



THESE

présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Rôle du gène de floraison *VvFT* dans la mise en place de la floraison chez la vigne

Mise en évidence des mécanismes d'extinction génique chez la vigne et de leurs réponses face aux stress abiotiques

Soutenue publiquement le 19 septembre 2013 à l'INRA de Colmar par

Marjorie ROMON

devant la Commission d'Examen composée de :

Léon	OTTEN	Professeur de l'UDS	Examineur
Hervé	VAUCHERET	Directeur de recherches	Rapporteur
Christophe	BERTSCH	Professeur de l'UHA	Rapporteur
Jean	MASSON	Directeur de recherches	Directeur de thèse

à Anne et Emma

à ma famille

Sommaire

TABLE DES FIGURES.....	10
ABREVIATIONS	13
PARTIE I - INTRODUCTION GENERALE SUR LA VIGNE.....	19
<i>I.1. La taxonomie de Vitis vinifera</i>	<i>19</i>
I.1.1. La taxonomie	19
I.1.2. La notion de cépage et clone.....	21
<i>I.2. Notion morphologique</i>	<i>23</i>
I.2.1. L'appareil végétatif	23
I.2.1.a. Les racines.....	23
I.2.1.b. Le rameau et le sarment	24
I.2.1.c. Les feuilles.....	25
I.2.1.d. La vrille	26
I.2.1.e. Les bourgeons	27
I.2.2. L'appareil reproducteur.....	29
I.2.2.a. L'inflorescence	29
I.2.2.b. La fleur	30
I.2.2.c. La baie et le pépin	31
<i>I.3. La physiologie de la vigne</i>	<i>33</i>
I.3.1. Le cycle végétatif de la vigne	33
I.3.1.a. Les pleurs	33
I.3.1.b. Le débourrement	34
I.3.1.c. La floraison et nouaison	35
I.3.1.d. La véraison et maturation	36
I.3.1.e. L'aoûtement.....	37
LE TRAVAIL DE THESE	39
PARTIE II - LA FLORAISON	43
CHAPITRE I - INTRODUCTION GENERALE SUR LES GENES DE LA FLORAISON	44
<i>I.1. La floraison chez Arabidopsis thaliana.....</i>	<i>45</i>
I.1.1. Les contrôles environnementaux	46
I.1.1.a. La lumière	46
I.1.1.b. La température	46
I.1.2. Les gènes régulateurs de la floraison.....	47
I.1.2.a. Les gènes intégrateurs et les gibbérellines	47
I.1.2.b. Les gènes impliqués dans la différenciation du méristème.....	48
<i>I.2. La floraison de la vigne</i>	<i>49</i>
I.2.1. Les gènes de la floraison chez la vigne.....	49
I.2.2. Les gènes VvFT et VFL	50
I.2.2.a. Le gène VFL	50
I.2.2.b. Le gène VvFT	51

I.2.3.	Le Pinot Meunier nain	52
CHAPITRE II -	OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE SUR LA FLORAISON.....	54
CHAPITRE III -	PUBLICATION.....	55
III.1.	<i>Introduction de la publication</i>	55
III.2.	<i>Publication</i>	57
EFFECT OF GIBBERELLINS AND VVFT ON THE DEVELOPMENT OF LATENT BUDS, TENDRILS AND INFLORESCENCES IN GRAPEVINE		57
ABSTRACT.....		58
BACKGROUND		59
RESULTS.....		62
DISCUSSION.....		65
CONCLUSIONS.....		69
METHODS.....		69
REFERENCES		74
FIGURES.....		79
ADDITIONAL FILES		85
III.3.	<i>Conclusion et perspectives de la publication</i>	86
BIBLIOGRAPHIE DE LA PARTIE I INTRODUCTION GENERALE ET DE LA PARTIE II FLORAISON		88
PARTIE III - LA MISE EN EVIDENCE DU SILENCING CHEZ LA VIGNE.....		97
CHAPITRE I -	INTRODUCTION GENERALE	97
I.1.	<i>Le mécanisme du silencing</i>	98
I.1.1.	Les différents acteurs	100
I.1.1.a.	DICER et dsRNA Binding Protein (DRB)	100
I.1.1.b.	Le complexe RISC	102
I.1.1.c.	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> et le mécanisme de transitivity	103
I.1.2.	Les différentes voies du silencing	105
I.1.2.a.	Les voies endogènes	105
i	Les micro RNA.....	105
ii	Les trans-acting siRNA	106
iii	Les nat-siRNA et hc-siRNA	106
I.1.2.b.	Le RNA silencing « exogène ».....	107
i	S-PTGS	107
ii	IR-PTGS	107
I.2.	<i>Les mouvements à longue et courte distance du silencing</i>	109
I.3.	<i>Les limites du silencing</i>	111
I.3.1.	Les cellules indifférenciées	111
I.3.2.	La température.....	112
I.4.	<i>Le silencing chez la vigne</i>	117
CHAPITRE II -	OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE SUR LE SILENCING	120
CHAPITRE III -	CREATION DU MATERIEL.....	123

III.1.	<i>Introduction</i>	123
III.2.	<i>Matériels et méthodes</i>	125
III.2.1.	Culture <i>in vitro</i>	125
III.2.1.a.	Les plantes	125
III.2.1.b.	Transformation stable de la vigne et conditions de culture en chambre climatique	126
III.2.1.c.	Milieu Woody Plant Medium avec ou sans BAP, avec ou sans Charbon	126
III.2.2.	Biologie Moléculaire	127
III.2.2.a.	Northern blot	127
i	Extraction des ARN	127
ii	Northern blot.....	127
III.3.	<i>Résultats</i>	128
III.3.1.	Transformation du PNG15 avec la construction tige-boucle anti-GFP	128
III.3.2.	Transformation du PN40024 avec la construction tige-boucle anti-GFP (lignée R2)	129
III.3.3.	Co-transformation du PN40024 (lignée RC1).....	131
III.4.	<i>Conclusion</i>	133
CHAPITRE IV -	MISE EN EVIDENCE DU SILENCING.....	134
IV.1.	<i>Introduction</i>	134
IV.2.	<i>Matériels et méthodes</i>	135
IV.2.1.	Milieux de culture	135
IV.2.1.a.	Milieu Tabac.....	135
IV.2.1.b.	Milieu Schenk.....	136
IV.2.2.	Observations sous loupe fluorescente.....	136
IV.2.3.	RT- PCR	137
IV.2.3.a.	Extraction des ARN.....	137
IV.2.3.b.	RT-PCR.....	137
IV.3.	<i>Résultats</i>	139
IV.3.1.	Les heterogreffages	139
IV.3.2.	Les greffages	141
IV.3.2.a.	PNG15 (<i>GFP</i>) sur la lignée R2 (anti-GFP)	141
IV.3.2.b.	PNG15 sur des PN40024 infectés par le <i>GFLV</i>	143
IV.3.3.	Analyse phénotypique de la lignée RC1 (<i>GFP</i> + anti-GFP).....	144
IV.4.	<i>Conclusion</i>	146
CHAPITRE V -	CLONAGE DE RDR6	147
V.1.	<i>Introduction</i>	147
V.1.1.	RDR6 chez Arabidopsis	147
V.1.2.	Séquence du PN40024 du génoscope.....	148
V.2.	<i>Matériels et méthodes</i>	150
V.2.1.	Matériel végétal.....	150
V.2.2.	Milieu LB (Lysogeny broth)	150
V.2.3.	Extraction d'ADN	150
V.2.4.	RT- PCR	151
V.2.4.a.	Extraction des ARN.....	151

V.2.4.b. RT-PCR.....	151
V.2.5. 3' et 5' RACE PCR	153
V.2.5.a. 3' RACE PCR.....	153
V.2.5.b. 5' RACE PCR.....	155
V.2.6. Clonage et séquençage	158
V.2.6.a. Clonage	158
V.2.6.b. Minipréparation (Miniprep)	159
V.2.6.c. Purification de fragments PCR	160
V.3. Résultats.....	161
V.3.1. Séquençage de l'ADNg VvRDR6	161
V.3.2. Séquençage de l'ADNc VvRDR6	162
V.3.2.a. Séquençage de l'ADNc	162
V.3.2.b. 3' et 5' RACE PCR.....	164
i 3' RACE PCR	164
ii 5' RACE PCR	165
V.4. Conclusion	167
CHAPITRE VI - DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	168
PUBLICATION	174
RNA SILENCING IS RESISTANT TO LOW-TEMPERATURE IN GRAPEVINE.....	174
METHODS.....	181
REFERENCES	184
FIGURES.....	188
BIBLIOGRAPHIE DE LA PARTIE III SILENCING	191
RESUMES.....	205
ROLE DU GENE DE FLORAISON VVFT DANS LA MISE EN PLACE DE LA FLORAISON CHEZ LA VIGNE.	205
MISE EN EVIDENCE DES MECANISMES D'EXTINCTION GENIQUE CHEZ LA VIGNE ET DE LEURS REPONSES FACE AUX STRESS ABIOTIQUES.	208

Table des figures

Figure 1 : Eléments de systématique des Vitacées.....	20
Figure 2 : Notion de cépage et variété.....	21
Figure 3 : Schéma montrant la mutation du gène MYBA1 chez le Pinot Noir et le Pinot Blanc.....	22
Figure 4 : L'appareil végétatif de la vigne.....	23
Figure 5 : Coupe longitudinale d'un sarment de vigne.....	24
Figure 6 : Caractéristiques morphologiques d'une feuille de vigne.....	25
Figure 7 : Schéma d'une feuille de vigne.....	26
Figure 8 : Photo d'une vrille de vigne.....	27
Figure 9 : Dessin d'une coupe longitudinale dans un bourgeon primaire avant l'entrée en dormance.....	28
Figure 10 : Inflorescence de vigne.....	29
Figure 11 : Fleur de Riesling <i>Vitis vinifera</i>	30
Figure 12 : Une baie de raisin et coupe longitudinale dans un pépin.....	31
Figure 13 : Cycle végétatif et reproductif de la vigne.....	33
Figure 14 : Stades repères de la vigne d'après Baggioloni.....	34
Figure 15 : Stades repères de la vigne d'après Baggioloni.....	35
Figure 16 : Nouaison.....	36
Figure 17 : Schéma reprenant les différentes voies de régulation de la floraison chez <i>A. thaliana</i>	45
Figure 18 : Mise en place de la floraison de la vigne.....	50
Figure 19 : Photos du Pinot Meunier nain.....	52
Figure 20 : Séquence protéique du gène GAI chez <i>Arabidopsis</i> , le blé, le maïs et la vigne.....	53
Figure 21 : Etapes clefs du silencing.....	99
Figure 22 : DCL et DRB chez <i>Arabidopsis</i>	100
Figure 23 : La protéine Argonaute.....	102
Figure 24 : Schéma représentant le mécanisme de la transitivity chez <i>Arabidopsis</i>	104
Figure 25 : Schéma représentant la voie du IR-PTGS.....	108
Figure 26 : Schéma représentant des modèles transgéniques dédiés aux études du mouvement à courte et longue distance chez <i>Arabidopsis</i>	110
Figure 27 : Résultats montrant l'absence de silencing dans les tumeurs suite à une infection par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	111
Figure 28 : Etude du silencing à basse température.....	113
Figure 29 : Graphique montrant l'expression des RDRPs chez <i>Arabidopsis</i> dans des conditions de stress.....	116
Figure 30 : Silencing induit chez la vigne par la méthode VIGS ciblant le gène PDS de vigne.....	118
Figure 31 : Mise en évidence du silencing avec extinction de la GFP.....	124
Figure 32 : Illustration des 3 processus de transformation.....	125
Figure 33 : Transformation de la lignée PNG15 avec la construction tige-boucle anti-GFP.....	128
Figure 34 : Transformation de la lignée PN40024 avec la construction tige-boucle anti-GFP.....	129

Figure 35 : Analyse moléculaire de la lignée R2.....	130
Figure 36 : Co-transformation de la lignée PN40024	131
Figure 37 : Analyse moléculaire de la lignée RC1.....	132
Figure 38 : Observations sous UV et lumière blanche des hétérogreffes.....	140
Figure 39 : Photos des montages et observations sous UV des greffes après 9 semaines.....	142
Figure 40 : Résultat de la RT-PCR réalisée à partir d'ARN de la lignée PNG15 infectée par le GFLV.....	143
Figure 41 : Observation sous UV des cals, feuilles et méristèmes de la lignée PN40024, PNG15 et RC1.....	145
Figure 42 : Photo d'un cal au point de greffe vigne sur vigne.	146
Figure 43 : Annotation du gène <i>AthRDR6</i> et représentation du gène <i>RDR6</i> chez d'autres espèces.....	148
Figure 44 : Résultat du BLASTP réalisé sur le site du génoscope	149
Figure 45 : Annotation du gène putatif <i>RDR6</i> de vigne GSVIVT01035851001	149
Figure 46 : Tableau des amorces pour le séquençage de <i>VvRDR6</i>	153
Figure 47 : Schéma représentant la technique de 3' RACE PCR	154
Figure 48 : Schéma représentant la technique de 5' RACE PCR.	156
Figure 49 : Résultat de la PCR à partir d'ADN du PN40024 avec les amorces <i>RDR6f1</i> et <i>RDR6r1</i>	161
Figure 50 : Résultat de la RT-PCR sur le gène <i>RDR6</i> de vigne.....	163
Figure 51 : Résultat de la 3' RACE PCR	165
Figure 52 : Résultat de la 5' RACE PCR.	166
Figure 53 : Architecture du gène <i>RDR6</i> de vigne après séquençage de l'ADNc.....	167
Figure 54 : Expériences de mircogreffage chez le pommier.....	171

Abréviations

° : degré

°C : degré Celsius

μE : micro-Einstein

μl : micro-litre

μM : micro-molaire

AAP : Abridged Anchor Primer

ADNg : Acide désoxyribonucléique
génomique

AGO : Argonautes

AP1 : *Apetala 1*

A-PTGS : Anti-sens- Post Transcriptionnel
Gene Silencing

ARMV : Arabic Mosaic Virus

ARNdb : d'ARN double brin

ARNsb : ARN simple brin

AUAP : 3'Abridged Universal Amplification
Primer

BA : Filtre barrière

BAP : benzyl adénine ou 6-
benzylaminopurine

BET : Bromure d'Ethidium

BLASTP : Basic Local Alignment Search
Tool Protein

BP : Bande-Pass

CaMV : Cauliflower mosaic virus

cDNA/ADNc : Acide désoxyribonucléique
complémentaire

Chp1 : Chromo domain-containing protein
1

CHS : Chalcone synthase

CiFT : FT orthologue des Citrus

cm : centimètre

CO : Constans

CTPS : Comité Technique Permanent de
la Sélection

DCL : DICER

DM : miroir dichroïque

DNA/AND : acide désoxyribonucléique

dNTP : désoxyribonucléotides

DPBB : double-psi β-barrel

DRB : ds RNA Binding Protein

DRD1 : Defective in RNA-Directed DNA
methylation 1

dsRDB : domaine de liaison à l'ARN
double brin

E.coli :

EDTA : Acide EthyleneDiamineTetracetic

ex : exemple

EX : filter d'excitation

FLC : Flowering Locus C

FLM : Flowering Locus M

FRI : Frigida

FT : Flowering locus T

FT2 : FT orthologue du peuplier

FU : Fruitfull

GA : Gibbérélines

Gai : GA-insensible

GFLV : Grapevine fanleaf virus

GFP : Green Fluorescent Protein

GlmRCHS : Glycine max inverted repeat
of CHS pseudogene

GUS : β-glucuronidase

GVA : Grapevine virus A	<i>OsRDR6 : Oryza sativa RDR6</i>
h : heure	<i>PAZ : Piwi Argonaute Zwill</i>
hc-siRNA : heterochromatin-targeted RNA	pb : paire de bases
<i>HDA6 : Histone Deacetylase</i>	PCR : Polymerase Chain Reaction
<i>HEN1 : Hua Enhancer 1</i>	PD : plasmodesmes
<i>HYL1 : Hyponastic leaves 1</i>	PG : Pinot Gris
IR-PTGS : Inverse Répétée - Post Transcriptionnel Gene Silencing	pH : potentiel Hydrogène
LB : Lysogeny broth	<i>PKIN1 : Potato Kinase 1</i>
<i>LFY : Leafy</i>	PM : Pinot Meunier
LP : Longue-Pass	PN : Pinot Noir
m : mètre	<i>PpRDR6 : Physcomitrella patens RDR6</i>
M13fw : M13 forward	PTGS : Post Transcriptionnel Gene Silencing
M13rev : M13 reverse	PVP : polyvinylpyrrolidone
mg : milligramme	PVX : virus X de la pomme de terre
min : minute	PVY : virus de la pomme de terre Y
Miniprep : Minipréparation	qPCR : quantitative PCR
miRNA : micro RNA	<i>RDR1 : RNA-dependent RNA polymerase 1</i>
ml : milli litre	<i>RDR6 : RNA-dependent RNA polymerase 6</i>
mm : millimètre	<i>RDRP : RNA-dependent RNA polymerase</i>
mM : milli-Molaire	<i>Rev : reverse</i>
<i>MYB : Myelablastosis</i>	RH : humidité relative
n : nombre de chromosomes	<i>RISC : RNA-induced silencing complex</i>
nat-siRNA : natural antisense transcript-siRNA	<i>RITS : RNA-Induced Transcriptional Silencing complex</i>
<i>NbRDR6 : Nicotiana benthamiana RDR6</i>	RNA/ARN : Acide ribonucléique
ng : nanogramme	rpm : rotation par minute
<i>NgRDR6 : Nicotiana glutinosa RDR6</i>	RT : Reverse transcription
nM : nano-molaire	s : seconde
NPK : Azote, Phosphore, Potassium	<i>SDE1 : Silencing Defective 1</i>
nt : nucléotide	SDS : Dodécylsulfate de Sodium
<i>NtRdRP1 : Nicotiana tabacum RDR1</i>	

SFT : *FT* orthologue des *Solanum*
SGS2 : *Suppressor of Gene Silencing 2*
SGS3 : *Suppressor of Gene Silencing 3*
 siRNA : small interfering RNA
SOC1 : *Suppressor of Over Expression Of Constans 1*
 S-PTGS : sens- Post Transcriptionnel Gene Silencing
SUL : Sulfur
SVP : *Short Vegetative Phase*
 TAE : Tris Acétate EDTA
TAS : *tasiRNA-generating noncoding precursor*
Tas3 : *RNA-induced transcriptional silencing complex protein*
 tasiRNA : trans-acting siRNA
TFL1 : *Terminal Flower 1*
 TGS : silencing transcriptionnel

Tm : Température d'hybridation des amorces
 TMV : virus de la mosaïque du tabac
 U : Unité
 UAP : Universal Amplification Primer
 UV : Ultra Violet
VFL : *LEAFY* de vigne
 VIGS : Virus-Induced Gene Silencing
VIN3 : *Vernalization Insensitive 3*
VvPDS : *Phytoène désaturase de vigne*
VvRDR6 : *Vitis vinifera RDR6*
 WPM : Woody Plant Medium
 Wt : wild type
XRN4 : *exoribonucléase 4*
 YEB : Yeast extract broth

Partie I

Introduction générale sur la vigne

Partie I - Introduction générale sur la vigne

I.1. *La taxonomie de Vitis vinifera*

I.1.1. La taxonomie

La vigne est une plante dicotylédone appartenant à l'ordre des *Rhamnales*, qui comprend 3 familles dont celle des *Vitacées*. La famille des *Vitacées* est subdivisée en 17 à 19 genres (selon les ouvrages) dont celui de *Vitis*. Le genre *Vitis* comprend environ 75 espèces réparties dans 2 sous-genres : *Euvitis* et *Muscadinia* qui se distinguent par leur nombre de chromosomes, *Euvitis* $2n=38$ et *Muscadinia* $2n=40$ (**Figure 1**). Ces espèces sont caractérisées comme étant des plantes pérennes lianescentes ayant pour attache des vrilles simples ou ramifiées le plus souvent et qui vivent principalement en zone intertropicale (Levadoux, 1956; Galet, 1998).

Le sous-genre *Euvitis* comprend trois sous-groupes : européen, asiatique et américain.

