due to cell expansion only. The grape berry subsequently goes through a lag phase of slow or no growth. The beginning of the second growth phase, known as veraison, is characterised by the initiation of a number of events, including colour development, softening, acceleration of growth (berry weight and volume), increase in sugar content and decrease in organic acids (Coombe 1992). The increase in berry weight during this second growth phase has been attributed mainly to the accumulation of water and sugar, and the increase in berry size is due solely to cell expansion (Coombe 1992).

Grape berry development is a complex process of physiological and biochemical changes, that is initiated by hormonal signals generated after pollination (Coombe and McCarthy, 2000; Conde et al., 2007). The nature and origin of the hormonal signals involved are not fully understood, but their abundance at specific stages of fruit development and ripening indicates their possible role during these developmental stages (Conde et al., 2007). The first steps of berry development, from fecundation to nouaison (fruit set) are under the control of developmental hormones (auxins, cytokinins and gibberellins) that promote cell division and cell expansion. Although part of these hormones can be imported into the berry, they are mostly produced by the seeds, or by the maternal tissues (unfertilized ovules) in case of seedless species. Thus, it was suggested that the final size of the berry depends on the number of seeds it contains. These hormones reach a maximal concentration just before veraison and then decrease sharply along ripening (Coombe 1992; Blouin and Guimberteau, 2000). Hormonal control of grape berry ripening may result from a combination of signals rather than being under the control of a single hormone. No specific hormone is clearly related to non-climacteric fruit ripening in general, and grape maturation in particular (Coombe and Hale 1973; Jiang et al. 2003; Giovanonni 2004). Three hormones may associate to regulate grape berry maturation processes: abscisic acid (ABA), ethylene, and brassinosteroids (BRs). There is evidence of a transient increase in endogenous ethylene levels prior to veraison

suggesting that ethylene may play some role during grape berry development (Chervin et al., 2004). Other classical plant hormones, such as auxin and abscisic acid (ABA), have also been implicated in the control of grape berry ripening (Seymour et al., 1993; Davies et al., 1997). Finally, it was shown that endogenous BR levels influence the onset of ripening in grape berries (Symons et al., 2006).

Basic helix-loop-helix (bHLH) proteins are a class of transcription factors found throughout eukaryotic organisms (Pires and Dolan, 2010). Their importance in a myriad of essential developmental and physiological processes is well established. In plants, bHLH proteins function as transcriptional regulators modulating secondary metabolism pathways, fruit dehiscence, carpel and epidermal development, phytochrome signalling, and stress responses (Ramsay and Glover 2005; Castillon et al. 2007; Pires and Dolan, 2010; Feller et al., 2011). Recent studies described the involvement of bHLH proteins in the determination of plant organ size. The SPATULA protein was shown, to control cotyledon, leaf, and petal expansion by affecting cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* (Ichihashi et al., 2010). The *Capsicum annum* protein Upa20 (up-regulated by AvrBs3) was described as a master regulator of cell enlargement that stimulates cell growth (Kay et al., 2007), whereas BIGPETALp (BPEp) from *Arabidopsis* was shown to limit petal growth by reducing cell size (Szécsi et al., 2006). In grapevine, few data are available about the role of proteins from the bHLH family in reproductive development. Only two papers describe the identification of bHLH grapevine genes related to flavonoid synthesis (Hichri et al., 2010; Matus et al., 2010).

The present study identifies and characterizes *VvCEB1* (*Vitis vinifera* Cell Elongation bHLH), a novel bHLH-like protein from grape (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon). *VvCEB1* transcripts predominantly accumulate in the berry, especially when auxin amounts are minimal. Using a transgenic approach, we show that *VvCEB1* overexpression disturbs embryo development and affects organ size by increasing cell size, whereas its silencing had no phenotypical effect. A transcriptional analysis confirmed that *VvCEB1* overexpression stimulates cell expansion and suggested that its biological function may be related to auxin homeostasis.

RESULTS

Identification of a novel bHLH-like protein from grape

A transcriptomic analysis of developing grape berries was performed in order to identify new transcription factors that could affect berry development (Glissant et al., 2008). Different transcription factor genes whose expression was upregulated during berry development were

identified. Among these, a bHLH-like gene was isolated and further analysed. The full-length cDNA was amplified by PCR using a grape berry cDNA library and was named VvCEB1 (XM_002267429).

In grapevine, an *in silico* analysis (using the 12X genome sequences) suggested the presence of a 102 predicted amino acid protein sequence (VvCEB1) fitting with the bHLH family (PlnTFDB : Perez-Rodriguez et al., 2009). To identify the cluster to which VvCEB1 belongs, a rooted phylogenetic tree (MEGA) was constructed from the alignment of 68 full-length bHLH protein sequences from different plant species (Figure 1). The grapevine sequences were identified by performing a BLASTP similarity search on the NCBI database using different *Arabidopsis* bHLH proteins as queries (Pires and Dolan, 2010). This phylogenetic analysis revealed that among the 26 distinct plant bHLH protein subfamilies described by Pires and Dolan, VvCEB1 belongs to subfamily XII and particularly to a cluster containing proteins involved in growth regulation. This cluster includes among others, UPA20 (ABW22630.1) from *Capsicum annum* reported to be involved in cell elongation (Kay et al., 2007), GBOF-1 (AAD56411.1) from *Tulipa gesneriana* affecting stem elongation in response to low temperature (Rietveld et al., 1999 unpublished results), BPEp (Q0JXE7-1) from *Arabidopsis thaliana* described as a regulator of petal size (Szécsi et al., 2006), bHLH137 (NP_851163) from *Arabidopsis thaliana* described as a DELLA responsive gene that may act as repressors of GA signalling (Zentalla et al., 2007). Furthermore, another bHLH from grape belongs to this cluster. This protein (XP_002284454) is the closest grape homolog of VvCEB1 (47% similarity) and UPA20 (59.4% similarity). Its function was not described yet but preliminary results show that this grape bHLH presents accumulation profiles in plants that are very similar to VvCEB1. The other proteins present in this subfamily correspond to bHLH involved in brassinosteroids signalling (BEE) (Friedrichsen et al., 2002) and cryptochrome interaction (CIB) (Liu et al., 2008).

The full-length cDNA of VvCEB1 (XM_002267429) was amplified by PCR using a grape berry cDNA library. The VvCEB1 transcript is 810 bp long and encodes a protein of 270 amino acids. VvCEB1 contains a nuclear localization site (NLS) between amino acids 68 and 96 and a typical basic HLH domain which usually serves as DNA binding and dimerization domain (Toledo-Ortiz et al., 2003) located in the region between amino acids 115 to 164 (Figure 2A).

The full length sequence alignment of VvCEB1 with its closest homologs from other plant species revealed that VvCEB1 exhibits 40.6% amino acid sequence similarities with UPA20 (*Capsicum annum*), 38.9% with GBOF-1 (*Tulipa gesneriana*), and 36.6% with BPEp

(*Arabidopsis thaliana*).

To precise the subcellular localization of *VvCEB1*, a green fluorescent protein (GFP) was fused in frame to the C-terminus of *VvCEB1*, and the resulting protein was expressed in tobacco protoplasts under the control of the CaMV 35S promoter. Unlike the GFP control that was expressed throughout the cell, *VvCEB1*-GFP was only detected in the nucleus (Figure 2B), in agreement with a putative role in the control of transcription.

Expression Analysis of *VvCEB1* in Grapevine

The expression profile of *VvCEB1* was determined in different grapevine organs by quantitative RT-PCR with RNA extracted from Cabernet Sauvignon roots, stems, leaves, flowers, and mature berries (80 days post anthesis, dpa). *VvCEB1* was almost exclusively expressed in berries in comparison to the other plant organs (Figure 3A). Indeed, in mature berries, *VvCEB1* was highly expressed whereas it was barely detectable in leaves, stems, roots and inflorescences.

VvCEB1 transcript accumulation was also assessed during berry development (Figure 3B). *VvCEB1* expression showed a strong and gradual increase from nouaison (2 dpa; berry set) and reached a maximum after veraison (60 dpa, fruit ripening). Transcript levels were maintained maximal until 80 dpa and then slowly decreased until the mature stage (100 dpa) (Figure 3B).

VvCEB1 transcript amounts were also monitored in the different berry compartments (seeds, pulp, and skin) after veraison. *VvCEB1* transcripts were most abundant in the pulp, moderately abundant in the skin and weakly detected in seeds (Figure 3C).

***VvCEB1* overexpression affects grapevine embryo development**

To investigate the function of *VvCEB1* in grape, transgenic cells overexpressing or underexpressing *VvCEB1* were produced using 35S-driven *VvCEB1* and *VvCEB1* RNA interfering (RNAi) constructs. After stabilization of the cell suspension, the expression of *VvCEB1* was tested by quantitative RT-PCR using *VvCEB1*-specific primers. In cells expressing the 35S::*VvCEB1* construct, *VvCEB1* transcript accumulated 75-fold more than in cells expressing the empty vector (Figure 4). A 2-fold silencing of *VvCEB1* expression was detected in cells expressing the RNAi construct (Figure 4).

To study the effect of *VvCEB1* on grape development, regeneration was initiated from *VvCEB1* overexpressing cells. The somatic embryos development of control, 35S::*VvCEB1* and, RNAi lines (*VvCEB1i*) was observed under the light microscope (Axiophot, ZEISS or

stereomicroscope, Leica MZFLIII) (Figure S1). No obvious difference was observed between the control embryos and the RNAi expressing embryos during the whole developmental process. By contrast *VvCEB1* overexpressing line displayed strong phenotypical defects. Until 7 days, embryos of similar appearance were formed in both control and *VvCEB1* overexpressing embryos. Between day 7 and 16, control embryos switched from the heart to the torpedo stage (day 16) and to mature embryos, with fully formed cotyledons ; hypocotyl-root axis were visible at day 18. During the same period, the transgenic embryos rapidly elongate and still failed to develop cotyledons and to acquire bilateral symmetry (Figure S1). Moreover, secondary embryos started to develop from the primary transgenic ones and led to abnormal somatic embryos that could never develop into grape plantlets (Figure 5A). Detailed measurements revealed that 35S:: *VvCEB1* embryos grew faster than the control and can reach, during the growth period, a size that exceeds by 11 fold the size of the control embryos (i.e. 17 days after initiation of embryogenesis) (Figure 5B). In addition, bright microscopy observation after chloral hydrate treatment showed that the increase in size of the transgenic embryo was associated with the presence of bigger cells in comparison to the control (Figure 6A). This difference in cell size increased during embryo development (Figure 6B).

All these phenotypical changes suggest that *VvCEB1* might be involved in cell growth and organogenesis.

Modulation of cell expansion- and auxin-related gene expression in grape cells overexpressing *VvCEB1*

The phenotypical changes observed in *VvCEB1* overexpressing embryos suggest an alteration in auxin polar transport and signalling, that was previously shown to influence the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis (Liu et al., 1993; Fischer and Neuhaus, 1996; Jenik and Barton, 2005; Moller and Weijers, 2009), and to affect growth and organogenesis (de Smet et al., 2010; Vanneste and Friml, 2009).

To strengthen this hypothesis and to address how *VvCEB1* can affect auxin response and cell expansion, the expression of several genes involved in these responses was tested in the transgenic embryos overexpressing or underexpressing *VvCEB1*. Therefore, the expression of several gene families involved in auxin transport and signalling and cell wall metabolism were analysed by quantitative RT-PCR in both grape transgenic lines. These included seven members of the PIN family (*VvPIN1.1*, *1.2*, *2*, *5*, *6*, *7* and *8*), three auxin influx carrier genes (*VvAUX1.3*, *1.8*, *1.13*), one PINOID gene (*VvPID1*), one Plethora gene (*VvPLT2*), five AUX/AIA genes (*VvIAA9*, *14*, *16*, *17* and *19*), three ARF genes (*VvARF6*, *9*, and *17*), two

SAUR genes (small auxin up RNA) (*VvSAUR1*, , *VvSAUR5*), two GH3 genes (*VvGH3-2*, *VvGH3-6*), one xyloglucan endotransglucosylase gene (*VvXET2*), two pectate lyase genes (*VvPECL1*, *VvPECL8*), one pectin methylesterase gene (*VvPME*), one α -amylase gene (*VvAMY1*), one cellulose synthase gene (*VvCS*), one arabinogalactan (*VvAGP20*), five expansin genes (*VvEXP1*, *VvEXP2*, *VvEXP8*, *VvEXP11*, *VvEXP17*) and, four aquaporin genes (*VvAQPI*, 2, 3, 4).

Among the seven *PIN* genes tested, three genes (*VvPIN5*, *VvPIN6* and 8) were hardly detectable in the embryos, three genes (*VvPIN1.1*, 1.2 and 7) were strongly repressed in 35S::*VvCEB1* embryos, whereas *VvPIN2* was dramatically upregulated in *VvCEB1* overexpressing embryos and strongly downregulated in RNAi cells in comparison to the control (Table 1). Among the three auxin influx carrier genes studied, one (*VvAUX1.13*) was not affected in the transgenic lines, whereas the two other genes were affected in an opposite way. Indeed, *VvAUX1.3* was repressed whereas *VvAUX1.8* was induced in the 35S::*VvCEB1* line (Table 1).

Concerning the genes encoding proteins involved in auxin signalling, our experiments revealed that the expression of the auxin kinase *VvPIDI* was not affected, in contrast to the expression of other auxin signalling components (Table 1). Indeed, *VvIAA9*, *VvIAA17*, *VvARF17* and *VvPLT2* genes were down-regulated in the transgenic embryos overexpressing *VvCEB1*, whereas *VvIAA14*, *VvIAA16*, *VvIAA19*, *VvSAUR1*, and *VvSAUR5* were strongly up-regulated compared to the RNAi and control lines. The genes encoding auxin-conjugating enzymes, *VvGH3-2* and *VvGH3-6*, were also dramatically upregulated in the 35S transgenic line.

Among the cell expansion genes tested, real time PCR experiments confirmed that most of these were strongly up-regulated in 35S::*VvCEB1* transgenic embryos in comparison to the control or RNAi line (Table 2). These correspond to the cell-wall modification genes encoding expansins (*VvEXP1*, *VvEXP8* *VvEXP11* and *VvEXP17*), α -amylase (*VvAMY1*), xyloglucan endotransglucosylase (*VvXET2*), pectate lyase (*VvPECL1*, *VvPECL8*), arabinogalactan protein (*VvAGP20*) and to three among four aquaporin genes tested (*VvAQPI*, 3, 4). The last few tested genes that were either not properly expressed or which expression was not significantly affected in the transgenic embryos correspond to *VvPME*, and *VvCS*.

The expression profiles for some of the genes that were the most overexpressed or underexpressed in the grape transgenic lines were analysed throughout berry development. The expression of the 35S::*VvCEB1*-downregulated genes declined during berry

development, in contrast to the *35S::VvCEB1*-upregulated genes which expression increased parallelly to *VvCEB1* transcript accumulation (Figure S2). For instance, the expression of auxin efflux transporter genes *VvPIN1.1*, *VvPIN1.2* and *VvPIN7*, and of the auxin responsive transcription factor genes *VvIAA9* and *VvIAA17* that was significant at the green stage, dropped during the berry development by contrast to *VvIAA19*, *VvIAA16*, *VvEXP11*, *VvAQP4*, *VvXET2*, *VvAMY1* and *VvPECL8* genes which expression increased during the same period (Figure S2).

Comparisons of gene expression by Q-PCR in control and transgenic embryos revealed strong and coordinated regulation of several genes encoding proteins involved in auxin signalling and polarity, and other proteins affecting cell expansion.

These data reinforce the hypothesis that *VvCEB1* expression regulates auxin transport and signalling, and cell expansion processes during berry development.

***VvCEB1* overexpression affects plant organ development**

To better understand the role of *VvCEB1* on berry development, we transformed cv. Wva 106 tomato plants with *35S::VvCEB1* construct or with PFB8 empty vector. This choice was guided by the fact that we failed to produce grape plantlets from the transgenic cells and, because tomato is relatively easy to transform and rapidly provides fruits. Out of twenty transformants, thirteen were tetraploid and seven were diploid. Among the diploid lines, three overexpressing lines differing in *VvCEB1* transcript abundance were selected for further investigation and compared to plant lines transformed with PFB8 empty vector. The overall growth phenotype of the selected plants is depicted in figure 7A. Their analysis revealed that *VvCEB1* expression level determines the strength of the phenotype. Indeed, the more the plant expressed the transgene, the more its morphology was altered (Figure 7A and 7B). In comparison to the control plants, the transgenic plants containing the highest amount of *VvCEB1* transcripts (plants L1, L2 and L3) exhibited phenotypically different leaves containing more supernumerary leaflets (presence of numerous intercalary leaflets) with less serrations (Figure 7C and 7D) and a loss of apical dominance with the consequent bushy appearance (Figure 7A). Floral structure was also severely disturbed with alterations in sepals, petals and stamens size and shape (Figure 8). Indeed, measurements showed that *VvCEB1* overexpression induced a 1.5 fold increase in sepal size and a curl aspect. The stamens were curly at the top and longer than the control and the petals were longer but less wide than that of the control (Figure 8). As fruit develop, sepals still stick in to the fruit by contrast to the control where the sepals stick out of the fruit (Figure 9). The morphology of the fruit was also

affected. 35S:: *VvCEBI* fruits are smaller and had an elongated shape in comparison to wide type fruits that were round. Fruit transversal sections showed no significant differences in pericarp size but revealed the presence of less but bigger cells in the transgenic fruit (Figure 10). Indeed, 35S:: *VvCEBI* fruit pericarp is composed by an average of 11 cell layers of $0.020 \pm 0.002 \text{ mm}^2$ whereas control fruit pericarp possesses around 14 cell layers of $0.015 \pm 0.001 \text{ mm}^2$ (Table 3). The septum was wider than in the control (0.904 ± 0.078 and 0.392 ± 0.076 respectively) (Figure 10, Table 3). By contrast to the pericarp, more and bigger cells compose this transgenic tissue. Indeed, a 10 cell layer of $0.017 \pm 0.003 \text{ mm}^2$ (corresponding to an estimated total of 179 cells) represents the 35S:: *VvCEBI* fruit whereas a layer of 7 cells of $0.007 \pm 0.001 \text{ mm}^2$ (estimated total of 318 cells) represents the control fruit (Table 3). The columella tissue of the transgenic fruit also appeared overdeveloped with again less but bigger cells 447 cells of $0.011 \pm 0.001 \text{ mm}^2$ and 2794 cells of $0.005 \pm 0.001 \text{ mm}^2$ respectively (Figure 10, Table 3). Another characteristic of the columella from transgenic fruits is that it gathered at the edge of the fruit, contributing to its elongated shape (Figure 10). Locular gel tissue and seeds were much less abundant than in the control (Figure 10). Indeed, 35S:: *VvCEBI* fruits possess 12 to 20 time less seeds than PFB8 control fruits, and these seeds hardly or do not germinate (75 % of the seeds do not germinate, data not shown).

Taken together, these data led us to conclude that the altered organ size observed in 35S:: *VvCEBI* plants results both from changes in cell number and in cell size.

To further investigate the relationship between *VvCEBI* expression and grape fruit size, *VvCEBI* transcript abundance was determined in grape varieties exhibiting differences in berry size. Five varieties producing small berries (Rubra, Cinerea, Riparia 10525, Riparia 10202 and Sylvestris 38) and six varieties producing big berries (Candicans 10089, Tite de Crabe, Cardinal, Dodrelabi, Dabouki, Kyoho) were analysed. This study was performed 3 weeks after veraison when *VvCEBI* expression peaks. The results are summarised in Figure 11. In small berries, *VvCEBI* expression varied from a relative expression level of 1 to 1.2 whereas it was almost tripled in big berries (relative expression level from 2.8 to 3.2). These data revealed a relationship between *VvCEBI* expression level and berry size.

Specific Expression of *VvCEBI* promoter in Tomato Fruits

Quantitative RT-PCR experiments showed that *VvCEBI* transcripts predominantly accumulate in the berry in comparison to the other plant organs (Figure 3A) suggesting a fruit specific expression of this gene. To further investigate *VvCEBI* expression *in planta* and to

confirm this hypothesis, we examined its promoter activity in transgenic tomatoes expressing *VvCEB1* promoter fused to the β -glucuronidase (GUS) reporter gene.

Strong GUS activity was observed in all 35Spro-GUS organs, while no staining was detected in wild-type controls (Figure 11). *VvCEB1* promoter only resulted in fruit-specific expression, with no GUS staining in vegetative organs (Figure 11) confirming that even when expressed in tomato, *VvCEB1* keeps its fruit specificity. Analysis of *VvCEB1*pro:GUS during fruit development showed GUS staining at early stages until the end the mature green stage (30 dpa), then its promoter activity decreases. These data are consistent with a specific expression of *VvCEB1* in the fruit during the expansion phase (10 to 40 dpa, Lemaire-Chamley et al., 2005).

DISCUSSION

This work identifies and characterizes *VvCEB1* a new bHLH transcription factor from grape that is preferentially expressed in the developing berry. Its expression is significant after fruit set, maximal at veraison and maintained until harvest. The nearly- exclusive expression of this gene in the berry suggests a key role for *VvCEB1* during fruit development.

***VvCEB1* is a Nuclear bHLH Transcription Factor Clustering with Genes Controlling Cell Growth and Organ Size**

A phylogenetic analysis revealed that *VvCEB1* belongs to the subfamily XII of the bHLH TFs (Pires and Dolan, 2010) that particularly contains proteins previously described as involved in growth regulation. This cluster includes among others, UPA20, GBOF-1, and BPEp all known to regulate cell growth and organ size. BPEp affects cell expansion and petal growth in an auxin-dependent manner (Szécsi et al., 2006 and Varaud et al., 2011). The other known proteins present in this subfamily correspond to bHLH proteins involved in brassinosteroids signalling (BEE) (Friedrichsen et al., 2002) and in cryptochrome interaction (CIB) (Liu et al., 2008). As auxins, BRs are crucial plant hormones in promoting plant growth, that participate in a large array of plant developmental progresses. At cellular levels, BRs can regulate cell elongation, cell division, and cell differentiation (Yang et al., 2011). Recently, Chung et al. (2011) made a direct link between auxin and BRs. These authors showed that auxin regulates BR biosynthesis in *Arabidopsis*, and suggested that, for some of its growth-promoting effects, auxin relies on synthesized BRs. Taken together, these data suggest that for the regulation of cell elongation, similarities exist in the mode of action

involving the different proteins from clade XII.

The Predominant Expression of *VvCEB1* in The Fruit Suggests a Key Role in Berry Development

The expression analysis of *VvCEB1* in grapevine revealed that *VvCEB1* was almost exclusively expressed in berries in comparison to the other plant organs. Additionally, while the overexpression of *VvCEB1* induces strong phenotypical changes in tomato plants, the analysis of the expression of its promoter showed that *VvCEB1* is specifically expressed in the fruit. Interestingly, this fruit specific expression occurs mainly during the fruit expansion phase reinforcing the link between *VvCEB1* and cell expansion. Finally, *VvCEB1* transcript accumulation study in grape varieties exhibiting differences in berry size revealed a correlation between *VvCEB1* transcript accumulation and the berry size. Altogether these data underline its key role in the regulation of berry development.

Overexpression of *VvCEB1* Affects Cell Size and Plant Organ Development

To get a better insight in the role of *VvCEB1* on plant and berry development, a transgenic approach was performed by producing grape cells and embryos overexpressing or underexpressing *VvCEB1*, and tomato plants overexpressing *VvCEB1*.

The time course of embryo development between *35S::VvCEB1* and the control were compared. Microscopic observations showed that the overexpressing line exhibited drastic phenotypical differences in comparison to the control. Indeed, the *35S::VvCEB1* embryos rapidly elongate, failed to develop cotyledons and to acquire bilateral symmetry thus leading to abnormal somatic embryos that could never develop into grape plantlets. In comparison to the control these embryos grew faster and reached a more important final size because of the presence of bigger cells. Over the past few years, important progress has been made to understand the role of auxin in plant embryogenesis. Indeed, new insights into its molecular mechanism of transport and signalling uncovered the fundamental roles of auxin in the earliest stages of plant development such as in the determination of the apical-basal axis of the embryo and in the formation of the root, of shoot apical meristems and of the cotyledons (for review see Jenik et al., 2005). Therefore, our results indicate that in addition to its potential role in regulating organogenesis and cell proliferation and elongation, *VvCEB1* may play a critical role in embryogenesis by affecting auxin action.

The involvement of bHLH transcription factors in embryogenesis was recently described in plants. In *Arabidopsis*, RETARDED GROWTH OF EMBRYO1 (*RGE1*), is expressed in

endosperm and controls embryo growth and morphology after the heart stage (Kondou et al., 2008). It regulates the breakdown of endosperm during embryo expansion (Yang et al., 2008 ; Kondou et al., 2008). BIM1 (BES interacting Myc-like protein 1) that was previously involved in BR signalling (Yin et al., 2005), has recently been involved in embryonic patterning without affecting auxin fluxes (Chandler et al., 2008).

The production of transgenic tomatoes overexpressing *VvCEB1* reinforces the results showing that *VvCEB1* affects cell growth through the involvement of the hormone auxin. Indeed, the transgenic plants exhibit an overall growth phenotype that suggests a deregulation in auxin homeostasis with a loss of apical dominance, phenotypically different leaves containing numerous intercalary leaflets, a floral structure severely disturbed, a morphology of the fruit strongly affected with an elongated shape and bigger cells. Data from the literature linked these phenotypical traits to auxin. Using tomato plants, Keonig et al. (2009) showed that auxin distribution is crucial to develop a dissected leaf because the asymmetric distribution of auxin, driven by active transport, delineates the initiation of lobes and leaflets and specifies differential laminar outgrowth. Auxin clearly plays an essential role in various aspects of flower development and is apparently a key regulator for the fate of several founder cells for flower primordia (for review see Cheng and Zhao, 2007). Recent genetic and physiological analyses have linked auxin signalling to the developmental changes associated with seed set and fruit initiation (Wang et al., 2005 ; Goetz et al., 2006). In addition, overexpression of *SUN* in tomato results in an extremely elongated fruit shape and in a lack of proper seed development that led the authors to suggest that *SUN* may affect auxin levels or distribution in the fruit (Xiao et al., 2008). Finally, our microscopic analysis of transversal fruit sections showed the presence of less numerous but bigger cells in the different 35S:*VvCEB1* tomato fruit tissues. This phenotype is closely related to auxin that is known to regulate cell division and cell expansion during fruit development.

VvCEB1 Strongly Affects the Expression of Genes Involved in Auxin Distribution and Signalling and Cell Expansion

The Q RT-PCR analysis performed on 41B cell lines overexpressing *VvCEB1* indicated that the hormone auxin could be involved through its transporters and signalling components, and showed that cell expansion genes were affected. These results fit well with the previous phenotypical observations suggesting that *VvCEB1* may act through alteration in auxin polar transport and signalling, that was previously shown to influence the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis (Liu et al., 1993; Fischer and Neuhaus, 1996;

Jenik and Barton; 2005; Moller and Weijers, 2009), and to affect growth and organogenesis (de Smet et al., 2010; Vanneste and Friml, 2009).

The targeted Q RT-PCR experiments performed on grape transgenic embryos confirmed the involvement of auxin distribution and signalling as well as cell expansion processes and suggest a specific mode of action of *VvCEB1* during grape development process.

Concerning auxin distribution and signalling, among the different *PIN* genes tested three (*VvPIN1.1*, *1.2* and *7*) were downregulated and only one, *VvPIN2* was upregulated in the overexpressing line. *PIN1* and *PIN7* mediate the polar auxin fluxes that are required to maintain fundamental processes of development and organogenesis during all aspects of plant growth (Zazimalova et al., 2007) and *PIN2* functions in auxin reflux in root tip and root gravitropism (Friml et al., 2004; Rahman et al., 2010; Peer et al, 2011). All changes in *PIN* subcellular polarity can redirect the auxin fluxes and trigger developmental reprogramming (Friml et al., 2002 and 2003; Robert and Friml, 2009). Thus, if *PIN* polarization fails, the apical part of the embryo ectopically accumulates auxin even at later stages, giving a false signal for root initiation and leading to the development of root-like structures that are derived from embryonic leaf tissue (Dhonukshe et al., 2008; Robert and Friml, 2009). These phenotypical alterations resemble those observed in grape embryos overexpressing *VvCEB1* (Figure 5). Expression analysis of the different grape *PINs* during berry development showed that only *VvPIN2* is highly expressed after the green stage and until veraison, a period in the course of which *VvCEB1* is expressed. These observations reinforce the link between both genes and underline their important role during berry development. Additionally, a recent work from Nishio et al. (2010) suggested a key role of *SIPIN2* and *SIPIN1* in auxin transport in tomato. The authors proposed that *SIPIN2* play roles in the export of auxin synthesized in young seeds and that *SIPIN1* is responsible for the subsequent transport in fruit tissue and that both are important for fruit set (Nishio et al., 2010).

Aux/IAA, *SAUR*, and *GH3* genes that are referred to as early or primary auxin-responsive genes are of major interest. Indeed, these genes encode very low abundant proteins of short half-lives (as far as analyzed), localized in the nucleus, and control secondary downstream genes (Hagen and Guilfoyle, 2002 ; Knauss et al., 2003). In the *VvCEB1* overexpressing line, the *VvIAA* genes tested were either induced or repressed whereas the *VvSAUR* and *VvGH3* genes tested were only up-regulated. These disparities in the levels of expression of the auxin-regulated genes in *VvCEB1* overexpressing line reflect the complex regulation of these genes, which are subject to various combinations of transcriptional regulators, some of these being modulated by cell-specific, developmental stage, or various abiotic signals (Paponov et al.,

2008). Among the *AUX/IAA* genes tested in this study, *VvIAA19* caught our attention because, in addition to its high expression in *35S::VvCEB1* line, this gene is the only *VvIAA* gene strongly expressed during berry development. Furthermore, a recent work (Kohno et al., 2011) support these data and showed that although no morphological changes were observed, transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing *VvIAA19* exhibited faster growth, including root elongation and floral transition, than the control plant, indicating that the constitutive expression of *VvIAA19* resulted in increased growth rates without any detectable harm. *SAUR* genes (for small auxin up RNA) that are upregulated in the *35S:: VvCEB1* line are known to be abundant in the zone of elongation in soybean hypocotyls and are expressed most strongly in epidermal and cortical cells (Gee et al., 1991). One mechanism by which plants coordinate auxin-mediated processes is to maintain the endogenous pool of auxins at an appropriate level. This can be achieved by regulating auxin biosynthesis and distribution among different organs and by conjugate formation with sugars, peptides, and amino acids (Berleth et al., 2004 ; Woodward and Bartel, 2005). Although the physiological importance of conjugates in auxin homeostasis is not yet fully understood, it is generally accepted that conjugate formation plays a critical role in auxin action. The rapid induction of the *GH3* genes by auxin may help to regulate auxin homeostasis by conjugating excess auxins to amino acids. However, their function may not be so simple, because only a fraction of the *GH3* genes are induced by auxin (Hagen and Guilfoyle, 2002). Our data showed that the two *VvGH3* genes tested are highly expressed in the overexpressing line, suggesting the presence of a high amount of conjugated auxin in these embryos. The last transcription factor, *VvPLT* was repressed in *VvCEB1* overexpressing line. Genes of the PLETHORA family, encode AP2-domain transcription factors that are related to auxin action and are essential for root stem cell maintenance. PLTs were revealed to control distinct aspects of root development in a dose-dependent manner (Aida et al., 2004; Galinha et al., 2007). Recently, Tromas et al. (2009), showed that *PLT2* overexpression at an early stage of ABP1 inactivation (before most meristematic cells have elongated) inhibits cell expansion of cells from the basal meristem and the transition zone, thus maintaining meristem size. Altogether, this transcriptional analysis reinforces the hypothesis that auxin could be involved in *VvCEB1* mode of action, and partly explains some of the phenotypical traits of the transgenic embryos that failed to develop into plantlets.

Finally, the study of the expression of cell expansion genes showed that most of these were strongly up-regulated in *35S:: VvCEB1* transgenic embryos. This result corroborates the observations that overexpression of *VvCEB1* in grape embryos enhances their final size by

increasing their cell size. The classical effect of auxin is a very rapid stimulation of cell expansion followed by sustained growth over a longer time period. However, auxins are also important in other responses, such as cell division and differentiation (Schenck et al., 2010). These authors speculate that auxin-induced gene expression is necessary for sustained auxin-induced cell expansion and long-term development (e.g. the auxin effect on root formation), but that transcriptional regulation of gene expression by auxin may not constitute the rate-limiting step for the near-instantaneous cell expansion (Schenck et al., 2010). The way VvCEB1 affects the transcriptional activity of expansion genes remains an open question. Is it a direct effect of VvCEB1 or an indirect effect mediated through auxin signalling ?

In conclusion, this work shows that *VvCEB1* is a bHLH transcription factor involved in grape berry development and more particularly in the regulation of cell size. The present work provides evidence that auxin signalling and homeostasis are affected and cell expansion genes are potential direct and/or indirect targets. The detailed understanding of the mode of action of VvCEB1 constitutes a major challenge. Indeed, bHLH transcription factors are known to act as dimers or in combination to other transcription factors like MYB or WD40 proteins (Ramsay and Glover, 2005). However, a very recent work showed that the bHLH protein BPEp interacts with the auxin response factor ARF8 to regulate petal growth (Varaud et al., 2011). This datum linking a bHLH transcription factor that affects organ size to auxin signalling reinforces our results and opens new perspectives.

METHODS

Isolation of *VvCEB1* cDNA and Constructs Production for Plant Transformation

VvCEB1 entire clone was generated from a cDNA library of grape Cabernet Sauvignon berries (veraison stage) by PCR using synthetic oligonucleotide primers designed to begin and end at the start and stop codons of the open reading frame (forward primer, 5'-TAGAATTCCCCGGGATGGCAGCCTTTTCTCAGCAGTCTCACCCAC- 3'; reverse primer, 5'-ATGGATCCCCGGGCTAGCGGCCGCAAAAAGAGTATCTGTTGCTGAAACCATA - 3').

This *VvCEB1* complete ORF was amplified and cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) for DNA sequencing, prior to subcloning into a stable expression binary vector downstream of the 35S promoter of cauliflower mosaic virus (CaMV). pFB8 and Pk7m34GW

binary vector (Gateway™, Karimi et al., 2002) were used to generate *VvCEB1*-overexpressing 41B cells and tomato plant, respectively.

To obtain *VvCEB1*-RNAi (*VvCEBi*) transgenic 41B cells, forward 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGTCAGCAGTCTCACC-3' and reverse 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGCCTTCTTTCTCTTC-3' primers were used to amplify a partial 206 bp cDNA clone. BLAST search analyses (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>) using this 206 bp sequence were performed to ascertain that no other sequences than *VvCEB1* were recognized in *Vitis* genome database. This fragment was then cloned into pK7GWIWG2(II) binary vector (Gateway™, Karimi et al., 2002) both in sense and antisense orientation under the transcriptional control of the CaMV, in order to generate siRNAs targeting specifically *VvCEB1*.

Plant Transformation and Culture

Grapevine transformations were made in 41B rootstock (*V. vinifera* 'Chasselas' x *Vitis berlandieri*) according to Lecourieux et al. (2009). An embryogenic cell suspension culture was initiated as described previously (Coutos-Thévenot et al., 1992a, 1992b). This cell suspension was subcultured weekly in 25 mL of glycerol-maltose culture medium (Coutos-Thévenot et al., 1992b) supplemented with synthetic auxin (naphthoxy acetic acid) at 1 mg.L⁻¹ in the dark. Embryogenic cells were transformed using an *Agrobacterium tumefaciens* cocultivation method (Mauro et al., 1995), and after selection, the transgenic cells were subcultured in the same condition in a medium supplemented with paromomycin at 2 mg.mL⁻¹ (final concentration) and cefotaxime at 200 mg.mL⁻¹ (Duchefa). Embryos were initiated from these 41B cells by removing auxin from the culture medium.

Transgenic tomato plants (*S. lycopersicum* L. cv. Wva106) were generated by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tomato cotyledons as described by Gonzalez et al. (2007). Tomato plants were grown in a culture chamber with a 14-h-day/10-h-night cycle. The temperature was 25 °C during the day and 20°C during the night. Individual flowers were tagged on the day of anthesis (flower opening). Fruits were harvested at mature green stage (30 days post anthesis, dpa).

RNA and cDNA Production

Roots, shoots, leaves and inflorescences were collected from Cabernet Sauvignon fruit cuttings grown in a greenhouse. Berries from different varieties (Tite de crabe, Dodrelabi,

Kyoho, Dabouki, Cardinal, Sylvestris 38, Candicans 10089, Riparia 10202, Riparia 10525, Sylvestris 38, Rubra 10924, Cinerea 10137 and Cabernet Sauvignon) were harvested in Domaine du Grand Parc (INRA, Lastresne, France) for the first six varieties cited, and in Domaine de la Grande Ferrade (INRA, Villenave d'Ornon, France) for the last seven. In order to compare berries at the same level of maturity Cabernet Sauvignon berries were sorted by weight before veraison, and on a NaCl density gradient after veraison,.

All collected samples were quickly frozen in liquid nitrogen, ground to a fine powder with a Danguomau blender, and stored at -80°C until use. Total RNA from grape organs and berries was extracted according to Lecourieux et al. (2009). Total RNA from grape embryos and tomato plants was extracted from 100 mg of starting tissue using the Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma) following the manufacturer's protocol. RNA isolation was followed by DNaseI treatment. Reverse transcription was performed from each sample from 2 μg of purified RNA using the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega) according to the manufacturer's instructions. The cDNA obtained was diluted (1/20) in distilled water.

Gene Expression Analysis

Quantitative real-time PCR expression analysis was carried out using the CFX96 Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad). Ten μl reaction mixes were prepared, that included 5 μl of iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0.2 μM of each primer and 2 μl of diluted cDNA. Gene transcripts were quantified upon normalization to *VvEF1 γ* (grape experiments) and *SLEiF4 α* (tomato experiments) as internal standards. All biological samples were tested in triplicate, and SD values of means were calculated using standard statistical methods. Specific oligonucleotide primer pairs were designed with Beacon Designer 7 software (Premier Biosoft International). Specific annealing of the oligonucleotides was controlled by dissociation kinetics performed at the end of each PCR run. The efficiency of each primer pair was measured on a PCR product serial dilution. Primer sequences used in quantitative RT-PCR experiments are listed in Table S1.

Protoplast Isolation and Transient Expression of *VvCEB1*-GFP Fusion Gene

The coding sequence of *VvCEB1* was cloned as a C-terminal fusion in frame with the GFP into the pRT101 vector (Kiegerl et al., 2000) and expressed under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter.

Tobacco (*Nicotiana tabaccum*, SR1) *in vitro* plants used for protoplasts preparation were cultivated in growth chamber with a constant temperature of 25 °C and a 14 h/10 h day/night photoperiod. Protoplasts were obtained from young leaves of 15 days-old subcultured plant according to Hosy et al. (2005). A 10 µg aliquot of plasmid DNA was used for PEG mediated co-transformation. Transfected protoplasts were incubated 16 h at 25°C and analyzed for GFP fluorescence by confocal microscopy. All transient expression assays were repeated at least three times.

Light Microscopy and Stereomicroscopy Analyses

Grape embryos were placed in a quick-clearing solution of chloral hydrate (chloralhydrate-H₂O-glycerol, 8:2:1, w:v:v) on a microscope slide for 4 - 24h . The samples were then examined under differential interference contrast optics (Nomarski) using a light microscope (Axiophot, ZEISS). Photographs were taken using Spot RTKE camera (Diagnostic Instruments).

Cytological analysis of tomato fruits were performed using a method similar to that described by Cheniclet et al. (2005). Tomato fruit sections were handmade with a razor blade in the equatorial plane, and placed on 0.1% toluidine blue solution. After 2 min staining, they were rinsed briefly in water and immersed, with the colored face turned upside, into a small layer of water in a petri dish. These sections were observed with a Leica FLIII stereomicroscope with illumination from above. Images were acquired with a Leica DC300F color digital camera and analyzed with ImagePro-Plus software (Media Cybernetics). For each fruit, 4 different portions of pericarp and septa were analyzed. The number of cell layers from the outer epidermis to the inner layers was estimated in pericarp and septa areas devoid of vascular bundles. For estimating septum and pericarp cell size, a rectangular area was drawn in the central zone between outer and inner layers, excluding peripheral zones (with smaller cells) and vascular bundles. Mean cell size area was calculated from the cell number counted per unit area measurements. Columella cell size area was measuring in the central portion of the columella, cell by cell (100 cells measured for each fruit), because of the bigger lacuna between columella cells. Columella and septum cells number were estimated by dividing their respective area by their mean cell area calculated previously.

GUS Histochemical Staining

Tissues from stably transformed tomato plants were fixed in cold acetone, washed twice in sodium phosphate buffer (0.1 M NaH₂PO₄, pH 7.2), soaked, vacuum infiltrated, and incubated

overnight at 37°C in GUS staining solution (1 mM X-gluc, 0.1 M NaH₂PO₄, pH 7, 1.5 mM K₃Fe(CN)₆, 1.5 mM K₄Fe(CN)₆, and 0.05% Triton X-100). GUS-stained tissues were cleared two days in 96% ethanol and stored in 70% ethanol.

Sequence Analysis

Amino acid sequence alignments were performed using ClustalW (Thompson et al., 1994; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). The phylogenetic tree was constructed using MEGA version 4 (Tamura et al., 2007) with full length protein sequences. The optimal tree with the sum of branch length (32.66568898) is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (2000 replicates) is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All positions containing alignment gaps and missing data were eliminated only in pairwise sequence comparisons (Pairwise deletion option). There were a total of 1167 positions in the final dataset.

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Genoscope database (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>) or GenBank/EMBL databases. GenBank accession numbers for the *Arabidopsis thaliana* sequences analyzed in the phylogenetic analysis are indicated in the review Pires and Dolan (2010). Genoscope accession numbers for the *Vitis vinifera* sequences, and GenBank accession number for other species analyzed in the phylogenetic analysis are mentioned in the phylogenetical tree (Figure1).

GenBank accession numbers for the sequences analyzed in Real-time PCR are as follows:

VvCEB1 (XM_002267429), VvIAA9 (HQ337788), VvIAA14 (XM_002284097.1), VvIAA17 (XM_002280488), VvIAA19 (HQ337790), VvGH3-2 (XM_002283850.1), VvGH3-6 (XM_002268242), VvARF6 (XM_002282794), VvARF9 (XM_002265126), VvARF17 (XM_002284292.1), VvSAUR1 (XM_002271526), VvSAUR5 (XM_002279234.1), VvPLT2 (XM_002285503), VvAUX1.3 (XM_002277381.1), VvAUX1.8 (XM_002279183.1), VvAUX1.13 (XM_002268889.1), VvPIN1.1 (XM_002282184), VvPIN1.2 (XM_002282651), VvPIN2 (XM_002266023), VvPIN5 (XM_002279155.1), VvPIN6 (XM_002278413.1), VvPIN7 (XM_002284266.1), VvPIN8 (XM_002282444.1), VvPID1 (XM_002274117.1),

VvEXPA1 (XM_002269481.1), *VvEXPA2* (XM_002266589.1), *VvEXPA8* (XM_002280264.1), *VvEXPA11* (XM_002285855.1), *VvEXPA17* (XM_002273247.1), *VvPECL1* (XM_002285603.1), *VvPECL8* (XM_002275745.1), *VvXET2* (XM_002274484.1), *VvAGP20* (XM_002280458.1), *VvAMY1* (XM_002285177.1), *VvAQP1* (XM_002274502.1), *VvAQP2* (XM_002262942.1), *VvAQP3* (XM_002274691.1), *VvAQP4* (XM_002274519.1), *VvPME* (XM_002270580.1), *VvCS* (XM_002269789.1).

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Figure 1. Kinetics of Development of Control (pFB8 empty vector) and *VvCEB1*-Overexpressing (35S::*VvCEB1*) 41B Grape Embryos.

Supplemental Figure 2. Kinetic of Expression of *VvCEB1* Putative Target Genes During Grape Berry Development.

Supplemental Table 1. PCR Primers Used to Amplify Gene-specific Regions for Expression Analyses.

ACKNOWLEDGEMENTS

PN was supported by a grant from Conseil Régional Aquitaine.

We thank G. Cramer for critical reading of the manuscript, M. Hernould and C. Perrot-Rechenmann for scientific discussions, L. Bordenave for help in the choice of the different grape varieties, C. Cheniclet for microscopy assistance and M. Meddar for preparing the cell culture media.

TABLES

Table 1. Ratios of transcript levels of selected auxin-related genes in transgenic grape embryos compared with the control.

Name	Accession number	Description	Ratio (35S/Control)	Ratio (RNAi/Control)
<i>VvPIN1.1</i>	XM_002282184.1	PIN Auxin efflux carrier	0.12	1.40
<i>VvPIN1.2</i>	XM_002282651.1	PIN Auxin efflux carrier	0.36	1.10
<i>VvPIN2</i>	XM_002266023.1	PIN Auxin efflux carrier	59	0.03
<i>VvPIN7</i>	XM_002284266.1	PIN Auxin efflux carrier	0.20	1.23
<i>VvAUX1.13</i>	XM_002268889.1	AUX1 auxin influx carrier	1.20	1.60
<i>VvAUX1.3</i>	XM_002277381.1	AUX1 auxin influx carrier	0.36	1
<i>VvAUX1.8</i>	XM_002279183.1	AUX1 auxin influx carrier	2.30	1
<i>VvPID1</i>	XM_002274117.1	PINOID protein kinase	1.50	1.20
<i>VvPLT2</i>	XM_002285503.1	PLETHORA transcription factor	0.21	2
<i>VvIAA9</i>	HQ337788.1	AUX/IAA Transcription factor	0.41	1.20
<i>VvIAA17</i>	XM_002280488.1	AUX/IAA Transcription factor	0.21	1.50
<i>VvIAA14</i>	XM_002284097.1	AUX/IAA Transcription factor	508	0.89
<i>VvIAA16</i>	XM_002281735.1	AUX/IAA Transcription factor	11	1.30
<i>VvIAA19</i>	HQ337790.1	AUX/IAA Transcription factor	12.20	1.30
<i>VvARF6</i>	XM_002282794.1	Auxin response transcription factor	1.30	1
<i>VvARF9</i>	XM_002265126.1	Auxin response transcription factor	0.76	1
<i>VvARF17</i>	XM_002284292.1	Auxin response transcription factor	0.56	1.7
<i>VvSAUR1</i>	XM_002271526.1	Small auxin upregulated protein	6	1.20
<i>VvSAUR5</i>	XM_002279234.1	Small auxin upregulated protein	17	0.13
<i>VvGH3-2</i>	XM_002283850.1	IAA-amido synthetase	168	0.33
<i>VvGH3-6</i>	XM_002268242.1	IAA-amido synthetase	79	0.26

Gene transcript level was quantified by quantitative real-time PCR in control (pFB8 empty vector), *VvCEB1*-overexpressing (35S), and *VvCEB1* down-regulated (RNAi) grape 41B embryos lines. These embryos were collected 7 days after initiation of embryogenesis. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* . Data are means of three independent experiments.

Table 2. Ratios of transcript levels of selected cell expansion-related genes in transgenic grape embryos compared with the control.

Name	Accession number	Description	Ratio (35S/Control)	Ratio (RNAi/Control)
<i>VvEXPA1</i>	XM_002269481.1	Expansin	7.70	0.75
<i>VvEXPA8</i>	XM_002280264.1	Expansin	38.70	1.50
<i>VvEXPA11</i>	XM_002285855.1	Expansin	1154	0.19
<i>VvEXPA17</i>	XM_002273247.1	Expansin	252.20	0.38
<i>VvAMY1</i>	XM_002285177.1	α -Amylase	4.30	0.62
<i>VvXET2</i>	XM_002274484.1	Xyloglucan endotransglycosylase	4	0.80
<i>VvPECL1</i>	XM_002285603.1	Pectate lyase	4.80	0.67
<i>VvPECL8</i>	XM_002275745.1	Pectate lyase	82	0.17
<i>VvPME</i>	XM_002270580.1	Pectin methylesterase	0.83	1.8
<i>VvCS</i>	XM_002269789.1	Cellulose synthase	1.50	1.20
<i>VvAGP20</i>	XM_002280458.1	Arabinogalactan protein	5	0.94
<i>VvAQP1</i>	XM_002274502.1	Aquaporin (TIP)	8.30	1.1
<i>VvAQP2</i>	XM_002262942.1	Aquaporin (TIP)	0.18	1
<i>VvAQP3</i>	XM_002274691.1	Aquaporin (TIP)	4.10	0.76
<i>VvAQP4</i>	XM_002274519.1	Aquaporin (TIP)	2.40	1

Gene transcript levels were quantified by quantitative real-time PCR in control (pFB8 empty vector), *VvCEB1*-overexpressing (35S), and *VvCEB1* down-regulated (RNAi) grape 41B embryos lines. Embryos were collected 7 days after initiation of embryogenesis. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* . Data are means of three independent experiments.

Table 3. Changes in Cell Area and in Number of Cell Layers in *VvCEB1*-Overexpressing Tomato Fruit

	Control	35S:: <i>VvCEB1</i>
Number of Pericarp Cell layer	14.351* \pm 0.770	10.942* \pm 0.520
Pericarp Cell Area (mm ²)	0.015* \pm 0.001	0.020* \pm 0.002
Number of Septum Cell Layer	7.050* \pm 0.856	9.980* \pm 1.012
Septum Thickness (mm)	0.392* \pm 0.076	0.904* \pm 0.078
Septum Cell Area (mm ²)	0.007* \pm 0.001	0.017* \pm 0.003
Septum Cell Number	318	179
Columella Cell Area (mm ²)	0.005* \pm 0.001	0.011* \pm 0.001
Columella Cell Number	2794	447

Control (pFB8 empty vector) and *VvCEB1*-overexpressing (35S::*VvCEB1*) tomato fruit were collected 30 days after anthesis. Data were estimated from equatorial section of fruit stained with toluidin blue. The results (mean \pm SD) are representative of data obtained with 5 fruits for each line. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks was performed and asterisks indicate statistically significant differences between lines ($p < 0.001$).

REFERENCES

- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y.S., Amasino, R., and Scheres B.** (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* **119** :109-20.
- Berleth, T., Krogan, N. T., and Scarpella, E.** (2004). Auxin signals - turning genes on and turning cells around. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7** : 553–563.
- Blouin, J., and Guimberteau, G.** (2000). Maturation et maturité des raisins. Usuels Féret de la vigne et du vin.
- Böttcher, C., Boss, P.K., and Davies, C.** (2011). Acyl substrate preferences of an IAA-amido synthetase account for variations in grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening caused by different auxinic compounds indicating the importance of auxin conjugation in plant development. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/err134.
- Castillon, A., Shen H, and Huq E.** (2007). Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci.* **12**:514–521.
- Chandler, J. W., Cole, M., Flier, A. and Werr, W.** (2008). BIM1, a bHLH protein involved in brassinosteroid signalling, controls Arabidopsis embryonic patterning via interaction with DORNRÖSCHEN and DORNRÖSCHEN-LIKE. *Plant Mol. Biol.* **69** :57-68.
- Cheniclet, C., Rong, WY, Causse, M., Bolling, L., Frangne, N., Carde, J.P., and Renaudin, J.P.** (2005). Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol.* **139**: 1984–1994.
- Cheng, Y. and Zhao, Y.** (2007). A Role for auxin in flower development. *J. Integr. Plant Biol.* **49**: 99–104.
- Chervin, C., El-Kereamy, A., Roustan, J.P., Latché, A., Lamon, J., and Bouzayen, M.** (2004). Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Sci.* **167** : 1301-1305.
- Chervin, C., Tira-umphon, A., Terrier, N., Zouine, M., Severac, D., and Roustan, J.P.** (2008). Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Physiol. Plant.* **134**: 534–546.
- Chung, Y., Maharjan, P.M., Lee, O., Fujioka, S., Jang, S., Kim, B., Takatsuto, S., Tsujimoto, M., Kim, H., Cho, S., Park, T., Cho, H., Hwang, I., and Choe, S.** (2011). Auxin stimulates DWARF4 expression and brassinosteroid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J.* **66**: 564–578.

- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., and Gerós, H.** (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine Quality. *Food* **1**: 1-22.
- Coombe, B. G.** (1992). Research on development and ripening of the grape berry *Am. J. Enol. Vitic.* **43**:1:101-110.
- Coombe, B.G., and Hale, C.R.** (1973). The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiol.* **51**: 629-634.
- Coombe, B.G., and McCarthy, M.G.** (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening, *Austral. J.Grape Wine Res.* **6**: 131-135.
- Coutos-Thévenot, P., Goebel-Tourand, I., Mauro, M.C., Jouanneau, J.P., Boulay, M., Deloire, A., and Guern, J.** (1992). Somatic embryogenesis from grapevine cells. I. Improvement of embryo development by changes in culture conditions. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **29** : 125–133.
- Coutos-Thévenot, P., Maës, O., Jouenne, T., Mauro, M.C., Boulay, M., Deloire, A., and Guern, J.** (1992b). Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. *Plant Sci.* **86** : 137–145.
- Davies, C., Boss, P.K., and Robinson, S.P.** (1997). Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiol.* **115**: 1155–1161.
- De Smet, I., Lau, S., Voß, U., Vanneste, S., Benjamins, R., Rademacher, E.H., Schlereth, A., De Rybel, B., Vassileva, V., Grunewald, W., Naudts, M., Levesque, M.P., Ehrismann, J.S., Inzé, D., Luschnig, C., Benfey, P.N., Weijers, D., Van Montagu, M.C., Bennett, M.J., Jürgens, G., and Beeckman, T.** (2010). Bimodular auxin response controls organogenesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 2705–2710.
- Dhonukshe, P., Tanaka, H., Goh, T., Ebine, K., Mähönen, A.P., Prasad, K., Blilou, I., Geldner, N., Xu, J., Uemura, T., Chory, J., Ueda, T., Nakano, A., Scheres, B., and Friml, J.** (2008). Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* **456**: 962-966.
- Feller, A., Machemere, K., Braun, E.L. and Grotewold, E.** (2011). Evolutionary and comparative genomics of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J.* **66**:94-116.
- Fischer, C. and Neuhaus, G.** (1996). Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. *Plant J.* **9**: 659–669.
- Friedrichsen, D.M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J.N., Alonso, J., Ecker, J.R., Furuya, M., and Chory, J.** (2002). Three redundant brassinosteroid early response genes

- encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics* **162**: 144-156.
- Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P., Palme, K., and Offringa, R.** (2004). A PINOID- dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* **306**: 862–865.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jürgens, G.** (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**:147–153.
- Friml, J., Wisniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K., and Palme, K.** (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* **415**: 806–809.
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., and Scheres, B.** (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* **449** :1053-7.
- Gee, M. A., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J.** (1991). Tissue-specific and organ-specific expression of soybean auxin-responsive transcripts GH3 and SAURs. *Plant Cell* **3** : 419–430.
- Giovannoni, J.** (2004). Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *Plant Cell* **16**: S170 –180.
- Glissant, D., Dedaldechamp, F., and Delrot, S.** (2008). Transcriptomic analysis of grape berry softening during ripening. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **42**: 1-13.
- Goetz, M., Vivian-Smith, A., Johnson, S.D., and Koltunow, A.M.** (2006). AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* **18** : 1873–1886.
- Gonzalez, N., Gévaudant, F., Hernould, M., Chevalier, C., and Mouras, A.** (2007). The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit. *Plant J.* **51**: 642-655.
- Hagen, G., and Guilfoyle, T.** (2002). Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.* **49** : 373–385.
- Hichri, I., Heppel, S.C., Pillet, J., Léon, C., Czettel, S., Delrot, S., Lauvergeat, V., and Bogs, J.** (2010). The basic helix–loop–helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine. *Mol. Plant* **3**:509-523.

- Ichihashi, Y., Horiguchi, G., Gleissberg, S., and Tsukaya, H.** (2010). The bHLH Transcription Factor SPATULA Controls Final Leaf Size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **51**: 252-261.
- Jenik, P.D. and Barton, M.K.** (2005). Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development* **132** : 3577-3585.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. and Bonas, U.** (2007). A bacteria effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**: 648–651.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A.** (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**: 193–195.
- Kiegerl, S., Cardinale, F., Siligan, C., Gross, A., Baudouin, E., Liwosz, A., Eklof, S., Till, S., Bogre, L., Hirt, H., and Meskiene, I.** (2000). SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell* **12**: 2247–2258.
- Knauss, S., Rohrmeier, T., Lehle, L.** (2003). The auxin-induced maize gene ZmSAUR2 encodes a short-lived nuclear protein expressed in elongating tissues. *J. Biol. Chem.* **278**: 23936-23943.
- Koenig, D., Bayer, E., Kang, J., Kuhlemeier, C., and Sinha, N.** (2009). Auxin patterns *Solanum lycopersicum* leaf morphogenesis. *Development* **136**: 2997–3006.
- Kohno, M., Takato, H., Horiuchi, H., Fujita, K., and Suzuki, S.** (2011). Auxin-nonresponsive grape Aux/IAA19 is a positive regulator of plant growth. *Mol. Biol. Rep.* DOI: 10.1007/s11033-011-0816-0.
- Kondou, Y., Nakazawa, M., Kawashima, M., Ichikawa, T., Yoshizumi, T., Suzuki, K., Ishikawa, A., Koshi, T., Matsui, R., Muto, S., and Matsui, M.** (2008). RETARDED GROWTH OF EMBRYO, a New Basic Helix-Loop-Helix Protein, Expresses in Endosperm to Control Embryo Growth. *Plant Physiol.* **147**: 1924-1935.
- Lecourieux, F., Lecourieux, D., Vignault, C., and Delrot, S.** (2010). A sugar inducible protein kinase, VvSK1, regulates hexose transport and sugar accumulation in grape cells. *Plant Physiol.* **152**: 1096–1106.
- Lemaire-Chamley, M., Petit, J., Garcia, V., Just, D., Baldet, P., Germain, V., Fagard, M., Mouassite, M., Cheniclet, C., Rothan, C.** (2005). Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiol.* **139**:750-69.
- Liu, C., Xu, Z., and Chua, N.H.** (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* **5**:621-630.

- Liu, H., Yu, X., Li, K., Klejnot, J., Yang, H., Lisiero, D., and Lin, C.** (2008). Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in Arabidopsis. *Science* **322** : 811535–1539.
- Mailhac, N., and Chervin, C.** (2006). Ethylene and grape berry ripening. *Stewart Posthar. Rev.* **2**: 1-5.
- Matus, J.T., Poupin, M.J., Cañón, P., Bordeu, E., Alcalde, J.A., and Arce-Johnson, P.** (2010). Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.* **72**:607-620.
- Möller, B. and Weijers, D.** (2009). Auxin Control of Embryo Patterning. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5** :a001545.
- Mauro, M.C., Toutain, S., Walter, B., Pinck, L., Otten, L., Coutos-Thévenot, P., Deloire, A., and Barbier, P.** (1995). High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Sci.* **112**: 97–106.
- Paponov, I.A., Paponov, M., Teale, W.D., Menges, M., Chakrabortee, S., Murray, J.A.H., and Palme, K.** (2008). Comprehensive Transcriptome Analysis of Auxin Responses in Arabidopsis. *Mol. Plant* **1**: 321-337.
- Peer, W.A., Blakesleeb, J.J., Yanga, H. and Murphya, A. .** (2011). Seven Things We Think We Know about Auxin Transport. *Mol. Plant* **4**: 487-504.
- Perez-Rodriguez, P., Riano-Pachon, D.M., Guedes Correa L.G., Rensing S.A., Kersten B., and Mueller-Roeber, B.** (2009). PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res.* **38**: 822–827.
- Pires, N. and Dolan, L.** (2010). Origin and Diversification of Basic-Helix-Loop-Helix Proteins in Plants. *Mol. Biol. Evol.* **27** : 862-874.
- Rahman, A., Takahashi, M., Shibasaki, K., Wu, S., Inaba, T., Tsurumi, S., and Baskin, T.I.** (2010). Gravitropism of Arabidopsis thaliana roots requires the polarization of PIN2 toward the root tip in meristematic cortical cells. *Plant Cell* **22**: 1762–1776.
- Ramsay, N.A., and Glover, B.J.** (2005). MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci.* **10**: 63–70.
- Rietveld, P.L., De Boer, A.D., Weijers, D., and Van der Plas, L.H.W.** "GBOF-1 is a novel auxin inducible G-box binding bHLH transcription factor from tulip involved in low temperature induced stem elongation." Submitted (SEP-1999) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- Robert, H.S., and Friml, J.,** (2009). Auxin and other signals on the move in plants. *Nat. Chem. Biol.* **5** : 325–332.

- Seymour, G.B., Taylor J.E., and Tucker, G.A.** (1993). *Biochemistry of fruit ripening*. London, New York: Chapman and Hall.
- Schenck, D., Christian, M., Jones, A. and Lüthen, H.** (2010). Rapid Auxin-Induced Cell Expansion and Gene Expression: A Four-Decade-Old Question Revisited. *Plant Physiol.* **152** : 1183-1185.
- Symons, G.M., Davies, C., Shavrukov, Y., Dry, I.B., Reid, J.B., and Thomas, M.R.** (2006). Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiol.* **140**: 150-158.
- Szecs, J., Joly, C., Bordji, K., Varaud, E., Cock, J.M., Dumas, C., and Bendahmane, M.** (2006). BIGPETALp, a bHLH transcription factor is involved in the control of Arabidopsis petal size. *EMBO J.* **25**:3912–3920.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- Thompson, J. D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Tromas, A., Braun, N., Muller, P., Khodus, T., Paponov, I.A., Palme, K., Ljung, K., Lee, J.Y., Benfey, P., Murray, J.A., Scheres, B., and Perrot-Rechenmann, C.** (2009). The AUXIN BINDING PROTEIN 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. *PLoS One* 4:e6648.
- Vanneste, S., and Friml, J.** (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**: 1005–1016.
- Varaud, E., Brioude, F., Szécsi, J., Leroux, J., Brown, S., Perrot-Rechenmann, C., and Bendahmane, M.** (2011). AUXIN RESPONSE FACTOR8 Regulates Arabidopsis Petal Growth by Interacting with the bHLH Transcription Factor BIGPETALp. *Plant Cell* **23**:973-83.
- Wang, H., Jones, B., Li, Z., Frasse, P., Delalande, C., Regad, F., Chaabouni, S., Latche, A., Pech J.C., and Bouzayen, M.** (2005). The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* **17** : 2676–2692.
- Woodward, A.W., and Bartel, B.** (2005). Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann. Bot. (Lond.)* **95**: 707–735.
- Xiao, H., Jiang, N., Schaffner, E., Stockinger, E.J. and van der Knaap, E.** (2008). A Retrotransposon-Mediated Gene Duplication Underlies Morphological Variation of

Tomato Fruit. *Science* **319** : 1527-1530.

Yang, S., Johnston, N., Talideh, E., Mitchell, S., Jeffree, C., Goodrich, J., and Ingram, G. (2008). The endosperm-specific ZHOUP1 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates endosperm breakdown and embryonic epidermal development. *Development* **135**: 3501–9.

Yang, C.J., Zhang, C., Lu, Y.N., Jin, J.Q., and Wang, X.L. (2011). The Mechanisms of Brassinosteroids' Action: From Signal Transduction to Plant Development. *Mol Plant*. doi: 10.1093/mp/ssr020.

Zazimalová, E., Murphy, A.S., Yang, H., Hoyerová, K., and Hósek, P. (2007). Polar transport of the plant hormone auxin – the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **64** : 1621–1637.

Zentella, R., Zhang, Z.L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., and Sun, T.P. (2007). Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**:3037–3057.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Phylogenetic Analysis of VvCEB1.

VvCEB1 (black circle) and its homologs (bold) belong to a distinct bHLH gene subfamily. The different bHLH gene subfamily numbers and *Arabidopsis thaliana* (At), *Thellungiella halophila* (Th), *Petunia hybrida* (Ph), *Oryza sativa* (Os), *Hordeum vulgare* (Hv) accession numbers reported in this figure are as described by Pires and Dolan (2010). This phylogenetic tree represent a non-exhaustive list of bHLH transcription factors; each bHLH subfamily is generally illustrated by a known *A. thaliana* bHLH and its closest homologs in *Vitis vinifera* (Vv) and *Populus trichocarpa* (Pt). The phylogenetic tree was constructed with MEGA version 4 ([Tamura et al., 2007](#)) using the Neighbor Joining method with 2.000 bootstrap replicates.

Figure 2. Sequence Analysis and Subcellular Localisation of VvCEB1

(A) Full-length sequence comparison of VvCEB1 and its closest homologs VvbHLH (VvbHLH-XP02284454), CaUPA20, AtBIGPETAL, AtbHLH137, TgGBOF1 and AtBEE1. using the ClustalW program. Conserved residues are shaded in black, dark gray shading indicates conserved residues in 5 and 6 out of 7 of the sequences, and light gray shading indicates conserved residues in 3 and 4 out of 7 of the sequences. Basic residues that putatively function as NLS for VvCEB1 are indicated by arrows on the top of the alignment. Putative protein-protein binding domain and basic-helix-loop-helix domain for VvCEB1 are labeled on the top of the alignment in black circles and open squares, respectively. Other conserved region with predicted secondary structure was identified for VvCEB1: an acidic alpha helical domain, underlined on the top of the alignment.

(B) Nuclear localization of GFP-VvCEB1 fusion protein in tobacco protoplasts. These confocal microscopy images indicate respectively from left to right, the same transformed protoplast under bright light exposure, fluorescence of the GFP-VvCEB1 product and red chlorophyll auto-fluorescence.

Figure 3. Quantitative Real-Time PCR Analysis of *VvCEB1* Expression Patterns in Grapevine cv. Cabernet Sauvignon.

(A) *VvCEB1* expression in various grapevine organs: roots (R), stem (S), leaves (L), inflorescences (I) and ripening berries at 80 days post anthesis (RB). Error bars were

calculated as SD for three independent experiments. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* .

(B) *VvCEBI* expression at different stages of berry development, from inflorescences (I) to mature berries at 100 days post anthesis (DPA). The arrow indicates the *veraison* stage. Error bars were calculated as SD for 4 replicates from 2 independent experiments (summer 2006 and 2009). Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* .

(C) *VvCEBI* expression in different tissues from ripening berries at 80 days post anthesis. Error bars were calculated as SD for three independent experiments. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* .

Figure 4. Relative Expression Level of *VvCEBI* Transcript Accumulation in Transgenic Grape 41B Embryos.

VvCEBI transcript level was quantified by quantitative real-time PCR in control (pFB8 empty vector), *VvCEBI*-overexpressing (35S::*VvCEBI*), and *VvCEBI* RNAi down-regulated (*VvCEBI*_i) 41B embryos lines. These embryos were collected 7 days after initiation of embryogenesis. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* . Data are means of three independent experiments indicating SD.

Figure 5. Overexpression of *VvCEBI* strongly affects grape embryos development.

(A) Control (pFB8 empty vector) and *VvCEBI*-overexpressing (35S::*VvCEBI*) embryos lines were observed with a stereomicroscope 32 days after the initiation of embryogenesis. Arrows indicate the position where cell area was assessed in Figure 6. Bars = 1 mm.

(B) Embryos sizes were measured at different stages of 41B embryo development, from 7 to 32 days after initiation of embryogenesis (DAE), both for control (pFB8 empty vector, black circles) and *VvCEBI*-overexpressing (35S::*VvCEBI*, open circles) lines. Thirty embryos were measured for each developmental stage in both lines. Error bars indicate SD. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks was performed and asterisks indicate statistically significant differences between lines at the same time point ($p < 0.001$).

Figure 6. Overexpression of *VvCEBI* Increases Cell Size in Grape 41B Embryos.

(A) Difference in cell size between control (empty vector) and *VvCEBI*-overexpressing (35S::*VvCEBI*) embryos lines. Observations were assessed at 12 and 24 days after initiation of embryogenesis (DAE). Arrows in Figure 5A show the position where cells were observed. Bars = 25 μ m

(B) Cell area of control (pFB8 empty vector, black circles) and *VvCEB1*-overexpressing (35S::*VvCEB1*, open circles) lines was assessed at different stages of 41-B embryos development, from 5 to 32 days after initiation of embryogenesis (DAE). Arrows in Figure 5A indicate the area where cells were measured. Data are mean of the ten biggest cells measured in this area for each embryo and twenty embryos for each line were used to collect these data. Error bars indicate SD. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks was performed and asterisks indicate statistically significant differences between lines at the same time point ($p < 0.001$).

Figure 7. Vegetative Growth Phenotypes of *VvCEB1*-Overexpressing Tomato Plants.

(A) Phenotype of transgenic tomato plants exhibiting different level of expression (L1, L2, L3) in comparison to the control (pFB8 empty vector)

(B) Quantitative Real-Time PCR Analysis of *VvCEB1* transcript accumulation in control (pFB8 empty vector) and *VvCEB1*-overexpressing tomato lines (L1, L2, and L3). Gene expression was normalized with *SlEiF α* . Data are means three replicates indicating SD.

(C) Tomato leaf morphology in control (pFB8 empty vector) and in L3 *VvCEB1*-overexpressing line (L3). Bars = 10 mm.

(D) Tomato leaflet morphology in control (pFB8 empty vector) and in L3 *VvCEB1*-overexpressing line. Bars = 5 mm.

Figure 8. Flower Disturbed Phenotype of *VvCEB1*-Overexpressing Tomato Plants.

Flowers were observed at anthesis in control (pFB8 empty vector) and *VvCEB1*-overexpressing line (35S::*VvCEB1*). 35S::*VvCEB1* line shows elongated petals and curly elongated stamen when compared to the control. Bars = 2.5 mm.

Figure 9. *VvCEB1* Overexpression in Tomato Plants Affects Fruit Development.

Fruits were analyzed at 30 days after anthesis in both control (pFB8 empty vector) and *VvCEB1*-overexpressing line (35S::*VvCEB1*). **(A)** and **(B)** show the entire fruit phenotype. **(C)** and **(D)** depict transversal section of control and 35S::*VvCEB1* fruits. Bars = 5 mm.

Figure 10. Microscopic Analysis of Longitudinal Tomato Fruit Sections.

(A) Global fruit longitudinal sections were performed 30 days after anthesis for control (pFB8 empty vector) and *VvCEB1*-overexpressing lines (35S::*VvCEB1*). Fruit were cut from the

equatorial region of the fruit and stained with toluidin blue. White squares indicate the portion of the columella chosen for magnification in **(B)**. Bars = 6 mm.

(B) Increase in cell size in columella of *VvCEBI*-overexpressing fruit (35S::*VvCEBI*) in comparison to control fruit (pFB8 empty vector). Fruit were cut from the equatorial region of the fruit and stained with toluidin blue. Bars = 0.5 mm.

Figure 11. Expression of *VvCEBI* promoter in Tomato.

(A) GUS activity in various organs of tomato plants stably transformed with *VvCEBI*promoter::GUS (*VvCEBI*pro:GUS) transgene. CaMV 35S promoter:: GUS (35Spro-GUS) and Wild Type (WT) plant lines were used as controls. Bars = 2.5 mm.

(B) GUS activity in tomato fruits stably transformed with *VvCEBI*promoter:: GUS (*VvCEBI*pro:GUS) transgene at different development stages: 6 days post anthesis (DPA), 20 DPA, 30 DPA, and Breaker + 6 days (Br + 6 days). Wild Type (WT) line was used as control. Bars = 2.5 mm.

Figure 12. Correlation Between *VvCEBI* Expression and Grape Berry Size.

Quantitative real-time PCR analysis showing *VvCEBI* transcript accumulation in different grape varieties exhibiting different berry size. Berries were harvested 80 days after anthesis. Seeds were removed for this analysis. Gene expression was normalized with *VvEF1γ*. All data are means of four replicates from two independent experiments (summer 2009 and 2010), with error bars indicating SD. Bars = 10 mm.

Figure 1

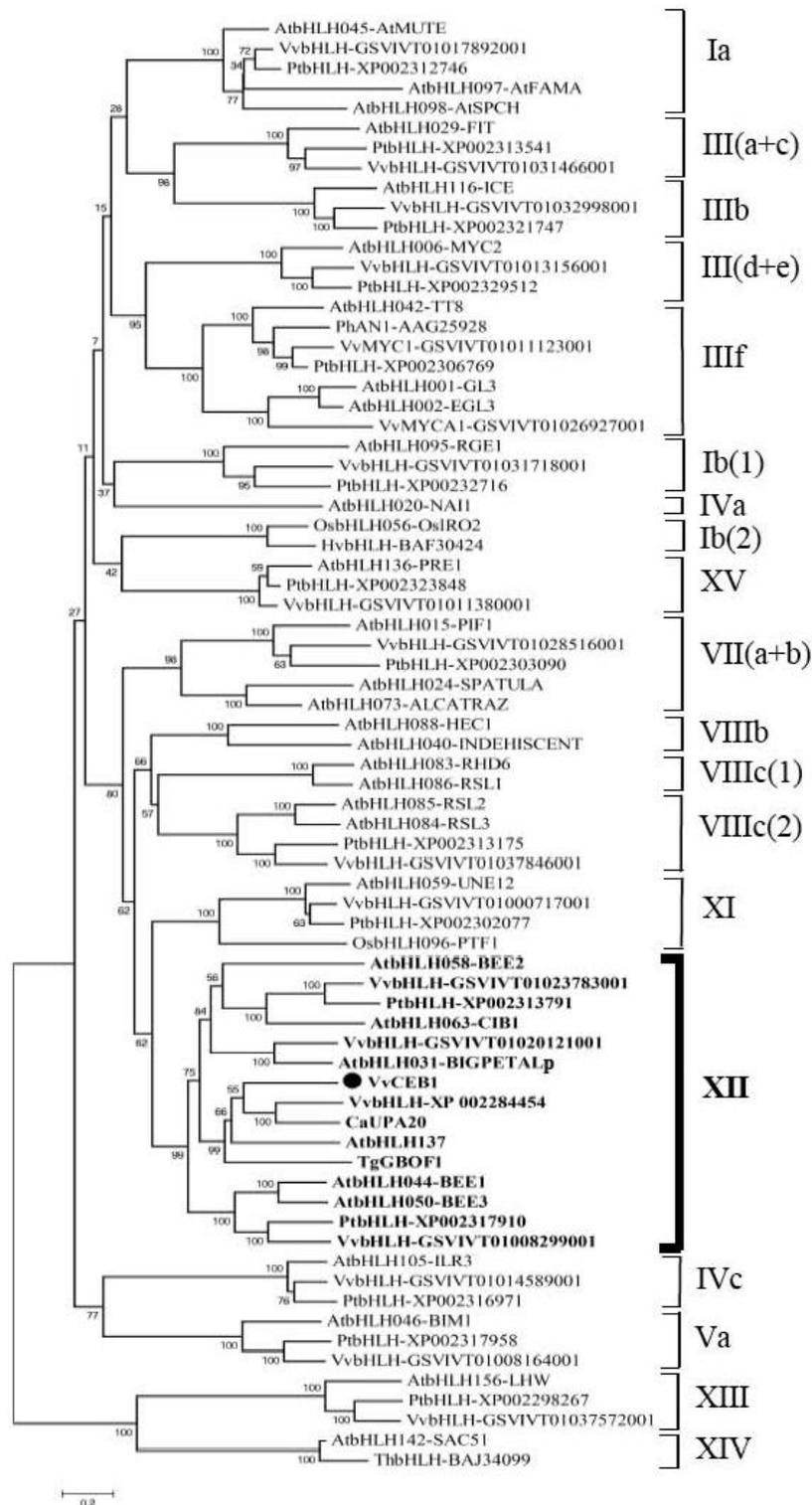


Figure 1. Phylogenetic Analysis of VvCEB1.

VvCEB1 (black circle) and its homologs (bold) belong to a distinct bHLH gene subfamily. The different bHLH gene subfamily numbers and *Arabidopsis thaliana* (At), *Theellungiella halophila* (Th), *Petunia hybrida* (Ph), *Oryza sativa* (Os), *Hordeum vulgare* (Hv) accession numbers reported in this figure are as described by Pires and Dolan (2010). This phylogenetic tree represent a non-exhaustive list of bHLH transcription factors, each bHLH subfamily is generally illustrated by a known *A. thaliana* bHLH and its closest homologs in *Vitis vinifera* (Vv) and *Populus trichocarpa* (Pt). The phylogenetic tree was constructed with MEGA version 4 (Tamura et al., 2007) using the Neighbor Joining method with 2.000 bootstrap replicates.

Figure 2

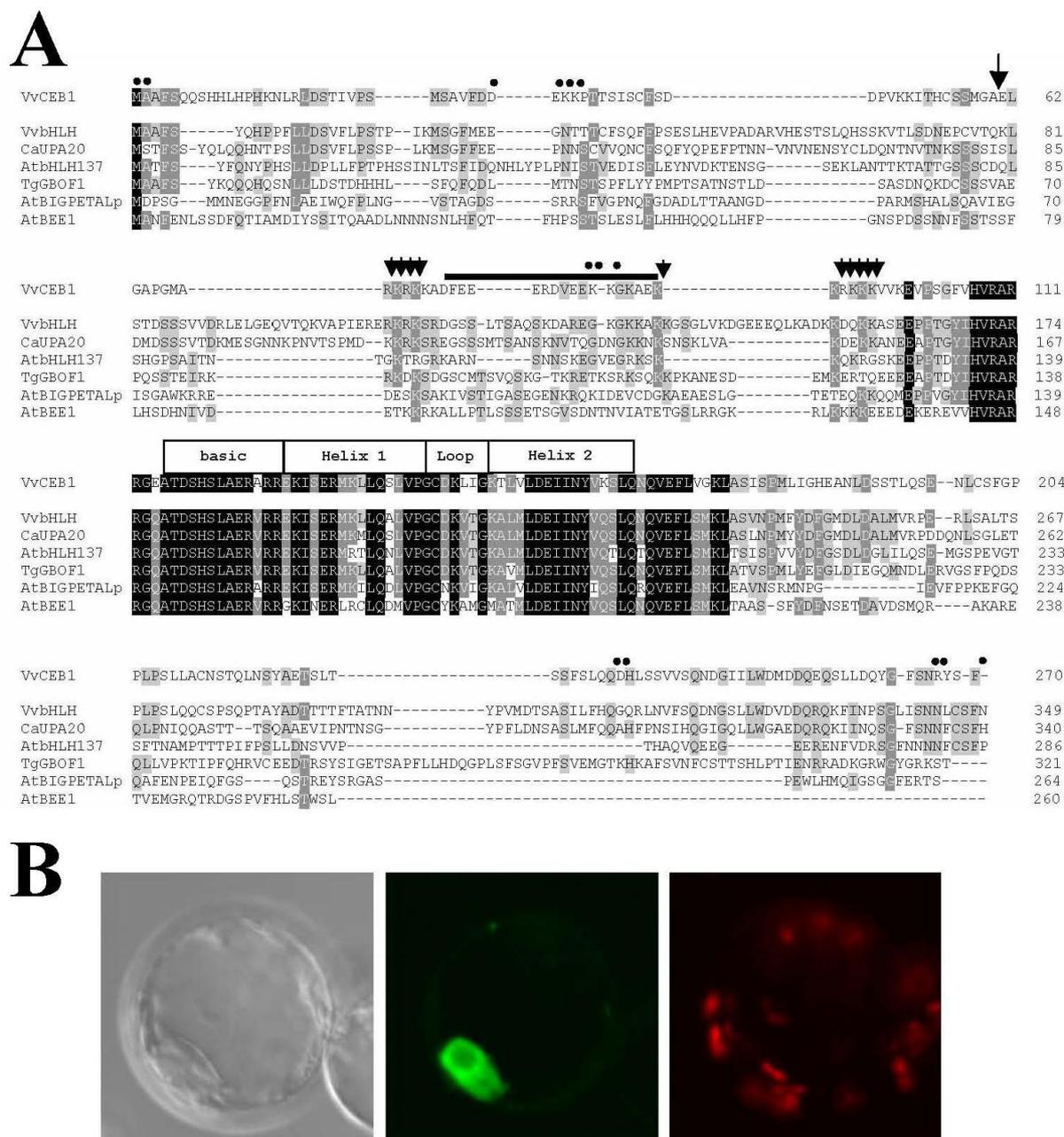


Figure 2. Sequence Analysis and Subcellular Localisation of VvCEB1.

(A) Full-length protein sequence comparison of VvCEB1 and its closest homologs VvbHLH (VvbHLH-XP02284454), CaUPA20, AtBIGPETAL, AtbHLH137, TgGBOF1 and AtBEE1, using the ClustalW program. Conserved residues are shaded in black, dark gray shading indicates conserved residues in 5 and 6 out of 7 of the sequences, and light gray shading indicates conserved residues in 3 and 4 out of 7 of the sequences. Basic residues that putatively function as NLS for VvCEB1 are indicated by arrows on the top of the alignment. Putative protein-protein binding domain and basic-helix-loop-helix domain for VvCEB1 are labeled on the top of the alignment in black circles and open squares, respectively. Other conserved region with predicted secondary structure was identified for VvCEB1: an acidic alpha helical domain, underlined on the top of the alignment.

(B) Nuclear localization of GFP-VvCEB1 fusion protein in tobacco protoplasts. These confocal microscopy images indicate respectively from left to right, the same transformed protoplast under bright light exposure, fluorescence of the GFP-VvCEB1 product and red chlorophyll autofluorescence.

Figure 3

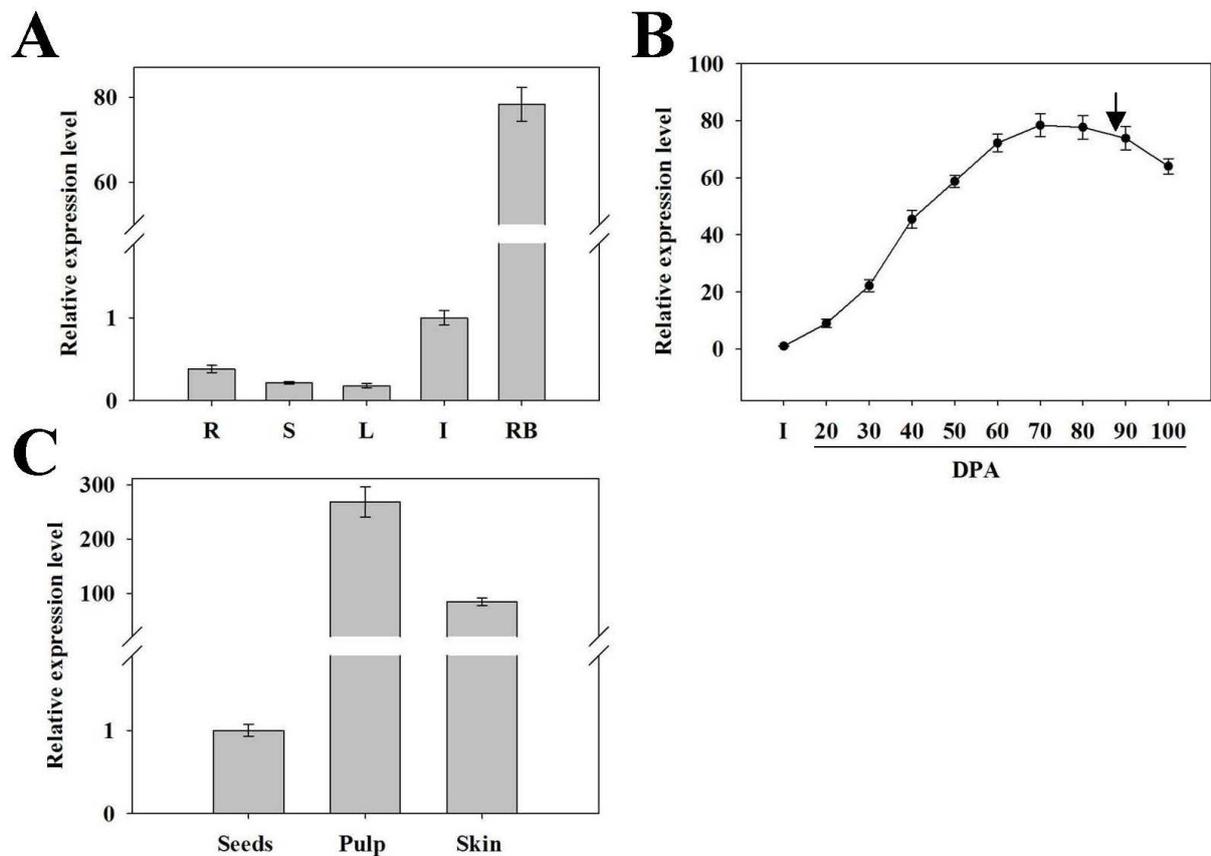


Figure 3. Quantitative Real-Time PCR Analysis of *VvCEB1* Expression Patterns in Grapevine cv. Cabernet Sauvignon.

(A) *VvCEB1* expression in various grapevine organs: roots (R), stem (S), leaves (L), inflorescences (I) and ripening berries at 80 days post anthesis (RB). Error bars were calculated as SD for three independent experiments. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* .

(B) *VvCEB1* expression at different stages of berry development, from inflorescences (I) to mature berries at 100 days post anthesis (DPA). The arrow indicates the *veraison* stage. Error bars were calculated as SD for 4 replicates from 2 independent experiments (summer 2006 and 2009). Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* .

(C) *VvCEB1* expression in different tissues from ripening berries at 80 days post anthesis. Error bars were calculated as SD for three independent experiments. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* .

Figure 4

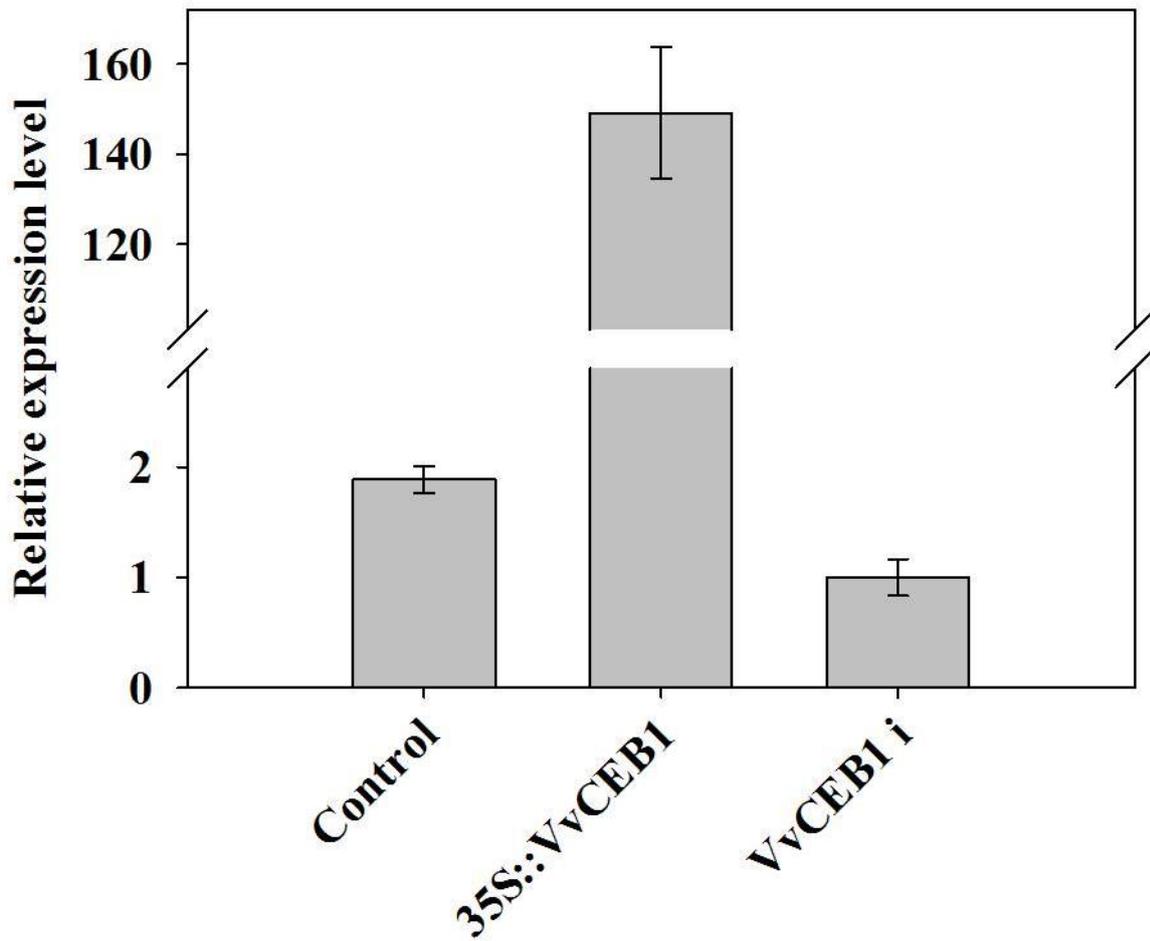


Figure 4. Relative Expression Level of *VvCEB1* Transcript Accumulation in Transgenic Grape 41B Embryos.

VvCEB1 transcript level was quantified by quantitative real-time PCR in control (pFB8 empty vector), *VvCEB1*-overexpressing (35S::*VvCEB1*), and *VvCEB1* RNAi down-regulated (*VvCEB1*_i) 41B embryos lines. These embryos were collected 7 days after initiation of embryogenesis. Gene expression was normalized with *VvEF1γ*. Data are means of three independent experiments indicating SD.

Figure 5

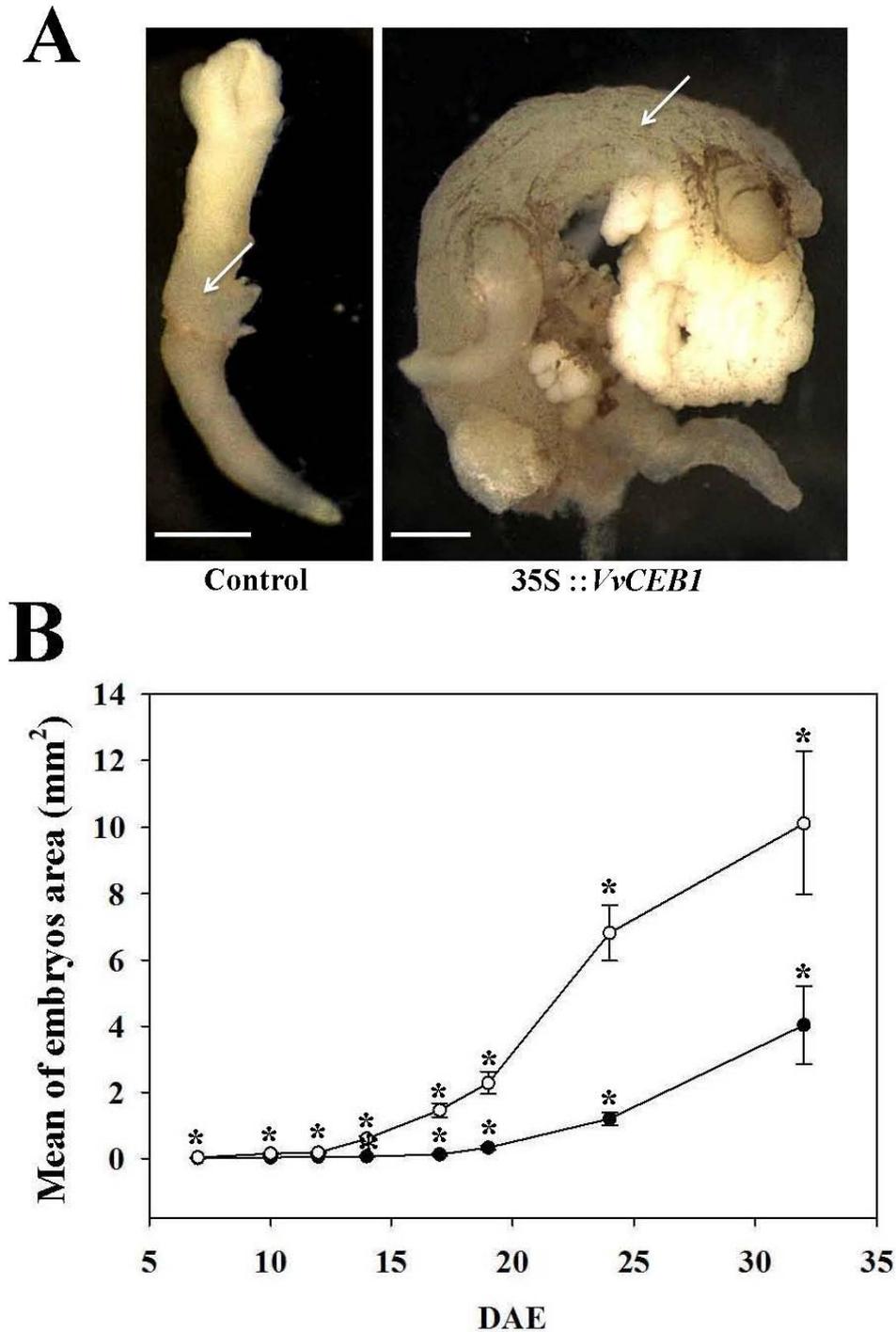


Figure 5. Overexpression of *VvCEB1* Strongly Affects Grape Embryos Development.

(A) Control (pFB8 empty vector) and *VvCEB1*-overexpressing (35S::*VvCEB1*) embryos lines were observed with a stereomicroscope 32 days after the initiation of embryogenesis. Arrows indicate the position where cell area was assessed in Figure 6. Bars = 1 mm.

(B) Embryos sizes were measured at different stages of 41B embryo development, from 7 to 32 days after initiation of embryogenesis (DAE), both for control (pFB8 empty vector, black circles) and *VvCEB1*-overexpressing (35S::*VvCEB1*, open circles) lines. Thirty embryos were measured for each developmental stage in both lines. Error bars indicate SD. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks was performed and asterisks indicate statistically significant differences between lines at the same time point ($p < 0.001$).

Figure 6

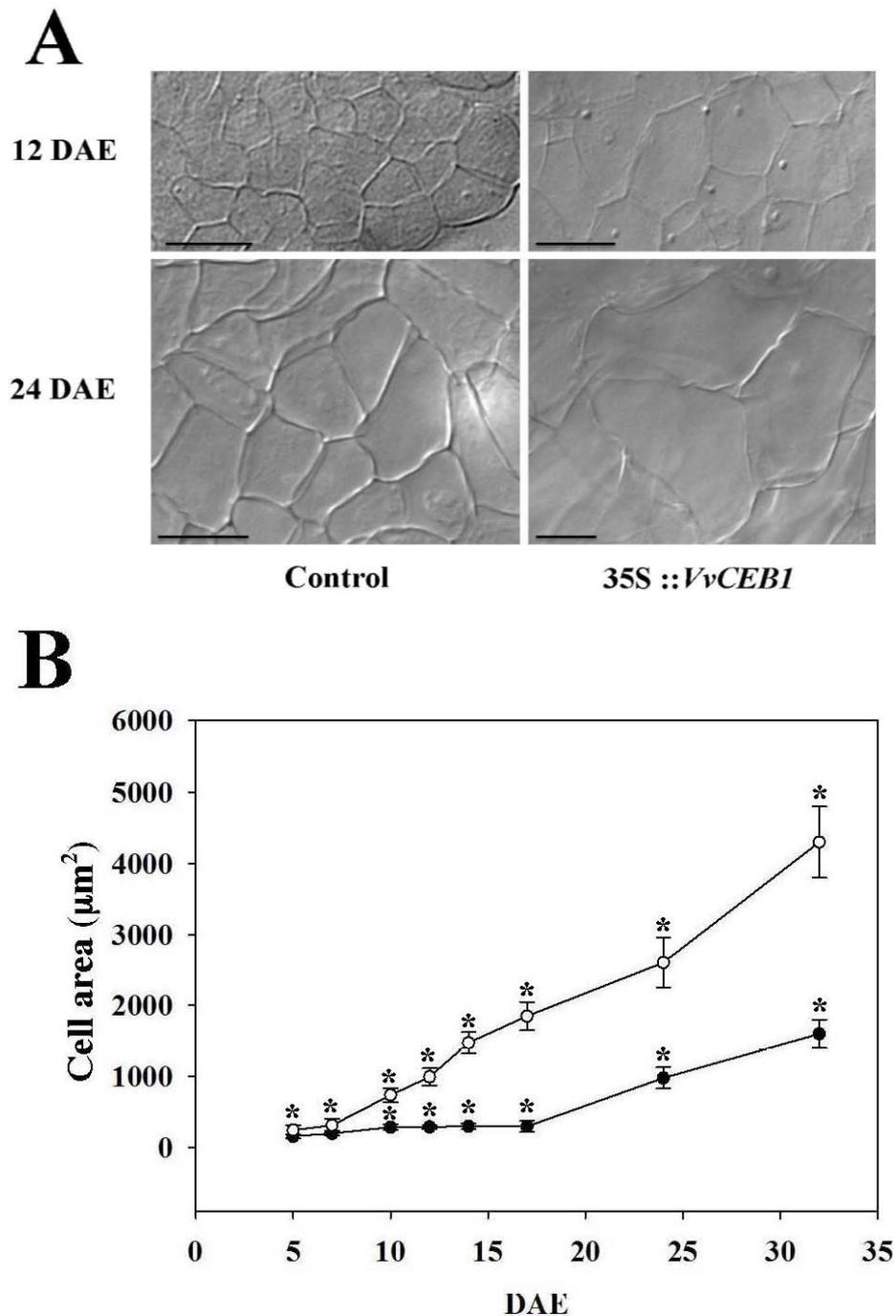


Figure 6. Overexpression of *VvCEB1* Increases Cell Size in Grape 41B Embryos.

(A) Difference in cell size between control (empty vector) and *VvCEB1*-overexpressing (35S::*VvCEB1*) embryos lines. Observations were assessed at 12 and 24 days after initiation of embryogenesis (DAE). Arrows in Figure 5A show the position where cells were observed. Bars = 25 μm .

(B) Cell area of control (pFB8 empty vector, black circles) and *VvCEB1*-overexpressing (35S::*VvCEB1*, open circles) lines was assessed at different stages of 41-B embryos development, from 5 to 32 days after initiation of embryogenesis (DAE). Arrows in **Figure 5A** indicate the area where cells were measured. Data are mean of the ten biggest cells measured in this area for each embryo and twenty embryos for each line were used to collect these data. Error bars indicate SD. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks was performed and asterisks indicate statistically significant differences between lines at the same time point ($p < 0.001$).

Figure 7

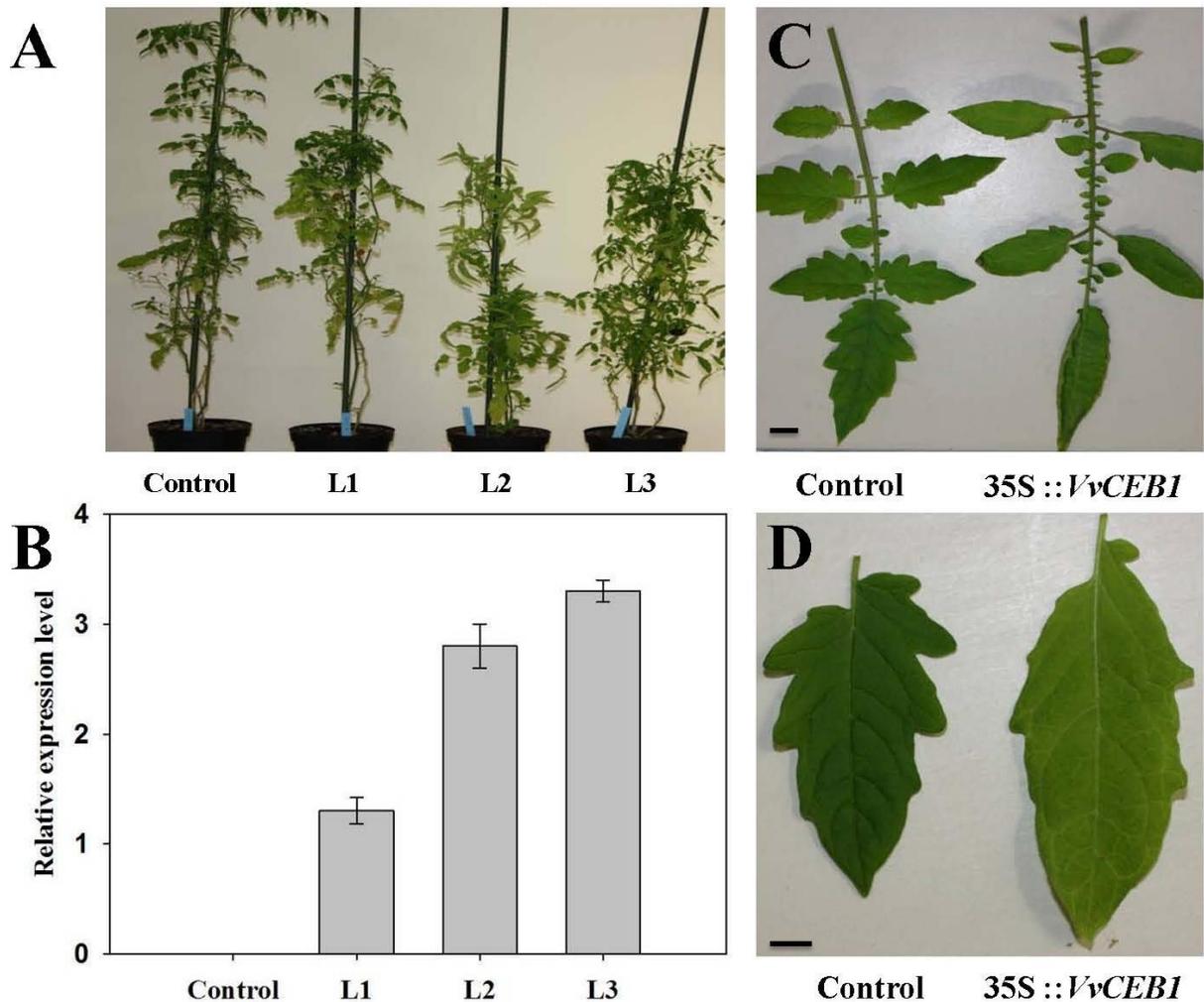


Figure 7. Vegetative Growth Phenotypes of *VvCEB1*-Overexpressing Tomato Plants.

(A) Phenotype of transgenic tomato plants exhibiting different level of expression (L1, L2, L3) in comparison to the control (pFB8 empty vector)

(B) Quantitative Real-Time PCR Analysis of *VvCEB1* transcript accumulation in control (pFB8 empty vector) and *VvCEB1*-overexpressing tomato lines (L1, L2, and L3). Gene expression was normalized with *SlEiFα*. Data are means three replicates indicating SD.

(C) Tomato leaf morphology in control (pFB8 empty vector) and in L3 *VvCEB1*-overexpressing line (L3). Bars = 10 mm.

(D) Tomato leaflet morphology in control (pFB8 empty vector) and in L3 *VvCEB1*-overexpressing line. Bars = 5 mm.

Figure 8

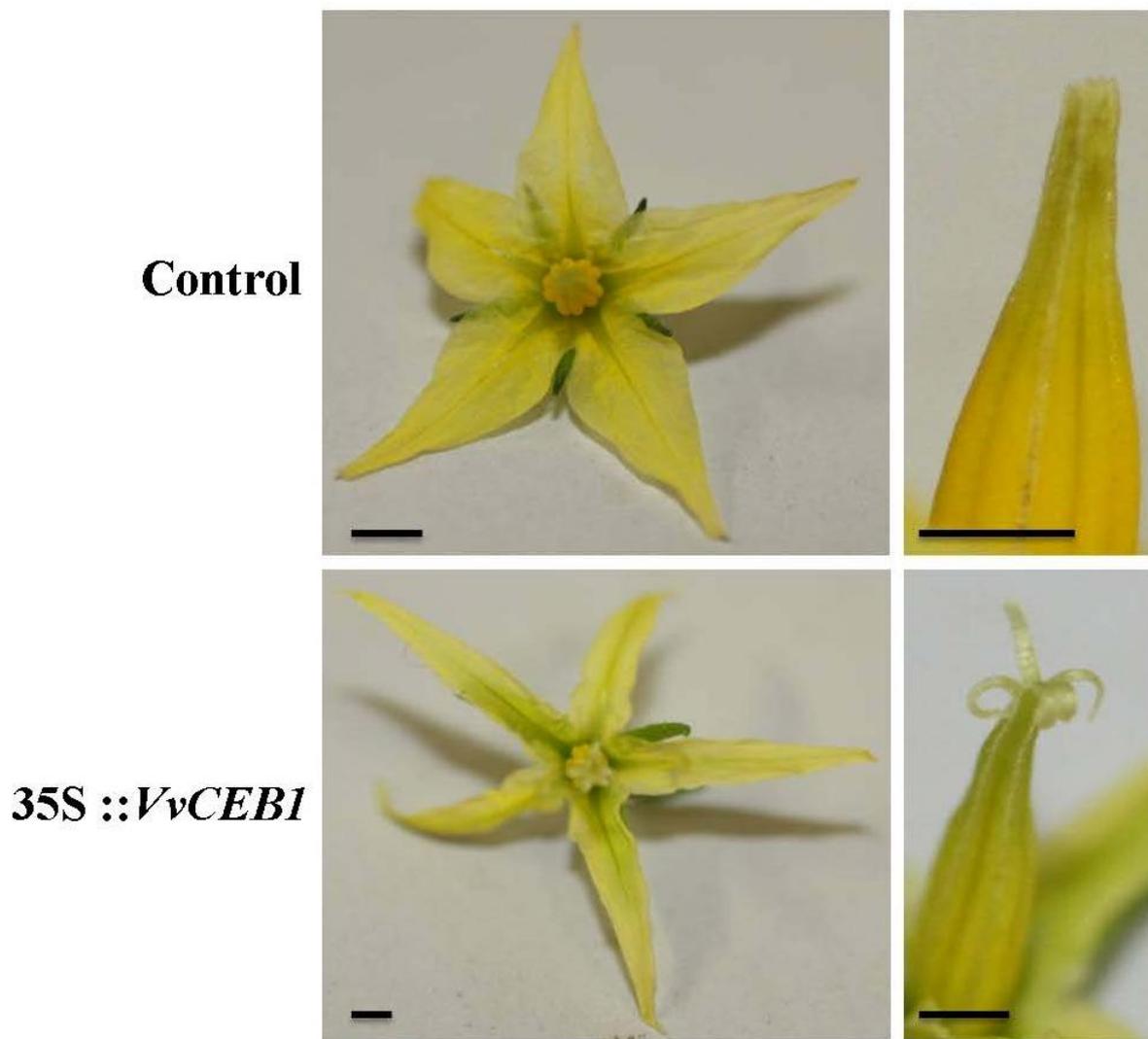


Figure 8. Flower Disturbed Phenotype of *VvCEB1*-Overexpressing Tomato Plants.

Flowers were observed at anthesis in control (pFB8 empty vector) and *VvCEB1*-overexpressing line (35S::*VvCEB1*). 35S::*VvCEB1* line shows elongated petals and curly elongated stamen when compared to the control. Bars = 2.5 mm

Figure 9

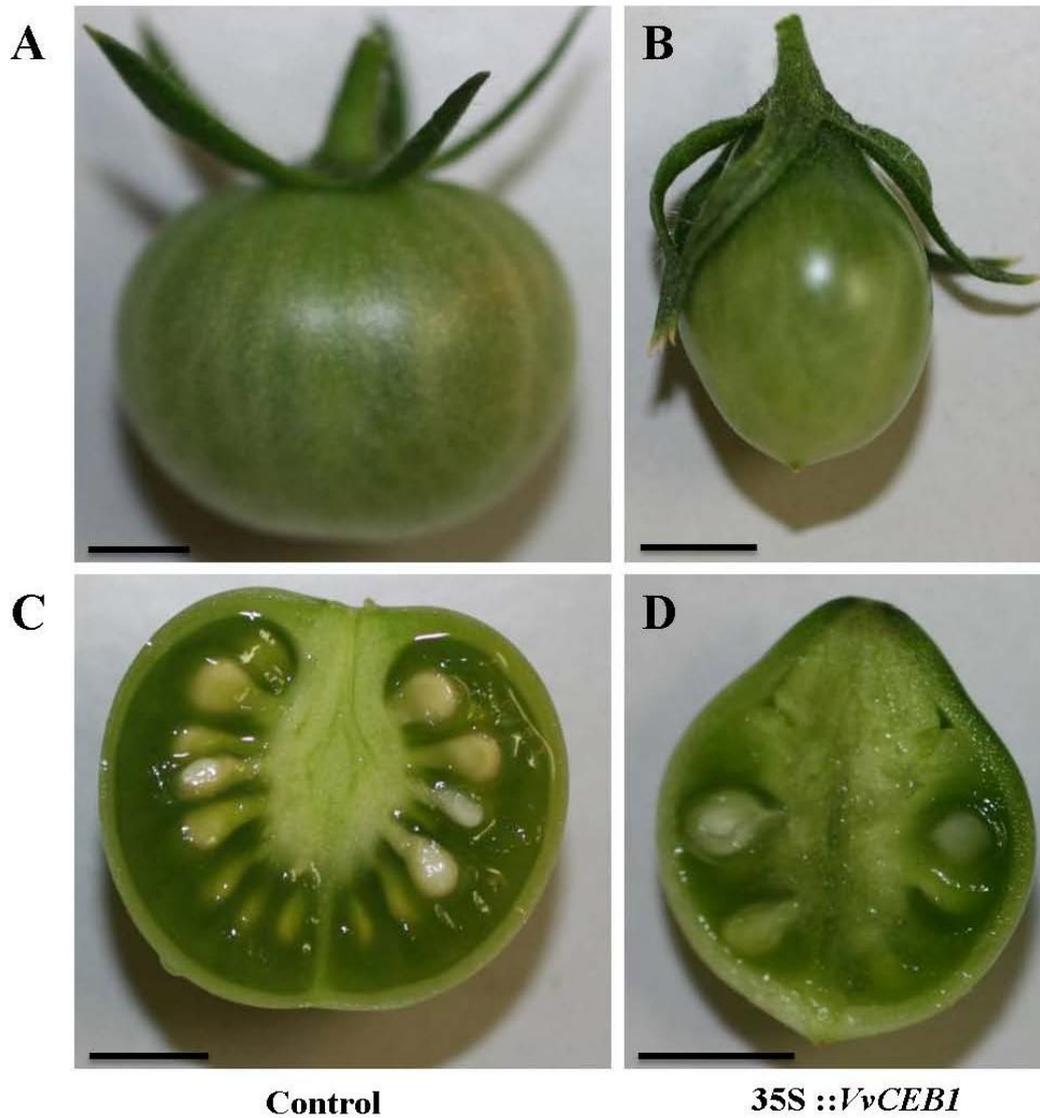


Figure 9. *VvCEB1* Overexpression in Tomato Plants Affects Fruit Development.

Fruits were analyzed at 30 days after anthesis in both control (pFB8 empty vector) and *VvCEB1*-overexpressing line (35S::*VvCEB1*). (A) and (B) show the entire fruit phenotype. (C) and (D) depict transversal section of control and 35S::*VvCEB1* fruits. Bars = 5 mm.

Figure 10

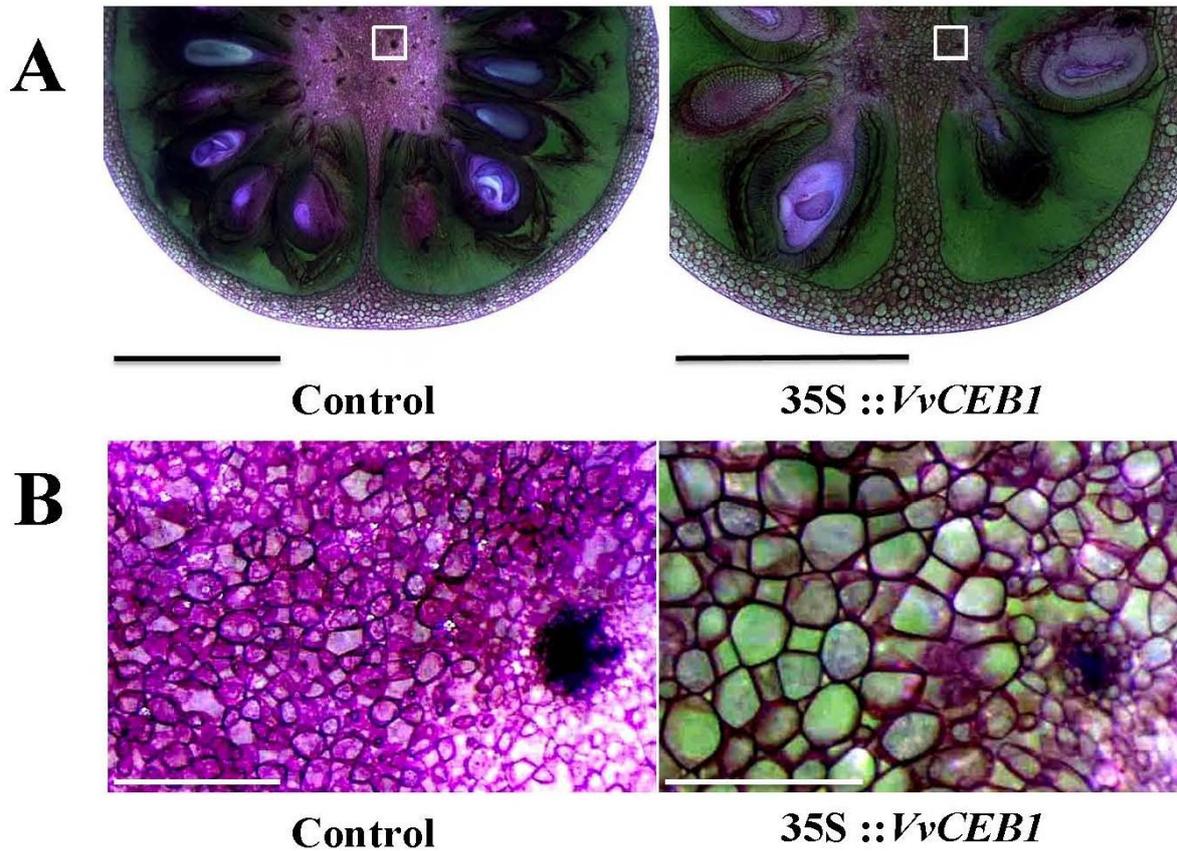


Figure 10. Microscopic Analysis of Longitudinal Tomato Fruit Sections.

(A) Global fruit longitudinal sections were performed 30 days after anthesis for control (pFB8 empty vector) and *VvCEB1*-overexpressing lines (35S::*VvCEB1*). Fruit were cut from the equatorial region of the fruit and stained with toluidin blue. White squares indicate the portion of the columella chosen for magnification in (B). Bars = 6 mm.

(B) Increase in cell size in columella of *VvCEB1*-overexpressing fruit (35S::*VvCEB1*) in comparison to control fruit (pFB8 empty vector). Fruit were cut from the equatorial region of the fruit and stained with toluidin blue. Bars = 0.5 mm.

Figure 11

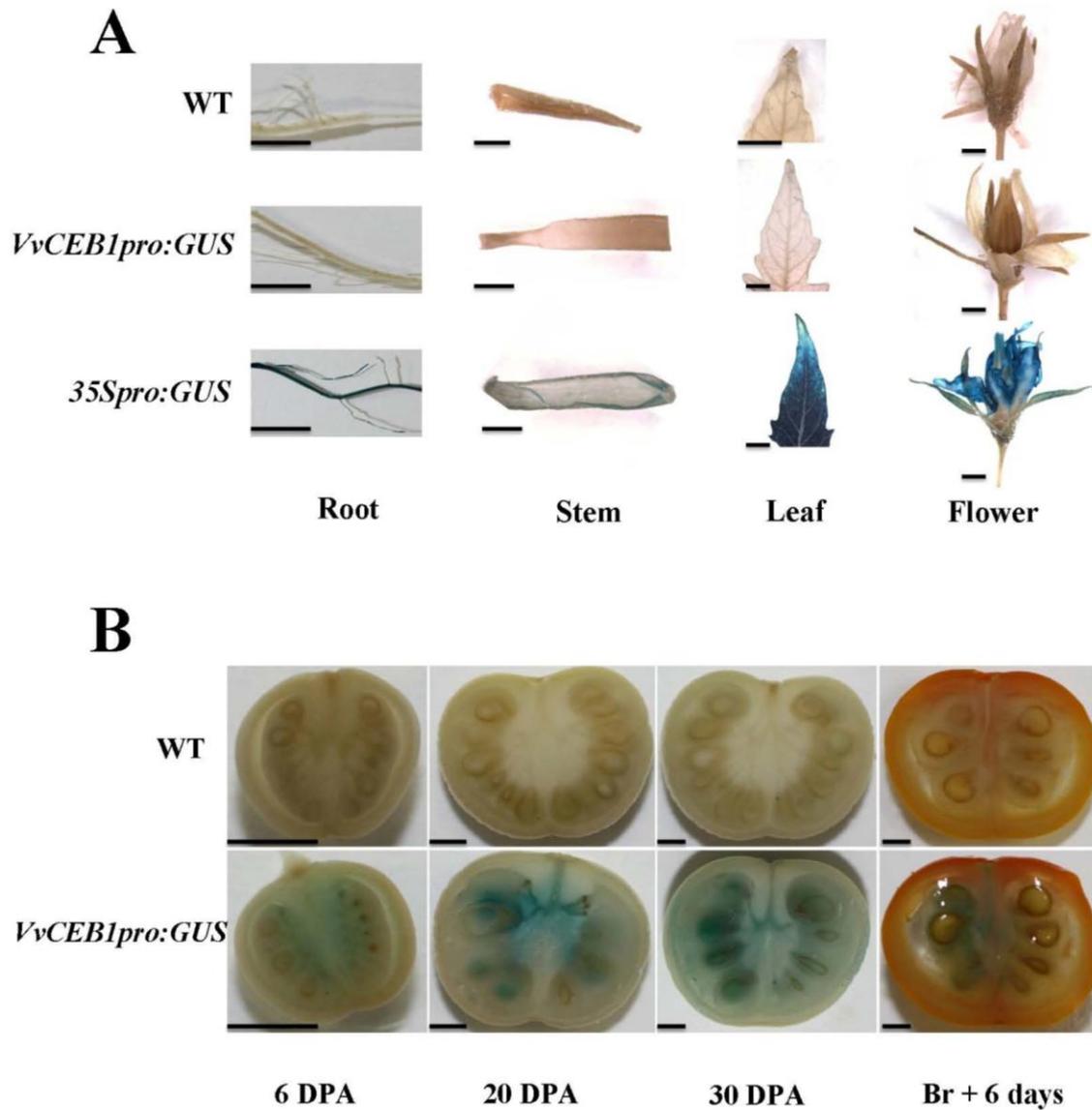


Figure 11. Expression of *VvCEB1* Promoter in Tomato.

(A) GUS activity in various organs of tomato plants stably transformed with *VvCEB1*promoter::*GUS* (*VvCEB1*pro:*GUS*) transgene. CaMV 35S promoter::*GUS* (35Spro-*GUS*) and Wild Type (WT) plant lines were used as controls. Bars = 2.5 mm.

(B) GUS activity in tomato fruits stably transformed with *VvCEB1*promoter::*GUS* (*VvCEB1*pro:*GUS*) transgene at different development stages: 6 days post anthesis (DPA), 20 DPA, 30 DPA, and Breaker + 6 days (Br + 6 days). Wild Type (WT) line was used as control. Bars = 2.5 mm.

Figure 12

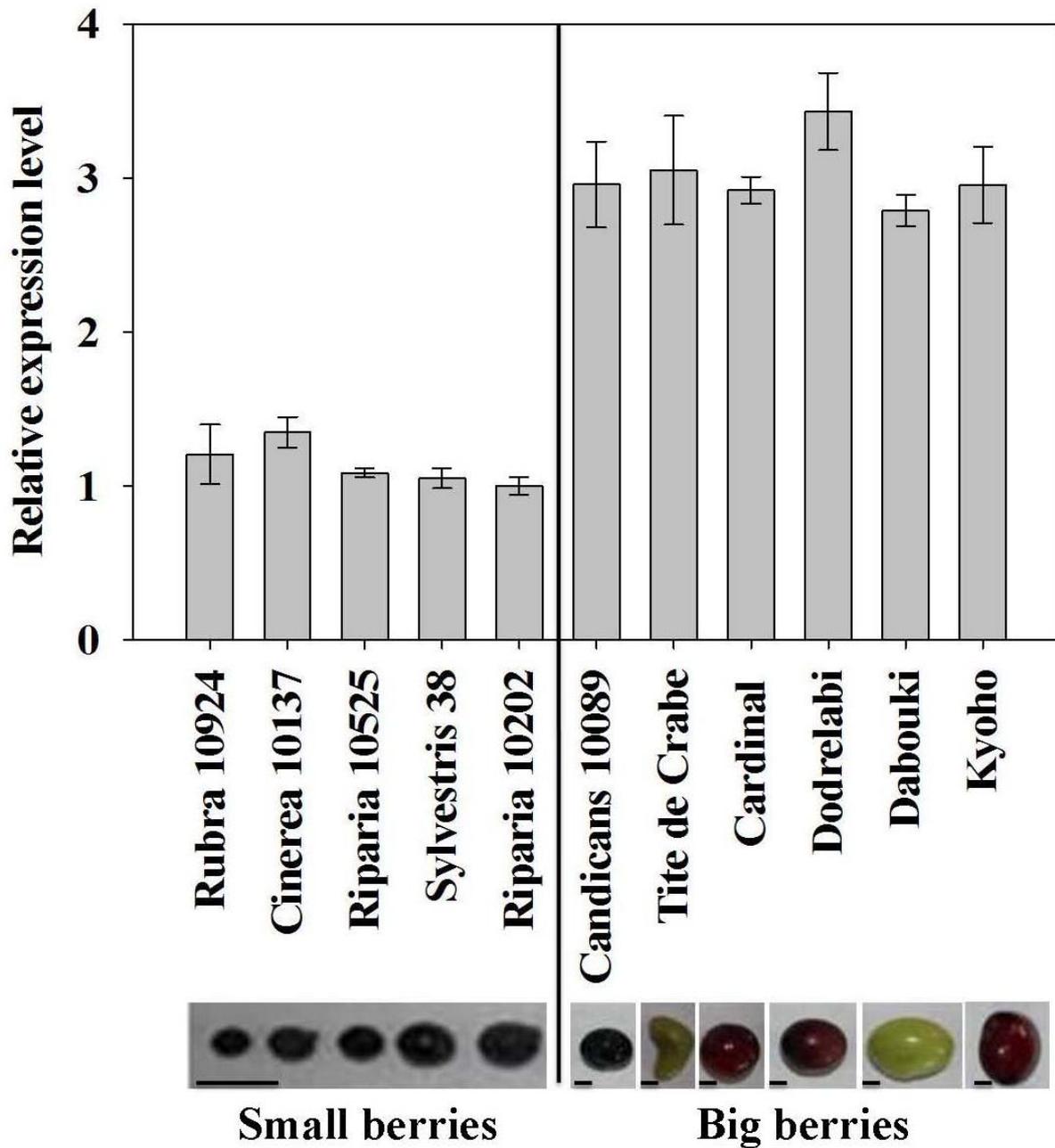


Figure 12. Correlation Between *VvCEB1* Expression and Grape Berry Size.

Quantitative real-time PCR analysis showing *VvCEB1* transcript accumulation in different grape varieties exhibiting different berry size. Berries were harvested 80 days after anthesis. Seeds were removed for this analysis. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* . All data are means of four replicates from two independent experiments (summer 2009 and 2010), with error bars indicating SD. Bars = 10 mm.

Figure S1

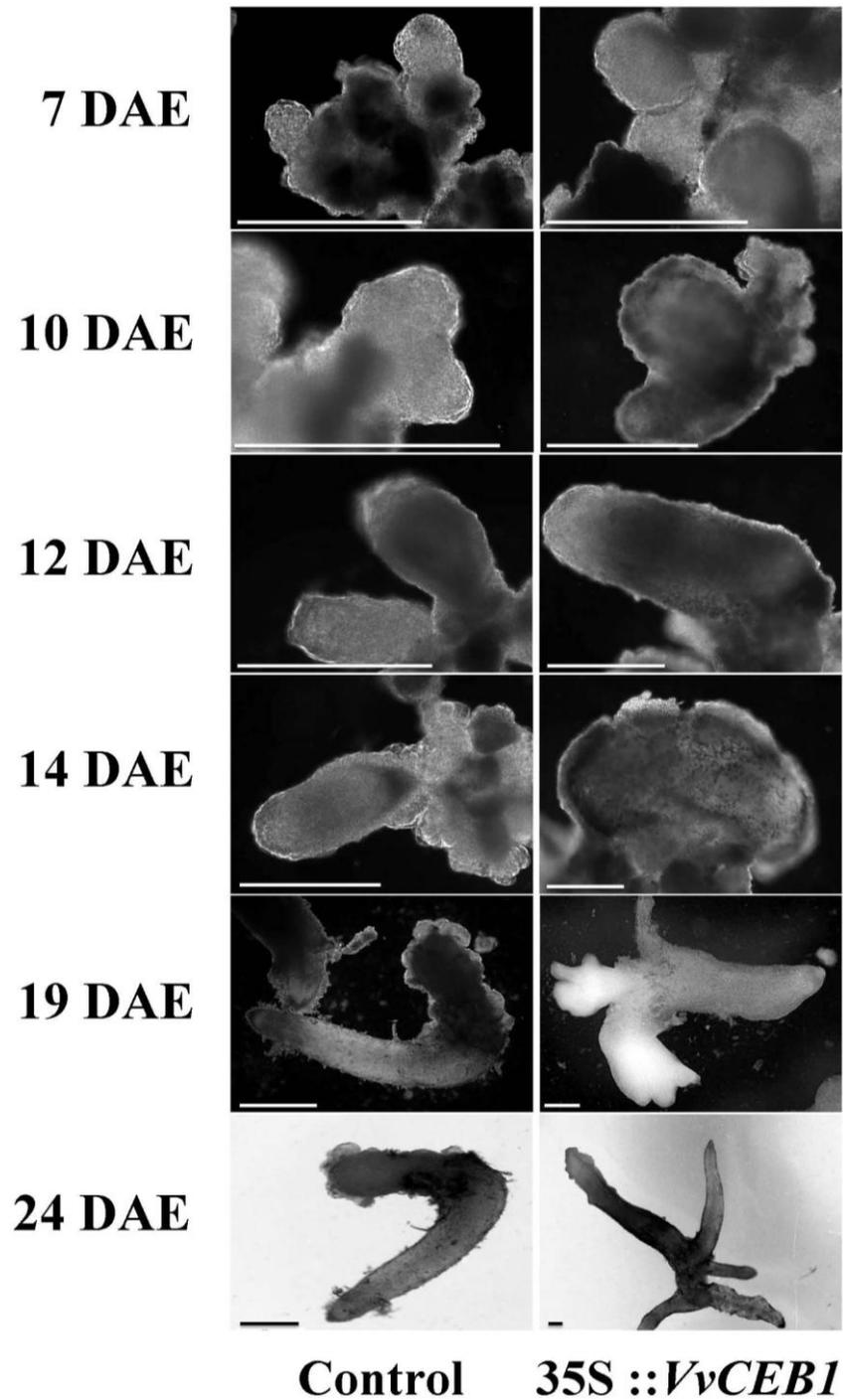


Figure S1. Kinetic of Development of Control (pFB8 empty vector) and *VvCEB1*-Overexpressing (35S::*VvCEB1*) 41B Grape Embryos.

Observations were performed at 7, 10, 12, 14, 19 and 24 days after initiation of embryogenesis (DAE) using a light microscope (Axiophot ZEISS, day 7 to 14) or a stereomicroscope (Leica FLIII; day 19 and 24). Bars = 500 μ m.

Figure S2

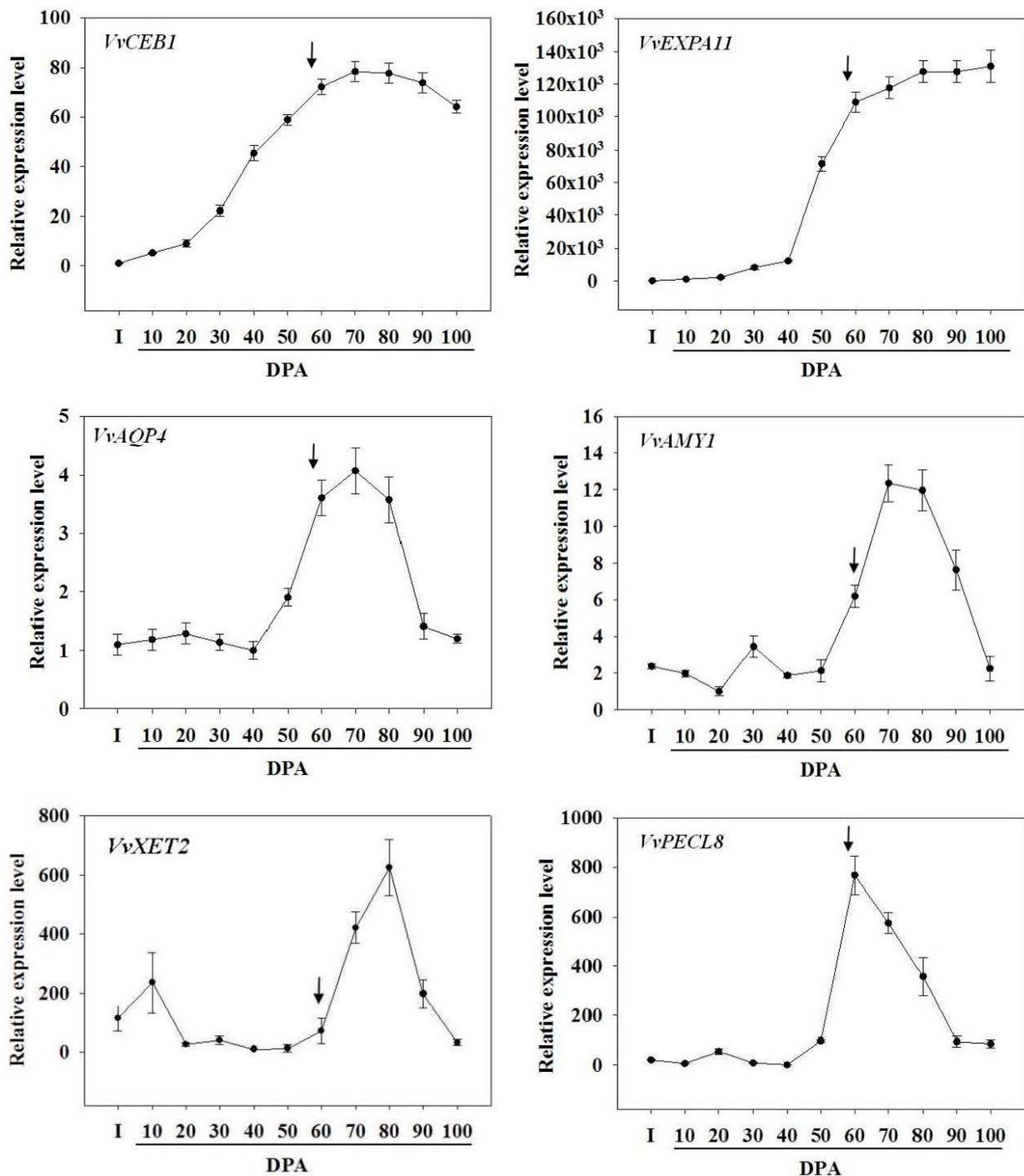


Figure S2. Kinetic of Expression of *VvCEB1* Putative Target Genes During Grape Berry Development.

Gene expression levels were estimated by quantitative real-time PCR from inflorescences (I) to mature berries at 100 days post anthesis (DPA). The arrow indicates the *veraison* stage. Error bars were calculated as SD for 4 replicates from summer 2006's harvest. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* .

Figure S2 (continued)

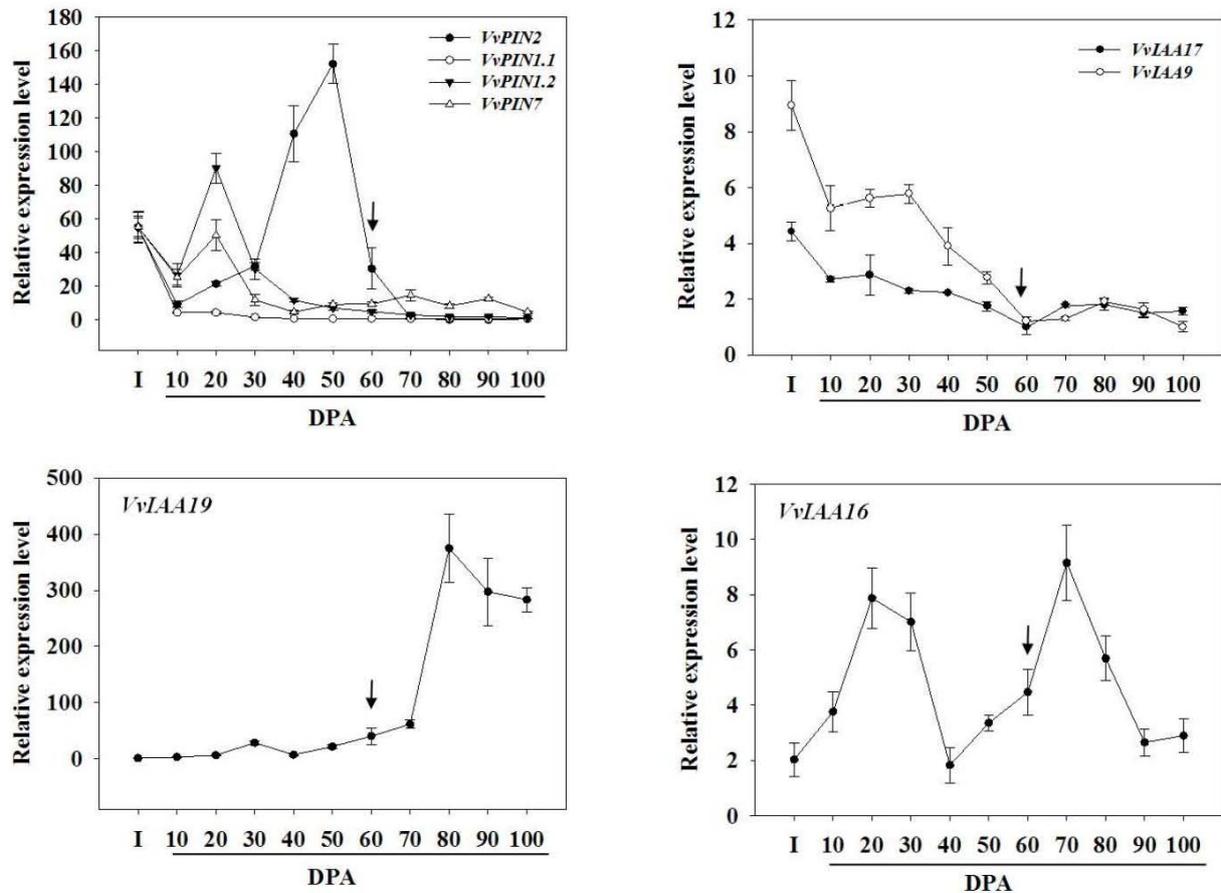


Figure S2. (continued) Kinetic of Expression of *VvCEB1* putative Target Genes During Grape Berry Development.

Gene expression levels were estimated by quantitative real-time PCR from inflorescences (I) to mature berries at 100 days post anthesis (DPA). The arrow indicates the *veraison* stage. Error bars were calculated as SD for 4 replicates from summer 2006's harvest. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* .

Table S1. PCR primers used to amplify gene-specific regions for expression analyses.

Gene Accession number	Forward (F) and reverse (R) primer sequences	From
<i>VvCEB1</i>	F 5'-CTCTGTTGGCATGCAACTCTAC-3'	
XM_002267429.1	R 5'-ACACTAGAGAGGTGGTCCTGTTG-3'	
<i>VvLAA9</i>	F 5'-GGTCTCAGCCAGCCAAGATG-3'	
HQ337788	R 5'-GCCAGCGTGTTCCTCCTAAAAG-3'	
<i>VvLAA14</i>	F 5'-ACGACTAGAATAGAGCAAGGT-3'	
M_002284097.1	R 5'-TTCAGATCCACTACTGATTCCT-3'	
<i>VvLAA17</i>	F 5'-CAGGCTCTATGGATTGTCTCTCAC-3'	
XM_002280488	R 5'-AGGTCTGGCTCTCTTTTCAGGAG-3'	
<i>VvLAA19</i>	F 5'-TCC CACCAAGGCTACTTCAATC-3'	Kohno et al. (2011) <i>Mol. Biol. Rep.</i> DOI: 10.1007/s11033-011-0816-0
HQ337790	R 5'-TACAAGCATCCAGTCCCCATC-3'	Bottcher et al. (2011) <i>J. Exp. Bot.</i> DOI: 10.1093/jxb/err134
<i>VvGH3-2</i>	F 5'-CTGAGTTGT GGAACCCAGTGAC-3'	
XM_002283850.1	R 5'-GCGGATGTAGAAGTTGGGAAAG-3'	
<i>VvGH3-6</i>	F 5'-TAGGATAGTGAAGCCTGG CACA-3'	
XM_002268242	R 5'-CTCTTTGGATTTGATGCACCTG-3'	
<i>VvARF6</i>	F 5'-TCTGCCTGCTGTTGGAA-3'	
XM_002282794	R 5'-TTG CTCTTGCGGACTCA-3'	
<i>VvARF9</i>	F 5'-AGAGGGAGATGATCTGTATGC-3'	
XM_002265126	R 5'-TGA CTCAGCTCCTGATTTCG-3'	
<i>VvARF17</i>	F 5'-TATCCACGGGTAGGGTCAT-3'	
XM_002284292.1	R 5'-CTCAGTCTCCATCGCCATT-3'	
<i>VvSAUR1</i>	F 5'-TGTGGTTCCAATATCTTACTTGAA-3'	
XM_002271526	R 5'-TGGATGATTGAAGCCGAATT-3'	
<i>VvSAUR5</i>	F 5'-CTGGTTCAACAATCCATTGC-3'	
XM_002279234.1	R 5'-GTTGGTTTCCTTGTTCCTTGAC-3'	
<i>VvPLT2</i>	F 5'-AGGCGAATGATTCTGATTACTT-3'	
XM_002285503	R 5'-TGTTGAACCTTTACCACTACC-3'	
<i>VvAUX1.3</i>	F 5'-GCTGGCTACCGTGTATGT-3'	
XM_002277381.1	R 5'-CCATGTCCCTGAAGTGTGAT-3'	
<i>VvAUX1.8</i>	F 5'-TTGACGGGAAACGAAGACA-3'	
XM_002279183.1	R 5'-TCTGCCTCGCTGATGTTTC-3'	
<i>VvAUX1.13</i>	F 5'-CGTTGCCATACTCCTTCTCT-3'	
XM_002268889.1	R 5'-CTGCTGCGGTACTCAATGT-3'	
<i>VvPIN1.1</i>	F 5'-CTCCAGAAGGTCACAGGGTTGTC-3'	
XM_002282184	R 5'-GGTCAGGCCGTACACGTCAGATG-3'	
<i>VvPIN1.2</i>	F 5'-AAACGGAATTGGCGGATT-3'	
XM_002282651	R 5'-GTAACCACCACCCTGTGAATA-3'	
<i>VvPIN2</i>	F 5'-GGAATGCTTGATTCAATGACACT-3'	
XM_002266023	R 5'-GCTGCCTGAGTCCTGATC-3'	
<i>VvPIN5</i>	F 5'-TGG CATGATCGTCTCCCTTCC-3'	
XM_002279155.1	R 5'-CTCTCCCTAACTCACTTCCCACATC-3'	
<i>VvPIN6</i>	F 5'-TGCGTATCAGACGGTCCA-3'	
XM_002278413.1	R 5'-CGGGAGTGTGACGGAGA-3'	
<i>VvPIN7</i>	F 5'-TCAATGTATGTACGGAGAAGTTTT-3'	
XM_002284266.1	R 5'-GCGGGTGCATCTTCACTTAT-3'	
<i>VvPIN8</i>	F 5'-TCCATCCAGACATCTTGAGCA-3'	
XM_002282444.1	R 5'-ACAACGCCAGTAGGAAGTAGTAG-3'	

Table S1. (Continued)

Gene Accession number	Forward (F) and reverse (R) primer sequences	From
<i>VvPID1</i>	F 5'-GGAGTCGCAACGGGATTTCG-3'	
XM_002274117.1	R 5'-GCGGCTTCAGCGTCAGATT-3'	
<i>VvEXPA1</i>	F 5'-TTTTGGCCCCAGTTCCTG-3'	Chervin et al. (2008)
XM_002269481.1	R 5'-TTTTGGCCCCAGTTCCTG-3'	<i>Physiol. Plant.</i> 134: 534-546
<i>VvEXPA2</i>	F 5'-GAGTACCGCGCCGGAATT-3'	Chervin et al. (2008)
XM_002266589.1	R 5'-CTCCACTCTTTCGGCAGGATA-3'	<i>Physiol. Plant.</i> 134: 534-546
<i>VvEXPA8</i>	F 5'-CAAGTTAGGAGGGCAGAAGTTTGT-3'	
XM_002280264.1	R 5'-CAACGATGACCCCAAATGGT-3'	
<i>VvEXPA11</i>	F 5'-CAGTATCAATCAAAGGCTCCC-3'	
XM_002285855.1	R 5'-CCCAATCTGAAGGCACAAC-3'	
<i>VvEXPA12</i>	F 5'-AAATGGCTCTGTTAGTTTAGTGTA-3'	
XM_002284822.1	R 5'-GCAAGGCTTCGTGTGAA-3'	
<i>VvEXPA17</i>	F 5'-GTGTGACGCAACCAAGG-3'	
XM_002273247.1	R 5'-CGAAAGCAGGTTGAGACAT-3'	
<i>VvPECL1</i>	F 5'-CAGTTAGATCCGTCTAGAGAGA-3'	
XM_002285603.1	R 5'-CATCACAGCGACGAAGAG-3'	
<i>VvPECL8</i>	F 5'-CTTGCCCTGCCTAACTTCATCTTC-3'	
XM_002275745.1	R 5'-AGGTTCTCGATGCTGATCACTACA-3'	
<i>VvPME</i>	F 5'-TCCAGTGGCCGGGTTTT-3'	Chervin et al. (2008)
XM_002270580.1	R 5'-TGAATTCGGTCACCGTGAAG-3'	<i>Physiol. Plant.</i> 134: 534-546
<i>VvCS</i>	F 5'-ACTGCAAACCCATTATTGAACC-3'	
XM_002269789.1	R 5'-GACATGACCCACCATCATCG-3'	
<i>VvXET2</i>	F 5'-GACCCAGGGCAAGAGAT-3'	
XM_002274484.1	R 5'-AACAAAGCAATAAGCGAGAGA-3'	
<i>VvAGP20</i>	F 5'-TGTTCTAGGGTTGGCATTG-3'	
XM_002280458.1	R 5'-ACGGATGGATGAGGTATGT-3'	
<i>VvAMY1</i>	F 5'-AATAGGCTTTGCTGGATGG-3'	
XM_002285177.1	R 5'-GTTTGGCTTACTGTCAATTCC-3'	
<i>VvAQP1</i>	F 5'-TCAACCCGATGCGCTCA-3'	Chervin et al. (2008)
XM_002274502.1	R 5'-CTCCGCGAACACAAAAATT-3'	<i>Physiol. Plant.</i> 134: 534-546
<i>VvAQP2</i>	F 5'-TGCCGATTCCCCTCTTCTG-3'	Chervin et al. (2008)
XM_002262942.1	R 5'-CAAACAACACCACAAACGCATAG-3'	<i>Physiol. Plant.</i> 134: 534-546
<i>VvAQP3</i>	F 5'-GAAACGCCAGAGACTCTCACGT-3'	Chervin et al. (2008)
XM_002274691.1	R 5'-TGAACCAAGAACACTGCAAACC-3'	<i>Physiol. Plant.</i> 134: 534-546
<i>VvAQP4</i>	F 5'-GTTCACTTGCCACTATTCCTATCA-3'	
XM_002274519.1	R 5'-GTTCACTTGCCACTATTCCTATCA-3'	
<i>VvEF1γ</i>	F 5'-CAAGAGAAACCATCCCTAGCTG-3'	
AF176496.1	R 5'-TCAATCTGTCTAGGAAAGGAAG-3'	
<i>SIEiF4α</i>	F 5'-AGTGGACGATTTGGAAGGAAG-3'	
BT013166.1	R 5'-GCTCCTCGATTACGACGTTG-3'	

III. Résultats complémentaires

III.1. Profils d'expression des homologues de *VvCEB1* chez la Vigne

VvCEB1 est un facteur de transcription dont les transcrits s'accumulent de façon quasi-exclusive dans les baies par rapport aux autres organes. Un arbre phylogénétique regroupant les bHLH de Vigne appartenant à la sous-famille XII décrites par Pires et Dolan (2010) a été réalisé (Figure 24). Cette analyse phylogénétique a révélé la présence de 13 membres en plus de *VvCEB1* à l'intérieur de la sous famille 12. Les profils d'expression des quatre homologues les plus proches de *VvCEB1* ont été analysés et comparés à son profil d'expression (Figure 25). De façon intéressante, le transcrite de *VvbHLH-XP002284454* (plus proche homologue de *VvCEB1* sur l'arbre phylogénétique, Figure 24) s'accumule très fortement et préférentiellement dans la baie de raisin mature par rapport aux autres organes (Figure 25 A). Cependant, alors que l'expression de *VvCEB1* augmente dès la mise en place du fruit, les transcrits *VvbHLH-XP002284454* ne s'accumulent fortement qu'à partir du « plateau herbacé » c'est-à-dire 40 à 50 j après anthèse (Figure 25 A). *VvGSVIVT01020121001* et *VvGSVIVT01023783001* ne présentent pas de profils d'expression spécifiques d'un organe en particulier (Figure 25 B et C), alors que *VvGSVIVT01033350001* est davantage exprimé dans les feuilles. Au cours du développement de la baie, l'accumulation de tous ces transcrits diminue fortement (Figure 25 B, C et D). Prises dans leur ensemble, ces données confirment que parmi les membres de la sous famille XII, *VvbHLH-XP002284454* semble le plus proche homologue de *VvCEB1*.

III.2. Profils d'expression de *VvCEB1* en réponse à différents traitements hormonaux

L'accumulation des transcrits *VvCEB1* en réponse aux hormones majeures connues pour être impliquées dans le développement de la baie de raisin (auxine, ABA, éthylène, cytokinines, BR et gibbérellines) a été analysée (Figure 26). Parmi ces hormones, les cytokinines, les gibbérellines, l'éthylène et l'ABA n'affectent pas significativement l'expression de *VvCEB1* (Figure 26 B-F), alors que l'auxine réprime de façon significative (jusqu'à 4 fois) l'accumulation des transcrits *VvCEB1* dès 2 heures après le début du traitement (Figure 26 A). Cette répression de *VvCEB1* par l'auxine est en accord avec l'accumulation préférentielle de *VvCEB1* à partir de la véraison lorsque le niveau d'auxine est

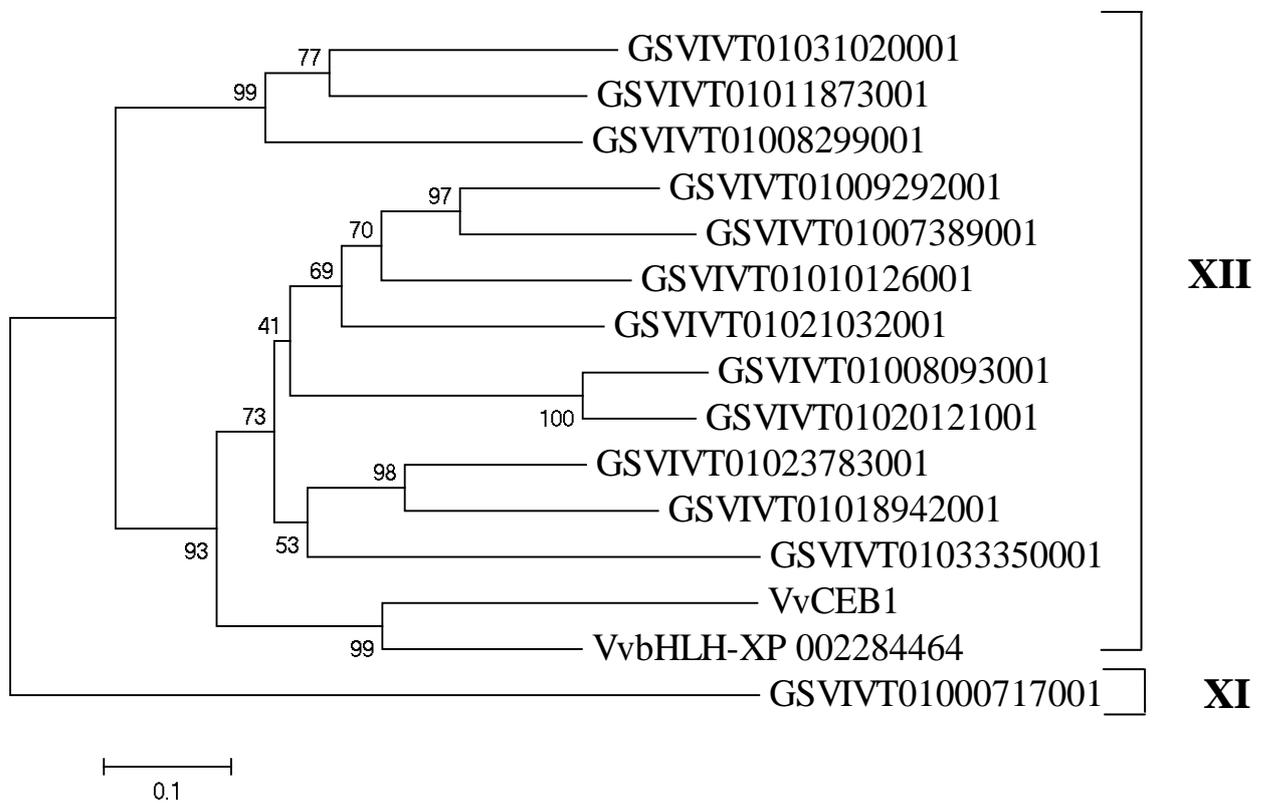
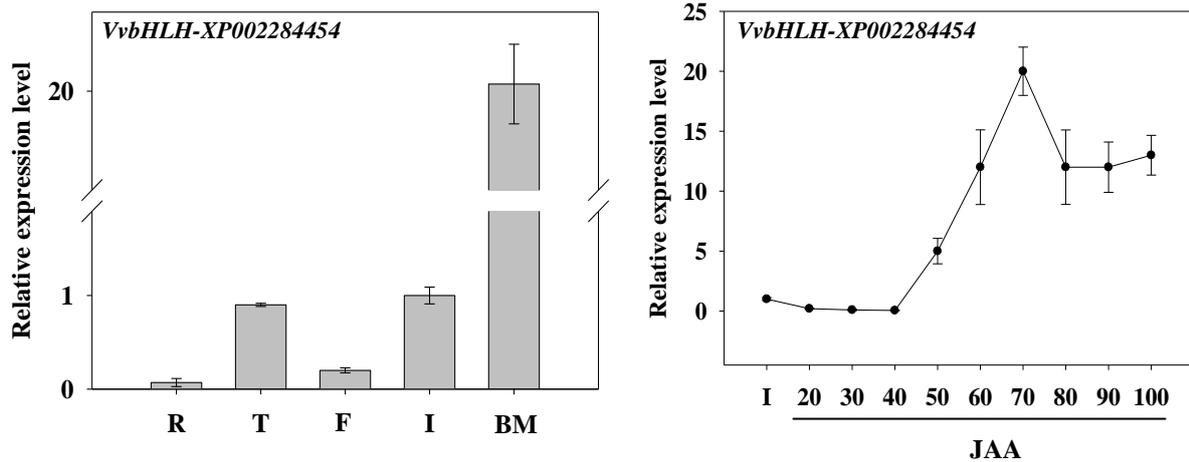
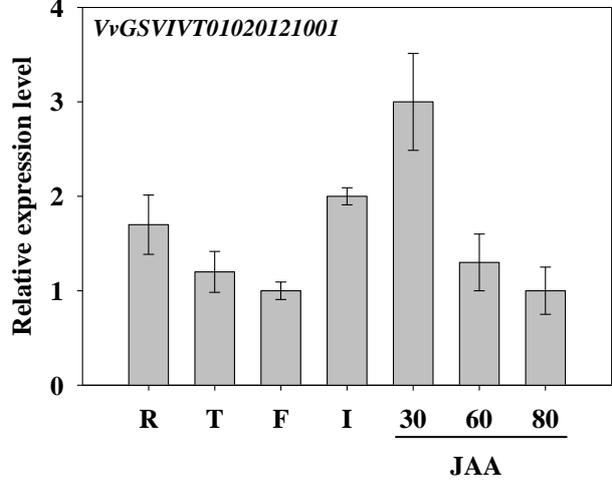


Figure 24. Analyse phylogénétique des protéines bHLH de Vigne appartenant à la sous-famille XII. Le bHLH identifié GSVIVT01000717001 appartient à la sous famille XI. L'arbre phylogénétique a été réalisé avec le logiciel MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007) et la méthode Neighbor Joining (2000 bootstrap replicates).

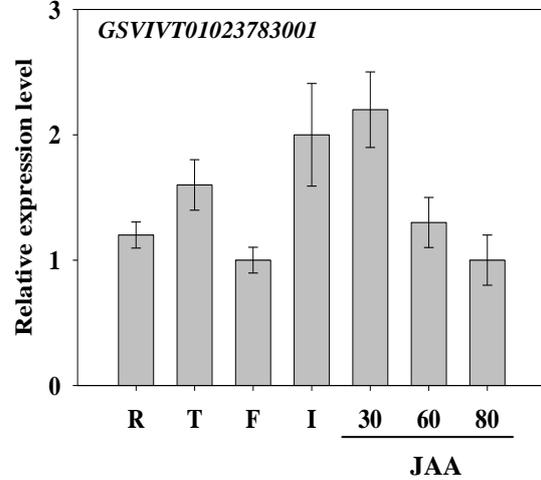
A



B



C



D

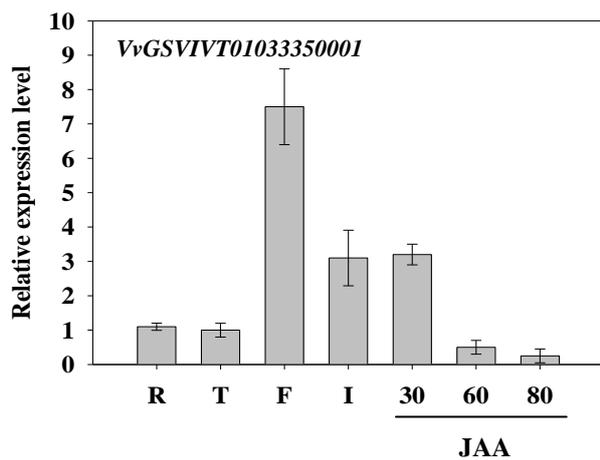


Figure 25. Analyse par PCR Quantitative des profils d'expression des 4 homologues de VvCEB1 : *VvbHLH-XP002284454* (A), *VvGSVIVT01020121001* (B), *VvGSVIVT01008299001* (C) et *VvGSVIVT01023783001* (D). Cette analyse a été réalisée pour différents organes de Vigne : R, racines; T, tiges; F, feuilles; I, inflorescences; BM, baies matures, et au cours du développement de la baie (30, 60 et 80 JAA, jours après anthèse). Le stade 60 JAA représente la véraison.

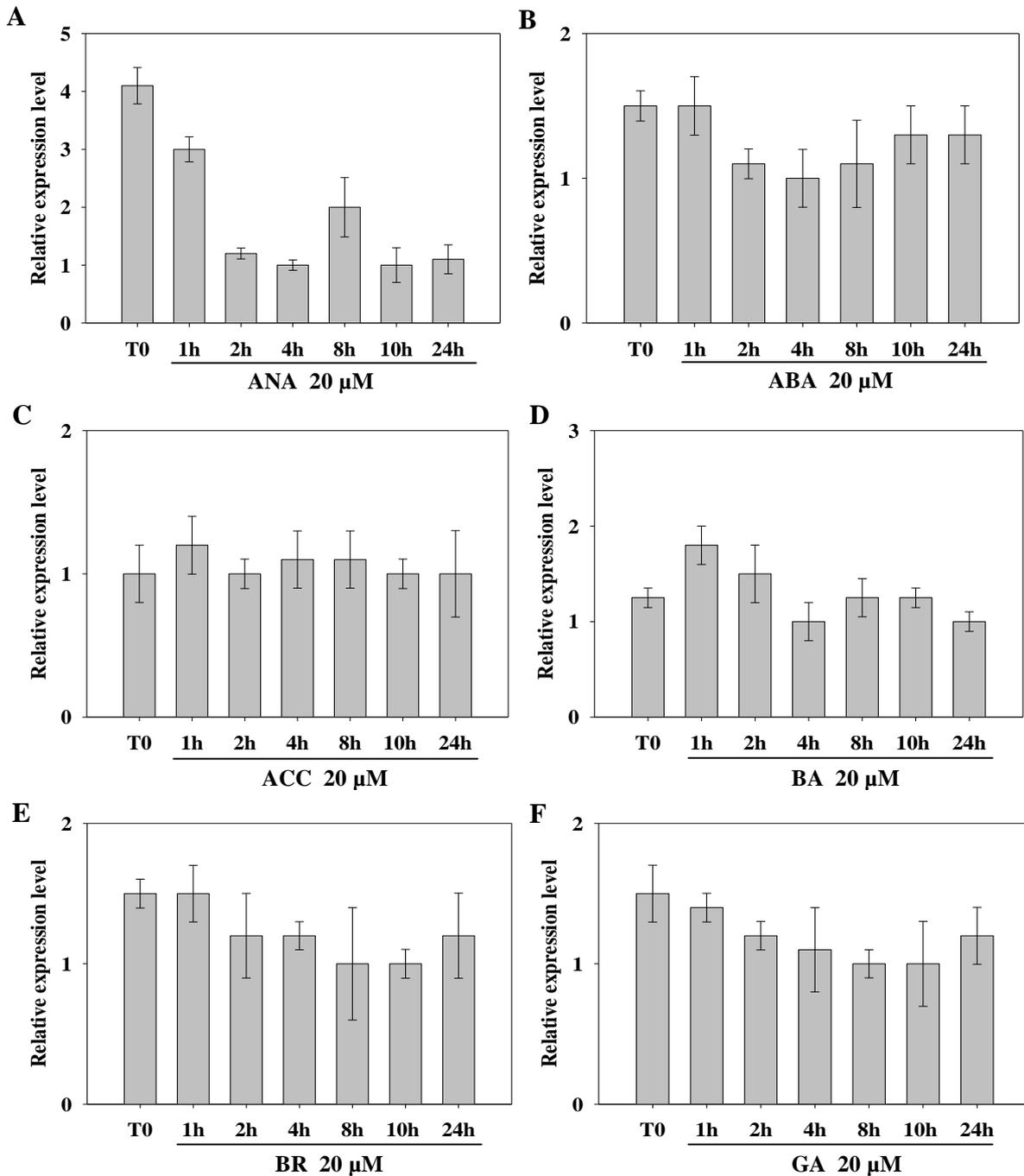


Figure 26. Analyse par PCR Quantitative de l'effet de différents traitements hormonaux sur l'expression de *VvCEBI* dans des suspensions cellulaires de cabernet-sauvignon (CSB) : (A) auxine 20 μ M (ANA, acide naphthalène acétique), (B) acide abscissique 20 μ M (ABA), (C) éthylène 20 μ M (ACC, Acide 1-Amino Cyclopropane-1-Carboxilique), (D) cytokinine 20 μ M (BA, 6-benzylaminopurine), (E) brassinostéroïdes (BR), et (F) gibbérellines 20 μ M (GA).

minimal dans le fruit (cf. Figure 10, contexte bibliographique). Ce résultat suggère que même si *VvCEB1* affecte l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie et la signalisation auxinique (cf. article), l'auxine peut en retour affecter son expression (rétrocontrôle négatif). Cette régulation négative de l'expression par l'auxine d'un bHLH impliqué dans le développement du fruit a récemment été démontrée chez la fraise. En effet, l'expression de *FaSPT* (*SPATULA*) est réprimée dans les fruits verts par 1 mM de NAA (Tisza *et al.*, 2010).