Le groupe asiatique comprend plus de 10 espèces, la plus connue étant *Vitis amurensis* très résistante au mildiou et au froid de l'hiver. Ses baies sont petites et de saveur agréable.

Le groupe américain regroupe une vingtaine d'espèces. Certaines sont très résistantes au phylloxéra comme *Vitis rupestris* mais aussi au mildiou et au black-rot qui sont les maladies majeures de la vigne en Europe.

Le groupe européen est composé d'une seule espèce *Vitis vinifera* qui comprend 2 sous-espèces, la sous espèce cultivée *Vitis vinifera* L. *subsp sativa* et la sous-espèce sauvage, *Vitis vinifera* L. *subsp silvestris* (Gmelin). *Vitis vinifera sativa* comprend les cépages cultivés dont le nombre est estimé à plus de 10 000 (Alleweldt and Dettweiler, 1994). Ce nombre varie régulièrement du fait de la création constante de nouvelles variétés. La sous-espèce sauvage a, quant à elle, pratiquement disparue avec l'arrivée du mildiou et du phylloxéra en Europe.

Dans le sous-genre *Muscadinia*, on trouve l'espèce *Vitis rotundifolia* ou *Muscadinia rotundifolia* (selon les auteurs) qui pousse à l'état sauvage aux Etats-Unis et qui présente des résistances à plusieurs pathogènes, en particulier contre le Phylloxera et le mildiou (**Figure 1**).

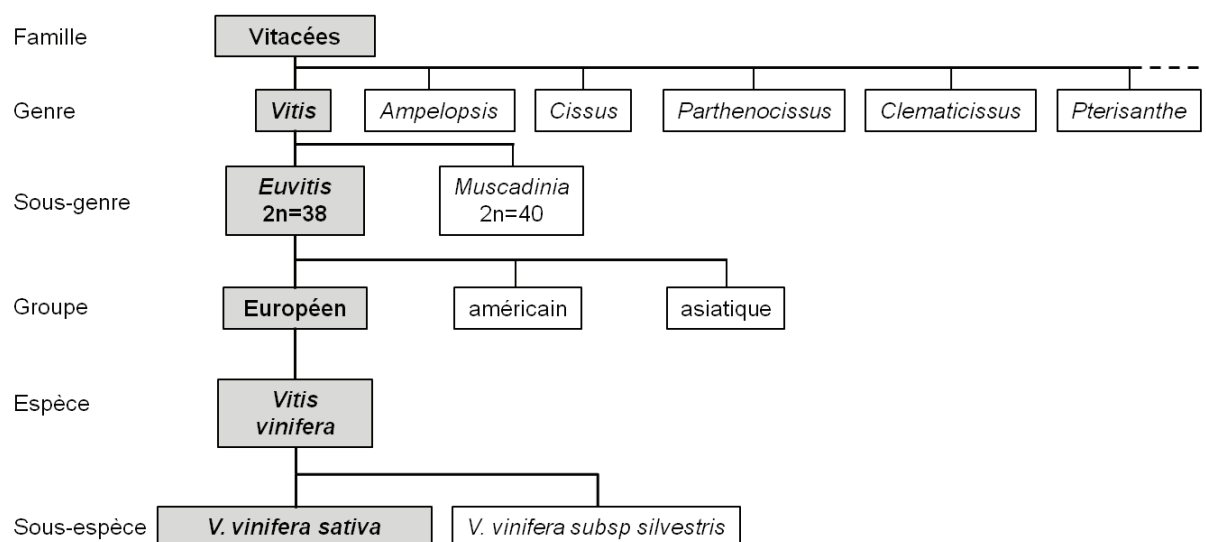


Figure 1 : Eléments de systématique des Vitacées

Approfondir les connaissances sur le genre *Vitis* a été nécessaire afin d'apporter des solutions à l'arrivée des maladies provenant d'Amérique en Europe, les plus connues étant l'oïdium en 1845, le phylloxéra en 1868, le mildiou en 1878 et le black rot en 1885. Ces études ont permis de trouver une solution contre le phylloxéra qui décimait rapidement les vignobles européens en sélectionnant comme porte-greffe des espèces américaines résistantes, comme *V. riparia*, *V. labrusca*, *V. rupestris*, sur lesquelles étaient greffés les cépages traditionnels, permettant de garder leurs caractéristiques organoleptiques. Une autre voie a été explorée, celle de la création variétale d'hybrides entre ces variétés américaines et les cépages traditionnels, cependant ces hybrides qui présentaient un niveau de résistance élevé au phylloxera possédaient des qualités organoleptiques très médiocres. Actuellement, de nouveaux programmes sont en cours pour créer, par hybridation, des nouveaux cépages résistants au mildiou et à l'oïdium par introgression de gènes de résistances à ces maladies provenant des espèces résistantes américaines et asiatiques (Galet, 2000; Huglin and Schneider, 1998; Levadoux, 1956).

I.1.2. La notion de cépage et clone.

Le terme de cépage est utilisé principalement par les viticulteurs, les botanistes préfèrent le terme de cultivar. Chaque cépage a pour origine un semis produit du croisement entre deux parents, donc d'un individu unique (ex Riesling, Pinot). Celui-ci a ensuite été multiplié par voie végétative pour conserver la conformité génétique des pieds-filles par rapport au pied-mère (Boursiquot and This, 1999). Les descendants d'un même individu par multiplication végétative sont appelés clone (Galet, 2000; Huglin and Schneider, 1998) (**Figure 2**). La vigne sauvage se propage naturellement par multiplication végétative, par enracinement d'un rameau, on parle de marcottage. Depuis l'Antiquité, la vigne cultivée a été multipliée par bouturage réalisé à partir d'un rameau ou sarment d'une souche mère que l'on fait raciner. Mais depuis l'arrivée du phylloxera qui s'attaque principalement aux racines, on utilise le greffage d'un rameau du pied mère sur un porte-greffe résistant qui donnera les racines.

Cependant, au cours de la croissance des plantes, des mutations peuvent apparaître et sont propagées par la multiplication végétative (Pelsy, 2010). Certaines mutations peuvent apporter de nouvelles caractéristiques organoleptiques et différencier les clones les uns des autres. Quand des clones sont utilisés pour des objectifs viticoles très différents, les populations de clones, présentant les mêmes caractéristiques, sont regroupées sous un même nom de variétés (exemple Pinot Noir, Pinot Blanc, Pinot Gris) (**Figure 2**).

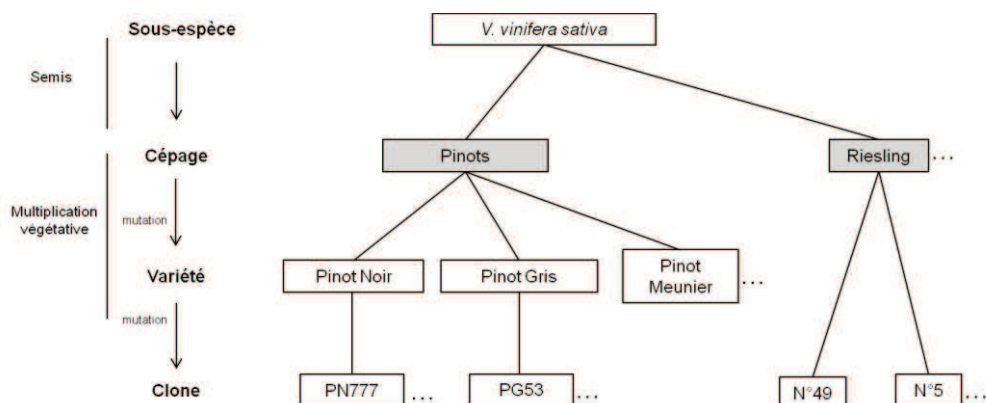


Figure 2 : Notion de cépage et variété

Puis, au sein d'un même cépage, différents types de mutations peuvent distinguer les clones. On peut citer comme exemple au sein du cépage Cabernet Sauvignon la variété Shalistic blanche (Walker et al., 2006). Les résultats convergent pour montrer que le Pinot Blanc est issu du Pinot Noir par mutation somatique à un locus de la couleur des baies des raisins (Vezzulli et al., 2012).

Le locus de la couleur est constitué d'un cluster de gènes apparentés aux facteurs de transcription *MYB* (*MYELOBLASTOSIS*) et il régule la biosynthèse des anthocyanes (pigments majeurs des baies de raisin). On y a caractérisé deux gènes, *VvMYBA1* et *VvMYBA2*, qui sont fonctionnels et transcrits dans les cépages noirs comme le Pinot Noir ou le Cabernet Sauvignon. Le plus souvent ces cépages sont hétérozygotes à ce locus, un chromosome porte les 2 gènes fonctionnels et l'autre chromosome homologue les 2 gènes mutés. La mutation du gène *VvmybA1* a pour origine l'insertion du rétrotransposon *Gret1* entre le promoteur et son site d'initiation. La mutation du gène *VvMyba2* est due à des mutations ponctuelles. A l'état homozygote, l'allèle muté conduit à l'absence de la biosynthèse des anthocyanes et donc à des cultivars blancs (Kobayashi et al., 2004; Bogs et al., 2007) (**Figure 3**). Pour la variété Pinot Gris, les mutations touchent la couche L1 du méristème, or seule la couche L2 qui est à l'origine des gamètes, peut transmettre ses caractéristiques par semis (Hoquigny, 2003; Hocquigny et al., 2004).

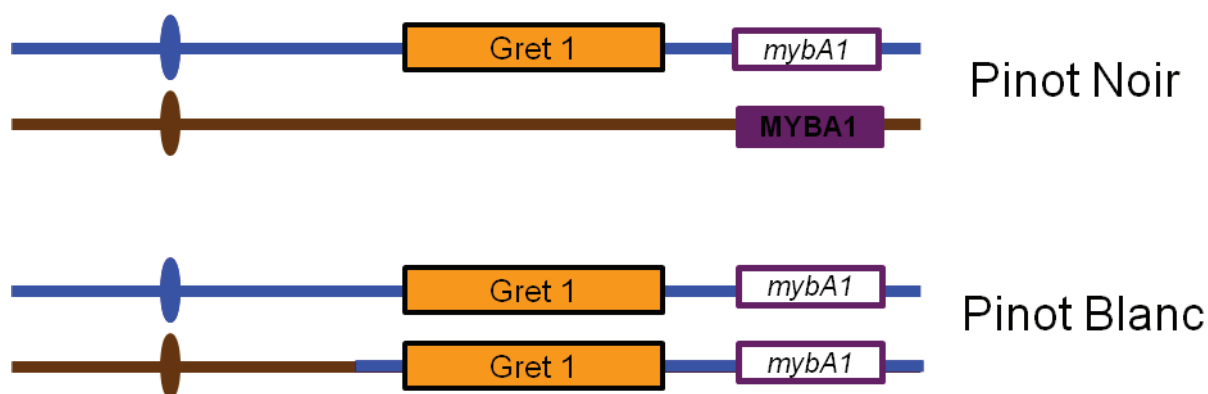


Figure 3 : Schéma montrant la mutation du gène *MYBA1* chez le Pinot Noir et le Pinot Blanc. L'insertion du rétrotransposon dans la partie promotrice du gène *MYBA1* entraîne l'absence de transcrits.

I.2. *Notion morphologique*

I.2.1. L'appareil végétatif

L'appareil végétatif de la vigne est composé d'organes pérennes comme le bois et les vrilles et d'organes annuels comme les feuilles. Nous allons décrire chacun de ces organes avant d'aborder le cycle végétatif et reproducteur de la vigne.

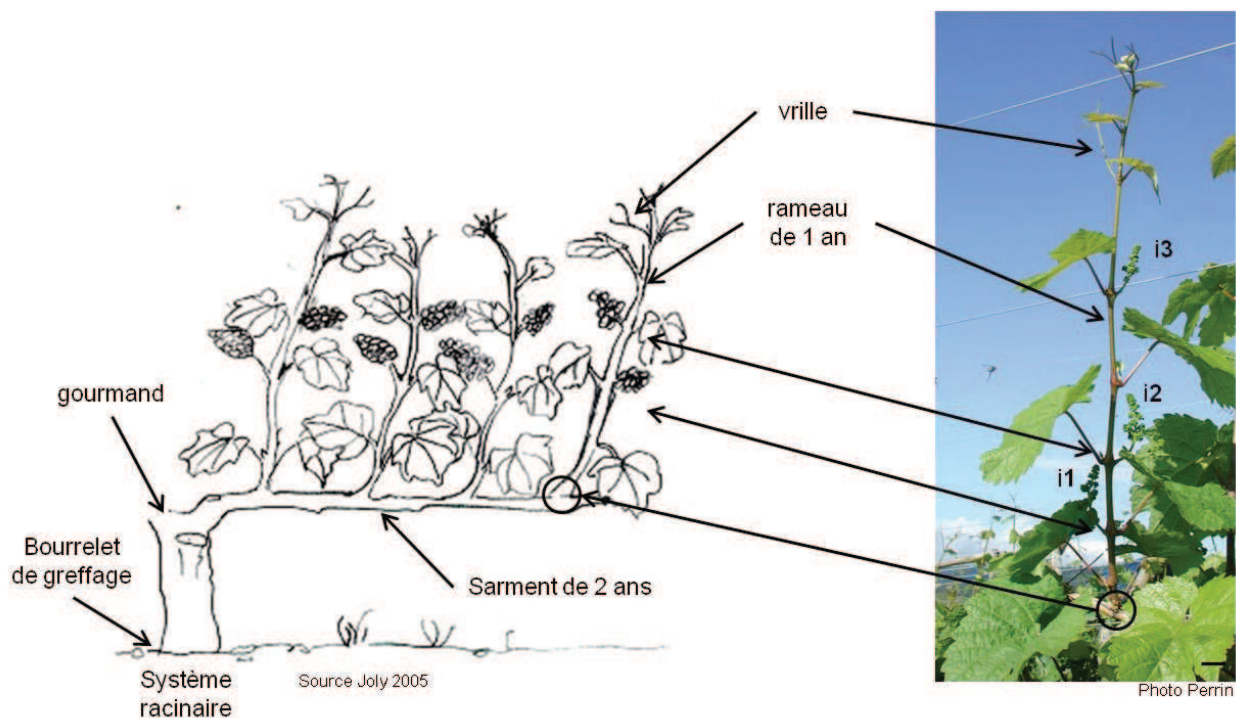


Figure 4 : L'appareil végétatif de la vigne (Joly, 2005)

I.2.1.a. **Les racines**

On observe généralement 2 à 3 racines principales qui se ramifient. La racine principale peut atteindre au-delà d'un mètre de profondeur et porter de nombreuses ramifications latérales dépassant largement les 5 mètres de long. La vigne étant une plante ligneuse, les racines se lignifient au cours de leur vieillissement (Huglin and Schneider, 1998; Galet, 2000, 1998).

I.2.1.b. Le rameau et le sarment

Le sarment est le rameau que le viticulteur a conservé lors de la taille et qui passe l'hiver. Il est à l'origine du développement de la vigne de l'année suivante. Chaque année, les bourgeons latents situés sur le sarment donnent naissance à des rameaux végétatifs dont la longueur et la croissance sont variables (**Figure 4**). Le port du rameau est rampant et peu rigide. Il est composé de petites boursouflures nommées nœud. La distance séparant 2 nœuds peut être variable, cette partie correspond à l'entre-nœud ou mérithalle. La morphologie du mérithalle peut varier en fonction des espèces. Il peut être recouvert de poils, d'épines ou de racines aériennes. La longueur du mérithalle est une caractéristique des espèces. Certaines espèces américaines ou asiatiques ont des mérithalles très longs allant jusqu'à 25 cm alors que les espèces cultivées *V. vinifera* ont un mérithalle de longueur moyenne (entre 5 et 15 cm) (Galet, 2000).

Le nœud porte les feuilles rattachées par le pétiole. Lorsque la feuille tombe, la cicatrice laissée par le pétiole est nommée «empreinte pétioleaire ». On trouve également des bourgeons ou yeux axillaires situés à l'aisselle des pétioles, des inflorescences et des vrilles (**Figure 5**).

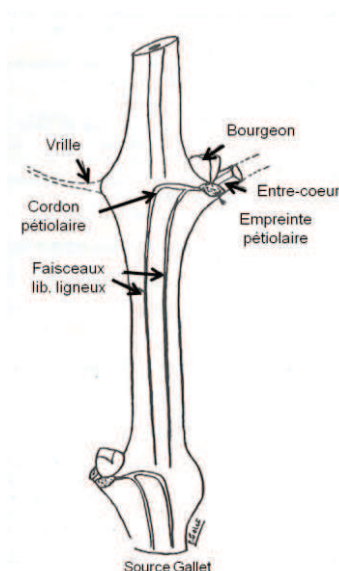


Figure 5 : Coupe longitudinale d'un sarment de vigne (Galet, 2000)

On distingue 2 bourgeons, un gros nommé le bourgeon latent qui est capable de se développer uniquement l'année suivant sa mise en place et 1 bourgeon plus petit nommé « prompt-bourgeon » qui, lui, peut se développer la même année et ainsi donner naissance à un rameau secondaire.

Les nœuds jouent également un rôle régulateur de réserve. Ils correspondent à une adaptation physiologique particulière. Ce renflement permet l'amélioration de la circulation de la sève vers la feuille.

I.2.1.c. Les feuilles

Les feuilles sont disposées sur le rameau en deux rangs opposés à 180°, on parle d'une disposition distique.

Les feuilles de vigne ont cinq nervures principales. Le limbe est divisé en trois lobes, le lobe terminal, le lobe latéral supérieur et le lobe latéral inférieur (**Figure 6**).

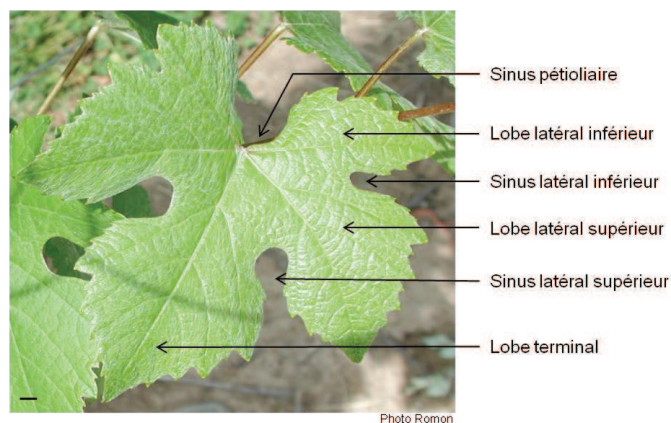


Figure 6 : Caractéristiques morphologiques d'une feuille de vigne

Ces caractéristiques varient beaucoup, il existe plusieurs types de feuilles en fonction de leurs mesures ampélographiques, ces valeurs sont un critère d'identification des cépages et des espèces. Elles consistent à mesurer les longueurs des nervures principales et les angles que font les nervures entre elles (**Figure 7**). Les feuilles sont

classifiées en fonction de leurs découpures, de leur dimension, de la villosité, la couleur, l'aspect général du limbe, la dimension du limbe et la dentelure.

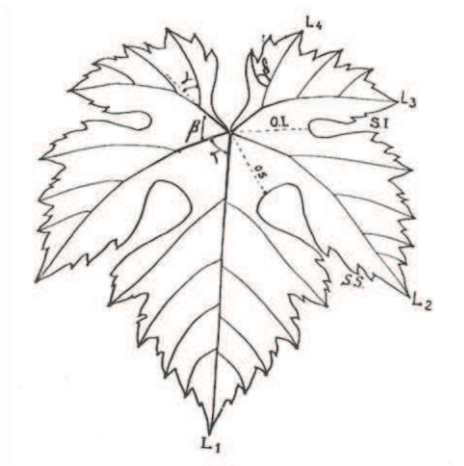


Figure 7 : Schéma d'une feuille de vigne. (Galet, 1998)

L1, L2, L3 et L4 représente les différentes nervures

α représente l'angle entre L1 et L2

β représente l'angle entre L2 et L3

γ représente l'angle entre L3 et L4

I.2.1.d. La vrille

La vrille est de même origine que les inflorescences. Elle est le plus souvent bifurquée, composée d'un pédoncule, d'une branche majeure située à l'aisselle d'une bractée et d'une branche mineure (**Figure 8**). La longueur est spécifique de la variété. Les vrilles permettent au rameau ou sarment de se fixer sur leur support grâce au renflement adhésif présent à leurs extrémités. Une fois que la vrille s'enroule et se fixe sur un support, elle va se rigidifier en se lignifiant. Les vrilles sont oppositifoliées et situées sur les nœuds supérieurs du rameau.

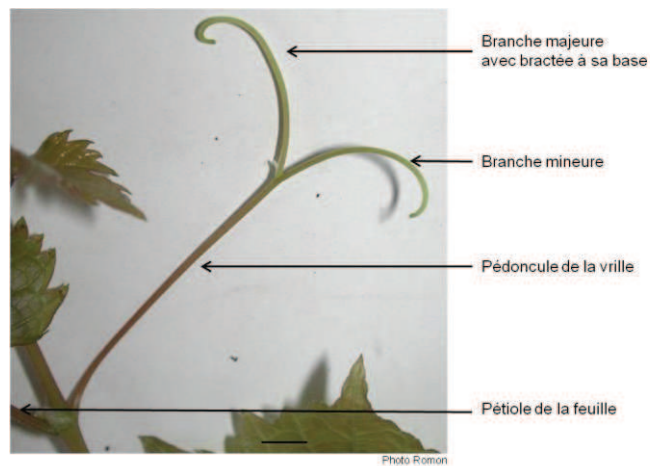


Figure 8 : Photo d'une vrille de vigne

Les vrilles sont un organe particulier car elles peuvent être stériles ou fertiles, en effet la vrille et les inflorescences dérivent du même méristème mais chaque organe se développe de manière indépendante selon les conditions environnementales et hormonales. Il est fréquent d'observer une vrille portant à son extrémité un bouton floral ou une structure fertile appelé(e) « solitary flower ».

I.2.1.e. Les bourgeons

Tous les bourgeons sont axillaires c'est-à-dire, situé à l'aisselle de la feuille. C'est un organe complexe. Chez la vigne, il existe 4 types de bourgeons : le bourgeon terminal, le prompt-bourgeon, l'œil latent et le bourgeon latent.

Le bourgeon terminal assure la croissance des différents organes du rameau. Il est situé sur le sarment et donne naissance au rameau.

On peut distinguer deux types de bourgeons à l'aisselle des feuilles, le « prompt bourgeon » et le bourgeon latent (également nommé dans la littérature « œil latent »). L'insertion du bourgeon est alternative une fois à droite et l'autre à gauche du pétiole.

Le prompt-bourgeon peut débourrer et se développer la même année que la formation du rameau contrairement au bourgeon latent qui se développe l'année suivante. Le prompt-bourgeon donne alors des pousses réduites nommées « entre-

cœurs » ou rameaux secondaires. Ce développement n'est pas obligatoire. Les rameaux secondaires sont stériles et de taille plus courte que le rameau principal. Leur morphologie reste identique mais leur développement s'arrête avant l'aoûtement.

La structure du bourgeon latent est beaucoup plus complexe que celle des autres bourgeons (**Figure 9**). Il comporte déjà un primordium de feuille et de vrille ainsi que 3 primordia d'inflorescences.

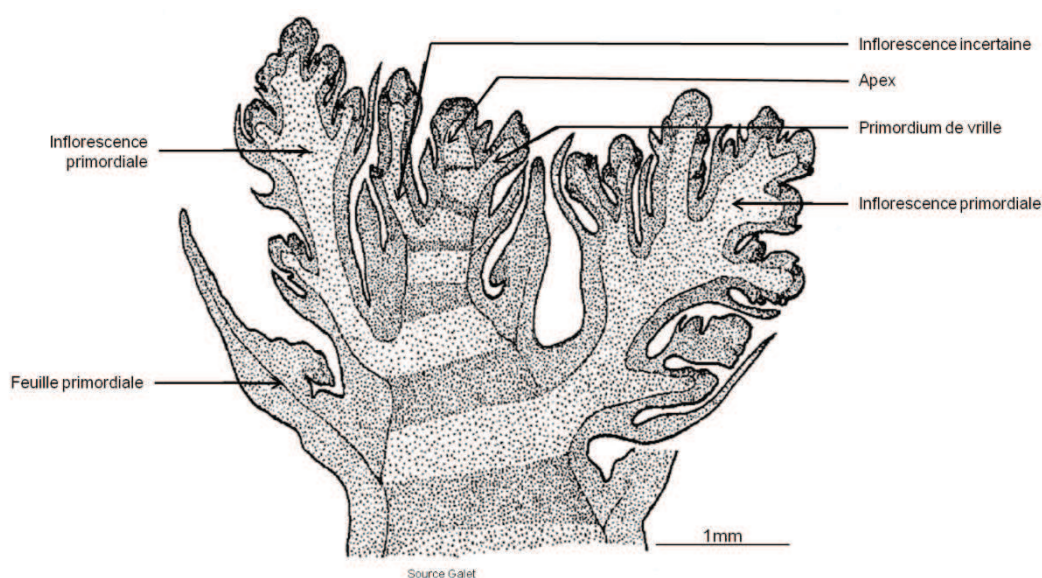


Figure 9 : Dessin d'une coupe longitudinale dans un bourgeon primaire avant l'entrée en dormance (Galet, 2000).

Le bourgeon latent grossit et se met en place uniquement durant la période végétative. Il ne se développe pas durant l'année de sa formation. Il est protégé par des écailles et de la bourre. Au terme de son initiation, on distingue au centre du bourgeon l'ébauche et l'organisation du futur rameau. On y trouve aussi des bourgeons secondaires (bourgeons de remplacement ou contre-bourgeon). Le bourgeon secondaire ne se développe généralement pas, sauf si le bourgeon principal est détruit après des gelées ou suite à l'attaque d'insectes.

I.2.2. L'appareil reproducteur

I.2.2.a. L'inflorescence

Les inflorescences sont oppositifolliées et comme indiqué précédemment elles ont la même origine que les vrilles et de manière anecdotique, certaines vrilles peuvent présenter des boutons floraux à leur extrémité. Le type d'inflorescence est un thyrses c'est-à-dire une grappe de cymes qui présente des axes secondaires, tertiaires et quaternaires portant les pédicelles des fleurs (**Figure 10**).

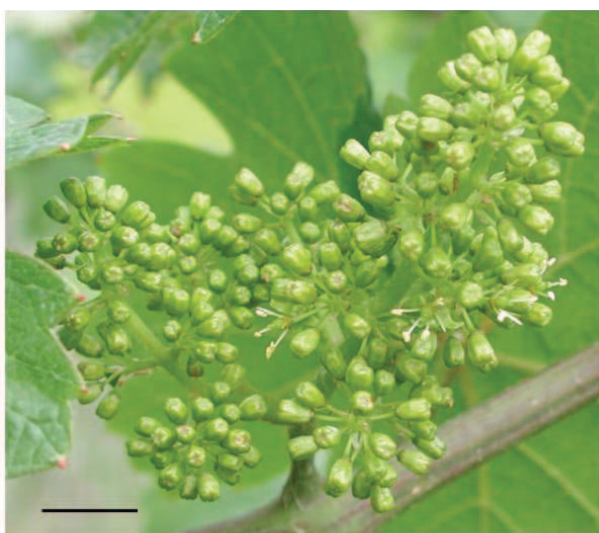


Photo Romon

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Disjunkt_heterokladische_Thyrse_%28inflorescence%29.PNG

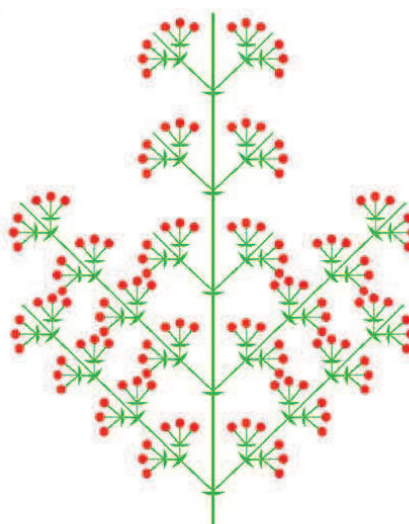


Figure 10 : Inflorescence de vigne

Généralement sur le rameau, les inflorescences apparaissent au niveau du troisième nœud puis du quatrième et du sixième (**Figure 4**). Le nombre d'inflorescences sur un rameau peut varier de 1 à 4.

I.2.2.b. La fleur

Le nombre de fleurs par inflorescence varie selon les espèces, les cépages et les clones. La fleur hermaphrodite est petite 3 à 4 mm pour *Vitis vinifera* et de symétrie d'ordre 5 (**Figure 11**).

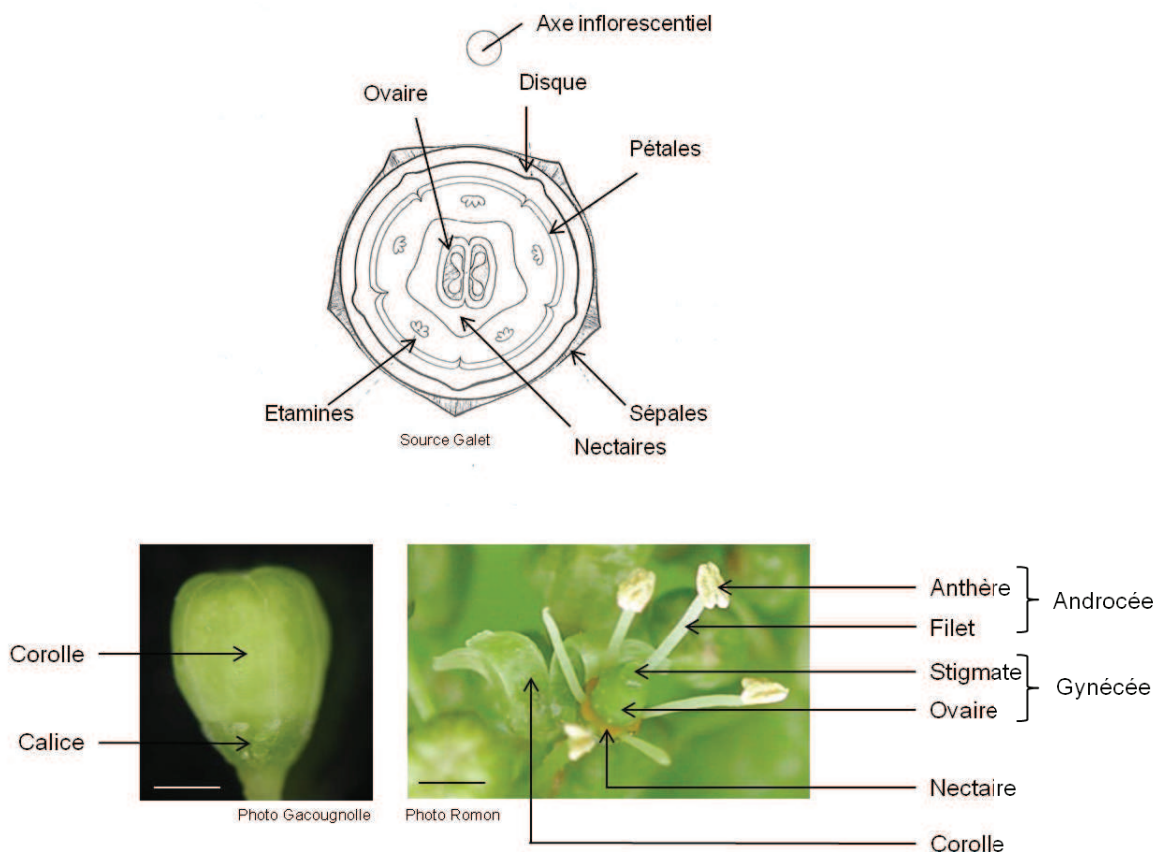


Figure 11 : Fleur de Riesling *Vitis vinifera* (Galet, 2000)

Le calice est composé de 5 sépales rudimentaires soudés, la corolle de 5 pétales entièrement soudés formant ainsi un capuchon qui lors de la floraison se détache progressivement par la base et libère les filets d'anthères. L'androcée est composée de 5 étamines opposées aux pétales. Chaque étamine possède 2 loges et libère le pollen par une fente longitudinale. Le gynécée est composé d'un ovaire avec 2 loges renfermant 2 ovules, un style et un stigmate très court. On trouve aussi 5 nectaires qui alternent avec les étamines se trouvant au renflement basilaire de l'ovaire et sécrètent un suc sucré et odorant. La fécondation est anémophile, il n'existe pas d'insecte pollinisateur chez la vigne. La fleur est hermaphrodite, donc capable de

s'autoféconder, en effet, lorsque le capuchon se détache, cela entraîne un petit mouvement des étamines qui libère ainsi du pollen. A la différence de la vigne cultivée, l'espèce sauvage, *V. vinifera subs silvestris*, est dioïque, avec des pieds mâles produisant le pollen et des pieds femelles des baies.

I.2.2.c. La baie et le pépin

Le nombre de baies est souvent inférieur à celui des fleurs en raison du phénomène de coulure et de l'avortement des ovaires. Les dimensions et les formes des baies sont un critère de classification des variétés. Une baie est composée de l'extérieur vers l'intérieur d'une pellicule, de la pulpe et des pépins. (**Figure 12**). A l'extrémité, on peut distinguer la trace du stigmate. Elle est reliée à la grappe par le pédicelle formant un bourrelet. A l'intérieur, on y retrouve la moelle et les faisceaux conducteurs.

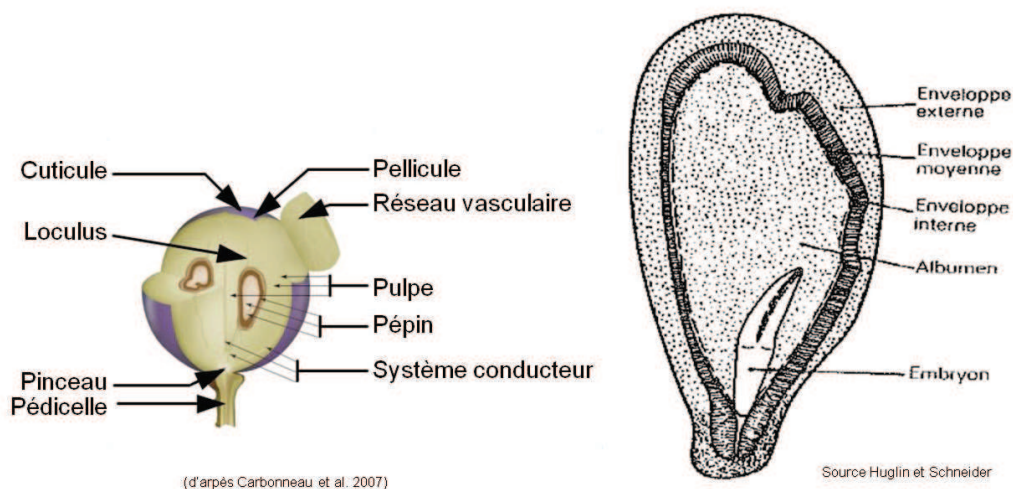


Figure 12 : Une baie de raisin (gauche) (Carbonneau et al., 2007) et coupe longitudinale dans un pépin (droite) (Huglin and Schneider, 1998)

La forme et la taille des pépins sont variables mais ne constituent pas à un critère de classification. Le pépin est composé de 3 enveloppes externes, moyennes et internes, de l'albumen et de l'embryon (**Figure 12**). L'albumen renferme des grains

d'aleurone et de l'huile. Le nombre de pépins par baie peut varier de 1 à 4, mais le plus souvent on y retrouve 2. Certaines variétés sont apyrènes, sans pépins ou avec des pépins non lignifiés, ce caractère est recherché pour les raisins de table. Il existe 3 variétés de raisin sans pépins, le « Centennial Seedless », la Sultanine ou Thomson Seedless et « Danuta ». La variété Danuta est issue d'un croisement réalisé entre les variétés « Dattier de Beyrouth » et « Sultanat moscata ». Cette variété est l'aboutissement de plus de 20 ans de recherche sur le déterminisme génétique de l'apyrénie chez la vigne par des chercheurs de l'INRA.

I.3. *La physiologie de la vigne*

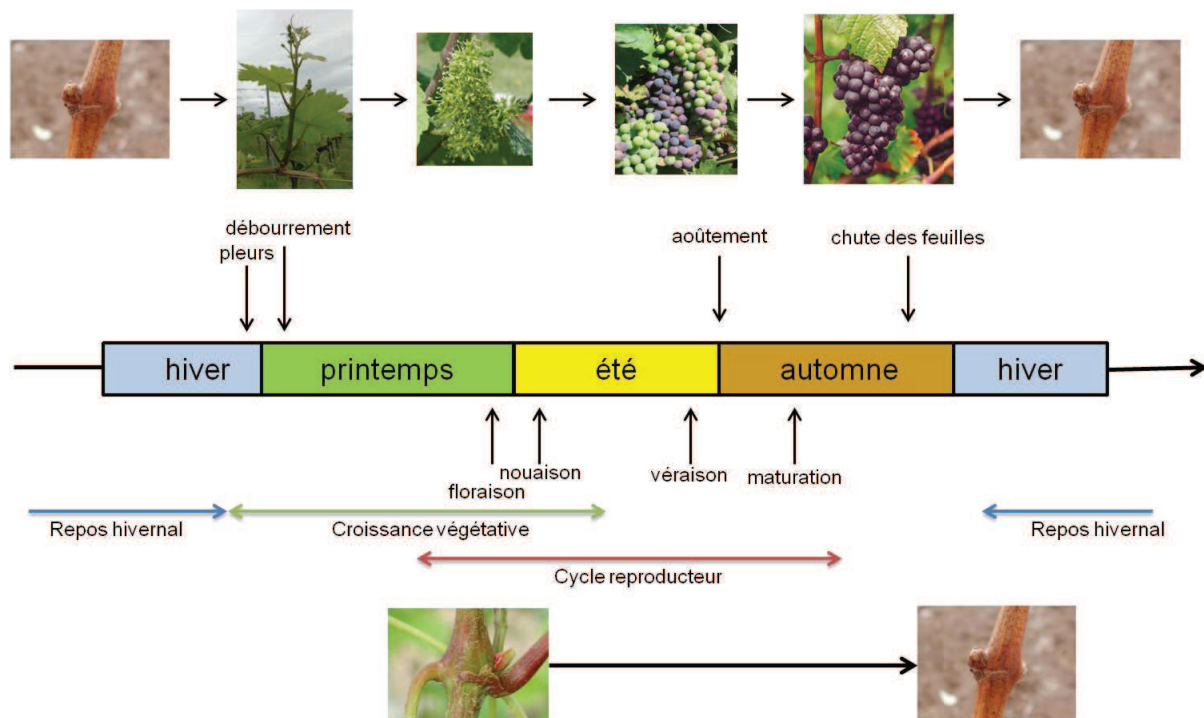


Figure 13 : Cycle végétatif et reproductif de la vigne

I.3.1. Le cycle végétatif de la vigne

I.3.1.a. **Les pleurs**

Après le repos hivernal, le cycle végétatif de la vigne commence par une étape dite de pleurs. Ce terme décrit un phénomène végétatif de transition avec la vie ralentie se traduisant, entre autres, par la montée de la sève dans le rameau et la formation d'une goutte à son extrémité. Ce phénomène annonce le début du débourrement (**Figure 13**).