III.3. Analyse transcriptomique des suspensions cellulaires surexprimant *VvCEB1*

Afin d'identifier des cibles potentielles de *VvCEB1*, une analyse transcriptomique a été effectuée au début de cette thèse à partir de cellules embryogènes 41B surexprimant *VvCEB1*. Cette analyse préliminaire a été réalisée avec des lames 14K (demi-génome) spottées par la plateforme MGX de Montpellier, et hybridées et analysées sur la plateforme de transcriptomique de l'INRA de Bordeaux (SFR Biologie Intégrative et Ecologie). L'exploitation des données issues de ces lames s'est révélée très compliquée et limitée, notamment du fait de la qualité de leur spottage et de la qualité du signal après hybridation. De nombreux spots ont donc été exclus de cette analyse. Néanmoins, parmi les 14500 unigènes présents sur la lame, 194 gènes se sont révélés être différentiellement exprimés (au moins 2 X) par rapport au contrôle (vecteur vide). Soixante seize étaient induits et 118 réprimés par surexpression de *VvCEB1* (cf. Tableau 3 et 4, à la fin de ce chapitre). Parmi les gènes induits, nous avons mis en évidence des gènes impliqués dans : la synthèse (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase) et la signalisation (EIN3-binding F-box protein) de l'éthylène, les processus de sénescence (*IDA* et Senescence-inducible chloroplast stay-green protein), la synthèse de composés phénoliques (Flavonol 3-O-glucosyltransférase, chalcone synthase), le stress oxydatif (Peroxirédoxine, peroxydase, SRO1, RCD1, early light-induced protein), la régulation de la transcription (Dehydration-responsive element binding protein, Nam-like protein, WRKY), le métabolisme des sucres (α -amylase, chloroplast α -glucan water dikinase, fructokinase, sucrose synthase) et le métabolisme de la paroi (cellulose synthase, WAK-like kinase, GDSL esterase/lipase, polygalacturonase inhibitor, proline rich cell wall protein et expansin) (Cf. Tableau 3). Parmi les gènes les plus réprimés, nous avons mis en évidence : des gènes codant des protéines de réponse au stress thermique (heat shock proteins) et osmotique (galactinol synthase, late embryogenesis proteins), un transporteur

	Glucose (g/mg poids sec)	Fructose (g/mg poids sec)	Saccharose (g/mg poids sec)
Témoin	0,68 ± 0,2	0	0,59 ± 0,20
<i>VvCEB1</i>	0,48 ± 0,1	0,35 ± 0,01	0,85 ± 0,02

Tableau 1. Dosage du glucose, fructose et saccharose dans les lignées cellulaires embryogènes de vigne surexprimant *VvCEB1* et témoins.

d'efflux d'auxine (homologue de AtPIN1) et 3 facteurs de transcription impliqués dans la signalisation auxinique (AUX/IAA) (Cf. Tableau 4).

Cet effet répresseur induit par la surexpression de *VvCEB1* sur les gènes reliés à l'auxine coïncide avec les modifications phénotypiques observées sur les embryons de Vigne et les plants de Tomate transgéniques (cf. article) qui suggéraient des effets liés à des perturbations associées à cette hormone. De nombreux gènes codant des protéines associées à l'homéostasie de l'auxine ou à sa signalisation ont donc été analysés par PCR Quantitative (cf. article).

Un autre aspect mis en évidence par cette analyse microarray est la régulation de gènes associés à l'expansion cellulaire. Dans ce contexte, plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans l'expansion cellulaire (expansine, cellulose synthase, ...) ont été sélectionnés (sur les bases de notre étude et de données de la littérature) et analysés par PCR Quantitative (cf. article). Les résultats obtenus confirment que *VvCEB1* stimule l'expansion cellulaire (Cf. article).

Le métabolisme des sucres et l'accumulation des hexoses jouent un rôle très important lors de l'expansion cellulaire dans le fruit (cf. contexte bibliographique) ou d'autres organes (Yamada *et al.*, 2009). En effet, ils interviennent en tant que source d'énergie, composants de la paroi, mais aussi comme *osmoticum* s'accumulant dans les vacuoles. Nous avons donc analysé par PCR Quantitative l'expression de certains gènes impliqués dans l'hydrolyse de l'amidon, comme suggéré par notre analyse transcriptomique (Cf. Tableau 3). Si l'induction du gène codant une « α -glucan water dikinase » chloroplastique n'a pas pu être confirmée, la stimulation de l'accumulation des transcrits codant l' α -amylase a été validée dans les lignées embryogènes surexprimant *VvCEB1* (cf. article). Cet effet suggéré de *VvCEB1* sur l'hydrolyse de l'amidon corrobore les travaux de Kay *et al.* (2007), selon lesquels la surexpression du facteur de transcription bHLH UPA20 favorisant l'expansion cellulaire, provoque une baisse de la teneur en amidon.

III.4. Analyse de la concentration en sucres des suspensions cellulaires surexprimant *VvCEB1*

L'analyse transcriptomique décrite précédemment suggérait la régulation, par *VvCEB1*, de gènes impliqués dans le métabolisme des sucres. Nous avons donc étudié la teneur en sucres (glucose, fructose, saccharose et amidon) des cellules transgéniques surexprimant *VvCEB1*. Les résultats montrent que cette surexpression a un effet sensible sur l'accumulation des sucres (Tableau 1). En effet, alors que le fructose n'est pas détectable dans les cellules

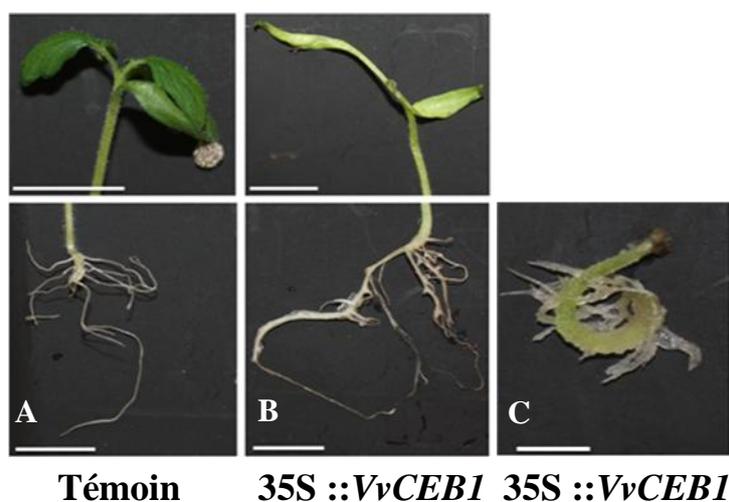


Figure 27. (A) et (B) Effet de la surexpression de *VvCEB1* sur le développement *in vitro* des plantules de Tomate. (C) Phénotype parmi les plus sévères observé sur le développement *in vitro* des plantules de Tomate surexprimant *VvCEB1*. (Échelle : 10 mm)

Nom	Numéro d'accession	Rapport (35S/Témoin)	Rapport (35S/Témoin) Homologue Vigne (cf. article, tableau 1 et 2)
<i>SIEXPA11</i>	AJ560646.1	255	1154
<i>SIXET2</i>	D16456.1	5	4
<i>SIPIN1</i>	AB508931.1	0,42	0.12
<i>SIPIN2</i>	AB508932.1	2,39	59
<i>SIIAA3</i>	AF022014.1	40	
<i>SIIAA7</i>	EF121545.1	36	
<i>SIIAA9</i>	AJ937282.1	0,51	0.41
<i>SIARF6</i>	HM594684.1	0,33	1,3
<i>SIARF9</i>	HM037250.1	0,41	0,76
<i>SIGH3</i>	EU543264.1	89	

Tableau 2. Comparaison par PCR Quantitative de l'accumulation des transcrits de gènes impliqués dans l'expansion cellulaire (*SIEXPA11* et *SIXET2*), l'homéostasie (*SIPIN*, *SIGH3*) et la signalisation (*SIIAA*, *SIARF*) de l'auxine entre les fruits de Tomate surexprimant *VvCEB1* (35S) et les fruits témoins, récoltés 30 j après anthèse.

témoins, il est détecté à un niveau significatif dans les lignées surexprimant *VvCEB1* (0,35 g/mg PS; Tableau 1). Les quantités de glucose et de saccharose sont également affectées, mais dans une moindre mesure. La surexpression de *VvCEB1* provoque une augmentation du contenu en saccharose de l'ordre de 44% et une diminution de la teneur en glucose de 30% (Tableau 1). Ce phénomène peut être le résultat d'une plus forte utilisation du glucose dans les processus métaboliques ou d'un clivage préférentiel du saccharose par la saccharose synthase dans les cellules de Vigne. Dans ce dernier cas, si le clivage du saccharose par les invertases permet l'obtention de taux identiques de glucose et fructose libre, son hydrolyse par la saccharose synthase conduit à l'accumulation de fructose libre uniquement (Hampp *et al.*, 1994; Filion *et al.*, 1999). Toutefois, dans le contexte du développement de la baie de raisin, il a été rapporté que l'activité de saccharose synthase reste faible au cours de la maturation (Hawker, 1969). L'accumulation des hexoses serait donc davantage due à l'activité des invertases et des transporteurs d'hexoses qui vont permettre leur compartimentation dans les vacuoles de la baie (Fillion *et al.*, 1999).

III.5. Analyses complémentaires des plants de Tomate surexprimant *VvCEB1*

Afin de poursuivre la caractérisation fonctionnelle de *VvCEB1* dans le contexte du développement du fruit charnu, des lignées de tomate (cv. WVA106) surexprimant *VvCEB1* ont été produites. Cette surexpression ectopique provoque des perturbations phénotypiques au niveau de la plante entière. Les altérations observées à la fois pour les lignées T0 et T1 semblent liées à l'homéostasie et la signalisation auxinique (cf. article). Les tests de germination ont révélé que peu de graines parvenaient à germer (cf. article). Les plantules résultant de cette germination présentent une croissance plus lente et une forte perturbation du développement. En effet, *in vitro*, les plantules 35S::*VvCEB1* présentent des hypocotyles plus courts, des cotylédons allongés ainsi que des racines de diamètre plus important (Figure 27 A et B). Dans les cas les plus sévères, nous avons noté que les cotylédons étaient absents et que les plantules présentaient des hypocotyles et des racines très courts et très larges (Figure 27 C).

L'expression des gènes codant des protéines liées à l'élongation cellulaire ainsi qu'au transport et à la signalisation de l'auxine a été analysée par PCR quantitative (Tableau 2). Dans les fruits T1 au stade MG (mature green, 30 j après anthèse), les transcrits des gènes impliqués dans l'expansion cellulaire (*SIEXPA11* et *SIXET2*) présentent, comme leur homologue de vigne (cf. article), une plus forte accumulation dans les fruits 35S::*VvCEB1*

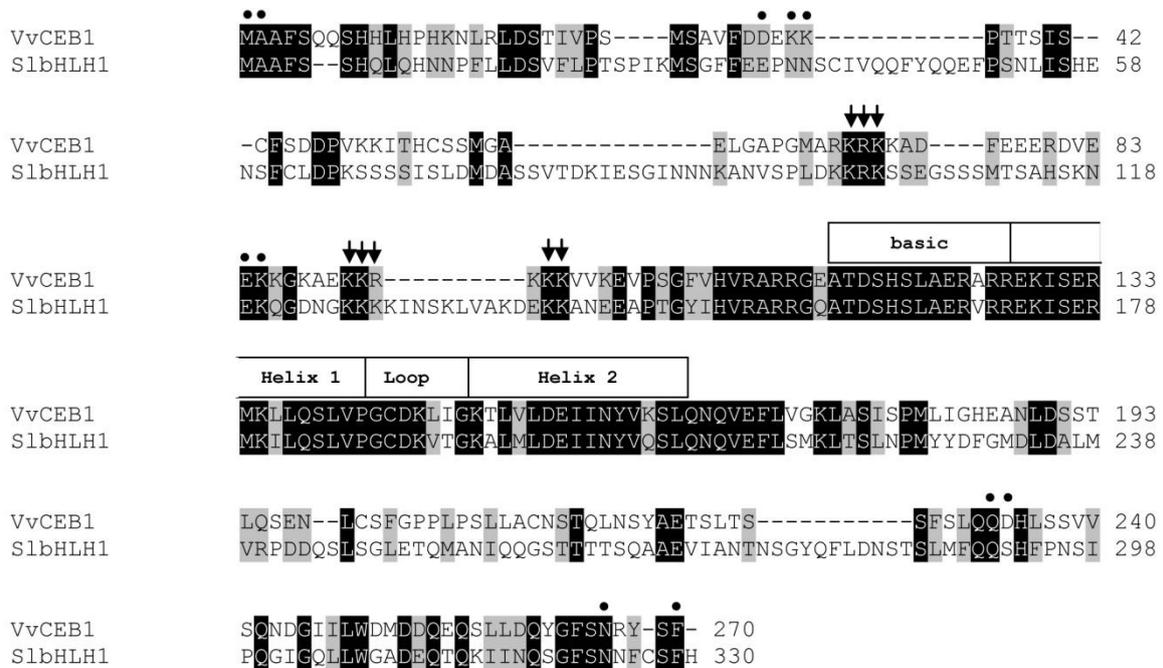


Figure 28. Aligement (ClustalW) des séquences protéiques de VvCEB1 et de son homologue SlbHLH1. Les acides aminés identiques sont surlignés en noir et les substitutions conservatives en gris. Les résidus basiques potentiellement impliqués dans le signal de localisation nucléaire sont indiqués par des flèches. Les domaines d'interactions protéiques potentiels conservés sont indiqués par des ronds noirs.

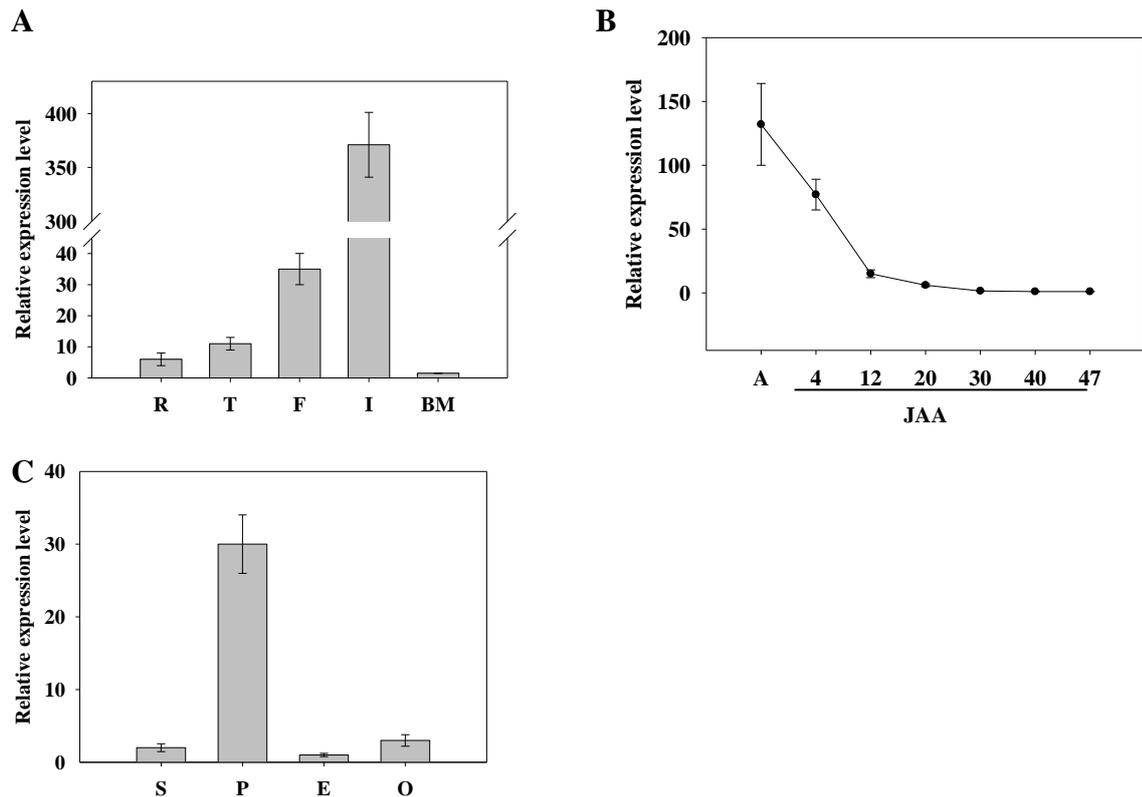


Figure 29. Analyse des profils d'expression de *SlbHLH1* par PCR quantitative: (A) dans différents organes de tomate (R, racines; T, tiges; F, feuilles; I, Fleurs à anthèse; BM, fruits mures), (B) au cours du développement du fruit (A, ovaire à l'anthèse; JAA, jours après anthèse) et (C) dans les différents tissus de la fleur à l'anthèse (S, sécales; P, pétales; E, étamines; O, ovaires). Les stades 40 j et 47 j correspondent respectivement aux stades « turning » et « fruit mûr ».

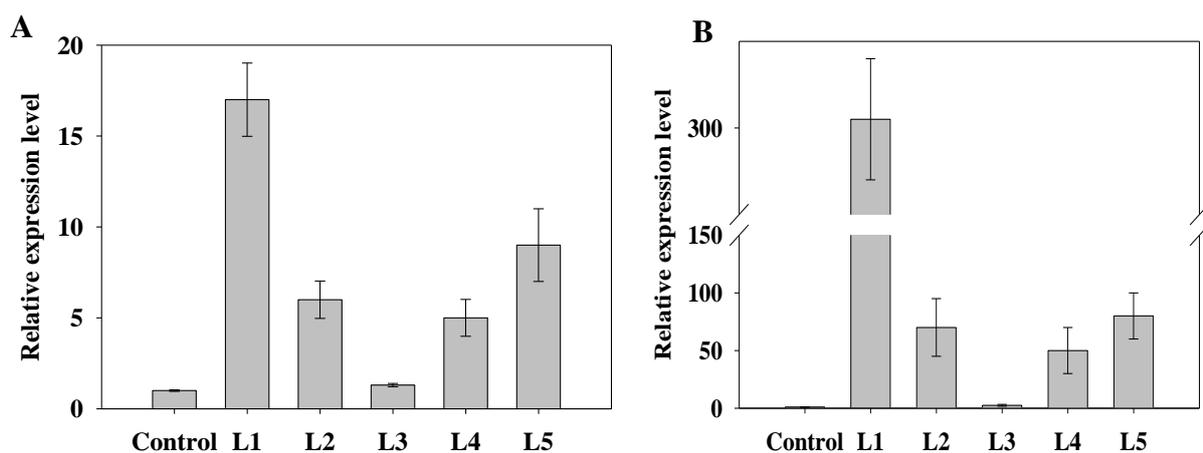


Figure 30. Analyse par PCR Quantitative de l'accumulation des transcrits *SlbHLH1* dans les lignées témoin et T1 35S::*SlbHLH1* (L1, L2, L3, L4 et L5), dans les feuilles (A) et les fruits collectés à 20 j après anthèse (B).

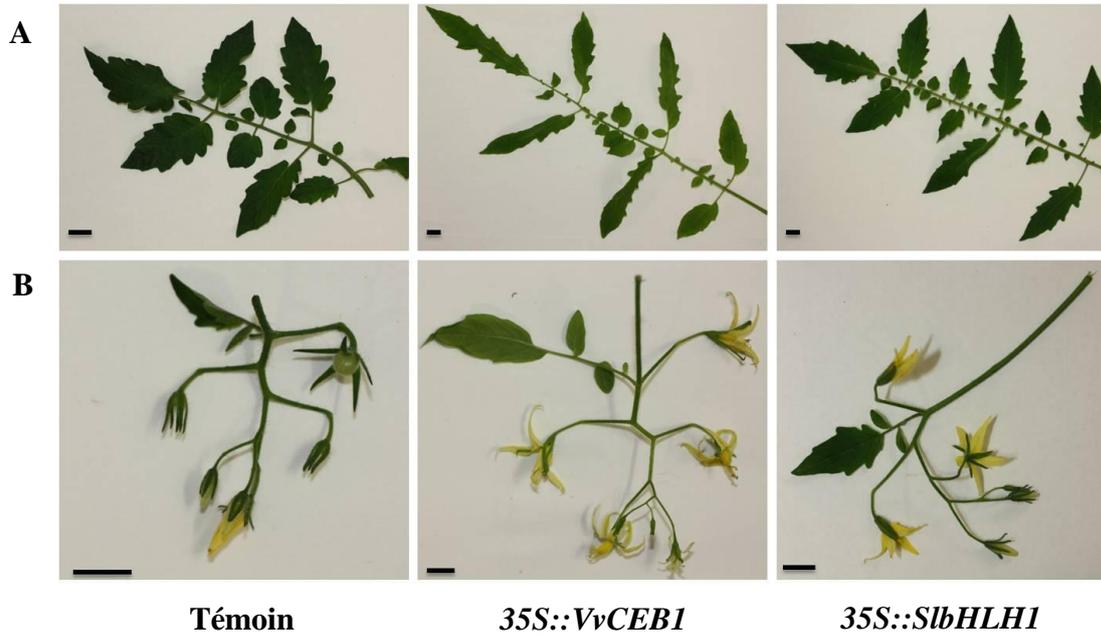


Figure 31. Comparaison du phénotype des feuilles (A) et des inflorescences (B) correspondant aux lignées témoins, 35S::VvCEB1 et 35S::SlbHLH1. Echelle = 10 mm



Figure 32. Comparaison de la taille et de la morphologie d'un fruit issu d'une lignée T1 surexprimant SlbHLH1 et d'une lignée témoin à 20 j après anthèse. Echelle = 5 mm

(Tableau 2). Les gènes impliqués dans le transport de l'auxine, *SIPIN1* (homologue de *VvPIN1*, cf. article) et *SIPIN2* (homologue de *VvPIN2*, cf. article) sont respectivement réprimés et induits dans les fruits 35S::*VvCEB1* (Tableau 2). Une *SIGH3*, dont l'homologue est connu pour être induit par l'auxine chez *Arabidopsis* (Nakazawa *et al.*, 2001), voit son expression fortement stimulée par la surexpression de *VvCEB1* (Tableau 2). Enfin, l'accumulation des transcrits *SIIAA* et *SIARF* est également modulée dans les fruits 35S::*VvCEB1* (Tableau 2).

III.6. Caractérisation fonctionnelle de l'homologue de *VvCEB1* chez la Tomate

Pour affiner la caractérisation fonctionnelle de *VvCEB1*, nous avons recherché son plus proche homologue chez la Tomate. Il correspond en partie à l'identifiant SGN-U583037 (<http://solgenomics.net>), celui-ci n'étant pas complet au niveau de sa région 3'. L'homologue de *VvCEB1* chez la Tomate code une protéine de 330 aa que nous avons nommée *SlbHLH1* (Figure 28). *VvCEB1* présente 45 % d'homologie en aa avec *SlbHLH1*. Le domaine bHLH ainsi que le signal de localisation nucléaire sont extrêmement conservés entre ces 2 protéines, comme le début et la fin des régions N- et C-terminales (Figure 28). Parmi les différences observées entre ces deux séquences, il faut noter que la région N-terminale du domaine bHLH de *SlbHLH1* comprend de nombreux aa supplémentaires par rapport à la séquence de *VvCEB1* (Figure 28). Le profil d'expression de *SlbHLH1* a été analysé dans différents organes de Tomate (cv. WVA106) et au cours du développement du fruit (Figure 29). *SlbHLH1* est majoritairement exprimé dans les fleurs (Relative Expression Level, REL \approx 370, plus particulièrement dans les pétales) mais aussi dans les feuilles (REL \approx 35), et beaucoup moins dans les tiges (REL \approx 10) et les racines (REL \approx 5) (Figure 29 A et C). Dans le fruit, son expression diminue au cours du développement, puisqu'elle passe de REL \approx 140 après anthèse, à REL \approx 1 dans les fruits mûrs (Figure 29 B).

Cinq lignées T1 de Tomate (cv. WVA106) sur-exprimant *SlbHLH1* (35S::*SlbHLH1*) ont été produites. L'expression de *SlbHLH1* dans les feuilles et les fruits de ces lignées transgéniques, a été suivie par PCR Quantitative (Figure 30). Les données présentées ci-après correspondent à la lignée L1 qui présente le plus fort niveau de surexpression pour *SlbHLH1* (Figure 30). Sur le plan végétatif, les lignées 35S::*SlbHLH1* sont beaucoup moins affectées que les lignées 35S::*VvCEB1*. Toutefois, comme pour les lignées 35S::*VvCEB1*, les feuilles sont plus allongées et présentent de petites folioles surnuméraires par comparaison aux plantes contrôles (Figure 31 A). Même si le phénotype floral n'est pas aussi marqué que pour

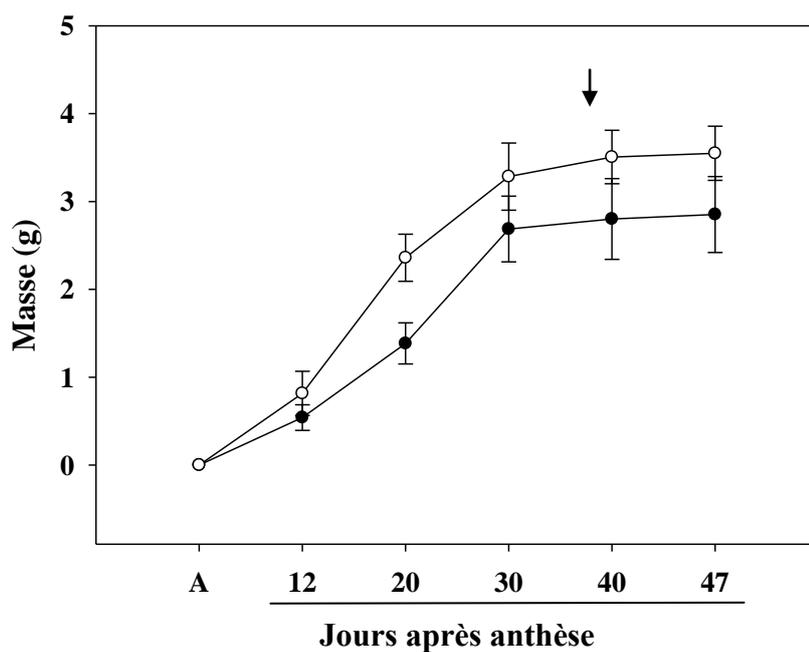


Figure 33. Evolution de la masse des fruits des lignées T1 35S::*SlbHLH1* (cercle blanc) et témoin (cercle noir) au cours du développement (A : Anthèse). La flèche indique le stade turning.

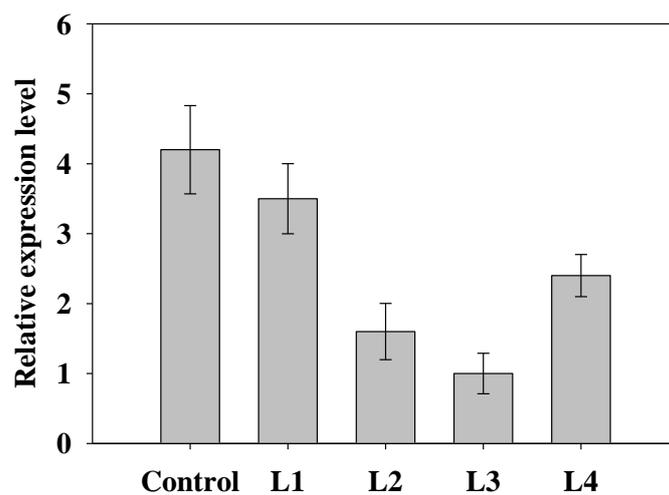


Figure 34. Analyse par PCR Quantitative de l'accumulation des transcrits *SlbHLH1* dans les feuilles des lignées témoins et T0 *SlbHLH1* RNAi (L1, L2, L3 et L4).

les lignées 35S::*VvCEB1*, les inflorescences des lignées 35S::*SibHLH1* ont une taille plus importante que celles des plantes témoins (Figure 31 B). Les fruits sont sensiblement plus gros et présentent parfois un aspect légèrement plus ovale ainsi qu'une columelle plus développée que les fruits témoins (Figure 32). Le suivi de l'évolution de la masse des fruits au cours du développement révèle que les fruits 35S::*SibHLH1* grossissent plus rapidement que les fruits témoins. La différence de masse entre les deux lignées est accentuée entre les jours 10 et 30 après anthèse (Figure 33). Cette période correspond à la phase d'expansion cellulaire du fruit (Gillaspy *et al.*, 1993). Ainsi, 20 j après anthèse, les lignées 35S::*SibHLH1* présentent des fruits de masse 60% supérieure à celle des fruits témoins (Figure 33). L'analyse plus fine de ces modifications et plus particulièrement de l'effet de la surexpression de *SibHLH1* sur le nombre et la taille des cellules du fruit est en cours.

Parallèlement aux lignées surexpresses, 4 lignées RNAi sous-exprimant *SibHLH1* ont été produites. L'accumulation des transcrits *SibHLH1* a été mesurée, au niveau des feuilles de ces 4 lignées, par PCR Quantitative (Figure 34). Les lignées L2 et L3 qui semblent sous-exprimer le plus fortement *SibHLH1* sont en cours de caractérisation. Les premiers résultats obtenus (générations T0) suggèrent que la sous-expression de *SibHLH1* réduirait la taille du fruit (Figure 35). En revanche, le phénotype végétatif de la plante et la forme du fruit ne semblent pas affectés dans ces lignées RNAi.

III.7. Variabilité génétique de *VvCEB1* au sein du genre *Vitis* - Etude préliminaire

En complément de l'étude de l'expression de *VvCEB1* dans différents cépages de l'espèce *vinifera* et dans différentes espèces du genre *Vitis* (cf. article), une analyse préliminaire de la variabilité génétique de *VvCEB1* dans le genre *Vitis* a été entamée. Pour cette analyse, des vignes produisant des baies de grandes (*V.candicans* et *V.labrusca*) ou petites tailles (*V.cinerea*, *V.berlandieri* et *V.rubra*) ont été sélectionnées. Leur ADNg a été isolé puis séquencé. La présence d'introns de grande taille dans le domaine conservé bHLH nous a conduit à limiter notre étude à la portion N-terminale de *CEB1* (aa 1 à 142). Les séquences protéiques déduites de ce séquençage partiel ont été comparées (Figure 36). Les résultats révèlent chez certaines des espèces étudiées des variabilités dans la partie N-terminale la protéine. En effet, les 2 espèces « à grosses baies » présentent une substitution de l'alanine (A) en position 68 par une valine (V) (Figure 36). Ces aa sont tous deux apolaires et aliphatiques : la substitution ne devrait donc pas affecter l'activité de la protéine. Chez les

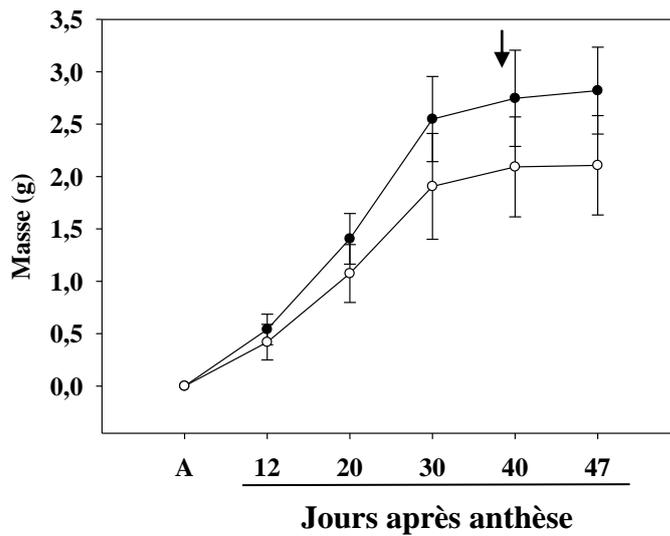


Figure 35. Evolution de la masse des fruits de lignées T0 *SlbHLH1* RNAi (cercle blanc) et contrôle (cercle noir) au cours du développement (A : Anthèse). La flèche indique le stade « turning ».

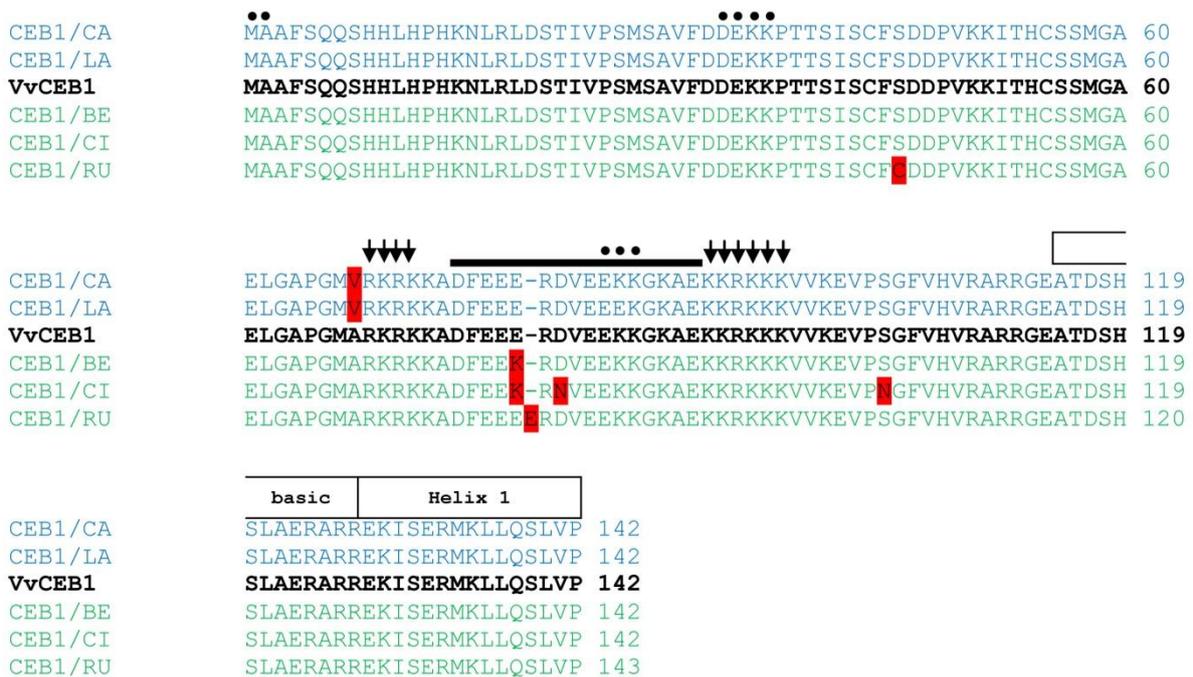


Figure 36. Alignement de la portion N-terminale des séquences protéiques de CEB1 provenant de différentes espèces du genre *Vitis*. La comparaison a été réalisée à partir d'espèces possédant de grosses baies (couleur bleue) (CA, *V.candicans* et LA, *V.mabrusca*) et de petites baies (couleur verte) (BE, *V.berlandieri*; CI, *V.cinerea*; RU, *V.rubra*). Les résidus basiques potentiellement impliqués dans le signal de localisation nucléaire sont indiqués par des flèches. Les domaines d'interactions protéiques potentiels et le domaine riche en aa acides sont indiqués respectivement par des ronds et un trait noir épais.

espèces « à petites baies », nous avons souvent observé une variation dans le domaine riche en aa acides. En effet, les espèces *V.berlandieri* et *V.cinerea* présentent une substitution de l'acide glutamique (E) en position 79 par une lysine (K) (Figure 36). L'espèce *V.cinerea* présente une substitution supplémentaire : l'acide aspartique (D) en position 81 par l'asparagine (N) (Figure 36). Par ailleurs, l'espèce *V.rubra*, qui possède la particularité de n'avoir qu'un seul gros pépin et quasiment aucune pulpe, contient un aa supplémentaire au niveau du domaine riche en aa acides : l'acide glutamique (E) en position 80 (Figure 36). Le domaine riche en aa acides étant primordial à l'activité de la protéine (Ptashne, 1988; Sigler, 1988; Estruch *et al.*, 1994; Pattanaik *et al.*, 2008), nous pouvons supposer que la substitution d'un aa acide par un aa basique ou encore la présence d'un aa supplémentaire pourrait avoir des conséquences sur l'activité de la protéine.

III.8. Expériences d'agroinfiltration sur baies de raisin

Des expériences d'agroinfiltration de baies de raisin issues de boutures fructifères (cv. cabernet sauvignon) ont été tentées au cours de ma thèse. Cette technique, dont l'efficacité a été mise en évidence chez le Fraisier (Hoffmann *et al.*, 2006; Griesser *et al.*, 2008), a été adaptée à la Vigne au laboratoire (D. Lecourieux et R. Fouquet).

Le premier essai a été réalisé en 2009 avec une construction permettant la surexpression de *VvCEB1* et une construction témoin (vecteur vide). Les baies ont été agroinfiltrées à 35 JAA et 60 JAA (jours après anthèse) (Figure 37 A et B). Trente baies issues de 3 boutures fructifères différentes ont été agroinfiltrées 3 fois à 1 jour d'intervalle pour chaque construction, puis le diamètre de chaque baie a été mesuré individuellement tout les 5 j à compter de la première agroinfiltration. Lorsque les baies ont été agroinfiltrées juste avant la véraison (60 JAA), aucune différence significative n'a été observée entre les constructions 35S::*VvCEB1* et témoin (Figure 37 A). En revanche, lorsque l'agroinfiltration a eu lieu à 35 JAA (fin de la phase de croissance herbacée), les baies agroinfiltrées avec la construction 35S::*VvCEB1* présentent dès la phase de plateau herbacée un diamètre légèrement supérieur par rapport au contrôle (Figure 37 B). Aucune augmentation de cette différence n'a été observée lors de la 2^{ème} phase de croissance. D'autre part, lorsque l'agroinfiltration a eu lieu à 35 JAA, un retard d'environ 10 j a été remarqué dans le déclenchement de la véraison, indépendamment des constructions utilisées (Fig. 37 B, C et D).

Cette expérience a été répétée en 2010, avec 3 constructions : une construction permettant la surexpression de *VvCEB1* (Figure 37 C), une construction RNAi permettant

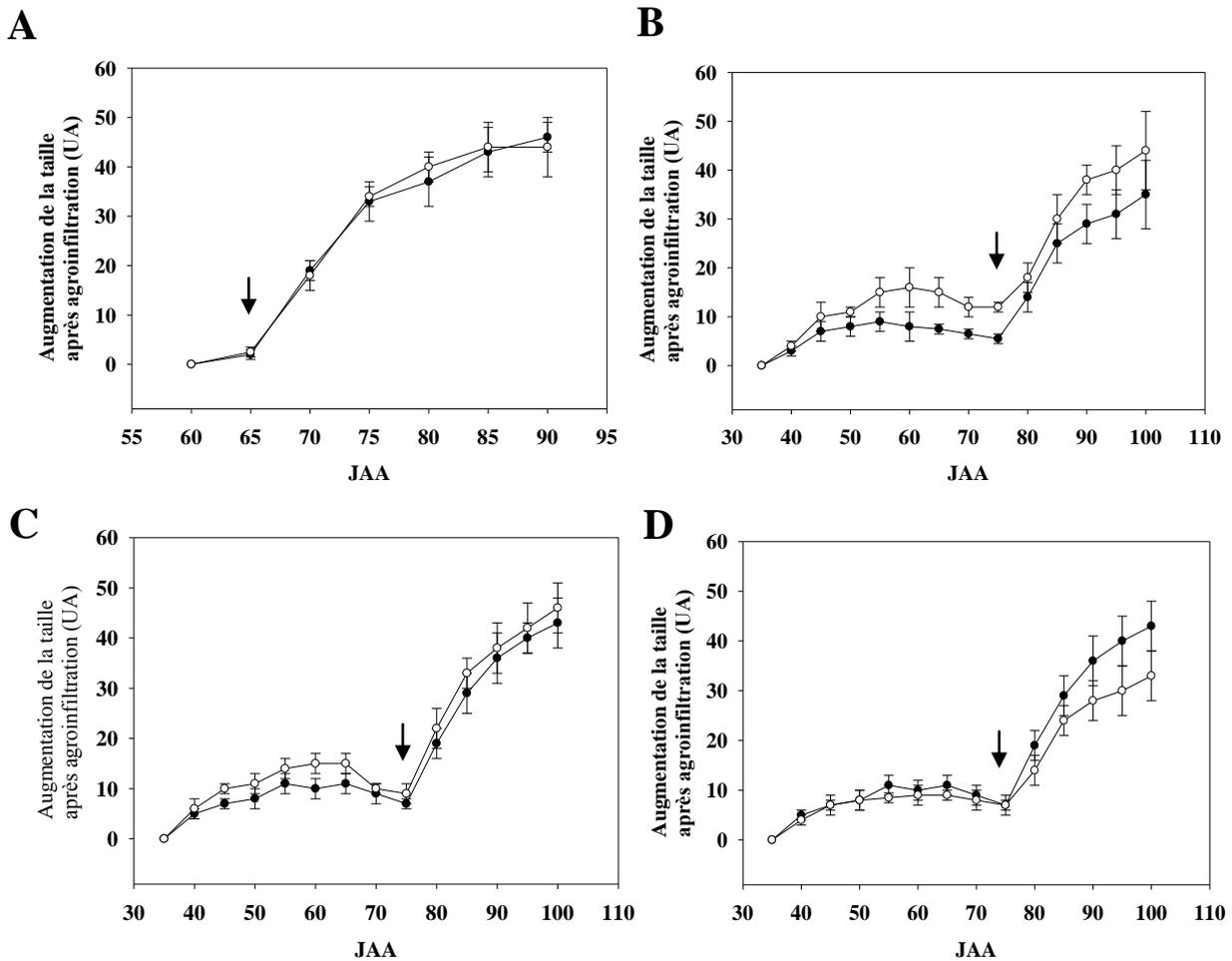


Figure 37. Evolution de la taille de baies de raisin issues de boutures fructifères (*Vitis vinifera* cv. cabernet sauvignon) après agroinfiltration par des constructions permettant la surexpression de *VvCEBI* (construction 35S::*VvCEBI*) (A, B, C) ou sa sous-expression (construction RNAi) (D). L'effet de la sur- ou sous-expression de *VvCEBI* est indiqué par des cercles blancs. L'effet de l'agroinfiltration avec le vecteur vide (témoin) est indiqué par des cercles noirs. La flèche représente le déclenchement de la véraison.

une diminution de l'expression de *VvCEB1* (Figure 37 D) et une construction témoin. L'ensemble des baies a été agroinfiltré à 35 JAA. L'agroinfiltration a été réalisée en suivant le même protocole que celui décrit précédemment. Les baies agroinfiltrées avec la construction 35S::*VvCEB1* ont une taille légèrement supérieure au témoin, mais dans des proportions moindres que ce qui a été observé en 2009 (Figure 37 C). L'agroinfiltration par la construction RNAi::*VvCEB1* semble associée, après véraison, à une diminution du diamètre de la baie par rapport au témoin (Figure 37 D).

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude restent préliminaires, la technique d'agroinfiltration des baies de raisin devant encore être améliorée. En effet, l'analyse de l'expression de construction « promoteur 35S :: GUS » a révélé que l'intégration de la construction dans la baie n'est pas homogène (Figure 38). De plus, l'analyse de l'expression de *VvCEB1* par PCR Quantitative 25 j après véraison ne montre pas de différence significative par rapport au témoin, que ce soit pour la construction 35S ou RNAi. Ce résultat pourrait être la conséquence de la très forte expression de *VvCEB1* endogène qui masquerait l'effet de la construction 35S. Concernant la construction RNAi, des expériences similaires réalisées chez le Fraisier montrent que dans les fruits récoltés 14 j après agroinfiltration, il n'est plus possible de détecter de diminution de l'accumulation des transcrits (Tisza *et al.*, 2010). Ces auteurs suggèrent que la fonction du gène peut être restaurée plusieurs jours après agroinfiltration.

III.9. Recherche des partenaires de *VvCEB1*- double hybride dans la levure

D'après les données de la littérature, les FT de type bHLH sont connus pour agir au sein de complexes protéiques, notamment avec des protéines MYB (Ramsey et Glover, 2005; Feller *et al.*, 2011). Le domaine d'interaction avec les protéines MYB est généralement situé en N-terminal (Pattanaik *et al.*, 2008). Dans le but d'identifier des protéines capables d'interagir *in vivo* avec *VvCEB1*, un crible double hybride chez la levure a été réalisé à l'aide d'une banque d'ADNc exprimés à la véraison. *VvCEB1* présentant une autoactivité quand il est exprimé dans la levure, nous avons produit des formes tronquées de *VvCEB1* : portions N-terminale et C-terminale auxquelles le domaine d'activation supposé de la transcription (domaine riche en aa acides) a été retiré (Figure 39) (Ptashne, 1988; Sigler, 1988; Estruch *et al.*, 1994; Pattanaik *et al.*, 2008). Seule la portion N-term (aa 1 à 74) a été conservée et

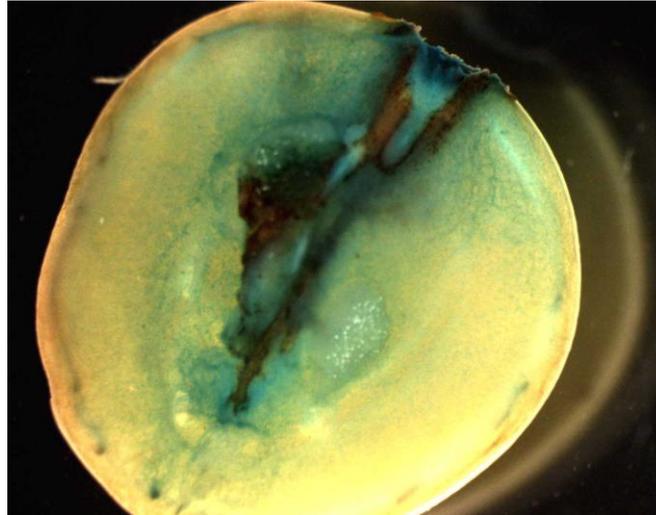


Figure 38. Coupe longitudinale, après coloration GUS, de baies de raisins agroinfiltrées avec la construction « promoteur 35S :: GUS ». Les baies ont été récoltées 20 jours après agroinfiltration.

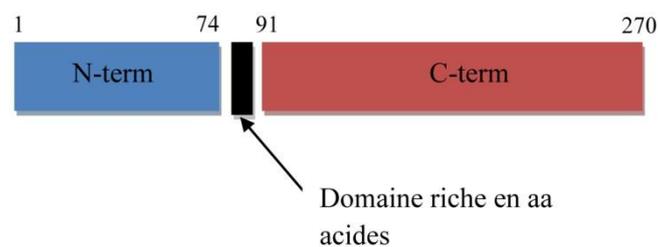


Figure 39. Représentation schématique des 2 parties (N-terminale et C-terminale) de VvCEB1 choisies pour le crible double hybride.

utilisée comme « appât » pour le crible double hybride, la portion C-terminale (aa 91 à 270) présentant encore une légère autoactivité.

Parmi les différents 40 clones isolés, une dizaine seulement ont pu être séquencés et identifiés, avec parmi eux : une expansine, une protéine GRIPP22 (kiwellin) (Davies et Robinson, 2000; Tuppo *et al.*, 2008), un U2 SnRNP auxiliary factor (épissage) (Forch *et al.*, 2003), une disulfid isomerase, deux FT de la famille zinc finger, une ASR (VvASR3, ABA Stress Ripening), un FT de la famille AUX/IAA (VvAUX/IAA16), un facteur d'initiation de la traduction et une protéine nucléaire de fonction inconnue. Parmi ces protéines, quatre nous paraissent particulièrement intéressantes car elles sont connues pour interagir au sein de complexe protéiques. Il s'agit des protéines : disulfide isomerase, zinc finger, ASR et AUX/IAA.

Les « disulfide isomérase » sont des enzymes localisées au niveau du réticulum endoplasmique. Elles interviennent notamment dans la stabilisation des interactions entre protéines et favorisent chez les animaux la formation de dimères entre les protéines de la famille bHLH (Benezra, 1994; Markus et Benezra, 1999). Chez les plantes, deux études récentes ont montré que les disulfide isomérases sont capables d'interagir avec le facteur de transcription bHLH MEE8 d'*Arabidopsis* (Cho *et al.*, 2011) ou avec le transporteur SUT1 de la pomme de terre (Krugel *et al.*, 2011).

Les facteurs de transcription de la famille zinc finger sont connus pour être impliqués dans la réponse au stress, mais également dans la régulation du développement des organes végétatifs et reproducteurs, en contrôlant notamment la division et l'expansion cellulaires (Takatsuji, 1999; Hu et Ma, 2006). Chez les animaux, au moins une étude mentionne l'interaction protéique bHLH/zinc finger et suggère que cette interaction affecte leur stabilité respective et leur dégradation par le protéasome 26S (Adhikary *et al.*, 2005).

Les protéines ASR sont des facteurs de transcription induits au cours de la maturation ou en réponse à l'ABA et au stress (Iusem *et al.*, 1993; Gilad *et al.*, 1997; Jeanneau *et al.*, 2002). Chez la Vigne, une protéine ASR, appelée VvMSA, a été caractérisée. VvMSA est impliquée dans la régulation transcriptionnelle du transporteur d'hexose VvHT1 (Cakir *et al.*, 2003). Plus récemment, une approche double hybride a montré que VvMSA pouvait interagir avec un facteur de transcription de type AP2-ERF (Saumonneau *et al.*, 2008).

Enfin, l'interaction de VvCEB1 avec un membre de la signalisation auxinique (AUX/IAA) est intéressante car elle confirmerait l'hypothèse selon laquelle VvCEB1 interviendrait dans la signalisation et la régulation de cette hormone. Une telle interaction a d'ailleurs récemment été démontrée chez *Arabidopsis* par Varaud *et al.* (2011). En effet, les

auteurs ont montré l'importance de l'interaction entre le FT bHLH BPEp et ARF8 dans la croissance des pétales.

Les interactions avec toutes ces protéines devront être validées par des tests d'interaction *in vivo*. Dans ce contexte, *VvAUX/IAA16* a été cloné afin de réaliser des expériences de BIFC (Bimolecular fluorescence complementation).

IV. Discussion/Conclusions

VvCEB1 est un facteur de transcription exprimé quasi exclusivement dans le raisin, ce qui suggère un rôle majeur de cette protéine dans les processus de développement et/ou de maturation du fruit. Les résultats collectés au cours de ma thèse suggèrent fortement un rôle de ce FT dans l'expansion cellulaire *via* une action sur l'homéostasie et/ou la signalisation auxinique. La surexpression de *VvCEB1* dans des embryons de Vigne et des plants de Tomate ont conduit à des modifications phénotypiques très marquées au niveau de la morphologie et du développement. Dans la littérature, l'auxine est connue pour son implication dans les processus de croissance et de développement des plantes. Par exemple, elle intervient dans la mise en place de l'embryon (Vanneste et Friml, 2009) et des organes de la plante (Heisler *et al.*, 2005; Scarpella *et al.*, 2006; Swarup *et al.*, 2008; Peret *et al.*, 2009). De nombreux travaux rapportent qu'une modification de l'homéostasie et/ou de la signalisation de l'auxine chez *Arabidopsis* sont responsables de perturbations développementales telles que la croissance de l'hypocotyle (Nakazawa *et al.*, 2001; Takase *et al.*, 2004), la croissance racinaire (Khan et Stone, 2007) et la morphologie des feuilles (Zhang *et al.*, 2007). De nombreux aspects de ces processus développementaux dépendent des multiples contrôles exercés par l'auxine sur la division et l'expansion cellulaire (Liscum et Reed 2002; Mockaitis et Estelle 2008; Perrot-Rechenmann *et al.*, 2010). Par exemple, l'auxine contrôle l'enchaînement des processus de division et d'élongation cellulaire lors du développement de l'embryon (Vieten *et al.*, 2005) et du fruit (Gillaspy *et al.*, 1993). Si dans nos travaux les fruits de tomate surexprimant *VvCEB1* ont une taille inférieure aux fruits témoins, la surexpression de son homologue *SibHLLH1* semble être positivement corrélée à l'augmentation de la taille du fruit. De même, l'exploitation d'individus provenant de différentes espèces du genre *Vitis* ou de différents cépages du genre *vinifera* suggère une corrélation positive entre le niveau d'expression de *VvCEB1* et la taille de la baie. La taille inférieure des fruits issus des plantes *35S:VvCEB1* peut être le résultat d'une modification de l'homéostasie auxinique généralisée à la plante entière et aboutissant à une mise en place du fruit perturbée. De manière intéressante, les fruits induits par l'application d'auxine exogène sur l'ovaire (Nitsch, 1970; Bunger-Kibler et

Bangerth, 1983; Serrani *et al.*, 2007) possèdent une taille inférieure et un nombre de graines réduit par rapport aux fruits témoins. D'autre part, la surexpression de *VvCEB1* se traduit par l'augmentation de la taille des cellules, que ce soit chez la Tomate ou dans les embryons de Vigne. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse d'un rôle pour *VvCEB1* dans l'expansion cellulaire. L'analyse de la taille des cellules dans les fruits sur- et sous-exprimant son homologue *SibHLLH1* devrait permettre d'infirmer ou confirmer cette hypothèse.

Les études transcriptomiques réalisées à partir des embryons de Vigne et des fruits de Tomate surexprimant *VvCEB1* sont en accord avec les observations phénotypiques suggérant une perturbation de l'homéostasie et de la signalisation auxinique. L'effet de *VvCEB1* sur l'expansion cellulaire est conforté par son effet stimulateur sur l'expression de gènes impliqués dans ce processus dont *EXPA11*. Ce gène est particulièrement intéressant du fait de la forte accumulation de ses transcrits dans les lignées 35S::*VvCEB1* et de ses profils d'expression lors du développement de la baie et dans les différents organes de vigne. En effet, ces profils sont très proches de ceux obtenus pour *VvCEB1*. Parmi les gènes associés à l'homéostasie de l'auxine affectés dans les surexprimeurs *VvCEB1*, des gènes codant des transporteurs d'auxine ont été identifiés. Ainsi, le transporteur d'efflux *VvPIN1* ainsi que deux de ses proches homologues (*VvPIN1.2* et *VvPIN7*), sont réprimés par la surexpression de *VvCEB1*, aussi bien chez la Tomate que la Vigne. A l'inverse, *VvPIN2* est fortement induit dans les mêmes conditions, notamment chez la Vigne. La perturbation du transport polarisé de l'auxine qui conduit à une altération des « *minima* » et « *maxima* » d'auxine au sein du tissu (Wisniewska *et al.*, 2006), peut expliquer les bouleversements observés sur la morphologie des fruits et des embryons. D'autre part, les travaux de Lemaire-Chamley *et al.* (2005) et plus récemment ceux de Nischio *et al.* (2010) suggèrent l'implication de ces 2 transporteurs dans le développement du fruit de tomate. Selon le modèle proposé par Nischio *et al.* (2010), *SIPIN2* qui est exprimé très majoritairement dans les graines, favoriserait l'exportation de l'auxine de son lieu de production vers les parties les plus externes du fruit. *SIPIN1* régulerait, pour sa part, le transport polarisé de l'auxine dans l'ensemble du fruit. Chez la Vigne, *VvPIN2* est également exprimé majoritairement dans les graines et son expression augmente jusqu'à la véraison. A l'opposé, l'expression de *VvPIN1* diminue rapidement au cours du développement de la baie. D'autre part, dans les embryons de Vigne l'expression de *VvGH3-2* est significativement induite. Ce résultat est particulièrement intéressant car l'enzyme correspondante est connue pour réguler les trop fortes concentrations en auxine dans les cellules (Delker *et al.*, 2008). De plus, des travaux récents ont montré qu'un traitement AIA juste avant véraison stimule l'expression de *VvGH3-2* parallèlement à une augmentation de

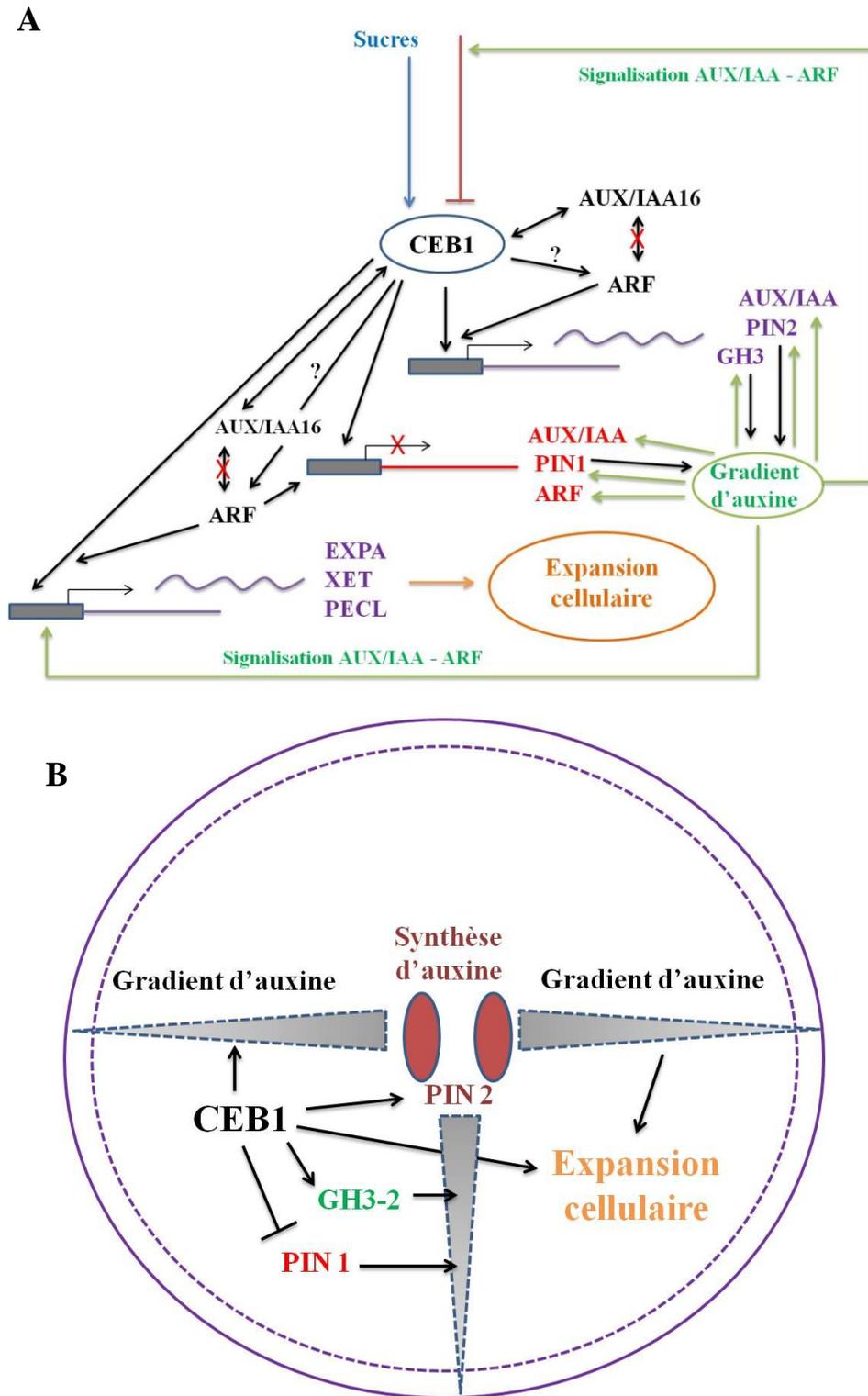


Figure 40. Schéma hypothétique du mode d'action de VvCEB1 lors du développement de la baie de raisin. (A) Représentation hypothétique détaillée du mode d'action de VvCEB1 sur la signalisation auxinique et l'expansion cellulaire. (B) Représentation hypothétique globale de l'effet de VvCEB1 dans la baie de raisin. Les lignes noires représentent les actions directes ou indirectes de VvCEB1.

la teneur en AIA-Asp et à une diminution de l'AIA libre dans la baie de raisin (Bottcher *et al.*, 2011). La surexpression de *VvCEB1* affecte également l'expression de gènes de la signalisation auxinique tels que les AUX/IAA et les ARF. Chez la Tomate, la signalisation auxinique impliquant le complexe AUX/IAA-ARFs intervient lors de la mise en place du fruit (Goetz *et al.*, 2007; de Jong *et al.*, 2009). Les ARF et les AUX/IAA sont induits dans les ovaires fécondés ou dans les ovaires non fécondés traités par l'auxine (Serrani *et al.*, 2008; Vriezen *et al.*, 2008). De plus, la sous-expression de *SIIAA9* provoque la formation de fruits parthénocarpiques et une hypersensibilité à l'auxine (Wang *et al.*, 2005).

Enfin, les gibbérellines sont aussi connues pour réguler, en lien avec l'auxine, l'expansion cellulaire au cours du développement du fruit (Serrani *et al.*, 2010). Nous avons analysé l'expression de 3 gènes de Vigne codant des protéines DELLA, régulateurs clef de la signalisation par les gibbérellines. Nos résultats montrent que l'expression de ces 3 gènes n'est pas modulée dans les embryons surexprimant *VvCEB1*.

Ce travail nous a conduit à proposer un schéma hypothétique du mode d'action de *VvCEB1* sur l'expansion cellulaire médiée par l'auxine (Figure 40 A et B). Selon ce modèle, *VvCEB1* pourrait agir directement ou indirectement sur l'expression de gènes de réponse à l'auxine (homéostasie, signalisation, expansion). Une action indirecte sur l'expression de gènes de réponse à l'auxine pourrait, par exemple, faire intervenir une interaction entre *VvCEB1* et les facteurs AUX/IAA (AUX/IAA16 ?). Cette interaction permettrait en retour aux facteurs ARF de réguler les gènes de réponse à l'auxine (PIN, GH3..). Cela aurait pour conséquence la modulation des gradients d'auxine au cours du développement du fruit et affecterait les processus d'expansion cellulaire. L'action inhibitrice de l'auxine sur l'expression de *VvCEB1* pourrait servir de rétrocontrôle négatif afin de réguler finement la réponse à l'auxine. Dans un contexte "développement du fruit", nous pouvons imaginer que l'auxine produite dans les graines dans la partie centrale du fruit pourrait être exportée vers les tissus plus externes par *VvPIN2*, dont l'expression est stimulée par *VvCEB1*. Dans les cellules du péricarpe, l'action de *VvCEB1* sur l'expression de *VvPIN1* et *VvGH3-2* notamment permettrait de réguler finement le gradient d'auxine et la mise en place des processus d'expansion cellulaire. Dans la littérature, il a déjà été démontré chez *Arabidopsis* que le facteur de transcription bHLH INDEHISCENT intervient dans la diminution de la concentration en auxine qui conduit aux *minima* d'auxine nécessaires au bon développement du fruit (Liljegren *et al.*, 2004).

Tableau 3. Tableau regroupant les gènes dont l'expression est induite plus de 2 fois dans les cellules embryogènes de Vigne (41B) surexprimant *VvCEB1* par rapport au témoin lors de l'analyse microarray. Les séquences des sondes ADN spottedées sur les lames microarray correspondant aux identifiants indiqués ci-dessous sont regroupées à la fin de ce manuscrit (Annexe 8).

Identifiants	Nom	Rapport (35S/témoin)
Vv_10006996 CB919876	Epoxide hydrolase-like protein - Arabidopsis thaliana, partial (22%)	3,868
Vv_10010496 TC62705	Type 2 DNA topoisomerase 6 subunit B	3,803
Vv_10011235 CD008579	Flavonol 3-O-glucosyltransferase 2, partial (41%)	3,392
Vv_10014434 TC62705	no annotation	3,237
Vv_10013024 CA818675	no annotation	3,018
Vv_10012306 TC70979	no annotation	2,979
Vv_10010936 CB009672	<i>VvCEB1</i>	2,971
Vv_10006114 CB342343	Peroxiredoxin Q (<i>Sedum lineare</i>), partial (25%)	2,908
Vv_10000122	no annotation	2,887
Vv_10012011 TC64418	IDA (INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION) (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (30%)	2,754
Vv_10013406 TC53577	EIN3-binding F-box protein 2, partial (60%)	2,745
Vv_10008748 TC52194	Dehydration-responsive element binding protein 3, partial (69%)	2,699
Vv_10003330 TC56392	Predicted protein, partial (10%)	2,568
Vv_10013879 TC67231	VRP1-1, VRP1-2, and VRP1-3 genes, complete cds	2,554
Vv_10008966 TC53577	EIN3-binding F-box protein 2, partial (60%)	2,546
Vv_10010907 TC66566	Nam-like protein 11, partial (16%)	2,497
Vv_10013601 TC68081	UDP-glucosyl transferase family protein (AT5G12890) mRNA, complete cds	2,455
Vv_10012991	no annotation	2,394

Tableau 3. (suite)

Vv_10011499 TC61515	Senescence-inducible chloroplast stay-green protein 2, partial (65%)	2,392
Vv_10007437 CB978247	Cellulose synthase-like protein OsCs1E2 { <i>Oryza sativa</i> }, partial (14%)	2,383
Vv_10000432 TC56249	Pit2 protein, partial	2,368
Vv_10000945 TC62494	Chloroplast alpha-glucan water dikinase isoform 3, partial (44%)	2,348
Vv_10012586	RCD1, partial	2,342
Vv_10014525 TC64558	Glycine max putative plastid glucose 6 phosphate/phosphate translocator	2,323
Vv_10012906 TC63394	no annotation	2,303
Vv_10005630	Glucosyl transferase, partial	2,295
Vv_10011367	no annotation	2,283
Vv_10000089 TC55331	Flavonol 3-O-glucosyltransferase 6 partial (33%)	2,279
Vv_10001607	no annotation	2,276
Vv_10011568 TC64392	Inner membrane protein oxaA (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	2,259
Vv_10010855	Vitis vinifera mRNA for putative proline-rich cell wall protein, partial (grip13)	2,253
Vv_10005507 CA808131	DNA-binding protein WRKY3, partial (34%)	2,252
Vv_10000425 TC62965	Expansin, complete	2,23
Vv_10001454 TC67368	Oxidoreductase, partial (94%)	2,228
Vv_10011466 TC62494	Chloroplast alpha-glucan water dikinase isoform 3, partial (44%)	2,225
Vv_10004770	Basic endochitinase precursor	2,214
Vv_10008701 TC55088	Polygalacturonase inhibitor-like protein, partial (94%)	2,21
Vv_10007413	Ankyrin-like protein (<i>Solanum tuberosum</i>)	2,192
Vv_10000081 TC59175	Maturase (Fragment), complete	2,19
Vv_10001290 TC65383	<i>Oryza sativa</i> precursor microRNA 159a gene, complete sequence	2,183
Vv_10006351 CB346558	Early light-induced protein-like protein (<i>Retama raetam</i>), partial (59%)	2,179
Vv_10012330	Ankyrin-like protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	2,178

Tableau 3. (suite)

Vv_10004196	Hypersensitive reaction associated Ca ²⁺ -binding protein, partial (16%)	2,177
Vv_10005900	Beta-1 3-glucanase (<i>Vitis vinifera</i>), partial (27%)	2,173
Vv_10000483 TC53320	NtPRp27, partial (83%)	2,171
Vv_10014343 TC52637	Serine/threonine phosphatase, family 2C	2,169
Vv_10003056 TC57339	Fructokinase-like protein, partial (51%)	2,167
Vv_10006834 CB916093	ABC-transporter (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (5%)	2,165
Vv_10004898 TC66580	WRKY54, partial (47%)	2,163
Vv_10008745 TC62793	Anionic peroxidase precursor, partial (85%)	2,16
Vv_10011523 TC69549	WAK-like kinase, partial (15%)	2,158
Vv_10012564 TC52576	Weakly similar to SRO1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (5%)	2,156
Vv_10012779	no annotation	2,155
Vv_10000250 TC55073	Lipid transfer protein precursor, partial (70%)	2,153
Vv_10004370 TC64623	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, partial (67%)	2,15
Vv_10006329	no annotation	2,143
Vv_10007842 CD720811	Sucrose synthase (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (18%)	2,142
Vv_10002206 TC62494	Chloroplast alpha-glucan water dikinase isoform 3, partial (44%)	2,14
Vv_10010223 TC60710	GDSL esterase/lipase (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (41%)	2,138
Vv_10010857 TC53967	Legumin-like protein, partial (34%)	2,133
Vv_10011675 TC68186	Hypothetical protein, partial (6%)	2,13
Vv_10006297 CB345700	Rac GTPase activating protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (25%)	2,129
Vv_10000201 TC63806	Chalcone synthase, complete	2,125
Vv_10011763 TC60921	no annotation	2,124

Tableau 3. (suite)

Vv_10003725 TC64733	Polyubiquitin (UBQ3) (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (62%)	2,121
Vv_10003562	Growth-regulating factor 6, partial (18%)	2,09
Vv_10002706	Alpha-amylase, partial (34%)	2,088
Vv_10004336	Proline-rich protein, partial (50%)	2,071
Vv_10000233 TC62989	Carboxypeptidase type III, partial (38%)	2,067
Vv_10000321 TC63415	H(+)-transporting ATPase, partial (29%)	2,04
Vv_10013984 TC68395	no annotation	2,035
Vv_10005088 TC68030	Plasma membrane aquaporin (<i>Vitis vinifera</i>), partial (27%)	2,029
Vv_10000173 TC53416	Ripening-related protein-like (GRIP68) (<i>Vitis vinifera</i>)	2,017
Vv_10002743 TC70660	no annotation	2,011
Vv_10009085 TC54289	Transcription factor, partial (8%)	2,03

Tableau 4. Tableau regroupant les gènes dont l'expression est réprimée plus de 2 fois dans les cellules embryogènes de Vigne (41B) surexprimant VvCEB1 par rapport au témoin lors de l'analyse microarray. Les séquences des sondes ADN spottées sur les lames microarray correspondant aux identifiants indiqués ci-dessous sont regroupées à la fin de ce manuscrit (Annexe 8).

Identifiants	Nom	Rapport (35S/témoin)
Vv_10001993 TC56430	Wound induced protein (Fragment), partial (92%)	0,182
Vv_10009807 TC67772	no annotation	0,192
Vv_10011030 TC53426	18.2 kDa class I heat shock protein, partial (86%)	0,198
Vv_10003934 TC54874	Adenosine 5'-phosphosulfate reductase, partial (93%)	0,201
Vv_10001074 TC53496	Histone H1 variant, partial (50%)	0,201
Vv_10011094 TC67588	18.1 kDa class I heat shock protein (HSP 18.1), partial (37%)	0,204
Vv_10004355	no annotation	0,208
Vv_10001081 TC56794	late embryogenesis abundant protein-like (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (41%)	0,223
Vv_10011029 TC58343	18.1 kDa class I heat shock protein (HSP 18.1), partial (86%)	0,233
Vv_10004596 TC58594	Galactinol synthase, partial (41%)	0,238
Vv_10000535 CF210584	no annotation	0,244
Vv_10001834	no annotation	0,255
Vv_10000420 TC59105	Small heat stress protein class CIII, partial (80%)	0,257
Vv_10000006 TC53184	Chloroplast small heat shock protein class I, partial (89%)	0,26
Vv_10013611 TC65419	no annotation	0,261
Vv_10000533 TC57528	Hsp22.3, partial (58%)	0,274
Vv_10011284 TC53131	18.8 kDa class II heat shock protein, partial (75%)	0,284
Vv_10002473 TC70699	Wound induced protein-like (Fragment), partial (27%)	0,284

Tableau 4. (suite)

Vv_10009389	no annotation	0,29
Vv_10004524 TC57576	AT5g45690/MRA19 8, partial (61%)	0,301
Vv_10000477 TC68191	15.5 kDa oleosin, partial (31%)	0,302
Vv_10010851	no annotation	0,305
Vv_10011694 TC65322	heat shock protein binding (Arabidopsis thaliana), partial (15%)	0,316
Vv_10011245	no annotation	0,324
Vv_10000918 TC60052	Late embryogenesis abundant protein D-34 (LEA D-34), partial (93%)	0,327
Vv_10006349 TC68559	Similar to Ankyrin-like protein, partial (44%)	0,328
Vv_10009398 TC67614	no annotation	0,331
Vv_10011056	no annotation	0,331
Vv_10004090 TC52852	Response regulator receiver; CCT, partial (12%)	0,334
Vv_10001182 TC59568	Similar to At3g13310 (Arabidopsis thaliana), partial (28%)	0,335
Vv_10011290 TC63269	Syringolide-induced protein 19-1-5, partial (59%)	0,335
Vv_10001645 TC65322	heat shock protein binding (Arabidopsis thaliana), partial (15%)	0,338
Vv_10000012 TC55826	Cytosolic class II low molecular weight heat shock protein, complete	0,339
Vv_10010670	no annotation	0,339
Vv_10008836 TC54339	no annotation	0,345
Vv_10008452 CF216188	APS reductase (Brassica juncea), partial (35%)	0,349
Vv_10007663 CD012124	Weakly similar to ATP synthase F0 subunit 9 (Thraustochytrium aureum), partial (32%)	0,349
Vv_10011095 TC65605	17.6 kD class I small heat shock protein	0,349
Vv_10011065 TC65411	similar to Gb AAF04880.1, partial (35%)	0,361
Vv_10004254 TC58803	similar to F6D8.22 protein (At1g52560), partial (57%)	0,366
Vv_10006544	heat-shock protein low molecular weight (common tobacco), partial (88%)	0,366

Tableau 4. (suite)

Vv_10011021 CF212592	similar to xyloglucan endo-1 4-beta-D-glucanase precursor (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (17%)	0,371
Vv_10001895	High mobility group protein, partial (69%)	0,375
Vv_10008539 TC53421	Phi-1 protein, partial (88%)	0,375
Vv_10002082 TC57568	weakly similar to Pathogenesis-related protein 1, partial (14%)	0,376
Vv_10000709 TC60072	Dehydrin, partial (51%)	0,377
Vv_10004016 TC58191	Cytochrome oxidase subunit 3, partial (65%)	0,377
Vv_10004261 TC56548	Protein At5g25560, partial (47%)	0,378
Vv_10011068	no annotation	0,379
Vv_10000595 CD013793	Purple acid phosphatase 1, partial (79%)	0,38
Vv_10004112 TC61617	no annotation	0,381
Vv_10014202 TC61486	no annotation	0,388
Vv_10004977 TC53068	similar to YSL transporter 3, partial (42%)	0,388
Vv_10001082 TC67485	late embryogenesis abundant protein-like (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (21%)	0,389
Vv_10010699	no annotation	0,39
Vv_10003680 TC54041	Low molecular weight heat-shock protein, partial (94%)	0,392
Vv_10013618 TC65453	NIN-like protein 2, partial (9%)	0,394
Vv_10010396 DT020438	no annotation	0,396
Vv_10001639 TC55755	Galactinol synthase (Fragment), partial (87%)	0,397
Vv_10001031 TC61146	similar to AT4g19390, partial (61%)	0,406
Vv_10004151 TC60131	;similar to DNA binding (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (51%)	0,412
Vv_10004184 TC53058	Heat shock protein 70, complete	0,416
Vv_10002250 TC62106	Galactinol synthase, partial (25%)	0,417

Tableau 4. (suite)

Vv_10010771 TC51935	MLP-like protein 34, partial (31%)	0,418
Vv_10000023 TC68108	Cytosolic class II low molecular weight heat shock protein, complete	0,419
Vv_10009046	weakly similar to Hydroxyproline-rich glycoprotein GAS28 precursor, partial (6%)	0,421
Vv_10001760 TC54002	weakly similar to At4g35750 (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (97%)	0,423
Vv_10000038 TC63760	22.0 kDa class IV heat shock protein precursor, partial (41%)	0,425
Vv_10005702 CA815595	similar to pseudo-response regulator 5 (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (20%)	0,426
Vv_10010681 TC57491	Lipid transfer protein isoform 1, complete	0,433
Vv_10000020 TC54356	Cytosolic class II low molecular weight heat shock protein, complete	0,434
Vv_10013694 CB913831	no annotation	0,435
Vv_10003816 TC56005	weakly similar to F12F1.7, partial (19%)	0,438
Vv_10002842 TC69356	similar to Oligopeptide transporter-like protein, partial (25%)	0,445
Vv_10006606 TC68139	Small hydrophobic protein 2, partial (86%)	0,446
Vv_10000811 TC59168	Cystatin, partial (72%)	0,447
Vv_10011576 TC66600	no annotation	0,449
Vv_10001274 TC54643	Catalytic/ trehalose-phosphatase (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (64%)	0,451
Vv_10010251 TC53410	Metalloendopeptidase/ protein binding (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (41%)	0,455
Vv_10006661 TC70104	Pherophorin-C2 protein precursor, partial (14%)	0,457
Vv_10006277 CB345250	weakly similar to progesterone 5-beta-reductase (<i>Digitalis purpurea</i>), partial (26%)	0,457
Vv_10001789 TC70541	DnaJ-like protein, partial (47%)	0,461
Vv_10011262 TC66916	Seed maturation protein PM21 (Seed maturation protein PM35), partial (39%)	0,461
Vv_10009642	Glycine-rich protein precursor, partial (9%)	0,463

Tableau 4. (suite)

Vv_10011134 TC65864	no annotation	0,464
Vv_10006714 CB913302	15.8 kDa oleosin (<i>Theobroma cacao</i>), partial (97%)	0,464
Vv_10005038 TC61814	Mitochondrial import inner membrane translocase, subunit Tim17/22, partial (85%)	0,466
Vv_10013131 TC57973	<i>Arabidopsis thaliana</i> genomic DNA, chromosome 3, TAC clone:K7M2, partial (63%)	0,467
Vv_10003986 TC68149	1-cys peroxiredoxin, complete	0,467
Vv_10011516 TC63766	ATPase, partial (4%)	0,467
Vv_10009625 TC70031	weakly similar to At3g17520 (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (21%)	0,467
Vv_10006890	no annotation	0,468
Vv_10011093 TC61469	18 kDa seed maturation protein, partial (61%)	0,468
Vv_10013176 TC53252	Uncharacterized protein family UPF0005 with 7 transmembrane domains, partial (93%)	0,469
Vv_10001021 TC53444	Photosystem I reaction center subunit N, chloroplast precursor (PSI-N), partial (80%)	0,47
Vv_10002077 TC59021	similar to Expressed protein, partial (46%)	0,472
Vv_10008835 TC58479	Heat shock protein 16.9, partial (65%)	0,473
Vv_10000405 TC53043	Pectin methylesterase PME1, complete	0,473
Vv_10007360 TC70724	PIN1-like auxin transport protein, partial (18%)	0,476
Vv_10011254 TC67340	Ca ²⁺ -binding EF hand protein, partial (44%)	0,477
Vv_10000175 TC58870	SOS2-like protein kinase, partial (89%)	0,478
Vv_10000589 TC52171	Phi-1 protein, partial (87%)	0,479
Vv_10000005 TC67119	Metallothionein 2b, partial (91%)	0,479
Vv_10002824 TC69301	Contains similarity to integral membrane protein nodulin, partial (15%)	0,479
Vv_10004150 TC60131	similar to DNA binding (<i>Arabidopsis thaliana</i>), partial (51%)	0,48

Tableau 4. (suite)

Vv_10010958 CB345272	LHY protein {Phaseolus vulgaris}, partial (7%)	0,482
Vv_10006651 TC56797	Senescence-associated protein DH, partial (90%)	0,485
Vv_10011888 TC70219	no annotation	0,489
Vv_10000490 TC51731	Aux/IAA protein, complete	0,489
Vv_10001990	no annotation	0,490
Vv_10011271	Abscisic stress ripening protein, partial (93%)	0,491
Vv_10014383	no annotation	0,491
Vv_10010750 TC52017	Heat shock protein 83, complete	0,492
Vv_10011059 TC56744	Caleosin, partial (40%)	0,494
Vv_10008821 TC57709	BZip transcription factor, partial (52%)	0,496
Vv_10011231 TC60981	Aux/IAA protein, partial (50%)	0,496
Vv_10004577	no annotation	0,497
Vv_10013542 TC56618	no annotation	0,497
Vv_10009319 TC62340	Expressed protein, partial (25%)	0,498
Vv_10001598 TC59487	Aux/IAA protein, partial (53%)	0,499
Vv_10004995 TC56535	Osmotin-like protein precursor, partial (92%)	0,5
Vv_10001462 TC63786	no annotation	0,5

Chapitre III

Caractérisation fonctionnelle de VvABF2



Photographie de détail de baies de raisin (Vitis vinifera cv.Koshu)

I. Introduction

De nombreux progrès ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la maturation des fruits climactériques par l'éthylène (Adams-Phillips *et al.*, 2004). En revanche, l'identité des signaux moléculaires responsables de la maturation des fruits non climactériques comme le raisin est encore très peu documentée. En 2000, une approche par tri différentiel a permis d'isoler des gènes appelés *GRIP* (grape ripening-induced protein) dont l'expression était associée à la maturation du raisin (Davies et Robinson, 2000). Plus récemment, la disponibilité d'informations génomiques sous forme de collections d'EST (da Silva *et al.*, 2005; Deluc *et al.*, 2007), puis du génome complet (Jaillon *et al.*, 2007, Velasco *et al.*, 2007), a permis de développer des études transcriptomiques (Terrier *et al.*, 2005; Waters *et al.* 2005 ; Grimplet *et al.* 2007 ; Deluc *et al.*, 2007; Pilati *et al.*, 2007) et protéomiques (Deytieux *et al.*, 2007; Giribaldi *et al.*, 2007; Negri *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008) permettant de mieux comprendre les changements moléculaires associés au développement et à la maturation du raisin. Un ensemble de 1477 gènes impliqués de façon spécifique dans les processus de maturation ont été mis en évidence par Pilati *et al.* (2007). Cinq catégories fonctionnelles y étaient représentées de façon majoritaire: organisation et métabolisme de la paroi, métabolisme des sucres, métabolisme des composés phénoliques, réponse au stress et photosynthèse.