I.3.1.b. Le débourrement

Le débourrement a lieu généralement entre mars et avril. Les bourgeons latents ayant passé l'hiver sur le sarment, commencent à débourrer. De nouveaux rameaux entrent alors en croissance. Cette étape marque le début de la croissance végétative de la vigne. En effet, les feuilles, les fleurs, les vrilles et les nouveaux bourgeons se mettent en place progressivement. Cette croissance se poursuivra tout le printemps et jusqu'en août. Les feuilles atteignent progressivement leur taille adulte et participent à l'enrichissement de la sève élaborée pour permettre la croissance des organes reproducteurs et des autres organes végétatifs (rameau secondaire, vrille) (**Figure 13**). On distingue différents stades durant le débourrement. Le stade C (pointe verte) et D (sortie des feuilles) débutent aux printemps. (**Figure 14**)

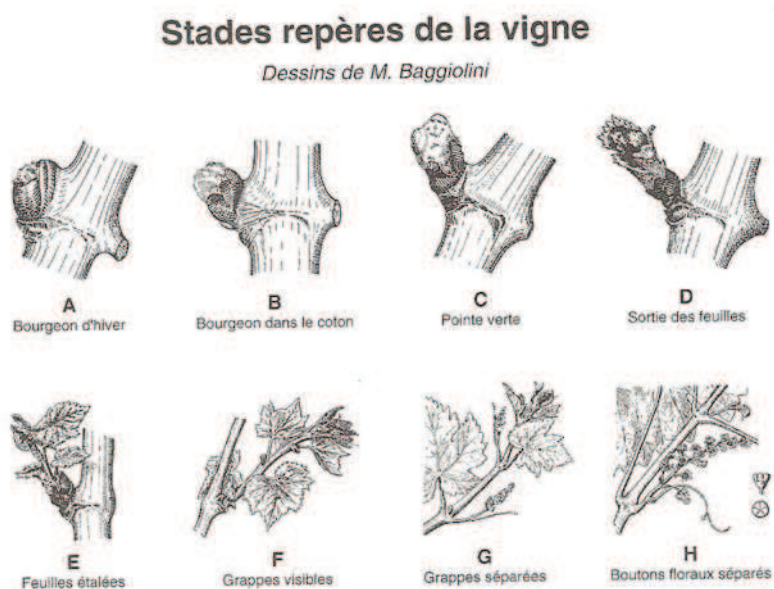


Figure 14 : Stades repères de la vigne d'après Baggioloni (Galet, 1998)

I.3.1.c. La floraison et nouaison

Le cycle reproductif de la vigne débute quelques jours après le débourrement. En effet, on peut rapidement distinguer l'apparition de petites inflorescences dont le développement va se poursuivre jusqu'à la floraison qui a lieu généralement de la mi-mai à fin juin (**Figure 13** et **Figure 15**).

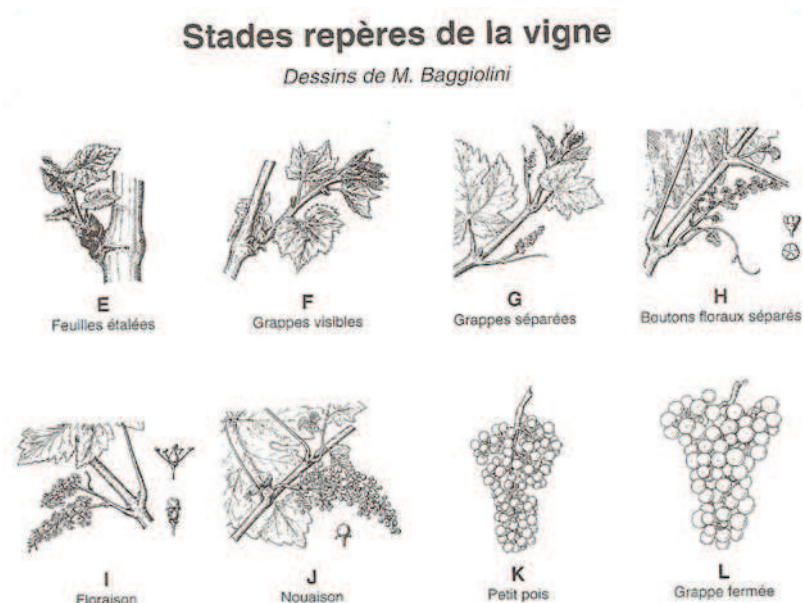


Figure 15 : Stades repères de la vigne d'après Baggioloni (Galet, 1998)

Ici, le terme floraison correspond au moment où les étamines sont découvertes après l'ouverture du capuchon. Le nombre de baies étant beaucoup plus faible que le nombre de fleurs présentes sur l'inflorescence, une proportion variable de baies fécondées arrêtent leur développement et tombent. Quand la perte de baies devient excessive, on parle alors de coulure. Par contre, on utilise le terme de nouaison lorsque l'ovaire se transforme en fruit ou baie (**Figure 16**).

La baie dans la première phase de sa croissance présente un fonctionnement de type herbacé et reste verte. C'est une phase de croissance caractérisée par de nombreuses divisions et grandissement cellulaires et la transformation de l'ovule en pépin. Les gibbérellines et l'auxine jouent un rôle important dans le grandissement cellulaire (Ferrier, 2008). A la fin de cette période, le nombre de baies est déterminé

sur la grappe. Le rendement est caractérisé par le nombre de grappes de raisin présents sur un pied de vigne. Le nombre de grappes peut varier d'une espèce à une autre, mais aussi d'un clone à un autre. On ne sait pas aujourd'hui quels sont les facteurs qui déterminent le nombre de grappes sur un pied de vigne. Mais ce caractère a déterminé la sélection des vignes cultivées aujourd'hui.

La fin de cette première phase est caractérisée par un ralentissement de la croissance appelée plateau herbacé.



Photo Romon

Figure 16 : Nouaison

I.3.1.d. La véraison et maturation

Le début de la maturation appelé véraison est caractérisé par le ramollissement du péricarpe, le changement de couleur de la pellicule facilement identifiable chez les cépages à raisins colorés et la reprise de la croissance uniquement liée au grandissement cellulaire. Elle a lieu parallèlement à l'aoûtement. La baie va devenir juteuse et translucide.

Durant la maturation, les baies s'enrichissent en sucres et autres métabolites secondaires importants pour la vinification. Des composées phénoliques comme les méthoxy-pyrazines vont s'accumuler dans les cellules de la pellicule mais également d'autres composés comme des terpènes et des thiols. Les cellules de la pulpe vont accumuler des sucres (glucose et fructose) et des acides organiques comme le malate et tartrate. L'acidité des baies diminue progressivement. Après la véraison, la synthèse d'éthylène reste faible, en effet, le raisin n'est pas un fruit climactérique.

D'autres hormones comme l'acide abscissique et les brassinostéroïdes jouent un rôle dans la maturation de la baie (Ferrier, 2008).

Le pépin mûrit également et son état de maturité est souvent utilisé par les viticulteurs comme indicateur de récolte des raisins (**Figure 13** et **Figure 15**).

I.3.1.e. L'aoûtement

Fin juillet, début août, la croissance s'arrête. On assiste alors à l'aoûtement qui va se poursuivre jusqu'au mois d'octobre. Au cours de cette période, du liber se forme dans les rameaux. La teinte des rameaux et sarments passe alors du vert au brun. A ce moment, l'assise génératrice subéro-phellodermique se met en place. On observe également un épaissement des parois cellulaires et l'accumulation de matières de réserve permettant aux tissus de mieux résister au froid. Puis, à la fin de l'aoûtement, durant l'automne, la chlorophylle va disparaître, les feuilles vont jaunir et tomber. Cette défeuillaison marque la fin du cycle végétatif de la vigne (**Figure 13**). Le bourgeon latent entre alors en dormance durant tout l'hiver. Les pleurs marqueront au début du printemps suivant le commencement d'un nouveau cycle végétatif et reproducteur.

Le travail de thèse

La thèse a porté sur deux thématiques indépendantes, qui ont été traitées successivement mais toujours en rapport avec la vigne. Ce changement de sujet a résulté d'un changement thématique du laboratoire d'accueil au cours de cette thèse.

Le première thématique a été consacrée à l'étude de deux gènes contrôlant l'initiation de la floraison de la vigne et la seconde thématique a porté sur la mise en évidence du silencing chez la vigne.

Le mémoire comprend donc deux parties indépendantes correspondant chacune à une thématique. Chaque partie comporte une introduction, dans laquelle sera exposé l'objectif du travail, suivie des résultats et des perspectives ouvertes par le travail mené.

Partie II

La floraison

Partie II - La Floraison

La France est le premier producteur mondial de vin avec 60 millions d'hectolitres de vin produits chaque année, ce qui représente 14% de la production agricole française. En Alsace la viticulture représente un poids non négligeable dans l'économie régionale (FranceAgriMer). Avec la venue des vins du Nouveau Monde et la concurrence exercée, la France doit adapter sa viticulture. De manière générale, les vignes à faible rendement aboutissent à une amélioration de la qualité du vin. Le rendement est caractérisé par le nombre d'inflorescences produites par un pied de vigne. Par conséquent, l'amélioration de nos connaissances sur la mise en place de la floraison chez la vigne est importante.

La mise en place de la floraison résulte de l'intégration de signaux endogènes et de signaux environnementaux tels que la température ou/et la lumière. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, les récepteurs de la photopériode situés au niveau des feuilles activent l'expression de facteurs de transcription comme le gène *Flowering locus T (FT)*. Cette protéine va circuler des feuilles vers le méristème apical via le phloème pour y activer l'expression d'autres facteurs de transcription, comme le gène *LEAFY*, qui vont entraîner la différenciation du méristème apical en méristème floral. Les gibbérellines jouent également un rôle dans la floraison en activant l'expression de facteurs de transcription au niveau du méristème.

Chapitre I - Introduction générale sur les gènes de la floraison

Les premières études sur la floraison, menées dans les années 1920, ont montré que les plantes percevaient les variations saisonnières et les changements de la longueur du jour (photopériodisme)(Garner and Allard, 1920). Par la suite, il a été mis en évidence que le signal issu de la photopériode circule de la feuille vers l'apex de la plante. Ce signal mobile a été appelé florigène. Ce n'est que dans les années 2000 que les scientifiques ont déterminé la nature du florigène : il s'agit de la protéine FT dont la synthèse a lieu dans la feuille, puis celle-ci circule jusqu'au méristème via le phloème. FT fait donc le lien entre la feuille et le méristème. Dans le méristème, cette protéine va activer d'autres facteurs de transcription comme le gène *LEAFY*, responsable de la différenciation du méristème en inflorescence (Corbesier et al., 2007). Différentes expériences ont été menées sur *Arabidopsis* dont le génome a été le premier à être séquencé chez les plantes, en 2000. La séquence de ce génome a permis de découvrir les gènes-clés de beaucoup de mécanismes de régulation ou de développement comme ceux de la floraison (Arabidopsis and Initiative, 2000). En particulier, il a été montré que la transcription du gène *FT* dans les feuilles est induite par des récepteurs contrôlés par la photopériode.

Cependant, la lumière n'est pas le seul facteur environnemental nécessaire à l'induction de la floraison. La température joue également un rôle important. En effet, une longue période de froid, nommée la vernalisation est nécessaire pour obtenir la floraison. Cette période est variable selon les espèces végétales (de 30 à 60 jours ou plus) à une température inférieure à 5°C.

Parmi les signaux endogènes, une famille de phytohormones importantes pour la floraison a été découverte par le phytopathologiste Eiichi Kurosawa en 1926 chez le riz, les gibbérellines. Aujourd'hui, on sait qu'il existe de nombreuses formes de gibbérellines et qu'elles ont un rôle dans la croissance, la levée de dormance et dans le débourrement des bourgeons.

I.1.1. Les contrôles environnementaux

I.1.1.a. La lumière

La lumière est perçue au niveau des feuilles à l'aide de photorécepteurs spécialisés comme les phototropines, cryptochromes et phytochromes (Lariguet and Dunand, 2005; Li and Yang, 2007; Quail et al., 1995). Le gène qui centralise les données de la photopériode est le gène *CONSTANS* (*CO*). Ce gène code pour un facteur de transcription qui possède un domaine en doigt de zinc (Putterill et al., 1995). Dans les conditions de jour court, l'expression de ce gène est circadienne, on observe une oscillation de son expression avec un pic d'expression toutes les 20 heures (Suárez-López et al., 2001).

L'induction de la transcription du gène *FT* par la protéine CO nécessite l'association de CO avec les co-facteurs NF-YB et NF-TC. (**Figure 17**)

Le complexe-clé de la photopériode, CO-FT, est conservé chez les espèces végétales pour la mise en place de la floraison, comme chez le riz (Komiya et al., 2008).

I.1.1.b. La température

Bien qu'il ait été montré que la température joue un rôle important dans l'activation de la floraison, les mécanismes d'activation de la floraison par la température sont moins bien connus que ceux contrôlés par la photopériode. Deux gènes régulés par la température ont été caractérisés : ce sont des répresseurs de la floraison *FRIGIDA* (*FRI*) et *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*). L'étude de mutants d'*Arabidopsis* a montré que la protéine FRI joue un rôle dans la vernalisation en activant l'expression de FLC (Michaels and Amasino, 2001). La protéine FLC est une protéine MADS-box qui réprime directement les gènes *FT* et *SOC1*. Un autre gène, le gène *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* (*VIN3*) semble également essentiel pour maintenir la répression de la floraison avec *FLC* durant la vernalisation (Sung and Amasino, 2004; Bond et al., 2009) (**Figure 17**).

Les gènes *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* et *FLOWERING LOCUS M (FLM)* ont été caractérisés comme étant des régulateurs majeurs de la floraison en réponse à la température ambiante (23°C) (Werner et al., 2005; Hartmann et al., 2000; Lee et al., 2007).

I.1.2. Les gènes régulateurs de la floraison

I.1.2.a. Les gènes intégrateurs et les gibbérellines

Les modalités du transport de FT via le phloème sont encore méconnues. On ne sait pas si la protéine passe par les plasmodesmes, si le transport nécessite de l'énergie ou au contraire s'il est passif. Dans le méristème, ce facteur de transcription FT s'associe avec la protéine FD, facteur de transcription bZIP spécifique du méristème, pour former un hétérodimère qui va activer la transcription de gènes comme *SOC1* et *FRUITFULL (FUL)* (Wigge et al., 2005; Abe et al., 2005; Ferrándiz et al., 2000). (**Figure 17**)

La protéine SOC1 est une MADS-box. Cette protéine est synthétisée à la fois dans la feuille et dans le méristème. Dans les feuilles, le gène *SOC1* est réprimé par *FLC* et activé par la vernalisation. Dans le méristème, *SOC1* a un rôle intégrateur important, car son expression est activée par les différents signaux initiateurs de la floraison dont les gibbérellines (Moon et al., 2003). Il a aussi été montré que la voie des gibbérellines active *SOC1* d'une manière indirecte en réprimant le gène *SVP* (Srikanth and Schmid, 2011). (**Figure 17**)

Les gibbérellines sont indispensables pour un passage à la floraison en jour court et en jour long. Ceci a été montré en étudiant le mutant d'*Arabidopsis ga1-3* qui ne synthétise pas de gibbérellines. Ce mutant ne fleurit jamais en jour court même après la vernalisation ou en cas d'apport de gibbérellines exogènes, alors qu'en jour long il se comporte normalement (Wilson et al., 1992; Sun et al., 1992). Le triple mutant *gid1*, qui possède une mutation dans les 3 gènes codant pour des récepteurs aux gibbérellines, GID1a, GID1b, et GID1c, montre quant à lui un fort retard dans la floraison uniquement en condition de jour long (Willige et al., 2007) (**Figure 17**).

I.1.2.b. Les gènes impliqués dans la différenciation du méristème.

Le gène *LFY* est central pour la différenciation du méristème en inflorescence. Son expression est activée par les signaux venant de la photopériode via FT-FD et SOC1 et par les gibbérellines. Les mutants *lfy* montrent des transformations homéotiques avec l'apparition de structures ressemblant à des feuilles à la place des organes floraux (Weigel et al., 1992).

LFY induit l'expression du gène *APETALA 1 (AP1)* qui code pour un facteur de transcription avec un domaine MADS-box. *AP1* régule négativement l'expression du gène *FUL* responsable du maintien du méristème végétatif lorsque le méristème est déjà différencié (Ferrándiz et al., 2000). L'expression d'*AP1* est aussi activée par l'hétérodimère FT-FD. Des études de microarray ont montré deux mille sites de liaison possible de *AP1* sur le génome complet d'*Arabidopsis* (Kaufmann et al., 2010). Dans la plupart des cibles identifiées *AP1* agit comme un répresseur durant le développement floral (Schmid et al., 2003; Wellmer et al., 2006).

I.2. ***La floraison de la vigne***

I.2.1. **Les gènes de la floraison chez la vigne**

La phase juvénile chez la vigne est assez longue, il faut attendre 3 à 6 ans pour qu'apparaisse la première floraison (Carmona et al., 2008).

Pour fleurir, la vigne n'est pas sensible à la photopériode mais aux degrés-jours (Galet, 1998). Jusqu'à présent, les températures élevées et la lumière intense sont les facteurs connus contrôlant la floraison de la vigne (Mullins et al., 1992). Une telle différence avec *Arabidopsis* résulte certainement de mécanismes de régulation différents de ceux caractérisés chez la plante modèle.

Depuis les années 2000, plusieurs gènes orthologues aux gènes de la floraison d'*Arabidopsis* intervenant dans la cascade de régulation de la floraison ont été caractérisés chez la vigne tels que *VvFT*, *VFL*, *VvCO*, *VvAP1*. (Carmona et al., 2002; Joly et al., 2004; Almada et al., 2009; Carmona, Calonje, et al., 2007). Cependant, les fonctions biologiques et les spécificités d'interactions de ces gènes orthologues, vraisemblablement différentes de celles découvertes chez *Arabidopsis*, restent à confirmer chez la vigne.

Au niveau de l'induction florale, les orthologues de *SOC1* et *FT* ont été identifiés. (Boss et al., 2006; Parcy, 2005; Carmona, Calonje, et al., 2007; Carmona et al., 2008). Chez *Arabidopsis*, ces gènes jouent un rôle central dans la perception de la photopériode et la vernalisation. La vigne n'étant pas sensible à la photopériode, la fonction des protéines codées par les orthologues de *SOC1* et *FT* chez la vigne reste à confirmer de même que les fonctions de 5 gènes orthologues de la famille de *FT/TFL1*. Enfin le gène *VvMADS8* a été caractérisé. Il a été montré qu'il est fortement transcrit dans les primordiaux d'inflorescences dans le bourgeon latent. Ce gène pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'initiation florale chez la vigne. (Sreekantan and Thomas, 2006).

Les gènes *FUL* et *AP1* qui sont des orthologues, ont été caractérisés chez la vigne et portent le nom de *VFUL-L* et *VAP1* (Calonje et al., 2004). Ces 2 gènes sont exprimés dans les méristèmes latéraux, les inflorescences et les vrilles. Au niveau des fleurs, *VFUL-L* est exprimé dans les carpelles des fruits et *VAP1* dans les pétales et

sépales. La présence de ces gènes dans les vrilles, laisse supposer que ces 2 gènes ont un rôle dans la mise en place des vrilles chez les *Vitaceae* (Carmona et al., 2008) (**Figure 18**)

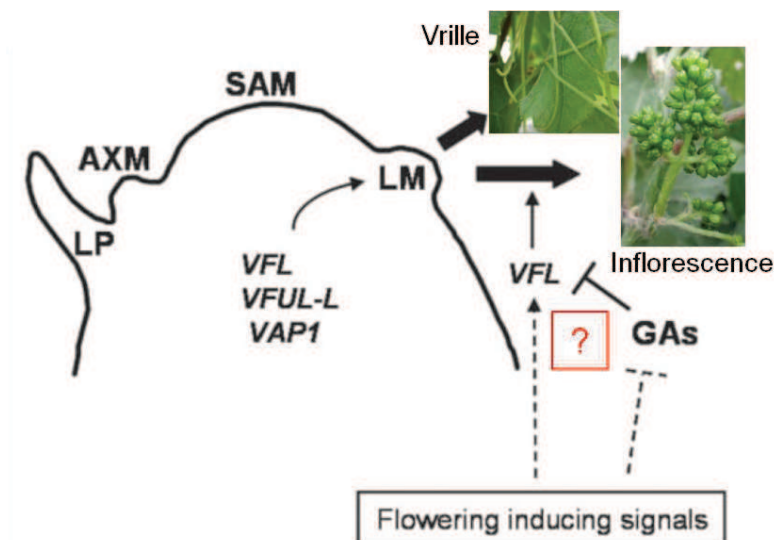


Figure 18 : Mise en place de la floraison de la vigne. (Carmona, Cubas, et al., 2007)

I.2.2. Les gènes *VvFT* et *VFL*

I.2.2.a. Le gène *VFL*

Au niveau du méristème floral, l'orthologue de *LFY* chez la vigne a été caractérisé et porte le nom de *VFL* (Carmona et al., 2002; Joly et al., 2004; Boss et al., 2006). Chez *Arabidopsis*, le gène *Leafy* est constitué de 3 exons (de 457pb, 394pb et 410pb) et 2 introns (de 496pb et 905pb) (TAIR). Chez la vigne, le gène *VFL* est présent en une seule copie dans le génome et il a une architecture composée de 3 exons (de 450pb, 377pb et 378pb) et 2 introns (de 153pb et 662pb) (Carmona et al., 2002; Joly et al., 2004).

Chez *Arabidopsis*, l'expression du transgène *VFL* entraîne une floraison précoce (Joly et al., 2004). Chez la vigne, ce gène a une expression spécifique dans les différents organes de la plante ressemblant à celle d'*Arabidopsis*. En effet, des

études de RT-PCR et d'hybridation *in situ* ont permis de mettre en évidence l'expression de *VFL* principalement dans le bourgeon latent, dans les primordiaux des étamines et dans l'inflorescence. Il est décrit comme ayant un rôle clef dans l'initiation florale (Carmona et al., 2002; Joly et al., 2004).

I.2.2.b. Le gène *VvFT*

Chez *Arabidopsis*, *FT* a un rôle dans la signalisation de la floraison en jour long (Corbesier et al., 2007; Jaeger and Wigge, 2007; Mathieu et al., 2007; Hisamatsu and King, 2008). Ce gène fait partie de la famille des protéines similaires de mammifères PEBPs (phosphatidylethanolamine-binding protein), trouvées également chez la levure et les bactéries (Bradley et al., 1996; Ahn et al., 2006).

Chez *Arabidopsis*, le gène *FT* est composé de 4 exons (de 283pb, 61pb, 40pb et 468pb) et 3 introns (de 814pb, 712pb et 123pb) (TAIR).

Comme pour le gène d'*Arabidopsis*, *VvFT* est composé de 4 exons (de 198pb, 63pb, 42pb et 219pb) et 3 introns (de 129pb, 922pb et 676pb) (Carmona, Calonje, et al., 2007)

Une première étude d'expression de ce gène a été réalisée par Northern blot. Le gène *VvFT* est fortement exprimé au niveau du pépin et de la pulpe des baies, et de manière plus faible dans les inflorescences. Un très léger signal est perçu au niveau des bourgeons latents durant les différents stades de leur développement et dans les feuilles (Carmona, Calonje, et al., 2007).

I.2.3. Le Pinot Meunier nain

Un mutant de vigne insensible aux gibbérellines *gai* (GA-insensitive) a été obtenu par régénération à partir de cellules de la couche L1 du Pinot Meunier (Boss and Thomas, 2002). Le phénotype de ce mutant est nain en raison des entre-nœuds très courts, de plus, ses vrilles sont remplacées en grande majorité par des vrilles inflorescentielles (**Figure 19**).



Figure 19 : Photos du Pinot Meunier nain. (Boss and Thomas, 2002).

Ce mutant résulte d'une substitution dans la séquence du gène *GAI* qui conduit au remplacement d'une leucine par une histidine (**Figure 20**). Le phénotype nain de ce mutant permet d'émettre l'hypothèse que les gibbérellines ont une action inhibitrice sur la floraison de la vigne (Boss and Thomas, 2002).

<i>Arabidopsis</i>		I	II
<i>GAI</i>	NGMDELLAVGYKVRSSMDVAQKLEQLEVMMSNVQEDDLSQLATETVHYNPAELYTWLDSMLT		
<i>gai</i>	NGM-----DVAQKLEQLEVMMSNVQEDDLSQLATETVHYNPAELYTWLDSMLT		
Wheat		I	II
<i>Rht-B1a/D1a</i>	EEVDELLAALGYKVRASDMADVAQKLEQLEMAMGMGGVGAGAAPDDSFATHLATDTVHYNPDLSSWVESMLS		
<i>Rht-B1b</i>	EEVDELLAALGYKVRASDMADVAQKLE*--MAMGMGGVGAGAAPDDSFATHLATDTVHYNPDLSSWVESMLS		
<i>Rht-D1b</i>	EEVDELLAALGYKVRASDMADVAQKL*--MAMGMGGVGAGAAPDDSFATHLATDTVHYNPDLSSWVESMLS		
Maize		I	II
<i>d8</i>	EDVDELLAALGYKVRSSDMADVAQKLEQLEMAMGMGGVGAGATADGGFVSHLATDTVHYNPDLSSWVESMLS		
<i>D8-Mp1</i>	-----MLS		
<i>D8-1</i>	EDVDELLAALGYKVRSSDMAG---LEDLEMAMGMGGVGAGATADGGFVSHLATDTVHYNPDLSSWVESMLS		
<i>D8-2023</i>	EDVDELLAALGYKVRSSDMADVAQKLEQLEMAMGMGGVGAGATADGGFVSH-----LSSWVESMLS		
Grapevine		I	II
<i>VvGAI1</i>	AGMDEL L AVLGYNVKASDMAEVAQKLEQLEEVIVNAQEDGLSHLASETVHYNPDLNWLGSMLS		
<i>Vvgai1</i>	AGMDEL H AVLGYNVKASDMAEVAQKLEQLEEVIVNAQEDGLSHLASETVHYNPDLNWLGSMLS		

Figure 20 : Séquence protéique du gène *GAI* chez *Arabidopsis*, le blé, le maïs et la vigne (Boss and Thomas, 2002)

Une autre étude a montré que le chlormequat (inhibiteur de la synthèse des gibbérellines) réprime l'initiation des bourgeons latéraux et l'élongation des vrilles (Srinivasan and Mullins, 1981).

Chapitre II - Objectif du travail de thèse sur la floraison

Le nombre de fleurs produites est un paramètre important du rendement de la vendange, cependant, l'initiation du développement des bourgeons et de la floraison semble être plus complexe chez la vigne que pour beaucoup d'autres plantes herbacées. Des connaissances plus approfondies sur la floraison chez la vigne permettraient de comprendre l'origine de la coulure par exemple, et de contribuer à un contrôle plus fin de la stabilité du rendement, d'une année sur l'autre.

La mise en place de la floraison chez la vigne, n'est pas déterminée par la photopériode et les mêmes facteurs qu'*Arabidopsis*. De plus, les publications montraient que le gène *VvFT* ne s'exprime pas dans les feuilles comme c'est le cas chez *Arabidopsis*.

Mon travail a été d'étudier l'expression des gènes *VvFT* et *VFL* dans différents organes d'une lignée de Pinot Meunier nain et d'une lignée de vigne sur-exprimant le gène *VvFT* obtenues au laboratoire, afin de mieux comprendre les interactions possibles entre ces deux gènes et l'influence des gibbérellines sur leur expression.

Quelle est l'influence des gibbérellines sur l'expression de *VFL* et *VvFT* ?

Quelle est la fonction de *VvFT* chez la vigne ?

Ces questions sont traitées dans le chapitre III de la thèse. Ce chapitre répondra à la problématique sous la forme d'une publication. Celle-ci présente les résultats obtenus en PCR quantitative sur les gènes *VFL* et *VvFT* dans différents tissus des vignes : une lignée de Pinot Meunier nain et une lignée de vigne sur-exprimant le gène *VvFT*, afin de répondre aux questions énoncées ci-dessus. Les réponses apportées nous ont permis de mieux comprendre les interactions possibles entre ces gènes et les gibbérellines et de proposer une réactualisation des modèles de la floraison chez la vigne.

Chapitre III - Publication

III.1. *Introduction de la publication*

La vigne n'est pas sensible à la photopériode pour mettre en place sa floraison. Il lui faut de hautes températures et une luminosité importante. La combinaison de ces deux paramètres est nécessaire pour que le débourrement des bourgeons latents soit optimale (Mullins et al., 1992). Alors que chez *Arabidopsis*, le gène *FT* est un florigène clef dans la mise en place de la floraison initiée par la photopériode, l'orthologue chez la vigne est exprimé principalement dans les baies et les inflorescences et a une expression extrêmement faible dans les feuilles (Carmona, Calonje, et al., 2007). Le gène *FT* active l'expression du gène *LEAFY* au niveau du méristème apical chez *Arabidopsis*. Mais chez la vigne, le gène *VvFT* semble avoir une toute autre fonction. De fait, chez la vigne, l'expression de *VFL* commence dans les bourgeons latents, qui sont les ébauches d'inflorescences immatures, des feuilles et des vrilles et cette expression persiste pendant toute la période de l'hiver (Carmona et al., 2008), or l'expression de *VvFT* est absente dans le bourgeon latent (Carmona, Calonje, et al., 2007).

L'obtention dans le laboratoire d'une lignée de Pinot Meunier nain et la transformation d'une lignée de vigne avec le gène *FT*, sont 2 outils intéressants pour l'étude de la floraison chez la vigne car leur phénotype est caractérisé par une floraison précoce pour la vigne transgénique *FT* et une floraison abondante pour le Pinot Meunier nain. En effet, les hormones telles que les gibbérellines jouent également un rôle dans le contrôle de l'induction florale. Les gibbérellines inhibent la formation d'inflorescences et stimulent la formation de vrilles. Les gibbérellines sont également responsables de la levée de dormance des bourgeons latents et de la vernalisation.

Ces plantes sont un bon outil pour étudier la relation entre l'expression du gène *VvFT* et le gène *VFL*. La lignée transgénique *FT* nous permet également de mieux comprendre la fonction physiologique du gène *VvFT* par rapport à son orthologue chez *Arabidopsis*. L'insensibilité aux gibbérellines chez le Pinot Meunier nain nous permet de mettre en évidence l'influence des gibbérellines sur l'expression de *VvFT* et *VFL*.

Mon travail a consisté en l'étude de l'expression des gènes *VFL* et *VvFT* chez la lignée transgénique FT, le Pinot Meunier nain, le Pinot Meunier sauvage et le Riesling 49 afin de mieux comprendre le rôle et les interactions de ces gènes dans la voie de signalisation de la floraison chez la vigne. Nous avons réalisé notre étude à partir de différents tissus (les feuilles, les vrilles, les bourgeons latents et les inflorescences).

III.2. *Publication*

Effect of gibberellins and *VvFT* on the development of latent buds, tendrils and inflorescences in grapevine

Marjorie Romon^{1*}, Duyen Prodhomme^{2*}, Mireille Perrin^{1*}, Carine Schmitt^{1*}, Isabelle Soustre-Gacougnolle^{3*}, Claude Gertz^{1*}, Romain Fouquet², Serge Delrot^{4*§}, Jean E. Masson^{1*§}

1 INRA, SVQV, Biologie du Développement, UMR1131, F-68022 Colmar; France

2 INRA, ISVV, Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne, UMR 1287, F-33140 Villenave d'Ornon, France

3 Université de Haute Alsace, Laboratoire Vigne, Biotechnologies et Environnement. 33 rue de Herrlisheim, 68000 Colmar, France.

4 Univ. Bordeaux, ISVV, Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne, UMR 1287, F-33140 Villenave d'Ornon, France

*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

Abstract

Background

Grapevine is cultivated on 7.5 million hectares of vineyards worldwide, and allows an annual wine production of 238 million hectoliters (in 2010), which underlines its important economic value. The number of flowers produced is a major parameter for crop yield, but the functioning of the bud system is more complicated in grapevine than in many other angiosperms. The present work investigates the signalling pathways contributing to the initiation of latent buds and their transformation into tendrils and inflorescences. More precisely, it addresses the role of gibberellins and of *VvFT*.

Results

For these investigations, a dwarf grape mutant was isolated, and a transgenic line overexpressing *VvFT* was produced. The phenotypic consequences of both alterations on flowering were analysed at the phenological and molecular levels. Plants overexpressing *VvFT* exhibit early flowering, within weeks instead of years, but they remain juvenile. In response to increased levels of gibberellins, dwarf plants develop almost true bunches in place of tendrils. Expression of *VvFT* and *VFL* expression was studied by Quantitative PCR analysis in different organs of transgenic and mutant genotypes.

Conclusions

The data obtained allowed us to refine the models which presently describe the developmental steps leading to flowering in grapevine. Already from vegetative meristem transition on, gibberellins and *VvFT* contribute, in different ways, to the sequence of developmental steps leading to the initiation and development of tendrils or inflorescences. A modified model for the regulation of flowering development is proposed for grapevine.

Background

In 2010, vineyards represented a worldwide acreage of roughly 7.5 million hectares. Sixty-five million tons of fresh and dried fruit were produced for direct consumption, but the majority of harvested berries was used to produce 238 million hectoliters of wines [1]. The major economic value of grapevine depends on both crop yield and quality. Although many grape growers tend to limit yield to improve wine quality, the reverse relationship between these parameters is still debated [1]. There is an increasing competition for the use of arable lands. The yield, which is mainly controlled by the use of specific cultivars and rootstocks and by intensive pruning, is more and more subjected to significant inter-annual variations. Thus, a 15%- 30% reduction was observed in 2007 and 2008 in Australia and in France, and this decrease reached almost 30% reduction in 2010, [1]. Rapid climate changes affect plant development and pest management and will also influence yield with potentially severe economic impacts. A thorough understanding of the effects of environmental signals on flowering may help anticipating changes in the number of flowers produced, which is a key parameter for yield. A better understanding of the phenology is also important for the adaptation to climate change.

Grapevine is a woody perennial plant belonging to the *Vitaceae* [2, 3] which exhibits characteristic developmental features such as phyllotaxy changes in seed-grown plantlets, and a 3-6 years vegetative growth prior first flowering [4]. The bud system of grapevine is more complicated than in many other angiosperms (May, 2000). The flowering process *per se* begins with the initiation of a composed bud – the latent bud- where the vegetative to reproductive transition most likely takes place. In the latent buds, which are the immature primordia of inflorescences, leaves and tendrils are initiated in a sequential manner. Flowering genes such as *VFL* (*the grapevine Floricaula/Leafy orthologue*) start to be expressed and this expression never stops throughout the winter period [4]. The next spring, after bud burst, a green arm develops and inflorescences terminate their development while the new latent buds are concomitantly initiated. In *Citrus*, for example, the flowering process also extends through a 2-year period. However, this species is sensitive to day length whereas grapevine is not [5]. So far, there is only evidence that high temperature and intense light are the main factors controlling grape flowering [6].

Inflorescences and tendrils are initiated in the same latent bud. Tendrils often bear a solitary flower, or even several flowers, at their tip (figure S1). The molecular analysis of the expression of *VvFT/VvTFL1* (*Vitis vinifera* Flowering locus *T* / *Vitis vinifera* Terminal Flower 1) or *VvAP1* (*Vitis vinifera* *Apetala* 1) [7, 8] supports this intimacy. However, gibberellins inhibit the development of inflorescences whereas they contribute to the development of tendrils [9]. Low temperature shocks also arrest the development of inflorescences which then turn into tendrils [9–11]. All these data suggest a common ontogeny pattern, but also a differential response of premeristems of tendrils and inflorescences to different signaling pathways.

Complex signaling pathways integrate the various environmental and endogenous signals which determine flowering competence. In *Arabidopsis*, the initial message for flowering arises in the leaf [12, 13]. The day length is perceived in plant leaves and activates the expression of *Constans* (*CO*) [14, 15]. The content of *CO* protein follows a circadian rhythm, thus supporting the idea that *CO* is a good candidate as the initial molecular signal [16–18]. Then, the signal is further transmitted into the cascade through the activation of *FT* (*Flowering locus T*) by *CO* [19]. The latter protein later is counter-regulated by the product of *FLC* (*Flowering locus C*) [20], unless favorable signals are transmitted from endogenous and vernalization pathways. Another check point of these flowering pathways is the expression of *SOC1* (*Suppressor of overexpression of CO1*) [21] which is activated by gibberellins. After convergence and integration of these various signals, mainly directed to *FT* and *SOC1* [22], *LFY* (*Leafy*) and *AP1* (*Apetala* 1) transcription are activated. Both *AP1* and *LFY* proteins contribute to the meristem transition from vegetative to flowering stage [23–26] (Figure 1a). In *Arabidopsis thaliana*, *FT* is involved in the control of long-days-induced flowering [19, 27–29]. *FT* also regulates stomatal opening [30]. This protein resembles to a PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein), a family of proteins found in mammals, yeast and bacteria [31]. A series of PEBPs proteins either activate or repress flowering, as for example *FT* and *TFL1* which are antagonists [7, 32–34]. *FT* is produced in leaves and circulates into the plant through the phloem. After reaching the shoot apical meristem, *FT* interacts with *FD*. This interaction leads to the activation of *AP1* and *LFY* [7, 15, 35] (Figure 1a).

Relying on this knowledge, a thorough approach in grapevine led to the cloning and functional analysis of the main flowering orthologues which are involved in the early

steps of meristem transition: *VvFT*, *VFL*, *VvCo*, *VvAP1* [2, 4, 36–38]. As in other woody plants and monocots, the structure and the function of *LEAFY*, for example, are well conserved [2, 5, 39, 40]. Somehow, the same conclusions could be drawn for the role of gibberellins in flowering regulation [41]. Thus, the available data suggest that the signaling pathways are conserved too.

However, when homologous genes from species other than *Arabidopsis* have been analyzed, differences regarding expression patterns and mutant phenotypes were found, that may reflect distinct roles from those described in *Arabidopsis* [42]. Given that in grapevine, flowering is an almost discontinuous two-year process, and that flowering *per se* is not determined by photoperiod, the question arises about the possible functional role of *FT* in grapevine. Does the *FT* orthologous gene of grapevine play the role of integrator of various and complex signals? Does *FT* activate *VFL* expression in grapevine as in *Arabidopsis*? (Figure 1b)

To address these questions, we have isolated a dwarf grape mutant characterized by altered gibberellin metabolism and produced a transgenic plant deregulated in *VvFT* expression. The phenotypic consequences of these significant changes on flowering were analyzed at the phenological and molecular levels. Our data show that gibberellins and *VvFT* coordinately contribute to the flowering process, though in a different way in inflorescences compared to latent buds and tendrils. A modified model explaining the developmental regulation of flowering in grapevine is proposed.

Results

Production, phenotypic and molecular characterization of a transgenic plant expressing FT

Line 41B was transformed with a construct consisting of the *NPTII* gene, *GUS* and *VvFT* cDNA placed downstream of the 35S promoter (Figure 2a). A series of independent transgenic calli were recovered after selection for kanamycin resistance. One transgenic plant regenerated from each embryogenic callus was chosen for histochemical detection of GUS activity which proved to be positive. Molecular analysis of the transformed plants selected was done using RT-PCR (Figure. 2b). RT-PCR on the 18S ribosomal-RNA was used as a positive control testing for adequate RNA quality and semi-quantitative comparison. The expected 650pb-fragment, corresponding to *VvFT* transcripts was detected in the three plants lines tested. The analysis shows that that *VvFT* transcripts were the most abundant in line 6-4 (Figure. 2b). Transcripts of *VvFT* were found in different organs in the 41B-FT plants and expression levels 2,500 to 30,000 times higher than in the wild type 41B were observed in the latent buds and inflorescences, respectively (Figure S2). Total proteins were extracted from 41B-FT and 41B and a western blot was carried out as a supplement to this molecular analysis. The data show that the protein derived from the construction (26 kd) is well translated in all plants 41B-FT (Figure 2c). The phyllotaxy of 41B plants grown *in vitro* was normal, but tendrils were rarely observed (data not shown). In contrast, in 41B-FT transgenic plants grown *in vitro*, fully developed tendrils and tendrils differentiated into tendril-like inflorescences were produced readily (Figure. 2d). Whereas a mature soil-grown wild type 41B vine carries tendrils often a solitary flower at the tip (Figure. S1), the arms of tendrils were terminated with a 1-5 flowers bud in *in vitro* grown transgenic FT plants (Fig. 2d). These flowers shared all characteristics of a standard 41B flower with a cup covering the stamens and the pistil. After transfer to soil, plants showed normal development, but their leaves kept a juvenile shape. At each internode position, plants developed large tendrils carrying several flower buds at the tip of their arms (Figure. 2d2). Except these altered flowering properties, the general development of the soil-grown transgenic FT plants was not distinguishable from a wild type 41B. In contrast, early flowering often arrested the development of *in vitro* grown plantlets. These data

suggest that *VvFT* overexpression forces plant development towards the initiation of inflorescence.