Dans le contexte bibliographique, nous avons décrit l'ABA comme un régulateur majeur favorisant la mise en place des processus de maturation chez le raisin comme chez d'autres fruits non climactériques (Coombe, 1992; Davies *et al.*, 1997; Giovannoni *et al.*, 2001; Rodrigo *et al.*, 2003 ; Zhang M. *et al.*, 2009a ; Giribaldi *et al.*, 2010, Koyama *et al.*, 2010). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont pas encore été élucidés. Chez *Arabidopsis thaliana*, des progrès importants ont été réalisés dans le cadre du décryptage de la signalisation déclenchée par l'ABA (cf. contexte bibliographique ; Umezawa *et al.*, 2010 ; Cutler *et al.*, 2010). Sur la base de ces avancées, des études récentes chez le Fraisier ont mis en évidence l'implication de deux récepteurs à l'ABA, FaCHLH/ABAR (Jia *et al.*, 2011) et FaPYR1 (Chai *et al.*, 2011), qui ont été décrits comme des régulateurs positifs de la maturation chez cette espèce. Chez la Vigne, aucun élément de la signalisation ABA susceptible de jouer un rôle dans les processus de maturation du raisin n'a été caractérisé à ce jour.

Dans ce contexte, un des objectifs de mon travail de thèse a été d'étudier la fonction d'un facteur de transcription de Vigne de la famille AREB/ABF, appelé VvABF2, dont l'homologue chez *Arabidopsis* est connu pour intervenir dans la signalisation ABA. Ce travail

a nécessité : la production de cellules embryogènes transgéniques surexprimant *VvABF2* et une analyse microarray sur génome complet. Cette étude transcriptomique a permis d'identifier les gènes cibles de *VvABF2* et les voies potentiellement affectées par ce FT en réponse à ABA chez la Vigne. Enfin, nous avons aussi produit des lignées de Tomate (cv. WVA106) surexprimant *VvABF2* afin d'étudier son rôle dans le développement du fruit.

Les résultats concernant cette partie de mon travail de thèse sont présentés et discutés ci-après sous la forme d'un article qui sera très prochainement soumis pour publication.

II. Article

TITLE: The b-ZIP transcription factor VvABF2 mediates ABA signalling in grape berry

ABSTRACT

In contrast to climacteric fruits where ethylene plays a prominent role, the hormonal control of ripening in non climacteric fruit, such as grape (*Vitis vinifera* L.), is poorly understood. In grape, abscisic acid (ABA) is thought to play a pivotal role in fruit ripening, but supporting genetic evidence is lacking. The present work characterizes VvABF2, a grape b-ZIP transcription factor belonging to a phylogenetic sub-group previously shown to be involved in ABA and abiotic stress signalling in other species. VvABF2 mainly accumulated in the berry, from the onset of ripening to harvesting stage, and was up-regulated by ABA. Microarray analysis on transgenic grape cells overexpressing VvABF2 showed that this transcription factor exacerbates and/or modifies existing networks related to ABA responses. In addition, cells overexpressing VvABF2 exhibited enhanced responses to ABA treatment compared to control cells. Among the VvABF2-mediated responses highlighted in this study, the synthesis of phenolic compounds and cell wall softening were the most strongly affected. Moreover, the firmness of fruits from tomato plants overexpressing VvABF2 is strongly reduced, which supports the hypothesis of a key role for VvABF2 in fruit ripening.

Introduction

Grape (*Vitis vinifera*) is a non-climacteric fruit which is important over the world for wine production and fresh consumption. The ripening of grape berry is a complex process involving the catabolism of organic acids, the accumulation of soluble sugars, flavonoids and aromatic compounds, and an increase in berry softness (Seymour *et al.*, 1993; Ribereau-Gayon, 2000). Berry composition and quality largely depend on the ripening processes that co-ordinate these biochemical, physiological and anatomical changes. While understanding of the key mechanisms supporting ethylene-mediated ripening of climacteric fruits (e.g. tomato, Giovannoni, 2004, 2007; Adams-Phillips *et al.*, 2004), the events controlling the ripening of non-climacteric fruits are less investigated and known.

Grape berry ripening involves the integration of multiple hormone signals. Classical plant hormones such as abscisic acid (ABA), auxin (indole-3-acetic acid, IAA), brassinosteroids and, to a lesser extent, ethylene, have previously been implicated in the control of ripening of grape berry (Davies *et al.*, 1997; Symons *et al.*, 2006; Chervin *et al.*, 2004, 2008). ABA content of grape berry gradually and strongly increases just before the onset of ripening, called véraison (Coombe and Hale, 1973; Scienza *et al.*, 1978; Davies *et al.*, 1997; Antolin *et al.*, 2003). In relation with its accumulation profile, numerous reports suggested that ABA may play a major role in controlling several ripening-associated processes of grape berry, among which coloration, sugar accumulation and softening (Coombe, 1992; Davies *et al.*, 1997; Giovannoni, 2001; Rodrigo *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 2009; Giribaldi *et al.* 2009).

In recent years, much progress has been made in the understanding of ABA signal transduction pathways in *Arabidopsis* (Cutler *et al.*, 2010; Umezawa *et al.*, 2010; Weiner *et al.*, 2010). The ABA signal is perceived by multiple receptors (Shen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Fujii *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Melcher *et al.*, 2009; Miyazono *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2011; Chai *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011). which triggers downstream signalling cascades resulting in physiological effects. Among these ABA receptors, only the PYR/PYL/RCAR proteins have been well characterized. ABA promotes the interaction of its receptor (PYR1) to the protein phosphatase 2C (PP2C), which results in the inactivation of PP2C and activation of SnRK2 (sucrose non-fermenting-related kinase 2). Activated SnRK2 turns on ABA signalling through the phosphorylation of downstream targets such as AREB/ABF

(ABA-response element binding factors/ABRE binding factors) transcription factors, which in turn activate several sets of genes (Fujii *et al.*, 2009).

AREB/ABFs are ABA-responsive transcription factors containing a bZIP type DNA-binding domain that binds the ABA-responsive element (T/CACGTGGC) and have a pivotal role in ABA-dependent gene activation (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000; Hattori *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002; Gomez-Porrás *et al.*, 2007). AREB/ABF-overexpressing plants exhibit ABA hypersensitivity and enhanced tolerance to freezing, drought and salt stress (Kang *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2005, Furihata *et al.*, 2006.). Among the AREB/ABFs, AREB1, AREB2, and ABF3 were shown to be master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signalling involved in drought stress tolerance, and require ABA for full activation (Yoshida *et al.*, 2010).

Although the ABA regulation of fleshy fruit development has been studied extensively, the molecular mechanisms underlying ABA perception and signal transduction in these fruits remain unclear. In the present study, we identified and characterized VvABF2, an AREB/ABFs-like transcription factor from grape, previously described as GRIPP55, which accumulates from véraison until the end of the ripening phase. VvABF2 is induced by both ABA and sucrose supply. A transcriptomic analysis made on transgenic grape cells overexpressing VvABF2 led to the identification of putative target genes for VvABF2. In parallel, VvABF2 was also overexpressed in tomato. The corresponding fruits exhibited accelerated ripening. Altogether, this work suggests that VvABF2 is involved in ABA signalling pathway and affects grape berry ripening by activating several pathways among which the synthesis of phenolic compounds and fruit softening.

Results

Identification of VvABF2, a b-Zip transcription factor from grape

Data from the literature describing changes in mRNA profiles during grape berry ripening led to the identification of a number of grape ripening-induced (GRIP) cDNAs whose transcripts accumulate during berry development (Davies and Robinson, 2000). Among these GRIP genes, GRIP55 (GSVIVT01009485001, XP_002284791) a transcription factor of the basic Leucine zipper family (b-ZIP), was selected for further analysis. GRIP55 full-length cDNA was amplified by PCR using cDNAs extracted from Cabernet Sauvignon grape berries at véraison. The corresponding transcript is 1341 bp long and encodes a protein of 447 amino acids. Amino acid sequence analysis further confirmed that this protein belongs

to the transcription factors of the b-ZIP family containing the typical DNA basic-binding region, the leucine zipper dimerization motif located at the C-terminal region (amino acids 367 to 418) (Jacoby *et al.*, 2002) and conserved domains predicted as phosphorylation sites involved in stress or ABA signalling (Figure 1). A phylogenetic analysis revealed that this protein belongs to the group A of b-ZIP transcription factors previously shown to be involved in ABA and abiotic stress signalling (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000; Hossain *et al.*, 2010) (Figure 2). Compared to *Arabidopsis*, the b-ZIP group A from grape contains six members among which only two belong to the Possible Groups of Orthologues (PoGOs) A5 (Corrêa *et al.*, 2008) (Figure 1A). The close homology of GRIP55 with AtAREB1/AtABF2 from *Arabidopsis* led us to rename this protein as *VvABF2* (Figure 1 and 2).

Expression Analysis of *VvABF2* in Grapevine and in response to ABA

The expression profile of *VvABF2* was determined in different grapevine organs by quantitative RT-PCR with RNA extracted from Cabernet Sauvignon roots, stems, leaves, flowers, and mature berries (11 weeks after flowering, WAF). As illustrated in Figure 3A, *VvABF2* is ubiquitously expressed in the different grape organs. However, its relative expression varied depending on the organ. In decreasing order, *VvABF2* transcript accumulation was higher in mature berries, stems, leaves, roots and inflorescences.

VvABF2 transcript accumulation was also assessed during berry development (Figure 3B). Interestingly, *VvABF2* expression increased just before the onset of grape berry ripening (8 WAF). Additionally, *VvABF2* transcripts accumulated more than two-fold more during the ripening stage (9-15 WAF) when compared to the herbaceous phase (2-7 WAF) (Figure 3B). *VvABF2* gene expression was also analyzed in the different berry compartments (seeds, pulp, and skin) after veraison. *VvABF2* transcripts were more abundant in both seeds and skin, than in pulp (Figure 3C).

The phylogenetic analysis revealed that this protein belongs to the group A of b-ZIP transcription factors, previously shown to be involved in ABA signalling (Hossain *et al.*, 2010). We therefore investigate the effect of ABA on *VvABF2* expression, by treating CSB cell suspensions with 20 μ M ABA. ABA significantly increased the transcript abundance of *VvABF2* within 2 h and the amount of *VvABF2* transcripts peaked at 6h before slightly declining till 24 h after ABA supply (Figure 3D).

VvABF2 encodes a functional transcription factor

The presence of a bipartite nuclear localization signal (NLS) between amino acids 357 and 373 suggests that *VvABF2* is probably targeted to the nucleus (Figure 1). To confirm this prediction, a green fluorescent protein (GFP) was fused in frame to the C-terminus of *VvABF2* and the resulting protein was expressed in tobacco mesophyll protoplasts under the control of the CaMV 35S promoter. Unlike the GFP control in which green fluorescence was seen throughout the cell, green fluorescence from *VvABF2*-GFP was only detected in the nucleus (Figure 4A), consistent with a putative role of this protein in the control of transcription. In order to examine the trans-activation ability of *VvABF2*, *GUS* reporter gene assays were performed by transient expression in tobacco protoplasts. The promoters of three ABA up-regulated genes were selected: *VvLEA* (Vv08s0007g04240), *VvRD26* (Vv09s0002g02450) and *VvBenzoR* (Vv07s0005g00140) (Wang *et al.*, 2011). Therefore, quantitative *GUS* expression analysis was assessed by using these promoters, and *VvABF2* as an effector protein in the presence or in the absence of 20 μ M ABA (Figure 4B). Co-expression of *VvABF2* significantly activates all promoters tested in the presence or in the absence of ABA (Figure 4B). By contrast, in absence of *VvABF2*, this promoter activation was observed only after addition of ABA. Taken together, these results indicate that *VvABF2* is a strong activator of all ABA-regulated genes tested and that ABA further increases this activation ability. These data suggest that *VvABF2* is a positive regulator for modulating downstream ABA signalling pathways.

Production of transgenic cell lines overexpressing *VvABF2* and transcriptomic analysis

Transgenic grape cells overexpressing *VvABF2* were produced using 35S-driven *VvABF2* construct. After stabilization of the cell suspension by subculture in glycerol-maltose-naphthoxyacetic acid culture medium supplemented with paromomycin and cefotaxime, the expression of *VvABF2* was tested by Real-time PCR using *VvABF2*-specific primers. In cells expressing the 35S::*VvABF2* construct, *VvABF2* transcript accumulated 6-times more than in cells expressing the empty vector (Figure 5). A one hour-ABA treatment (20 μ M) of control cells dramatically stimulates *VvABF2* expression. ABA also further stimulates *VvABF2* expression in transgenic cells but in a lesser extent (Figure 5).

Total RNA extracted from 41B cells treated or not 1h with 20 μ M ABA were hybridized with 60-mer oligoarrays bearing a set of 29,582 unigenes (NimbleGen Gene Expression 12x135K Arrays). Analysis of differentially expressed genes was performed using twofold expression change and a $P < 0.05$ as cut-off from three independent experiments.

Differential gene expression analysis was assessed through microarray data comparison of three different experimental conditions: ABA-treated vs untreated control cell lines (condition 1), untreated 35S:*VvABF2* vs untreated control cell lines (condition 2) and ABA-treated 35S:*VvABF2* vs untreated control cell lines (condition 3). The overlap in genes differentially expressed in these three conditions is depicted with a three-way Venn diagram (Figure 6A). Results showed that 1722 genes were differentially expressed in at least one of the three conditions. More specifically, ABA treatment of control cell lines (condition 1) regulated 569 (1.9 %) of the 29,582 unigenes of the microarray slide. Among these, 424 (74.5 %) were up-regulated and 145 (25.5 %) were down-regulated. Overexpression of *VvABF2*, without ABA treatment, led the differential expression of 662 (2.2 %) genes when compared to the control (condition 2). Three hundred thirty eight (51 %) genes were up-regulated and 324 (49 %) were down-regulated (Figure 6A). Treatment of 35S:*VvABF2* transgenic cells with ABA resulted in the differential expression of 1370 (4.6 %) genes when compared to the untreated control cells (condition 3). Eight hundred eighty one (64.4 %) genes were up-regulated and 489 (35.6 %) were down-regulated (Figure 6A). The comparison of all three conditions showed that only 10 genes were commonly affected. Four hundred forty one genes were common between conditions 1 and 2, and 438 genes between conditions 1 and 3. Moreover, 501 genes are specific of 35S:*VvABF2* cells treated with ABA (condition 3) (Figure 6A).

The differentially expressed genes identified in our experiments were clustered based on expression ratios from conditions 1, 2 and 3 into 10 clusters of specific expression profiles (Figure 6B). The clusters A, D and J contained genes regulated by ABA in a genotype-independent manner. Genes were up-regulated by ABA in clusters A and D, and down-regulated in cluster J. Clusters B, E and G, I, included genes affected by *VvABF2* overexpression (up- and down-regulated respectively) independently of the presence of ABA. Clusters C, F and H contained genes regulated by ABA and/or *ABF2*. Clusters C and F encompassed genes significantly stimulated in 35S:*VvABF2* cells treated with ABA, whereas cluster H corresponded to genes that were repressed in the same condition. These clusters C, F and H thus contained genes regulated by ABA in a *VvABF2*-dependent manner.

To functionally classify the 1722 genes differentially expressed in all three experimental conditions, we also performed an analysis using MapMan functional categories (Thimm *et al.*, 2004) (Figure 6C). This classification suggested that most transcripts were linked to “hormone metabolism”, “protein metabolism”, “transport”, “signalling”, “stress”, and “transcription” when cells were supplemented with ABA (Figure 6C). Among these ABA stimulated-groups, overexpression of *VvABF2* led to the further enrichment of most categories

and more particularly of the groups linked to “secondary metabolism” (enrichment factor 5.5 x) “transport” (4.5 x), “signalling” (3 x), “stress” (3 x), and “cell wall modification” (3 x).

Using MapMan Wilcoxon test, we identified the more altered biological functions with statistical significance among the 1722 genes differentially expressed (Table 1).

In condition 1, genes involved in calcium signalling ($P = 4.4 \times 10^{-16}$), minor CHO metabolism ($P = 3.19 \times 10^{-10}$), AP2/ERF transcription factor family proteins ($P = 4.44 \times 10^{-10}$), and phenylpropanoid metabolism (5.1×10^{-9}) were among the highest differentially expressed genes (Table 1 and 2). These genes followed the expression profiles of clusters A or D (Figure 6B). In addition, other modulated genes previously reported to exhibit ABA-regulated expression in grape berry (Koyama *et al.*, 2010) and other plants species (Seki *et al.*, 2002; Rabbani *et al.*, 2003; Buchanan *et al.*, 2005; Matsui *et al.*, 2008), such as LEA and biotic/abiotic stress related proteins were also identified (Table 2). In condition 2, genes involved in secondary metabolism ($P = 1.1 \times 10^{-13}$), protein degradation and modification ($P = 4.7 \times 10^{-4}$ and 2.2×10^{-7} , respectively), hormone metabolism and signalling (auxin and ethylene) ($P = 7.63 \times 10^{-6}$ and 4.1×10^{-7} , respectively) and cell wall degradation ($P = 9.3 \times 10^{-5}$) were significantly affected by overexpression of *VvABF2* (Table 1). These genes characterizing *VvABF2* effect on grape cells, belong to clusters B, E, G or I (Figure 6B) and are shown in Table 3. Among these, numerous genes encoding cell wall hydrolytic enzymes (e.g. pectinesterases and polygalacturonases), secondary metabolism enzymes (eg. flavonoid-O-glycosyltransferase, isoflavone reductases, dihydroflavonol 4-reductase, and isoflavone 2'-hydroxylase), hormone metabolism- and signalling- related proteins (e.g. Indole-3-acetic acid-amido synthetase and serine/threonine-protein kinase BRI1-like), protein degradation-related proteins (e.g. F-box protein), sugar transport and metabolism-related proteins (e.g. hexose transporter and invertase), transport-related proteins (e.g. MATE, amino acids and potassium transporter), transcription factors (e.g. ERF, MYB, bHLH and HB-ZIP), and stress-related proteins (e.g. pathogenesis related-protein, endochitinases and peroxidases) (Table 3). Finally, in condition 3, the clustering into functional categories showed that genes involved in secondary metabolites biosynthesis were dramatically affected ($P < 1 \times 10^{-20}$). The enrichment was also observed for genes corresponding to calcium signalling ($P < 1 \times 10^{-20}$), stress ($P < 1 \times 10^{-20}$), hormone metabolism and signalling (auxin and ethylene) ($P = 2.5 \times 10^{-8}$ and 1.77×10^{-8}), and WRKY transcription factor ($P = 1.25 \times 10^{-7}$) (Table 1). Clusters C, F or H contained genes affected by ABA in *VvABF2* background (Figure 6B). Detailed results are shown in Table 4. Transcript abundance of key enzymes involved in secondary metabolism and more particularly in the first steps of phenylpropanoid pathway was considerably

increased in condition 3. These enzymes correspond to phenyl ammonia lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (4-CL). Interestingly, several stilbene synthase genes followed a similar expression pattern (Table 3). Numerous genes encoding proteins related to hormone metabolism and signalling (e.g. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO), gibberellin receptor (GAR) and gibberellin 2-oxidase (GA-2ox)), protein degradation (e.g. F-box protein, ubiquitin-protein ligase and RING-H2 finger protein), and transport (e.g. ABC transporter G family member and glutamate receptor) were also strongly affected in the same condition. Finally, a strong accumulation of transcripts corresponding to transcription factors (e.g. Dehydration-responsive element-binding protein, WRKY and MYB), and stress-related proteins (e.g. pathogenesis related (PR)-proteins, endochitinases, peroxidases and receptor-like kinase (RLK)) was also observed in *VvABF2*-overexpressing cells supplied with ABA (Table 4).

Phenotype of Tomato fruits overexpressing *VvABF2*

To investigate the role/involvement of *VvABF2* in fruit development and ripening processes, transgenic tomatoes overexpressing *VvABF2* were produced. The full-length coding region of *VvABF2* was cloned downstream of the Cauliflower mosaic virus 35S promoter. Five independent 35S:*VvABF2* transgenic plants were selected for their successful integration of the transgene (Figure 7A). *VvABF2* overexpression did not result in apparent developmental defects. Flowers and fruits developed normally until the turning stage with kinetics comparable to the control plants. By contrast, after the turning stage and in the later ripening stages, fruits from all 35S::*VvABF2* lines exhibited dramatic phenotypes. Indeed, as soon as 2 days after turning, the firmness of the tomatoes from *VvABF2* overexpressing lines was strongly reduced in comparison to the control fruits. This reduction in firmness for the *VvABF2* overexpressing fruits 20 days after turning is illustrated in Figure 7B.

Discussion

Non climacteric fruit ripening is usually associated with ABA, a phytohormone that gradually accumulates during the onset of ripening (Coombe, 1992; Giribaldi *et al.*, 2010; Koyama *et al.*, 2010). The mechanisms involved in this ABA-mediated process are still poorly understood, but some regulators have been identified. Among these, two different ABA receptors, FaCHLH/ABAR (Jia *et al.*, 2011) and FaPYR1 (Chai *et al.*, 2011), were

recently shown to be positive regulators of strawberry ripening in response to ABA. In this context, AREB/ABF b-ZIP transcription factors that constitute regulators of ABA and stress responses in plants (Fujita *et al.*, 2005; Furihata *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007), are good candidates for the regulation of ABA-mediated fruit ripening. Moreover, possible role of AREB/ABFs transcription factors have been reported in climacteric fruit ripening (Bastias *et al.*, 2011).

The present work attempted to get an insight into the role of this class of TF during the ABA-mediated ripening of grape berries. In this context, we isolated and characterized VvABF2, previously known as GRIP55 (GSVIVT01009485001, XP_002284791). VvABF2 belongs to the group A of b-ZIP transcription factors, previously shown to be involved in ABA and abiotic stress signalling (Choi *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2000; Hossain *et al.*, 2010). VvABF2 was ubiquitously expressed in the different grape organs and its transcript accumulated just before the onset of grape berry ripening (8 WAF) when ABA concentrations increase (Coombe, 1992). These data fit well with the observation that VvABF2 expression was regulated by ABA (Figure 3D) and underline a putative role for this transcription factor in influencing ABA-regulated grape berry ripening processes. GUS reporter gene assays performed by transient expression in protoplasts further support the hypothesis of VvABF2 involvement in the ABA-mediated signalling pathway. Indeed, VvABF2 was able to transactivate several known ABA-regulated genes (*VvLEA*, *VvRD26* and *VvBenzoR*) and its transcriptional activating role was further increased by ABA supply (figure 4B).

The function of VvABF2 and its role in ABA signalling were further analyzed by a transcriptomic approach comparing the response to ABA of transgenic grape cells which overexpressed VvABF2 with that of control cells. ABA treatment was needed as many studies previously reported that *in vivo* ABFs/AREBs functions are modulated by protein kinases (Choi *et al.*, 2005; Furihata *et al.*, 2006; Chae *et al.*, 2007). For instance, in Arabidopsis, activation of ABF2/AREB1 requires the phosphorylation by an ABA-activated 42-kD protein kinase (Furihata *et al.*, 2006). Furthermore, transgenic plants overexpressing the phosphorylated active form of AREB1 resulted in the expression of many ABA-inducible genes in the absence of ABA treatment (Furihata *et al.*, 2006). Our results show that overexpression of VvABF2 (condition 2) modulate the expression of many grape genes in the absence of ABA. Only few (10) genes were common with ABA-treated control cells (condition 1). This might be the consequence of an ABA treatment (1 h) that was too short to affect all ABA-regulated genes in control cells. This hypothesis was strengthened by the fact

that many of the *VvABF2*-regulated genes (condition 2) belong to families previously shown to be involved in ABA responses. This also suggests that the ectopic expression of *VvABF2* was sufficient to affect some of ABA-dependent genes. In addition, ABA treatment of 35S::*VvABF2* transgenic cells (condition 3) regulated many other genes among which 438 were common with ABA treated control cells (condition 1). It seems that the control of the expression of these genes needs the ABA-mediated phosphorylation of *VvABF2*.

ABA treatment of grape cells led to the regulation of many genes known to be ABA- and stress-related genes (Seki et al., 2002; Buchanan et al., 2005; Koyama et al., 2010). For instance, genes encoding i) proteins involved in osmotic stress, desiccation (*raffinose synthase*, *LEA*), biotic stress (*PR protein*) responses, ii) proteins known to improve stress tolerance to abiotic stresses (*AP2-DREB*, *b-ZIP*, and *NAC*) (Nakashima et al., 2009) and iii) members of the ABA core (*PP2C*) (Nishimura et al., 2007 ; Park et al., 2009; Wang et al., 2011) and calcium signalling-related genes (CaM and Cam-stimulated PK) (Desikan et al., 2001; Yu et al., 2006) were specifically affected by ABA treatment (Table 2). These results confirm data from the literature and therefore validate these experiments.

As mentioned before, *VvABF2* overexpression can affect some ABA-dependent genes in the absence of ABA treatment (Table 2). For instance, several PR proteins such as endochitinases showed strongly increased transcript abundance in *VvABF2* transgenic cells. These genes were previously shown to be induced during berry development and ripening (Davies and Robinson 2000; Pilati et al., 2007). Genes encoding potassium transporters and channels were also strongly affected (Table 3). These genes are known ABA targets that are also important for berry ripening (Davies et al., 2006). Indeed, together with sugars accumulation, K⁺ influx might help the turgor driven berry expansion (Davies et al., 2006). Additionally, Cuéllar et al. (2010) suggested that the K⁺ channel *VvK1.1* could play a major role in K⁺ loading into berry tissues, especially upon drought stress.

ABA is known to promote sugar metabolism and accumulation in fleshy fruits (Yamaki and Asakura, 1991; Kobashi et al., 1999; Richings et al., 2000; Pan et al., 2005). In tomato, overexpression of *SIAREB1* stimulates hexoses accumulation in correlation with increased expression of genes encoding vacuolar invertases (Bastias et al., 2010). In *VvABF2* overexpressing cells, the stimulated expression of vacuolar invertase and hexose transporter genes is consistent with this data.

The softening which accompanies the last stages of fleshy fruit ripening has been extensively studied (Harker et al., 1997). This process is typically attributed to changes in cell

wall properties (Li *et al.*, 2010). Several studies have underlined the role of ABA in enhancing softening in both tomato (Zhang M *et al.*, 2009b) and grapevine (Gambetta *et al.*, 2010). The high transcripts levels of genes encoding cell wall hydrolytic enzymes such as pectinesterase, polygalacturonase and rhamnogalacturonase in *VvABF2* overexpressing cells, suggest a role for *VvABF2* in fruit softening (Table 3). This hypothesis is further strengthened by the observation that tomato fruits overexpressing *VvABF2* present a dramatic acceleration in the softening process during the ripening phase. In grape berry, the modification of cell walls occurring under ABA treatment may be reflected by the differential transcript abundances of cell wall proteins and pectin modifying enzymes (Koyama *et al.*, 2010).

The role of ABA in enhancing the synthesis of phenolic compounds during fruit ripening has extensively been reported (Ban *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2004 ; Peppi *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 2009 ; Gambetta *et al.*, 2010). Our transcriptomic analysis revealed that ABA indeed regulates some genes secondary metabolism enzyme, but that *VvABF2* overexpression does it as well. Thus, treatment of control cells with ABA up-regulated genes involved in flavonoids/anthocyanins biosynthesis (Table 2). Among these, the *F3H* is known to be induced in berry skin treated by ABA (Koyama *et al.*, 2010). Likewise, *VvABF2* overexpression also led to the stimulation of this pathway (Table 3). Indeed, expression of genes encoding proteins involved in the biosynthesis of anthocyanins (*UFGT*, *DFR*) and isoflavones (*IFH*, *IFR*), is modulated by *VvABF2*. Finally, treatment of *35S:VvABF2* cells by ABA also up-regulated secondary metabolism and more particularly the first steps of the phenylpropanoid pathway (PAL, 4CH), lignin biosynthesis pathway (CAD) and the phytoalexins pathway (stilbene synthase). The strong up-regulation of these genes in ABA-treated *35S:VvABF2* cells by comparison to ABA-treated control cells suggest that their expression depends on both ABA and *VvABF2*.

Interestingly, overexpression of *VvABF2* affected the accumulation of MATE transporters transcripts. Since this gene family is involved in the transport of flavonoids (Zhao and Dixon, 2009; Gomez *et al.* 2009), these data suggest that *VvABF2* may also be involved in the regulation of flavonoid transport.

Our results also suggest interactions of *ABF2* with phytohormone signalling pathways. Indeed, *VvABF2* overexpressing cells showed an accumulation of transcripts for genes belonging to hormone biosynthesis and/or signalling (Table 3 and 4). Two sets of genes could be identified. The first one corresponded to genes stimulated by ABA in control cells, and that expression was further induced by *VvABF2* overexpression. The second set included genes

that were already affected in 35S:*VvABF2* cells and that accumulation was further disturbed by ABA supply. Among these genes, many genes involved in the control of hormone amounts and more particularly involved in their biosynthesis (*NCED*, *ACO*) and catabolism (*GH3*, *Gibberellin 2-oxidase*, *ABA 8'-hydroxylase*, *cytokinin-O-glucosyltransferase*) (Table 3 and 4). Other genes corresponding to proteins involved in hormone signalling were also affected: genes involved in hormone sensing (*GID1*, *BRI1*) and transduction (*AUX/IAA*, *SAUR*). These data suggest a fine tuning of hormone amounts and signalling pathways by ABA, and underline a putative role of *VvABF2* in this control. Hormone balance is important for fruit development and ripening. For example, the maintenance of precise amounts of cytokinins is needed to achieve fruit ripening. Indeed, CK mediate a number of light-regulated processes (de-etiolation and chloroplast differentiation) during ripening (Mok, 1994). It was also recently shown that low levels of free IAA (maintained by *GH3*) are needed to allow berry ripening (Bottcher *et al.*, 2010, 2011) and that ABA stimulated this conjugating enzyme (Seki *et al.*, 2002). Ethylene plays an important role in climacteric fruit ripening (Giovannoni, 2007) and ABA is thought to control ripening of climacteric fruit through activation of ethylene biosynthesis (Zhang M *et al.*, 2009b). Although the role of ethylene in non-climacteric fruits remains unclear, its involvement in grapevine berry ripening has been suggested (Chervin *et al.*, 2004). Indeed, an ethylene peak, preceded by the stimulation of *ACO* expression, was observed just before véraison (Chervin *et al.*, 2004). Additionally, application of exogenous ethylene was also shown to affect both ripening and some of the related processes (Chervin *et al.*, 2004, 2008). Finally, BRs are positive hormonal regulators of berry ripening (Symons *et al.*, 2006) that interact with other phytohormones (ABA, auxin) to achieve their biological function (Hardtke *et al.*, 2007; Zhang S *et al.*, 2009).

The ubiquitin/26S proteasome pathway plays a key role in the perception and transmission of environmental and hormonal signals (Smalle and Vierstra, 2004; Liu and Stone 2010; Antoni *et al.*, 2011). In the present work, the importance of this pathway in ABA signalling is highlighted by the response of several genes encoding F-box proteins and others components of the proteasome pathway in 35S:*VvABF2* transgenic lines and after ABA supply (Table 3).

Numerous transcription factors are regulated by ABA or ABA-regulated stresses, even though their specific role in ABA signalling remains unknown (Nemhauser *et al.*, 2006; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). The present work shows that ABA-regulated members of DREB, WRKY and MYB transcription factor families, are up-regulated when *VvABF2* is overexpressed (Table 3). Interestingly, the most induced *WRKY* gene

(vv09s0018g00240) identified in our transcriptomic analysis is closely related to *WRKY40* from *Arabidopsis*. Using ChIP analysis, Shang *et al.*, (2010) showed that *WRKY40* binds the promoters of several members of AREBs/ABFs transcription factors subfamily including *ABF2*. These authors also suggested that *WRKY40* activity is inhibited by ABA perception by the Mg-chelatase H subunit receptor (*CHLH/ABAR*).

Taken together, these data suggest that *VvABF2* overexpression does not only activate new gene networks, but mainly functions by exacerbating and/or modifying existing networks related to ABA responses. Indeed, ABA treatment of *VvABF2* overexpressing cells often led to an enhanced response compared to ABA treatment of control cells (cluster C, F and H, figure 6B). This was particularly observed for genes involved in the phenylpropanoid pathway. Several genes encoding enzymes involved in the first step of this pathway (*PAL* and *C4H*), and several stilbene synthases were strongly induced. These data suggest that, in presence of ABA, *VvABF2* is an important regulator of the phenylpropanoid pathway leading to the stilbene biosynthesis. This result is consistent with data from the literature showing an upregulation of several stilbene synthase genes paralleling an increase in resveratrol concentrations in ABA-treated berries (Koyama *et al.*, 2010). In addition, *VvABF2* seems to affect lignin biosynthesis by stimulation of Cinnamyl alcohol Dehydrogenase and laccase genes (Table 3 and 4). Induction of lignin biosynthetic genes by ABA was previously illustrated in *Arabidopsis* (Seki *et al.*, 2002; Ostergaard *et al.*, 2001)

Finally, several reports indicated that fruit softening is hormonally regulated by ABA and ethylene (Jiang *et al.*, 2000; Zhang M *et al.*, 2009a, 2009b). Inhibitors of ABA biosynthesis delay tomato ripening and softening (Zhang M *et al.*, 2009a, 2009b). Treatments of berries with ABA or ethephon (ethylene analogue) increase softening (Peppi *et al.*, 2006). Surprisingly, ABA treatment does not affect the expression of softening-related genes in our microarray experiments. As mentioned before, this may be due to a too short duration of treatment. Nevertheless, both microarray data and the results obtained with transgenic tomatoes strongly suggest the involvement of the ABA-regulated transcription factor *VvABF2* in stimulating fruit maturation and softening.

In summary, this work led us to characterize *VvABF2*, a transcription factor of the AREB/ABF2 family sensitive to ABA. This transcription factor mediates at least in part ABA signalling pathway and affect fruit physiology when overexpressed in tomato. *VvABF2* could therefore be a key component of ABA-mediated berry ripening in synergy with other

hormones. Indeed, our results clearly showed that *VvABF2* overexpression strongly affect different pathways (secondary metabolism, cell wall metabolism, hormone metabolism and signalling, etc.) involved in the fruit maturation process.

METHODS

Isolation of *VvABF2* cDNA isolation and constructs production for plant transformation

Full length *VvABF2* clone was produced from a cDNA library isolated from grape Cabernet Sauvignon berries (véraison stage). PCR was performed using synthetic oligonucleotide primers designed to begin and end at the start and stop codons of the open reading frame of *VvABF2*. Primer sequences used for promoter cloning are listed in Table S1. The complete ORF was amplified and cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) for DNA sequencing, prior to subcloning into a stable expression binary vector downstream of the 35S promoter of cauliflower mosaic virus (CaMV). pFB8 and Pk7m34GW binary vector (Gateway™, Karimi *et al.*, 2002) were used to generate *VvABF2*-overexpressing 41B cells and tomato plant, respectively.

Plant transformation and culture conditions

Grapevine transformations were made in 41B rootstock (*V. vinifera* 'Chasselas' x *V. berlandieri*) according to Lecourieux *et al.* (2009). An embryogenic cell suspension culture was initiated as described previously (Coutos-Thévenot *et al.*, 1992a, 1992b). This cell suspension was subcultured weekly in 25 mL of glycerol-maltose culture medium (Coutos-Thévenot *et al.*, 1992b) supplemented with synthetic auxin (naphthoxy acetic acid) at 1 mg.L⁻¹ in the dark. Embryogenic cells were transformed using an *Agrobacterium tumefaciens* cocultivation method (Mauro *et al.*, 1995), and after selection, the transgenic cells were subcultured in the same condition in a medium supplemented with paromomycin at 2 mg.mL⁻¹ and cefotaxime at 200 mg.mL⁻¹ (Duchefa).

Transgenic tomato plants (*S. lycopersicum* L. cv. Wva106) were generated by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tomato cotyledons as described by Gonzalez *et al.* (2007). Tomato plants were grown in a culture chamber with a 14 h day/10 h night cycle. The temperature was 25 °C during the day and 20°C during the night. Individual flowers were tagged on the day of anthesis (flower opening).

RNA and cDNA production

Roots, shoots, leaves and inflorescences were collected from Cabernet Sauvignon fruit cuttings grown in a greenhouse. Berries (cv. Cabernet Sauvignon) were harvested in Domaine de la Grande Ferrade (INRA, Villenave d'Ornon, France). In order to compare berries at the same developmental stage, berries were sorted by weight before véraison, and on a NaCl density gradient after véraison.

All collected samples were quickly frozen in liquid nitrogen, ground to a fine powder with a Dangoumau blender, and stored at -80°C prior to use. Total RNA from grape organs and berries was extracted according to Lecourieux *et al.* (2009). Total RNA from grape embryos and tomato plants was extracted from 100 mg of starting tissue using the Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma) following the manufacturer's protocol. RNA isolation was followed by Dnase I treatment. For each sample, reverse transcription was performed from 2 μg of purified RNA using the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega) according to the manufacturer's instructions. The cDNA obtained was diluted (1/20) in distilled water.

Gene expression analysis

Quantitative real-time PCR expression analysis was carried out using the CFX96 Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad). Ten μl reaction mixes were prepared, that included 5 μl of iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0.2 μM of each primer and 2 μl of diluted cDNA. Gene transcripts were quantified with normalization to *VvEF1 γ* (grape experiments) and *SlEiF4 α* (tomato experiments) as internal standards. All biological samples were tested in triplicate, and SD values of means were calculated using standard statistical methods. Specific oligonucleotide primer pairs were designed with Beacon Designer 7 software (Premier Biosoft International). Specific annealing of the oligonucleotides was controlled by dissociation kinetics performed at the end of each PCR run. The efficiency of each primer pair was measured on a PCR product serial dilution. Quantitative RT-PCR primer sequences are listed in Table S1.

Protoplasts isolation and transient expression assays

The coding sequence of *VvABF2* was cloned as a C-terminal fusion in frame with the GFP into the pRT101 vector (Kiegerl *et al.*, 2000) and expressed under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter.

The promoter region of *VvLEA* (Vv08s0007g04240), *VvRD26* (Vv09s0002g02450) and *VvBenzoR* (Vv07s0005g00140) were inserted upstream the GUS reporter gene into pAM35 (Guerineau *et al.*, 2003). Primer sequences used for promoter cloning are listed in Table S1.

Tobacco (*Nicotiana tabaccum*, SR1) *in vitro* plants used for protoplasts preparation were cultivated in a growth chamber with a constant temperature of 25 °C and a 14 h/10 h day/night photoperiod. Protoplasts were obtained from young leaves of 15 day-old subcultured plant according to Hosy *et al.* (2005). A 10 µg aliquot of each plasmid DNA was used for PEG mediated co-transformation. Transfected protoplasts were incubated 16 h at 25°C.

GFP fluorescence was analyzed by confocal microscopy. Fluorometric *GUS* assay was performed following the protocol described by Jefferson (1987). Protoplasts were centrifuged briefly for 30 s and vortexed with GUS extraction buffer containing 50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM Na₂-EDTA (pH 8.0), and 0.1% Triton X-100. The extracts were centrifuged for 15 min in a microcentrifuge at 4 °C, and the supernatants were incubated at 37°C for GUS assay using 1 mM 4-methylumbelliferyl-β-d-glucuronide (MUG) as a substrate. Reaction was stopped with 0.2 M Na₂CO₃. The amount of methylumbelliferone (MU) production was determined using a fluorometer (Versafluor fluorometer, Biorad). Total protein content of the samples was determined by Bradford's method (Bradford, 1976).

Microarrays Experiments and Analyses

Three biological replicates of each sample (untreated control, control + ABA, 35S:*VvABF2*, 35S:*VvABF2* + ABA) were hybridized on NimbleGen microarrays 090818 *Vitis* exp HX12 (Roche, NimbleGen Inc., Madison, WI), representing about 30,000 genes based on the 12X grapevine V1 gene model prediction (<http://genomes.cribi.unipd.it>). The chip probe design is available at the following address, <http://ddlab.sci.univr.it/FunctionalGenomics>. Raw data are available at PLEXdb (Wise *et al.*, 2007) with the accession number VV30:VvABFOx. Data analyses were performed using R/Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004). Expression intensities were background corrected,

quantile-normalized and summarized using the *rma* function of the *oligo* package (Carvalho *et al.*, 2010). Differentially expressed genes were identified using the *Limma* package (Smyth *et al.*, 2004) for the following contrasts: *35S:VvABF2* vs control ; *35S:VvABF2* + ABA vs control ; control + ABA vs control. Genes with absolute log₂ fold changes above 1 (ratio 2) and Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) corrected p-Values below 0.05 were considered as significant. Expression profiles of these genes were clustered using the MapMan software (Thimm *et al.*, 2004). Gene models were aligned against the UnirRef100-2011-07 database (Suzex *et al.*, 2007) using the blast program (Altschul *et al.*, 1997). Genes considered as differentially expressed were associated to the MapMan Ontology (Thimm *et al.*, 2004) using the Mercator Online tool (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/app/mercator>). The most extreme categories within these differentially expressed genes were identified using a Wilcoxon rank sum test implemented in the MapMan tool (Usadel *et al.*, 2005).

Sequence Analysis

Amino acid sequence alignments were performed using ClustalW (Thompson *et al.*, 1994; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). The phylogenetic tree was constructed using MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007) with full length protein sequences. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The optimal tree with the sum of branch length = 10.86640422 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (2000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). There were a total of 117 positions in the final dataset.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank MM for preparing the cell culture media. PN was supported by a grant from the Conseil Régional Aquitaine.

TABLES

Table 1. Selected categories identified by the MapMan Wilcoxon test to be significantly different from all other differentially expressed genes

Category name	<i>P</i> - value Condition 1	<i>P</i> - value Condition 2	<i>P</i> - value Condition 3
Calcium signaling	4.4×10^{-16}	0.4×10^{-2}	$< 1 - 10^{-20}$
Secondary metabolism: Phenylpropanoids/Lignin	5.1×10^{-9}	6.8×10^{-8}	6.8×10^{-9}
Secondary metabolism: flavonoids/ stilbenes	1.1×10^{-4}	1.1×10^{-13}	$< 1 - 10^{-20}$
Minor CHO metabolism	3.2×10^{-10}	1.9×10^{-4}	1.3×10^{-8}
AP2-ERF transcription factor	4.4×10^{-10}	5.5×10^{-3}	6.6×10^{-11}
WRKY transcription factor	9.3×10^{-5}	8.7×10^{-2}	1.2×10^{-7}
Cell wall degradation	1.3×10^{-1}	9.3×10^{-5}	4×10^{-5}
Protein degradation/Proteasome 26S	4.2×10^{-2}	4.7×10^{-4}	1.1×10^{-3}
Auxin metabolism and signaling	8.4×10^{-2}	7.63×10^{-6}	2.5×10^{-8}
Ethylene metabolism and signaling	2.2×10^{-5}	4.1×10^{-7}	1.77×10^{-8}
Protein modification/kinase	1.3×10^{-3}	2.2×10^{-7}	7.1×10^{-4}
Stress	1.6×10^{-5}	1.3×10^{-4}	$< 1 - 10^{-20}$

Table 2. Selected ABA-induced genes from the clusters A and D, and associated with minor CHO metabolism, signaling, flavonoids metabolism, stress, development and transcription functional categories.

Name	ID	Ratio condition 1	Ratio condition 2	Ratio condition 3
<u>Minor CHO metabolism</u>				
Raffinose synthase	Vv17s0000g08960	5	1.2	4
Trehalose-6-phosphate synthase	Vv11s0037g00720	2.2	1	2.1
<u>Signalling</u>				
Protein phosphatase 2C	Vv00s0179g00140	4	1	4
Protein phosphatase 2C	Vv11s0016g03180	4	1	3
SNF1-related protein kinase	Vv03s0038g04580	3	1.1	4
CaM-stimulated protein kinase	Vv18s0001g06180	5	1.1	6
Calmodulin	Vv17s0000g02480	2.3	0.9	2.3
Calmodulin	Vv01s0010g02950	3	0.8	3.5
Calmodulin	Vv16s0100g00620	2	0.9	2
<u>Secondary metabolism</u>				
Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase	Vv19s0085g00750	4	1	3
Flavanone 3-hydroxylase	Vv18s0001g03510	4	1	4
<u>Stress</u>				
Heat stress transcription factor	Vv00s0179g00150	10	0.9	10
Pathogenesis-related protein	Vv06s0004g04010	3.5	0.8	3.5
17.2 kDa class II heat shock protein	Vv09s0002g00640	2.5	1	2.5
Aquaporin TIP1-1	Vv08s0007g04780	3.2	1.2	3.3
Desiccation-related protein	Vv05s0077g00610	2.1	1	2.1
Senescence-associated protein	Vv00s2814g00010	3	1.1	3
<u>Development</u>				
Late embryogenesis abundant protein	Vv13s0067g01250	5	1.2	5
Late embryogenesis abundant protein	Vv08s0007g06420	3	1.1	3
Late embryogenesis abundant protein	Vv16s0115g00170	4.5	1.1	5
<u>Transcription</u>				
AP2/ERF transcription factor	Vv07s0031g00720	34	0.7	34
AP2/ERF transcription factor	Vv04s0008g02230	5	0.9	6
AP2/ERF transcription factor	Vv15s0046g00310	2.5	1.1	3
DREB transcription factor	Vv18s0001g13320	7	1	7
Dehydration-responsive element-binding protein	Vv13s0067g01960	2,3	1	2.3
NAC transcription factor	Vv19s0014g03290	10	0.9	10
NAC transcription factor	Vv02s0236g00100	8	0.9	8
ABI5	Vv03s0063g00310	2,3	1	2.3

Table 3. Selected *VvABF2*-regulated genes from the clusters B, E, G and I, and associated to cell wall metabolism, secondary metabolism, hormonal metabolism and signalling, protein degradation, sugar metabolism and transport, transcriptional regulation, transport and stress response functional categories.

Name	ID	Ratio condition 1	Ratio condition 2	Ratio condition 3
<i>cell wall metabolism</i>				
Pectinesterase	Vv18s0001g12670	1	11	11
Pectinesterase	Vv16s0022g00710	1	8	8
Pectinesterase	Vv03s0038g04740	1	5	5
Polygalacturonase	Vv14s0066g01060	1	5.9	3.5
Rhamnogalacturonate lyase	Vv00s0346g00030	1	3.7	4
Expansin	Vv07s0005g02310	0.7	3	2
Endoglucanase	Vv02s0087g00930	0.8	0.25	0.25
Endoglucanase	Vv14s0036g01040	1	0.25	0.25
<i>Secondary metabolism</i>				
Flavonoid 5,3-O-glucosyltransferase	Vv18s0041g00900	0.8	7	5
Flavonoid 5,3-O-glucosyltransferase	Vv18s0041g00800	1	5	5
Flavonoid 5,3-O-glucosyltransferase	Vv18s0041g00970	0.8	3.5	3
Isoflavone reductase	Vv02s0033g00260	1	3.1	3.5
Dihydroflavonol 4-reductase	Vv02s0025g01260	1	3	2.9
Dihydroflavonol 4-reductase	Vv01s0011g03480	1	0.3	0.3
Isoflavone 2'-hydroxylase	Vv09s0002g06450	1	3.2	2
Laccase	Vv18s0164g00170	1.1	3.3	2
<i>Hormonal metabolism and signalling</i>				
Indole-3-acetic acid-amido synthetase	Vv12s0134g00230	0.9	12.5	8.8
Indole-3-acetic acid-amido synthetase	Vv01s0150g00300	0.7	3.7	3
AUX/IAA family protein	Vv05s0020g04690	0.9	6.5	4.6
SAUR family protein	Vv03s0038g01220	0.9	5.8	4.3
PIN family protein	Vv11s0052g00440	0.4	4.9	2.3
9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	Vv02s0087g00093	0.9	0.25	0.3
Serine/threonine-protein kinase BRI1-like	Vv16s0013g01500	1.1	3	3.7
Serine/threonine-protein kinase BRI1-like	Vv00s0316g00010	0.9	3.2	3.2
<i>Protein degradation:</i>				
F-box protein	Vv01s0011g0122	1	11	5
Ubiquitin family protein	Vv14s0219g00210	1	4.6	4.9
<i>Sugar transport and metabolism:</i>				
Vacuolar invertase	Vv16s0022g00670	1	3.1	3
Hexose carrier protein (HT4)	Vv16s0013g01950	1	3	3
Polyol transporter	Vv03s0063g02250	1	3.5	3.2

Table 3. Continued

Name	ID	Ratio condition 1	Ratio condition 2	Ratio condition 3
<i>Transport</i>				
Uncharacterized amino-acid permease	Vv18s0001g01850	1	3.6	3
Vacuolar amino acid transporter	Vv19s0027g01890	0.6	3	4
Peptide transporter PTR2	Vv18s0001g11280	1	4	3.5
MATE efflux family protein	Vv13s0064g00940	1	5.5	5.1
MATE efflux family protein	Vv16s0100g00460	0.7	10	4
Potassium transporter	Vv01s0011g03020	1	7.2	6
Potassium channel KAT3	Vv04s0008g04510	1.2	3	3
Aquaporin PIP1;1	Vv13s0067g00220	1	3.5	5
ABC transporter family protein	Vv19s0085g00060	1	0.01	0.01
MATE efflux family protein	Vv08s0056g00870	1	0.3	0.3
GDP-mannose transporter	Vv16s0022g00370	0.6	0.01	0.01
<i>Transcription</i>				
Ethylene-responsive transcription factor	Vv10s0003g00590	0.8	6	5
Homeobox-leucine zipper protein HB40	Vv04s0023g01330	1.1	8	10
MYB transcription factor MYB36	Vv11s0016g02780	0.8	4	5
Transcription factor bHLH68	Vv11s0016g03560	1	6	4.5
Dof zinc finger protein	Vv07s0255g00020	1	4.5	4
Dof zinc finger protein	Vv10s0003g00040	0.9	4.5	3
bHLH transcription factor	Vv00s0274g00070	0.8	0.3	0.3
bHLH transcription factor	Vv07s0205g00190	1	0.3	0.4
MYB transcription factor	Vv09s0070g00410	0.9	0.2	0.3
Homeobox-leucine zipper protein KNAT1	Vv18s0001g08380	0.8	0.2	0.2
<i>Stress response</i>				
Pathogenesis-related protein	Vv03s0088g00700	0.8	32	26
Pathogenesis-related protein	Vv08s0040g02170	1.1	4.5	4.5
Pathogenesis-related protein	Vv13s0147g00150	1.4	4	4.5
Endochitinase	Vv05s0094g00280	1.3	21	20
Endochitinase	Vv16s0050g02210	0.9	4	3.6
Peroxidase	Vv07s0104g01100	1.1	5	3.6
Peroxidase	Vv10s0116g00340	1	5	4.2
Heat shock protein	Vv19s0014g03420	0.9	28	23
Accelerated cell death	Vv14s0081g00350	1	3	3.3
Peroxidase	Vv11s0016g05280	0.6	0.3	0.2
Pathogenesis-related protein	Vv18s0041g02190	1.1	0.3	0.3
protein kinase-coding resistance protein-like	Vv12s0028g01850	0.8	0.2	0.2

Table 4. Selected genes transcriptionally regulated in *VvABF2*-overexpressing cells treated by ABA, belonging to the clusters C, F and H, and associated to secondary metabolism, hormonal metabolism and signalling, protein degradation, transport, transcriptional regulation and stress response functional categories.

Name	ID	Ratio condition 1	Ratio condition 2	Ratio condition 3
<i>Secondary metabolism</i>				
Stilbene synthase	Vv10s0042g00840	1.2	2.8	5.5
Stilbene synthase	Vv16s0100g00780	1.5	2.2	6.5
Stilbene synthase	Vv16s0100g01020	1.7	1.3	13
Stilbene synthase	Vv16s0100g00960	1.6	1.3	8
Cinnamate 4-hydroxylase	Vv11s0078g00290	1.8	1.3	7
Cinnamate 4-hydroxylase	Vv11s0065g00350	2	1.3	13
Cinnamyl alcohol dehydrogenase	Vv18s0122g00450	1.4	3.2	5
Phenylalanine ammonia-lyase	Vv16s0039g01170	2	0.9	6
Phenylalanine ammonia-lyase	Vv16s0039g01320	2.1	0.9	5
Phenylalanine ammonia-lyase	Vv00s2508g00010	2.1	0.8	4.5
Phenylalanine ammonia-lyase	Vv08s0040g01710	1.6	0.9	3
<i>Hormonal metabolism and signalling</i>				
AUX/IAA family protein	Vv11s0016g04490	1.8	1.5	3
1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	Vv18s0001g01840	1.1	12	19
Gibberellin receptor <i>GID1</i>	Vv01s0011g03270	1.2	3.6	10
Gibberellin 2-oxidase	Vv19s0140g00120	3.5	2.3	8
Abscisic acid 8'-hydroxylase	Vv06s0004g05050	1.9	1.1	3
Cytokinin-O-glucosyltransferase	Vv13s0019g03120	1.2	1.6	3.5
Serine/threonine-protein kinase <i>BRI1</i> -like	Vv09s0018g00780	1.3	1.3	4.5
<i>Protein degradation:</i>				
F-box protein	Vv00s1386g00020	1.1	1	22
F-box protein	Vv10s0116g01290	1.2	1	19
ubiquitin-protein ligase	Vv08s0105g00190	2.7	1	11
ubiquitin-protein ligase	Vv18s0166g00190	1.2	0.8	3
cupin superfamily protein	Vv07s0005g04620	1	1.2	3
RING-H2 finger protein	Vv05s0077g01970	2	0.8	3.7
<i>Transport:</i>				
ABC transporter G family member	Vv06s0061g01490	1.5	1.1	4
Glutamate receptor	Vv05s0051g00780	1.5	1	3
Amino acid transporter	Vv03s0038g03530	1.2	1.1	3

Table 4. Continued

Name	ID	Ratio condition 1	Ratio condition 2	Ratio condition 3
<i>Transcription:</i>				
Ethylene-responsive transcription factor	Vv03s0063g00460	9	0.6	16
Dehydration-responsive element-binding protein	Vv17s0000g07940	8.6	1	14
Dehydration-responsive element-binding protein	Vv02s0025g04460	6.5	1	11
Dehydration-responsive element-binding protein	Vv16s0100g00380	2.1	1	4
WRKY 40 DNA-binding protein	Vv09s0018g00240	9	0.9	21
WRKY 33 DNA-binding protein	Vv08s0058g00690	4.5	0.7	14
WRKY 28 DNA-binding protein	Vv10s0003g02810	3.6	3.1	13
WRKY 53 DNA-binding protein	Vv02s0025g01280	1.3	1.1	3.5
Zinc finger transcription factor	Vv03s0091g00690	6	0.6	13
Zinc finger transcription factor	Vv18s0001g09230	2.1	1.1	4
Homeobox-leucine zipper protein HAT22	Vv00s0732g00010	1.2	1.4	3
Leucine zipper protein-like protein	Vv00s0317g00140	2.3	1.6	3.7
Transcription factor MYB102	Vv00s0203g00070	3.6	2	9.2
MYB transcription factor VIMYBB1-1	Vv05s0049g01020	1.8	0.7	3
Transcription factor MYB108	Vv05s0077g00500	1.8	0.8	2.7
Ethylene-responsive transcription factor	Vv09s0002g09140	0.5	0.6	0.3
MYB transcription factor	Vv01s0026g01050	0.6	0.5	0.3
MYB transcription factor	Vv14s0083g00120	0.6	0.4	0.2
Zinc finger transcription factor	Vv02s0012g01190	0.4	0.4	0.2
<i>Stress :</i>				
Pathogenesis-related protein	Vv00s0934g00010	1.2	1.6	4
Pathogenesis-related protein	Vv14s0081g00030	1.6	1.4	4
Endochitinase	Vv07s0005g02560	1.1	3.2	9
Endochitinase	Vv05s0094g00320	3	0.6	7
Peroxidase	Vv12s0055g01020	2	1.1	9
stress-induced receptor-like kinase	Vv16s0098g00220	2	1	11
Putative LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	Vv18s0166g00070	2.1	1	20

REFERENCES

- Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni J** (2004) Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science* **9**: 331-338.
- Altschul S, Madden T, Schaffer A** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Antolín MC, Baigorri H, De Luis I, Aguirrezábal F, Geny L, Broquedis M, Sánchez-Díaz M** (2003) ABA during reproductive development in non-irrigated grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo). *Aust J Grape Wine Res* **9**: 169-176.
- Antoni R, Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Rodriguez PL** (2011) News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signaling. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 547-553
- Ban T, Ishimaru M, Kobayashi S, Goto-Yamamoto SN, Horiuchi S** (2003) Abscisic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in 'Kyoho' grape berries. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **78**: 586-589.
- Bastías A, López-Climent M, Valcárcel M, Rosello S, Gómez-Cadenas A, Casaretto JA** (2011) Modulation of organic acids and sugar content in tomato fruits by an abscisic acid-regulated transcription factor. *Physiol Plant* **141**: 215-26.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Benjamini Y and Hochberg Y** (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* **57**: 289-300.
- Böttcher C, Keyzers RA, Boss PK, Davies C** (2010) Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *J Exp Bot* **61**: 3615-3625.
- Böttcher C, Boss PK, Davies C** (2011) Acyl substrate preferences of an IAA-amido synthetase account for variations in grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening caused by different auxinic compounds indicating the importance of auxin conjugation in plant development. *J Exp Bot* **62**: 4267-4280.
- Buchanan CD, Lim S, Salzman RA, Kagiampakis I, Morishige DT, Weers BD, Klein RR, Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM, Klein PE, Mullet JE** (2005) *Sorghum bicolor's*

- transcriptome response to dehydration, high salinity and ABA. *Plant Mol Biol* **58**: 699-720.
- Carvalho B and Irizarry R** (2010) A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* **26**: 2363-2367.
- Chae MJ, Lee JS, Nam MH, Cho K, Hong JY, Yi SA, Suh SC, Yoon IS** (2007) A rice dehydration-inducible SNF1-related protein kinase 2 phosphorylates an abscisic acid responsive element-binding factor and associates with ABA signaling. *Plant Mol Biol* **63**: 151-169.
- Chai YM, Jia HF, Li CL, Dong QH, Shen YY** (2011) FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *J Exp Bot* **62**: 5079-5089.
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan JP, Latche A, Lamon J, Bouzayen M** (2004) Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Sci* **167**: 1301-1305.
- Chervin C, Tira-Umphon A, Terrier N, Zouine M, Severac D, Roustan JP** (2008) Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Physiol Plant* **134**: 534-546.
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim S** (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem* **275** : 1723-1730.
- Coombe BG and Hale CR** (1973) The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiol* **51**: 629-634.
- Coombe BG** (1992) Research on Development and Ripening of the Grape Berry. *Am J Enol Vitic* **43**: 101-110.
- Corrêa LG, Riaño-Pachón DM, Schrago CG, dos Santos RV, Mueller-Roeber B, Vincentz M** (2008) The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS One* **3**, e2944.
- Coutos-Thévenot P, Goebel-Tourand I, Mauro MC, Jouanneau JP, Boulay M, Deloire A, Guern J** (1992a) Somatic embryogenesis from grapevine cells. I. Improvement of embryo development by changes in culture conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **29**: 125–133.
- Coutos-Thévenot P, Maës O, Jouenne T, Mauro MC, Boulay M, Deloire A, Guern J** (1992b) Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. *Plant Science* **86**: 137–145.
- Cuéllar T, Pascaud F, Verdeil JL, Torregrosa L, Adam-Blondon AF, Thibaud JB, Sentenac H, Gaillard I** (2010) A grapevine Shaker inward K(+) channel activated by the

- calcineurin B-like calcium sensor 1-protein kinase CIPK23 network is expressed in grape berries under drought stress conditions. *Plant J* **61**: 58-69.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651–679.
- Davies C, Boss PK, Robinson SP** (1997) Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiol* **115**: 1155-1161.
- Davies C and Robinson SP** (2000) Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening: cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol* **122**: 803-812.
- Davies C, Shin R, Liu W, Thomas MR, Schachtman DP** (2006) Transporters expressed during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development are associated with an increase in berry size and berry potassium accumulation. *J Exp Bot* **57**: 3209-3216.
- Deluc LG, Quilici DR, Decendit A, Grimplet J, Wheatley MD, Schlauch KA, Merillon JM, Cushman JC, Cramer GR** (2009) Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics* **10**: 212.
- Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ** (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* **127**: 159-172.
- Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park SY, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu JK** (2009) In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462**: 660-664.
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell* **17**: 3470-3488.
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**: 1988-1993.
- Gambetta GA, Matthews MA, Shaghasi TH, McElrone AJ, Castellarin SD** (2010) Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape. *Planta* **232**: 219-234.

- Gentleman R, Carey V, Bates D, Bolstad B** (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* **5**(10): R80.
- Giovannoni, J** (2001) Molecular regulation of fruit ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52** : 725-749.
- Giovannoni JJ** (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* **16**: S170-S180.
- Giovannoni JJ** (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 283-289.
- Giribaldi M, Geny L, Delrot S, Schubert A** (2010) Proteomic analysis of the effects of ABA treatments on ripening *Vitis vinifera* berries. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2447-2458.
- Gomez C, Terrier N, Torregrosa L, Vialet S, Fournier-Level A, Verries C, Souquet JM, Mazauric JP, Klein M, Cheynier V, Ageorges A** (2009) Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters. *Plant Physiol* **150**: 402-415.
- Gomez-Porras JL, Riano-Pachon DM, Dreyer I, Mayer JE, Mueller-Roeber B** (2007) Genome-wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in *Arabidopsis* and rice. *BMC Genomics* **8**: 260-273.
- Gonzalez N, Gévaudant F, Hernould M, Chevalier C, Mouras A** (2007) The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit. *Plant J* **51**: 642-655
- Hardtke CS** (2007) Transcriptional auxin-brassinosteroid crosstalk: who's talking? *Bioessays* **29**: 1115-1123.
- Harker FR, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH, Carter G** (1997) Texture of fresh fruit. *Horticultural Reviews* **20**: 121-124.
- Hattori T, Totsuka M, Hobo T, Kagaya Y, Yamamoto-Toyoda A** (2002) Experimentally determined sequence requirement of ACGT-containing abscisic acid response element. *Plant Cell Physiol* **43**: 136-140.
- Hossain M, Lee Y, Cho JI, Ahn CH, Lee SK, Jeon JS, Kang H, Lee CH, An G, Park PB** (2010) The bZIP transcription factor OsABF1 is an ABA responsive element binding factor that enhances abiotic stress signaling in rice. *Plant Mol Biol* **72**: 557-566.

- Hosy E, Duby G, Véry A, Costa A, Sentenac H, Thibaud JB** (2005) A procedure for localisation and electrophysiological characterisation of ion channels heterologously expressed in a plant context. *Plant Methods* **1**: 14.
- Hunter S, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Binns D, Bork P, et al.** (2009) InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic acids research* **37**: 211-215.
- Jacoby M, Weisshaar B, Droege-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F** (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **7**: 106-111.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901-3907
- Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M** (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.
- Jia HF, Chai YM, Li CL, Lu D, Luo JJ, Qin L, Shen YY** (2011) Abscisic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening. *Plant Physiol* **157**: 188-199.
- Jiang Y, Joyce DC, Macnish AJ** (2000) Effect of abscisic acid on banana fruit ripening in relation to the role of ethylene. *J Plant Growth Regul* **19**: 106-111.
- Kang J, Choi H, Im MY, Kim SY** (2002) Arabidopsis basic leucine zipper proteins mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* **14**: 343-357.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**: 193-195.
- 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. *Plant Cell* **12**: 2247-2258.
- Kim S, Kang JY, Cho DI, Park JH, Kim SY** (2004) ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J.* **40**: 75-87.
- Kobashi K, Gemma H, Iwahori S** (1999) Sugar accumulation in peach fruit as affected by abscisic acid treatment in relation to some sugar metabolizing enzymes. *J Jpn Soc Hortic Sci* **68**: 465-470.
- Koyama K, Sadamatsu K, Goto-Yamamoto N** (2010) Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Functional and Integrative Genomics* **10**: 367-381.

- Lecourieux F, Lecourieux D, Vignault C, Delrot S** (2010) A sugar-inducible protein kinase, VvSK1, regulates hexose transport and sugar accumulation in grape cells. *Plant Physiol* **152**: 1096-1106
- Li X, Xu CJ, Korban SS, Chen KS** (2010) Regulatory mechanisms of textural changes in ripening fruits. *Critical Reviews in Plant Sciences* **29**: 222-243.
- Liu H and Stone SL** (2010) Abscisic acid increases Arabidopsis ABI5 transcription factor levels by promoting KEG E3 ligase self-ubiquitination and proteasomal degradation. *The Plant Cell* **22**: 2630-2641.
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu WH, Ma L** (2007) A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* **315**: 1712-1716.
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E** (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324**: 1064-1068.
- Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E, Endo TA, Okamoto M, Nambara E, Nakajima M, Kawashima M, Satou M, Kim JM, Kobayashi N, Toyoda T, Shinozaki K, Seki M** (2008) *Arabidopsis* transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiol* **49**:1135-1149.
- Mauro MC, Toutain S, Walter B, Pinck L, Otten L, Coutos-Thévenot P, Deloire A, Barbier P** (1995) High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Sci* **112**: 97–106
- Melcher K, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Xu Y, Suino-Powell KM, Park SY, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, et al.** (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462**: 602-608.
- Miyazono K, Miyakawa T, Sawano Y, Kubota K, Kang HJ, Asano A, Miyauchi Y, Takahashi M, Zhi Y, Fujita Y, et al.** (2009) Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* **462**: 609-614.
- Mok MC** (1994) Cytokinins and plant development: An overview. In *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*, D.W.S Mok and M.C. Mok, eds (Boca Raton, FL: CRC Press), pp. 155–156.
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, et al.** (2009) Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol* **50**: 1345-1363.

- Nemhauser JL, Hong F, Chory J** (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **126**: 467-475.
- Nishimura N, Yoshida T, Kitahata N, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T** (2007) ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant J* **50**: 935-949.
- Nishimura N, Hitomi K, Arvai AS, Rambo RP, Hitomi C, Cutler SR, Schroeder JI, Getzoff ED** (2009) Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* **326**: 1373-1379.
- Ostergaard L, Lauvergeat V, Naested H, Mattsson O, Mundy J** (2001) Two differentially regulated Arabidopsis genes define a new branch of the DFR superfamily. *Plant Sci* **160**: 463-472.
- Pan QH, Li MJ, Peng CC, Zhang N, Zou X, Zou KQ, Wang XL, Yu XC, Wang XF, Zhang DP** (2005) Abscisic acid activates acid invertases in developing grape berry. *Physiol Plant* **125**: 157-170.
- Pandey S, Nelson DC, Assmann SM** (2009) Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis. *Cell* **136**: 136-148.
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, et al.** (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**: 1068-1071.
- Peppi MC, Fidelibus MW, Dokoozlian, N** (2006) Abscisic acid application timing and concentration affect firmness, pigmentation, and color of 'Flame Seedless' grapes. *Hortic Sci* **41**: 1440-1445.
- Pilati S, Perazzolli M, Malossini A, Cestaro A, Demattè L, Fontana P, Dal Ri A, Viola R, Velasco R, Moser C** (2007). Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison. *BMC Genomics* **8**: 428.
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol* **133**:1755-1767.
- Ribèreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A** (2000) The grape and its maturation. In: *Handbook of enology*. Vol. I. John Wiley and Sons, Ltd 219-255.

- Richings EW, Cripps RF, Cowan AK** (2000) Factors affecting 'Hass' avocado fruit size: carbohydrate, abscisic acid and sopenoid metabolism in normal and phenotypically small fruit. *Physiol Plant* **109**: 81-89.
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Alférez F, Mallent MD, Zacarias L** (2003) Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruitspecific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J Exp Bot* **54**: 727-738
- Santiago J, Dupeux F, Round A, Antoni R, Park SY, Jamin M, Cutler SR, Rodriguez PL, Marquez JA** (2009) The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* **462**: 665-668.
- Scienza A, Miravalle CV, Fregoni M** (1978) Relationships between seed number, gibberellin and abscisic acid levels and ripening in 'Cabernet Sauvignon' grape berries. *Vitis* **17**: 361-368.
- Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression pattern of around 7, 000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct Integr Genomics* **2**: 282-291.
- Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA** (1993) *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman and Hall, London.
- Shang Y, Yan L, Liu ZQ, Cao Z, Mei C, Xin Q, Wu FQ, Wang XF, Du SY, Jiang T, Zhang XF, Zhao R, Sun HL, Liu R, Yu YT, Zhang DP** (2010) The Mg-chelatase H subunit of *Arabidopsis* antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. *Plant Cell* **22**: 1909-1935.
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, et al.** (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**: 823-826.
- Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* **58**: 221-227.
- Smalle J, and Vierstra RD** (2004) The ubiquitin 26s proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **55**: 555-590.
- Smyth GK** (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* **3**: Article 3.

- Sun L, Wang YP, Chen P, Ren J, Ji K, Li Q, Li P, Dai SJ, Ping Leng P** (2011) Transcriptional regulation of *SIPYL*, *SIPP2C*, and *SlSnRK2* gene families encoding ABA signal core components during tomato fruit development and drought stress. *J Exp Bot* doi: 10.1093/jxb/err252.
- Suzek BE, Huang H, McGarvey P, Mazumder R, Wu CH** (2007) UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters. *Bioinformatics* **23**: 1282-1288.
- Symons GM, Davies C, Shavrukov Y, Dry IB, Reid JB, Thomas MR** (2006) Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology* **140**, 150-158.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599.
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, et al.** (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.
- Thompson J D, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K** (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 17588-17593.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11632-11637.
- Usadel B, Nagel A, Thimm O, Redestig H, Blaesing OE, Palacios-Rojas N, Selbig J, et al.** (2005) Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant physiology* **138**: 1195-1204.
- Wang RS, Pandey S, Li S, Gookin TE, Zhao Z, Albert R Assmann SM** (2011) Common and unique elements of the ABA-regulated transcriptome of Arabidopsis guard cells. *BMC Genomics* **12**: 216.
- Weiner JJ, Peterson FC, Volkman BF, Cutler SR** (2010) Structural and functional insights into core ABA signaling. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 495-502.

- Wheeler S, Loveys B, Ford C, Davies C** (2009) The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **15**: 195-204.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 781-803.
- Yamaki S and Asakura T** (1991) Stimulation of the uptake of sorbitol into vacuoles from apple fruit flesh by abscisic acid and into protoplasts by indoleacetic acid. *Plant Cell Physiol* **32**: 315-318.
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* **61**: 672-685
- Yu XC, Li MJ, Gao GF, Feng HZ, Geng XQ, Peng CC, Zhu SY, Wang XJ, Shen YY, Zhang DP** (2006) Abscisic acid stimulates a calcium-dependent protein kinase in grape berry. *Plant Physiol* **140**: 558-579.
- Zhang M, Leng P, Zhang G, Li X** (2009a) Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1241-1252.
- Zhang M, Yuan B, Leng P** (2009b) The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1579-1588.
- Zhang S, Cai Z, Wang X** (2009) The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4543-4548
- Zhao J and Dixon RA** (2009) MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 2323-2340.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Table 1. PCR primers used to amplify gene and promoter -specific regions for cloning and expression analyses.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Sequence Analysis of VvABF2

Full-length sequence comparison of VvABF2 and its closest homologs from *Arabidopsis thaliana*: AtABF2 (AAF27180.1), AtABF3 (AAF27181.1), AtABF4 (AAF27182.1) and AtABF1 (AAF27179.1), using the ClustalW program. Conserved residues are shaded in black, conserved residues in 4 out of 5 of the sequences are indicated in dark gray shading, and conserved residues in 3 out of 5 of the sequences are shown by a light gray shading. The basic region and the leucine repeats are indicated by open squares and arrows, respectively. Glutamine-rich region, commonly found in transcriptional activation domains, are underlined (dashed line) for VvABF2. The recognition sites for calmodulin-dependent protein kinase II (XRXXSX) and casein kinase II (X(S/T)XX(D/E)X) are indicated, respectively, by grey and black lines on the top of the alignment. Putative phosphorylated amino acids in VvABF2 sequence are shown by stars.

Figure 2. Phylogenetic Analysis of VvABF2.

The phylogenetic tree represents VvABF2 (black circle) and its homologs (bold) from A subgroup of b-ZIP transcription factor in *Arabidopsis thaliana* (At) and *Vitis vinifera* (Vv). The closest homolog of VvABF2 from *Solanum lycopersicum* (SlAREB1; Bastias *et al.*, 2010), and representative *A. thaliana* b-ZIP transcription factors from other b-ZIP sub-groups (Subgroup G/AtGBF2; H/AtHY5. I/AtbZIP29; E/AtbZIP34; D/AtTGA3; S/AtATB2; B/bZIP28; C/AtBZO2H2) are also reported. The different b-ZIP gene subfamily numbers and accession numbers are as described by Jacoby *et al.* (2002) and Guedes Corrêa *et al.* (2008). The phylogenetic tree was constructed using MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007) using the Neighbor Joining method with 2.000 bootstrap replicates.

Figure 3. Quantitative Real-Time PCR Analysis of *VvABF2* Expression Patterns in Grapevine cv. Cabernet Sauvignon plants and ABA treated cells.

(A) *VvABF2* expression in grapevine organs: roots (R), stem (S), leaves (L), inflorescences (I) and ripening berries at 11 weeks after flowering (RB). Error bars were calculated as SD for three independent experiments. Gene expression was normalized with *VvEF1γ*.

(B) *VvABF2* expression at different stages of berry development, from 2 weeks after flowering (WAF) to mature berries at 15 WAF. The arrow indicates the *véraison* stage. Error bars were calculated as SD for 4 replicates from 2 independent experiments (summer 2006 and 2009). Gene expression was normalized with *VvEF1γ*.

(C) *VvABF2* expression in different tissues from ripening berries at 11 weeks after flowering (WAF). Error bars were calculated as SD for three independent experiments. Gene expression was normalized with *VvEF1γ*.

(D) *VvABF2* transcript accumulation after treatment with 20 μ M ABA in Cabernet Sauvignon suspension cells. Error bars were calculated as SD for three independent experiments. Gene expression was normalized with *VvEF1γ*.

Figure 4. Subcellular Localisation and trans-Activation Ability of *VvABF2*

(A) Nuclear localization of GFP-*VvABF2* fusion protein in tobacco leaves protoplasts. These confocal microscopy images indicate from left to right, the same transformed protoplast under bright light exposure, red chlorophyll auto-fluorescence and fluorescence of the GFP-*VvABF2* product, respectively.

(B) Promoter activation by *VvABF2* of selected ABA-regulated genes (Wang *et al.*, 2011): *VvLEA* (Vv08s0007g04240), *VvRD26* (Vv09s0002g02450) and *VvBenzoR* (Vv07s0005g00140), in tobacco protoplasts. 35S::GUS is used as a positive control. Open bars indicate GUS activity without additional construct or treatment, grey solid bars indicate GUS activity after transformation with 35S::*VvABF2* construct, white dotted bars indicate GUS activity after 20 μ M ABA treatment and black solid bars indicate GUS activity after transformation with 35S::*VvABF2* construct coupled with 20 μ M ABA treatment, respectively. Data from three independent experiments were pooled and analyzed. Error bars indicate SD.

Figure 5. Relative Expression Level of *VvABF2* Transcript Accumulation in Transgenic Grape 41B Cells.

VvABF2 transcript level was assessed by quantitative real-time PCR in control (pFB8 empty vector) and *VvABF2*-overexpressing (35S::*VvABF2*) 41B cell lines, treated or not with 20 μ M ABA during 1h. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* . Data are means of three independent experiments indicating SD.

Figure 6. Overlap, expression profiles clustering and functional categorization of the 1722 differentially expressed genes in the three experimental conditions.

(A) Three-way Venn diagram showing the overlap of differentially expressed genes in the three experimental conditions: condition 1 (Control + ABA vs control), condition 2 (35S::*VvABF2* vs control) and condition 3 (35S::*VvABF2* + ABA vs control).

(B) Ten cluster have been created using MapMan (Thimm *et al.*, 2004) on transcript ratios for the 1722 differentially expressed genes under condition 1, condition 2 and condition 3.

(C) Classification of the 1722 differentially expressed genes within selected MapMan ontology classes. X axis indicates the number of genes within the different functional categories (Y axis) for each condition: condition 1, condition 2 and condition 3.

Figure 7. Mature Fruit Phenotypes of *VvABF2*-Overexpressing Tomato Plants.

(A) Quantitative Real-Time PCR Analysis of *VvABF2* transcript accumulation in control (pFB8 empty vector) and *VvABF2*-overexpressing tomato lines (L1, L2, L3, L4 and L5). Gene expression was normalized with *SIEiF α* . Data are means three replicates indicating SD.

(B) *VvABF2* overexpression in tomato plants affects fruit firmness during ripening. Fruits were analyzed at 20 days after turning in both control (pFB8 empty vector) and L3 *VvABF2*-overexpressing line (35S::*VvABF2*).

Figure 1

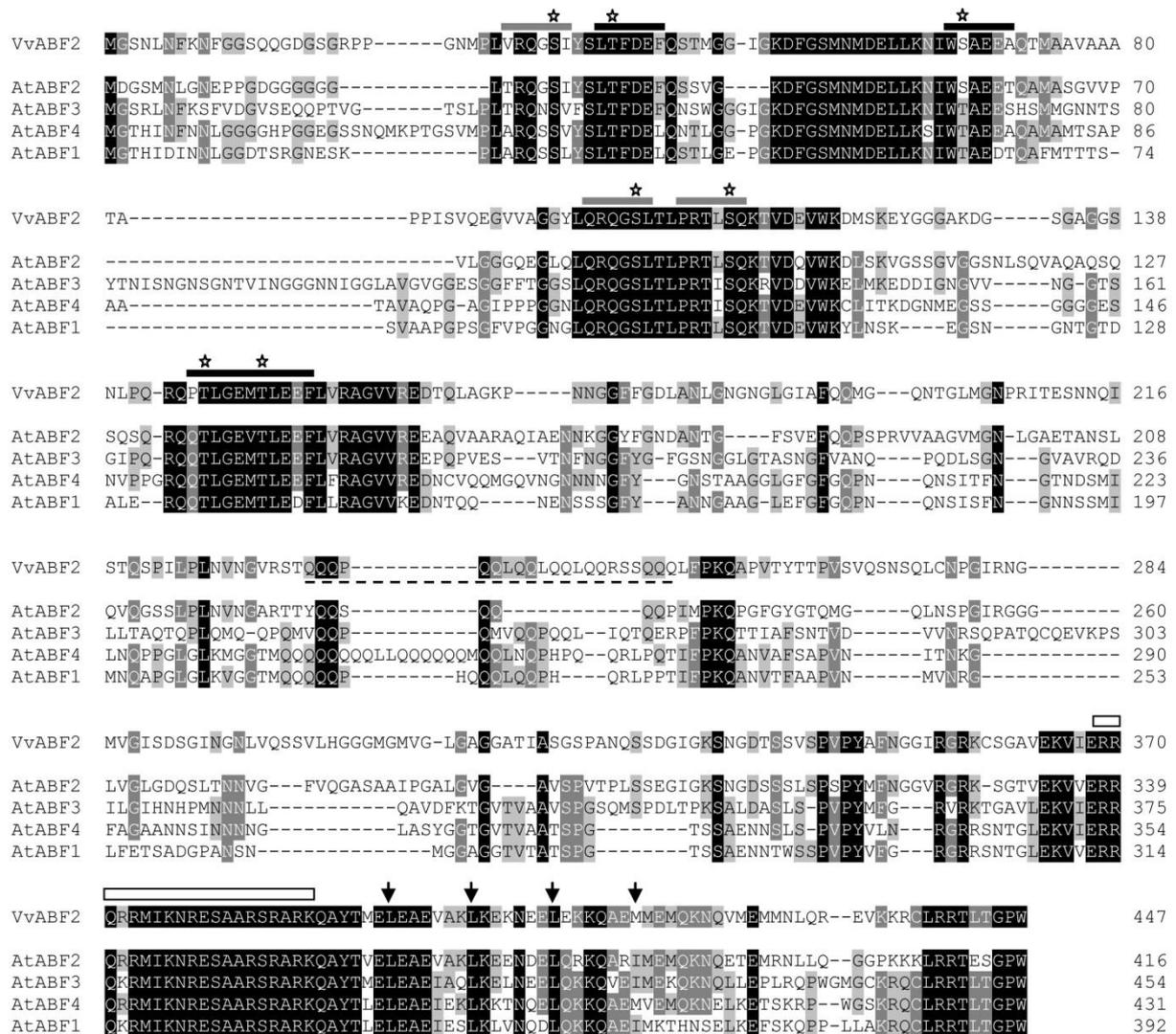


Figure 1. Sequence Analysis of VvABF2.

Full-length sequence comparison of VvABF2 and its closest homologs from *Arabidopsis thaliana*: AtABF2 (AAF27180.1), AtABF3 (AAF27181.1), AtABF4 (AAF27182.1) and AtABF1 (AAF27179.1), using the ClustalW program. Conserved residues are shaded in black, conserved residues in 4 out of 5 of the sequences are indicated in dark gray shading, and conserved residues in 3 out of 5 of the sequences are shown by a light gray shading. The basic region and the leucine repeats are indicated by open squares and arrows, respectively. Glutamine-rich region, commonly found in transcriptional activation domains, are underlined (dashed line) for VvABF2. The recognition sites for calmodulin-dependent protein kinase II (XRXXXS) and casein kinase II (X(S/T)XX(D/E)X) are indicated, respectively, by grey and black lines on the top of the alignment. Putative phosphorylated amino acids in VvABF2 sequence are shown by stars.