Production, phenotypic and molecular characterization of a dwarf line

Plants were regenerated from L1-derived somatic tissues of *Vitis vinifera* cv. Pinot Meunier (clone 458) [43]. As a result of small size of internodes (10-20 mm instead of 10-20 cm in wild-type-like segregating progeny), these plants presented a dwarf phenotype (Figure 3 and data not shown). Four successive selfings were performed, thus reaching a similar level of homozygosity as the 40024 line [44]. This dwarf line is self-fertile and does not carry any more major genetic defaults. Red bunches were produced on 2-3 months-old plants of 20-40 cm height, and the seed to seed cycle was completed within 5 months (Figure 3). The tendrils were very small and rare. Although this genotype resembles previously described material [41], it carries small but true bunches at each internode, rather than inflorescence-like tendrils. The first dwarf line described in [41] carries a mutation in the *GAI* gene, most likely explaining all its phenotypic characteristics. The *GAI* gene of the present accession was analyzed at the molecular level. The same mutation was found in the *GAI* locus. However, complete gene sequencing showed SNPs corresponding to distinct allelic composition, when compared to published material (Figure 4). A molecular analysis focusing on *FT* and *VFL* was conducted on this 41B-FT transgenic plant and the dwarf mutant to unravel the influence of gibberellins and FT protein on the flowering process in grapevine.

Expression analysis of *VFL* and *FT* in leaves, latent buds and inflorescences

RNAs were extracted from fresh leaves, tendrils, latent buds and inflorescences collected from the different accessions at the same developmental stage. Actin Ct varied significantly neither between the tissues samples analyzed, nor between the experimental replicates. The corresponding values obtained for each sample were calculated using the RNAs from leaf of the Riesling accession CTPS 49 as reference sample to calculate the relative ratio of *FT* transcripts, according to Pfaffl [45].

The *FT* transcripts were barely detectable in leaves and latent buds of all four genotypes tested (data not shown). When compared to leaves, 40-60 times more transcripts were detected in tendrils with few variations between Riesling (49a), 41B and Pinot Meunier standard accessions (Figure 5a). In contrast, 3 times less transcripts were detected in tendrils of the dwarf Pinot Meunier, suggesting that gibberellins downregulate *FT* expression in these organs (Figure 5a).

In inflorescences, when compared to leaves, 200 and 400 times higher levels were detected in 41B, Pinot Meunier, dwarf Pinot Meunier and Riesling, respectively (Figure 5b). These data suggest that *FT* is more abundant in inflorescences than in tendrils, and that gibberellins down regulate *FT* in the tendrils but not in the inflorescences.

A comparative analysis was conducted for *VFL* expression. Low *VFL* transcripts levels were found in tendrils and leaves (Figure. 5c and d). However, 8 times more transcripts were found in leaves of transgenic 41B-FT, thus suggesting that *FT* expression activates *VFL* expression (Figure 5c). In latent buds and inflorescences, transcripts levels were 10-100 times higher than in leaves (Figure 5d). In latent buds of transgenic 41B-FT plants, the *VFL* transcripts levels were twice higher than in wild type 41B. In the dwarf Pinot Meunier, these *VFL* transcripts levels were 8 times increased, when compared to latent bud of Pinot Meunier (Figure 5d). These data suggest that both *FT* and gibberellins activate the expression of *VFL* in latent buds where the onset of inflorescences takes place, one year prior bolting.

Strikingly, *VFL* transcript levels did not differ between inflorescences and latent buds in Riesling, 41B and Pinot Meunier wild tipe, while in 41B-FT and in the dwarf plants, transcripts levels were 10 and 8 times lower in inflorescences than in latent buds, respectively (Figure 5d). These data suggest that both *FT* and gibberellins slightly repress *VFL* expression in inflorescences.

Discussion

The present work addresses the signaling pathways contributing to the initiation of latent buds and their transformation into tendrils and inflorescences in grapevine, with a special focus on the role of gibberellins and *VvFT*. The expression of *VFL* and *VvFT* was analyzed in different organs of a dwarf grape mutant affected in gibberellins signaling and of a transgenic plant overexpressing *VvFT*. The data suggest that gibberellins and *VvFT* do not coordinate the flowering process in the same way as they do in *Arabidopsis*. Furthermore, our results provide refinements for the models already published describing bud fate control in grapevine [7].

Orthologues of *Arabidopsis FT* gene have been described in numerous species, including perennial woody plants such as citrus [46, 47], poplar [48, 49] apple tree (*Malus x domestica Borkh*) [50, 51] or the Norway spruce (*Picea Abies*) [52]. All these trees share a typical long vegetative growth phase, so that several years and even decades precede the first flowering [48]. In most ligneous species studied at the molecular level, *FT* overexpression reduces significantly the juvenile phase to several months [7, 49]. However, hastening of flowering onset has also been described after overexpression of *LFY* or/and *AP1* in woody species [5] suggesting that the question of juvenile to adult phase is more complex and species-dependent.

In grapevine, RNA blots detected *VvMFT* (*Vitis vinifera Mother of FT and TFL1*) and *VvFT* transcripts, in inflorescences, flowers and tendrils [7, 38]. Our quantitative expression analysis provides a refined picture of the organ distribution of *VvFT* expression in latent buds, tendrils, and inflorescences for three major accessions including two varieties (Pinot Meunier, Riesling) and a rootstock (41 B). Very high transcripts levels were found for *VvFT* in inflorescences and tendrils, while only traces were detected in the latent buds. This does not mean that *VvFT* has no role in latent buds where meristematic transitions take place. Indeed, overexpression of *VvFT* clearly accelerates the transition from juvenile to adult stage, as shown by the early flower buds formed and the upregulation of *VFL*. These observations are in agreement with conclusions reached for *FT* function in *Arabidopsis* [7, 34, 47]. It is still peculiar, however, that all other phenotypic characteristics of *FT*-transgenic grapes tend to remain of juvenile type.

Overexpression of *LFY* in citrus, as well as overexpression of *CiFT* (*FT* orthologue of Citrus) in transgenic trifoliate orange leads to the replacement of thorns by inflorescences [5, 53]. This suggests that besides its role in meristem fate, *FT* may act in other developmental processes. Indeed, *FT* determines the transformation of meristems into inflorescences instead of thorns in citrus [53], the transformation into tendrils instead of inflorescences in grapevine (our data) and the transformation of stems into tubers in potato [54, 55]. In tomato, *SFT* (the *Solanum FT* orthologue) is likely involved in leaf development, stem growth and the set-up of abscission zones [56, 57]. These numerous and distinct functions suggest that *FT* has a broad role in meristematic-associated transitions. A recent review outlines the different functions of *FT*, which are so numerous that it comes up with a status of plant hormone, as suggested by Turnbull [42]. The mobility of *FT* in the vascular systems is in line with these broad functions, although *FT* transport was not demonstrated for all species analyzed, including grape [42].

VvFT over-expression was accompanied by increased levels of *VFL* in latent buds (Figure 5d) and most likely contributed to the transformation of tendril meristems into inflorescences (Figure 6). The situation was opposite in inflorescences (Figure 5d). This contrasting picture may result from a contribution of other developmental-specific cofactors which are only present in the latent buds, though the stimulation is more tenuous in tendrils (Figure 6). In poplar, the repression of *FT2* (orthologue of *FT*) contributes to bud-dormancy [48, 58]. This particular repression status is at least endowed by *TFL1*, which, in *Arabidopsis*, represses *LFY* and represses inflorescence development. Though no direct correlation was established in grapevine, expression analysis support the idea of a conserved function of *VvTFL1* as an antagonist of flowering transition [7, 36, 59].

Interestingly, quantitative expression analysis in 41B-*FT* transgenic plants showed very high and similar expression levels of *VvFT* in all but latent buds organs as observed in wild type accessions Riesling, 41B and Pinot Meunier. So, this striking resemblance may indicate efficient down-tuning of *VvFT* transcript levels by other factors, *VvTFL1* or even by an active miRNAs-mediated regulation [42] (Figure 6).

In *Arabidopsis*, *FT* expression is activated in the leaf as a response to permissive photoperiod and is transported to the meristematic regions where it is active. In grapevine, in contrast, and despite our attempts, we barely detect *VvFT* expression in leaves. Whereas evidence for photoperiod-driven flowering is lacking in grapevine, its bud burst and flowering are correlated with temperature accumulation (°C-day) [60]. Increased temperature can also accelerate flowering in *Arabidopsis* even under non-favorable photoperiod [61]. High temperatures influence the repressor *FLC* and thus *FT* expression would be activated in a manner independent from photoperiod.

Mutation in the *GAI* gene confers late-flowering phenotype to *Arabidopsis*. This phenotype is suppressed by *FT* over-expression in *Arabidopsis ga1-3 mutant* [29, 61–63] thus supporting the existence of distinct flowering cues involving either gibberellins, *FT* or the photoperiod pathway [61, 64]. In the dwarf grape which are insensitive to gibberellins, the transition from juvenile to adult stage is accelerated and tendrils are transformed into inflorescence [41]. Furthermore, our data obtained with another accession sharing the same mutation in the *GAI* locus, suggest that the flowering characteristics may slightly differ (may be as a result of other uncharacterized somatic mutations), namely in producing small bunches instead of tendril-like inflorescences when compared to published data (Boss and Thomas, 2002).

In latent buds where *VFL* is the most strongly expressed, increased levels of gibberellins contribute to further increase *VFL* levels in a manner resembling the response to *FT* over expression. Indeed, in the same tissues, we observed a decrease in *FT* transcripts as response to high gibberellins contents. This may be explained either by a colinear response or a common signaling pathway, or independent but concerted pathways.

The response of inflorescences to high gibberellins strongly differs from that of latent buds. *VvFT* transcript levels are stable and those of *VFL* decrease. The latter response resembles what is observed for *VFL* in inflorescences of *FT*-transgenic plants. In tendrils, the transcripts levels of *VvFT* and *VFL* decrease in response to high gibberellins. So, we came up with three contrasting pictures with respect to gibberellins role's depending on the tissue.

On the basis of our data, we infer that *FT* transcript levels are constitutively maintained low in latent buds. Also, *VFL* expression is not directly repressed by gibberellins in grapevine [38], in contrast to the situation in *Arabidopsis*. Thus, we propose that the increase of *VFL* induced by insensitivity to gibberellins content in the latent bud involves an indirect step mediated by *FT*. In the course of tendrils differentiation, at their tip, meristematic tissues tend to develop into a solitary flower. In response to gibberellins, these tissues will develop numerous flower meristems, so those tendrils are transformed into an inflorescence finally leading to a bunch-like structure instead.

In the course of differentiation of the rachis, high levels of *VFL* are balanced by low levels of *TFL1*, thus leading to rather small inflorescence structure. *VFL* reduction in dwarf and 41B-*FT* as soon as this differentiation step reaches an inflorescence stage, suggest that *FT* and gibberellins do not influence significantly the inflorescence development.

So, depending on the differentiation stage, gibberellins and *FT* either contribute to the same fate or act on an opposite manner. Tissue-specific factors are most likely involved. Among them, transcription factors or/and miRNA are candidates of choice (Figure 6). The wild-type developmental characteristics of a latent bud and the resulting flowering involve the contribution of *FT* and gibberellins (Figure 6). The arm bears in an alternate manner a N0 node, a N1 node carrying an inflorescence or a tendril, the same for N2, etc. The number of iterations carrying inflorescences is specific to accessions, thus suggesting a genetic basis. Our data suggest that fine tuning of GA/*FT* gradients, particularly in the complex meristematic structure, *i.e.* the latent bud where most important fates are established, can contribute to this complex architecture and explain the quite frequent alterations observed in the vineyards as a response to abiotic stress. Our work emphasizes the importance of a true functional analysis *in planta* for a given species to understand complex and important developmental issues such as flowering of crop plants.

Conclusions

The study of mutants and gene expression allowed us to better understand the development of flowers or tendrils in vine. Compared to *Arabidopsis*, *FT* integrates the signals of photoperiod and the protein moves to SAM. In grapevine, this gene may have an early integration role for the development of a vegetative meristem to that of a flower or a tendril to an inflorescence. By now, the transport of *VvFT* and its direct interaction with *VFL* still need to be documented in grapevine. Gibberellins have a role in the development of tendril via *VvFT*. The balance is sensitive, and when *VvFT* transcripts are too abundant, flower buds form at the tip of tendrils.

Methods

Plant material, initiation of embryogenic callus and plant regeneration

The accession 41B (*V. vinifera* Muscat x *V. berlandieri*) was grown in the field, while the Pinot Meunier CTPS 458, Riesling CPTS 49 and Pinot Meunier-derived dwarf lines were grown in growth-chambers. In the latter case, the plants were grown at 28/26°C under a 16 h light regime of 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (Osram HQI-T400WN and NAV-T400W4Y), RH 80-90% and fertilized with nutritive solution type Plantprod (NPK, 15-10-30). Collection of immature inflorescences and all steps from embryogenic callus induction to plant regeneration were conducted following described protocols [43, 65]. The MPM01 medium [43] was used for long term maintenance of embryogenic callus.

Agrobacterium-mediated transformation

Friable embryogenic calli of 41B were sub-cultured at three-week intervals on MPM1 medium. Co-cultivation with *Agrobacterium* was performed for two days after transfer of the calli onto fresh medium. The *A. tumefaciens* strain used for transformation experiments was C58pMP90 harboring binary vector pFB8. The plasmid pFB8 contained the *VvFTHA* gene and the *GUS* gene cloned behind the CaMV 35S promoter. The vector confers resistance to kanamycin in plants. The *Agrobacterium* was maintained on YEB (Yeast extract broth) solid medium supplemented with

rifampicin (50 mg.L⁻¹), kanamycin (50 mg.L⁻¹), gentamycin (20 mg.L⁻¹). The bacterium was grown overnight on an orbital shaker at 28°C and 200 rpm in YEB liquid medium containing antibiotics. When optical density (OD₆₀₀) reached 0.8, the culture was centrifuged at 3500 *g* for 10 min and re-suspended in fresh YEB supplemented with antibiotics for an additional 2 h culture. Transformation was conducted as described in Krastanova [66]. However, all media were replaced by MPM1 basis for selection of transgenic cells resistant to kanamycin (25 mg. L⁻¹) and Cefotaxime 600 mg.L⁻¹ [65].

After 3 weeks, resistant calli were picked and cultured at 28°C in dark on MPM1 with cefotaxime (400 mg.L⁻¹) supplemented (or not) with kanamycin (25 mg.L⁻¹). In contrast, the dwarf line-derived embryos were transferred to Woody Plant Medium (WPM) with BAP (0.25 mg.L⁻¹) for better germination and plantlet development. All plants were propagated in vitro according to Perrin et al 2001 [65].

Total RNA extraction

Total RNA was extracted with the Qiagen RNeasy[®] mini kit (Qiagen Inc., USA), using an extraction buffer supplemented with PVP40 (10 mg. mL⁻¹). The RTL buffer was used for latent buds and RLC buffer for inflorescences, leaves and tendrils. The RNase-Free DNase set (Qiagen) was used to remove DNA traces. Total RNA integrity was verified by agarose gel electrophoresis. (Qiagen Cat. No 79254).

Reverse-transcription polymerase chain reaction

For the characterization of *VvFt* transgenic plants, first strand cDNA was synthesized with 500 ng RNA and specific primer 5'TTAGCGGCCGCACTGAGCA 3' (FTHA 7R) using reverse transcriptase Superscript II[®] (Invitrogen) according to manufacturer's protocol. For the quantitative analysis, first-strand cDNA synthesis was carried out from 500ng of total RNA for each sample using oligo(dT)18-20 according to the manufacturer's instructions (Superscript III[®]Invitrogen). Then, each RT product was diluted 5 times for the qPCR.

Polymerase chain reaction

The PCR was performed as described above with 0.5-1 µl cDNA mix. A positive control was run for each sample using the primer 5' GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGC 3' (forward) and 5' TCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTG 3' (reverse) to amplify the cDNA corresponding to 18S-rRNA. The cDNAs were subjected to amplification according to the manufacturer with Taq DNA Polymerase recombinant (Cat No 10342 Invitrogen). Amplification were realized in a Robocycler® (Stratagene, La Jolla, CA) in a 25µl reaction as follows: 95°C for 5 min (denaturation), 40 cycles of 95°C for 45 sec, 62°C for 45 sec, 72°C for 1 min (annealing and elongation) and 72°C for 10 min (final elongation). The PCR analysis used 5'TTAGCGGCCGCACTGAGCA 3' (FTHA 7R) and 5'ATGCCYAGGGAAGGGATC 3' (FT8S). Fragment lengths of 645 pb for FT and 350 pb for 18S-rRNA respectively were expected.

Quantitative polymerase chain reaction

The Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR® ASSAYw from Eurogentec was used for the qPCR according to the protocol supplied by the manufacturer. The following primer sequences were used: 5' GCACTTCTCACCGCGCTCTTTGGC 3'(VFL7R)-5'GTGACGGAGCCAGGAGAGGTTGC 3'(VFL22S) and 5'CCAGCAAGGTCAAGACGAAGGATAGC 3' (ActQ1R) and 5'TGTTGCCATTTCAGGCTGTTCTTTCTC 3' (ActQ1S) and 5'GTACTCCCTTAGGTTCCGATTAC 3' (VvFTe12R) and 5'AAGTAGCAAATGGCTGTGAGTTC 3' (VvFTe12S) primer 150nM for *VFL* and 300nM for *VvFT*, (ref gene *VFL* GSVIVT00018048001, *VVFT* GSVIVT00012870001) T_m of *VFL* T_m = 69°C and for *VvFT* T_m = 67°C. The cycle starts with 95°C for 5 min (denaturation), 45 cycles of 95°C for 15 sec, 67°C or 69°C for 20 sec, 72°C for 20 sec (annealing and elongation) and 80,5°C for 10 sec for the data collection and real time analysis. Then, starting from 55°C, the temperature increases every 10 sec of 0.5°C to produce a melting curve data collection and analysis enabled. Quantitative PCR analyses were performed with a BioRad iCycler iQ using SYBR Green (each experiment was repeated four times for each gene). These data allowed calculation of a standard deviation. The quantitative RT-PCR results were carefully checked by

(i) excluding results with cycle threshold (Ct), (ii) controlling melting curve of the amplified products, and (iii) finally checking the length of the amplified product by electrophoresis. The reference *ACTIN* gene was used as an internal control for normalization the Ct value. Relative values were calculated using the RNAs from the Riesling accession CTPS 49 as the reference sample. The expression levels were calculated using the mathematical model of Pfaffl (2001) [45]. By definition, the expression level obtained for the accession CTPS 49 was equal to 1.

Protein analysis

Total protein from plant material (100 mg) was extracted in 300 μ L of extraction buffer (500 mM sucrose, 500 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 10% PVPP, 4 mM ascorbic acid, 5 mM DTT and 1 tablet per 50 mL of protease inhibitor cocktail (Roche)). The quantity of total soluble protein was determined by the Bradford method and the bovine serum albumin (BSA) was used as standard.

For western blot, total soluble protein was mixed with 4x buffer Laemmli (250 mM Tris-HCl, 8% SDS, 0.1% Bromophenol Blue, 40% glycerol and 10% mercaptoethanol [pH 6.8]) and incubated at 100°C for 10 min. The PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) was used as a protein marker. The proteins were separated by SDS-PAGE through a 12% acrylamide gel. The proteins were blotted onto a Hybond nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, UK). Total protein was assessed by staining of the membrane Ponceau Red (0.2% Ponceau in 1% acetic acid) and blocked in 5% skim milk and TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 [pH 8]). Primary antibody (HA monoclonal antibody, Roche, Germany, 12CA5) was diluted in 1:850 and incubated for 2 h at room temperature. After 4 washes with TBST in 2% skim milk, the membrane was incubated with secondary anti-mouse Ig-HRP antibody (GE Healthcare) at 1:3000 dilution for 1 hour at RT. Membrane was washed 6x with TBST and signal detection was conducted using the ECL western blotting chemiluminescent detection system (GE Healthcare).