Figure 2

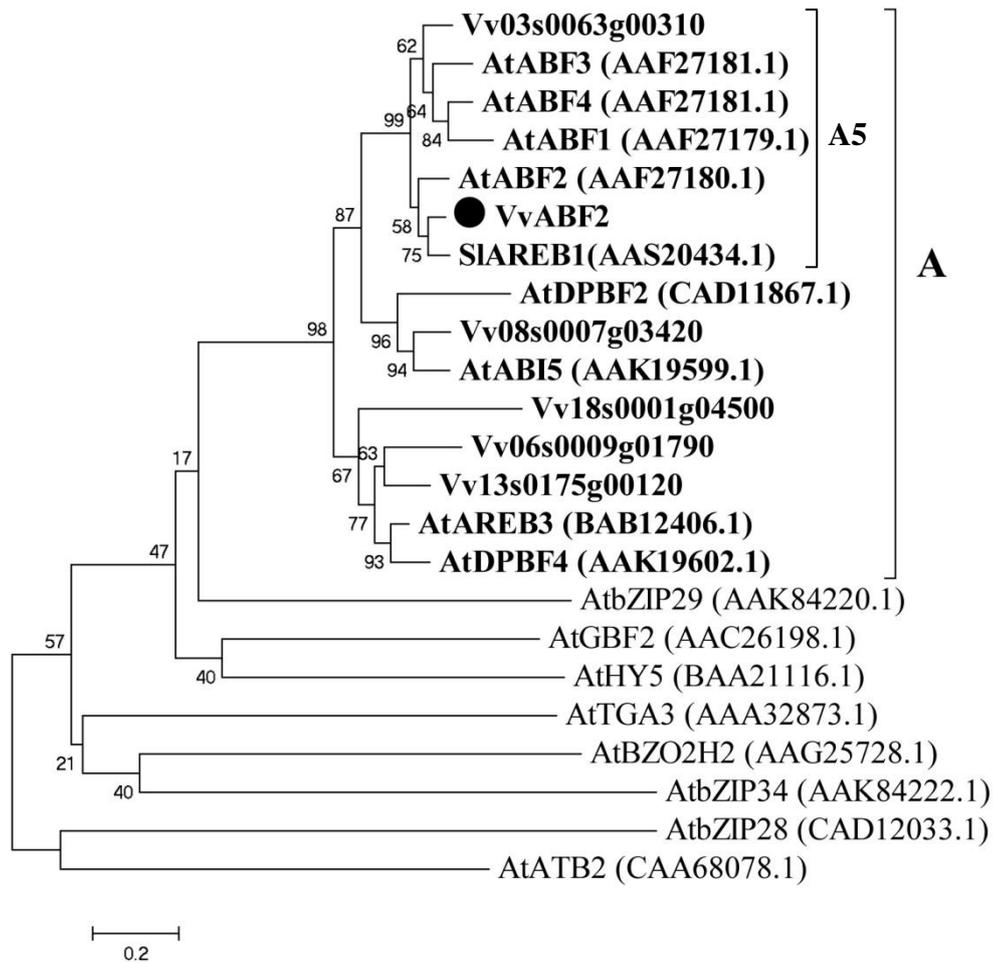


Figure 2. Phylogenetic Analysis of VvABF2.

The phylogenetic tree represents VvABF2 (black circle) and its homologs (bold) from A subgroup of b-ZIP transcription factor in *Arabidopsis thaliana* (At) and *Vitis vinifera* (Vv). The closest homolog of VvABF2 from *Solanum lycopersicum* (SIAREB1; Bastias *et al.*, 2010), and representative *A. thaliana* b-ZIP transcription factors from other b-ZIP sub-groups (Subgroup G/AtGBF2; H/AtHY5. I/AtbZIP29; E/AtbZIP34; D/AtTGA3; S/AtATB2; B/bZIP28; C/AtBZO2H2) are also reported. The different b-ZIP gene subfamily numbers and accession numbers are as described by Jacoby *et al.* (2002) and Guedes Corrêa *et al.* (2008). The phylogenetic tree was constructed using MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007) using the Neighbor Joining method with 2.000 bootstrap replicates.

Figure 3

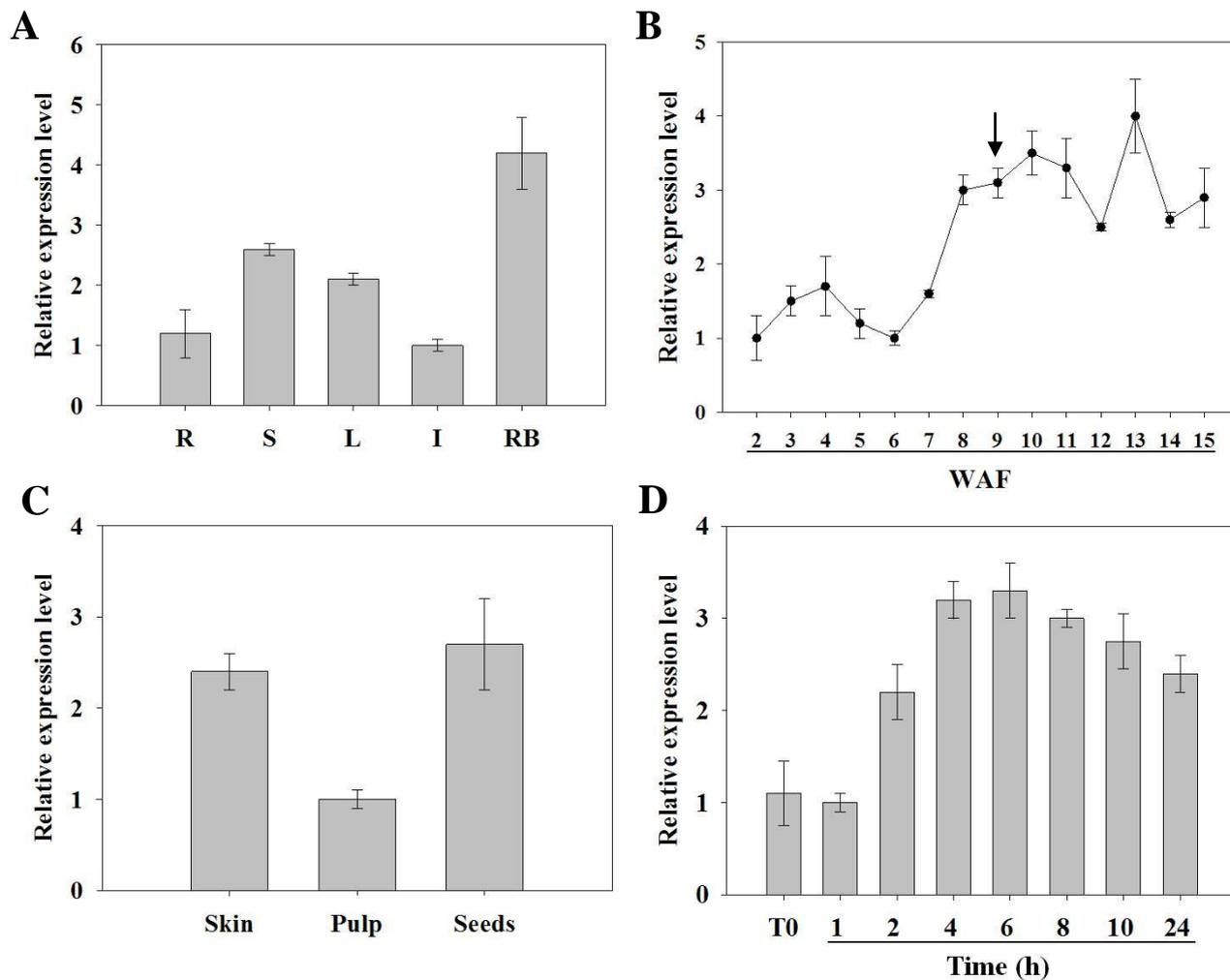


Figure 3. Quantitative Real-Time PCR Analysis of *VvABF2* Expression Patterns in Grapevine cv. Cabernet Sauvignon plants and ABA treated cells.

(A) *VvABF2* expression in grapevine organs: roots (R), stem (S), leaves (L), inflorescences (I) and ripening berries at 11 weeks after flowering (RB). Error bars were calculated as SD for three independent experiments. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* .

(B) *VvABF2* expression at different stages of berry development, from 2 weeks after flowering (WAF) to mature berries at 15 WAF. The arrow indicates the *véraison* stage. Error bars were calculated as SD for 4 replicates from 2 independent experiments (summer 2006 and 2009). Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* .

(C) *VvABF2* expression in different tissues from ripening berries at 11 weeks after flowering (WAF). Error bars were calculated as SD for three independent experiments. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* .

(D) *VvABF2* transcript accumulation after treatment with 20 μ M ABA in Cabernet Sauvignon suspension cells. Error bars were calculated as SD for three independent experiments. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* .

Figure 4

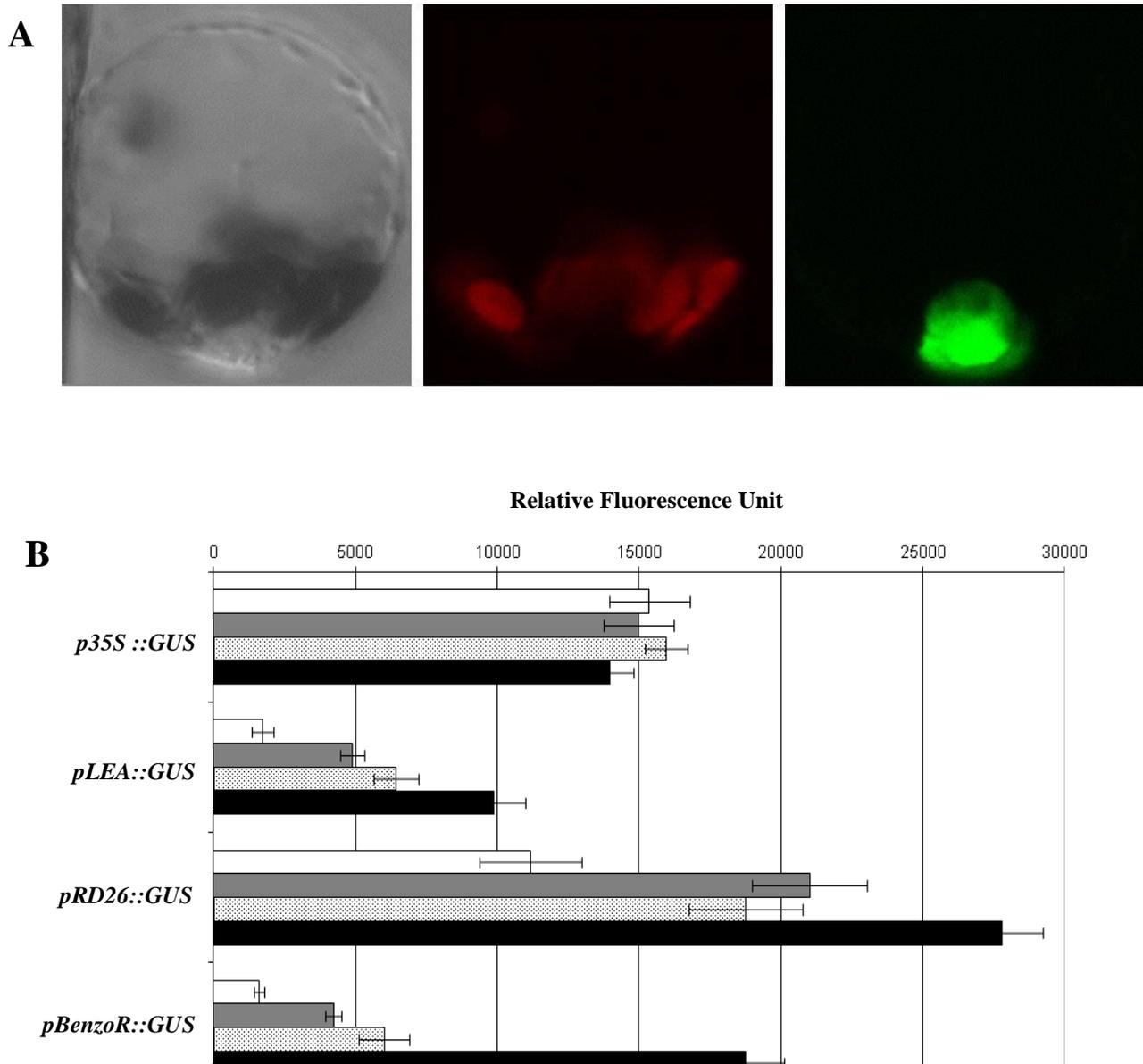


Figure 4. Subcellular Localisation and trans-Activation Ability of VvABF2

(A) Nuclear localization of GFP-VvABF2 fusion protein in tobacco leaf protoplasts. These confocal microscopy images indicate from left to right, the same transformed protoplast under bright light exposure, red chlorophyll auto-fluorescence and fluorescence of the GFP-VvABF2 product, respectively.

(B) Promoter activation by VvABF2 of selected ABA-regulated genes (Wang *et al.*, 2011): *VvLEA* (Vv08s0007g04240), *VvRD26* (Vv09s0002g02450) and *VvBenzoR* (Vv07s0005g00140), in tobacco protoplasts. 35S::GUS is used as a positive control. Open bars indicate GUS activity without additional construct or treatment, grey solid bars indicate GUS activity after transformation with 35S::VvABF2 construct, white dotted bars indicate GUS activity after 20 μ M ABA treatment and black solid bars indicate GUS activity after transformation with 35S::VvABF2 construct coupled with 20 μ M ABA treatment, respectively. Data from three independent experiments were pooled and analyzed. Error bars indicate SD.

Figure 5

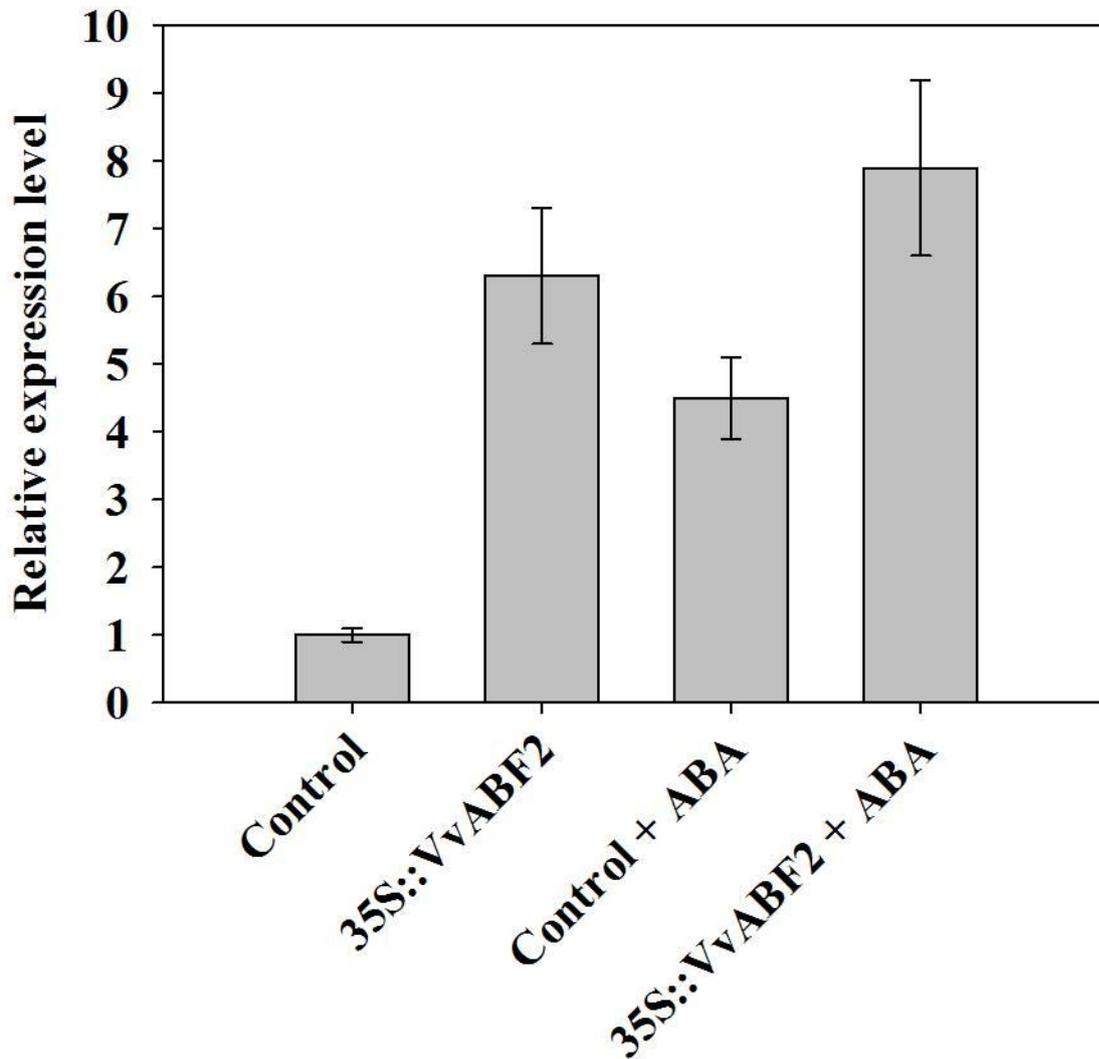


Figure 5. Relative Expression Level of *VvABF2* Transcript Accumulation in Transgenic Grape 41B Cells.

VvABF2 transcript level was assessed by quantitative real-time PCR in control (pFB8 empty vector) and *VvABF2*-overexpressing (35S::*VvABF2*) 41B cell lines, treated or not with 20 μ M ABA during 1h. Gene expression was normalized with *VvEF1 γ* . Data are means of three independent experiments indicating SD.

Figure 6

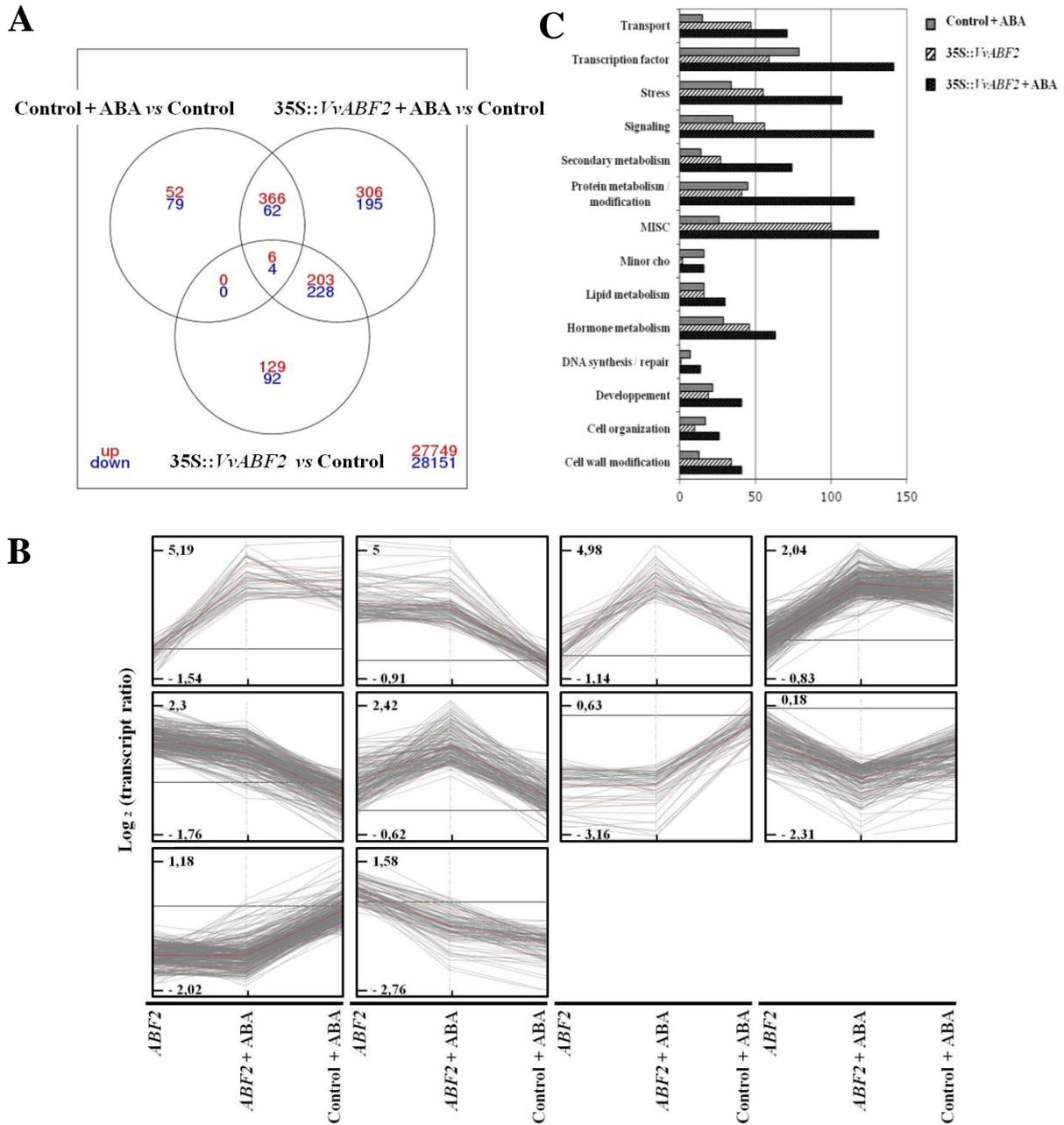


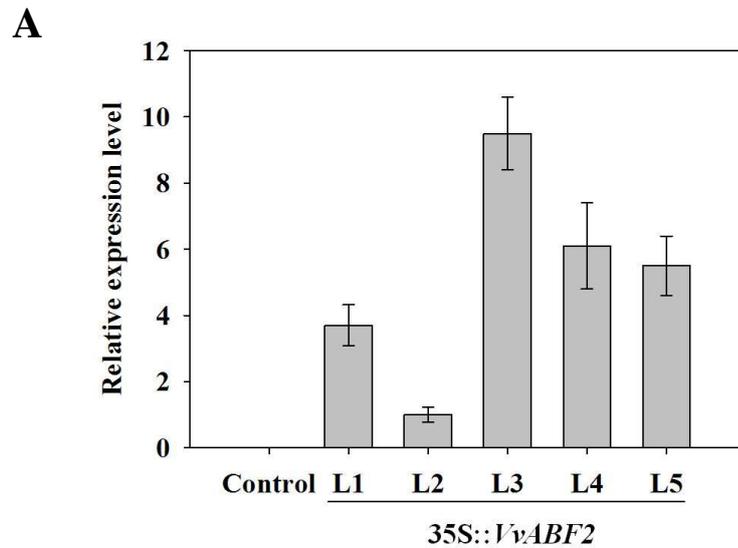
Figure 6. Overlap, expression profiles clustering and functional categorization of the 1722 differentially expressed genes in the three experimental conditions.

(A) Three-way Venn diagram showing the overlap of differentially expressed genes in the three experimental conditions: condition 1 (Control + ABA vs control), condition 2 (35S::*VvABF2* vs control) and condition 3 (35S::*VvABF2* + ABA vs control).

(B) Ten clusters have been created using MapMan (Thimm *et al.*, 2004) on transcript ratios for the 1722 differentially expressed genes under condition 1, condition 2 and condition 3.

(C) Classification of the 1722 differentially expressed genes within selected MapMan ontology classes. X axis indicates the number of genes within the different functional categories (Y axis) for each condition: condition 1, condition 2 and condition 3.

Figure 7



B



Figure 7. Mature Fruit Phenotypes of *VvABF2*-Overexpressing Tomato Plants.

(A) Quantitative Real-Time PCR Analysis of *VvABF2* transcript accumulation in control (pFB8 empty vector) and *VvABF2*-overexpressing tomato lines (L1, L2, L3, L4 and L5). Gene expression was normalized with *SLEiFα*. Data are means three replicates indicating SD.

(B) *VvABF2* overexpression in tomato plants affects fruit firmness during ripening. Fruits were analyzed at 20 days after turning in both control (pFB8 empty vector) and L3 *VvABF2*-overexpressing line (35S::*VvABF2*).

Table S1. PCR primers used to amplify gene and promoter -specific regions for cloning and expression analyses.

Name	Forward (F) and reverse (R) primer sequences
<i>VvABF2</i> (Cloning)	F 5'-TAGAATTCCCCGGGATGGGGAGTAATTTGAACTTCA AAAACTTC-3' R 5'-ATGGATCCCCCGGGCTAGCGGCCGCACCAGGGGCCAG TCAGTGTGCGTCTCAAGCAA -3'
<i>VvABF2</i> (QPCR)	F 5'-GGAGTTGGAAGCAGAGGTTG-3' F 5'- AGTGTGCGTCTCAAGCAACG-3'
<i>prVvRD26</i> (Cloning)	F 5'-TAAAGCTTAATTGACATTTCCCATTTAAAATC-3' F 5'- ATCTGCAGTTCCGGCGATGATGATGATGATG-3'
<i>prVvBenzoR</i> (Cloning)	F 5'-TAAAGCTTTCGCAATTCCAAATGTGCCCAATTTATAAAG-3' F 5'- ATCTGCAGGAAAAGAAGAAAAGAACAGAAAGAAAATA AGGTA -3'
<i>prVvLEA</i> (Cloning)	F 5'- TAAGCTTCTTCCAGTTATGCCATAAAATT -3' F 5'- ACTGCAGCATCCTCTCACACTCAAACAAAGAAATAT-3'
<i>VvEF1γ</i> (QPCR)	F 5'-CAAGAGAAACCATCCCTAGCTG-3' R 5'-TCAATCTGTCTAGGAAAGGAAG-3'
<i>SIEiF4α</i> (QPCR)	F 5'-AGTGGACGATTTGGAAGGAAG-3' R 5'-GCTCCTCGATTACGACGTTG-3'

Conclusions et perspectives



Photographie de grappes de raisin cv. cabernet sauvignon

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont eu pour objectif de mieux comprendre les phénomènes associés au développement et à la maturation de la baie de raisin. Plus précisément, nous avons choisi d'étudier des régulateurs majeurs de l'expression génique : les facteurs de transcription. Ces travaux ont permis d'identifier et d'isoler 5 facteurs de transcription de Vigne sensibles au sucre et présentant des profils d'expression intéressants au cours du développement de la baie. Parmi ces FT, deux ont été étudiés en détail : VvCEB1 qui est exprimé quasi-exclusivement dans la baie et VvABF2 qui est sensible à l'ABA, un régulateur clef de la maturation des fruits non climactériques.

Caractérisation fonctionnelle de VvCEB1, un FT exprimé spécifiquement dans la baie de raisin et potentiellement impliqué dans l'expansion cellulaire

Les fruits charnus d'une même espèce comme la vigne cultivée (*V. vinifera ssp sativa*), présentent une forte variabilité de taille (Bourisquot *et al.*, 1995). Cependant, malgré l'importance de la taille des baies pour le rendement ou la qualité de la vendange et des vins (Champagnol, 1998), l'étude des mécanismes impliqués est limitée. Chez la Tomate, moins de 10 *loci* semblent responsables de la majorité des changements de taille du fruit (Tanskley, 2004). Cette variabilité est principalement due à des différences dans la taille et le nombre des cellules et, dans une moindre mesure à celle du nombre de carpelles (Tanskley, 2004; Cheniclet *et al.*, 2005; Cong *et al.*, 2008). L'auxine produite par les graines et/ou leurs tissus adjacents, induit et accélère la croissance du fruit par expansion cellulaire (Gillaspy *et al.*, 1993; Lemaire-Chamley *et al.*, 2005). A ce jour, 3 gènes impliqués dans la variation de la masse du fruit ont été clonés chez la Tomate : *Fw2.2*, un régulateur négatif de la division cellulaire dans l'ovaire (Cong *et al.*, 2002), *fas* (*fasciated*) et *locule number* (*Lc*), qui contrôlent le nombre de carpelles dans la fleur (Cong *et al.*, 2008). Certains de ces gènes impliqués dans la variation de la taille du fruit ont également des effets pléiotropiques sur la forme du fruit, laquelle dépend à la fois des processus de division et d'expansion cellulaire (Tanskley, 2004). Deux autres loci, *Ovate* et *Sun* ont été associés à la forme du fruit et dans une moindre mesure à sa taille (Liu *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2008).

Chez la Vigne, Fernandez *et al.* (2006a) ont mis en évidence que la variabilité de taille entre différentes cépages est principalement due à une différence de taille cellulaire. De façon intéressante, un mutant naturel de *V. vinifera* cv. Ugni Blanc, produit des baies pour lesquelles la pulpe est quasiment inexistante. Chez ce mutant particulier, appelé *fleshless berry* (*flb*), la taille et le nombre de cellules de la pulpe sont affectés (Fernandez *et al.*,

2006b). Le gène responsable de cette mutation n'a pas été identifié (Houel *et al.*, 2010). D'autre part, peu d'études génétiques (QTL) concernant le déterminisme de la variation de la taille du fruit ont été réalisées chez la Vigne. Elles concernent majoritairement la détection de QTL dans les descendances issues de croisements avec des variétés apyrènes (Doligez *et al.*, 2002; Fanizza *et al.*, 2005; Cabezas *et al.*, 2006; Constantini *et al.*, 2008; Mejia *et al.*, 2007, 2011). Ces QTL sont souvent différents et montrent une instabilité dans les résultats selon les années étudiées et le phénotypage réalisé. A ce jour, aucun gène impliqué dans la régulation de la taille de la baie de raisin n'a été décrit dans la littérature. Toutefois, une étude récente a mis en évidence un gène candidat potentiel, *VvAGL11* codant pour un facteur de transcription Agamous-like (Mejia *et al.*, 2011). Ce gène co-localise avec un QTL majeur impliqué à la fois dans le caractère apyrène et la taille de la baie (Mejia *et al.*, 2011). Deux autres candidats potentiels ont été identifiés chez la Vigne grâce à un criblage utilisant la génétique d'association. Il s'agit de *VvJMJ* et *VvHMGR1* qui codent respectivement pour un facteur de transcription jumonji et une 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA reductase (Thèse, C. Houel (2011)).

Au cours de cette thèse nous avons identifié *VvCEB1*, un FT de type bHLH impliqué dans le développement de la baie et plus particulièrement dans le processus d'expansion cellulaire. D'après nos données, ce rôle impliquerait l'intervention de gènes auxine-dépendants et des gènes liés à l'expansion cellulaire (cf. Chapitre 2). Néanmoins, plusieurs points restent à préciser quant au mode d'action de *VvCEB1*.

En premier lieu, la surexpression de *VvCEB1* affecte l'expression des gènes régulant l'homéostasie de l'auxine (PIN, GH3...) et induit les phénotypes associés à une perturbation auxinique. Il semble donc important quantifier l'auxine présente dans le fruit de tomate. Ces mesures devraient nous permettre de comprendre comment s'établissent les *minima* et *maxima* d'auxine dans ces fruits transgéniques. Ces dosages devront donc être réalisés indépendamment dans chaque compartiment du fruit (graines, tissu loculaire, columelle et péricarpe). Par ailleurs, la re-transformation des plants de tomate sur- ou sous-exprimant notre transgène (*35S::VvCEB1*, *35S::SICEB1*, *RNAi-SICEB1*) avec une construction *DR5::GUS* devrait nous aider à visualiser le gradient d'auxine au niveau des fruits entiers au cours du développement. De la même manière, il sera important de doser l'auxine dans les embryons de Vigne transgéniques en développement.

Pour mieux comprendre le mode d'action de *VvCEB1*, l'identification de ces partenaires est fondamentale. Une expérience de double hybride réalisée avec la partie N-

terminale de VvCEB1 nous a permis d'identifier quelques partenaires potentiels. Dans un premier temps, il faudra valider ces interactions *in vivo* en utilisant par exemple la technique de BIFC. Pour cette étude, nous ciblerons prioritairement les facteurs de transcription (AUX-IAA16, zinc finger et ASR) et la disulfide isomérase (protéine de dimérisation de bHLH). D'autre part, la recherche de partenaires en utilisant la partie C-terminale contenant un domaine de dimérisation (HLH) doit être envisagée. Cette étude sera plus difficile car cette portion de la protéine présente une légère autoactivité. Il faudra donc travailler en présence de 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazole) afin de calibrer le système et d'apporter une plus grande sensibilité (cf. Matériel et Méthodes).

Concernant les cibles de VvCEB1, il serait intéressant de déterminer si elles sont ou non régulées transcriptionnellement par l'auxine. De plus, dans le but de confirmer certains des gènes cibles de VvCEB1, une approche "promoteur/gène rapporteur GUS" dans des protoplastes de tabac a été initiée. Cette étude a notamment montré que le promoteur du gène *AUX16* n'est pas sensible à la surexpression de *VvCEB1*. Des analyses sont en cours pour tester les promoteurs des gènes *AUX19*, *GH3-2*, *PIN1*, *PIN2* et *EXPA11*.

Une autre approche envisageable permettant l'identification de cibles directes de VvCEB1 est l'utilisation de la technique de CHIP (Chromatin ImmunoPrecipitation). Cette technique permet d'identifier *in vivo* des interactions entre une protéine (généralement un facteur de transcription) et une séquence d'ADN. Elle consiste à purifier des complexes ADN-protéines (stabilisés par le formaldéhyde), grâce à l'utilisation d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine d'intérêt. Il est ensuite possible d'identifier les séquences d'ADN liant la protéine étudiée par purification suivie d'une PCR. Dans ce contexte, la synthèse d'un anticorps spécifique à VvCEB1 s'avère nécessaire. Outre son utilisation pour l'analyse par CHIP, cet anticorps permettra également de suivre l'accumulation de VvCEB1 au cours du développement du fruit, dans les différents cépages de l'espèce *vinifera* présentant des tailles de fruits variables, dans les différents organes de vigne, ou encore après traitement par les hormones impliquées dans le développement du raisin.

VvCEB1 est un gène exprimé quasi exclusivement dans le fruit. Aussi, quand il est surexprimé de façon ectopique, il perturbe fortement le développement des parties végétatives et des inflorescences, rendant le processus de mise à fruit délicat. De ce fait, il faut envisager l'utilisation de promoteurs inductibles ou fruit-spécifiques afin d'étudier l'effet de la surexpression de *VvCEB1* dans le fruit uniquement. D'autre part, les lignées sous-exprimant *VvCEB1* n'étant pas suffisamment efficaces, il serait opportun de rechercher des mutants « perte de fonction » par TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes). Cette

approche est d'autant plus envisageable que nous bénéficions sur le site INRA d'une infrastructure adaptée (plateforme de TILLING, SFR Biologie intégrative et Ecologie).

Enfin les études préliminaires sur les différents cépages de l'espèce *vinifera* et les différentes espèces du genre *Vitis* corroborent le rôle de VvCEB1 dans la régulation de la taille de la baie. Des analyses complémentaires sont néanmoins nécessaires. Il est important d'étudier les profils d'expression de VvCEB1 et de ses cibles potentielles au cours du développement de ces différents individus. Les mesures de leur contenu en auxine doivent être réalisées. De plus, l'analyse microscopique de ces fruits de tailles variables sera nécessaire pour déterminer le nombre et la taille des cellules les constituant. Ce phénotypage permettra de préciser la nature du lien entre le niveau d'expression de VvCEB1 et la taille des baies. De façon complémentaire, l'étude sur la variabilité génétique de VvCEB1 au sein de ces différentes variétés doit être poursuivie sur une population plus importante et sur la totalité de sa séquence. L'étude préliminaire réalisée pour la recherche de SNP pourrait être étendue à une méthode de génétique d'association permettant de tester l'association entre les SNP identifiés pour VvCEB1 et la variation de la taille de la baie au sein d'une population importante d'individus.

Caractérisation fonctionnelle de VvABF2, un FT impliqué dans la signalisation ABA chez la Vigne

Ce travail de thèse nous a également conduit à l'identification d'un autre FT, VvABF2, jouant potentiellement un rôle dans les processus de maturation du raisin contrôlés par l'ABA. L'homologue de VvABF2 chez *Arabidopsis*, a fait l'objet de nombreuses études témoignant de son rôle majeur dans les processus de signalisation médiés par l'ABA au niveau végétatif (Uno *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2000; Kagaya *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2005; Furihata *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010). De manière similaire, l'analyse transcriptomique que nous avons réalisée à partir des cellules embryogènes de Vigne exprimant VvABF2 suggère une implication de ce FT dans la réponse "globale" contrôlée par l'ABA. De plus, il est intéressant de noter que l'ABA et les transcrits VvABF2 s'accumulent préférentiellement au même moment : juste avant la véraison et durant la phase de maturation. Nos données montrent également que la surexpression de VvABF2 chez la Vigne affecte l'expression de gènes codant des enzymes impliquées dans les processus liés à la maturation de la baie de raisin c'est-à-dire : la synthèse de composés phénoliques et le ramollissement. Enfin, la surexpression de VvABF2 chez la tomate se traduit par une accélération du

ramollissement du fruit, renforçant ainsi le rôle supposé de VvABF2 dans ce processus physiologique.

Concernant le rôle de VvABF2 dans la signalisation ABA et la maturation du fruit, des analyses complémentaires devront être mises en place afin de préciser plusieurs points.

Tout d'abord, les cibles potentielles de VvABF2 suggérées par les analyses transcriptomiques devront être confirmées par PCR Quantitative (au niveau des cellules embryogènes de Vigne et des fruits de Tomate transgéniques). Afin d'identifier d'autres cibles de VvABF2 dans le contexte du développement du fruit, des analyses transcriptomiques pourront être effectuées sur des fruits de Tomate surexprimant VvABF2 avant ou après traitement par l'ABA. Le traitement des fruits devra être réalisé au stade « mature green », avant le stade « breaker » et l'apparition du pic endogène d'ABA (Zhang *et al.*, 2009b). D'autre part, certains gènes cibles de VvABF2 (comme les gènes codant des pectinestérases impliquées dans le relâchement de la paroi; cf. chapitre 3, tableau 3) ne sont pas induits après 1h de traitement par l'ABA. Afin de savoir si l'expression de ces gènes est ABA-dépendante, il faudra étudier leur expression par PCR Quantitative, au cours d'une cinétique de traitement par l'ABA. Dans le but d'identifier des boîtes ABRE, qui sont spécifiquement reconnues par les FT de la famille AREB/ABF (ABA Response Element; PyACGTGG/TC), des analyses *in silico* des séquences promotrices des gènes cibles potentiels pourront être réalisées (Zhang *et al.*, 2005; Gomez-Porrás *et al.*, 2007). Enfin, tout comme nous l'avons décrit pour VvCEB1, des expériences "promoteurs-gènes rapporteur GUS " ou ChIP pourront être réalisées afin de confirmer et/ou d'identifier des cibles de VvABF2.

La surexpression de VvABF2 semble affecter le ramollissement du fruit (Chapitre 3, Figure 7) et certaines voies de biosynthèse des métabolites secondaires (Chapitre 3, Tableaux 3 et 4). Il sera donc fondamental de quantifier ce ramollissement par des mesures de fermeté des fruits à l'aide d'un duromètre, et de doser les métabolites par les méthodes classiques (HPLC). De plus, la production de lignées cellulaires embryogènes de Vigne sous-exprimant VvABF2 pourra également être tentée afin de confirmer l'impact de ce gène sur ces 2 processus. Toutefois, la redondance fonctionnelle des FT de la famille AREB/ABF pourrait être une limite à ces expériences de "silencing" (Yoshida *et al.*, 2010).

Nos données montrent que la surexpression de VvABF2, en l'absence de traitement ABA affecte un grand nombre de gènes dont la plupart sont connus pour appartenir à des voies régulées par l'ABA. Le traitement des cellules 35S:: VvABF2 par cette hormone,

stimule davantage la transcription des gènes ABA et/ou VvABF2- dépendants. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de VvABF2 est probablement nécessaire à l'activation efficace de certaines voies (Furihata *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2007). La nécessité de cette phosphorylation pourra être évaluée par la production par exemple, d'une forme recombinante -GST de VvABF2. La phosphorylation de cette protéine pourra ensuite être testée *in vitro* après application d'un "overlay" correspondant à un extrait issu de suspension cellulaire traitée par l'ABA. Si cette phosphorylation est avérée, il sera alors intéressant de réaliser une analyse transcriptomique à partir de cellules de Vigne surexprimant la forme auto-phosphorylée de VvABF2 comme décrit par Furihata *et al.* chez *Arabidopsis* (Furihata *et al.*, 2006). L'avantage de cette expérience réside dans le fait qu'elle nous permettrait d'étudier l'effet de VvABF2 en s'affranchissant du traitement ABA et ainsi des effets qui ne seraient pas directement liés à l'action de VvABF2. Cette forme mutée de VvABF2 pourra également être utilisée pour préciser le rôle de VvABF2 dans la maturation du fruit dans un contexte ABA (transgénèse Tomate).

Les membres de la famille AREB/ABF sont connus pour former des homo et/ou des hétérodimères (Yoshida *et al.*, 2010). Afin de mettre en évidence une éventuelle homodimérisation de VvABF2, nous avons produit des constructions BIFC qui devront être testées après transformation transitoire de protoplastes.

Enfin, des plantules, puis des plantes surexprimant VvABF2 pourront être régénérées à partir des cellules embryogènes produites. Ces plantes nous permettront d'étudier l'effet de la surexpression de ce FT sur plante entière et si la fructification est possible, sur le fruit. Ce projet s'inscrira dans le très long terme car plusieurs années seront nécessaires avant l'obtention de plants de Vignes transgéniques produisant éventuellement des raisins.

Pour conclure, l'ensemble des données obtenues au cours de cette thèse contribue à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la baie de raisin. Toutefois, ces travaux se sont heurtés aux limites imposées par notre modèle. L'utilisation de la Tomate a été une alternative qui nous a permis de caractériser nos gènes d'intérêt dans un contexte fruit. Néanmoins, l'utilisation d'un fruit climactérique pour réaliser des expériences de génomique fonctionnelle à partir de gènes de Vigne est souvent critiquée. Il est donc nécessaire de développer à l'avenir des approches alternatives comme l'agroinfiltration de baies de raisin. D'autres techniques comme le VIGS (Virus-induced

Posttranscriptional Gene Silencing) pourront être adaptés à la vigne afin d'obtenir un silencing efficace. En effet, cette technique a été utilisée avec succès chez le Fraisier (un autre fruit non climactérique) en utilisant le virus TRV (tobacco rattle virus) comme vecteur d'infection (Jia *et al.*, 2011; Chai *et al.*, 2011). Enfin, la création prochaine d'une serre S3 devrait nous permettre d'aller plus loin dans nos études en génomique fonctionnelle.

Références bibliographiques

Les références bibliographiques ci-dessous regroupent l'ensemble des références du manuscrit, excepté celles associées aux articles.

- Abbas MF, Abbas MJ, Abdel-Basit OI** (2000) Indole-3-acetic acid concentration during fruit development in date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Hillawi). *Fruit* **55**: 115-118.
- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 63-78.
- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T** (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**: 1052-1056.
- Abel S et Theologis A** (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol* **111**: 9-17.
- Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni J** (2004) Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science* **9**: 331-338.
- Adhikary S, Marinoni F, Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, Bernard S, Quarto M, Capra M, Goettig S, Kogel U, Scheffner M, Helin K, Eilers M** (2005) The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* **123**: 409-421.
- Adie BA, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R** (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**: 1665-168.
- Aharoni A, Keizer LC, Broeck Van Den HC, Blanco-Portales R, Munoz-Blanco J, Bois G, Smit P, Vos De RC, O'Connell AP** (2002) Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programmes in strawberry, a nonclimacteric fruit. *Plant Physiol.* **129**: 1019-1031.
- Aharoni A, Ric De Vos CH, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, Mol JNM, O'Connell AP** (2001) The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *The Plant Journal* **28**: 319-332.
- Allen MS, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M, Suzuki M** (1998) A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J.* **17**: 5484-5496.
- Allen MS, Lacey MJ** (1999) Methoxypyrazines of grapes and wines. In *Chemistry of Wine Flavor* A.L. Waterhouse and S.E. Ebeler Eds. American Chemical Society Washington, DC 31-38.
- Allen MS, Lacey MJ, Brown W, Harris RLN** (1989) Occurrence of methoxypyrazine in grapes of *Vitis vinifera* cv. cabernet-cauvignon and sauvignon blanc. In *Actualités OEnologiques* 89, *Compte Rendu du IV^e Symposium d'OEnologie de Bordeaux*, Dunod, Paris, 25-30.

- Alleweldt G et Koch R** (1977) Der Äthylengehalt reifender Weinbeeren. *Vitis* **16**: 263-271.
- Alleweldt G, Engel M, Gebbing H** (1981) Histologische Untersuchungen an Weinbeeren. *Vitis* **20**: 1-7
- Altschul SF, et al.** (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Archbold DD, Dennis FG** (1984) Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit development. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **109**: 330-335
- Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL** (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci.* **12**: 419-426.
- Atanassova R** (2008) Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus. *FEBS Lett* **582**: 3281-3287.
- Atanassova R, Favet N, Martz F, Chabbert B, Tollier MT, Monties B, Fritig B, Legrand, M** (1995) Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing *O*-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *Plant J.* **8**: 465-477.
- Atchley WR et Fitch WM** (1997) A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5172-5176.
- Axelos M, Curie C, Mazzolini L, Bardet C, Lescure B** (1992) A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension culture. *Plant Physiol. Biochem* **30**: 123-128.
- Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J** (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938-943.
- Baggiolini M** (1952) Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue romande d'Agriculture et d'Arboriculture* **8**: 4-6.
- Bailey PC, Martin C, Toledo-Ortiz G, Quail PH, Huq E, Heim MA, Jakoby M, Werber M, Weisshaar B** (2003) Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **15**: 2497-2502.
- Bajguz A, Piotrowska A** (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70**: 957-969.
- Ban T, Ishimaru M, Kobayashi S, Shiozaki S, Goto-Yamamoto N, Horiuchi S** (2003) Abscisic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in 'Kyoho' grape berries. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **78**: 586-589.
- Barry CS et Giovannoni JJ** (2007) Ethylene and fruit ripening. *J. Plant Growth Regul.* **26**: 143-159.

- Bastías A, López-Climent M, Valcárcel M, Rosello S, Gómez-Cadenas A, Casaretto JA** (2011) Modulation of organic acids and sugar content in tomato fruits by an abscisic acid-regulated transcription factor. *Physiol Plant* **141**: 215-26.
- Bavaresco L, Fregoni C** (2001) Physiological role and molecular aspects of grapevine stilbenic compounds. Ed. Roubelakis-Angelakis KA. *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*, 153-182. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands.
- Bayonove C, Baumes R, Crouzet J, Gunata Z** (1998) Chap. 5 : Aromes, 183-193. In : *Oenology, fondements scientifiques et technologiques*. Ed. Lavoisier, Tec & Doc., Paris. Bertrand,
- Benezra R** (1994) An intermolecular disulfide bond stabilizes E2A homodimers and required for DNA binding at physiological temperatures. *Cell* **79**: 1057-1067.
- Benjamins R et Scheres B** (2008) Auxin: The looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 443-465.
- Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G, Friml J** (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**: 591-602.
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A, Lejeune P** (1993) Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* **5**: 1147-1155.
- Bessis R** (1972) Etude de l'évolution des stomates et des tissus peristomatiques du fruit de la vigne. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Serie D* **274** : 2158-61.
- Blouin J et Guimberteau G** (2000) *Maturation et maturité des raisins*. Ed. Feret. Bordeaux. 151p.
- Bogs J, Downey M, Harvey JS, Ashton AR, Tanner GJ, Robinson SP** (2005) Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiol* **139**: 652-663.
- Bogs J, Jaffé FW, Takos AM, Walker AR, Robinson SP** (2007) The grapevine transcription factor VvMybPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiology* **143**: 1347-1361.
- Boss PK, Davies C, Robinson SP** (1996) Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2**: 163-170
- Boss PK, Sensi E, Hua C, Davies C, Thomas MR** (2002) Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Science* **162**: 887-895.

- Böttcher C, Harvey K, Forde CG, Boss PK, Davies C** (2010a) Auxin-treatment of pre-veraison grape (*Vitis vinifera* L.) berries both delays ripening and increases the synchronicity of sugar accumulation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **17**: 1-8.
- Böttcher C, Keyzers RA, Boss PK, Davies C** (2010b) Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *Journal of Experimental Botany* **61**: 3615-3625.
- Boursiquot JM, Dessup M, Rennes C** (1995) Distribution des principaux caractères phénologiques, agronomiques et technologiques chez *Vitis vinifera*. *Vitis* **34**: 31-35.
- Bouzayen M, Latché A, Nath P, Pech JC** (2009) Mechanisms of fruit ripening, Ed. Pua, M.R. Davey, *Plant Developmental Biology–Biotechnological Perspectives: Vol 1*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Bronner et Oliveira** (1990) Creation and study of the Pinot Noir variety lineage. In : Proc. 5th Intern. Symp. Grape Breeding St Martin/Pflaz, Germany, Sept 1989, *Vitis*, special issue, pp69-80.
- Buesa C, Domínguez M, Vendrell M** (1994) Abscisic acid effects on ethylene production and respiration rate in detached apple fruits at different stages of development.-*Rev. Español Cien. Tecnol. Aliment.* **34**: 495-506.
- Bünger-Kibler S et Bangerth F** (1983) Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regulation* **1**: 143-154.
- Bustamante CA, Civello PM, Martinez GA** (2009) Cloning of the promoter region of b-xylosidase (FaXyl1) gene and effect of plant growth regulators on the expression of FaXyl1 in strawberry fruit. *Plant Science* **177**: 49-56.
- Buta JG et Spaulding DW** (1994) Changes in indole-3-acetic acid and abscisic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit development and ripening. *J. Plant Growth Regul.* **13**: 163-166.
- Cabezas JA, Cervera MT, Ruiz-Garcia L, Carreno J, Martinez-Zapater JM** (2006) A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome* **49**: 1572-1585.
- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R** (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 2165-2180.
- Carmona MJ, Chaib J, Martinez-Zapater JM, Thomas MR** (2008) A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Enology and Viticulture* **22**: 92-109.
- Castillon A, Shen H, Huq E** (2007) Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* **12**: 514-521.

- Catalá C, Rose JK, Bennett AB** (2000) Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant Physiol* **122**: 527-534.
- Cawthon DL et Morris JR** (1982) Relationship of seed number and maturity to berry development, fruit maturation, hormonal changes, and uneven ripening of Concord (*Vitis labrusca* L.) grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* **107**: 1097-1104.
- Chai YM, Jia HF, Li CL, Dong QH, Shen YY** (2011) FaPYP1 is involved in strawberry fruit ripening. *J Exp Bot* **62**: 5079-5089.
- Champagnol F** (1984) *Eléments de physiologie de la vigne et de viticulture générale*, Ed. Dehan, Montpellier, 371p.
- Champagnol F** (1998) Critères de qualité de la vendange. In: C. FLANZY (Ed): *Oenologie, Fondements Scientifiques et Technologiques*, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp653-659.
- Chapman EJ et Estelle ME** (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu Rev Genet* **34**: 265-285.
- Chen G, Hu Z, Grierson D** (2008) Differential regulation of tomato ethylene responsive factor LeERF3b, a putative repressor, and the activator Pti4 in ripening mutants and in response to environmental stresses. *J Plant Physiol* **165**: 662-670.
- Chen J, Liu D, Jiang Y, Zhao M, Shan W, Kuang J, Lu W** (2011) Molecular Characterization of a Strawberry FaASR Gene in Relation to Fruit Ripening. *PLoS One* **6**: e24649.
- Chen Y, Yang X, He K, Liu M, Li J, Gao Z, Lin Z, Zhang Y, Wang X, Qiu X, Shen Y, Zhang L, Deng X, Luo J, Deng XW, Chen Z, Gu H, Qu LJ** (2006) The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: Expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* **60**: 107-124.
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y** (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 2430-2439.
- Cheniclet C, Rong WY, Causse M, Frangne N, Bolling L, Carde JP, Renaudin JP** (2005) Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiology* **139**: 1984-1994.
- Cheong YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S** (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**: 661-677.
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan JP, Latche A, Lamon J, Bouzayan M** (2004) Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Sci* **167**: 1301-1305.

- Chervin C, Tira-Umphon A, Terrier N, Zouine M, Severac D, Roustan JP** (2008) Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Physiol Plant* **134**: 534-546.
- Cheyrier V, Moutounet M, P Sarni-Manchado P** (1998) Les composés phénoliques, Œnologie: fondements scientifiques et technologiques, Lavoisier TEC & DOC, Paris, pp123-162.
- Chiu WI, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J** (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* **6**: 325-330.
- Cho EJ, Yuen CYL, Kang BH, Ondzighi CA, Staehelin LA, Christopher DA** (2011) Protein disulfide isomerase-2 of Arabidopsis mediates protein folding and localizes to both the secretory pathway and nucleus, where it interacts with maternal effect embryo arrest factor. *Molecules and Cells* doi: 10.1007/s10059-011-0150-3.
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim S** (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem* **275**: 1723-1730.
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E** (2006) Integration of abscisic acid signaling into plant responses. *Plant Biol* **8**: 314-325.
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E** (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signaling of water shortage. *Plant J* **52**: 167-174.
- Chuang CF, Running MP, Williams RW, Meyerowitz EM** (1999). The Perianthia gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in Arabidopsis thaliana. *Genes and Development* **13**: 334-344.
- Chung MY, Vrebalov J, Alba R, Lee J, McQuinn R, Chung JD, Klein P, Giovannoni J** (2010) A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SlAP2a, is a negative regulator of fruit ripening. *Plant J.* **64**: 936-947.
- Ciceri P, Locatelli F, Genga A, Viotti A, Schmidt RJ** (1999) The activity of the maize Opaque2 transcriptional activator is regulated diurnally. *Plant Physiol.* **121**: 1321-1328.
- Cohen J** (1982) Identification and quantitative analysis of indole-3-acetyl-l-aspartate from seeds of *Glycine max* L. *Plant Physiol* **70**: 749-753.
- Conde C, Silva P, Fontes N, Dias ACP, Tavares RM, Sousa MJ, Agasse A, Delrot S, Geros H** (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* **1**: 1-22
- Cong B, Barrero LS, Tanksley SD** (2008) Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nat Genet* **40**: 800-804.
- Cong B, Liu JP, Tanksley SD** (2002) Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 13606-13611.

- Conn S, Curtin C, Bezier A, Franco C, Zhang W** (2008) Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. *J Exp Bot* **59**: 3621-3634.
- Coombe BG** (1976) Development of fleshy fruits. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **27**: 207-228.
- Coombe BG** (1992) Research on Development and Ripening of the Grape Berry. *Am J Enol Vitic* **43**: 101-110.
- Coombe BG et Hale CR** (1973) The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiol* **51**: 629-634.
- Coombe BG, Bovio M, Schneider A** (1987) Solute Accumulation by Grape Pericarp Cells: V. RELATIONSHIP TO BERRY SIZE AND THE EFFECTS OF DEFOLIATION. *J Exp Bot* **38**: 1789-1798.
- Coombe BG, McCarthy MG** (2000) Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**: 131-135.
- Corrêa LG, Riaño-Pachón DM, Schrago CG, dos Santos RV, Mueller-Roeber B, Vincentz M** (2008) The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS One* **3**: e2944.
- Costantini E, Landi L, Silvestroni O, Pandolfini T, Spena A, Mezzetti B** (2007) Auxin synthesis-encoding transgene enhances grape fecundity. *Plant Physiol* **143**: 1689-1694.
- Costantini L, Battilana J, Lamaj F, Fanizza G, Grando M** (2008) Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.) From Quantitative Trait Loci to underlying genes. *BMC Plant Biology* **17**: 8-38.
- 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 PR10 promoter. *Journal of Experimental Botany* **52**: 901-910.
- Cowan AK, Cripps RF, Richings EW, Taylor NJ** (2001) Fruit size: Towards an understanding of the metabolic control of fruit growth using avocado as a model system. *Physiol. Plant* **111**: 127-136.
- Crane JC** (1964) Growth Substances in Fruit Setting and Development, *Annual Review of Plant Physiology* **15**: 303-326.
- Creasy LL et Coffee M** (1998) Phytoalexin production potential of grape berries. *Journal of American Society for Horticultural Science* **113**: 230-234
- Csukasi F, Osorio S, Gutierrez JR, Kitamura J, Giavalisco P, et al.** (2011) Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytol* doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03700.x.

- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651-679.
- Czemmel S, Stracke R, Weisshaar B, Cordon N, Harris NN, Walker AR, Robinson SP, Bogs J** (2009) The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYBF1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries. *Plant Physiology* **151**: 1513-1530.
- Da Silva F, Iandolino A, Al-Kayal F, et al.** (2005) Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiology* **139**: 574-597.
- Dale S, Wilson WA, Edelman AM, Hardie DG** (1995) Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase. I. *FEBS Lett* **361**: 191-195.
- Dangles O, Saito N, Brouillard R** (1993) Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry* **34**: 119-124.
- Davidson EH et ERWIN DH** (2006) Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* **311**: 796-800.
- Davies C et Robinson SP** (2000) Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening: cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol* **122**: 803-812.
- Davies C, Boss PK, Robinson SP** (1997) Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiol* **115**: 1155-1161.
- Davies C, Boss PK, Robinson SP** (1997) Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiology* **115**: 1155-1161.
- Davuluri RV et al.** (2003) AGRIS: Arabidopsis gene regulatory information server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinformatics* **4**: 25.
- de Jong M, Mariani C, Vriezen WH** (2009) The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1523-1532.
- de Jong M, Wolters-Arts M, Feron R, Mariani C, Vriezen WH** (2009) The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (SlARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *The Plant Journal* **57** : 160-170.
- de la Fuente JI, Amaya I, Castillejo C, Sanchez-Sevilla JF, Quesada MA, Botella MA, Valpuesta V** (2006) The strawberry gene FaGAST affects plant growth through inhibition of cell elongation. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2401-2411.
- de Vetten NC et Ferl RJ** (1995) Characterization of a maize G-box binding factor that is induced by hypoxia. *Plant J* **7**: 589-601.

- Delker C, Raschke A, Quint M** (2008) Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta* **227**: 929-941.
- Delrot S, Bonnemain JL** (1989) Phloem loading and unloading. *Ann Sci For* **46**: 786-796.
- Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergeat V, Decendit A, Richard T, Carde JP, Merillon JM, 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 AR, Ferrier T, Decendit A, Merillon J-M, Robinson SP, Barrieu F** (2008) The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiology* **147**: 2041-2053.
- Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, Tillett R, Quilici DR, Osborne C, Schooley DA, Schlauch KA, Cushman JC, Cramer GR** (2007) Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* **8**: 429.
- Descendit A, Ramawat KG, Waffo P, Deffieux G, Badoc A, Merillon JM** (1996) Anthocyanins, catechins, condensed tanins and piceid production in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Biotechnol Lett* **18**: 659-662.
- Despres C, DeLong C, Glaze S, Liu E, Fobert PR** (2000) The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* **12**: 279-290.
- Deytieux C, Geny L, Lapailierie D, Claverol S, Bonneau M, Doneche B** (2007) Proteome analysis of grape skins during ripening. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1851-1862.
- Deytieux-Belleau C, Gagne S, L'Hyvernay A, Doneche B, Geny L** (2007) Possible roles of both abscisic acid and indol-acetic acid in controlling grape berry ripening process. *Journal International des sciences de la vigne et du vin* **41**: 141-148.
- Dharmasiri, N, Dharmasiri, S, and Estelle M** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445.
- Diakou P, Carde JP** (2001) In situ fixation of grape berries. *Protoplasma* **218**: 225-235.
- Diekmann W, Venis MA, Robinson DG** (1995) Auxins induce clustering of auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3425-3429.
- Dixon DP, Laphorn A, Edwards R** (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* **3**: 1-10.
- Dixon RA, Xie DY, Sharma SB** (2005) Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoids Research ? *New Phytologist* **165**: 9-28.
- Doligez A, Bouquet A, Danglot Y, Lahogue F, Riaz S, Meredith P, Edwards J, This P** (2002) Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theor Appl Genet.* **105**: 780-795.

- Dorcey E, Urbez C, Blázquez MA, Carbonell J, Perez-Amador MA** (2009) Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **58**: 318-332.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdalec W** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16**: 6127-64145.
- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP** (2003a). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Austr. J. Grape Wine Res.* **9**: 15-2.
- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP** (2003b) Synthesis of Flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* **9**: 110-121.
- Eichhorn KW, Lorenz H** (1977) Phaenologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Nachrichten des deutschen Pflanzen - schutzdienst Deutsche. Weinbau* **29**: 119-120.
- El-Sharkawy I, Kim WS, El-Kereamy A, Jayasankar S, Svircev AM, Brown DCW** (2007) Isolation and characterization of four ethylene signal transduction elements in plums (*Prunus salicina* L.) *Journal of Experimental Botany* **58**: 3631-3643.
- El-Sharkawy I, Sherif S, Mila I, Bouzayen M, Jayasankar S** (2009) Molecular characterization of seven genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors during plum fruit development and ripening. *J Exp Bot* **60**: 907-922.
- Esau K** (1965) *Plant anatomy*. Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp89-112.
- Espley, R.V., Hellens, R.P., Putterill, J., Stevenson, D.E., Kutty-Amma, S., and Allan, A.C.** (2007). Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *Plant J.* **49**: 414-427.
- Estruch J, Crossland L, Goff S** (1994) Plant activating sequences: positively charged peptides are functional as transcriptional activation domains. *Nucl Acids Res.* **22**: 3983.
- Fabbroni C, Costa F, Bregoli AM, Costa G** (2006) Effect of auxin on fruit morphogenesis: physiological and molecular aspects in kiwifruit ripening. 6th International Symposium on Kiwifruit, Rotorua, New Zealand (International Society of Horticultural Science): 541-547.
- Fanizza G, Lamaj F, Costantini L, Chaabane R, Grando MS** (2005) QTL analysis for fruit yield components in table grapes (*Vitis vinifera*). *Theor. Appl. Genet.* **111**: 658-664.
- Feller A, Machemer K, Braun EL, Grotewold E** (2011) Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J* **66**: 94-116.
- Fernandez L, Pradal M, Lopez G, Berud F, Romieu C, Torregrosa L** (2006a) Berry size variability in *Vitis vinifera* L. *Vitis* **45**: 53-55.

- Fernandez L, Romieu C, Moing A, Bouquet A, Maucourt M, Thomas MR, Torregrosa L** (2006b) The grapevine flb mutation: A unique genotype to investigate differences between fleshly and nonfleshly fruit. *Plant Physiol.* **140**: 537-547.
- Fernandez L, Torregrosa L, Terrier N, Sreekantan L, Grimplet J, Davies C, Thomas MR, Romieu C, Ageorges A** (2007) Identification of genes associated with flesh morphogenesis during grapevine fruit development. *Plant Molecular Biology* **63**: 307-323.
- Ficcadenti N, Sestili S, Pandolfini T, Cirillo C, Rotino GL, Spena A** (1999) Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Mol Breeding* **5**: 463-470.
- Fields S et Song O** (1989) A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S** (1999) Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiol* **120**: 1083-1094.
- Finkelstein RR** (1994) Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J.* **5**: 765-771.
- Finkelstein RR et Lynch TJ** (2000) Abscisic acid inhibition of radicle emergence but not seedling growth is suppressed by sugars. *Plant Physiol.* **122**: 1179-1186.
- Fisher F et Goding CR** (1992) Single amino acid substitutions alter helix–loop–helix protein specificity for bases flanking the core CANNTG motif. *EMBO J* **11**: 4103-4109.
- Förch P, Merendino L, Martinez C, Valcarcel J** (2003) U2 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) auxiliary factor of 65 kDa, U2AF65, can promote U1 snRNP recruitment to 5' splice sites. *Biochem. J.* **372**: 235-242.
- Forde CG, Cox A, Williams ER, Boss PK** (2011) Associations between the sensory attributes and volatile composition of Cabernet Sauvignon wines and the volatile composition of the grapes used for their production. *J Agric Food Chem.* **59**: 2573-83.
- Fougère-Rifot M, Park HS, Benharbit El Alami N, Bouard J** (1996) Anomalies de la structure des fleurs de vigne et des baies de raisin en relation avec la coulure et le millérandage. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **HS**: 47-52.
- Fowler S, Thomashow MF** (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* **14**: 1675-1690.
- Frenkel C** (1972) Involvement of peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase isozymes from pear, tomato, and blueberry fruit in ripening. *Plant Physiol.* **49**: 757-763.
- Frenkel C et Dyck R** (1973) Auxin inhibition of ripening in Bartlett pears. *Plant Physiol* **51**: 6-9.
- Friedrichsen DM, Nemhauser J, Muramitsu T, Maloof JN, Alonso J, Ecker JR, Furuya M, Chory J** (2002) Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics* **162**: 1445-1456.

- Fu FQ, Mao WH, Shi K, Zhou YH, Asami T, Yu JQ** (2008) A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2299-2308.
- Fujii H et Zhu J** (2009) Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**: 8380-8385.
- Fujii H, Verslues PE, Zhu JK** (2007) Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 485-494.
- 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. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 632-638.
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran LSP, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal* **39**: 863-876.
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell* **17**: 3470-3488.
- Fukazawa J, Sakai T, Ishida S, Yamaguchi I, Kamiya Y, Takahashi Y** (2000) Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell* **12**: 901-915.
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**: 1988-1993.
- Gagne S, Saucier C, Geny L** (2006) Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 9465-9471.
- Galet P** (2000) Dictionnaire encyclopédique des cépages. Ed. Hachette. Paris. 1024p.
- Gambetta GA, Matthews MA, Shaghasi TH, McElrone AJ, Castellarin SD** (2010) Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape. *Planta* **232**: 219-234.
- Geny L, Ollat N, Soyer JP** (1998) Les boutures fructifères de vigne : validation d'un modèle d'étude de la physiologie de la vigne. II. Etude du développement de la grappe. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **32**: 83-90.
- Gibson SI** (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 93-102.

- Gilad A, Amitai-Zeigerson H, Bar-Zvi D, Scolnik PA** (1997). ASR1, a tomato water stress-regulated gene: Genomic organization, developmental regulation and DNA-binding activity. *Acta Hort.* **447**: 441-453.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) Fruit: a developmental perspective. *Plant Cell* **5**: 1439-1451.
- Giovannoni JJ** (2001) Molecular regulation of fruit ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 725-749.
- Giovannoni JJ** (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* **16**: S170-S180.
- Giovannoni JJ** (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 283-289.
- Giribaldi M, Geny L, Delrot S, Schubert A** (2010) Proteomic analysis of the effects of ABA treatments on ripening *Vitis vinifera* berries. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2447-2458.
- Giribaldi M, Perugini I, Sauvage FX, Schubert A** (2007) Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. *Proteomics* **7**: 3154-3170.
- Given NK, Venis MA, Grierson D** (1988) Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta* **174**: 402-406.
- Glissant D** (2005) Approches transcriptomiques et fonctionnelle du développement et du transport des sucres dans la baie de raisin (*Vitis vinifera* L.). Thèse de l'Université de Poitiers, France, 120p.
- Goetz M, Hooper LC, Johnson SD, Rodrigues JC, Vivian-Smith A, Koltunow AM** (2007) Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiology* **145**: 351-366.
- Goldsmith MHM** (1977) The polar transport of auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**: 439-478
- 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. *Plant J.* **67**: 960-70.
- Gomez C, Terrier N, Torregrosa L, Vialet S, Fournier-Level A, Verries C, Souquet JM, Mazauric JP, Klein M, Cheynier V, Ageorges A** (2009). Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters. *Plant Physiol.* **150**: 402-415.
- Gomez-Porrás JL, Riano-Pachón DM, Dreyer I et al.** (2007) Genome-wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in *Arabidopsis* and rice. *BMC Genomics* **8**: 260.

- Goto-Yamamoto N, Wan GH, Masaki K, Kobayashi S** (2002) Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*). *Plant Sci.* **162**: 867-872.
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M** (2001) Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**: 271-276.
- Greenspan MD, Schultz HR, Matthews MA** (1996) Field evaluation of water transport in grape berries during water deficits. *Physiologia Plantarum* **97**: 55-62.
- Greenspan MD, Shackel KA, Matthews MA** (1994) Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits. *Plant Cell and Environment* **17**: 811-820.
- Griesser M, Hoffmann T, Bellido ML, Rosati C, Fink B, Kurtzer R, Aharoni A, Munoz-Blanco J, Schwab W** (2008) Redirection of flavonoid biosynthesis through the downregulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *Plant Physiol.* **146**: 1528-1539.
- Grimplet J, Deluc LG, Tillett RL, Wheatley MD, Schlauch KA, Cramer GR, Cushman JC** (2007) Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics* **8**: 187.
- Grotewold E** (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 761-780.
- Grotewold E, Sainz MB, Tagliani L, Hernandez JM, Bowen B, Chandler VL** (2000) Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13579-13584.
- Guerineau F et Mullineaux P** (1993) In *Plant molecular biology LABFAX manual*. Oxford, Bios Scientific Publishers and Blackwell Scientific Publications.
- Guilfoyle TJ et Hagen G** (2007) Auxin response factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 453-460.
- Guilfoyle TJ, Ulmasov T, Hagen G** (1998) The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell Mol. Life Sci.* **54**: 619-627.
- Gultinan MJ et Miller L** (1994). Molecular characterization of the DNA-binding and dimerization domains of the bZIP transcription factor, EmBP-1. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1041-1053.
- Guo A et al.** (2005) DATF: a database of Arabidopsis transcription factors. *Bioinformatics* **21**: 2568-2569.
- Guo AY et al.** (2008) PlantTFDB: a comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res.* **36**: 966-969.
- Gustafson FG** (1937) Inducement of fruit development by growth promoting chemicals. *Proc Natl Acad Sci* **22**: 629-636.
- Hale CR** (1968) Growth and senescence of the grape berry. *Aust J Agric Res* **19**: 939-945.

- Hale CR, Coombe BG, Hawker JS** (1970) Effects of ethylene and 2-chloroethylphosphoric acid on the ripening of grapes. *Plant Physiol* **45**: 620-623
- Hampp R, Egger B, Effenberger S, Einig W** (1994) Carbon allocation in developing spruce needles. Enzymes and intermediates of sucrose metabolism. *Physiologia Plantarum* **90**: 299-306.
- Hamza S et Chupeau Y** (1993) Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Exp. Bot.* **269**: 1837-1845.
- Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks M, Smeekens S** (2008) The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. *Plant Journal* **53**: 935-949.
- Hardie WJ, O'Brien TP, Jaudzems VG** (1996) Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape, *Vitis vinifera* L. *Aust J Grape Wine Res* **2**: 97-142.
- Harpster MH, Brummell DA, Dunsmuir P** (1998) Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo-1, 4-beta-glucanase gene in strawberry. *Plant Physiol* **118**: 1307-1316.
- Harris JM, Kriedemann PE, Possingham JV** (1968) Anatomical aspects of grape berry development. *Vitis* **7**:106-119
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA** (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**: 1788-1795.
- Hawker JS** (1969) Changes in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries. *Phytochemistry* **8**: 9-17.
- Heim MA, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, Bailey PC** (2003) The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol* **20**: 735-747.
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA, Meyerowitz EM** (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr Biol* **15**: 1899-1911.
- Henderson J, Macdonald H, Lazarus CM, Napier RM, Hawes CR** (1996) Protein retention in the endoplasmic reticulum is not compromised by baculovirus infection. *Cell Biol Int* **6**: 413-422.
- Hichri I, Barrieu F, Bogs J, Kappel C, Delrot S, and Lauvergeat V** (2011) Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* **62**: 2465-2483.
- Hichri I, Heppel SC, Pillet J, Léon C, Czemplin 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**: 509-523.

- Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Hohener B, Grill E** (2002) Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *EMBO J* **21**: 3029-3038.
- Hiratsuka S, Onodera H, Kawai Y, Kubo T, Itoh H, Wada R** (2001) ABA and sugar effects on anthocyanin formation in grape berry cultured in vitro. *Sci Hort.* **90**: 121-130.
- Hirayama T et Shinozaki K** (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* **61**: 1041-1052.
- Ho LC** (1996) The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato. *J Exp Bot* **47**: 1239-1243.
- Hoecker U, Vasil IK, McCarty DR** (1999) Signaling from the embryo conditions Vp1-mediated repression of alpha-amylase genes in the aleurone of developing maize seeds. *Plant J* **19**: 371-377.
- Hoffmann T, Kalinowski G, Schwab W** (2006) RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *Plant J.* **48**: 818-826.
- Holm M, Ma LG, Qu LJ, Deng XW** (2002) Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis. *Genes Dev* **16**: 1247-1259.
- Houel C** (2011) Caractérisation de la variation phénotypique de la taille de la baie chez la vigne *Vitis vinifera* L. et approches de génétique d'association et de recherche de traces de sélection pour ce caractère. Thèse de l'Université d'Evry-Val d'Esonne, France, 231p.
- Houel C, Bounon R, Chaïb J, Guichard C, Peros JP, Bacilieri R, Dereeper A, Canaguier A, Lacombe T, N'Diaye A, Le Paslier MC, Vernerey MS, Coriton O, Brunel D, This P, Torregrosa L, Adam-Blondon AF** (2010) Patterns of sequence polymorphism in the fleshless berry locus in cultivated and wild *Vitis vinifera* accessions. *BMC Plant Biol.* **10**: 284.
- Hrazdina G, Parsons GF, Mattick LR** (1984) *Am. J. Enol. Vitic.* **35**: 220-227.
- Hu W et Ma H** (2006) Characterization of a novel putative zinc finger gene MIF1: involvement in multiple hormonal regulation of Arabidopsis development. *Plant J.* **45**: 399-422.
- Huang D, Jaradat MR, Wu W, Ambrose SJ, Ross AR, Abrams SR, Cutler AJ** (2007) Structural analogs of ABA reveal novel features of ABA perception and signaling in Arabidopsis. *Plant J* **50**: 414-428.
- Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI** (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes and Development* **24**: 1695-1708.
- Huglin P, Schneider C** (1998) *Biologie et écologie de la vigne*. Ed. Lavoisier Tec et Doc, Paris. 370p.

- Hurst HC** (1994) Transcription factor 1: bZip proteins. *Protein Profile* **1**: 123-168.
- Iida K et al.** (2005) RARTF: database and tools for complete sets of Arabidopsis transcription factors. *DNA Res.* **12**: 247-256.
- Ikeda Y, Men S, Fischer U, Stepanova AN, Alonso JM, Ljung K, Grebe M** (2009) Local auxin biosynthesis modulates gradient-directed planar polarity in Arabidopsis. *Nature Cell Biology* **11**: 731-738.
- Iland PG, Coombe BG** (1988) Malate, tartrate, potassium, and sodium in flesh and skin of shiraz grapes during ripening: concentration and compartmentation. *American Journal of Enology and Viticulture* **39**: 71-76.
- Inaba A, Ishida M, Sobajima Y** (1976) Changes in endogenous hormone concentrations during berry development in relation to ripening of Delaware grapes. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **45**: 245-252.
- Ito Y, Kitagawa M, Ihashi N, Yabe K, Kimbara J, Yasuda J, Ito H, Inakuma T, Hiroi S, Kasumi T** (2008) DNA-binding specificity, transcriptional activation potential, and the rin mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator RIN. *Plant J* **55**: 212-223.
- Iusem ND, Bartholomew DM, Hitz WD, Scolnik PA** (1993) Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiol.* **102**: 1353-1354.
- Jaakola L, Poole M, Jones MO, Kämäräinen-Karppinen T, Koskimäki JJ, Hohtola A, Häggman H, Fraser PD, Manning K, King GJ et al.** (2010) A SQUAMOSA MADS box gene involved in the regulation of anthocyanin accumulation in bilberry fruits. *Plant Physiol* **153**: 1619-1629.
- Jacoby M, Weisshaar B, Droege-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F** (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **7**: 106-111.
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, et al.** (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**: 463-467.
- Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian, M** (2002) "Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism" *J Agric Food Chem* **50**: 2731-2741
- Jeanneau M, Gerentes D, Foueillassar X, Zivy M, Vidal J, Toppan A, Perez P** (2002) Improvement of drought tolerance in maize: Towards the functional validation of the ZM-ASR1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. *Biochimie* **84**: 1127-1135.
- Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, Esaka M** (2006) Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Sci.* **170**: 61-69.

- Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, Kobayashi S, Hashizume K, Esaka M** (2008) Expression of multi-copy flavonoid pathway genes coincides with anthocyanin, flavonol and flavan-3-ol accumulation of grapevine. *Vitis* **47**: 135-140.
- Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M** (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.
- Jia HF, Chai YM, Li CL, Lu D, Luo JJ, Qin L, Shen YY** (2011) Abscisic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening. *Plant Physiol* **157**: 188-199.
- Jiang Y et Joyce DC** (2003) ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation* **39**: 171-174.
- Jiang Y, Joyce DC, Macnish AJ** (2000) Effect of abscisic acid on banana fruit ripening in relation to the role of ethylene. *J Plant Growth Regul* **19**: 106-111
- Jiang, W et Yu, D** (2009) Arabidopsis WRKY2 transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid. *BMC Plant Biol.* **9**: 96.
- Johnson RR, Wagner RL, Verhey SD, Walker-Simmons MK** (2002) The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol* **130**: 837-846.
- Jones S** (2004) An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol* **5**: 226.
- Jung C, Seo JS, Han SW, Koo YJ, Kim CH, Song SI, Nahm BH, Choi YD, Cheong JJ** (2008) Overexpression of AtMYB44 enhances stomata closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiol.* **146**: 623-635.
- Jung C, Shim JS, Seo JS, Lee HY, Kim CH, Choi YD, Cheong JJ** (2010) Non-specific phytohormonal induction of AtMYB44 and suppression of jasmonate-responsive gene activation in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell* **29**: 71-76.
- Kagaya Y, Hobo T, Murata M, Ban A, Hattori T** (2002) Abscisic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor, TRAB1. *Plant Cell* **14**: 3177-3189.
- Kamei A, Seki M, Umezawa T, Ishida J, Satou M, Akiyama K, Zhu JK, Shinozaki K** (2005) Analysis of gene expression profiles in Arabidopsis salt overly sensitive mutants sos2-1 and sos3-1. *Plant Cell Environ* **28**: 1267-1275.
- Kaminaka H, Näke C, Epple P, Dittgen J, Schütze K, Chaban C, Holt BF 3rd, Merkle T, Schäfer E, Harter K, Dangl JL** (2006) bZIP10- LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection. *EMBO J.* **25**: 4400-4411.
- Kano Y et Asahira T** (1981) Roles of cytokinin and abscisic acid in the maturing of strawberry fruits. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **50**: 31-36.

- Karimi M, Bleys A, Vanderhaeghen R, Hilson P** (2007a) Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiol* **145**: 1183–1191.
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P** (2005) Modular cloning in plant cells. *Trends Plant Sci* **10**: 103–105.
- Karimi M, Depicker A, Hilson P** (2007b) Recombinational Cloning with Plant Gateway Vectors *Plant Physiology* **145**: 1144-1154.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**: 193-195.
- Karlova R, Rosin FM, Busscher-Lange J, Parapunova V, Do PT, Fernie AR, Fraser PD, Baxter C, Angenent GC, de Maagd RA** (2011) Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell* **23**: 923-941.
- Katagiri F, Seipel K, Chua NH** (1992) Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcription activator. *Mol Cell. Biol.* **12**: 4809-4816.
- Katz E, Lagunes PM, Riov J, Weiss D, Goldschmidt EE** (2004) Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric citrus fruit. *Planta* **219**: 243-252.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U** (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**: 648-651.
- Kende H et Zeevaart JAD** (1997) The five “classical” plant hormones. *Plant Cell* **9**: 1197-1210.
- Kennedy JA** (2002) Understanding berry development. *Practical Winery and Vineyard* July/August: 14-23.
- Kennedy JA, Troup GL, Pilbrow JR, Hutton DR, Hewitt D, Hunter CR, Ristic R, Iland PG, Jones GP** (2001) Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Aust. J. Grape Wine R.* **6**: 244-254.
- Khan S, Stone JM** (2007) *Arabidopsis thaliana* GH39 influences primary root growth. *Planta* **226**: 21-34.
- Khandelwal A, Cho SH, Marella H, Sakata Y, Perroud PF, Pan A, Quatrano RS** (2010) Role of ABA and ABI3 in desiccation tolerance. *Science* **327**: 546.
- Kim J, Harter K, Theologis A** (1997). Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 11786-11791.
- Kim S, Choi HI, Ryu HJ, Park JH, Kim MD, Kim SY** (2004) ARIA, an arabidopsis Arm repeat protein interacting with a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, is a novel abscisic acid signaling component. *Plant Physiol.* **136**: 3639-3648.