Characterization of the GAI homologues of the dwarf rapid cycling line

DNA was isolated from leaves of Pinot Meunier dwarf line using the DNeasy Plant mini kit (Qiagen Inc., USA). DNA amplification used 5'GTTCCGAGACCCACCCTCTGC 3' (1F) and 5' CGGTCATACAAGCGGGTTAGGG 3' (1R) to span the conserved region of the 3 *GAI* alleles (70 ng plant DNA, 0.25µM primers, 1U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), dNTP 10mM; denaturation 5mn, 35 cycles of denaturation, hybridization at 63°C and elongation at 68°C and final elongation at 68°C. A 1955bp-amplified fragment was obtained, as controlled after gel electrophoresis on a 0.8% agarose gel and purified using QIAquick gel extraction kit and quantified. The PCR products were cloned into the pCR-XL-TOPO vector using the "TOPO XL PCR Cloning kit (cat N° K7030-20 Invitrogen). The plasmid inserts from kanamycin-resistant (50µg/ml) colonies were sequenced on both strands with primers covering full gene (see above) and internal primers (5' AGTTCCACCGAGTCCGCTCG 3' 2F, 5' GTTCAAGCATGGATGCGTCG 3' 2R, 5' CAGGAAGCCAACCACAACGGC 3' 3F, and 5' GTTGGCTGTAGCTGAAGTCGTGGG 3' 3R). The sequences were analyzed with bioinformatics software Vector NTI™.

Authors' contributions

MR, CS and IS carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment. MP, CG, and JM produced the dwarf line, the transgenic line and characterized their phenotype on the phenology and molecular levels. RF isolated the VvFT cDNA and produced the constructs. DP contributed to FT transgenic production and their molecular analysis. JM and SD conceived the study, its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We acknowledge the CIVA (Comité Interprofessionnel des Vins d'Alsace) and the Conseil Régional Alsace for the PhD stipend of M. Romon. This project was supported by the ANR grant 'GrapeFunGen_ANR07GPLA006'. We thank Messaoud Meddar for technical assistance.

References

1. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin [<http://www.oiv.int/oiv/cms/index>]
2. Carmona MJ, Cubas P, Martínez-Zapater JM: **VFL, the grapevine *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate.** *Plant physiology* 2002, **130**:68–77.
3. Judd WS: *Plant Systematics: a Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates; 1999.
4. Carmona MJ, Chaïb J, Martínez-Zapater JM, Thomas MR: **A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine.** *Journal of experimental botany* 2008, **59**:2579–96.
5. Peña L, Martín-Trillo M, Juárez J, Pina J a, Navarro L, Martínez-Zapater JM: **Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time.** *Nature biotechnology* 2001, **19**:263–7.
6. Mullins MG, Bouquet A, Williams LE: *Biology of the Grapevine*. Cambridge University Press; 1992.
7. Carmona MJ, Calonje M, Martínez-Zapater JM: **The *FT/TFL1* gene family in grapevine.** *Plant molecular biology* 2007, **63**:637–50.
8. Calonje M, Cubas P, Martínez-Zapater JM, Carmona MJ: **Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine.** *Plant physiology* 2004, **135**:1491–501.
9. Srinivasan C, Mullins MG: **Physiology of flowering in the grapevine -- a review.** *Am J Enol Vitic* 1981, **32**:47–63.
10. Srinivasan C, Mullins MG: **Reproductive anatomy of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): origin and development of the anlage and its derivatives.** *Annals of Botany* 1976, **40**:1079–1084.
11. Srinivasan C, Mullins MG: **Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.): formation of inflorescences in vitro by isolated tendrils.** *Plant physiology* 1978, **61**:127–30.
12. Halevy AH: *CRC Handbook of Flowering*. CRC Press; 1989.
13. Ausín I, Alonso-Blanco C, Martínez-Zapater J-M: **Environmental regulation of flowering.** *The International journal of developmental biology* 2005, **49**:689–705.
14. Jaeger KE, Graf A, Wigge P a: **The control of flowering in time and space.** *Journal of experimental botany* 2006, **57**:3415–8.
15. Wigge P a, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, Weigel D: **Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*.** *Science* 2005, **309**:1056–9.
16. Parcy F: **Flowering: a time for integration.** *The International journal of developmental biology* 2005, **49**:585–93.

17. Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G: **Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering.** *Science* 2004, **303**:1003–6.
18. Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G: **CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*.** *Nature* 2001, **410**:1116–20.
19. Jaeger KE, Wigge P a: **FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*.** *Current biology* 2007, **17**:1050–4.
20. Michaels SD, Amasino RM: **FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering.** *The Plant cell* 1999, **11**:949–56.
21. Moon J, Suh S-S, Lee H, Choi K-R, Hong CB, Paek N-C, Kim S-G, Lee I: **The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*.** *The Plant Journal* 2003, **35**:613–623.
22. Simpson GG, Dean C: ***Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time?** *Science* 2002, **296**:285–9.
23. Corbesier L, Coupland G: **The quest for florigen: a review of recent progress.** *Journal of experimental botany* 2006, **57**:3395–403.
24. Kieffer M, Davies B: **Developmental programmes in floral organ formation.** *Seminars in cell & developmental biology* 2001, **12**:373–80.
25. Lohmann JU, Hong RL, Hobe M, Busch M a, Parcy F, Simon R, Weigel D: **A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*.** *Cell* 2001, **105**:793–803.
26. Koornneef M, Hanhart CJ, Van der Veen JH: **A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*.** *Molecular & general genetics : MGG* 1991, **229**:57–66.
27. Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, Coupland G: **FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*.** *Science* 2007, **316**:1030–3.
28. Mathieu J, Warthmann N, Küttner F, Schmid M: **Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*.** *Current biology* 2007, **17**:1055–60.
29. Hisamatsu T, King RW: **The nature of floral signals in *Arabidopsis*. II. Roles for FLOWERING LOCUS T (FT) and gibberellin.** *Journal of experimental botany* 2008, **59**:3821–9.
30. Kinoshita T, Ono N, Hayashi Y, Morimoto S, Nakamura S, Soda M, Kato Y, Ohnishi M, Nakano T, Inoue S-I, Shimazaki K-I: **FLOWERING LOCUS T regulates stomatal opening.** *Current biology* 2011, **21**:1232–8.
31. Bradley D, Carpenter R, Copsey L, Vincent C, Rothstein S, Coen E: **Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*.** *Nature* 1996, **379**:791–797.

32. Hanzawa Y, Money T, Bradley D: **A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**:7748–53.
33. Ahn JH, Miller D, Winter VJ, Banfield MJ, Lee JH, Yoo SY, Henz SR, Brady RL, Weigel D: **A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1.** *The EMBO journal* 2006, **25**:605–14.
34. Kobayashi Y: **A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals.** *Science* 1999, **286**:1960–1962.
35. Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T: **FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex.** *Science* 2005, **309**:1052–6.
36. Joly D, Perrin M, Gertz C, Kronenberger J, Demangeat G, Masson JE: **Expression analysis of flowering genes from seedling-stage to vineyard life of grapevine cv. Riesling.** *Plant Science* 2004, **166**:1427–1436.
37. Almada R, Cabrera N, Casaretto J a, Ruiz-Lara S, González Villanueva E: **VvCO and VvCOL1, two CONSTANS homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds.** *Plant cell reports* 2009, **28**:1193–203.
38. Carmona MJ, Cubas P, Calonje M, Martínez-Zapater JM: **Flowering transition in grapevine (Vitis vinifera L.)** This review is one of a selection of papers presented at the symposium on Vitis at the XVII International Botanical Congress held in Vienna, Austria, 2005. *Canadian Journal of Botany* 2007, **85**:701–711.
39. Weigel D, Nilsson O: **A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse.** *Nature* 1995, **377**:495–500.
40. He Z, Zhu Q, Dabi T, Li D, Weigel D, Lamb C: **Transformation of rice with the Arabidopsis floral regulator LEAFY causes early heading.** *Transgenic research* 2000, **9**:223–7.
41. Boss PK, Thomas MR: **Association of dwarfism and floral induction with a grape “green revolution” mutation.** *Nature* 2002, **416**:847–50.
42. Turnbull C: **Long-distance regulation of flowering time.** *Journal of experimental botany* 2011, **62**:4399–4413.
43. Perrin M, Gertz C, Masson JE: **High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotypes grown worldwide.** *Plant Science* 2004, **167**:1343–1349.
44. Jaillon O, Aury J-M, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Hugueney P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, et al.: **The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla.** *Nature* 2007, **449**:463–7.

45. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic acids research* 2001, **29**:45e–45.
46. Hisada S, Akihama T, Endo T, Moriguchi T, Omura M: **Expressed Sequence Tags of Citrus Fruit during Rapid Cell Development Phase.** *Journal of the American Society for Horticultural Science* , **122**:808–812.
47. Kardailsky I: **Activation tagging of the floral inducer FT.** *Science* 1999, **286**:1962–1965.
48. Böhlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, Brunner AM, Jansson S, Strauss SH, Nilsson O: **CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees.** *Science* 2006, **312**:1040–3.
49. Hsu C, Liu Y, Luthe DS, Yuceer C: **Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering.** *The Plant cell* 2006, **18**:1846–61.
50. Hattasch C, Flachowsky H, Kapturska D, Hanke M-V: **Isolation of flowering genes and seasonal changes in their transcript levels related to flower induction and initiation in apple (*Malus domestica*).** *Tree Physiology* 2008, **28**:1459–1466.
51. Kotoda N, Wada M: **MdTFL1, a TFL1-like gene of apple, retards the transition from the vegetative to reproductive phase in transgenic *Arabidopsis*.** *Plant Science* 2005, **168**:95–104.
52. Gyllenstrand N, Clapham D, Källman T, Lagercrantz U: **A Norway spruce FLOWERING LOCUS T homolog is implicated in control of growth rhythm in conifers.** *Plant physiology* 2007, **144**:248–57.
53. Endo T, Shimada T, Fujii H, Kobayashi Y, Araki T, Omura M: **Ectopic expression of an FT homolog from citrus confers an early flowering phenotype on trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.).** *Transgenic research* 2005, **14**:703–12.
54. Navarro C, Abelenda J a., Cruz-Oró E, Cuéllar C a., Tamaki S, Silva J, Shimamoto K, Prat S: **Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T.** *Nature* 2011:0–4.
55. Jackson SD: **Multiple signaling pathways control tuber induction in potato.** *Plant physiology* 1999, **119**:1–8.
56. Wigge P a: **FT, a mobile developmental signal in plants.** *Current biology* 2011, **21**:R374–8.
57. Shalit A, Rozman A, Goldshmidt A, Alvarez JP, Bowman JL, Eshed Y, Lifschitz E: **The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**:8392–7.
58. Rinne PLH, Welling A, Vahala J, Ripel L, Ruonala R, Kangasjärvi J, Van der Schoot C: **Chilling of dormant buds hyperinduces FLOWERING LOCUS T and recruits GA-inducible 1,3-beta-glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*.** *The Plant cell* 2011, **23**:130–46.
59. Boss PK, Sreekantan L, Thomas MR: **A grapevine TFL1 homologue can delay flowering and alter floral development when overexpressed in heterologous species.** *Functional Plant Biology* 2006:31–41.

60. Huglin P, Schneider C: *Biologie Et Écologie De La Vigne*. Tec & doc-Lavoisier; 1998.
61. Balasubramanian S, Sureshkumar S, Lempe J, Weigel D: **Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature.** *PLoS genetics* 2006, **2**:e106.
62. Blázquez MA, Weigel D: **Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*.** *Nature* 2000, **404**:889–92.
63. Mutasa-Göttgens E, Hedden P: **Gibberellin as a factor in floral regulatory networks.** *Journal of experimental botany* 2009, **60**:1979–89.
64. Wilson RN, Heckman JW, Somerville CR: **Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days.** *Plant physiology* 1992, **100**:403–8.
65. Perrin M, Martin D, Joly D, Demangeat G, This P, Masson JE: **Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells.** *Plant Science* 2001, **161**:107–116.
66. Krastanova S, Perrin M, Barbier P, Demangeat G, Cornuet P, Bardonnnet N, Otten L, Pinck L, Walter B: **Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus.** *Plant Cell Reports* 1995, **14**:550–554.

Figures

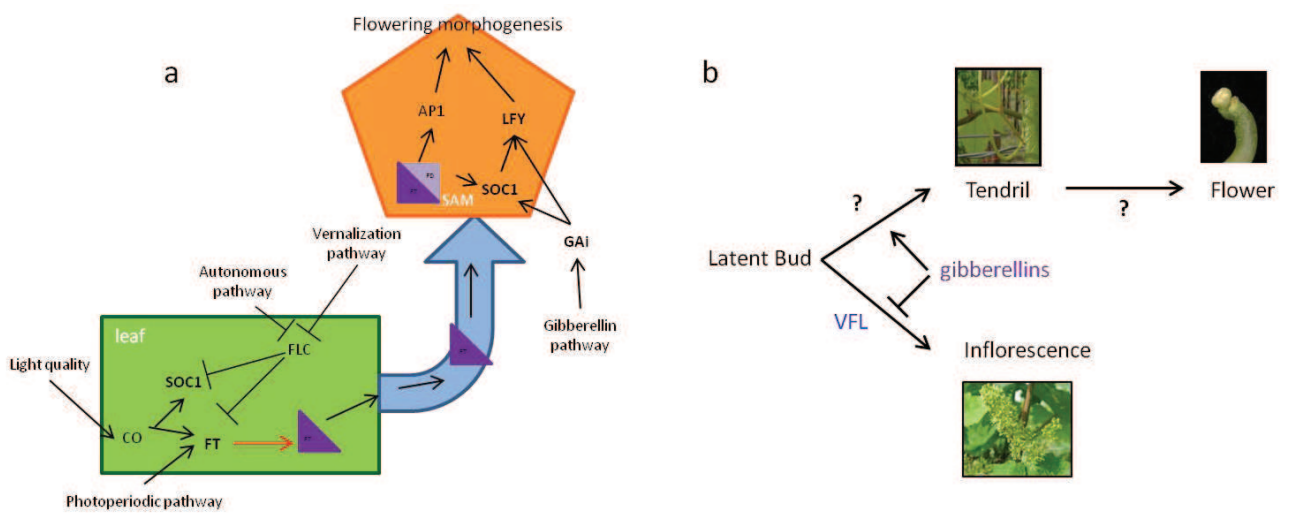


Figure 1 - Models of pathways controlling flower initiation

(a) In *Arabidopsis thaliana*, different activation pathways triggered by photoperiod, light quality and gibberellins control flowering. *FT* and *SOC1* play a key role. The *FT* protein is transported from the leaf to the meristem, where it activates flowering via *AP1* or *LFY*. The GA pathway activates *LFY* and *SOC1*. (b) In grapevine, flowering inductive signals are so far unknown. This reproductive developmental program is associated with an increase in *VFL* expression and is repressed by gibberellins. Gibberellins promote the development of tendrils through a mechanism which is unknown so far.

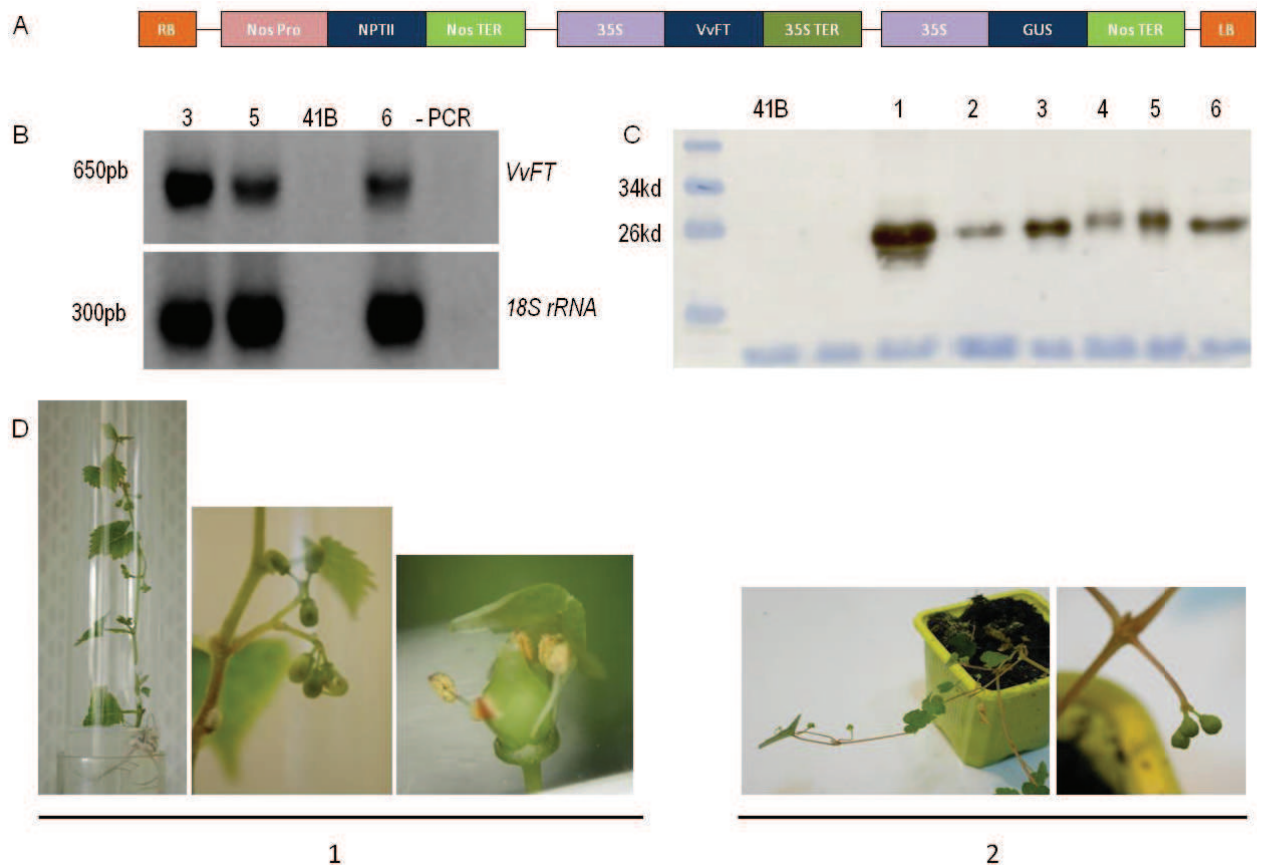


Figure 2 - Characterization of transgenic plants overexpressing *VvFT*

(a) Construction used for *VvFT* overexpression. LB and RB, left and right borders of the T-DNA, respectively; NOS Pro, Nopaline synthase promoter; NOS TER, Nopaline synthase terminator; 35S, CaMV 35S promoter; 35S TER, CaMV 35S terminator; *NPTII*, Neomycin Phosphotransferase gene; *VvFT*, *Vitis vinifera* Flowering locus T; *GUS*, beta-glucuronidase. (b) Semi-quantitative RT-PCR analysis of transgenic 41B-FT plants ; RNA was extracted from leaves of *in vitro* grown plants; 18S cDNA was used as a quantitative control of loading; -RT and -PCR are negative controls from the RT and the PCR; *VvFT* is expressed in each transgenic plant (650pb). (c) Western blot analysis of transgenic 41B-FT plants. Protein was extracted from vitro plants. Primary antibody (HA monoclonal antibody) was used and a secondary anti-mousse Ig-HRP antibody was incubated and detected with a chemiluminescent detection system. The FT proteins from the construction were detected in each transgenic plant (26Kd) and are absent in the 41B plant. (d) Phenotypes and flowering of grapevine 41B-FT transformed with the *VvFT* constructs grown *in vitro* (1) and in greenhouse conditions (2).

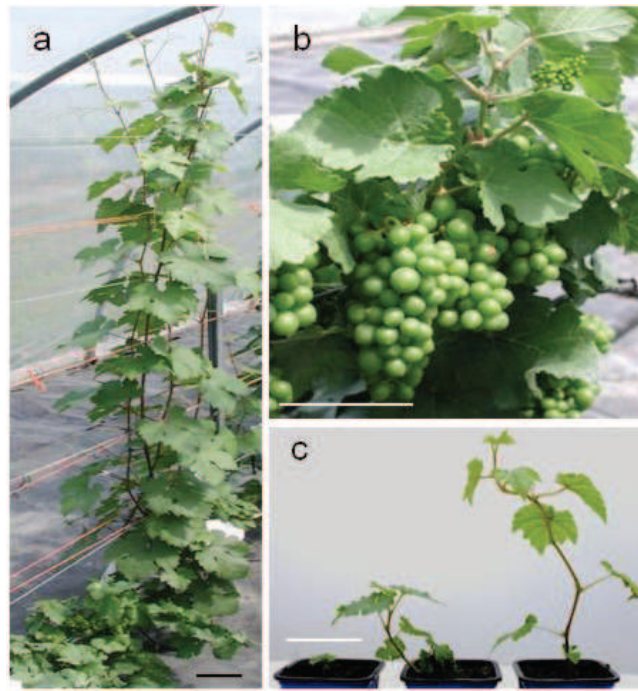


Figure 3 - Pinot Meunier dwarf line

(a) Plant sizes and bunch production in the Pinot-derived Line 40024 (right) and the Pinot Meunier-derived dwarf line (left). (b) Green bunches (at preveraison stage) on the dwarf plants. (c) 2 weeks-old segregating self-progeny. (*gai/gai*; *GAI/gai* and *GAI/GAI* from left to right), (Bars = 50 mm).