- Kitamura S** (2006) Transport of flavonoids. In Grotewold E, editor. The science of flavonoids. New York, Springer. pp123-146.
- Kizis D et Pages M** (2002) Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J* **30**: 679-689.
- Klein D, Fink B, Arold B, Eisenreich W, Schwab W** (2007) Functional characterization of enone oxidoreductases from strawberry and tomato fruit. *J Agric Food Chem* **55**: 6705-6711.
- Kliewer WM** (1966) Sugars and organic acids of *Vitis vinifera*. *Plant Physiology* **41**: 923-931.
- Klingler JP, Batelli G, Zhu J** (2010) ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *J. Exp. Bot.* **61**: 3199-3210.
- Kobashi K, Gemma H, Iwahori S** (1999) Sugar accumulation in peach fruit as affected by abscisic acid treatment in relation to some sugar metabolizing enzymes. *J Jpn Soc Hortic Sci* **68**: 465-470.
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H** (2004) Retrotransposon- induced mutations in grape skin color. *Science* **304**: 982.
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H** (2005) Association of VvmybA1 gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **74**: 196-203.
- Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, Honda C** (2002) Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* **215**: 924-933.
- Kohno M, Takato H, Horiuchi H, Fujita K, Suzuki S** (2011) Auxin-nonresponsive grape Aux/IAA19 is a positive regulator of plant growth. *Mol Biol Rep.* May 12.
- Koncz C et Schell J** (1986) The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet.* **204**: 383-396.
- Kondo S et Gemma H** (1993) Relationship between abscisic acid (ABA) content and maturation of the sweet cherry. *J Jpn Soc Hort Sci* **62**: 63-68.
- Kondo S et Inoue K** (1997) Abscisic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) content during growth of 'Satohnishiki' cherry fruit, and the effect of ABA and ethephon application on fruit quality. *J Hort Sci* **72**: 221-227.
- Kong JM, China LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R** (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**: 923-933.
- Koshioka M, Nishijima T, Yamazaki H, Liu Y, Nonaka M, Mander LN** (1994) Analysis of gibberellins in growing fruits of *Lycopersicon esculentum* after pollination or treatment with 4-chlorophenoxyacetic acid. *Journal of Horticultural Science* **69**: 171-179.

- Koyama K, Sadamatsu K, Goto-Yamamoto N** (2010) Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Functional and Integrative Genomics* **10**: 367-381.
- Krügela U, Hea HX, Giera K, Reinsa J, Chincinskaa I, Grimma B, Schulzeb WX, Kühna C** (2011) The Potato Sucrose Transporter StSUT1 Interacts with a DRM-Associated Protein Disulfide Isomerase. *Mol. Plant* doi: 10.1093/mp/ssr048.
- Lacampagne S, Gagné S, Gény L** (2009) Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *Journal of Plant Growth Regulation* **29**: 81-90.
- Landy A** (1989) Dynamic, structural and regulatory aspects of A sitespecific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 913-949.
- Lang A, Thorpe MR** (1989) Xylem, phloem and transpiration flows in a grape: application of a technique for measuring the volume of attached fruits using Archimedes' principle. *Journal of Experimental Botany* **40**: 1069-1078.
- Lara P, Oñate-Sánchez L, Abraham Z, Ferrándiz C, Díaz I, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J** (2003) Synergistic activation of seed storage protein gene expression in Arabidopsis by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *J. Biol. Chem.* **278**: 21003-21011.
- Larronde F, Krisa S, Decendit A, Cheze C, Merillon JM** (1998) Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Rep* **17**: 946-950.
- LeClere S, Tellez R, Rampey RA, Matsuda SPT, Bartel B** (2002) Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 20446-20452.
- Ledbetter CA, Ramming DW** (1989) Seedlessness in grapes. *Hort Rev* **11**:159-184
- Ledent V et Vervoort M** (2001) The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res* **11**: 754-770.
- Lee SJ, Kang JY, Park HJ, Kim MD, Bae MS, Choi HI, Kim SY** (2010) DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. *Plant Physiol.* **153**: 716-727.
- Leivar P, Monte E, Al-Sady B, Carle C, Storer A, Alonso JM, Ecker JR, Quail PH** (2008) The Arabidopsis phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* **20**: 337-352.
- Lemaire-Chamley M, Petit J, Garcia V, Just D, Baldet P, Germain V, Fagard M, Mouassite M, Cheniclet C, Rothan C** (2005) Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiol* **139**: 750-769.

- Leng P, Zhang GL, Li XX, Wang LH, Zheng ZM** (2009) Cloning of 9-cisepoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene encoding a key enzyme during abscisic acid (ABA) biosynthesis and ethylene production regulated by ABA in detached young persimmon calyx. *Chin. Sci. Bull.* **54**: 2830-2838.
- 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**: 405-430.
- Leung J et Giraudat J** (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 199-222.
- Leyser HMO, Lincoln CA, Timpte C, Lammer D, Turner J, Estelle M** (1993). Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* **364**: 161-164.
- Li G, Xin H, Zheng X, Li S, Hu Z** (2011) Identification of the abscisic acid receptor VvPYL1 in *Vitis vinifera*. *Plant biology* doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00504.x
- Li H, Sun J, Xu Y, Jiang H, Wu X, Li C** (2007) The bHLH-type transcription factor AtAIB positively regulates ABA response in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **65**: 655-665.
- Li L, Zhu B, Fu D, Luo Y** (2011) RIN transcription factor plays an important role in ethylene biosynthesis of tomato fruit ripening. *J Sci Food Agric.* **91**: 2308-14.
- Li X, Duan X, Jiang H et al.** (2006) Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**: 1167-1184.
- Licausi F, van Dongen JT, Giuntoli B, Novi G, Santaniello A, Geigenberger P, Perata P** (2010) HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **62**: 302-315.
- Licker JL, Acree TE, Henick-kling T** (1999) What in 'Brett' (Brettanomyces) flavour? A preliminary investigation. In "Chemistry of Wine Flavor" A. L. Waterhouse and S. E. Ebeler Eds.
- Liljegren SJ, Roeder AH, Kempin SA, Gremski K, Ostergaard L, Guimil S, Reyes DK, Yanofsky MF** (2004) Control of fruit patterning in Arabidopsis by INDEHISCENT. *Cell* **116**: 843-853.
- Lin, Z, Hong Y, Yin M, Li C, Zhang K, Grierson D** (2008). A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *Plant J.* **55**: 301-310.
- Lin-Wang K, Bolitho K, Grafton K, Kortstee A, Karunairetnam A, McGhie TK, Espley RV, Hellens RP, Allan AC** (2010) An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biology* **10**: 50.
- Lipsick JS** (1996) One billion years of Myb. *Oncogene* **13**: 223-235.

- Liscum E et Reed JW** (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* **49**: 387-400.
- Liu DJ, Chen JY, Lu WJ** (2011) Expression and regulation of the early auxin-responsive Aux/IAA genes during strawberry fruit development. *Mol Biol Rep* **38**: 1187-93.
- Liu J, Van Eck J, Cong B, Tanksley SD** (2002) A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13302-13306.
- Liu L, White M, Mac Rae T** (2000) Transcription factors and their genes in higher plants. Functional domains, evolution and regulation. *Eur. J. Biochem.* **262**: 247-257.
- Liu R, Chen L, Jia Z, Lü B, Shi H, Shao W, Dong H** (2011) Transcription Factor AtMYB44 Regulates Induced Expression of the ETHYLENE INSENSITIVE2 Gene in Arabidopsis Responding to a Harpin Protein. *Mol Plant Mic* **24**: 377-389.
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu WH, Ma L** (2007) A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* **315**: 1712-1716.
- Liu Y, Roof S, Ye Z, Barry C, van Tuinen A, Vrebalov J, Bowler C, Giovannoni J** (2004) Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9897-902.
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant J.* **28**: 465-474.
- Lohani S, Trivedi PK, Nath P** (2004) Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biol Technol.* **31**: 119-126.
- Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt DE, Benfey PN** (2010) The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in Arabidopsis roots. *The Plant Cell* **22**: 2219-2236.
- Lopez-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT, Chua NH** (2002) ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J* **32**: 317-328.
- Loreti E, Povero G, Novi G, Solfanelli C, Alpi A, Perata P** (2008) Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in Arabidopsis. *New Phytol.* **179**: 1004-1016.
- Luan F, Wust M** (2002) Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp. *Phytochemistry* **60**: 451-459.
- Ludwig-Müller J** (2011) Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *J. Exp. Bot.* **62**: 1757-1773.
- Lund ST et Bohlmann J** (2006) The molecular basis for wine grape quality - A volatile subject. *Science* **311**: 804-805.

- Ma J, et al.** (2011) The sucrose-regulated Arabidopsis transcription factor bZIP11 reprograms metabolism and regulates trehalose metabolism. *New Phytol.* **191**: 733-745.
- Ma L, Sun N, Liu X, Jiao Y, Zhao H, Deng XW** (2005) Organ-specific expression of Arabidopsis genome during development. *Plant Physiol* **138**: 80-91.
- Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C** (2005) Les composés phénoliques des végétaux Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Lavoisier, Paris, p192.
- Machemer K, Shaiman O, Salts Y, Shabtai S, Sobolev I, Belausov E, Grotewold E, Barg R** (2011) Interplay of MYB factors in differential cell expansion, and consequences for tomato fruit development. *Plant J.* **68**: 337-50.
- Mallappa C, Yadav V, Negi P, Chattopadhyay S** (2006) A basic leucine zipper transcription factor, G-box-binding factor 1, regulates blue light-mediated photomorphogenic growth in Arabidopsis. *J Biol Chem* **281**: 22190-22199.
- Manning K** (1994) Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta* **94**: 62-68.
- Manning K** (1998) Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta* **205**: 622-631.
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB** (2006) A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet* **38**: 948-952.
- Mapelli S, Frova C, Torti G, Soressi GP** (1978) Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant and Cell Physiology* **19**: 1281-1288.
- Mariotti L, Picciarelli P, Lombardi L, Ceccarelli N** (2011) Fruit-set and Early Fruit Growth in Tomato are Associated with Increases in Indoleacetic Acid, Cytokinin, and Bioactive Gibberellin Contents. *J Plant Growth Regul* 1-11.
- Markus M et Benezra R** (1999) Two isoform of protein disulfide isomerase alter the dimerization status of E2A proteins by a redox mechanism. *J Biol Chem* **274**: 1040-1049.
- Martí C, Orzáez D, Ellul P, Moreno V, Carbonell J, Granell A** (2007) Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *The Plant Journal* **52**: 865-876.
- Martínez-Madrid MC, Serrano M, Riquelme F, Romojaro F** (1996) Polyamines, abscisic acid and ethylene production in tomato fruit.-*Phytochemistry* **43**: 323-326.
- Massari ME et Murre C** (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**: 429-440.
- Maston GA, Evans SK, Green MR** (2006) Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**: 29-59.

- Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E, Endo TA, Okamoto M, Nambara E, Nakajima M, Kawashima M, Satou M, Kim JM, Kobayashi N, Toyoda T, Shinozaki K, Seki M** (2008) Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiol* **49**:1135-1149.
- Matsushima J, Hiratsuka S, Taniguchi N, Wada R, Suzaki N** (1989) Anthocyanin accumulation and sugar content in the skin of grape cultivar Olympia treated with ABA. *J Jpn Soc Hortic Sci.* **58**: 551-555.
- Matus JT, Poupin MJ, Cañón P, Bordeu E, Alcalde JA, Arce-Johnson P** (2010) Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology* **72**: 607-620.
- McClure BA, Guilfoyle TJ** (1987) Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. *Plant Mol Biol* **9**: 611-623
- Mejia N, Gebauer M, Muñoz L, Hewstone N, Muñoz C, Hinrichsen P** (2007) Identification of QTLs for seedlessness, berry size, and ripening date in a seedless × seedless progeny. *Am J Enol Vitic.* **58**: 499-507.
- Mejía N, Soto B, Guerrero M, Casanueva X, Houel C, Miccono Mde L, Ramos R, Le Cunff L, Boursiquot JM, Hinrichsen P, Adam-Blondon AF** (2011) Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenospermocarpic seedlessness in grapevine. *BMC Plant Biol.* **11**: 57.
- Mezzetti B, Landi L, Pandolfini T, Spena A** (2004) The defH9-iaaM auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnol* **4**: 1-4.
- Mitsuda N et Ohme-Takagi M** (2009) Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **50**: 1232-1248.
- Mockaitis K et Estelle M** (2008) Auxin receptors and plant development: A new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 55-80.
- Mockaitis K et Howell SH** (2000) Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal* **24**: 785-796.
- Molesini B, Pandolfini T, Rotino GL, Dani V, Spena A** (2009) Aucsia genes silencing causes parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Physiology* **149**: 534-548.
- Montoya T, Nomura T, Yokota T, Farrar K, Harrison K, Jones JGD, Kaneta T, Kamiya Y, Szekeres M, Bishop GJ** (2005) Patterns of Dwarf expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. *The Plant Journal* **42**: 262-269.
- Mori K, Saito H, Goto-Yamamoto N, Kitayama M, Kobayashi S, Sugaya S, Gemma H, Hashizume K** (2005) Effect of abscisic acid treatment and night temperatures on anthocyanin composition in Pinot noir grapes. *Vitis* **44**:161-165.

- Mullins MG, Bouquet A, Williams LE** (1992) *Biology of grapevine*. Cambridge University Press, Cambridge. 239p.
- Muszynski MG, Dam T, Li B, Shirbroun DM, Hou Z, Bruggemann E, Archibald R, Ananiev EV, Danilevskaya ON** (2006) *delayed flowering1* encodes a basic leucine zipper protein that mediates floral inductive signals at the shoot apex in maize. *Plant Physiol* **142**: 1523-1536.
- Nadeau JA** (2009) Stomatal development: new signals and fate determinants. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 29-35.
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H** (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol*. **140**: 411-432.
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, et al.** (2009) Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol* **50**: 1345-1363.
- Nakazawa M, Yabe N, Ichikawa T, Yamamoto YY, Yoshizumi T, Hasunuma K, Matsui M** (2001) DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyls length. *Plant J*. **25**: 213-221.
- Negri AS, Prinsi B, Rossoni M, Failla O, Scienza A, Cocucci M, Espen L** (2008) Proteome changes in the skin of the grape cultivar Barbera among different stages of ripening. *BMC Genomics* **8**: 378.
- Nemhauser JL, Hong F, Chory J** (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **126**: 467-475.
- Nieva C, Busk PK, Domínguez-Puigjaner E, Lumbreras V, Testillano PS, Risueño MC, Pagès M** (2005) Isolation and functional characterisation of two new bZIP maize regulators of the ABA responsive gene *rab28*. *Plant Mol. Biol.* **58**: 899-914.
- Niggeweg R, Thurow C, Kegler C, Gatz C** (2000) Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of as-1-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of as-1-containing target promoters. *J Biol Chem* **275**: 19897-19905.
- Nishio S, Moriguchi R, Ikeda H, Takahashi H, Takahashi H, Fujii N, Guilfoyle TJ, Kanahama K, Kanayama Y** (2010) Expression analysis of the auxin efflux carrier family in tomato fruit development. *Planta* **232**: 755-764.
- Nitsch JP** (1952) Plant hormones in the development of fruit. *Quart Rev Biol* **27**: 33-57.
- Nitsch JP** (1970) Hormonal factors in growth and development In Hulme, AC Eds., *The biochemistry of fruits and their products*, Academic Press, London and New York, pp 427-472.

- Niwa Y** (2003) A synthetic Green Fluorescent Protein gene for plant biotechnology. *Plant Biotechnol* **20**: 1-11.
- Oh MO, Romanov WG, Smith RC, Zamski E, Sasse J, Clouse SD** (1998) Soybean BRU1 encodes a functional xyloglucan endotransglycosylase that is highly expressed in inner epicotyl tissues during brassinosteroid promoted elongation. *Plant Cell Physiol* **39**: 124-130.
- Ojeda H, Deloire A, Carbonneau A, Ageorges A, Romieu C** (1999) Berry development of grapevines: Relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. *Vitis* **38**: 145-150.
- Okushima Y, et al.** (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* **17**: 444-463.
- Ollat N, Diakou-Verdin P, Carde JP, Barrieu F, Gaudillère JP, Moing A** (2002) Grape berry development : a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **36**: 109-131.
- Ollat N, Geny L, Soyer JP** (1998) Les boutures fructifères de vigne : validation d'un modèle d'étude de la physiologie de la vigne. II. Principales caractéristiques de l'appareil végétatif. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **32**: 1-9.
- Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW** (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* **405**: 462-466.
- Östin A, Kowalyczk M, Bhalerao RP, Sandberg G** (1998). Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **118**: 285-296.
- Overvoorde PJ, et al.** (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**: 3282-3300
- Ozga JA, van Huizen R, Reinecke DM** (2002) Hormone and seed-specific regulation of pea fruit growth. *Plant Physiol* **128**: 1379-1389.
- Ozga JA, Yu J, Reinecke DM** (2003) Pollination-, development-, and auxin-specific regulation of gibberellin 3beta-hydroxylase gene expression in pea fruit and seeds. *Plant Physiol* **131**: 1137-1146.
- Pan QH, Li MJ, Peng CC, Zhang N, Zou X, Zou KQ, Wang XL, Yu XC, Wang XF, Zhang DP** (2005) Abscisic acid activates acid invertases in developing grape berry. *Physiol Plant* **125**: 157-170.
- Pandey S, Nelson DC, Assmann SM** (2009) Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell* **136**: 136-148.
- Paponov IA, Paponov M, Teale W, Menges M, Chakrabortee S, Murray JA, Palme K** (2008) Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **1**: 321-337.

- Park HS** (1995) Le péricarpe des baies de raisin normales et millerandées: ontogenèse de la structure et évolution de quelques constituants biochimiques, notamment des tanins. Thèse de l'université de Bordeaux I, France, 207p.
- Park SK, Morrison JC, Adams DO, Noble AC** (1991) Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes in the skin and mesocarp of Muscat of Alexandria grapes during development. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 514-518.
- Pattanaik S, Xie CH, Kong Q, Shen KA, Yuan L** (2006) Directed evolution of plant basic helix-loop-helix transcription factors for the improvement of transactivational properties. *Biochim Biophys Acta* **1759**: 308-318.
- Pattanaik S, Xie CH, Yuan L** (2008) The interaction domains of the plant Myc-like bHLH transcription factors can regulate the transactivation strength. *Planta* **227**: 701-715.
- Paul MJ et Pellny TK** (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* **54**: 539-547.
- Payne CT, Zhang F, Lloyd AM** (2000) GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in Arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* **156**: 1349-1362.
- Peppi MC, Fidelibus MW, Dokoozlian N** (2006) Abscisic acid application timing and concentration affect firmness, pigmentation, and color of 'Flame Seedless' grapes. *Hortic Sci* **41**: 1440-1445.
- Péret B, de Rybel B, Casimiro I, Benkova I, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ** (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* **14**: 399-408.
- Perez-Rodriguez P, Riano-Pachon M, Correa LGG, Rensing SA, Kersten B, Mueller-Roeber B** (2009) PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research* **doi**: 10.1093/nar/gkp805
- Perkins Veazie P** (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Reviews* **17**: 267-197.
- Perrot-Rechenmann C** (2010) Cellular responses to auxin: Division versus expansion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**: a001446.
- Peters NK, Frost JW, Long SR** (1986) A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **233**: 977-980
- Petro-Turza M** (1987) Flavor of tomato and tomato products. *Food Rev Int* **2**: 309-351.
- Picaud S, Becp F, Dédaldéchamp F, Ageorges A, Delrot S** (2003) Cloning and expression of two plasma membrane aquaporins expressed during ripening of grape berry. *Functional Plant Biology* **30**: 621-630.
- Pilati S, Perazzolli M, Malossini A, Cestaro A, Dematte L, Fontana P, Dal Ri A, Viola R, Velasco R, Moser C** (2007) Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the

occurrence of an oxidative burst at veraison. *BMC Genomics* **8**: 428.

- Pires N et Dolan L** (2010) Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Mol. Biol. Evol.* **27**: 862-874.
- Pirie A et Mullins MG** (1976) Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate, and abscisic acid. *Plant Physiol.* **58**: 468-472.
- Pontier D, Miao ZH, Lam E** (2001) Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *Plant J.* **27**: 529-538.
- Possner DRE, Kliever WM** (1985) The localization of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* **24**: 229-240.
- Poupin MJ, Federici F, Medina C, Matus JT, Timmermann T, Arce-Johnson P** (2007) Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box TM6, PISTILLATA and APETALA3 genes which are differentially expressed during flower and fruit development. *Gene* **404**: 10-24.
- Pratt C** (1971) Reproductive anatomy in cultivated grapes. A review. *American Journal of*
- Price SF, Breen PJ, Valladao M, Watson BT** (1995) Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot-Noir Grapes and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **46**: 187-194.
- Ptashne M** (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* **335**: 683-689.
- Pufky J, Qiu Y, Rao MV, Hurban P, Jones AM** (2003) The auxin-induced transcriptome for etiolated Arabidopsis seedlings using a structure/function approach. *Funct Integr Genomics* **3**: 135-143
- Purgatto E, do Nascimento JRO, Lajolo FM, Cordenunsi BR** (2002) The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. *Journal of Plant Physiology* **159**: 1105-1111.
- Quesada MA, Blanco-Portales R, Posé S, García-Gago JA, Jiménez-Bermúdez S, Muñoz-Serrano A, Caballero JL, Pliego-Alfaro F, Mercado JA, Muñoz-Blanco J** (2009) Antisense down-regulation of the FaPG1 gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening. *Plant Physiol* **150**: 1022-1032.
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E** (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci.* **15**: 395-401.
- Rahmani F, Hummel M, Schuurmans J, Wiese-Klinkenberg A, Smeekens S, Hanson J** (2009) Sucrose control of translation mediated by an upstream open reading frame-encoded peptide. *Plant Physiol.* **150**: 1356-1367.
- Ramsay NA et Glover BJ** (2005) MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci* **10**: 63-70.

- Rapaport HF, Manrique T, Gucci R** (2004) Cell division and expansion in the olive fruit. *Acta Hort.* **636**: 461-465.
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST** (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol* **6**: 27.
- Ren J, Sun L, Wu J, Zhao S, Wang C, Wang Y, Ji K, Leng P** (2010a) Cloning and expression analysis of cDNAs for ABA 8'-hydroxylase during sweet cherry fruit maturation and under stress conditions. *Journal of Plant Physiology* **167**: 1486-1493.
- Ren X, Chen Z, Liu Y, Zhang H, Zhang M, Liu Q, Hong X, Zhu JK, Gong Z** (2010) ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis. *Plant J* **63**: 417-429.
- Ren Z, Li Z, Miao Q, Yang Y, Deng W, Hao Y** (2011) The auxin receptor homologue in *Solanum lycopersicum* stimulates tomato fruit set and leaf morphogenesis. *J Exp Bot.* **62**: 2815-2826.
- Reynier A** (2007) Manuel de viticulture, 10^{ème} Edition. Editions Tec et Doc Lavoisier, Paris, 532p.
- Riano-Pachon DM, Ruzicic S, Dreyer I, Mueller-Roeber B** (2007) PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database. *BMC Bioinformatics* **8**: 42.
- Ribereau-Gayon P** (1964) Les Composés Phenoliques du Raisin et du Vin, Institut Nationale de la Recherche Agronomique, Paris, 79p.
- Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdiou D** (2006) Handbook of enology, Volume 2. The chemistry of wine. Stabilization and treatments. Edition Wiley. 441p.
- Richings EW, Cripps RF, Cowan AK** (2000) Factors affecting 'Hass' avocado fruit size: carbohydrate, abscisic acid and sopenoid metabolism in normal and phenotypically small fruit. *Physiol Plant* **109**: 81-89.
- Riechmann JL, Heard J et al.** (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**: 2105-2110.
- Rodrigo MJ, Alquezar B, Zacarias L** (2006) Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Experimental Botany* **57**: 633-643.
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Alferez F, Mallent MD, Zacarias L** (2003) Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruitspecific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J Exp Bot* **54**: 727-738.
- Roggero JP, Larice JL, Rocheville-Divore C, Archier P, Coen S** (1988) Composition anthocyanique des cépages. II. Essai de classification sur trois ans par analyse en composantes principales et par analyse factorielle discriminante. *Rev. Fr. Oenol.*, **112** : 41-48.

- 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.
- Romeyer FM, Macheix JJ, Goiffon JP, Reminiac CC, Sapis JC** (1983) The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **31**: 346-349
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A, van Kampen M, Borrias M, Weisbeek P, Smeekens S** (1998b) Sucrose-specific signaling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J.* **15**: 253-263.
- Rook F, Weisbeek P, Smeekens S** (1998a) The light-regulated Arabidopsis bZIP transcription factor gene ATB2 encodes a protein with an unusually long leucine zipper domain. *Plant Mol. Biol.* **37**: 171-178.
- Rosinsky JA, Atchley WR** (1998) Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *J Mol Evol* **46**: 74-83.
- Rotino GL, Perri E, Zottini M, Sommer H, Spena A** (1997) Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nat Biotechnol* **15**: 1398-1401.
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M** (1998) The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev.* **12**: 198-207.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Saitou N et Nei M** (1987) The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Santner A et Estelle M** (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**: 1071-1078.
- Sastry KKS et Muir RM** (1963) Gibberellin: Effect on diffusible auxin in fruit development. *Science* **140**: 494-495.
- Satoh R, Fujita Y, Nakashima K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **45**: 309-317.
- Saumonneau A, Agasse A, Bidoyen MT, Lallemand M, Cantereau A, Medici A, Laloi M, Atanassova R** (2008) Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus. *FEBS Lett* **582**: 3281-3287.
- Scarpella E, Marcos D, Friml J, Berleth T** (2006) Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes Dev* **20**: 1015-1027.

- Schoonheim PJ, Veiga H, Pereira DD, Friso G, vanWijk KJ, de Boer AH** (2007) A comprehensive analysis of the 14-3-3 interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two-hybrid approach. *Plant Physiology* **143**: 670-683.
- Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression pattern of around 7, 000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct Integr Genomics* **2**: 282-291.
- Serna L** (2009) Emerging parallels between stomatal and muscle cell lineages. *Plant Physiol* **149**: 1625-1631.
- Serrani JC, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Gallego-Giraldo L, Peres LE, Garcia-Martinez JL** (2010) Inhibition of auxin transport from the ovary or from the apical shoot induces parthenocarpic fruitset in tomato mediated by gibberellins. *Plant Physiology* **153**: 851-862.
- Serrani JC, Fos M, Atarés A, García-martínez JL** (2007a) Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv. micro-tom of tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**: 211-221.
- Serrani JC, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez JL** (2008) Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *The Plant Journal* **56**: 922-934.
- Serrani JC, Sanjuán R, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez JL** (2007b) Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiology* **145**: 246-257.
- Setha S, Kondo S, Hirai N, Ohigashi H** (2005) Quantification of ABA and its metabolites in sweet cherries using deuterium-labeled internal standards. *Plant Growth Regul* **45**: 183-188.
- Seymour GB, Ryder CD, Cevik V, Hammond JP, Popovich A, King GJ, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Manning K** (2011) A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue. *J Exp Bot* **62**: 1179-1188.
- Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA** (1993) *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman and Hall, London.
- Shang Y, Yan L, Liu ZQ, Cao Z, Mei C, Xin Q, Wu FQ, Wang XF, Du SY, Jiang T, Zhang XF, Zhao R, Sun HL, Liu R, Yu YT, Zhang DP** (2010) The Mg-Chelatase H Subunit of Arabidopsis antagonizes a group of transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. *Plant Cell* **22**: 1909-1935.
- Shen H, Cao K, Wang X** (2007) A conserved proline residue in the leucine zipper region of AtbZIP34 and AtbZIP61 in Arabidopsis thaliana interferes with the formation of homodimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**: 425-430.
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Zhang DP** (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**: 823-826.

- Sheng J, Ruan Y, Liu K, Shen L** (2008) Spatiotemporal relationships between abscisic acid and ethylene biosynthesis during tomato fruit ripening. *Acta Hort* **774**: 59-65.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M** (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 410-417.
- Shkolnik D et Bar-Zvi D** (2008) Tomato ASR1 abrogates the response to abscisic acid and glucose in Arabidopsis by competing with ABI4 for DNA binding. *Plant Biotechnol J* **6**: 368-378.
- Sigler PB** (1988) Acid blobs and negative noodles. *Nature* **333**: 210-213.
- Silacci MW, Morrison JC** (1990) Changes in pectin content of Cabernet sauvignon grape berries during maturation. *Am J Enol Vitic* **41**:111-115.
- Silveira AB, Gauer L, Tomaz JP, Cardoso PR, Carmello-Guerreiro S, Vincentz M** (2007) The Arabidopsis AtbZIP9 protein fused to the VP16 transcriptional activation domain alters leaf and vascular development. *Plant Sci.* **172**: 1148-1156.
- Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P** (2006) Sucrosespecific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **140**: 637-646.
- Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G, 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
- Sreekantan L et Thomas MR** (2006) VvFT and VvMADS8, the grapevine homologues of the floral integrators FT and SOC1, have unique expression patterns in grapevine and hasten flowering in Arabidopsis. *Functional Plant Biology* **33**: 1129-1139.
- Srinivasan A et Morgan DG** (1996) Growth and development of the pod wall in spring rape (*Brassica napus*) as related to the presence of seeds and exogenous phytohormones. *J Agricult Sci* **127**: 487-500.
- Srivastava A et Handa A** (2005) Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *J Plant Growth Regul* **24**: 67-82.
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W** (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17**: 616-627.
- Staswick PE, Tiryaki I, Rowe ML** (2002) Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**: 1405-1415.
- Stines AP, Grubb J, Gockowiak H, Henschke PA, Hoj PB, Heeswijck RV** (2000) Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Aust. J. Grape Wine Res.* **6**: 150-158.

- Stracke R, Werber M, Weisshaar B** (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 447-456.
- Strathmann A, Kuhlmann M, Heinekamp T, Droge-Laser W** (2001) BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI-3/TBZF and BZI-4, and is functionally involved in flower development. *Plant J* **28**: 397-408.
- Sun L, Wang YP, Chen P, Ren J, Ji K, Li Q, Li P, Dai SJ, Ping Leng P** (2011) Transcriptional regulation of SIPYL, SIPP2C, and SLSnRK2 gene families encoding ABA signal core components during tomato fruit development and drought stress. *J Exp Bot* doi: 10.1093/jxb/err252.
- Sun L, Zhang M, Ren J, Qi J, Zhang G, Leng P** (2010) Reciprocity between abscisic acid and ethylene at the onset of berry ripening and after harvest. *BMC Plant Biology* **10**: 257-268.
- Sun L, Zhang M, Ren J, Qi J, Zhang G, Leng P** (2010) Reciprocity between abscisic acid and ethylene at the onset of berry ripening and after harvest. *BMC Plant Biology* **10**: 257-268.
- Sundberg E et Ostergaard L** (2009) Distinct and Dynamic Auxin Activities During Reproductive Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**: a001628
- Swarup K, Benková E, Swarup R, et al.** (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* **10**: 946-954.
- Symons GM, Davies C, Shavrukov Y, Dry IB, Reid JB, Thomas MR** (2006) Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology* **140**: 150-158.
- Takase T, Nakazawa M, Ishikawa A, Kawashima M, Ichikawa T, Takahashi N, Shimada H, Manabe K, Matsui M** (2004) ydk1-D, an auxin-responsive GH3 mutant that is involved in hypocotyl and root elongation. *Plant J.* **37**: 471-483.
- Takatsuji H** (1999) Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science. *Plant Mol. Biol.* **39**: 1073-1078.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599.
- Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng CX, Robinson CV, Estelle M, Zheng N** (2007) Mechanism of perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**: 640-645.
- Tanksley SD** (2004) The genetic, developmental and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell* **16**: S181-S189.
- Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, et al.** (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**: 164-176.

- Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M, Smeekens S** (2005) Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiol* **139**: 1840-1852.
- Terrier N, Glissant D, Grimplet J, et al.** (2005) Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* **222**: 820-831.
- Terrier N, Torregrosa L** (2001) Grape berry acidity. In "Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine". KA Roubelakis-Angelakis (Edition Kluwer Academic Publishers), 474p.
- Terrier N, Torregrosa L, Ageorges A, Vialet S, Verriès C, Cheynier V, Romieu C** (2009) Ectopic expression of VvMybPA2 promotes proanthocyanidin biosynthesis in *Vitis vinifera* L. and suggests additional targets in the pathway. *Plant Physiology* **149**: 1028-1041.
- Theologis A et al.** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 816-820.
- Thompson PA** (1969) The effect of applied growth substances on development of the strawberry fruit.: II. Interactions of auxins and gibberellins. *Journal of Experimental Botany* **20**: 629-647.
- Thompson J D, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Thurrow C, Schiermeyer A, Krawczyk S, Butterbrodt T, Nickolov K, Gatz C** (2005) Tobacco bZIP transcription factor TGA2.2 and related factor TGA2.1 have distinct roles in plant defense responses and plant development. *Plant J* **44**: 100-113.
- Tingwa P, Young R** (1975) The effect of indole-3-acetic acid and other growth regulators on the ripening of avocado fruits. *Plant Physiol* **55**: 937-940.
- Tisza V, Kovacs L, Balogh A, Heszky L, Kiss E** (2010) Characterization of FaSPT, a SPATULA gene encoding a bHLH transcriptional factor from the non-climacteric strawberry fruit. *Plant Physiol. Biochem.* **48**: 822-826.
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ** (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* **15**: 533-543
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ** (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **16**: 533-543
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH** (2003) The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15**: 1749-1770.
- Ton J, Flors V, Mauch-Mani B** (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci* **14**: 310-317.

- Topfer R, Matzeit V, Gronenborn B, Schell J, Steinbiss HH** (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Research* **15**: 5890.
- Tournier B, Sanchez-Ballesta MT, Jones B, Pesquet E, Regad F, Latché A, Pech JC, Bouzayen M** (2003) New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Lett* **550**: 149-154.
- Trainotti L, Bonghi C, Ziliotto F, Zanin D, Rasori A, Casadoro G, Ramina A, Tonutti P** (2006) The use of microarray μ PEACH1.0 to investigate transcriptome changes during transition from pre-climacteric to climacteric phase in peach fruit. *Plant Science* **170**: 606-613.
- Tromas A et Perrot-Rechenmann C** (2010) Recent progresses in Auxin Biology. In Numéro thématique Développement végétatif des plantes. *CRAS* **333**: 297-306.
- Tuppo L, Giangrieco I, Palazzo P, Bernardi ML, Scala E, Carratore V, Tamburrini M, Mari A, Ciardiello MA** (2008) Kiwellin, a Modular Protein from Green and Gold Kiwi Fruits: Evidence of in Vivo and in Vitro Processing and IgE Binding. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 3812-3817.
- Ullmann A, Jacob F, Monod J** (1967) Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **24**: 339-343.
- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2010) Molecular basis of the core regulatory network in aba responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol* **51**: 1821-1839
- Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, et al.** (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**: 17588-17593.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11632-11637.
- Van Leene J, Witters E, Inzé D, De Jaeger G** (2008) Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends Plant Sci.* **13**: 517-520.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002) Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. Biol.* **3**: 1-12.
- Vanneste S, Friml J** (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**: 1005-1016.

- Varaud E, Brioude F, Sze'csi J, Leroux J, Brown S, Perrot-Rechenmann C, Bendahmane M** (2011) AUXIN RESPONSE FACTOR8 Regulates Arabidopsis Petal Growth by Interacting with the bHLH Transcription Factor BIGPETALp. *Plant Cell* **23**: 973-983.
- Vardhini BV et Rao SS** (2002) Acceleration of ripening of tomato pericarp discs by brassinosteroids. *Phytochemistry* **61**: 843-847.
- Velasco R, et al.** (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* **2**: e1326
- Vendrell M** (1969) Reversion of senescence: effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and indoleacetic acid on respiration, ethylene production and ripening of banana fruit slices. *Aust. J. Biol. Sci.* **22**: 601-610.
- Vendrell M** (1985) Dual effect of 2,4-D on ethylene production and ripening of tomato fruit tissue. *Physiol Plant* **64**: 559-563.
- Vendrell M et Buesa C** (1989) Relationship between abscisic acid content and ripening of apples. *Acta Hort* **258**: 389-396.
- Verries C, Guiraud JL, Souquet JM, Vialet S, Terrier N, Olle D** (2008) Validation of an extraction method on whole pericarp of grape berry (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz) to study biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 5896-5904
- Vieten A, Sauer M, Brewer PB, Friml J** (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci.* **12**: 160-168.
- Vieten A, Vanneste S, Wiśniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J** (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**: 4521-4531.
- Vivian-Smith A et Koltunow AM** (1999) Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarpy in Arabidopsis. *Plant Physiol* **121**: 437-452.
- Vom Endt D, Kijne J, Memelink J** (2002) Transcription factors controlling plant secondary metabolism: What regulates the regulators? *Phytochemistry* **61**: 107-114.
- Vrebalov J, Pan IL, Arroyo AJ, McQuinn R, Chung M, Poole M, Rose J, Seymour G, Grandillo S, Giovannoni J, et al.** (2009) Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato SHATTERPROOF gene TAGL1. *Plant Cell* **21**: 3041-3062.
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J** (2002) A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science* **296**: 343-346.
- Vriezen WH, Feron R, Maretto F, Keijman J, Mariani C** (2008) Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist* **177**: 60-76.

- Vriezen WH, Feron R, Maretto F, Keijman J, Mariani C** (2008) Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist* **177**: 60-76.
- Walker AR, Lee E, Bogs J, McDavid DAJ, Thomas MR, Robinson SP** (2007) White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant Journal* **49**: 772-785.
- Walsh J et Freeling M** (1999) The *liguleless2* gene of maize functions during the transition from the vegetative to the reproductive shoot apex. *Plant J.* **19**: 489-495.
- Walsh J, Waters CA, Freeling M** (1997) The maize gene *liguleless2* encodes a basic leucine zipper protein involved in the establishment of the leaf blade-sheath boundary. *Genes and Development* **11**: 208-218.
- Wang A, Tan DM, Takahashi A, Li TZ, Harada T** (2007) MdERFs, two ethylene-response factors involved in apple fruit ripening. *J Exp Bot* **58**: 3743–3748
- Wang H, Huang H, Huang X** (2007) Differential effects of abscisic acid and ethylene on the fruit maturation of *Litchi chinensis* Sonn.. *Plant Growth Regul.* **52**: 189-198.
- Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latche A, Pech JC, Bouzayen M** (2005) The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *The Plant Cell* **17**: 2676-2692.
- Waters DLE, Holton TA, Ablett EM, Lee LS, Henry RJ** (2005) cDNA microarray analysis of the developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) berry skin. *Functional and Integrative Genomics* **5**: 40-58.
- Weaver RJ** (1962) The effect of benzo-thiazole-2-oxyacetic acid on maturation of seeded varieties of grape. *Am J Enol Vitic* **13**: 141-149.
- Wellmer F, Kircher S, Rügner A, Frohnmeyer H, Schäfer E, Harter K** (1999) Phosphorylation of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by light. *J. Biol. Chem.* **274**: 29476-29482.
- Weltmeier F, Ehlert A, Mayer CS, Dietrich K, Wang X, Schütze K, Alonso R, Harter K, Vicente-Carbajosa J, Dröge-Laser W** (2006) Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO J.* **25**: 3133-3143.
- Wheeler S, Loveys B, Ford C, Davies C** (2009) The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **15**: 195-204.
- Wiese A, Elzinga N, Wobbes B, Smeekens S** (2004) A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. *Plant Cell* **16**: 1717-1729.

- Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, Weigel D** (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**: 1056-1059.
- Winicur ZM, Zhang GF, Staehelin LA** (1998) Auxin deprivation induces synchronous golgi differentiation in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol* **117**: 501-513.
- Wisniewska J, Xu J, Seifertova D, Brewer PB, Ruzicka K, Blilou I, Rouquie D, Benkova E, Scheres B, Friml J** (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* **312**: 883
- Wittwer SH, Bukovac MJ, Sell HM, Weller LE** (1957) Some effects of gibberellin on flowering and fruit setting. *Plant Physiol* **32**: 39-41.
- Wray, G. A., M. W. Hahn, E. Abouheif, J. P. Balhoff, M. Pizer et al.** (2003) The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol* **20**: 1377-1419.
- Wu FQ, Xin Q, Cao Z, Liu ZQ, Du SY, Mei C, Zhao CX, Wang XF, Shang Y, Jiang T, Zhang XF, Yan L, Zhao R, Cui ZN, Liu R, Sun HL, Yang XL, Su Z, Zhang DP** (2009) The Mg-chelatase H subunit binds abscisic acid and functions in abscisic acid signaling: new evidence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **150**: 1940-1954.
- Xiao H, Jiang N, Schaffner EK, Stockinger EJ, van der Knaap E** (2008) A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science* **319**: 1527-1530.
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D and Shen QJ** (2005) Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiol.* **137**: 176-189.
- Xu H, Wang X, Chen J** (2010) Overexpression of the Rap2.4f transcriptional factor in *Arabidopsis* promotes leaf senescence. *Sci China Life Sci.* **53**: 1221-1226.
- Yakushiji H, Morinaga K, Kobayashi S** (2001) Promotion of berry ripening by 2,3,5-triiodobenzoic acid in 'Kyoho' grapes. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **70**: 185-190.
- Yakushiji H, Morinaga K, Kobayashi S** (2001) Promotion of berry ripening by 2,3,5-triiodobenzoic acid in 'Kyoho' grapes. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **70**: 185-190.
- Yamada K, Takahashi R, Fujitani C, Mishima K, Yoshida M, Joyce DC, Yamaki S** (2009) Cell wall extensibility and effect of cell-wall-loosening proteins during rose flower opening. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science* **78**: 242-251.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 781-803.

- Yamaki S, Asakura T** (1991) Stimulation of the uptake of sorbitol into vacuoles from apple fruit flesh by abscisic acid and into protoplasts by indoleacetic acid. *Plant Cell Physiol* **32**: 315-318.
- Yang T et Poovaiah BW** (2000) Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action. *J. Biol. Chem.* **275**: 3137-3143.
- Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, Zhaofeng G, Zhiqiang L, Yunfei Z, Xiaoxiao W, Xiaoming Q, et al.** (2006) The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* **60**: 107-124.
- Yin Y, Zhu Q, Dai S, Lamb C, Beachy RN** (1997) RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, functions in vascular development. *EMBO J.* **16**: 5247-5259.
- Yin ZM, Malinowski R, Ziolkowska A, Sommer H, Plader W, Malepszy S** (2006) The DefH9-iaaM-containing construct efficiently induces parthenocarpy in cucumber. *Cell Mol Biol Lett* **11**: 279-290.
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* **61**: 672-685.
- Yu XC, Li MJ, Gao GF, Feng HZ, Geng XQ, Peng CC, Zhu SY, Wang XJ, Shen YY, Zhang DP** (2006) Abscisic acid stimulates a calcium-dependent protein kinase in grape berry. *Plant Physiol* **140**: 558-579.
- Zapata C** (1998) Suivi pluriannuel de la mise en place et de la mobilisation des réserves carbonées et azotées chez deux cépages de vigne (*Vitis vinifera* L.) présentant une sensibilité différente à la coulure. Thèse, I.N.A. Paris Grignon. 107 p.
- Zapata C, Deléens E, Chaillou S, Magné C** (2004) Mobilisation and distribution of starch and total N in two grapevine cultivars differing in their susceptibility to shedding. *Functional Plant Biology* **31**: 1127-1135.
- Zazimalova E, Opatrny Z, Brezinova A** (1995) The effect of auxin starvation on the growth of auxin-dependent tobacco cell culture-dynamics of auxin binding activity and endogenous free IAA content. *J Exp Bot* **46**: 1205-1213.
- Zhang H, Jin JP, Tang L, Zhao Y, Gu XC, Gao G, Luo JC** (2011) PlantTFDB 2.0: update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research* **39**: 1114-1117.
- Zhang J, Chen R, Xiao J, Qian C, Wang T, Li H, Ouyang B, Ye Z** (2007) A single-base deletion mutation in SIIAA9 gene causes tomato (*Solanum lycopersicum*) entire mutant. *J. Plant Res.* **120**: 671-678.

- Zhang J, Ma H, Feng J, Zeng L, Wang Z, Chen S** (2008) Grape berry plasma membrane proteome analysis and its differential expression during ripening. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2979-2990.
- Zhang JY, Broeckling CD, Sumner LW, Wang ZY** (2007) Heterologous expression of two *Medicago truncatula* putative ERF transcription factor genes, WXP1 and WXP2, in *Arabidopsis* led to increased leaf wax accumulation and improved drought tolerance, but differential response in freezing tolerance. *Plant Mol Biol.* **64**: 265-278.
- Zhang M, Leng P, Zhang G, Li X** (2009a) Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1241-1252.
- Zhang M, Yuan B, Leng P** (2009b) The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1579-1588.
- Zhang W, Ruan J, Ho TH et al.** (2005) Cis-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid- and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* **21**: 3074-3081.
- Zhang XR, Luo GG, Wang RH, Wang J, Himelrick DG** (2003) Growth and developmental responses of seeded and seedless grape berries to shoot girdling. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* **128**: 316-323.
- Zhang Y, Tessaro MJ, Lassner M, Li X** (2003) Knockout analysis of *Arabidopsis* transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell* **15**: 2647-2653.
- Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, Zhao R, Li Y, Fan RC, Shang Y, Du SY, Wang XF, Wu FQ, et al.** (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3019-3036.
- Zurek DM et Clouse SD** (1994) Molecular cloning and characterisation of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. *Plant Physiol* **104**: 161-170.

Matériel et méthodes complémentaires détaillés



Photographie d'une baie de raisin cv. béquignol mutant

I. Outils bioinformatiques

I.1. Les banques de données, recherche de séquences nucléotidiques

I.1.1. GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>

La base de données américaine GenBank est un recueil annoté de toutes les séquences nucléotidiques disponibles publiquement ainsi que de leur traduction en protéines. Elle a été mise en place par le “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) dans le cadre de l'INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration). Désormais, elle est regroupée avec d'autres banques, RefSeq et PDB, sous la dénomination “Nucleotide”. GenBank est constituée par des soumissions directes de séquences de la part de laboratoires ou de centres de séquençage à grande échelle.

I.1.2. Génoscope: <http://www.genoscope.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>

L'analyse du séquençage du génome de la Vigne est le fruit d'une collaboration entre le Génoscope (Centre National de Séquençage), l'INRA, l'IGA (“Istituto di Genomica Applicata”) et d'un *consortium* de groupes italiens. Les données de séquençage (couverture 12X) ont été générées par le Génoscope, l'IGA et l'université de Vérone. L'assemblage a été réalisé par l'IGA. Les prédictions de gènes ont été effectuées par le logiciel GAZE.

I.1.3. Sol Genomic Network (SGN): <http://solgenomics.net/>

SNG est une base de données dédiée à la biologie de la famille des Solanacées, laquelle comprend un nombre important d'espèces d'intérêt agronomique comme la tomate, la pomme de terre, et le tabac par exemple. SNG fait partie du programme SOL (International Solanaceae Initiative) et constitue l'interface bioinformatique du projet de séquençage du génome de la tomate. Depuis décembre 2009, une première version de l'assemblage du génome de la tomate est disponible sur ce site.

I.1.4. The Institute of Genomic Research (TIGR): <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html>

La banque du TIGR recense et regroupe les séquences génomiques et les séquences d'ADNc complètes ou partielles sous forme de TC (tentative consensus) ou d'EST (Expressed Sequenced Tag) de divers organismes: animaux, plantes, protistes, champignons.

I.2. Recherche d'homologie, alignement des séquences nucléotidiques et protéiques

I.2.1. BLAST

Les comparaisons de séquences des gènes d'intérêt avec les banques de données ont été réalisées à l'aide du programme BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool). BLAST est une méthode de recherche bioinformatique permettant de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés. Elle a été développée au NCBI (Altschul *et al.*, 1990), mais est également disponible sur les autres bases de données (Génoscope, TIGR, SGN...). Ce programme permet de retrouver rapidement dans ces bases de données, les séquences (nucléotidiques ou protéiques) ayant des zones de similitude avec une séquence donnée (introduite par l'utilisateur).

I.2.2. ClustalW

Les séquences nucléotidiques ou protéiques sont alignées avec le logiciel ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Ce programme d'alignement multiple de séquences utilise un algorithme progressif basé sur la similarité des paires des séquences. Les deux séquences les plus similaires servent de base pour l'élaboration d'un alignement multiple primaire.

I.2.3. MEGA4

L'analyse phylogénétique a été réalisée avec MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). La méthode utilisée est celle du Neighbour Joining (Saitou et Nei, 1987). Elle est fondée sur la notion de distance génétique en tenant compte des différences de vitesse d'évolution entre les différentes branches de l'arbre phylogénétique. Elle consiste à calculer les longueurs de branches de l'arbre et choisir l'arbre qui minimise la longueur totale.

I.3. Recherche de domaines protéiques in silico

PlnTFDB (**P**lant **T**ranscription **F**actor **d**atabase) (<http://plntfdb.bio.unipotsdam.de/v3.0/>; Perez Rodriguez *et al.*, 2009) est une base de données regroupant les facteurs de transcription de plantes et les classant en différentes familles. Les gènes codant des facteurs de transcriptions sont identifiés grâce à des alignements avec des domaines connus (issus notamment de la base de données PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)).

Les interfaces ScanProsite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>) ou InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) permettent de rechercher dans une séquence

d'acides aminés, des motifs protéiques connus recensés dans une banque de motifs et ainsi, de prédire la fonction et la famille de la protéine étudiée.

Les prédictions d'adressage des protéines aux organelles par recherche de motifs putatifs sont réalisées grâce à l'interface WoLF PSORT (<http://wolfsort.org/>).

Nuc pred (<http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/>) permet de recenser les acides aminés contribuant à la localisation nucléaire d'une protéine.

La prédiction des sites de phosphorylation potentiels est réalisée grâce au logiciel NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

Enfin, la prédiction de la liaison à l'ADN d'une protéine est réalisée grâce à deux logiciels différents: DNABindR (<http://turing.cs.iastate.edu/PredDNA/predict.html>) et BindN (<http://bioinfo.ggc.org/bindn/>).

II. Matériel biologique

II.1. Matériel végétal

II.1.1. Baies de raisin

Les baies de raisins utilisées pour les extractions d'ARN à différents stades de développement proviennent du cépage *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon. Elles ont été prélevées sur le Domaine INRA de la Grande Ferrade (Villenave d'Ornon, Gironde) entre juin et septembre, les années 2006 et 2009. Les baies sont prélevées avec des ciseaux en coupant juste au dessus du pédicelle, puis triées:

- Les baies au stade vert sont triées en fonction de leur masse (la masse moyenne d'une baie représentative d'un stade étant déterminée à partir de la masse de trois prélèvements indépendants de 50 baies).
- Les baies au stade véraison sont prélevées dès qu'un changement de couleur est observé.
- Pour les prélèvements à partir de la véraison et jusqu'au stade vendange, les baies sont triées en fonction de leur teneur en sucre (test de flottaison des baies dans des solutions de NaCl). Les baies sont ensuite immédiatement plongées dans l'azote liquide et stockées à -80°C jusqu'à utilisation. Ce prélèvement est effectué sur plusieurs cepes et plusieurs grappes pour chaque stade.

Concernant les études de profils d'expression des gènes dans les différents tissus de la baie, la séparation pulpe/pellicule/pépins a été effectuée à partir de baies congelées.

Les baies provenant des cépages Tite de crabe, Dodrelabi, Kyoho, Dabouki, Cardinal et Sylvestris 38 ont été prélevées sur le Domaine INRA du Grand Parc (Lastresne, Gironde).

Candicans 10089, Riparia 10202, Riparia 10525, Rubra 10924, Cinerea 10137 and Cabernet Sauvignon) ont été prélevées sur le Domaine INRA de la Grande Ferrade (Villenave d'Ornon, Gironde). Tite de crabe, Dodrelabi, Kyoho, Dabouki, Cardinal, Sylvestris 38 sont des cépages de l'espèce *Vitis vinifera*. En revanche, Candicans 10089, Riparia 10202, Riparia 10525, Rubra 10924 et Cinerea 10137 sont des espèces du genre *Vitis*, mais ne font pas partie de l'espèce *vinifera*. Les récoltes effectuées à partir de ces différents cépages ont été réalisées grâce aux conseils de Mr. Louis Bordenave (UMR INRA EGFV).

II.1.2. Organes de vigne

Les ARNm des différents organes de vigne ont été extraits à partir de racines, tiges, feuilles et inflorescences prélevées en serre sur des boutures fructifères du cépage cabernet sauvignon. Les boutures fructifères ont été produites et entretenues par Mr. Thierry Robert selon le protocole décrit par Ollat *et al.* (1998) et Gény *et al.* (1998).

II.1.3. Plants de tabac

Les plants de tabac (*Nicotiana tabacum*) utilisés pour la préparation de protoplastes correspondent au cultivar Petit Havana SRI. Ils sont cultivés *in vitro* en chambre de culture avec une alternance jour/nuit (16h/8h), et une température de 25°C jour/ 20°C nuit. Ces plants sont cultivés dans du milieu Murashige et Skoog (MS) gélosé (Annexe 7, Tableau 1) et repiqués toutes les 4 semaines. Les feuilles de Tabac utilisées pour la préparation de protoplastes sont prélevées 2 semaines après repiquage.

II.1.4. Plants de tomate

La variété de tomate utilisée est *Solanum lycopersicum* cv. West Virginia 106 (WVA106). Les ARN issus de fruits à différents stades de développement, racines, tiges, feuilles et inflorescences proviennent de plantes cultivées en serre et mis à notre disposition par Mr. Daniel Just (UMR INRA 1332 « Biologie du fruit et pathologie »).

Les graines de tomate sont stérilisées en surface 15 min dans une solution d'hypochlorite CaCl₂ 4% (p/v) puis rincées 3 fois dans de l'eau stérile et enfin séchées sous la hotte pendant 48 h. Les graines sont ensuite semées sur un milieu MS gélosé (Annexe 7, Tableau 2), additionné de kanamycine (75 mg/L) pour les plantules transgéniques. Les semis sont placés 24h à l'obscurité, puis cultivés *in vitro* en chambre de culture avec une alternance jour/nuit (16h/8h), et une température de 25°C jour/ 20°C nuit. Ces plantules sont cultivées dans du milieu Murashige et Skoog (MS) gélosé (Annexe 7, Tableau 3) additionné de

kanamycine (75 mg/L) pour les plantes transgéniques, et repiquées tous les 4 semaines. Elles sont ensuite transférées en phytotron dans du terreau et soumises à une alternance jour/nuit (16h/8h), et à une température de 25°C jour/ 20°C nuit. L'acclimatation se fait d'abord en "mini serre" ce qui permet de maintenir les plantes dans une atmosphère humide, pendant une semaine environ, avant d'être exposées à l'atmosphère du phytotron. Aucune solution nutritive n'est ajoutée lors de l'arrosage. Les fleurs sont « baguées » le jour de l'anthèse (ouverture maximale des pétales).

II.1.5. Culture de cellules

a. Suspension cellulaire d'*Arabidopsis thaliana*

La lignée cellulaire T87 d'*Arabidopsis thaliana* a été créée en induisant des cals à partir de plantules (Axelos *et al.*, 1992). Ces cellules sont cultivées dans un milieu liquide GB5 (Annexe 7, Tableau 4), à l'obscurité, sous agitation permanente (120 rotation par minute (rpm)) en salle climatisée (22°C). Cette suspension cellulaire est repiquée tous les 7 jours, par addition de 10 mL de cellules dans 40 mL de milieu neuf. Cette culture cellulaire est utilisée pour la production de protoplastes.

b. Suspension cellulaire de vigne (CSB)

Les cellules isolées de baie de raisin cv Cabernet Sauvignon (cellules CSB) sont cultivées dans le « milieu vigne » (Descendit *et al.*, 1996 ; Annexe 7, Tableau 5). Les cellules sont maintenues à l'obscurité, sous agitation orbitale (120 rpm), et température contrôlée (22-23°C). Cette suspension cellulaire est repiquée tous les 7 jours, par addition de 10 mL dans 40 mL de milieu de culture frais.

Les traitements les différentes hormones sont réalisés au 6^{ème} jour de culture, alors que les cellules CSB sont en fin de phase exponentielle de croissance. Après différents temps de traitement, les cellules sont prélevées par filtration sous vide, immédiatement congelées dans l'azote liquide, puis conservées à -80°C.

c. Suspension cellulaire embryogène de Vigne (41B)

Les cellules de Vignes utilisées pour la transformation sont des cellules embryogènes, issues du porte-greffe 41B (*Vitis vinifera* cv Chasselas X *Vitis berlandieri*). Cette suspension cellulaire a été initiée selon les techniques précédemment décrites par Mauro *et al.* (1995). Ces suspensions cellulaires sont cultivées dans du milieu GM⁺ (Annexe 7, Tableau 6) à

l'obscurité, sous agitation permanente (120 rpm) en salle climatisée (22°C). Ces cellules sont repiquées tous les 10 jours, en prélevant 0,5 mL de cellules sédimentées (PCV – Packed cell Volume) dans 25 ml de milieu neuf. Aucun antibiotique n'est ajouté pour la souche sauvage 41B, alors le milieu est additionné de céfotaxime (200µg/mL, contre-sélection d'*Agrobacterium*) et de paromomycine (1,8 µg/mL sélection des plantules transformées) pour les suspensions transformées de façon stable.

Ces cellules 41B ont le potentiel de générer des embryons (par embryogénèse somatique) puis des plantules, si le milieu est dépourvu d'auxine. Le milieu GM dépourvu de NOA est alors appelé GM₀ (Coutos-Thévenot *et al.*, 1992). Pour cela, 50 µL de cellules sont mises en culture dans 80 mL de milieu liquide GM₀ complété avec de la céfotaxime (200 µg/mL) et de la paromomycine (1,8 µg/mL) sous agitation permanente (200 rpm), à 26°C et à l'obscurité. Après une semaine de culture, les embryons commencent à se différencier et le milieu est alors changé tous les 3 jours.

II.2. Les souches de bactéries

II.2.1. Souche d'*Escherichia Coli*

a. XL1-Blue

Une des souches d'*Escherichia Coli* utilisée pour l'amplification d'un plasmide recombinant, est la souche XL1-Blue (Clontech). Elle a surtout été utilisée lors de clonage de base. Elle est recA1 c'est à-dire qu'elle ne peut plus subir de recombinaison de son génome, ce qui leur confère une bonne stabilité génétique. Elle est utilisée pour la multiplication des plasmides introduits par choc thermique (thermo-compétence). La souche XL1-Blue possède en plus une résistance à la tétracycline (Tn10). Elle présente le génotype *endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac-*, [F'*lacIqZDM15, proAB, Tn10*]. Ces bactéries sont cultivées dans du milieu Luria Bertani (LB) (Annexe 7, Tableau 7) liquide ou gélosé (ajout de 15 g/L d'agar bactériologique (p/v)), à 37°C, et sous une agitation de 200 rpm environ pour les cultures bactériennes liquides.

b. TOP10

TOP10 (Invitrogen) est une souche d'*Escherichia Coli* qui a été utilisé lors des clonages par la méthode Gateway™. Contrairement à la souche XL1-Blue, les TOP10 sont utilisées pour la multiplication des plasmides introduits par choc électrique (électro-compétence). Elle présente le génotype suivant: F- *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)*

$\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(araleu) 7697 galU galK rpsL$ (Str^R) *endA1 nupG*. Ces bactéries sont cultivées dans le même milieu que les cellules XL1-Blue.

c. One Shot® *ccdB* Survival™ T1 Phage-Resistant

Cette souche d'*Escherichia Coli* One Shot® *ccdB* Survival™ T1 Phage-Resistant (Invitrogen) est utilisée pour la propagation des plasmides Gateway™ non recombinés, contenant l'opéron *ccdB*. Elle présente le génotype suivant : F *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 ara\Delta 139 D(araleu)7697 galU galK rpsL$ (Str^R) *endA1 nupG tonA::P_{trc}-ccdA*. Elles sont transformées par thermocompétence.

II.2.2. Souches d'*Agrobacterium tumefaciens*

La transformation stable de Tomate et des cellules embryogènes de vigne a été réalisée avec les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (*Vir*, *Chlo*^R, *rif*^R) (Koncz et Schell, 1986) et EHA105 (*Vir*, *Sp*^R, *rif*^R). Ces souches disposent chacune d'un gène de résistance à la rifampicine (*rif*^R) sur leur chromosome. Elles possèdent également un plasmide Ti (Tumor inducing) désarmé contenant un gène de résistance à un autre antibiotique (Chloramphénicol (*Chlo*^R) pour GV3101 et spectinomycine (*Sp*^R) pour EHA105) ainsi que les gènes de virulence (*Vir*) permettant passage de l'ADN de transfert (ADN-T) dans le noyau de la cellule végétale, et son intégration dans l'ADN génomique de celle-ci.

Ces bactéries sont cultivées en milieu YEB (Annexe 7, Tableau 8) liquide ou gélosé (ajout de 15 g/L d'agar bactériologique (p/v)), à 28°C, et sous une agitation de 200 rpm environ pour les cultures bactériennes liquides.

II.3. Les souches de levure

Deux souches de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ont été utilisées pour les analyses d'interactions protéiques par la technique de double hybride chez la levure:

II.3.1. AH109

La souche AH109 (MATa) (Clontech) a été transformée avec la banque d'ADNc. Elle a également été transformée avec la protéine appât lors du test d'autoactivité. Elle présente le génotype : *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1*. Elle possède quatre gènes rapporteurs : *ADE2, HIS3, lac Z* et *MEL1*. *ADE2* et *HIS3* codent respectivement des enzymes permettant la synthèse de l'adénine et de l'histidine.

lacZ code une β -galactosidase, dont l'activité peut être mesurée par hydrolyse de l'X-Gal. *MEL1* code une α -galactosidase, enzyme sécrétée dans l'espace périplasmique. Son activité peut être détectée par addition de X- α -Gal sur boîtes de Pétri, l'hydrolyse de ce substrat par MEL1 induisant une coloration bleue des colonies.

II.3.2. Y187

La souche Y187 (MAT α) (Clontech) a été transformée avec la protéine appât. Elle présente le génotype : MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4 Δ* , *met-*, *gal80 Δ* , *URA3::GALIUAS-GALITATA-lacZ*, *MEL1*. Elle possède deux gènes rapporteurs *Lac Z* et *MEL1*.

Lorsqu'elles ne sont pas transformées, les souches Y187 et AH109 sont cultivées sur milieu YPDA (Annexe 7, Tableau 9) liquide ou gélosé (ajout de 20 g/L d'agar bactériologique (p/v)), à 30°C, sous agitation (200 rpm) pour les cultures liquides. Après transformation, les levures sont cultivées dans du milieu dit « de sélection » : le milieu minimum « Synthetic Dropout » (SD) (Annexe 7, Tableau 10) complété par une solution d'acides aminés DO (Dropout solution) (Annexe 7, Tableau 11) dans lequel certains acides aminés sont délibérément omis en fonction de la pression de sélection désirée. Le milieu SD peut également être additionné de X- α Gal (20 mg/L), après autoclavage, afin de tester l'activité du gène rapporteur *MEL1*. Les milieux de culture solides sont obtenus par ajout de 20 g/L d'agar bactériologique.

II.4. Vecteurs de clonage

L'ensemble des cartes des vecteurs de clonage sont présentées en Annexes.

II.4.1. Les vecteurs de sous-clonage

Le clonage moléculaire permet l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur de clonage et sa multiplication dans des bactéries. Deux vecteurs de sous-clonage ont été utilisés (Annexe 1) :

a. Le vecteur pGEMT-easy

Le pGEMT-easy (3015 pb, *Amp^R*) (Promega) est utilisé pour la plupart des sous-clonages d'ADNc. Il est fourni sous sa forme linéarisée, coupé au milieu de son multi-site de clonage (Multiple Cloning Site, MCS). Il possède une thymidine en position 3' bordant chaque extrémité, l'empêchant de se recirculariser. La présence de ces bases permet le clonage

rapide d'amplicons obtenu par PCR et possédant une déoxyadénosine protrusive en 3', ajoutée par la plupart des polymérases thermostables de type *Thermophilus*. Les séquences nécessaires à la transcription *in vitro* par les ARN polymérases T7 et SP6 se trouvent de part et d'autre du multi-site de clonage. Les marqueurs de sélection sont le gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R) et le gène codant pour la partie N-terminale de la β -galactosidase (peptide α) placée sous le contrôle du promoteur *lac* inductible par l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside, inducteur de l'opéron lactose). Le produit de ce gène peut compléter le fragment C-terminal de la β -galactosidase (peptide ω) dont le gène est porté par l'épisme F' de certaines souches d'*E. Coli*. La β -galactosidase, ainsi reconstituée, est alors capable de transformer le substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) en un produit coloré bleu. Les bactéries transformées par un plasmide ayant intégré l'insert d'intérêt peuvent ainsi être sélectionnées grâce à ce système de crible « blanc/bleu » aussi appelé “ α -complémentation” (Ullmann *et al.*, 1967) . En effet, la séquence du peptide α étant interrompue par le MCS, l'insertion d'un fragment d'ADN dans ce MCS implique la synthèse d'un fragment N-terminal tronqué et une β -galactosidase non fonctionnelle. L' α -complémentation n'est alors plus possible. Celle-ci ne peut avoir lieu que si les bactéries ont intégré un plasmide vide reliqué sur lui-même. En résumé, les colonies bactériennes contenant l'insert ne métabolisent pas l'X-Gal et apparaissent blanches (pas d' α -complémentation), celles ne contenant pas d'insert apparaissent bleues (α -complémentation possible).

b. Le vecteur pDONRTM 201 (GatewayTM)

Le pDONRTM 201 (4470pb, Kan^R) (Invitrogen) est le vecteur d'entrée utilisé pour le clonage par la technologie GatewayTM. Il est fourni sous forme circulaire. Il possède, entre les séquences attP1 et attP2 permettant la recombinaison, le gène *ccdB* (codant pour une protéine qui interfère avec l'ADN girase des bactéries, empêchant ainsi leur croissance) ainsi qu'un gène de résistance au chloramphénicol (Cm^R). Afin de multiplier ce vecteur (ainsi que tout autre vecteur GatewayTM possédant ce gène *ccdB*) avant l'étape de recombinaison, il est nécessaire d'utiliser une souche d'*E.coli* résistante à la toxine ccdB. La souche utilisée est : One Shot® *ccdB* SurvivalTM T1 Phage-Resistant (cf. Matériel et Méthodes, § II.2.1.c.). Le clonage d'un fragment d'ADN amplifié par PCR possédant les séquences *attB1* et *attB2* à ses extrémités se fait par recombinaison BP avec les séquences *attP1* et *attP2* du pDONR 201. Les plasmides recombinés perdent alors leur résistance au chloramphénicol ainsi que le gène

ccdB, mais conservent leur résistance à la kanamycine (*Kan^R*), ce qui permettra la sélection des bactéries transformées par les plasmides recombinants.

II.4.2. Les vecteurs de transformation transitoire de plantes

Les vecteurs d'expression transitoires (Annexe 2) sont des vecteurs de clonage qui permettent la transcription et la traduction d'une séquence d'ADN codante en protéine native ou étiquetée, dans des systèmes eucaryotes (plante, levure) ou procaryote (bactérie). La séquence d'ADN clonée est sous le contrôle d'un promoteur pour l'initiation de la transcription et possède souvent à sa fin une séquence de terminaison de la transcription.

a. Le vecteur pRT101

Ce vecteur d'expression transitoire de plante (3340 pb, *Amp^R*; Topfer *et al.*, 1987) possède le promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du Chou-fleur (CaMV, Cauliflower Mosaic Virus), et un signal de polyadénylation. Il est dérivé du pUC18, et permet l'étude de protéines naturelles ou de fusion. Il a été utilisé pour l'expression transitoire en protoplastes de gènes fusionnés à la protéine fluorescente GFP. La sélection des bactéries transformées avec ce vecteur est possible grâce à la présence du gène codant pour la résistance à l'ampicilline (*Amp^R*).

b. Le vecteur pAM35

Ce vecteur (5000 pb, *Amp^R*; Guerineau et Mullineaux, 2003) possède le gène codant la β -glucuronidase (GUS) en aval d'un MCS, au niveau duquel pourra être intégré la séquence promotrice du gène étudié. Il permet de réaliser des constructions « promoteur-gène rapporteur GUS » pour étudier la régulation de l'expression du gène d'intérêt. La sélection bactérienne est assurée par le gène de résistance à l'ampicilline (*Amp^R*).

c. Le vecteur pTH2

Ce vecteur d'expression transitoire (Chiu *et al.*, 1996 ; Niwa *et al.*, 2003) possède la séquence codante de la protéine fluorescente GFP sous contrôle du promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du Chou-fleur (CaMV, **C**auliflower **M**osaic **V**irus). Il permet de surexprimer la GFP dans toute la cellule et a donc été utilisé comme contrôle lors des observations de localisation cellulaire en protoplastes de protéines couplées à la GFP.

II.4.3. Les vecteurs de transformation stable de plantes

Les vecteurs de transformation stable (ou vecteurs binaires) (Annexe 3) sont des vecteurs portant un ADN dit de transfert (ADN-T) limité par deux bordures RB (**R**ight **B**order) et LB (**L**eft **B**order). Ils permettent la transformation stable de la plante par *A. tumefaciens* du fait de l'intégration de l'ADN-T dans le génome de celle-ci. Un second plasmide porté par *A. tumefaciens* et nommé Ti (*Tumor inducing*) préalablement désarmé, porte les gènes de virulence *Vir*. Ces derniers permettent l'excision de l'ADN-T du vecteur binaire, son exportation vers la cellule végétale et son intégration dans le génome. Sept vecteurs binaires ont été utilisés au cours de ma thèse :

a. pFB8

Le vecteur binaire pFB8 (12800 pb, *Kan^R*; Atanassova *et al.*, 1995) se réplique à la fois dans *E. coli* et dans *Agrobacterium tumefaciens*. Il dérive du vecteur pBI101. Les bordures droite (Right Border, RB) et gauche (Left Border, LB) de l'ADN de transfert délimitent une cassette comprenant 2 gènes de sélection: les gènes *nptII* (gène codant pour la néomycine phosphotransférase conférant la résistance à la kanamycine) et *uidA* (β -D-glucuronidase ou GUS) permettant la formation d'un produit bleu en présence de X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide). Cette cassette comprend également un MCS entre ces deux constructions, situé entre le promoteur et le terminateur régulant la transcription de l'ARN 35S du virus de la Mosaïque du chou-fleur. Afin de vérifier le sens de clonage des inserts dans le MCS une amorce antisens nommée pFB8 As a été définie. Ce vecteur a été utilisé pour surexprimer le gène étudié.

b. pK7GWIWGD(II) (Gateway™)

Ce vecteur binaires (12904 pb ; Karimi *et al.*, 2002) est compatible avec le système Gateway™. Ils possèdent les bordures droite (Right Border, RB) et gauche (Left Border, LB) qui délimitent un ADN-T permettant d'induire une sous-expression de gène par ARN interférence chez les plantes transformées. En effet, une portion spécifique du gène étudié sera introduit par recombinaison à la fois en orientation sens et antisens de part et d'autre d'un intron. Une fois dans le génome de la cellule végétale et grâce à l'épissage de cet intron, il y aura appariement des séquences en orientation sens et antisens pour permettre la formation d'un ADN double brin. Le promoteur et le terminateur régulant la transcription de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur permettront quant à eux une expression constitutive de

cet ADN double brin dans la cellule végétale. Cela permettra par la suite la production de petits ARN interférents (de type siRNA) qui iront cibler spécifiquement les ARNm complémentaires du gène étudié empêchant alors leur traduction. Par ailleurs, ce vecteur comprend également au niveau de leur ADN-T un gène de sélection chez les plantes, le gène de résistance à la Kanamycine. La sélection bactérienne est assurée par le gène de résistance à la spectinomycine.

c. pK7m34GW (Gateway™)

Ce vecteur binaire (10198 pb, Karimi *et al.*, 2005) possède les bordures droite (Right Border, RB) et gauche (Left Border, LB) de l'ADN de transfert délimitant une cassette comprenant un gène de sélection chez les plantes (le gène de résistance à la Kanamycine) ainsi que le terminateur régulant la transcription de l'ARN 35S du virus de la Mosaïque du chou-fleur. Ce plasmide a été utilisé pour exprimer 2 constructions différentes. Tout d'abord, après recombinaison avec les vecteurs pENL4-2-R1 (possédant le promoteur de la nopaline synthase) (Annexe 4 ; Karimi *et al.*, 2007a), pENR2-3xHA-L3 (possédant une répétition de 3 épitopes HA) (Annexe 4 ; Van Leene *et al.*, 2008) et le pDONR201 (contenant la séquence codante du gène étudié), le pK7m34GW permettra la surexpression constitutive du gène étudié fusionné en 3' avec une étiquette HA. D'autre part, après recombinaison avec les vecteurs pEN-R2-SI*-L3 (possédant le gène rapporteur *β -D-glucuronidase* ou *GUS*) (Annexe 4 ; Karimi *et al.*, 2007a), pEN-L1-NF-L2 (possédant le gène rapporteur *GFP*) (Annexe 4 ; Karimi *et al.*, 2007a) et pEN-L4-pOp6M2-R1 (dont les séquences *6XOP* et *minimal p35S + oméga* ont été éliminées par digestion enzymatique SacII/SalI et remplacées par le promoteur du gène étudié) (Annexe 4 ; Karimi *et al.*, 2007a), le pK7m34GW permettra l'expression des gènes rapporteur *GUS* et *GFP* sous contrôle du promoteur étudié. La sélection bactérienne pour ce plasmide est assurée par le gène de résistance à la spectinomycine.

d. pXK7S*Nf2 (Gateway™)

Ce vecteur binaire (12286 pb ; Karimi *et al.*, 2007b) possède les bordures droite (Right Border, RB) et gauche (Left Border, LB) de l'ADN de transfert délimitant une cassette comprenant un gène de sélection chez les plantes (le gène de résistance à la Kanamycine) ainsi que les gènes rapporteurs *β -D-glucuronidase* (ou *GUS*) et *GFP* sous contrôle du promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du Chou-fleur (CaMV, Cauliflower Mosaic Virus). Il permet donc la surexpression des gènes *GUS* et *GFP* de façon constitutive

et a donc été utilisé comme contrôle lors des études d'expression des gènes d'intérêt (*via* les constructions promoteurs-gènes rapporteurs).

II.4.4. Les vecteurs de transformation de levures

a. pGBKT7

pGBKT7 (Clontech) (Annexe 5) est un vecteur d'expression de 7300 pb, contenant à la fois une origine de répllication bactérienne (pUC) ainsi qu'une origine de répllication de levure (2 μ). Il est utilisé pour surexprimer dans les levures la protéine d'intérêt ("appât") fusionnée au *GAL4-DBD* (*GAL4-DNA Binding Domain*, séquence codant les acides aminés 1-147). Cette construction est placée sous le contrôle d'un fragment de 700 pb du promoteur constitutif *ADHI* (*Alcohol Dehydrogenase 1*). La version tronquée du promoteur *PADHI*, dont la taille réelle avoisine 1500 pb, conduit à un niveau d'expression élevé des constructions d'intérêts. Ce vecteur permet ainsi la recherche d'un domaine d'activation de la transcription pour une protéine donnée (test d'auto-activation), mais également la recherche de partenaires protéiques de cette protéine "appât", par la méthode de double hybride. Il possède un gène de résistance à la kanamycine (KanR) comme marqueur de sélection chez *E. coli* et un marqueur de sélection eucaryote correspondant au gène (*TRP1*) permettant la complémentation de l'auxotrophie des levures vis-à-vis du tryptophane. Il contient également un promoteur T7 permettant la transcription et la traduction de protéines *in vitro*, ainsi qu'un épitope c-Myc servant de tag et localisé juste en aval du domaine GAL4-DBD. Enfin, la fin de la transcription est assurée par les terminateurs de la transcription T7 et *ADHI*.

b. pGADT7-Rec

pGADT7-Rec (Clontech) (Annexe 5) est un vecteur de 8000 pb, possédant un gène de résistance à l'ampicilline (AmpR) permettant la sélection chez *E. coli* et un marqueur nutritionnel de synthèse de la leucine (*LEU2*) permettant la sélection chez *S. cerevisiae*. Ce vecteur est utilisé lors de l'expérience de double hybride pour exprimer la «cible» (protéine d'intérêt ou une banque d'ADNc, ce qui est notre cas) fusionnée au GAL4-AD (*GAL4-Activation Domain*, acides aminés 768 à 881). Cette expression se fait sous le contrôle du promoteur entier *ADHI* (1500 pb). Les protéines "cibles" produites présentent une étiquette HA. pGADT7-Rec est un plasmide à fort nombre de copies, et possède à la fois une origine de répllication bactérienne (pUC) ainsi qu'une origine de répllication de levure (2 μ).

III. Techniques de biologie moléculaire

III-1 Technique de clonage de gènes

III-1-1 Clonage par la technique dite “classique”

a. Réaction de PCR

La **PCR** (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne) est une technique de répllication *in vitro* permettant d’obtenir d’importantes quantités d’un fragment d’ADN double brins (Saiki *et al.*, 1988) grâce à des couples d’amorces spécifiques et une polymérase thermostable de type *Thermophilus*.

Le choix des amorces a été réalisé avec l’interface primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Les oligonucléotides synthétiques ont été fournis par la société Eurogentec puis MWG Opéron. Chaque amorce synthétisée contient au moins 18 bases complémentaires à la séquence de l’insert. Elles ne doivent pas former de structures secondaires et être spécifiques uniquement de la portion d’ADN à amplifier (vérification par blast ; cf. Matériel et Méthodes, § I.2.). La température de fusion (T_m) des amorces est un critère important lors de la désignation des amorces. Elle représente la température pour laquelle il n’y a plus que 50 % des amorces qui s’hybrident sur leur matrice ADN. En général, la température d’hybridation (T_a) choisie est donc légèrement inférieure à la T_m de quelques degrés. Le T_m peut être calculé approximativement en utilisant la relation suivante :

$$T_m = [2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)] - 5^\circ C$$

(A : nombre d’adénines; T : nombre de thymidines; G : nombre de guanines; C : nombre de cytosines)

La T_m utilisée lors de la réaction de PCR est généralement la T° la plus basse des deux amorces (la T_m de chacune des deux amorces étant choisi de sorte qu’elles soient le plus proche possible). Les amorces utilisées pour les réactions de PCR sont présentées en Annexe 6.

Dans le cas d’un clonage par PCR, il s’agit d’introduire au niveau des extrémités de la séquence d’intérêt:

- soit des sites de restriction enzymatiques adaptés pour permettre le clonage dans le MCS du vecteur désiré (clonage classique).
- ou bien des séquences nucléotidiques particulières permettant la recombinaison du produit PCR dans le vecteur d’entrée (clonage Gateway), comme par exemple les séquences *attB1* et *attB2*.

Les réactions de PCR ont été réalisées dans l'appareil *iCycler*® (BIORAD). Pour le clonage, la polymérase utilisée a été la *Pfx* (Invitrogen). Les conditions de PCR sont décrites dans le protocole fourni par Invitrogen. Le volume réactionnel final est de 50 µl comportant 200ng d'ADN matriciel, 0,3 µM de chacune des deux amorces, 0,3 mM de chaque désoxyribonucléotide triphosphates (dNTP), 5 µL de tampon d'amplification 10X (Invitrogen), 1 mM de MgCl₂, 1 U de *Pfx* ADN polymérase (Invitrogen). Cette amplification peut être réalisée soit à partir d'ADNg (clonage de promoteur), soit à partir d'une banque d'ADNc (clonage des gènes d'intérêt). Par ailleurs, la *Pfx* n'ajoute pas d'adénosine triphosphate protrusive à l'extrémité 3' des ADN double brins lors de l'étape d'élongation. Après cette réaction de PCR et élution du fragment d'ADN d'intérêt, l'ajout d'une étape permettant l'addition d'adénosine triphosphate est donc nécessaire afin de réaliser le clonage dans le pGEM-T easy. Une fois cet ajout effectué, l'insert sera prêt pour l'étape de ligation dans le pGEM-T easy.

La PCR à partir de colonies bactériennes est effectuée afin de vérifier la présence de l'insert, à l'issue de la transformation avec le plasmide d'intérêt. Ces PCR dites de « routine » sont réalisées grâce à une polymérase produite au laboratoire, la “yellow *Taq* (*Thermophilus aquaticus*) DNA polymerase”, dans un volume réactionnel final de 25 µl (Annexe 7, Tableau 12). Cette polymérase est conservée dans un tampon particulier (50 mM Tris HCl pH 7,9; 50 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 50 % glycérol). Les échantillons sont soumis à une dénaturation préalable à 95°C pendant 5 min, puis à 30 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 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 5 min termine le programme de PCR. Les fragments amplifiés sont ensuite analysés sur gel d'agarose.

b. Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose

Le fragment PCR amplifié est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose (de 0,8 à 2% pour analyser des fragments de grandes à petites taille, respectivement) en condition non dénaturante dans du tampon TAE 1X (Tris 40 mM, éthylène diamine tétra-acétate (EDTA) 10 mM, acide acétique 0,019 M). Du GelGreen™ est ajouté lors de la préparation du gel d'agarose, celui-ci s'intercale entre les bases de l'ADN et permet de le visualiser par fluorescence sous UV. Les échantillons sont additionnés de 1/10ème de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25%, saccharose 40%, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 ; 10/1 : v/v) puis

déposés sur gel d'agarose. Un marqueur de masse moléculaire (1 kb) permet de déterminer la taille des fragments d'intérêt. L'électrophorèse est réalisée pendant 20 min dans du tampon TAE 0,5 X (Tris 20 mM, EDTA 0,05 mM, acide acétique 9,5 mM) sous une tension de 100V. L'ADN est visualisé sous UV (272 nm). L'acquisition des images est réalisée avec le logiciel *Quantity One* (BioRAD). La bande d'intérêt visualisée sous lumière UV est découpée et l'ADN contenu est extrait à l'aide du kit « Wizard® SV Gel » (Promega) ou « QIAquick Gel Extraction Kit » (Quiagen) selon le protocole décrit par le fournisseur.

c. Quantification des acides nucléiques

La quantification des acides nucléiques est réalisée par mesure spectrophotométrique (Gene Quant *pro*, Amersham) à 260 nm. Une unité d'absorbance à 260 nm équivaut à 50 µg d'ADN / mL et à 40 µg d'ARN / mL. La présence de sucres, de composés organiques (phénol par exemple) ou de sels chaotropes est évaluée par des mesures d'absorbance à 230 nm. Une contamination protéique éventuelle est quant à elle mesurée à 280 nm. La pureté de la préparation d'acides nucléiques est donc estimée en utilisant le rapport A_{260}/A_{280} (égal ou supérieur à 2 pour une préparation d'ARN et égal 1,8 pour une préparation d'ADN) et A_{260}/A_{230} (aux alentours de 2).

d. Addition d'adénosine triphosphate protrusive pour le clonage dans le vecteur pGEMT®-easy

Certaines polymérase, comme la *Pfx*, n'ajoutent pas d'adénosine triphosphate protrusive à l'extrémité 3' des ADN double brins. L'ajout d'une étape permettant l'addition d'adénosine triphosphate à l'insert d'intérêt est pourtant nécessaire pour réaliser le clonage dans le pGEM-T easy. Cet ajout est réalisé en mélangeant 20 µL du produit PCR élué, 3 µL de dATP (2 mM), 3 µL de « yellow buffer 10X » et 3 µL de « *yellow Taq DNA polymerase* » dans un volume final de 30 µL. Ce mélange est ensuite incubé 25 min à 72°C puis l'insert d'intérêt est purifié à l'aide du kit « QIAquick PCR Purification Kit » (Quiagen) et quantifié.

e. Digestion enzymatique de l'ADN

L'hydrolyse de l'ADN au niveau de sites spécifiques par les endonucléases est réalisée soit pour vérifier la présence de l'insert, soit pour cloner un fragment d'intérêt. Elle met en jeu 2 à 4 µg d'ADN. Les endonucléases (Promega) sont utilisées à une concentration de 5 U d'enzymes / µg d'ADN dans un tampon spécifique préconisé par le fournisseur. Les réactions

ont lieu à la température optimale d'activité des enzymes (37°C généralement). La durée des incubations varie selon la nature et la quantité d'ADN à digérer (1 à 12 h). Les enzymes peuvent pour la plupart être inactivées par une incubation de 15 min à 65°C. Dans le cas d'une double digestion, et lorsque le tampon n'est pas compatible pour les deux enzymes, il est nécessaire d'effectuer successivement les deux digestions en les séparant par une étape de purification grâce au kit « QIAquick PCR Purification Kit » (Quiagen) (selon le protocole décrit par le fournisseur). L'insert et le plasmide dans lequel sera réalisé le clonage final sont digérés par les mêmes enzymes de restriction afin d'obtenir des extrémités compatibles à l'insertion. Les ADN de l'insert et du vecteur sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, extraits à l'aide du kit Wizard® SV Gel ou PCR Clean-Up System (Promega) puis quantifiés.

f. Ligation de l'ADN dans le vecteur d'intérêt

La ligation permet, en présence d'ATP, la création de lien covalent de type phosphodiester entre les extrémités du fragment d'ADN d'intérêt et celles du vecteur de clonage. Elle est réalisée grâce à l'action d'une ligase (l'ADN ligase du bactériophage T4, Promega) entre le phosphate en 5' et l'hydroxyle en 3'. Afin d'optimiser la réaction, la quantité de produit PCR à ajouter au vecteur en fonction de la taille de l'insert et du rapport molécules d'insert/molécules de vecteur désiré, peut être calculée de la façon suivante :

$$X \text{ (ng d'insert)} = \frac{\text{(ng de vecteur} \times \text{taille du vecteur (kb)} \times \text{rapport insert/vecteur)}}{\text{(taille de l'insert (kb))}}$$

Classiquement, l'efficacité de la réaction de ligation est maximale pour des rapports de concentrations molaires insert/vecteur de type 1:1 ou 3:1. La quantité x de produit de PCR (de l'insert) est mélangée à 25 ng de vecteur de destination, 1 µL de tampon de ligation 10X (300mM Tris-HCl (pH 7.8), 100mM MgCl₂, 100mM DTT and 10mM ATP., et 0,5 U de ligase T4 d'ADN (Promega) dans un volume final de 10 µL. Le mélange est incubé une nuit à 4°C. La totalité de la réaction de ligation est ensuite utilisée lors de la transformation des bactéries thermocompétentes.

g. Préparation des bactéries thermocompétentes

Cinquante µL de bactéries XL1-Blue sontensemencés sur un milieu SOB solide (ajout de 15 g/L d'agar bactériologique (p/v)) (Annexe 7, Tableau 13) et incubées pendant 3 jours à température ambiante. Une colonie est alors prélevée et utilisée pour ensemencer 10 mL de milieu SOB. Cette préculture est soumise à agitation (200 rpm) pendant une nuit à 28°C.

Deux cent cinquante mL de milieu SOB sontensemencés à partir des 10 mL de la préculture, et placés sous agitation (200 rpm) à 28°C jusqu'à obtention d'une $A_{600\text{ nm}}$ de 0,6. Les bactéries sont alors maintenues 5 min dans la glace afin de ralentir leur croissance. Toutes les étapes ultérieures sont réalisées dans la glace ou à 4°C pour les centrifugations pour d'éviter les chocs thermiques. Les bactéries sont centrifugées 15 min à 3000 rpm. Le culot est repris très délicatement dans 83 mL de tampon TB (PIPES 10mM, $\text{CaCl}_2/2\text{H}_2\text{O}$ 15 mM, KCl 250 mM, $\text{MnCl}_2/4\text{H}_2\text{O}$ 55 mM, pH 6,7) conservé à 4°C. Après une incubation de 10 min sur la glace, les bactéries sont à nouveau centrifugées 10 min à 3000 rpm puis resuspendues dans 20 mL de tampon TB. Enfin, 1,5 ml de DMSO (Diméthyle sulfoxyde) est ajouté goutte à goutte, en agitant doucement les bactéries. L'ensemble est placé dans la glace pendant 10 min puis les cellules sont aliquotées par 100 μl dans des tubes eppendorfs froids et congelées brutalement dans l'azote liquide. Elles sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

h. Transformation de bactéries thermocompétentes

Les bactéries thermocompétentes XL1-blue (100 μL) sont décongelées dans la glace puis mélangées à la totalité de la réaction de ligation (soit 10 μL). Après une incubation de 30 minutes sur la glace, le mélange est soumis à un choc thermique d'une minute à 42°C. Les bactéries sont ensuite redéposées dans la glace 5 min, puis cultivées dans 500 μL de milieu SOC (milieu SOB (Annexe 7, Tableau 13) + glucose 20 mM, après autoclavage) sous agitation (200 rpm) à 37°C pendant 1h. Cent cinquante μL de la culture sont étalés sur un milieu LB solide contenant l'antibiotique adéquat. En outre, lors de la transformation des bactéries avec le vecteur pGEMT[®]-easy (cf. Matériel et Méthodes, § II .4.1.a.) la visualisation de l' α -complémentation est permise par l'ajout d'IPTG (200 mg/mL) et du substrat chromogène de la β -galactosidase, le X-Gal [5% (p/v)] dans le milieu LB. Enfin, les boites sont incubées à 37°C pendant une nuit. Un criblage PCR sur les colonies qui se sont développées pendant la nuit permet de déterminer celles possédant le plasmide ayant intégré la séquence d'ADN d'intérêt (cf. Matériel et Méthodes, § III.1.a.). Généralement un couple d'amorce spécifique à la fois de l'insert et du plasmide est utilisé.

i. Préparation des bactéries électrocompétentes

Ce protocole a été utilisé pour la préparation de bactéries électrocompétentes TOP10 (*Escherichia Coli*), EHA105 (*Agrobacterium Tumefaciens*) et GV3101 (*Agrobacterium tumefaciens*). Le milieu de culture pour les cellules TOP10 est le SOB (Annexe 7, Tableau

13) alors que le milieu YEB (Annexe 7, Tableau 8) est utilisé pour les cellules EHA105 et GV3101. Les étapes sont identiques au protocole de préparation de bactéries thermocompétentes (cf. Matériel et Méthodes, § III-1-1i.), et ce jusqu'à la première étape de centrifugation réalisée à 4000rpm/10min/4°C. Le culot est alors repris dans 25 mL d'eau distillée froide puis à nouveau centrifugé (4000rpm/10min/4°C). Les cellules sont lavées de cette manière 8 fois avec de l'eau distillée froide. Un dernier rinçage est effectué avec 20 mL de glycérol 10% et le culot obtenu est alors repris dans 400 µL de glycérol 10%. L'ensemble est placé dans la glace pendant 5 min puis les cellules sont aliquotées par 40 µL dans des tubes eppendorfs froids et congelées brutalement dans l'azote liquide. Elles sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

j. Transformation de bactéries électrocompétentes.

Ce protocole a été utilisé pour la transformation des bactéries *E. coli* TOP10 ainsi que pour les *A. tumefaciens* EHA105 et GV3101. L'électroporation consiste à soumettre les cellules à une très grande différence de potentiel électrique pendant un temps de quelques millisecondes afin de provoquer la formation de pores dans la membrane plasmique, laquelle devient alors perméable au plasmide d'intérêt (Dower *et al.*, 1988). Quarante µL de bactéries électrocompétentes TOP10 sont incubés 1 minute dans la glace avec 1 à 2 µL de réaction de recombinaison BP ou LR. Les souches d'*Agrobacterium* EHA105 et GV3101 sont quant à elles, incubées avec 200 ng du plasmide d'intérêt. Les cellules sont ensuite transférées dans une cuve d'électroporation froide en évitant soigneusement la formation de bulles d'air pouvant être à l'origine d'un arc électrique. La cuvette est alors soumise à une impulsion électrique de 1,8 kV (pour *E. coli*) ou 1,5 kV (pour *A. tumefaciens*) à l'aide d'un électroporateur (Electroporator 2510, Eppendorf). Les cellules sont immédiatement remises en culture dans 1 mL de milieu SOC (cf. Matériel et Méthodes, § III.1.1.i.). Enfin, après incubation pendant 1 heure à 37°C (28°C pour *A. tumefaciens*) sous agitation (220 rpm), les cellules sont étalées sur un milieu LB (pour *E.coli* ; Annexe 7, Tableau 7) ou YEB (pour *A.tumefaciens* ; Annexe 7, Tableau 8) solide contenant le ou les antibiotique(s) adéquat(s). Les cellules sont cultivées toute la nuit à 37°C (pour *E. coli*) ou 28°C pendant 2 jours (pour *A. tumefaciens*). Un criblage PCR sur les colonies qui se sont développées permet de déterminer celles possédant le plasmide ayant intégré la séquence d'ADN d'intérêt (cf. Matériel et

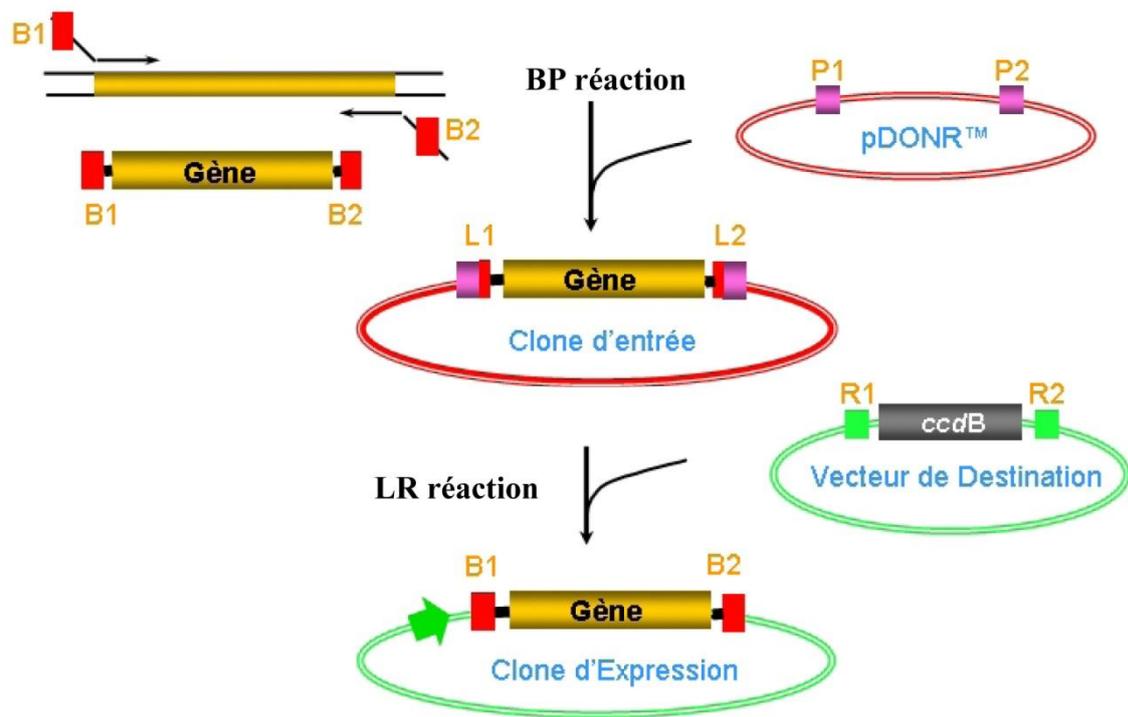


Figure 41. Principe du clonage par la technologie Gateway™

Méthodes, § III.1.1.a.). Généralement un couple d'amorce spécifique à la fois de l'insert et du plasmide est utilisé.

k. Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique à partir d'une culture bactérienne contenant le plasmide d'intérêt (4 mL) est effectuée par la méthode de lyse alcaline avec le kit « Qiaprep spin Miniprep » (QIAGEN), selon les instructions du fournisseur. Ce kit permet d'extraire les plasmides de type « high-copy » (généralement de taille maximale jusqu'à 8 kb). D'autre part, lorsqu'il s'agit de plasmides de type « low-copy », ou lorsque qu'il est nécessaire d'obtenir une quantité d'ADN plasmidique plus importante, les plasmides sont extraits à partir d'un plus grand volume de culture bactérienne (100 mL ou 250 mL) et purifiés, respectivement, à l'aide des kits « Qiaprep spin Midiprep » ou « Qiaprep spin Maxiprep » (QIAGEN) toujours selon les instructions du fournisseur. Dans le cas d'un clonage classique, la présence des inserts clonés est vérifiée par digestion enzymatique et/ou par PCR. Pour un clonage réalisé avec la technique Gateway™, seul un contrôle par PCR est réalisé. Par la suite, le vecteur est envoyé pour être séquencé à la société GATC (Allemagne). Les résultats de séquençage sont analysés (analyse de profil de restriction, traduction en protéines, alignement) par le logiciel CLC Sequence Viewer 6.

III.1.2. Clonage par la technologie Gateway™ (Invitrogen)

a. Principe

La technologie Gateway™ (Figure 41) est une méthode de clonage *in vitro* créée en 2000 (Hartley *et al.*, 2000) pour répondre à certaines limites de la technique de clonage classique généralement plus lente et fastidieuse (digestion et utilisation d'enzymes de restriction). Cette technologie repose sur la capacité d'excision et d'intégration, site-spécifique, du bactériophage λ dans le génome d'*E.coli* (Landy, 1989). Ces réactions sont médiées par des enzymes « recombinases » de la famille des λ intégrases qui catalysent un échange réciproque d'ADN double-brin entre deux sites de séquences nucléiques spécifiques. Ces sites spécifiques (ou adaptateurs) sont générés par PCR en 5' et en 3' du gène d'intérêt. Ils sont appelés *attB1* et *attB2* (**att**: site-specific **att**achment). L'insert possédant les sites *attB* pourra alors être intégré dans un plasmide dit « d'entrée » possédant les sites *attP1* et *attP2* grâce à la réaction de recombinaison BP. Après cette première recombinaison, le plasmide d'entrée (aussi appelé plasmide donneur) possédera l'insert d'intérêt, bordé par les

sites *attL1* et *attL2* (issus de la recombinaison des sites *attB* et *attP*). Ce plasmide pourra ensuite être recombiné avec autant de vecteurs de destinations contenant les sites spécifiques *attR1* et *attR2* : c'est la réaction de recombinaison LR. Cette technologie fournit donc un moyen efficace et rapide pour intégrer une séquence d'ADN (possédant les sites *attB*) vers différents vecteurs de destinations (variables suivant les applications désirées) *via* un plasmide d'entrée, par recombinaison et sans digestion enzymatique.

b. Préparation de l'insert

Des adaptateurs contenant les boîtes de recombinaison *attB1* et *attB2* sont ajoutés par PCR pour permettre le clonage en système Gateway, respectivement en 5' et en 3' du gène cloné. Ces réactions de PCR sont réalisées avec la polymérase *Pfx* suivant le protocole décrit dans le § III.1.1. a. La matrice d'ADN utilisée est le gène d'intérêt cloné dans le pGEMT easy. Les amorces utilisées pour ajouter ces adaptateurs en 5' et 3' sont présentées en Annexe 6.

c. La réaction BP (ou insertion dans le vecteur d'entrée)

Comme décrit précédent, la réaction BP permet l'intégration orientée d'un insert possédant les sites *attB1* et *attB2* dans un vecteur d'entrée possédant les sites *attP1* et *attP2*. Le vecteur d'entrée utilisé est le pDONR201 (cf. Matériel et Méthodes, § II.4.1.b.). Cette réaction est réalisée dans un volume final de 5 μ L en mélangeant 125 ng d'insert, 75 ng de pDONR201 et 1 μ L de « BP clonase »TM. Après une nuit d'incubation à 25°C, la réaction de recombinaison est arrêtée par l'ajout de 0,5 μ L de protéinase K (2 μ g/ μ L). Un μ L de cette réaction est ensuite utilisé pour la transformation de bactéries *E.coli* TOP10, par électroporation (cf. Matériel et Méthodes, § III.1.1.j.).

d. La réaction LR (ou insertion dans le vecteur de destination)

Cette réaction permet de transférer l'insert d'intérêt, contenu entre les sites spécifiques *attL* du vecteur d'entrée pDONR201, vers un vecteur de destination possédant les sites *attR*. Cette réaction est réalisée dans un volume final de 10 μ L en mélangeant 150 ng du vecteur d'entrée pDONR201, 150 ng du vecteur de destination et 2 μ L de « LR clonase »TM. Après une nuit d'incubation à 25°C, la réaction de recombinaison est arrêtée par l'ajout de 1 μ L de protéinase K (2 μ g/ μ L). Les quantités de vecteurs de destinations apportées lors de la réaction LR décrites ci-dessus sont valables uniquement lorsqu'un seul vecteur de destination est mélangé avec le vecteur d'entrée. C'est le cas du vecteur de destination pK7GWIWGD(II)

(cf. Matériel et méthodes, § II.4.). Dans les cas décrits ci-après, les quantités de vecteurs apportés lors de la réaction LR ont été modifiées. Le vecteur de destination pK7m34GW, combiné lors de la réaction LR aux vecteurs pENL4-2-R1 et pENR2-3xHA-L3 (cf. Matériel et méthodes, § II.4.), a été utilisé pour produire des lignées surexprimant le gène d'intérêt fusionné en 3' avec trois épitopes HA. Lors de cette réaction de LR, 50 ng de chacun de ces 3 vecteurs ont été apportés ainsi que 150 ng du vecteur d'entrée pDONR201 (contenant la séquence codante du gène étudié). Le vecteur de destination pK7m34GW a également été combiné lors de la réaction de LR aux vecteurs pEN-R2-SI*-L3 et pEN-L1-NF-L2 (cf. Matériel et méthodes, § II.4.), pour permettre l'expression des gènes rapporteur *GUS* et *GFP* sous contrôle du promoteur étudié. Lors de cette réaction de LR, 50 ng de chacun de ces 3 vecteurs ont été apportés ainsi que 150 ng du vecteur pEN-L4-pOp6M2-R1 (contenant la séquence promotrice du gène étudié) considéré alors comme le vecteur d'entrée. Un μL de la réaction de LR est ensuite utilisé pour la transformation de bactéries *E.coli* TOP10, par électroporation (cf. Matériel et Méthodes, § III.1.1. j.).

III.2. Méthodes de manipulation et d'analyse des acides nucléiques

III.2.1. Extraction d'ADN génomique de vigne

L'extraction d'ADN génomique de *Vitis vinifera* cv. Cabernet sauvignon a été effectué à partir de feuilles à l'aide du kit « *DNeasy Plant Mini* » (Quiagen) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN extrait est visualisé après séparation électrophorétique en gel d'agarose (cf. Matériel et Méthodes, § III.1.1.b.) puis quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre par mesure de l'absorbance à 260 nm (cf. Matériel et Méthodes, § III.1.1.c.). L'ADNg a été ensuite utilisé pour l'amplification par PCR et le clonage de promoteurs des gènes d'intérêt.

III.2.2. Extraction d'ARN totaux et digestion DNase

Ce protocole a permis l'extraction des ARNm totaux de baies, racines, tiges, feuilles et inflorescences de *Vitis vinifera* cv. Cabernet sauvignon, ainsi que ceux des baies provenant de différents *Vitis* (cf. Matériel et Méthodes, § II.1). Ces échantillons ont été broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. L'extraction des ARN totaux est réalisée selon le protocole de Reid *et al.* (2006). L'équivalent de 1,5 g de poudre est mélangé à 15 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 (60000 rpm, 15 min, 4°C). Les acides nucléiques sont précipités 30 min à -80°C, en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et de 0,6 volume d'isopropanol. Après centrifugation (6000 rpm, 30 min, 4°C), le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans 1 mL de tampon TE (pH 7,5). Les ARN totaux sont précipités toute la nuit à 4°C en présence de 0,3 volume de LiCl 10M. 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 50 µL d'eau. La concentration en ARN totaux est déterminée par spectrophotométrie $\lambda = 260$ nm. L'absence de dégradation des ARN ainsi que la contamination par de l'ADNg est contrôlée par migration sur gel d'agarose 1% en déposant 500 ng d'échantillon. Si le dépôt sur gel d'agarose révèle une contamination des ARN extraits par de l'ADNg, un traitement DNase de ces échantillons est nécessaire. L'ADNg contaminant des échantillons d'ARN totaux de Vigne a été éliminé par la DNase RQ1 (Promega). Cette réaction est réalisée en mélangeant 50 µg d'ARN totaux, 20 µL de tampon « 10X DNase Buffer Free Rnase », 10 U d'enzyme « RQ1 DNase » et 40 U de « RNasin® » Ribonuclease inhibitor, Promega) dans un volume final de 200 µL. Le mélange est incubé 30 min à 37°C puis la réaction est arrêtée par l'ajout de 50 µL de solution « stop » (EGTA 20 mM).

Les ARNm totaux de racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits de tomate ainsi que ceux des cellules et embryons de Vigne 41B ont été extraits à l'aide du kit « Spectrum™ Plant Total RNA » (Sigma) selon les recommandations du fournisseur. Ces ARNm totaux ont ensuite été purifiés avec le kit « On-Column DNase I Digestion Set » (Sigma).

III.2.3. Réaction de transcription inverse (RT)

Elle permet de synthétiser les ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN messagers extraits. La transcription inverse ou RT (Reverse Transcription) est réalisée à partir de 2 µg d'ARNm totaux. Les ARNm totaux traités à la DNase sont incubés à 75°C pendant 10 minutes en présence d'oligonucléotides poly d(T)₁₅ (2 µM) dans un volume final de 15 µL. Ce mélange est ensuite immédiatement refroidi dans la glace afin d'éviter le réappariement des ARN. La réaction de transcription inverse est effectuée à 42°C pendant 60 min en ajoutant 5µL de « M-MLV reverse transcriptase buffer 5X » (Promega), 0,8 mM de dNTPs, 4 mM de

DTT, 40 U de « RNasin® Ribonuclease Inhibitor » (Promega) et 200 U de « M-MLV reverse transcriptase » (Promega) dans un volume final de 25 µL. La transcriptase inverse est ensuite inactivée par une incubation de 10 min à 95°C. Les ADNc ainsi obtenus sont dilués 20 fois et conservés à -20°C.

III.2.4. Analyse de l'expression d'un gène par RT-PCR semi-quantitative

Pour les analyses de RT-PCR, le nombre de cycles d'amplification nécessaire dépend du gène étudié. Pour chaque gène, plusieurs tests d'amplification sont réalisés de façon à déterminer le nombre de cycles adéquats, qui doit se situer dans la phase exponentielle de la réaction de PCR (quantité de produit formé proportionnel au nombre de cycle). Cette technique possède donc des limites car généralement, au-delà de 30 cycles, le signal obtenu ne reflète plus la quantité initiale d'ADNc car on se situe dans la « phase plateau » de la réaction de PCR : la quantité de produit formé n'est alors plus proportionnelle au nombre de cycle. Les réactions de PCR ont été réalisées à partir de 2 µL d'ADNc dilués avec la « GOTAQ Master Mix 2X » (Promega) selon les instructions du fournisseur. Le gène de référence utilisé pour normaliser les résultats est *VvEFIγ*.

III.2.5. Analyse de l'expression d'un gène par RT-PCR quantitative

a. Principe

Cette méthode permet de quantifier, de façon relative ou absolue, l'expression de gènes candidats. Contrairement à la méthode « semi quantitative », cette technique permet de quantifier le produit de PCR après chaque cycle d'amplification et non uniquement à la fin de la réaction. Parmi les différentes technologies disponibles en RT-PCR quantitative, la technique du « SYBR GREEN » a été utilisée au cours de ma thèse. Le « SYBR GREEN » est fluorochrome (longueur d'onde d'excitation maximum 497 nm, longueur d'onde d'émission maximum 520 nm) non fluorescent sous forme libre, devenant fluorescent lorsqu'il est intercalé à l'ADN double brin (1 molécule toutes les 25 pb). L'enregistrement en temps réel de la fluorescence émise par les amplicons formés après chaque cycle de PCR permet ainsi de visualiser la phase exponentielle de la réaction de PCR (pendant laquelle le signal est proportionnel à la quantité de cible présente dans l'échantillon de départ). L'intégration du signal de fluorescence par le programme CFX-Manager (Bio-Rad) restitue le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil de détection de l'amplicon (noté Ct pour threshold cycle). Le Ct est donc le nombre de cycle seuil à partir duquel le produit PCR devient

délectable. Il est proportionnel à la quantité d'amplicons et donc directement à la quantité d'ADN de départ (Figure 42)

b. Courbe de fusion

La fluorescence émise par le « SYBR GREEN » n'est pas spécifique mais révélatrice de tout ADN double brin formé. Aussi, afin de vérifier que la fluorescence émise provient d'un seul type d'amplicon (et non pas également de dimères d'amorces ou d'un autre amplicon), une courbe de fusion est calculée. Pour cela, le cycle de PCR se termine par un cycle de fusion, pendant lequel la température croit de 0,5 s toutes les 5 s. La dissociation des amplicons bicaténaires en brins monocaténaires au fur et à mesure de l'augmentation de la température fait diminuer l'intensité de la fluorescence. On peut alors tracer une courbe de fluorescence en fonction de la température. Le calcul de la dérivée de cette courbe permet d'obtenir la variation de la fluorescence en fonction de temps ; c'est la courbe de fusion. Chaque amplicon est caractérisé par sa température de fusion ou T_m (melting température) qui est la température pour laquelle 50 % des brins sont dénaturés. C'est le point de cassure, l'apex de la courbe de fusion. Il dépend de la taille et de la séquence du produit PCR. Il est donc très spécifique d'un produit donné. La représentation graphique de la courbe de fusion (Figure 43) permet de représenter le nombre de produits amplifiés : un seul pic doit apparaître.

c. Conditions de PCR

Les réactions d'amplification sont réalisées en plaques 96 puits dans un thermocycleur « CFX 96 Real Time System » (Biorad) en mélangeant 2 μL d'ADNc, 5 μL de tampon iQ™ SYBR® Green Supermix 2X et 0,2 μM de chaque amorce du gène à amplifier, dans un volume final de 10 μL . Les conditions de PCR sont constituées d'une dénaturation préalable à 95°C pendant 3 min, puis de 40 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 s et une étape de 10 s à 60°C qui permet à la fois l'hybridation des amorces sur la matrice et l'élongation. Le cycle de PCR se termine par une dernière étape au cours de laquelle la température augmente de 60°C à 95°C par pas de 0,5°C toutes les 5 s afin d'établir une courbe de fusion. Le choix des amorces a été réalisé grâce au logiciel Beacon Designer (Premier Biosoft).

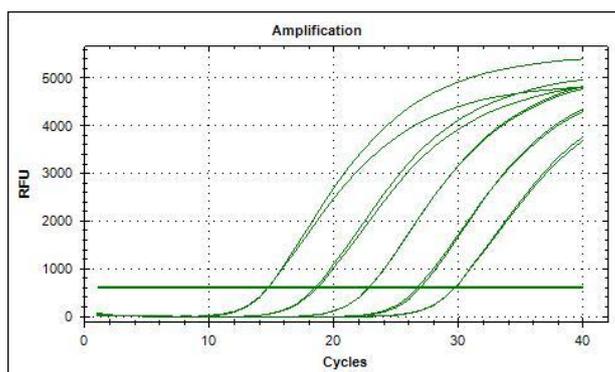


Figure 42. Exemple de représentation graphique d'amplification par PCR quantitative avec détermination du cycle seuil par le programme CFX-Manager

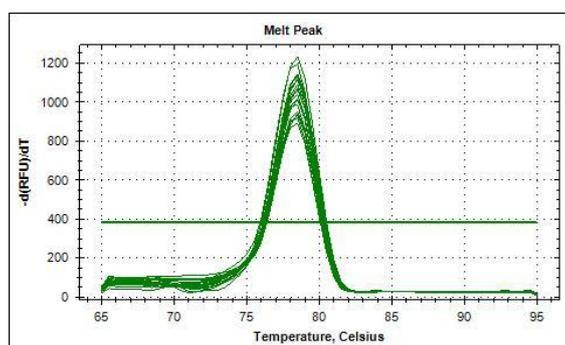


Figure 43. Exemple de courbe de fusion obtenue à l'issue d'une PCR quantitative avec le programme CFX-Manager

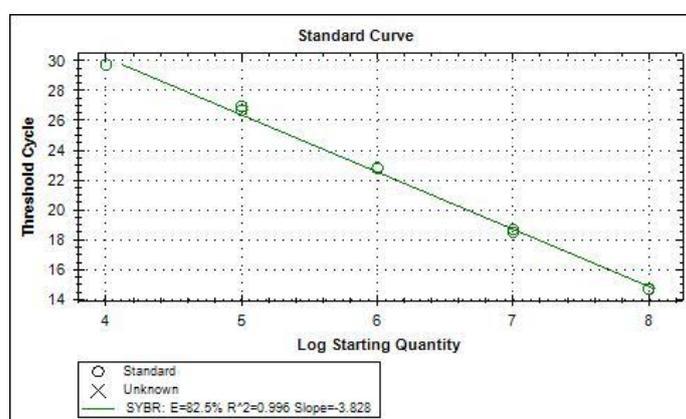


Figure 44. Courbe d'efficacité de la PCR obtenue avec les amorces du gène *VvCEB1* grâce au programme CFX-Manager

d. Test d'efficacité des amorces

Une gamme standard (Figure 44) permettant de vérifier l'efficacité de l'amplification a été réalisée pour chaque gène (gène d'intérêt et gène de référence) à partir de dilutions en série d'une quantité initiale d'ADNc. Pour chaque couple d'amorces, une amplification PCR « classique » réalisée avec la *Taq* polymérase produite au laboratoire est effectuée à partir d'ADNc totaux. La spécificité des amorces est vérifiée par dépôt d'un aliquot sur gel d'agarose 1,8 %, puis le produit de PCR correspondant est élué à l'aide du kit Wizard® SV Gel et dosé par spectrophotométrie à 260 nm. Une série de dilution au dixième du produit PCR élué est alors réalisée, en partant d'une concentration initiale de 10^8 copies du gène à 10^3 copies. Ces différentes dilutions de l'ADNc d'intérêt servent alors de matrice pour une réaction de PCR quantitative effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. L'obtention du cycle seuil de sortie (Ct) en fonction de la quantité de copies de départ, permettra d'évaluer l'efficacité de la PCR pour chaque paire d'amorces. Théoriquement, l'écart des cycles seuils entre deux dilutions de facteur 10 doit être de 3,3. Cet écart correspond à une efficacité de 100 %, et indique que le nombre de copie double à chaque cycle de PCR. Une efficacité de PCR jusqu'à 80% est tolérée, mais cette valeur devra alors être prise en compte lors de l'analyse des résultats.

e. Analyse des résultats

La méthode utilisée pour quantifier les valeurs d'expression s'inspire de Pfaffl (2001) et Vandesompele *et al.* (2002). Elle permet, à partir des Ct de chaque essai et du facteur de normalisation déterminé, de connaître la quantité d'expression relative d'un gène et de la normaliser. Pour cela, il faut tout d'abord calculer les expressions relatives de chaque gène constitutif pour pouvoir obtenir les facteurs de normalisation. La stabilité de l'expression des gènes constitutifs est évaluée grâce au logiciel GeNorm® (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Le gène *VvEFIγ* a été choisi pour son taux de transcrits relativement stable au cours du développement de la baie de raisin ainsi que dans les suspensions cellulaires de vigne. Concernant, les analyses d'expression de gènes chez la Tomate, le gène *VvEiF4α* a été sélectionné. Les niveaux d'expression des différents gènes d'intérêt sont ensuite normalisés par rapport à l'expression des gènes constitutifs. Les calculs d'expression relative et de normalisation ont été effectués en utilisant le programme CFX Manager de Bio-Rad. Les valeurs d'expressions relatives sont calculées en fonction de la valeur d'expression la plus faible pour chaque gène (qui prend la valeur arbitraire de 1).

III.2.6. Technique de microarray pour la caractérisation fonctionnelle de VvCEB1

L'expérience microarray sur génome complet (NimbleGen microarrays 090818 Vitis exp HX12 (Roche, NimbleGen Inc., Madison, WI) concernant la caractérisation fonctionnelle de VvABF2 (cf. Chapitre 3) a été réalisé par la société MOgene (<http://www.mogene.com/>). Seule l'expérience microarray concernant la caractérisation fonctionnelle de VvCEB1 (Chapitre 2) sera décrite ci-après.

a. Type de lames utilisées

Les lames microarray utilisées ont été générées à partir de 14562 séquences unigènes sélectionnées sur l'ensemble des données EST de vigne disponibles dans la version 3 de la banque de données du TIGR en 2003. Des oligonucléotides de 70 mers associés à ces séquences EST ont été choisis par la société Opéron dans l'orientation sens 5'-3' puis synthétisés par Qiagen. Enfin, le dépôt de ces sondes a été réalisé par le Génomipôle de Montpellier. La taille des spots est de 150 à 160 µm et la concentration des oligonucléotides de 5µM.

b. Synthèse et marquages des sondes

La synthèse des sondes a été effectuée à l'aide du kit « Amino allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification » (Ambion) selon les recommandations du fournisseur. C'est un protocole de marquage indirect permettant l'amplification des ARN. Des ADNc doubles brins générés par transcription inverse servent de 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. La dernière étape est le marquage avec des aa-UTP avec les fluorochromes. Des N-hydroxysuccinimidyl ester (NHS-ester) de la cyanine 3 (Cy3) ou de la cyanine 5 (Cy5) (« Cy5™ Post Labelling Reactive Dye Pack », Amersham) sont couplés aux aa-dUTP des ARNas. Chaque lot d'ARN issu d'une condition particulière est marqué avec les 2 fluorochromes. Cela permettra la réalisation d'un répliquât technique appelé « dye swap ». Une lame sera hybridée avec un lot d'ARN issu de la condition A marqué au Cy3 et l'autre lot d'ARN issu de la condition B marqué au Cy5. Une autre lame sera hybridée en inversant le marquage des lots d'ARN issu de chaque condition : le lot d'ARN issu de la

condition A sera marqué au Cy5 et l'autre lot d'ARN issu de la condition B sera marqué au Cy3.

c. 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_{260nm}) permet de doser les ARNas. L' A_{550nm} et l' A_{650nm} permettent de doser respectivement les fluorochromes Cy3 et Cy5. La quantité de fluorescence incorporée (pmol) doit être au minimum de 100 pmol par μg .

d. Co-hybridation et lavages des lames

Plusieurs étapes sont nécessaires avant l'hybridation. Elles sont détaillées ci-dessous :

- **Prétraitement 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.
- **Préparation des sondes pour l'injection** : Quatre μg de chaque sonde marquée sont mélangés puis fragmentés. La fragmentation est effectuée avec le kit «RNA fragmentation Reagents» (Ambion). Un μL de tampon de fragmentation 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* 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.

* La solution de sperme de saumon (0,1 mg/mL) est dénaturée 5 min à 100°C, puis placée dans la glace pendant 1 min.

- **Co-hybridation et lavages des lames** : 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.

e. Acquisition des images

L'acquisition des images est réalisée par lecture des puces sur le scanner Gene Pix 4000B (Axon instruments) de la plateforme transcriptomique de l'INRA de Bordeaux. Les scans sont déterminants pour l'étape de normalisation et nécessite une certaine mise au point. Les deux lasers du scanner permettent l'acquisition simultanée des signaux émis à 552 nm et 635 nm par les fluorochromes Cy3 et Cy5, respectivement. La fluorescence émise est mesurée à l'aide de photomultiplicateurs (PMT) sur lesquels on peut appliquer une tension variable pour ne pas trop saturer les images et pour équilibrer l'intensité des deux fluorochromes. Les autres lames correspondant au « dye swap » (lame où le marquage des lots d'ARNas est inversé) sont ensuite scannées avec les mêmes puissances. Le scanner permet une résolution de 5 µm par pixel. Les images obtenues pour chaque canal Cy3 et Cy5 et pour la superposition des canaux Cy3/Cy5 sont enregistrées au format TIFF.

f. Analyse des images

Le logiciel GenePix Pro 4.0 (Axon Instruments) a été utilisé pour l'acquisition des données brutes. La quantification et le contrôle de la qualité des signaux ont été réalisés avec le logiciel Maia version 2.75. Les signaux de mauvaise qualité ainsi que ceux ayant une intensité saturante (supérieure à 50000) ont été éliminés pour les analyses ultérieures. L'analyse des données a été réalisée par Mr. Christian Kappel (thèse 2010, UMR INRA EGFV), à l'aide du logiciel R/Bioconductor « package limma ». Le « bruit de fond » des lames a été corrigé avec la méthode « normexp ». La normalisation a été effectuée à l'aide de la fonction « normalizeWithinArrays » et de la méthode « printtiploess ». Les gènes avec un ratio d'expression supérieur à 1.6 et avec une p-Value ajustée inférieure à 0.1 ont été considérés comme exprimés de façon différentielle. Les séquences oligonucléotidiques (sondes) présentes sur les lames ont été réannotées en utilisant la version 12X du génome de

la vigne (Jaillon *et al.*, 2007) et un BLAST contre la banque de données « uniref100 release 15.14 » (<http://www.ebi.ac.uk/uniref/>).

IV. Transformation des plantes

IV.1. Transformation transitoire de protoplastes

IV.1.1. Isolement et transformation de protoplastes de Tabac

Le protocole est mentionné dans l'article concernant la caractérisation fonctionnelle de VvCEB1 (Chapitre 2).

IV.1.2. Isolement et transformation de protoplastes de *d'Arabidopsis thaliana*

Les solutions utilisées pour l'isolement des protoplastes sont détaillées dans l'annexe 7, tableau 14. Les manipulations se font à température ambiante. Les protoplastes sont préparés à partir de 50 mL d'une suspension cellulaire d'*A.thaliana* âgée de 6 jours après le dernier repiquage. Les cellules sont collectées par centrifugation (5min/1000 rpm) puis incubées dans 50 mL d'une solution de B5 GM additionnée de cellulase R10 (Duchefa) (1 %) et de macérozyme (Duchefa) (0,2 %) pendant 4 h, sous agitation et à l'obscurité. Les cellules digérées sont centrifugées 5 min à 1000 rpm, lavées avec 25 mL de B5 GM puis resuspendues dans 10 mL de B5 S. Après une nouvelle centrifugation (6 min/800 rpm), « L'anneau flottant » de protoplastes est récupéré puis les protoplastes sont comptés grâce à une cellule de Malassez. Leur concentration est ajustée à 4.10^6 protoplastes par mL. La transformation des protoplastes d'*A.thaliana* est ensuite réalisée comme décrit précédemment pour le Tabac. Lors de la dernière étape de la transformation, les protoplastes d'*Arabidopsis* sont resuspendus dans 150 μ L de B5 GM.

IV.2. Transformation stable des plantes

IV.2.1. Transformation d'*A.tumefaciens* par électroporation

Les souches sauvages EHA105 et GV3101 d'*A.tumefaciens* sont rendues compétentes (cf. Matériel et Méthodes, § III.1.1.i.) et transformés par électroporation (cf. Matériel et Méthodes, § III.1.1.j.) avec respectivement, le vecteur pFB8 et les vecteurs de la technologie Gateway™.

IV.2.2. Préparation de la suspension d'*A.tumefaciens*

Les souches transformées d'*A.tumefaciens* sont mises en culture dans 25 mL de YEB (pH 7,2) additionnés des antibiotiques de sélection, sous agitation (220 rpm) à 28°C jusqu'à ce que la culture atteigne une absorbance (600 nm) de 0,6 (phase exponentielle de croissance). Après une centrifugation de 15min/5000 rpm/4°C, le culot bactérien est lavé une fois et repris dans 25 mL de YEB (pH 5,6) additionné d'acétosyringone (100 µM) pour induire la virulence des bactéries, puis placé 2h à 28°C sous agitation (220 rpm).

IV.2.3. Transformation de la suspension cellulaire embryogène 41B de vigne

La culture bactérienne (préparé selon le protocole décrit précédemment) est centrifugée 15 min/5000 rpm/4°C, lavée 2 fois avec 25 mL de milieu GM⁺ (Annexe 7, Tableau 6) puis repris dans 20 mL de milieu GM⁺. La suspension d'*A.tumefaciens* est placée sur de la glace. L'absorbance à 600 nm est mesurée puis ajustée à 0,2. Des cellules embryogènes 41B sauvages âgées de 7 jours (0,5 mL de cellules sédimentées) sont incubées avec 10 mL de la suspension bactérienne pendant 30 min à 28°C sous agitation (110 rpm). Cette co-culture est ensuite asséchée et déposée sur un papier stérile (Whatman 3MM), lui-même placé sur un milieu solide GM⁺. Après 48 heures de co-culture à l'obscurité et à 26 °C, les cellules sont rincées 2 fois avec 20 mL de milieu GM⁺ liquide puis mises en culture dans 25 mL de GM⁺ additionné de paromomycine (sélection des cellules transformées) et de céfotaxime (élimination d'*A.tumefaciens*) à 22°C sous agitation (120 rpm).

IV.2.4. Transformation des cotylédons de tomate cv. WVA106

La transformation des cotylédons de tomate est réalisée selon le protocole modifié de Hamza et Chupeau (Hamza et Chupeau, 1993). Des graines sont mises à germer (cf. Matériel et Méthodes, § II.1.4.) et les cotylédons sont prélevés sur des plantules âgées de 9 jours. Les cotylédons sont coupés en deux explants afin d'induire une meilleure réponse à la blessure nécessaire pour l'infection par *A. tumefaciens*. Ils sont ensuite mis en culture, face supérieure contre la gélose, pendant 2 jours à l'obscurité sur du milieu MS (Annexe 7, Tableau 3) additionné de l'hormone zéatine (cytokinine) à 1,5 mg/L et appelé milieu de régénération. La culture bactérienne (cf. Matériel et Méthodes, § IV.2.2.) est centrifugée 15 min/5000 rpm/4°C, lavée 2 fois avec 25 mL de milieu MS (Annexe 7, Tableau 3) puis repris dans 50 mL du même milieu MS additionné d'acétosyringone (100 µM). La suspension d'*A.tumefaciens* est placée sur de la glace. L'absorbance à 600 nm est mesurée puis ajustée à

0,1. Les explants sont ensuite immergés pendant 30 min, avec des agitations manuelles régulières, dans 50 mL de la suspension bactérienne. L'excès de suspension bactérienne est éliminé entre deux feuilles de papier absorbant stérile. Les cotylédons sont alors placés face supérieure contre la gélose sur du milieu de régénération additionné de 100 μ M d'acétosyringone. Cette co-culture se fait à l'obscurité, en chambre de culture pendant 48h à 26°C. Les cotylédons sont rincés 4 fois 3 min dans 50 mL de milieu MS liquide (Annexe 7, Tableau 3). Un 5^{ème} lavage est réalisé avec ce même milieu MS additionné de Timentin (300 μ g/mL). Les cotylédons sont alors égouttés sur du papier absorbant et mis en culture, face supérieure contre la gélose, sur du milieu de régénération additionné de Timentin à 300 mg/L (élimination d'*A.tumefaciens*) et de kanamycine (sélection des transformants) à 100 mg/L. Les explants, cultivés en chambre de culture (25°C), sont repiqués chaque semaine sur ce milieu de régénération complété jusqu'à l'apparition des bourgeons et de tiges, faisant suite à la formation de cal. Dès que les tiges néoformées atteignent 2 cm, elles sont excisées du cal et placées sur du milieu MS (Annexe 7, Tableau 3) additionné de Timentin à 300 mg/L, de kanamycine à 100 mg/L et d'IAA (auxine) à 0,5 mg/L, afin de favoriser l'enracinement.

IV.2.5. Méthodes de sélection et d'analyses des plantes transgéniques

Les plants de Tomate ainsi que les cellules 41B transformées sont analysés au niveau moléculaire par PCR et par RT-PCR semi quantitative afin de vérifier respectivement, la présence de l'ADN-t dans l'ADN génomique et son effet sur la transcription des ARNm du gène d'intérêt. D'autre part, les plants de tomate sont également analysés par cytométrie en flux afin de déterminer leur taux de ploïdie. Ces analyses de cytométrie en flux sont réalisées sur des noyaux isolés de jeunes feuilles. Les tissus végétaux sont placés dans une boîte de Pétri et sont lacérés à la lame de rasoir dans 1 mL de tampon « Cystain UV ploidy » (Partec) contenant du DAPI, un composé fluorescent (λ exc. : 344nm, λ em. : 466) qui se fixe spécifiquement à l'ADN. Les échantillons sont ensuite filtrés à travers un film de nylon (taille des pores, 100 μ m). Les préparations de noyau sont analysées avec un cytomètre Partec Pas-II (Münster, Allemagne). Le système informatique associé (DPAC, Partec) au cytomètre permet de traiter les signaux pour les représenter sous formes d'histogrammes de populations de noyaux. Les mesures de cytométrie en flux sont réalisées sur 10000 noyaux en moyenne. Seules les plantes diploïdes et exprimant le transgène sont conservées pour les analyses ultérieures.

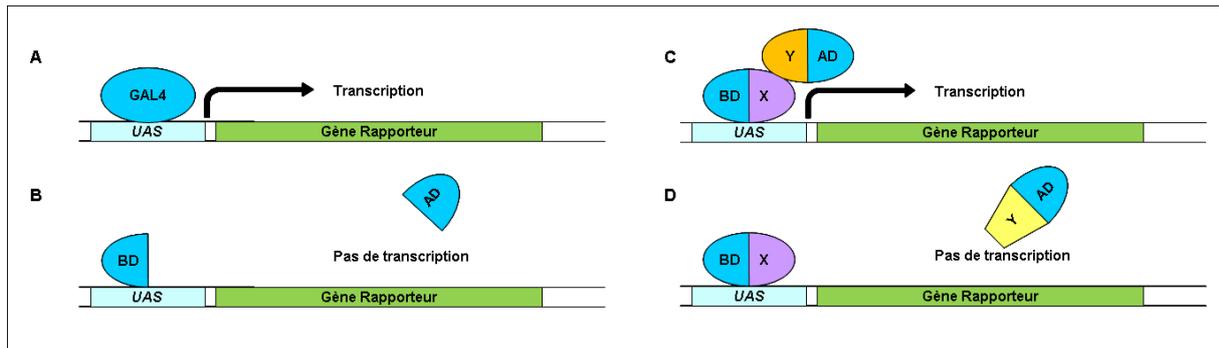


Figure 45. Principe de la technique de double hybride chez la levure

A. La protéine GAL4 active la transcription au niveau de l'UAS.

B. La protéine GAL4 est composée d'un domaine de fixation à l'ADN (BD) et d'activation de la transcription (AD) qui, séparés l'un de l'autre, ne peuvent pas activer la transcription au niveau de l'UAS.

C. Cas où X et Y interagissent, il y aura activation de la transcription.

D. Cas où X et Y n'interagissent pas, il n'y aura pas de transcription possible.

IV.2.6. Expériences d'agroinfiltration sur baies de raisin

Une culture d'*Agrobacterium* EHA105 transformée avec le vecteur d'intérêt est incubée à 28°C dans du milieu YEB (Annexe 7, Tableau 8) additionné des antibiotiques de sélection, d'acétosyringone 20 μmol^{-1} et tamponné à pH 5.6 avec du MES 10 mmol.L^{-1} . Quand la culture atteint une absorbance de 0.8, les bactéries sont centrifugées puis remises en suspension pour obtenir une absorbance de 2,4 (concentrée 3X par rapport à la culture d'origine). Elles sont ensuite incubées 1h à 22°C dans un milieu MMA (MS salts, 20 g.L^{-1} saccharose, 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 10 mmol.L^{-1} MES pH 5,6). Les baies de raisin issues de boutures fructifères ont été agroinfiltrées avec 200 μL de cette solution d'*Agrobacterium*. Ce protocole a été adapté par David Lecourieux et Romain Fouquet, d'après le protocole décrit par Spolaore *et al.* (2001). Les boutures fructifères ont été produites et entretenues par Mr. Thierry Robert selon le protocole décrit par Ollat *et al.* (1998) et GénY *et al.* (1998).

V. Technique du criblage double hybride chez la levure

V.1. Principe de la technique du double hybride chez la levure

Le double hybride permet la recherche de partenaires protéiques capables d'interagir *in vivo* en système eucaryote levure (*Saccharomyces cerevisiae*) avec la protéine étudiée (Figure 45; Fields et Song, 1989). Cette méthode repose sur deux propriétés intrinsèques aux facteurs de transcription. Tout d'abord, les facteurs de transcription eucaryotes ont typiquement une structure modulaire constituée de deux domaines distincts: un domaine de liaison à l'ADN noté DB (DNA-Binding) et un domaine d'activation de la transcription AD (Activation Domain). De fait, il est possible de créer un FT hybride en combinant le domaine DB d'une protéine et le domaine AD d'une autre protéine. D'autre part, ces domaines fonctionnent indépendamment et ne doivent pas nécessairement co-exister au sein de la même protéine pour entraîner la transcription d'un gène. En effet, quand les domaines sont exprimés séparément puis rapprochés les uns des autres par des interactions non-covalentes, ils peuvent fonctionner collectivement et recréer la fonction transcriptionnelle de la protéine intacte.

Chez la levure, le galactose est importé et converti en galactose 6-phosphate par plusieurs enzymes (GAL1 notamment). La régulation de l'expression des gènes codant ces enzymes est assurée par trois facteurs de transcription, GAL80, GAL3 et GAL4. Comme la plupart des facteurs de transcription eucaryotes de type « activateurs » de la transcription, GAL4 possède un domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain, DBD) et un domaine d'activation de la transcription (Activation Domain, AD). Aussi, chez les levures sauvages en

présence de galactose, cette protéine est produite et active la transcription du gène GAL1, responsable de la digestion du galactose. Le domaine DB de GAL4 se fixe sur une séquence cis-régulatrice, GUAS (GAL1 upstream activating sequence) pour activer la transcription du gène GAL1. Il a été démontré que dans la levure, la partie intermédiaire de la protéine GAL4 ne modifie pas son action. GAL1, ainsi que tout gène comportant la séquence GUAS en amont de son promoteur, sera activé par la présence de DB et AD maintenus à proximité l'un de l'autre. Ainsi, lorsque l'on fusionne une protéine X (appelée appât, ici VvCEB1) au BD de GAL4 (BD-X) à une protéine Y (appelée proie) fusionnée à AD (AD-Y) et si (et seulement si) il y a interaction entre la protéine X et Y, le facteur de transcription GAL 4 sera alors reconstitué (BD-X-Y-AD) et fonctionnel. Il se fixera au niveau du motif GUAS permettant l'activation de l'expression des gènes situés en aval de cette région promotrice. Par ailleurs, comme la capacité de dégradation du galactose est difficile à observer (la levure disposant de plusieurs mécanismes métaboliques), les souches de levure utilisées dans les systèmes double hybride ont été modifiées par ingénierie génétique (cf. Matériel et Méthodes, § II-3). Dans notre cas, ces levures ne produisent plus la protéine GAL4 endogène et sont auxotrophes à certains acides aminés (tryptophane, adénine, leucine et histidine). Aussi, des gènes rapporteurs sélectifs ont été placés sous contrôle de séquences GUAS. Il s'agit des gènes rapporteurs HIS3, ADE2, MEL1 et lacZ (Figure 46). Expérimentalement, les levures sont transformées simultanément par deux plasmides permettant la production de protéines recombinantes (cf. Matériel et Méthodes, § II.4.4.). Le plasmide pGBKT7 est utilisé pour exprimer dans les levures la protéine d'intérêt ("appât") fusionnée au GAL4-DBD. Il possède le gène TRP1 permettant la complémentation de l'auxotrophie des levures vis-à-vis du tryptophane. Le plasmide pGADT7-Rec est utilisé pour exprimer la «cible» (protéine d'intérêt ou une banque d'ADNc contenant des interacteurs potentiels, ce qui est notre cas) fusionnée au GAL4-AD. Il possède le gène LEU permettant la complémentation de l'auxotrophie des levures vis-à-vis de la leucine. Seules les levures ainsi co-transformées pourront se développer sur un milieu de croissance carencé en tryptophane et leucine (SD/-Leu/-Trp). De plus, l'interaction entre l'appât et un partenaire protéique potentiel activera l'expression des gènes rapporteurs permettant ainsi aux seules levures co-transformées et dont le facteur de transcription GAL4 a été reconstitué, de se développer en milieu de croissance également dépourvu d'histidine et d'adénine (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade ou QDO pour Quadruple dropout

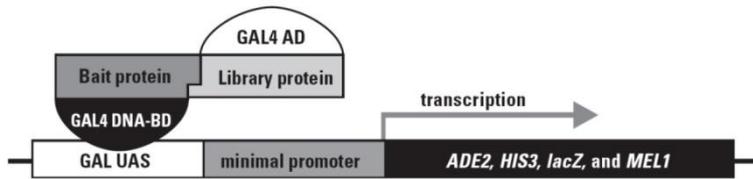


Figure 46. Activation des gènes rapporteurs par reconstitution du facteur de transcription GAL4 chez la levure

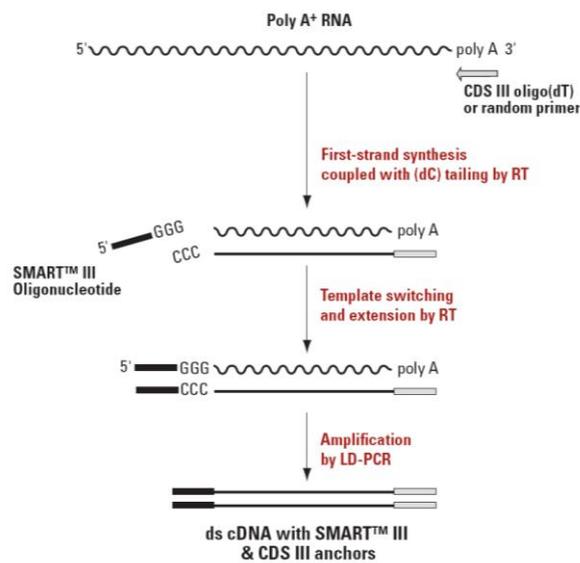


Figure 47. Construction de la banque d'ADNc par la technique SMART™ pour le criblage double hybride chez la levure.

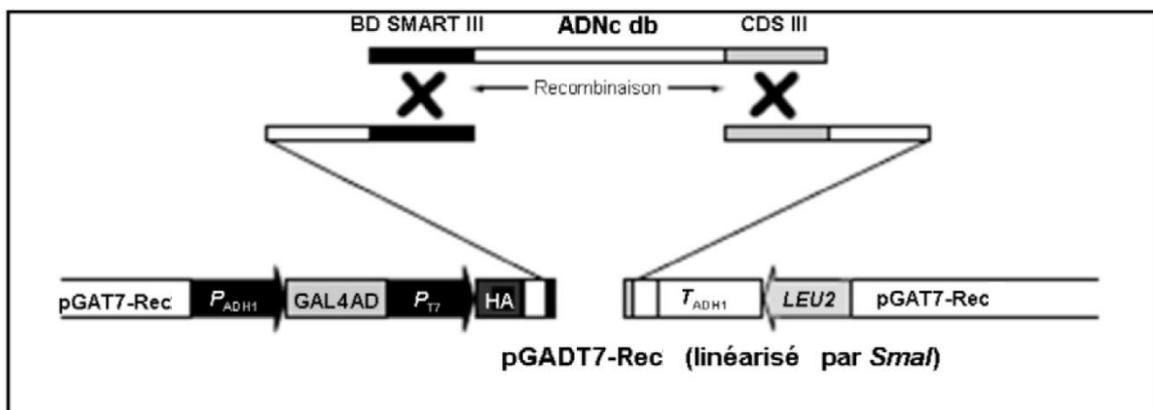


Figure 48. Insertion de la banque d'ADNc dans le vecteur pGADT7-rec par recombinaison homologue chez la levure.

medium). Deux autres gènes rapporteurs sont activés en cas d'interaction: le gène codant la β -galactosidase (lacZ) et le gène codant l' α -galactosidase (MEL1). Le gène lacZ permet d'effectuer des expériences contrôles de coloration lacZ sur levures issues de milieux de cultures solides ou liquides en ajoutant du β -Gal. L' α -galactosidase est une enzyme sécrétée dont l'activité peut facilement être détectée par l'ajout de son substrat (X- α -Gal) dans les milieux de cultures solides. Si MEL1 est exprimé et X- α -Gal présent, les colonies de levures se colorent en bleu. De fait, le milieu le plus sélectif est QDO + X- α -gal.

Les expériences de double hybride ont été réalisées avec et selon les instructions du kit « BD Matchmaker™ Library Construction and Screening kits » (Clontech).

V.2. Construction de la banque d'ADNc

Une banque d'ADNc a été construite à partir de 2 μ g ARN totaux extraits de baies de raisin (*V. vinifera* cv Cabernet Sauvignon) récoltées au stade véraison. Les ARN ont été rétro-transcrits en ADNc selon la technique SMART (Figure 47) (Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript). Lors de la transcription inverse, les ARNm sont sélectionnés grâce un adaptateur comprenant une séquence oligonucléotidique riche en déoxythymidines (CDS III Oligo(dT)) qui s'hybride spécifiquement sur les ARNm, pourvus d'une séquence polyadénylée. De plus, l'activité terminale transférase de la MMLV permet l'addition de déoxycytosines à l'extrémité 3' de l'ADNc simple brin. Une seconde amorce « SMART III™ » riche en déoxyguanine en 3' est ensuite ajoutée à la réaction de RT. Elle viendra s'hybrider spécifiquement sur les ADNc sb possédant des déoxycytosines supplémentaires en leur extrémité 3' et la réaction de RT se poursuivant, il y aura ajout de la séquence complémentaire à l'amorce « SMART III™ » au niveau de l'extrémité 3' des ADNc simples brins néoformés. Par la suite, une réaction de LD PCR (Long Distance PCR) à l'aide de la polymérase Pfx platinum et utilisant ces deux adaptateurs (SMART III™ et CDS III Oligo(dT)) comme amorces, permettra la construction de la banque d'ADNc, dans un volume final de 100 μ L. Les ADNc doubles brins ainsi générés sont ensuite purifiés sur colonne de résine (BD CHROMA SPIN™ TE 400, BD Biosciences Clontech). Cette purification permet la sélection des fragments d'ADN ayant une taille supérieure à 200 pb. En effet, les molécules dont la taille est supérieure à celle des pores de la résine sont exclues de celle-ci, puis récupérées par centrifugation. L'ADN est finalement purifié dans un volume final de 20 μ L. Les séquences des adaptateurs en 5' et 3' des ADNc étant similaires à celles situées aux extrémités des plasmides pGADT7-Rec, linéarisé par l'enzyme de restriction SmaI, les ADNc

double brins s'inséreront dans les plasmides par recombinaison homologue *in vivo* (Figure 48).

V.3. La transformation des levures

La préparation des levures compétentes est réalisée suivant les recommandations du kit Clontech. La transformation des levures (Annexe 7, Tableaux 15 et 16) se fait par la méthode LiAc (Acétate de Lithium). Les cellules compétentes de levures incubées 45 min à 30 °C avec l'ADN plasmidique ainsi que de l'ADN de sperme de hareng dénaturé, et une solution de PEG (Polyéthylène Glycol). Enfin, après addition de DMSO (Diméthylsulfoxyde), l'ADN pénètre dans les cellules grâce à un choc thermique de 20 min réalisé à 42°C. Après transformation des levures, celles-ci sont centrifugées, et la solution de PEG totalement éliminée. Les levures transformées sont ensuite incubées 90 min à 30°C sous agitation 220 rpm, dans du milieu YPD Plus (Clontech). Les levures sont de nouveau culottées par centrifugation, et le culot est resuspendu dans une solution de NaCl 0,9% (p/v). Cent cinquante µL de cette suspension sont étalés sur du milieu sélectif solide. L'estimation de l'efficacité de transformation, ainsi que les tests préliminaires d'auto-activation et de toxicité ont été réalisés selon les recommandations du kit Clontech.

V.4. Criblage double hybride par « Yeast mating »

La procédure de criblage choisie a été le « mating » entre les souches de levures AH109 (contenant exprimant les ADNc de la banque) et les levures Y187 (exprimant la protéine appât). Après transformation des levures AH109 avec la banque d'ADNc, celles-ci sont étalées sur environ 200 boîtes de milieu sélectif SD-Leu (150 µL par boîte). L'ensemble des colonies s'étant développées est mélangé et repris dans du freezing medium (Clontech). La densité cellulaire est calculée et doit être $\geq 2 \times 10^7$ cellules / mL. Les levures AH109 exprimant la banque d'ADNc sont alors aliquotées par 1 mL et stockées à -80°C jusqu'à utilisation. Pour la réaction de « mating », un aliquot d'1 mL de levures AH109 exprimant la banque d'ADNc est décongelé et mélangé à 5 mL de levures Y187 exprimant la protéine appât ($\geq 1 \times 10^7$ cellules/ml). Quarante cinq mL de milieu YPDA 2X additionné de kanamycine (50µg/ml) sont ajoutés et le mélange est incubé de 20 à 24 h, à 30°C sous agitation lente (30 rpm). La présence de zygote est vérifiée après 20 heures de «mating» sous microscope (400X). Si des zygotes sont présents, les levures sont incubées pendant 4 heures supplémentaires. Les levures sont alors centrifugées (1000 g/10 min) et reprises dans 10 ml de milieu YPDA 0,5X additionné de Kanamycine (50 µg/ml). Deux cent µL de levures sont

alors étalées sur milieu sélectif QDO (Quadruple Dropout Medium: SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp). Les colonies potentiellement positives ont été réétalées successivement deux fois sur un milieu QDO puis une fois sur un milieu QDO+X- α -gal. L'estimation de l'efficacité du « mating » a été réalisée selon les recommandations du kit Clontech.

V.5. Isolation des clones positifs en double hybride chez la levure

Le protocole utilisé est le même que pour la PCR à partir de colonies bactériennes (cf. Matériel et Méthodes, § III.1.1.a.). Les amorces utilisées sont décrites en Annexe 6. Elles permettent d'amplifier l'ADNc intégré dans le plasmide pGADT7-rec. Les produits PCR sont élués à l'aide du kit Wizard® SV Gel ou PCR Clean-Up System (Promega) selon le protocole décrit par le fournisseur, puis envoyés à la société de séquençage GATC.

Une minipréparation d'ADN plasmidique des clones de levure positifs a également été réalisé à l'aide du kit « Qiaprep spin Miniprep » (QIAGEN), selon les instructions du fournisseur.

VI. Méthodes d'analyse microscopique

Les analyses histologiques et microscopiques ont été réalisées au sein du Pôle d'Imagerie du Végétal (PIV, site INRA de Bordeaux) avec les précieux conseils de Mme Catherine Cheniclet.

VI.1. Observation des protoplastes

L'observation des protoplastes transformés se fait après dépôt d'un aliquot sur une lame de verre. Les observations de localisation cellulaire des protéines d'intérêt couplées à la GFP ont été effectuées avec le microscope à épifluorescence Nikon Eclipse 800 équipé d'une caméra Spot RTKE (Diagnostic Instruments) mais également à l'aide d'un microscope à balayage laser confocal (Leica TCS SP2) équipé d'une caméra SPOT-KE-SPLIDER et d'un logiciel de commande Leica Software. Concernant le microscope confocal, un laser argon pouvant émettre à 488 nm a été utilisé pour exciter la GFP. Un miroir dichroïque reflète le faisceau d'excitation et laisse passer le faisceau d'émission. Un filtre d'arrêt contrôle les longueurs d'onde émises par l'objet. L'autofluorescence des chloroplastes des feuilles est visualisée par l'observation des rayons réémis après excitation des pigments chlorophylliens par l'absorption d'une raie émise par un laser hélium à 650 nm. Les images réalisées avec ces différents jeux de filtres ont été prises au grossissement 40x (immersion à eau).

D'autres observations ont été effectuées à l'aide du microscope à épifluorescence Nikon Eclipse 800 équipé d'une caméra Spot RTKE (Diagnostic Instruments).

VI.2. Analyse phénotypique des fruits de tomate à la loupe binoculaire

Les observations et mesures cytologiques ont été réalisées sur des fruits prélevés au stade vert-mature (30 DPA) sur des plantes contrôle (pFB8) et 35S::VvCEB1. Les fruits sont coupés en 2 avec une lame de rasoir, selon un plan équatorial. La coloration des parois des cellules est réalisée pendant 1 min 30 sec dans une solution de 0,1% de bleu de toluidine / 0,1 M tampon phosphate. Après rinçage à l'eau, les demi fruits sont fixés sur une boîte de pétri et immergés dans l'eau. Les observations sont réalisées avec une loupe binoculaire Leica MZ FLIII (Leica Microsystems) équipée d'une caméra Leica DC300F pour l'acquisition des images. Les images ont été analysées avec le logiciel ImagePro-Plus (Media Cybernetics). Les mesures ont été réalisées sur 5 fruits pour chaque lignée. Pour chaque fruit, 4 zones différentes du péricarpe et des septa ont été analysés. Le nombre de couches cellulaires a été estimé entre l'épiderme externe et les couches internes en évitant les zones contenant des faisceaux vasculaires. La surface des cellules du péricarpe et des septa est représentative des cellules situées dans la partie centrale de ces tissus : les cellules se trouvant à la périphérie et autour des tissus vasculaires n'ont pas été prises en compte. Un rectangle a été tracé au niveau de la partie centrale de ces tissus et la taille moyenne des cellules a été estimée en divisant l'aire du rectangle par le nombre de cellules qu'il contient. La surface des cellules (environ 100 cellules mesurées pour chaque fruit) de la columelle a également été mesurée dans la partie centrale de ce tissu, mais cette fois-ci cellule par cellule (les méats étant plus important dans la columelle). L'estimation du nombre de cellules de la columelle et des septa a été estimée en divisant leur surface respective par la surface moyenne des cellules calculée précédemment.

VI.3. Analyse phénotypique des embryons de Vigne

Le phénotype général des embryons a été observé à l'aide du microscope optique Zeiss Axiophot couplé à la caméra SPOT RTKE (Diagnostic Instruments) pour les stades précoces de développement (de 7 à 17 jours après déclenchement de l'embryogénèse (JAE)) puis à l'aide loupe binoculaire Leica MZ FLIII (Leica Microsystems) équipée d'une caméra Leica DC300F après les stades ultérieurs. Les surfaces estimées des embryons sont issues de la moyenne des mesures effectuées sur 30 embryons pour chaque lignée.

L'observation et les mesures de tailles cellulaires ont été effectuées grâce à la technique microscopique du contraste interférentiel différentiel (DIC) à l'aide du microscope Axiophot couplé à la caméra SPOT RTKE. Le DIC aussi appelé contraste « Nomarski » est utilisé pour l'observation de préparations non colorées. Le principe repose sur la division d'un rayon lumineux polarisé en deux rayons de même longueur d'onde, mais polarisés orthogonalement et séparés spatialement d'une distance très courte (une fraction de la longueur d'onde). La séparation en deux rayons est réalisée par un Wollaston (assemblage particulier de deux cristaux biréfringents). Ces deux rayons (nommés respectivement ordinaire et extraordinaire) traversent les spécimens en deux points différents mais très proches. Suivant les milieux traversés par chacun des deux rayons, par exemple cytoplasme pour le rayon ordinaire et la membrane cytoplasmique pour l'extraordinaire, ceux-ci subissent un déphasage différent. Après collection par l'objectif les deux rayons sont recombinaés par un second Wollaston et viennent interférer sur un filtre polariseur. Suivant la différence de phase entre les rayons, un contraste positif ou négatif sera créé révélant ainsi les structures cellulaires. Pour ces observations, les embryons de Vigne ont préalablement été incubés dans une solution de chloral hydrate (chloralhydrate-H₂O-glycerol, 8:2:1, w:v:v) sur une lame de microscope pendant 4 à 24h. Vingt embryons pour chaque lignée ont été étudiés. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel ImagePro-Plus (Media Cybernetics).

VII. Techniques de biochimie

VII.1. Dosage des sucres solubles dans les suspensions cellulaires de vigne 41B

Les cellules de Vigne ont été collectées 7 jours après repiquage, lavées 2 fois dans l'eau distillée puis congelées et broyées dans l'azote liquide. Afin de préserver le matériel végétal, la quantité de poudre nécessaire à chacune des analyses métaboliques décrites ci-dessous, est prélevée à partir de stocks de poudre conservés à -80°C. Ces prélèvements sont alors lyophilisés pendant 4 jours. Les échantillons lyophilisés sont ensuite conservés à l'obscurité, dans une cloche maintenue sous vide, à température ambiante et en présence de gel de silice, jusqu'à utilisation. Trente mg de poudre lyophilisée (poids sec) sont broyées pendant 5 min au broyeur oscillant à billes (fréquence 30/s) en présence de 1,2 mL d'éthanol 80%. Les cellules subissent ensuite un passage dans un bain à ultrasons (10 min à 60°C) entrecoupé d'une agitation au vortex. Après incubation à 4°C pendant 30 min, les échantillons sont centrifugés 5 min à 14000 rpm. Le surnageant contenant les sucres solubles est séché au

« speed vac » pendant une nuit puis stocké à -20°C jusqu'au dosage. Les sucres solubles ont été dosés sur microplaques par voie enzymatique et dosage spectrophotométrique (340 nm) à l'aide du kit « Biosentec » selon les recommandations du fournisseur et du robot « Biotek » associé au lecteur de plaques « Biotek Instrument ».

VII.2. Test de l'activité β -glucuronidase (GUS)

L'évaluation de l'activité de la β -glucuronidase est fondée sur la détection du produit de la réaction catalysée par cette enzyme. Différents substrats peuvent être utilisés, en fonction du type de détection souhaité. Dans notre cas, 2 substrats ont été utilisés. Le MUG (4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide) a été utilisé pour une détection quantitative de l'activité GUS par fluorimétrie. Le X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide) a été utilisé pour visualiser l'activité GUS dans les tissus.

VII.2.1. Dosage de l'activité β -glucuronidase par fluorimétrie

Ce dosage a été effectué à partir de protoplastes transformés avec des constructions « promoteur du gène étudié / gène rapporteur GUS » et des constructions permettant la surexpression de gènes d'intérêts (cf. Matériel et Méthodes, § II.4.2. et § IV.1.), afin d'analyser l'effet de cette surexpression sur l'activité de promoteurs de gènes cibles potentiels. Tout d'abord, l'efficacité de transformation est testée par transformation de protoplastes avec le vecteur contrôle pTH2 (cf. Matériel et Méthodes, §s II.4.2.c.). Le pourcentage de protoplastes exprimant la GFP est déterminé par comptage (comparaison protoplastes intacts observés en lumière transmise et en fluorescence). Si ce pourcentage est d'au moins 50 %, les protoplastes sont transformés avec les constructions d'intérêts et cultivés 16 h à l'obscurité. Les protoplastes sont centrifugés 30 s à 12000 rpm. Le culot de protoplastes est repris dans 100 μ L de tampon d'extraction GUS (β -glucuronidase, enzyme de la réaction) (NaH_2PO_4 50 mM pH 7, β -mercaptoethanol 10 mM, EDTA 10 mM, triton X-100 0,1 %). Les protoplastes subissent ensuite 2 séries de congélation/décongélation puis sont centrifugés 15 min/12000 rpm/4°C. Le surnageant est récupéré et conservé dans la glace. Quarante μ L de surnageant sont mélangés à 600 μ L de tampon d'extraction contenant 1 mM de MUG (4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide, substrat de la réaction). Cent μ L de ce mélange sont incubés à 37°C pendant 30 min. La réaction est arrêtée par ajout de 900 μ L de Na_2CO_3 (0,2M). Le dosage de l'activité GUS est effectué avec un spectrofluorimètre (Versafluor fluorometer, Biorad) après excitation à 365 nm et émission à 455 nm, longueur

d'onde à laquelle le MU (4-methylumbelliférol, produit de la réaction enzymatique) fluoresce. Une gamme étalon est préalablement réalisée avec différents volumes de MU à 1 μM .

VII.2.2. Test histochimique de l'activité β -glucuronidase

Le substrat utilisé est le X-gluc. Il permet la formation d'un produit formant un précipité bleu insoluble. Ce test permet de visualiser et de localiser l'activité de la β -glucuronidase, mais ne permet pas un dosage quantitatif comme décrit précédemment. Ce test a été réalisé pour :

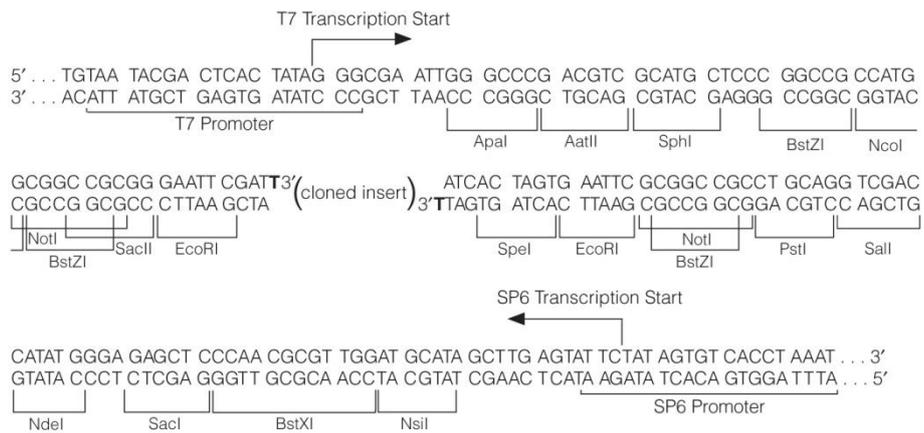
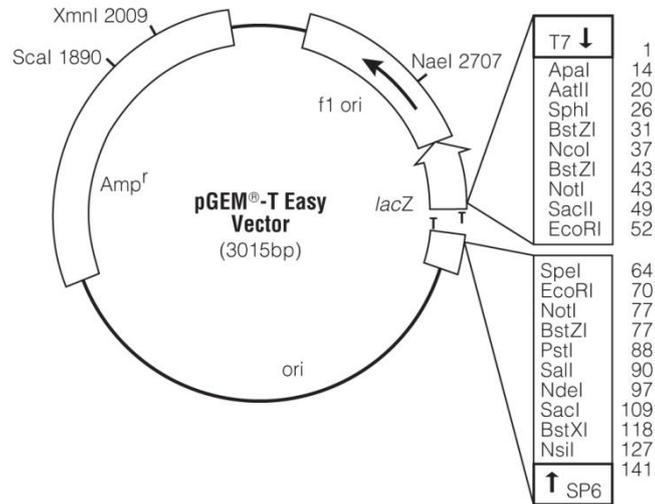
- vérifier la transformation des cellules 41B avec le vecteur pFB8.
- analyser la localisation de l'expression de VvCEB1 dans différents tissus de tomate.

Pour cela les tissus transformés de façon stable sont fixés dans de l'acétone froide, lavés deux fois dans du tampon sodium phosphate (0.1 M NaH_2PO_4 , pH 7,2). Les échantillons sont ensuite immergés complètement dans la solution de coloration GUS (1 mM X-gluc, 0,1 M NaH_2PO_4 pH 7, 1,5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1,5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, et 0.05% Triton X-100) et infiltrés sous vide pendant 45 min en « cassant » le vide plusieurs fois. Par la suite, les échantillons sont incubés à 37°C toute une nuit dans la solution de coloration GUS, puis incubés plusieurs jours dans des solutions d'éthanol 90 %. Ils sont ensuite conservés à 4°C dans une solution d'éthanol 70 %.

Annexes

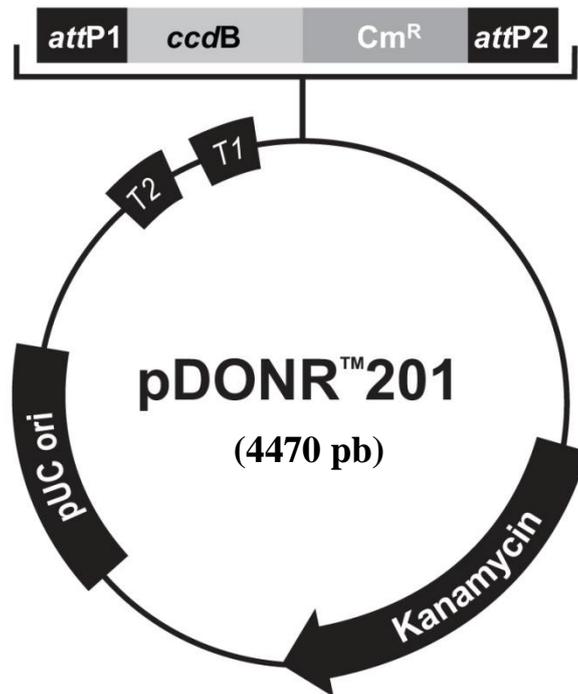
Vecteurs de sous-clonage

→ pGEM-T Easy

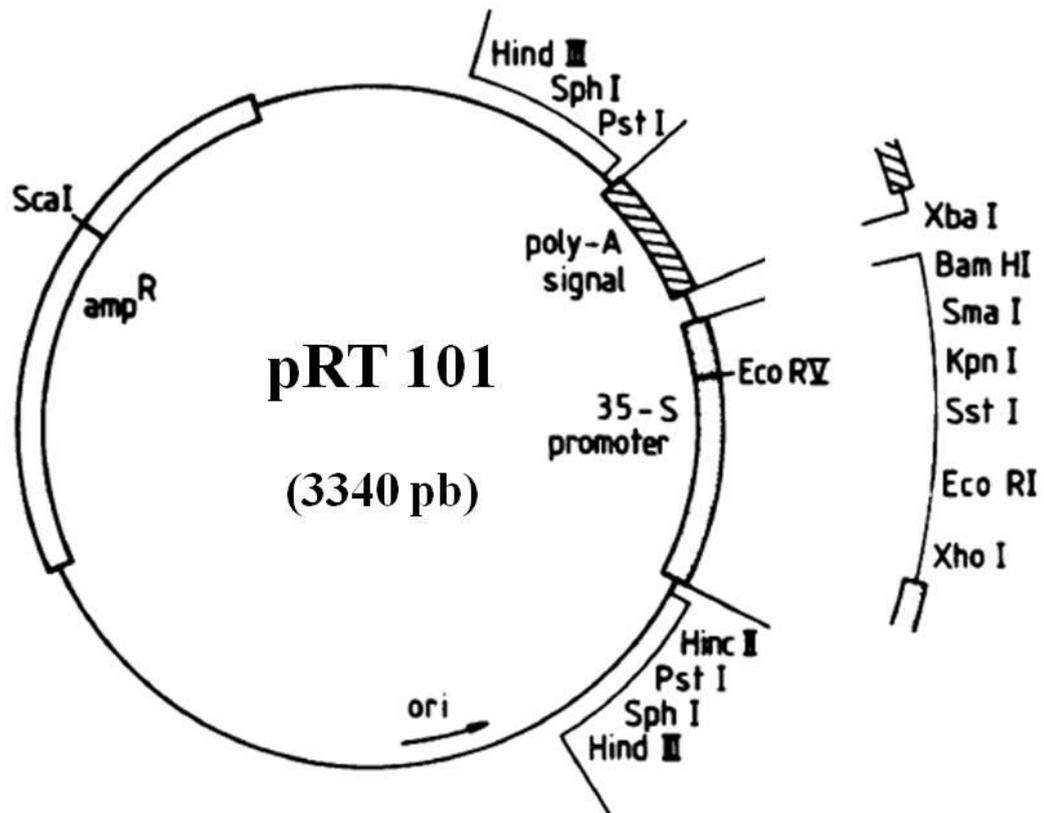


Vecteurs de sous-clonage (suite)

→ pDONR™ 201 (Gateway™)

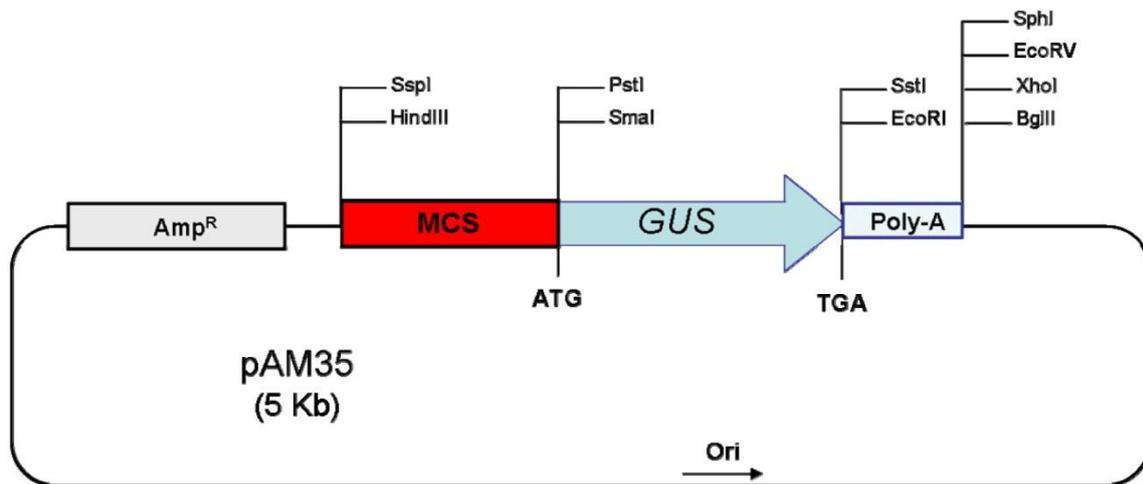


Vecteurs de transformation transitoire de plantes

→ pRT 101

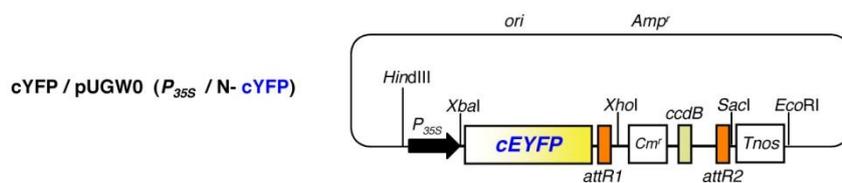
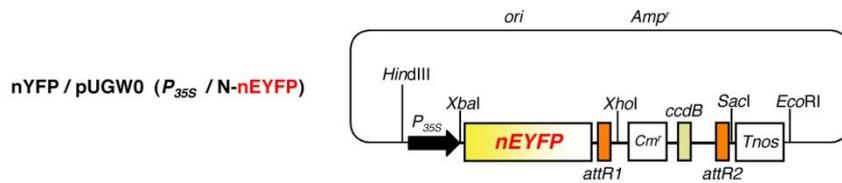
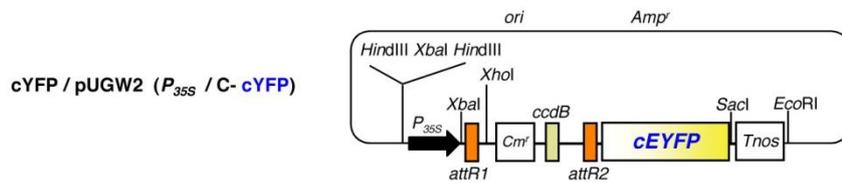
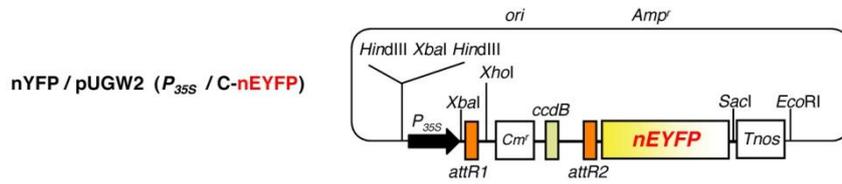
Vecteurs de transformation transitoire de plantes (suite)

→ pAM35



Vecteurs de transformation transitoire de plantes (suite)

→ Les vecteurs Gateway™ utilisés pour la technique BIFC

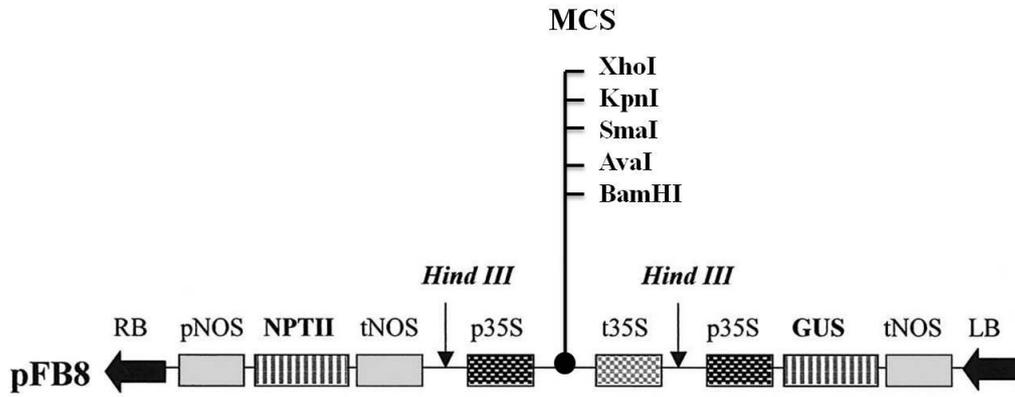


→ pTH2

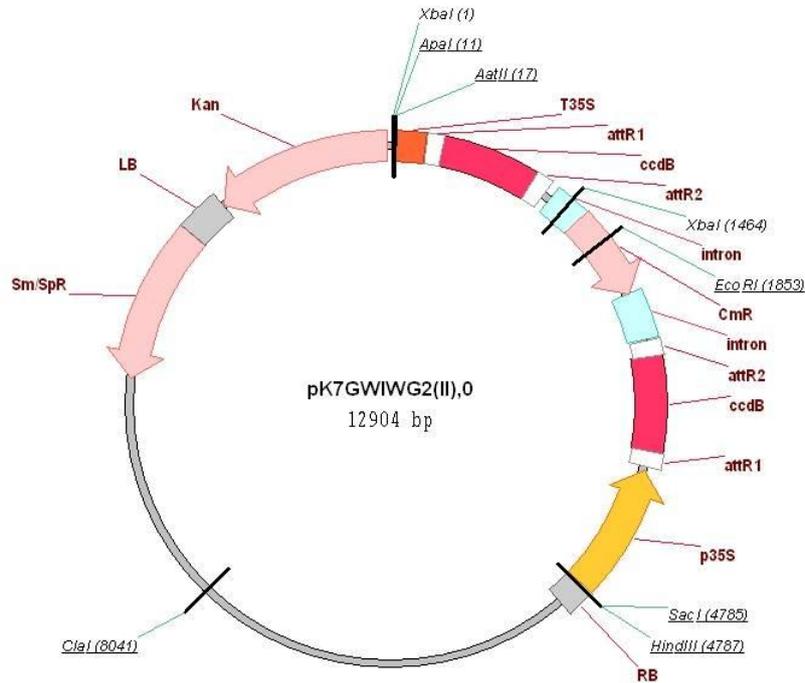


Vecteurs de transformation stable de plantes

→ pFB8

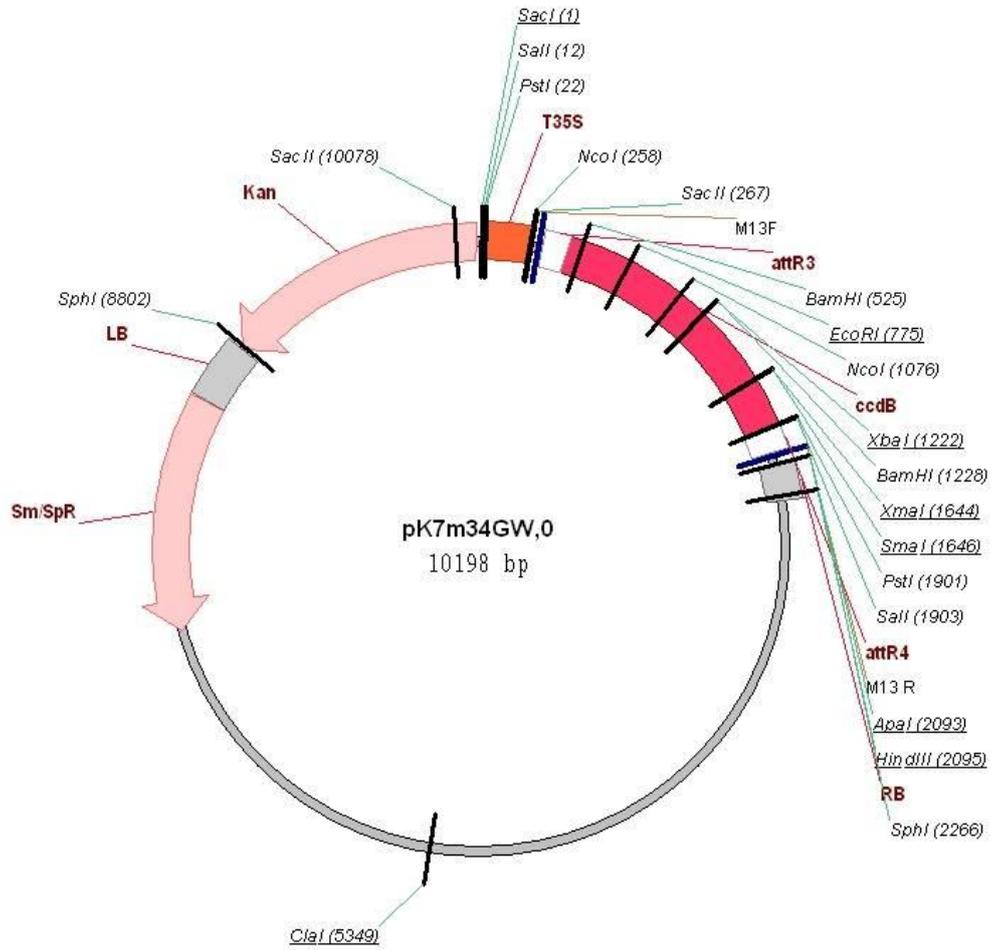


→ pK7GWIWG2(II) (Gateway™)

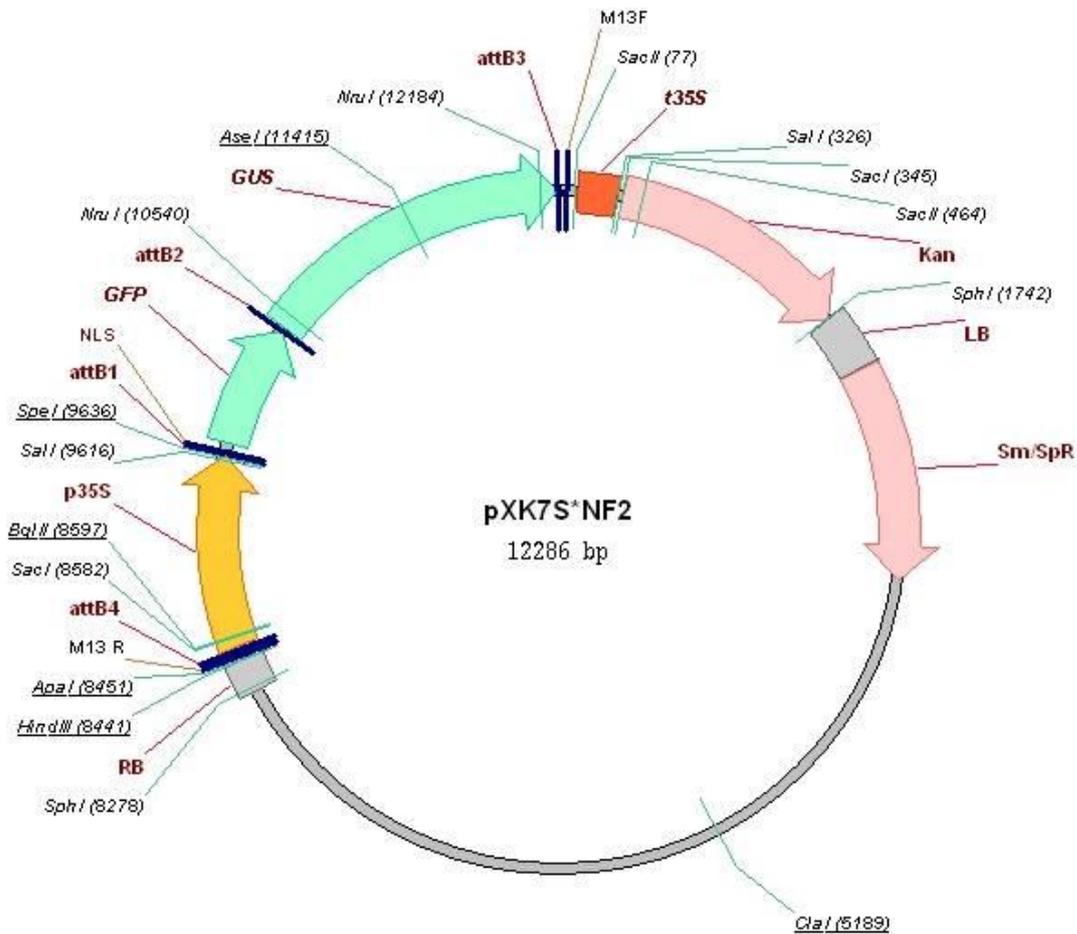


Vecteurs de transformation stable de plantes (suite)

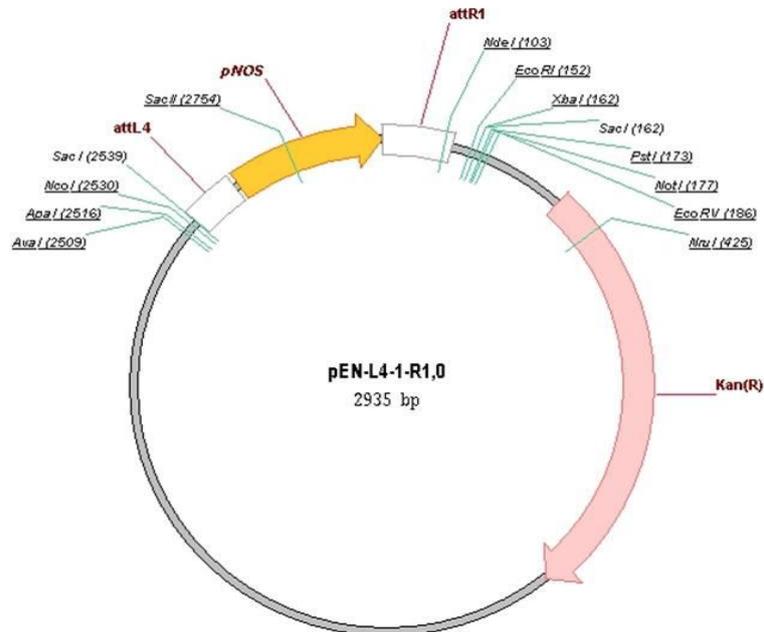
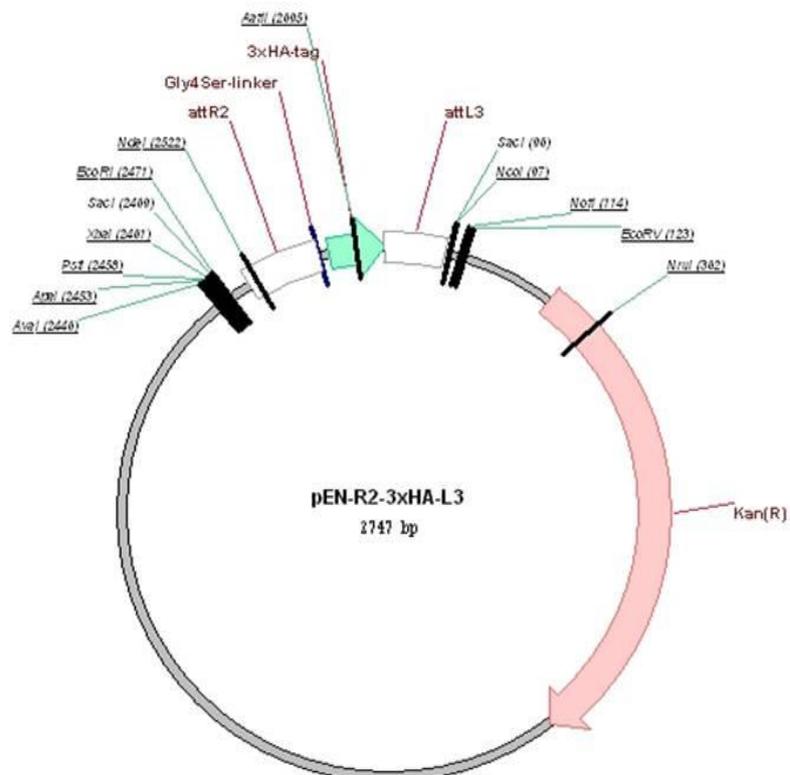
→ **pK7m34GW (Gateway™)**



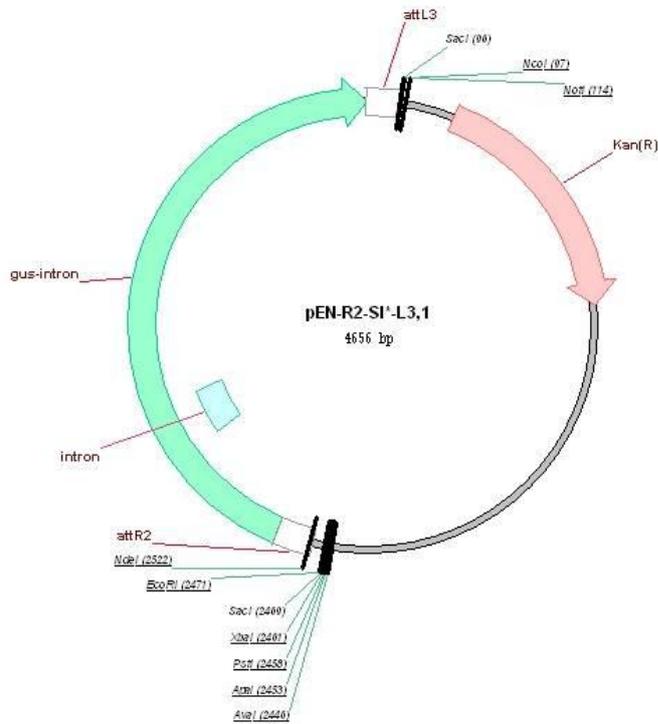
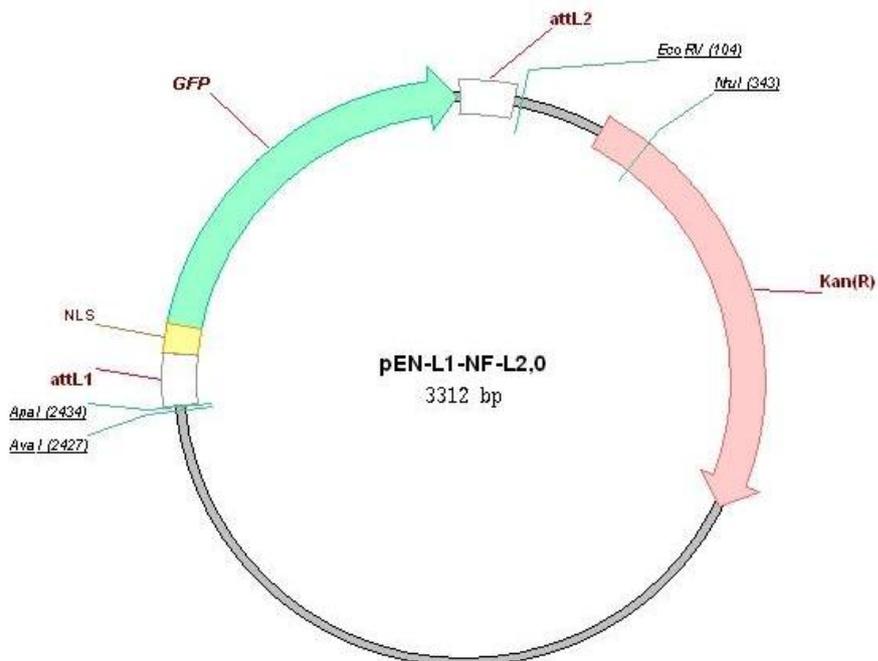
Vecteurs de transformation stable de plantes (suite)

→ pXK7S*NF2 (Gateway™)

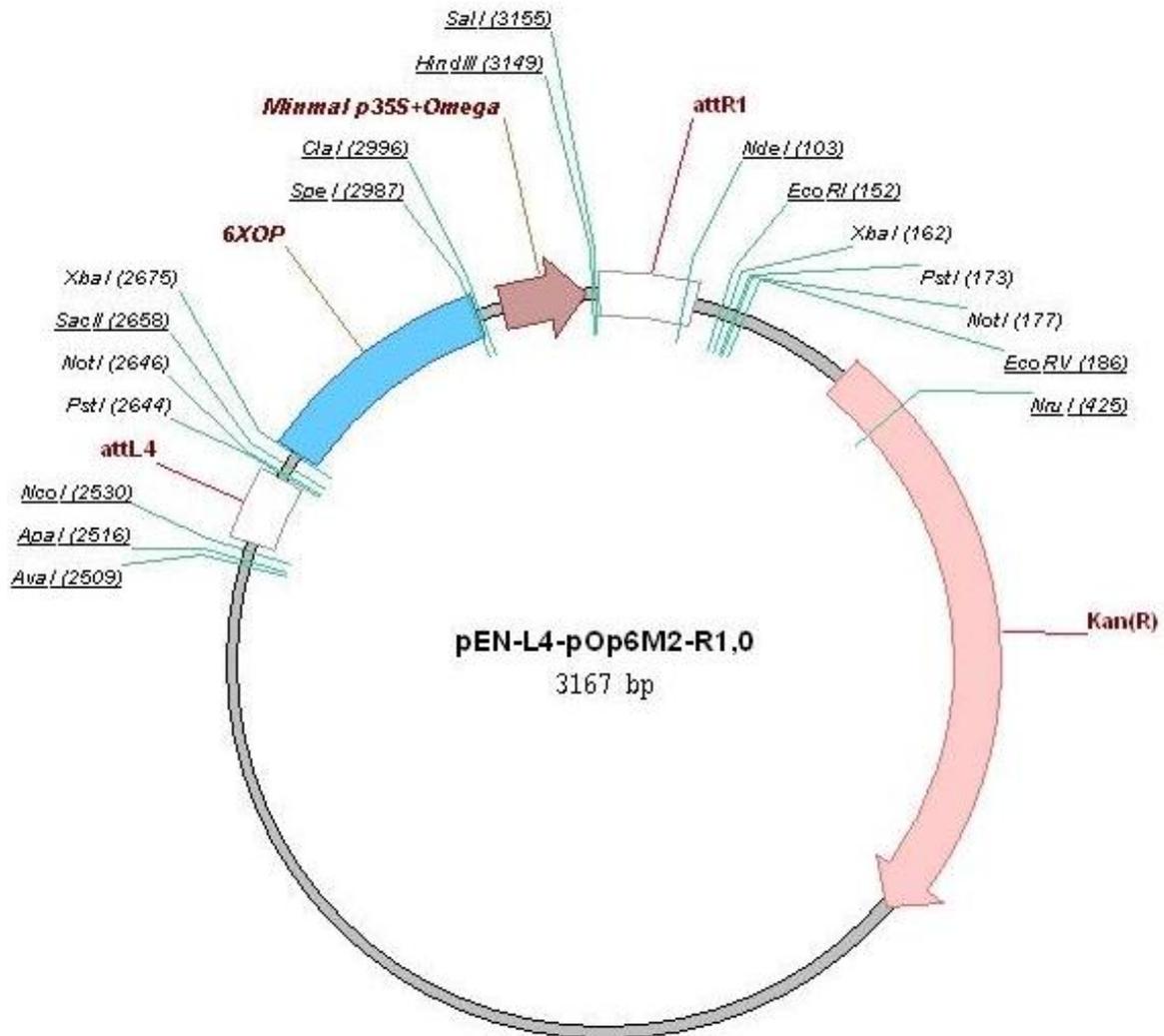
Vecteurs intermédiaires (Gateway™)

→ pENL4-2-R1 (Gateway™)→ pENR2-3xHA-L3 (Gateway™)

Vecteurs intermédiaires (Gateway™) suite

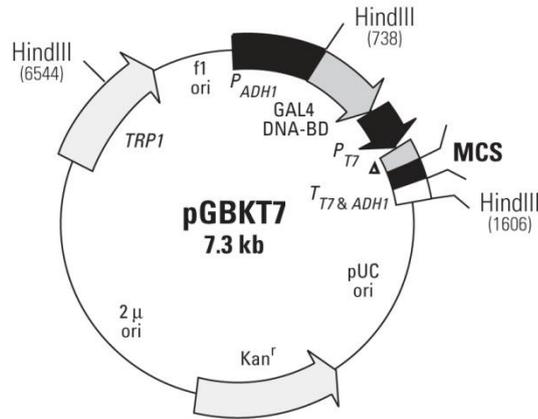
→ **pEN-R2-SI*-L3 (Gateway™)**→ **pEN-L1-NF-L2 (Gateway™)**

Vecteurs intermédiaires (Gateway™) suite

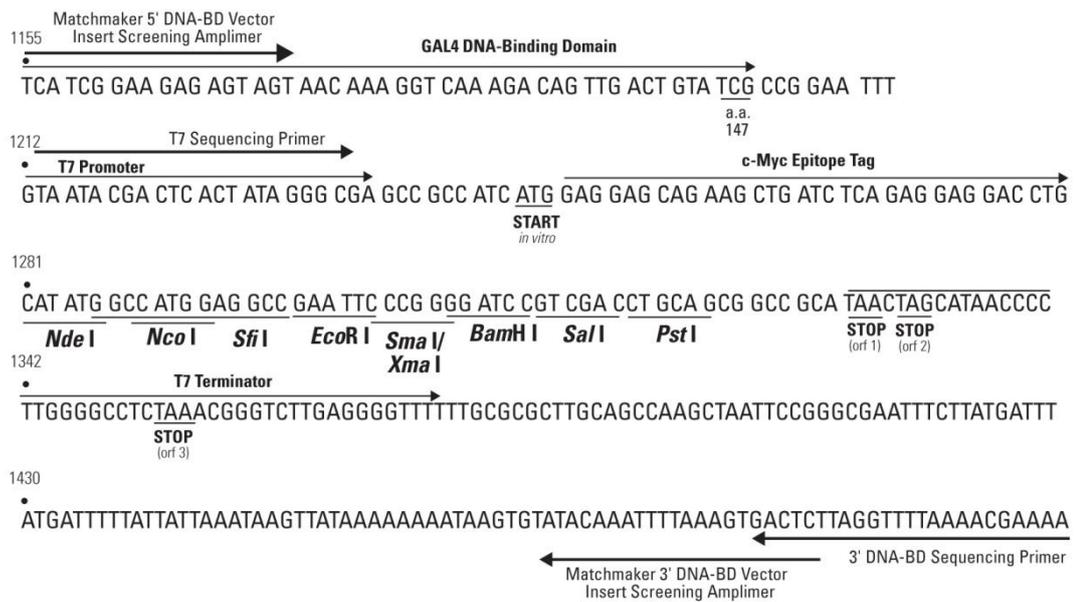
→ pEN-L4-pOp6M2-R1 (Gateway™)

Vecteurs de transformation des levures

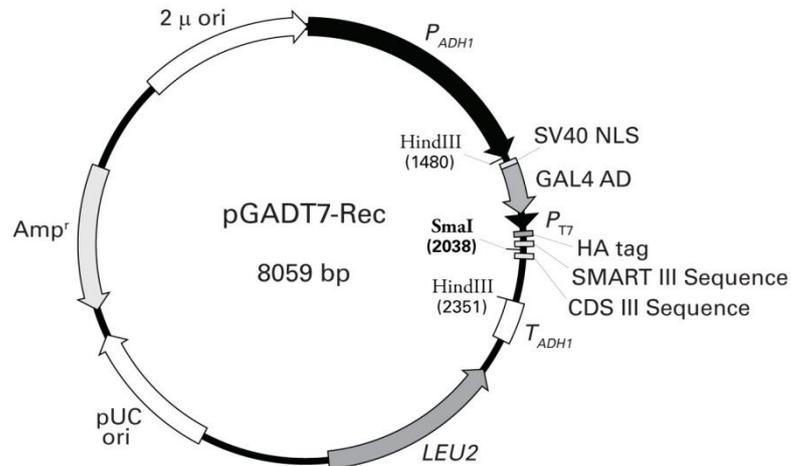
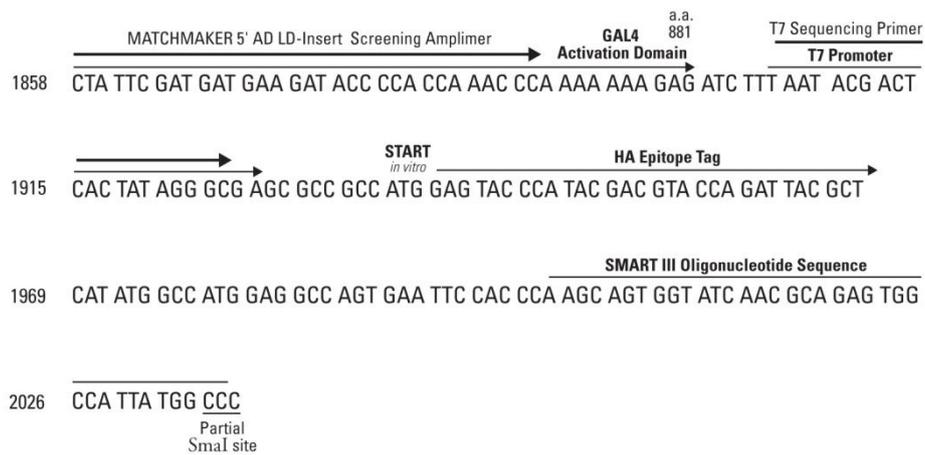
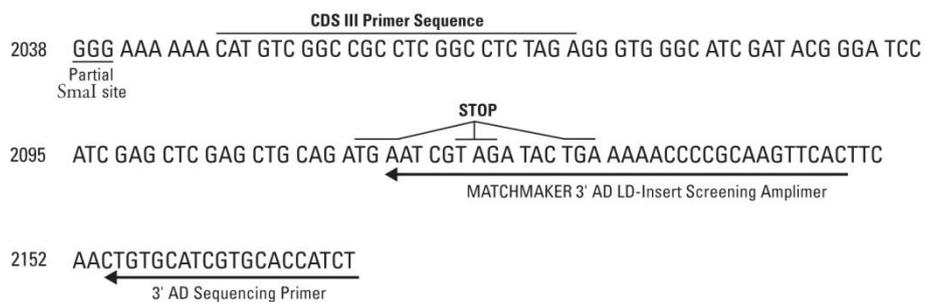
→ **pGBKT7**



Δ c-Myc epitope tag



Vecteurs de transformation des levures (suite)

→ **pGADT7-Rec****SMART™ III terminus****CDS III terminus**

Amorces utilisées

Gene	Sens (5'-3')	Antisens (5'-3')	Application
<i>VvSREBP</i>	ATGGCTGCAACGAGAAAGGAT GTGG	CTACTCGATCTTGCTGAT GCCGATG	Clonage classique
<i>VvSREBP</i>	GCTGTTAGCTGTGATGCAAGAG	GCAAGCATAACCCATTCT GT	PCR semi- quantitative
<i>VvATB2</i>	TAGAATTCCCCGGGATGGCTTC CTCCAGTGGCACATCTTCAGGG	ATGGATCCCCCGGGCTAG CGCCCGCAGTACTGAAAG ATATC	Clonage classique
<i>VvATB2</i>	CAGACTGCAGTATCTGGTTGAG	GTTTCATGAGGCTGTCAGA AGTG	PCR semi- quantitative
<i>VvAP2- ERF</i>	TACTCGAGCCCGGGATGAAAG CACTTGAACCTTTTATGA	TCTAGACCCGGGCTAGCG GCCGCAGATGGATGCCCA ATCAATCTCCACAGA	Clonage classique
<i>VvAP2- ERF</i>	GGTGGAGATCTCATCATCATCG	ACTTCTCCAACGTCAAGC ACTC	PCR semi- quantitative
<i>Promoteur VvCEB1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAA AGCAGGCTCGTATCTAGATATA TT	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTCATGGAT CCGTGATGG	Clonage Gateway™
<i>VvbHLH- XP0022844 54</i>	GAGGAAGGGAACACCACCACT TG	AGCCTATCCACCACTGAC GAAGAG	PCR quantitative
<i>VvbHLH- GSVIVT010 23783001</i>	CCCGTCAACTCTGCCTCTG	ACTCATCCTCCGAACTCA CATC	PCR quantitative
<i>VvbHLH- GSVIVT010 33350001</i>	TTGGCGAGGAAATTCAAAGACT G	TGTGTCAGATTCCTGCGA GTG	PCR quantitative
<i>VvbHLH- GSVIVT010 20121001</i>	TGCTGCTGGTGTGGCATATAGT TC	CGGTCAAACCACCA ACCTG	PCR quantitative
<i>VvDELLA1</i>	ATCCCACCTGTGAAAACATAAT	CCATCGTCCCACATCTTC	PCR quantitative
<i>VvDELLA2</i>	TTCATGTGGAGTTCGAATACAG	CGACAGCACCTCTCAAT	PCR quantitative
<i>VvDELLA3</i>	TGGCTAAGTGGAGGAATCG	CAGCCTAGCGTCAAACAC	PCR quantitative
<i>VvGWD</i>	ACCATCTACGCAAGCAATT	AACTGAGGAAACACCACA AA	PCR quantitative
<i>SlbHLH1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAA AGCAGGCTCGATGGCTGCTTTT TC	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTCATGGAA AGAACAAAA	Clonage Gateway™
<i>SlbHLH1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAA AGCAGGCTCGTCTTGTATAGTA CA	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTCATAGA AGACCC	Clonage Gateway™

<i>SibHLH1</i>	CTATGACTTTGGAATGGACTTGA GA	GCTGCCTGTGATGTAGTAG G	PCR quantitative
<i>SIIAA3</i>	GATCATAACAGGAAAAATCATG TGT	TCCTTCTCTTTCTGAATAC ACTC	PCR quantitative
<i>SIIAA7</i>	ACTCAACCTCCATCATAATGAT AATATTCC	ACCCACCACTTGAGCCT TA	PCR quantitative
<i>SIIAA9</i>	CCCCTTGCACCCTTCCA	AGCGTCTGAAAATCCTCG TTTG	PCR quantitative
<i>SIPIN1</i>	GGGCTTTGAAGCTGATGATG	TTGTTCCCAACAATTGAC CA	PCR quantitative
<i>SIPIN2</i>	CAGTGCTGCCTGCAGTTAAA	TTCCACCAACGAACAGAA CC	PCR quantitative
<i>SIARF6</i>	CCAACATATCCCTAGTACTTCA G	GTGCCTGAGATATTAGTT GGT	PCR quantitative
<i>SIARF9</i>	CGTAGGCGTCAACAAATACTTA GAGG	TCCACTGTGAAGAAAGAT CATCAATTCC	PCR quantitative
<i>SIGH3</i>	TGTGACATAGTCCAGTAACAA TAACATCG	TTGAAATGGAATGTAGTA AAGAGTCATGGAAAGG	PCR quantitative
<i>SIEXPA11</i>	CTCTGCTTCTGGATGGATGA	GTAACATTGACCACATGA TGCT	PCR quantitative
<i>SIXET2</i>	CTGCCACGCCACAAGAAGTCC	TTTGACGAACCCAACGAA GTCTCC	PCR quantitative

Milieux de culture et de réaction

Tableau 1. Composition du milieu de culture pour plants de tabac *Nicotiana tabacum* cv petit Havana SR1

Milieu Murashige et Skoog (MS medium including vitamins, Duchefa)	4,4 g/L
Saccharose	30 g/L
Phytoagar (KALYS)	7,5 g/L
pH	5,7

Tableau 2. Composition du milieu de germination des graines de tomate *Solanum lycopersicum* cv. West Virginia 106 (WVA106)

Milieu Murashige et Skoog (MS medium including Nitsch vitamins, Duchefa)	1,1 g/L
Saccharose	7,5 g/L
Phytoagar (KALYS)	7,5 g/L
pH	5,8

Milieux de culture et de réaction (suite)

Tableau 3. Composition du milieu de culture des plantules de tomate *Solanum lycopersicum* cv. West Virginia 106 (WVA106)

Milieu Murashige et Skoog (MS medium including Nitsch vitamins, Duchefa)	4,4 g/L
Saccharose	30 g/L
Phytoagar (KALYS)	7,5 g/L
pH	5,7

Tableau 4. Composition du milieu de culture des suspensions cellulaires d'*Arabidopsis thaliana*

Milieu Gamborg B5 (Duchefa)	3,2 g/L
Saccharose	58 mM
Acide naphthalène acétique (ANA)	2,68 mM
pH	5,8

Milieux de culture et de réaction (suite)

Tableau 5. Composition du milieu de culture des suspensions cellulaires CSB

Milieu Murashige et Skoog (MS basal salt medium, Duchefa)	4,3 g/L
Saccharose	20 g/L
Caséine	0,25 g/L
Hormones	
Acide naphthalène acétique (ANA)	ANA 0,46 mg/L
6-benzyl amino purine (BAP)	BAP 120 mg/L
Vitamines 200 X (additionnées après autoclavage)	5 mL/L
20 g/L Myoinositol;	
0,2 g/L Acide Nicotinique;	
0,2 g/L Calcium D Panthoténat;	
2 mg/L Biotine;	
0,2 g/L Pyridoxine HCl;	
0,2 g/L Thiamine HCl	
pH	5,8

Milieux de culture et de réaction (suite)

Tableau 6. Composition du milieu de culture des suspensions cellulaires 41B de vigne

Glycérol	4,6 g/L
Maltose	18 g/L
N-Z-Amine A	1 g/L
Milieu MS ½ Macro	0,8 g/L
Biotine	0,05 mg/L
Thiamine	0,5 mg/L
Pyidoxine Hydrochloride	0,5 mg/L
Acide nicotinique	5 mg/L
Myoinositol	100 mg/L

Tableau 7. Composition du milieu de culture (LB) des souches bactériennes *Escherichia Coli* XL1-Blue et TOP10

Bactotryptone	10 g/L
Extrait de levures	5 g/L
NaCl	5 g/L
pH	7
Antibiotique de sélection (après autoclavage)	Selon la résistance portée par le plasmide intégré dans les bactéries

Milieux de culture et de réaction (suite)

Tableau 8. Composition du milieu de culture (YEB) des souches bactériennes *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 et EHA105

Extrait de bœuf	5 g/L
Extrait de levures	1 g/L
Peptone	5 g/L
Saccharose	5 g/L
MgSO ₄	5 mM
pH	7,2 pour la multiplication des bactéries 5,6 lors de l'étape de transformation
Antibiotique de sélection (après autoclavage)	Rifampicine (100 mg/L) + antibiotique choisit selon la résistance portée par le plasmide intégré dans les bactéries

Tableau 9. Composition du milieu (YPDA) de culture des souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* Y187 et AH109

Peptone	20 g/L
Extrait de levures	10g/L
Adénine hémisulfate	0,003 % (p/v)
D(+)-glucose (après autoclavage)	2 % (p/v)
pH	6,5

Milieux de culture et de réaction (suite)

Tableau 10. Composition du milieu minimum (SD) de culture des souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* Y187 et AH109

Yeast nitrogen base without aminoacids	6,7 g/L
DO (Dropout) mix 10X (après autoclavage)	100 mL/L
D(+)-glucose (après autoclavage)	2 % (p/v)
pH	5,8

Tableau 11. Composition de la solution d'acides aminés DO (Dropout) 10 X à additionner au milieu minimum (SD) de culture des souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* Y187 et AH109

L-Adénine hémissulfate	200 mg/L
L-Arginine HCl	200 mg/L
L-Histidine HCl monohydrate	200 mg/L
L-Isoleucine	300 mg/L
L-Leucine	1000 mg/L
L-Lysine HCl	300 mg/L
L-Méthionine	200 mg/L
L-Phénylalanine	500 mg/L
L-Thréonine	2000 mg/L
L-Tryptophane	200 mg/L
L-Tyrosine	300 mg/L
L-Uracil	200 mg/L
L-Valine	1500 mg/L

Milieux de culture et de réaction (suite)

Tableau 12. Composition du mélange réactionnel pour la réaction de PCR sur colonies bactériennes

Yellow buffer 10X (Tris-HCl 50 mM pH 8, BSA 0,5 mg/mL, Ficoll 0,5%, Saccharose 1%, KCl 30 mM, MgCl ₂ 3 mM, Tartrazine 1 mM)	2,5 µL
dNTPs (10 mM)	0,5 µL
Amorce sens (10 µM)	0,5 µL
Amorce antisens (10 µM)	0,5 µL
ADN matriciel	Une « pointe » de la colonie bactérienne
Yellow Taq pol (5 U/ µL) 0,5 µL	0,5 µL
H₂O	20,5 µL

Tableau 13. Composition du milieu de culture (SOB) des souches bactériennes *Escherichia Coli* XL1-Blue et TOP10

Bactotryptone	20 g/L
Extrait de levures	5 g/L
NaCl	0,5 g/L
KCl	2,5 mM
pH	7,2
MgSO ₄ (après autoclavage)	20 mM
MgCl ₂ (après autoclavage)	20 mM
Antibiotique de sélection (après autoclavage)	Selon la résistance portée par le plasmide intégré dans les bactéries

Milieux de culture et de réaction (suite)

Tableau 14. Composition des milieux utilisés lors de la purification et de la transformation des protoplastes d'*Arabidopsis thaliana*

B5 S	Gamborg B5 3,16 g/L pH 5,8 Saccharose 96 g/L pH 5,5
B5 GM	Gamborg B5 3,16 g/L pH 5,8 Mannitol 30,5 g/L Saccharose 30,5 g/L pH 5,5
PEG	25% PEG 6000, Mannitol 0,45 M, Ca(NO ₃) ₂ 0,1 M pH 9

Milieux de culture et de réaction (suite)

Tableau 15. Réactions de transformation de la souche de levure AH109

	Banque d'ADNc
pGADT7-rec	3 µg
Banque d'ADNc	20 µL
ADN de sperme de hareng dénaturé (Carrier DNA, 10 mg/mL)	20 µL
Cellules compétentes AH109	600 µL
Solution de PEG/LiAc	2,5 mL
DMSO	160 µL
Centrifugation	700 g/ 5 min
YPD Plus	3 mL
NaCl	30 mL
Milieu selectif	SD-Leu
Efficacité de transformation attendue	$\geq 1 \times 10^6$ transformants / 3 µg pGADT7-Rec

Milieux de culture et de réaction (suite)**Tableau 16.** Réaction de transformation de la souche de levure Y187

	Transformation avec la protéine appât
pGBKT7-gène <i>d'intérêt</i>	250 ng
ADN de sperme de hareng dénaturé (Carrier DNA, 10 mg/mL)	5 µL
Cellules compétentes Y187	50 µL
Solution de PEG/LiAc	500 µL
DMSO	20 µL
Centrifugation	13000 rpm/15 s
YPD plus	1 mL
NaCl	1 mL
Milieu selectif	SD-Trp

Annexe 8. Séquences ADN des sondes correspondantes aux gènes induits et réprimés plus de 2 fois dans l'expérience microarray sur les cellules embryogènes de Vigne (41B) surexprimant *VvCEB1*.

Vv_10006996 CB919876	ATTGGTTTTAAAGACGGTGGTACAAAGGAATAC ATAGAAGGAAATACCTTCAAGACACTTGTTCC GACC
Vv_10010496 TC62705	GTCTTGGTGCAAAACATACAAGGATGGCAAGC TGCCCAAAGGTACTTTCTTGAAACAGTTACGAA CCATT
Vv_10011235 CD008579	AGCCACATCATCTGTGGTGTTTTTATGTTTTG GTAGCGCTGGAGCATTCCACATGGATCAAATC AACGA
Vv_10014434 TC62705	AAACATACAAGGATGGCAAGCTGCCCAAAGGT ACTTTCTTGAAACAGTTACGAACCATTGTGGGG GATGA
Vv_10013024 CA818675	CTCAGTTCGGTTGGGGGTATGAGGAAGGAAG TATTCTAAACCTTTTTCTAAACCTTTTTGGTATT GCA
Vv_10012306 TC70979	AATTACTACTTGGGGTCCACTGAAGCAACA ACAAGCCAGCAGCTATTTGATGCAGATTTTCATG ATAT
Vv_10010936 CB009672	CACCTCTCCAGTGTTGTTTCTCAGGTATTTATG ATCATATTTTTGCTGAAACTTCAAATTTGGGA AAC
Vv_10006114 CB342343	CTCCCGGAAATGTTCCAAAATATCTGCCGCT GCTCCCAACCTTTCTCCCCTTGTTCCCGCCT TCGC
Vv_10000122	CTTGCGTGGAGCTCAACATGCCGGTGAAAAAG CAGGAAAGCTTTGTTGTGTGTGTGTCTTGTA AAAAA
Vv_10012011 TC64418	GCATAAGTTCAAGACGAGTTTTCAACAGGGAG GCCAGATGTTCAACTTTTTCCCAAAGGAGTCC CTATT
Vv_10013406 TC53577	GCTTAGCTTTTCGCTGGTCTTGCCAGTATGCTT CAACTAAGCTTTATACCCCTTTTCAGTAACTTT TGG
Vv_10008748 TC52194	CAATTTGCAGAAATATCCCTCTAACGAGATCGA TTGGGCAGCTATTTTCATCCCAATGGCCATGATG TTAT
Vv_10003330 TC56392	GCAGGAAAAAAGTCCCTCAAAGATGAATCACA CACCACCCATCTAACGGAAACTTGACTCTTCTC CCAT
Vv_10013879 TC67231	GACTTCATCAAATCAAGATTGAAGGAGAGAGG GGGCTCAAATTCTTGAAAAGATGGGGTTTTAGG AGTAA
Vv_10008966 TC53577	GTGTTTTAGCTTAGCTTTTCGCTGGTCTTGCCA GTATGCTTCAACTAAGCTTTATACCCCTTTCA GTAA
Vv_10010907 TC66566	GGAAATGAAGATGTACCTTATGAAGGTTATGAC CAGAACAATTCTCTAAGAAATCCAAAACAATTCT GAG
Vv_10013601 TC68081	ATCAACGAGGGAGAAGACAAAACGAGGACCAA ACAAATATGGACAAAGAAGGTGAAGTAACCTTT GGAAG
Vv_10012991 TC65247	TTTATAAACACCCGACCCACTCAAGGAGACATA AAACAAGAATGTGATACCCAACCTGGCTTTACTT CTAT
Vv_10011499	AGAAAGTGAAAGACCAGATGTCTCTGCATGTG

TC61515	CACTGCCACATAAGTGGAGGCCATTTCTTCTA GATTT
Vv_10007437 CB978247	TTGCAAGAAATTCAAAGCTGAACCCAGATGCC AGAAGCTTATTTTAGCTCTACTTCTGAACCAT CAT
Vv_10000432 TC56249	CGAAGCCTTCCACCTTCGTACACTCTTCCGT TCTCGGCAGCGAGGAGGCTGCCAAGAAGGCT CTCATA
Vv_10000945 TC62494	ATCCGCTTAACAGTAGATTACAGCAAGAAACCT ATGACAATTGACCCAATCTTTCGCAGGCAGCTT GGTC
Vv_10012586	TGAACGCAGCGGTGTTCCATCAAGATTCATGT TCTATAGAGATGGTTCCTGGGTTGATTTCCAA ACCA
Vv_10014525 TC64558	TGGATCATCAAAAGTAGCAGTAGGAGAAATCAG CAAGTACAGCCATAGAAACAGGGTGTGCACT GTGTG
Vv_10012906 TC63394	GCCCATCTATCCACCGAAGTGGCAGTCGGTAT CCATGATCAATTGATGTTGTTTGTACTTGAAC TTAA
Vv_10005630	TTCCTTATCCGGGTCCATCCGATTTGTTACCT TCCTGAACCCGACTCAGATCCATCCAATTCTAA CCCA
Vv_10011367	CGAGGCCACTTTCTCTTTTTCTAGTTTTCTG ATCAGGCAAATTAAGAAGGGTTAAAAATGGTGT TCTC
Vv_10000089 TC55331	TATGTTGGTTGAGTGTTGTGGATAGAATAGCTA TACTCCTCTAAGTCCAGGATGATGTCGGCCGC CTCGG
Vv_10001607 TC68186	ATGGTCATTACGACGAAGAAAAAATTGAAGATA GCGGTCACGCATGCCCCGACGATGGACCGAT GGCCGA
Vv_10011568 TC64392	GGTTGTGTGCAAGACTTGTGTAAAGTTTTGGAT AATGGGTAGCTGCAGTTTTGTTGGGATTTTCATG TTTC
Vv_10010855	GAATATTGAGTGTTACTTGCAGTGCTATCTACA ATTCAGATTTCTTGATCTATTTATATTTTGACC ACC
Vv_10005507 CA808131	TCTTCTCCTTCTCAGTCTCCTTATGACTTGTCTA ATAAATCGGAATTGCCCAAACCGGTTGAGCCAA GCC
Vv_10000425 TC62965	GCCCTGATCATTTAAATTTGCATTTGTCAATGTG GCCTTGTAGGGGTAGGGGTACCCTATTCAGAG ACCC
Vv_10001454 TC67368	TCCCTTGTTGAACATTTGCTACAGAAGAAAGAC TTCTTCGAAGGGATAGTCTCCCGAACTCCCCTT GGGC
Vv_10011466 TC62494	ACGCTGGCATTTCGCAAATTTAGTGAGGAGCT GTTGGTACTTGGTGCAGGACCTGCTGATGGAG AGGTTA
Vv_10004770	TCCTTCGGGAACAGGGCAACCCTGGAGACTAC TGTGTTGCCAATCAACAATGGCCATGCGCTTCT GGTAA
Vv_10008701 TC55088	TCTCTCTGAACCGGCTCTCAGGTCAAATACCG GCATCACTGGGCAAATGGCTGTTCTCTCAACA CTAAA
Vv_10007413	CAATCAATCTCGGGGTGAACCTCATGGGCTTTAA CAGAAGCTGGGTCTCAAGACTCTCCTGGTCA GCAAC

Vv_10000081 TC59175	CGACTTTCTGGGCTATCTTTCAAGTGTGCGACT AAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATGCTAGA AAAT
Vv_10001290 TC65383	GCTTGTGGCTTGCATATCTCAGGAGCTGCATTA TCCAAGTTTAGATCCTTGTGGATTGAAGGGA GCTC
Vv_10006351 CB346558	GATCTACTACTACAAAGGAGGATGGGGCGGGT GAGGAGATCCAAGGAAGAGGATCTGATCGAAT AGACAC
Vv_10012330	TATACCGTCCTCTTCCTTTAATACAAGAGGAAA CCGTGTTTTTAACAAATCAAGGATCCAAGCCTT CCAA
Vv_10004196 TC56475	GCTCGAGGATTTGAAGAGCTATATGAATTGGG CCGGGTTTTCTGCAACTGAGGAAGATATCAAG GCCATG
Vv_10005900 CB006476	TATTTTCAGTGCATACATTGTTCCCATACATTGTT CACTGCATCAGCGTTGCTAGGCAAACACGTAT CCTA
Vv_10000483 TC53320	CGCCAACATACATCGGAAGCTACTCAGGCGATG TGAAGACTGAATTCAGTGGGGTCTTTACCATG AGATG
Vv_10014343 TC52637	TCTTTTTACTCATGAGATCAAAGATCTTGTGATA AATGAGATACGAAAAGACCCAGCTCCATCTCCC GAC
Vv_10003056 TC57339	ACTCAGAAAGGAGCAATACCAGCACTCCCAAC CAATTCAGATGCACTTGACCTTGTTAACAATC CAAGG
Vv_10006834 CB916093	CGTGAGGTCAAATCTAACTAGTCTTGAAAATC TGGCCGATATCTGAACCAGCAAGCCCGGGTCT TACAC
Vv_10011523 TC69549	CCAAGGAGTCACTTCAACAAACTGCAGGTA AAA TGGTACACTGGGGAGATCATATTGTCCCAAAT TGAG
Vv_10008745 TC62793	TTTCGATAACAAGTACTACGTCGATCTGGTGCA CCGACAGGGCCTGTTCACTTCAGACCAAGACT TGAC
Vv_10011523 TC69549	GCATAGAGACCATGGCCTTCTTCAAGATATTGT GCCCTCCCATATGAGAAAGGAAGAGGAGATAT GACGA
Vv_10012564 TC52576	AGCAGATGGAGAGGACAAAGGCTGCCCAAGG GATCTGCAATACCACATTTGCTTGGCATGGGAC GTCGGC
Vv_10012779	GAAAGGGAGAAAGGGAGAAAGGGAGATGGGG AGACAGGGAGAAAGGGAGAAAGACGATCGGCT GGTAAAC
Vv_10000250 TC55073	GTGCTTGATAAATGCTTCTAAATCCATCTCTGG TGTGAACTTTGGTCTGGCTGCTGGCCTCCCTG GCAA
Vv_10004370 TC64623	AACATGGGGCCAATTGCAACAGCCTAA GAACAGTTCTAATTGATTGAAGGATTTA TGTTGCTTGTTTCCA
Vv_10006329	GGGGGGGGCTTAAATCAACCAGCCACCAAATA TATTACCAGGGGGGCTCCAAAATCCCTCCGGA TCCCGG
Vv_10007842 CD720811	GCAACCCTAGAAGAGTAAAGGTTGTGT GGCTCTCATACTGTCCAACATGATTCTT GCTTCCGGCAATCTC

Vv_10002206 TC62494	CTAGCTTCTTTGGGTGCAGTTTCTGATAAAGTT TACAGTGACCAAGGGGTGCCTGCTTCATTTAAG G TTC
Vv_10010223 TC60710	TCGTTTCAGCGATTGCGGGCTATTCCTAAACACT ATGGGTTTTCGGATGTGTCTAATGCATGCTGTG GAGA
Vv_10010857 TC53967	TGATTAATAACAGGAGTTACAGGGCCCTTATGA TCTATTATCATTGTTTTCTGGAGTTACAGGGCT ATT
Vv_10011675 TC68186	GACGATGGACCGATGGCCGAAGAAAAGGAAAT TGAAGCAGGAGGGATTCAAATCAGCGGTGAAT CCGATG
Vv_10006297 CB345700	GGATTGGGCCATCAACCTCATGGCGGATGTGCG TCCAGGAGGAGCATCTAAACAAAATGAACGCA CGCAAC
Vv_10000201 TC63806	AGTCACTCGTCCCTATAATACTGAAGGGAAGAT GGGAATGGCTGCTGGCTGGAGACTGGTGAGG ACTGCA
Vv_10011763 TC60921	GGGGATTTGGATATGGACATGGACAAGGCCAC TGGGGATTTGGACATCGACACGGCCACCGGG GACATGG
Vv_10003725 TC64733	GTGTGTGGATGCAGTTCAGTTGCTTCTGGCTG CTGATTGAAATAAAGAGTGGATGACATATTAGT ACCTA
Vv_10003562 TC66376	CCAATCTCTCAATTTCACTCCCAGTGAGCAGCA CCACAAATGACATCTCCCCAAGAGTGTTCTTC AACT
Vv_10002706 TC67671	AGGAGGAGATTTCTAAGCTGATCAGTATCAGGA CCAGGAACGGGATCAAACCCAACAGTGTGGTG CGTAT
Vv_10004336 TC68904	TTCTATCCAGTTGCAGTGTGCTGTAAGCCATGT TTTGATCTGGGGCATGGTGGCCCATGCCACCA TAGCT
Vv_10000233 TC62989	AGAAAACATTCCATAAAAGATGTCAAGAAAAC TGCATCCTAGTACCATGTGAGTGAATCCAGTGT CAGG
Vv_10000321 TC63415	AAACCAGCAACATTTTCTCTGACAAGAGCGGTT ACAGGGAGCTTTCCGAGATTGCAGAGCAAGCC AAACG
Vv_10013984 TC68395	GAAGCCAAGTTCTATTTTAGCTCAACCATCAAT GAAAGCAAACCAGCTTTTGATGTAGCCCAAGAT TTGA
Vv_10005088 TC68030	GTAGTTAGAGGGTAGTTACCATTACTAGAAATG TGAACAAGTCCATACAAATCTTGAGTTACCCT AACC
Vv_10000173 TC53416	ACCAGCTGAAGCAGCAGAGGAAGCCAGCACAG AGGTTCTGTGCGAGAAGATTGAGGAATAGATCT ACCTA
Vv_10002743 TC70660	TCTTCCTGCTTATTTCTTTTATATATTTATTGTG GTGGAGCTTCATTGTGCTTGCATGTGTGTGCG GGT
Vv_10009085 TC54289	ATTTGAATCGATGCAACGAATAGACAAGAGGAA AGAGGACAGCCTTTTCATCAAGCTGAAGACTGA GAAT

Vv_10001993 TC56430	AGAAGACAAACAAGAAGGTGGAAATCCAGA AATGAGTTAGAACCAACTGCTAATAGTTGGC GTCTCTGAG
Vv_10009807 TC67772	CCGACTAATCCGCAGACTCCCTGAAGTATTT GTGGGAAAGGTAGAAAGATTACACACCCTA GTAAAGATC
Vv_10011030 TC53426	GGAGTACCATAGCAACAGGTGTTGATTTCTT ATTACGCAATTCAATATTCCAATTCCGTCACT CTCTCTT
Vv_10003934 TC54874	CAC TTCGGAGAAGAGAGATGTCGACTCATT GATGGCTTTTGTGAATGCCCTTCGATGAGAG AACTAAGAA
Vv_10001074 TC53496	AGCGAAGGGAAATCTCATCAAGATCAAGGC TTCCTACAAGCTTCCGGAGTAAGAAAAGGA ACGGCAAAG
Vv_10011094 TC67588	TGTTTTGAGCTGTCAGTGGGTTTCATGGGATG TTTTATTGCTGGTATTTGTGTATGCAAATGTT CCTGCCA
Vv_10004355	AGCAATTTTCTTGAATTTTCTTGGAGACT CACGAATTACAACCAATTGCTCAGGGTTGG GAAAATTG
Vv_10001081 TC56794	GCTGCGGAGAAAGCGAGAGGGGTCAAGGA CACCACATTGGGGAAGACAGGGGAGTACAA AGATTATGCAG
Vv_10011029 TC58343	ATTCCAATTCCGTCACTCTCTTTGCGACA AACTTTCAGATAATGTCTGTGATTCCAAGCT TCTTCAGC
Vv_10004596 TC58594	GATTACAGGAACTCATCTGCAGACGGAAAG CCATTCACGGTGGCGCTTTCAGAGGCGGGT GTAGTCCACT
Vv_10000535 CF210584	GTAATGGGACTGTAAATGGATGAGAAGGATT GGTTTGATCCGTGGCCATTAATGAATTCAG TCCAGTTT
Vv_10001834	GATCAAATACCCCTCAGAGAAAAGGGATGTT GATTCGTTGACGGCTTTTGTAAACGCCTTAC AATGATGG
Vv_10000420 TC59105	CTTTCCAAGTTTGTAAAGCTACCAATTATTCT TCATGTTGAGCGTGTAGGGTTTTTGTTCAG GTCCACT
Vv_10000006 TC53184	ATAGCAAAAAGGTGTTGACTTCTCATAACCAA TTCAATATTCCAGTTCCGTCACTCTCTCCTG CGACAAGC
Vv_10013611 TC65419	GCTGGAAGCTGTTGGCGAAACCGTGCTTGA AATCGCACAGGCAACTAAAGAGCTTGTTATT GGGAAGGAT
Vv_10000533 TC57528	GGGTGTTGAGGATCACAATCCCAAGCTGG CAGAAGACAGGAAGAAGCAGGCTAAGGTTG TTAACATTGC
Vv_10011284 TC53131	TTTGTCTGGCTTTGTTTCAAGTGATCCATGG ATATGGTGGATATGGTGGATCTGGTATCTAT GAAATTA
Vv_10002473 TC70699	TTGATCGTCCTACTAGTGATGAAGACAGTGG AGGGGAGAGATTGATTTTCATGGAATTTTGT ATAAAGAC
Vv_10009389 TC65419	AGGTCTGCAATGCCAGATCAAGGAAAGCCA GAAATGTCGCCAGGGGAACTGAACATAAG AGCATTGAAG
Vv_10004524 TC57576	AACTCGAAAATATTGCCAAATCCTATGGCAA GTTTTGGTGACATGGCAAGTCGACAGAGG

	TGACAGGCT
Vv_1000477 TC68191	CTGTCTTCACTCTCTTGGATCGTCAACTACC TCCGGAAAGGCCGCGTAACGGAGCAAATGG AGCATGCAA
Vv_10010851	GGTTTTGGGAGGGTTTTTCTGAATTTTTAACT GTCAATAATGTGGTATTGTGGGTGTGTATTA AAATTCA
Vv_10011694 TC65322	GTACGTAACAGAGTTTTTGTCTTCATCCAGTT GATTATAGCCCAAACACTACAATGAAGACATTG ATATGGGC
Vv_10011245	TTCTAGTTTTGAGTATGAATGAAAGCCTCTC CTGCTCTGTTTTTCTTCTTCTTTGGTGTATCT CTCTTCA
Vv_1000918 TC60052	GATAAAGCTGTAACGCGCCAGGATGCCGAA GGAGTGATGAGTGCGGAGATGCCGAACAAC CCGAATTTGG
Vv_10006349 TC68559	GTATGCAAGATTACATACCTTGTTTGGACAA TGTGAAGGAGATCGCAAGATTGAATTCGAC GGAAAGGGG
Vv_10009398 TC67614	GTCGGCCAACCCAGATGAGAAGGATAGGA AGATTCGAGAGCTATCTTCAGAGCTGCACC GTGCAAATCA
Vv_10011056	CAAGCCTAGCTTGCAAAGATTCTTAAAGAGG GTAATGTAGTGATCTTCCAAGTTTGTTAAC TACCAAT
Vv_10004090 TC52852	ACACTCCAACCGCTGATGGGTAATCCTGGT ACCCTTTGATGCTCATATTCTGCGCTGCCAT TAACAAGAC
Vv_10001182 TC59568	AGATGTACCACCCCGACGCGTCGCCGGTGG ATTCGGACGGGCGTAACTTCATCCAGATTCA CAACGCCTA
Vv_10011290 TC63269	TTCGACCCTACTGCCGATTTCCACACATATT CTGTTCTCTGGAATCCTCAGCGCATTATCTT CTCTGTGG
Vv_10001645 TC65322	TTGCTGCATATACAAGTGAATAACGGTAGA GGAGGTAGAGAGGTTTATCAGTTCAGTTCTC AATGGGGA
Vv_10000012 TC55826	GGGAATGTTTTTCTGGGTTTTTAATAGCAA CAATATGGTAATGTGGGTGTGCCCAGGTGG GCTTTGTTT
Vv_10010670	TCTACATTGCAATAGCAGTTGTCACAATCT CACACCAACAAATCTCTGACACCCAACATGG ATTTGAGG
Vv_10008836 TC54339	AATACCGGTGACACCCCATGGTGAACCTT TGAATTGAAAATGCGTGGGCAAGGAACAATT GCTTGAAGT
Vv_10008452 CF216188	GAACAAGGGATTGTTCTTTTCTATGAAGAT GGTCACCAAGAATGCTGCAGAATACGTAAG GTGAGGCCT
Vv_10007663 CD012124	GAACAAGTGGCCATGACAAGCAGTGGTTCCG AAGAAAAGAGGTCTATCAGGAAAGGAATATG GGCTTTGCT
Vv_10011095 TC65605	GAAGAAGCCGGAGGTCAAGGCGATCGAGAT ATCTGGTTAAGTAGATGTTTTCAAATTTAGCT ACTGCAGG
Vv_10011065 TC65411	GACCGGTCCATTTCTTTGCAGAGTGAAATT TATGATATGGTACAGAGCTGTTGGTGAAGCT GGGAGAGT
Vv_10004254	GCTACGAAATGCCCGGATTGACCAAAGAGG

TC58803	ATGTGAAGATCTCAGTTGAAGATGGGATCTT ATCCATAAG
Vv_10006544 CB349906	CCTTCGCCGGGTGAGGCTGCCGGAGAATGC TAGAGATGGATCAAGAGAAGGCTACTATGG AGAACGGCGT
Vv_10011021 CF212592	TCTTCTACCTCCACCAAGATCGATATGGTAT TCACAGGAGCTAGATTCCACAAGCCAAGAG AGAATGACA
Vv_10001895 TC62658	TCTTTGTTTCAGTGTTGAGTGTTGTAAGCTA GTGGGTGTCTGTAATTGCATGTAATTGTGC AGCGGCTG
Vv_10008539 TC53421	AACACATGGGTCTTCTCCCAGCTCCAAGACT GCTAAGGTTAATGGCAAGATCTCCAAGTTCCG CATAATC
Vv_10002082 TC57568	GCCTACTGAAGAAGGGTGCAGTATCGAGTG GAGGTATGAAGTTGAGCCAGTGAGGGGCTG GACACTGGGG
Vv_10000709 TC60072	AGCGCCACCACCCCGTTACTGTGCTGCAT CACCATGAACAGCATGAGAAGAAGGGCATG TTGGAGAAGA
Vv_10004016 TC58191	CTTTTTCCTTAGCAACTGGCTTTTCATGGTTTT CATGTGATTATAGGTAATCTTTTCTCGATCAT ATGTGG
Vv_10004261 TC56548	CAACCCTCAACCGGAGATCACAATGATGAC CCACACTCAGTTTAAATGCGTCACAATCTGG GTTTTGAGA
Vv_10011068	AGGTGTGGCTTATTGTGATTTGACCTTTTTT TGTTTTTTCCTTCTTTTACCCTTTGAGTGGTT TGGTTT
Vv_10000595 CD013793	GGTGAATCCAGAGGAACTCAAGTTCTACTA CGACGGGCAAGGGTTCATGTCAGTGCAGAT TACTGCATC
Vv_10004112 TC61617	ATCTACTTACTGAAAATGCCGAAATAGCCAT CTCAGAAGCTGCTTGTATGTGCAGGTCAGA AGTTTGCA
Vv_10014202 TC61486	TGATATGGAGCTGTGTGAGATATATAGGGTG TCCTATTAATGCATCACCTTTGAGTTATGGT GTCATGT
Vv_10004977 TC53068	CAGCCAACCTTGGTGAGAGACCTTTCCCAT CAAAGATTGGAATAATGGATTCTCTCCCAAT GGCCATGGC
Vv_10001082 TC67485	CCATCTTATGTTTGCCTCTTGGTTGTGTGC AATAATTTTGGTGTGGGTACAGCCCACCAA CATTCCA
Vv_10010699	ATTCTTCGCGTTTCGTTGACCGATGAGTGAG TGGGTTTTGTGAGATAGAGTCTTCCATGTGA TGTTTTGA
Vv_10003680 TC54041	CGAGATCTCTGGCTAAAGCCTTGAGTTGAAT TCTAGTTTTGGTGTCTGCGTTTTCGGTGGG TTCATCAA
Vv_10013618 TC65453	CTTCAGATCGGCACATTCCAGCTCAAGTACC TTGATGATGAAGAAGAGTGGGTGATGCTGG TAAATGACG
Vv_10010396 DT020438	ACGGGTTCCGGTGGTTAAGATTCATGTAATTG AATTTACCGCTCTTTGGCCATAGTATTGCC GTTTTTGT
Vv_10001639 TC55755	GATACTGCCAACAGTGTCCGGAAAAGGTTT AGTGGCCGGCGGAGCTGGGTACGCCGCT TCACTTTACTT

Vv_10001031 TC61146	GTCTCTTTGGCTTATTCACTCTACAGGAACG GCCACAATGGTTAGAGATAAAATCGGTCAAT GAGCTGAA
Vv_10004151 TC60131	AGCTTCAAGTGAGAATTTTACAAGCATGAGC AGGGAATTCATGCACTACTGAATATGGCAG GGTCCGGCT
Vv_10004184 TC53058	AACTTTGAGCATTCTCTGAAGTTCAGGTAAT CTCCGGAGAGAGATCGGGCGGAGAAATGC GGCTGATAGG
Vv_10002250 TC62106	TGACAAGTCATTGGATTACAAGAAGACGAG GATGATGGCGAATGATTACAGCAGTGTTTTG CCGGGGGAG
Vv_10010771 TC51935	TGTTTCCTGAGAATTCTCACTAGAAAGTAGG AATTAGGGAGACATGGGTCTAGTAGGTAAG CTTGAGGCT
Vv_10000023 TC68108	TGTAGGGGGTTTTGGGAGGGTATTTCTGGG TTTTTAATAGTAAATAATGCCACAGGAGCCT TTGTTTGGG
Vv_10009046 TC58513	GTGAAGAGGAAGGCGAAGGCGAGAGCCATT CAGCCGTTGGAGGAAATTCAGAGGAGAGA GAAGTGGAGA
Vv_10001760 TC54002	GTGGAGCCATGTAAGGAGGAACGGACTCGA GATACCTGAGTTTGTATTGGATCACGATGAG GAACTGGAA
Vv_10000038 TC63760	CAAGGTGGTCAGCATTGCTGGAGGAGATGA GGAAGAGAACCCCAAGCTCAAAAGTGAAAC CTCCAAACAG
Vv_10005702 CA815595	GACATGCACCAACTAGTGGGCATGTGTCTC AAAATTTAAGCATTGCACAGAACAAAGTTGA AGTCAGTTC
Vv_10010681 TC57491	TGCTCCAAGGTGACTTGAAGCAAAGGTGG AGTAGGATGAGCTATGGTAGCAACTAGCATA AGAATAAAG
Vv_10000020 TC54356	GTTTTGGGAGGGTTTTTTAATAGTAAATAAT GTGGTAATGTTGCTGTGCCACAGGGGTCTTT TGTTTGAG
Vv_10013694 CB913831	GAAATAGGAAGTAGTACTCAATGATAGAAGC GTTGCATCTCACTTTACACCGTAAACTTGCT GTCTCAA
Vv_10003816 TC56005	TGGAGGAGAATGCGAAACTGATGTGTCTGA TGACGAAGCTCTTTGAGAAGAACGAAGCGC AGACTCGGCT
Vv_10002842 TC69356	TGGCGAAGTTCCTATCAGAATGAGAACAATG GGAATAGCACTCTACTCTAGTGTCTTTGGAG TTGGGAGC
Vv_10006606 TC68139	GACTTGCTGCTGACCATTCTGGGCTACATTC CAGGAATCCTATATGCGCTCTATGTGCTGGT TGCTTTAT
Vv_10000811 TC59168	GGAGAGAGGCCATAGGCAACGTCCTAGGAA TGGACTACGAATATCTGACGTTCTCGGAGGT AGTGGAGGC
Vv_10011576 TC66600	ACCAGTTCAAAGAAGAATTCAAAGCCCACA AGCCAGAGCTCTAGGAGCATAGAATGGACA CCATTGTGG
Vv_10001274 TC54643	CAGCCAGTGAATTCCTTCCCATGATCGACGA GGTTTACAAAGCATTGTTGGAGAAAACCAAG TCCATCCC
Vv_10010251 TC53410	TGGTCATTTTCTTGCTGCATATCTTCAGGGG ATTCATGTAAGTAAATTTGCAGTTGGGTTTTG

	GTCCAATT
Vv_10006661 TC70104	GAGGGGGCGGCGCGTAACTTGAGAGTTGAT CGATCCACGCAAGTCGATATAGTGTAGTATG ATGTGAAAA
Vv_10006277 CB345250	CACCCAACCCCTTCCTCAAATGCTTCCACTT GAACTAATCTCCTTTTGTGATGTTAAAGGTTT CGATTCT
Vv_10001789 TC70541	CGATGGGAAACGAACTCAATGGTGGACAGA GGTTCACGTGTCCATGTGTATGGGACCAGC AGTTAGTGCA
Vv_10011262 TC66916	ACGGGGTCCCTTAGTTTTTCTTGAGTTTGT TTTTGCTTGTGGAGAGCCTGGATTACTTGT AAGATGTC
Vv_10009642 TC70494	TTAAGTAAAGCTTGTGACATAAGACGTAGTA CACCATGCTTGAGCCGTTGTGGTTTGTGCAT GGACAATA
Vv_10011134 TC65864	AAGATCAAAATCCAGAAAAAGAGAAATTAA GTTCTGTGGAAAGGGACGAGATGTCTACTT CGTTCGGAG
Vv_10006714 CB913302	GTTATACGAGTACGTAGCCGGAAAAACCCC GCCGGGGCGGATCAGCTGGACTACGCTA GGATGAGGATA
Vv_10005038 TC61814	GAAGCCCTGGTGAAGAGCACAGGAAAAGAA TCTCTTCAATGGGGACTAGCAGCAGGAATG TATTCAGGTC
Vv_10013131 TC57973	AGACAAAGACTGGAATGACATCTGCTGCTG AAAATATCACAGAGAGCCTTCGCCGAACTC GCCAGCTTAT
Vv_10003986 TC68149	CATCGTTGGCCCTGACAAGAAGATTAAGCT GAGCTTTCTTTATCCGGCGAGCACCGGCCG GAACATGGAT
Vv_10011516 TC63766	TGGAGGATTCACAGAGGCTTCACTTCACAG GAGTGCCTTTTCGCGTGACCGGCCTATTTT CAGCTGGAT
Vv_10009625 TC70031	GGAGGCAAAGGAGAAGGCGTATCACAAGAC AGAAGAAGCCAAGGAAGCAGCCAAGGAGAA GGGAGCAAAG
Vv_10006890	GTGGCTGTTTCTTTTGGGAGGAGGCTTTCTC TAGGTGTTTGGTTACTCCCTGTCTCATTTTGT AACCTG
Vv_10011093 TC61469	TATGGGACAGGTGGCACCCGACGCCACCGGT GGCGCCGCCACCAGGGACATGAACTATGGC GGAACCACCA
Vv_10013176 TC53252	TTCTTGGAGTTTTTACGGTTTTCTCTCGCTTTT GTTGTTGGATTGACATGTGCATTTACGAGTG GCAAGGT
Vv_10001021 TC53444	CACTGTTCAATTTGGAACCTGCAAGTTCCT GAGAACTTCACTGGCTGCCAGGATCTCGCC AAGAAAAA
Vv_10002077 TC59021	TCGACAGCCTGAGATTGTCTTGGATTCACCA TATTTTGAACGAGTTTCTGTTTTTGGAGGATCC TGATGAA
Vv_10008835 TC58479	AAAAGAGCTGGGGCCGTGGCCCTGATGACG ATGTGTCGGCTCTAGCTCATGCTCACGTGCA CTGGCGTGA
Vv_10000405 TC53043	ATGAAATCCTACATCAGTGATGCCATTAGGC CAGAAGGATGGCTAGAGTGGAATGGGGATT TTGCTCTGG
Vv_10007360	GCCAGGTCCATTGCTGCACCAGAACTTGG

TC70724	ACGGGGAAACCAGAAGGAAGATGATGAAGA AACTGGACCA
Vv_10011254 TC67340	GGTGTATAATAATAGGTAGGTGTTATACGC ATGGGAGGCCATCTCACATGTCAGAACCGC TTGCTAGAT
Vv_10000175 TC58870	AGAGCGAAACGATAGTGAGGCTGCAGGGG CAGGAAAGAGGAAGAAAAGGGAAATTAGCG ATAGGAGCGGA
Vv_10000589 TC52171	CTTCCTGCCTTGTATGATCCTTCTACATCCT CGTGTCTACTCTGGTCTGAAGCAGATTAGT GTCTTGAC
Vv_10000005 TC67119	GTCTTTCCCATCACTTCCTTTTACTCAGAAAA CATGTCTTGCTGCGGTGGAAACTGTGGTTG CGGCAGCG
Vv_10002824 TC69301	CCCATCAACTTCTTGGGCTTCACCCTTTTCG CCTTCTTTGGTTTGCGCCACATCACTCCAT AAAAACCT
Vv_10004150 TC60131	TTGTTTCTTCAATGGTTCAGTTTTCTCTTGA TGCATCATCATCGACCTTGCTTCTCAAGACC AGTCACA
Vv_10010958 CB345272	ATCATTTTCTGTTAATTTCTAGACATGAAGG CTCACGAACTGTCGTGTAGGTGTGTAATA TATATGT
Vv_10006651 TC56797	AATCTTTGTCGTCTATTGTGAAGCGAAATG GCTCGTACGAAGCAAAGTCTCGCAAATCA ACTGGTGGG
Vv_10011888 TC70219	AAAGCATTTACCCCTGGAAAGAACTTGGAAAG CTACGTACACTCAGCGTCAAAGTTATTTTGT CAATTCTC
Vv_10001990	CAGGAGCGTGCCATGATCGACACGTGTGCG TCGCTTTCAATTGTATATTTAGAAGCTCCATT CGAGTTGT
Vv_10014383	TGACAACGTGAAGCATTTTTGCAGGCACCTC ATAATATGGATGCTGTTGCAATGGATGCAC ATCAACGT
Vv_10011271 TC57994	AAACCATCTCCTCTCTCGTTTCTCCAGCTA ATTTGATCACCACCACAAGGACAAGCCTGTT GACGACGC
Vv_10010750 TC52017	CAGAGCTAAACTGGCTGATCTGCTCCGATAT TACTCGACCAAAGTGGTGAAGAGATGACA AGTTTGAAG
Vv_10011059 TC56744	AGAACCCTTGCTAGATGCTTAGTCTTGTGT AGATGTGCAGACAGTGGCTTCGCATAACCA TCTTTATAT
Vv_10000490 TC51731	CTTATTTGAGGAAAGTAGACTTGAGA AATTACTCTGCATATCAGGAACTGTC TTCTGCTCTCGAGAAGAT
Vv_10008821 TC57709	ATAATTCAGGTTCTGTGACAGGAGCACTGA GGAAGAAGGCGACATGTACGAGAAAAACAC AAACTG
Vv_10011231 TC60981	CAGGGCCTGGTCTCTATTTGTCAAAGTCAA TATGGATCACATGGAGCTCCCGCAGGGAG ATGCTGAG
Vv_10004577	ATTATGGTGTAGGCCAGTGAAGCGGGTGA TCCAGCAAATGTTGAAAATGAACTTGCCAA GGGCATATT
Vv_10013542 TC56618	TGCAAAGGGAATGCTGAATTTGAACATTACT CTGTGCGTGTGAACATTAGAGTTTCTAGAGG GTTGATGC

Vv_10009319 TC62340	ATGTTCCAACAACAGATTTTGTGCTGTTTGA CATAGAAGAGGAGGAGAAGGAGCATTTCCT TGGTTGCCA
Vv_10001598 TC59487	GAAAGCGGAGAAAGTTGCAATAGAGGAAGG AGCAAAGTGACAGGATGGCTCAGCTGAACA GCTGATCATG
Vv_10004995 TC56535	TCAGACATGCAGAGCTTCCAGCTTCTCGGA GTTCTTCAAGCATGCTTGTCCAGCCACGTTT ACCTATGCC
Vv_10001462 TC63786	AGTTGAAGGCCATTCCCATAACTTGAAATT GAAGCAGAGAAGTGTAGTGGGTGATAGAAG GGATGATAT