Polymorphic tags showing allelic differences from sequences detailed below

A-VvGAI-1	CTTCT
A-Vvgsi-1	CTACT
A-VvGAI-1b	CCTTC
F-VvGAI-1	CCTTT
F-Vvgsi-1	TTACT
F-VvGAI-1b	CCTCT

A-VvGAI-1	GAAGAGGGAGTATCATCATCTCATCACCCTTCTCCACGTCCCCACCGGCAAGGG 180
A-Vvgsi-1	GAAGAGGGAGTATCATCATCTCATCACCCTTCTCCACGTCCCCACCGGCAAGGG
A-VvGAI-1b	GAAGAGGGAGTATCATCATCTCATCACCCTTCTCCACGTCCCCACCGGCAAGGG
F-VvGAI-1	GAAGAGGGAGTATCATCATCTCATCACCCTTCTCCACGTCCCCACCGGCAAGGG
F-Vvgsi-1	GAAGAGGGAGTATCATCATCTCATCACCCTTCTCCACGTCCCCACCGGCAAGGG
F-VvGAI-1b	GAAGAGGGAGTATCATCATCTCATCACCCTTCTCCACGTCCCCACCGGCAAGGG

A-VvGAI-1	TAAGATGTGGGATGCCGACCCCCAGCAAGACCGTGGCATGGATGAGCTTCTCGCTGTTTT 240
A-Vvgsi-1	TAAGATGTGGGATGCCGACCCCCAGCAAGACCGTGGCATGGATGAGCTTCTCGCTGTTTT
A-VvGAI-1b	TAAGATGTGGGATGCCGACCCCCAGCAAGACCGTGGCATGGATGAGCTTCTCGCTGTTTT
F-VvGAI-1	TAAGATGTGGGATGCCGACCCCCAGCAAGACCGTGGCATGGATGAGCTTCTCGCTGTTTT
F-Vvgsi-1	TAAGATGTGGGATGCCGACCCCCAGCAAGACCGTGGCATGGATGAGCTTCTCGCTGTTTT
F-VvGAI-1b	TAAGATGTGGGATGCCGACCCCCAGCAAGACCGTGGCATGGATGAGCTTCTCGCTGTTTT

A-VvGAI-1	CAATCAAGCCATCCTTGAAGCCTTCGAGGGGAAAAAGCGGGTTCACGTATCGATTTCAG 1080
A-Vvgsi-1	CAATCAAGCCATCCTTGAAGCCTTCGAGGGGAAAAAGCGGGTTCACGTATCGATTTCAG
A-VvGAI-1b	CAATCAAGCCATCCTTGAAGCCTTCGAGGGGAAAAAGCGGGTTCACGTATCGATTTCAG
F-VvGAI-1	CAATCAAGCCATCCTTGAAGCCTTCGAGGGGAAAAAGCGGGTTCACGTATCGATTTCAG
F-Vvgsi-1	CAATCAAGCCATCCTTGAAGCCTTCGAGGGGAAAAAGCGGGTTCACGTATCGATTTCAG
F-VvGAI-1b	CAATCAAGCCATCCTTGAAGCCTTCGAGGGGAAAAAGCGGGTTCACGTATCGATTTCAG

A-VvGAI-1	CTACTACTCCACTCTGTTTGACTCATTGGAAGGGTGTGGTGTGTCCCGGTGAACACCCA 1560
A-Vvgsi-1	CTACTACTCCACTCTGTTTGACTCATTGGAAGGGTGTGGTGTGTCCCGGTGAACACCCA
A-VvGAI-1b	CTACTACTCCACTCTGTTTGACTCATTGGAAGGGTGTGGTGTGTCCCGGTGAACACCCA
F-VvGAI-1	CTACTACTCCACTCTGTTTGACTCATTGGAAGGGTGTGGTGTGTCCCGGTGAACACCCA
F-Vvgsi-1	CTACTACTCCACTCTGTTTGACTCATTGGAAGGGTGTGGTGTGTCCCGGTGAACACCCA
F-VvGAI-1b	CTACTACTCCACTCTGTTTGACTCATTGGAAGGGTGTGGTGTGTCCCGGTGAACACCCA

Figure 4 - Alignment of the VvGAI homologues after Boss and Thomas, A and this study, F.

(primer sets 1f-3r, 2f-2r, 3f-1r, respectively).

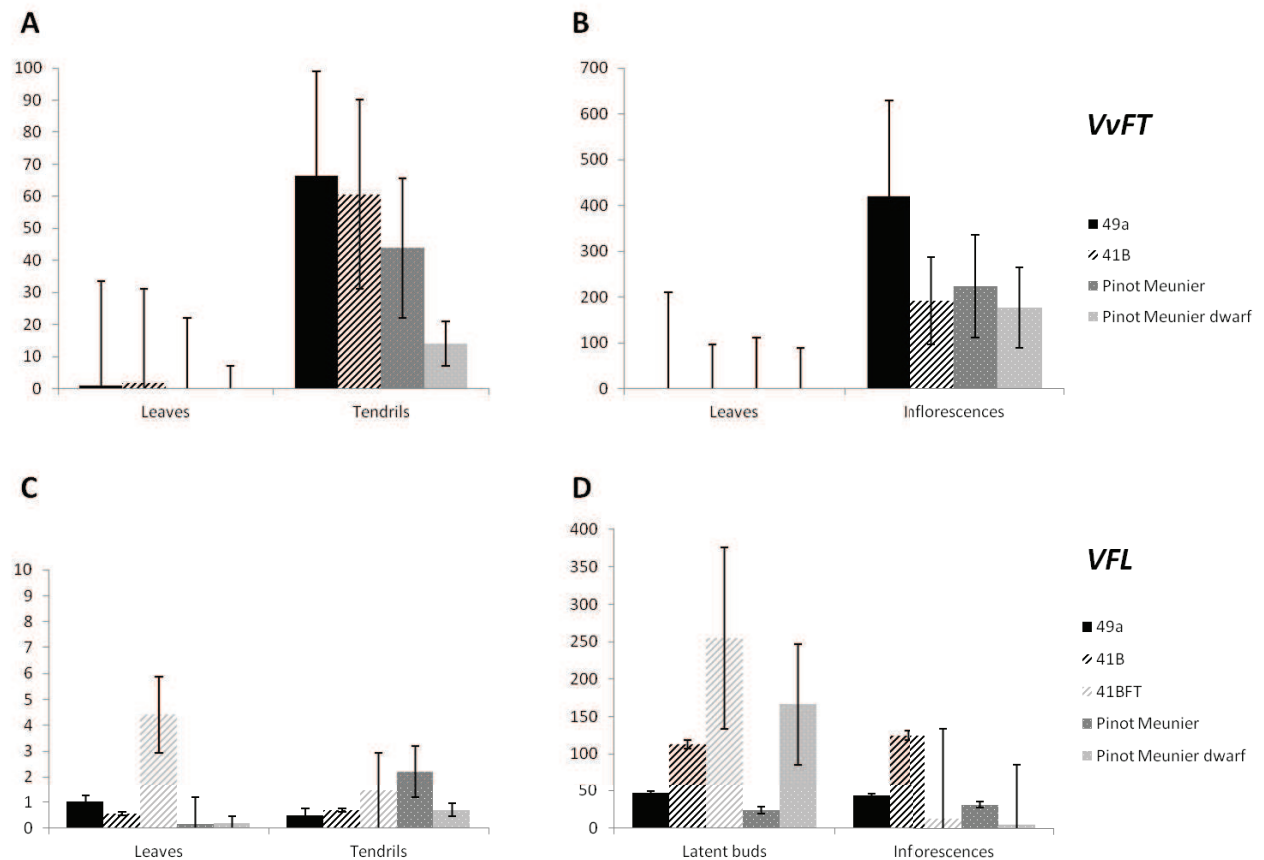


Figure 5 - Relative expression levels of *VvFT* and *VFL* in different tissues from different grapevine accessions

Each experiment was repeated four times for each gene. The reference ACTIN gene was used as an internal control for normalization. Relative values were calculated using the RNAs from the leaf of the Riesling accession CTPS 49 as the reference sample. The expression levels were calculated using the mathematical model of Pfaffl [45].

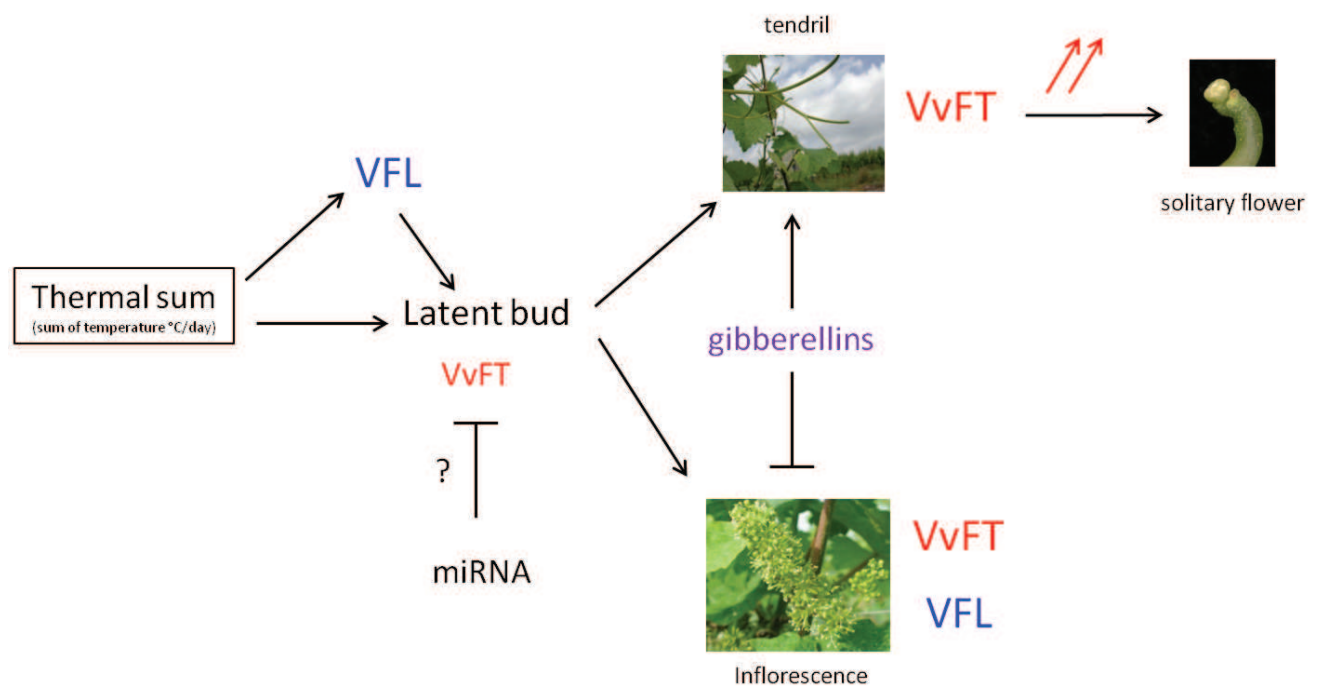
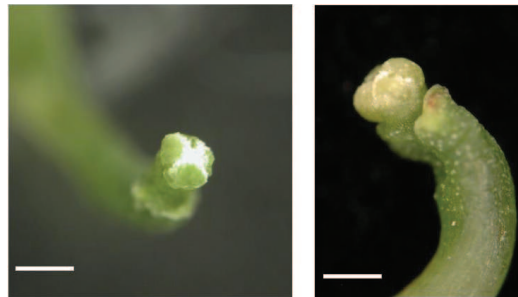


Figure 6 - New schematic models of pathways controlling flower initiation in grapevine

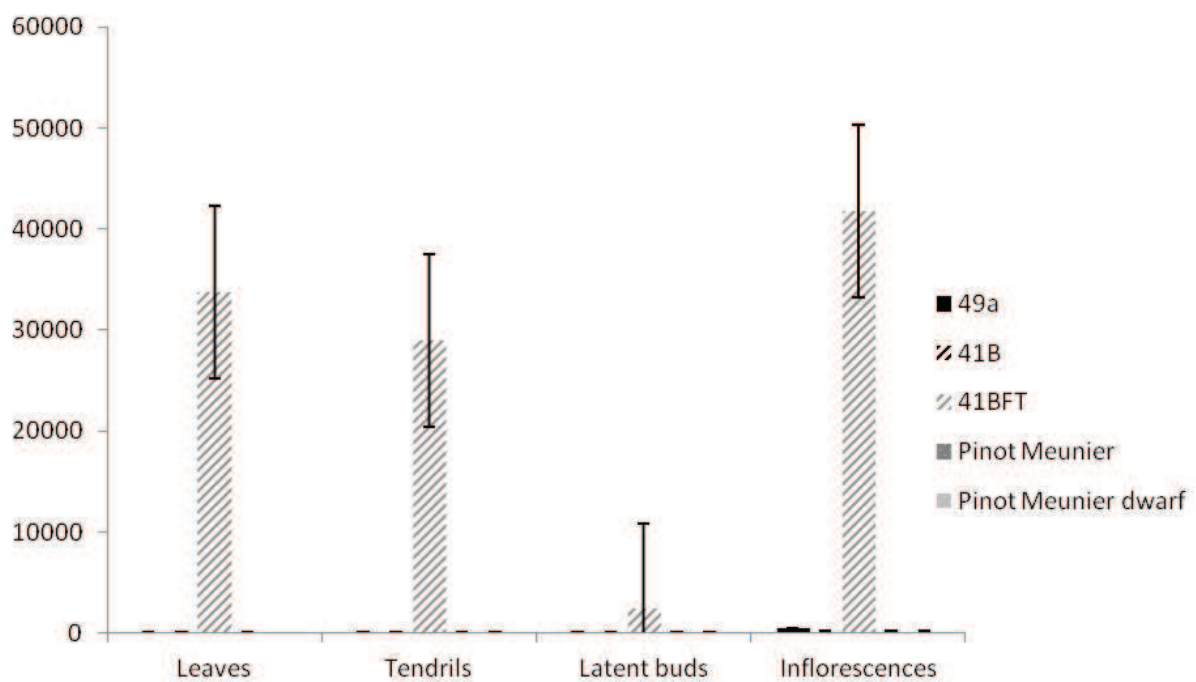
In grapevines, we know that the temperature controls the flowering time and not the photoperiod. *VFL* plays a key role in the latent buds and the development of floral primordia. In inflorescences, *VFL* and *VvFT* are expressed and maybe control the development of floral organ or floral development. Gibberellins block the formation of flower and promote the development of tendrils. In tendrils *VvFT* is highly expressed, but a strong expression could induce the formation of a solitary flower.

Additional files



Additional file 1 – Photos of a solitary flower

A solitary flower at the tip of the tendril (bar = 1 mm).



Additional file 2 – Relative expression levels of *VvFT* in different tissues from 41B-FT and 41B wild type

The ACTIN gene was used as an internal control for normalization. The expression levels were calculated using the mathematical model of Pfaffl [45].

III.3. ***Conclusion et perspectives de la publication***

Nous avons créé deux lignées de vignes intéressantes pour l'étude de la floraison ; un porte greffe 41B transformé avec une construction contenant le gène *VvFT* sous contrôle du promoteur 35S et un Pinot Meunier nain régénéré par embryogénèse somatique à partir de la couche cellulaire L1 du Pinot Meunier (clone 458). A partir des séquences des gènes *LEAFY* et *FT*, impliquées dans l'initiation de la floraison chez *Arabidopsis*, nous avons recherché les gènes orthologues dans l'objectif d'étudier le mécanisme de mise en place de la floraison chez la vigne.

Chez la vigne, la surexpression du gène *VvFT* entraîne la formation de boutons floraux très précoces comme cela est également le cas chez *Arabidopsis* (Carmona, Calonje, et al., 2007; Kobayashi, 1999; Kardailsky, 1999). Nos analyses du niveau d'expression ont permis de mettre en évidence une expression du gène *VvFT* dans les inflorescences et les vrilles, ce qui permet de conclure que *FT* aurait alors un rôle dans le déterminisme des méristèmes qui se différencieraient, en épine chez le *Citrus* (Endo et al., 2005), ou encore en tubercule chez la pomme de terre (Navarro et al., 2011; Jackson, 1999). Chez la tomate, *SFT* (*FT* « homolog » de la tomate) aurait un rôle dans la maturation des feuilles, la croissance de la tige ou la formation de zone d'abscission (Wigge, 2011; Shalit et al., 2009). Tous ces rôles divers de *FT* font fortement penser qu'il est un élément mobile, contrôlant la floraison mais aussi des « meristem-associated transitions » (Navarro et al., 2011).

La forte expression de *LFY* entraîne la formation de fleurs (Endo et al., 2005; Peña et al., 2001). Dans nos analyses, l'expression de *VFL* est plus forte chez le 41B transgénique sur-exprimant *VvFT*, ce qui indique que *VFL* pourrait être à l'origine de la formation d'inflorescences à la place des vrilles. Par contre, nous ne sommes pas capables de conclure quant à une action directe de *VvFT* sur *VFL*.

Chez la vigne, *VvFT* n'est pas exprimé dans les feuilles et nos résultats de RT-PCR quantitative le confirment. Par contre, la vigne étant sensible aux degrés jour, l'activation de *VvFT* par la température serait une voie possible. Des études complémentaires seraient à faire sur la protéine de la vigne, afin de mettre en évidence si elle circule, si elle fonctionne, éventuellement sous forme de dimère

comme c'est le cas chez la pomme (Mimida et al., 2011) ou *Arabidopsis* (Abe et al., 2005).

Contrairement à la vigne, une mutation dans le gène *GAI* entraîne un retard dans la floraison chez *Arabidopsis* pour qui l'activation de la floraison est indépendante de la photopériode mais activée via les gibbérellines et *FT*. (Balasubramanian et al., 2006; Wilson et al., 1992).

Le Pinot Meunier nain est caractérisé par de toutes petites vrilles et de nombreuses inflorescences. Les gibbérellines inhiberaient donc la formation d'inflorescences et favorisent la formation de vrilles inflorescentielles (Boss and Thomas, 2002). Nous avons montré que *VvFT* aurait aussi un rôle dans la mise en place de la vrille et serait certainement activé par les gibbérellines. Les gibbérellines inhiberaient l'expression de *VFL* favorisant ainsi l'apparition et la croissance des vrilles. En effet, nous avons montré que dans la vrille, l'expression de *VvFT* chez le nain est très faible alors qu'on a pu observer une augmentation du taux de *VFL* dans les bourgeons latents. Ceci démontre que l'activation de *VvFT* aurait aussi un rôle dans la mise en place de la vrille et serait activé par les gibbérellines. Une forte expression de *VvFT* dans les vrilles pourrait changer un certain équilibre et favoriser la formation de boutons floraux à leur extrémité terminant ainsi leur croissance en augmentant l'expression de *VFL*. En inhibant l'expression de *VFL*, les gibbérellines, favoriseraient donc l'apparition et la croissance des vrilles et limiteraient la formation des inflorescences.

Arabidopsis n'ayant pas de vrilles, il est difficile de comparer le mécanisme de mise en place de cet organe chez d'autres plantes, c'est pourquoi la publication du génome de la vigne en 2007 (Jaillon et al., 2007) est un outil de plus pour essayer de trouver d'autres gènes candidats ou partenaires afin de mieux comprendre la mise en place de la floraison chez une plante ligneuse.

Bibliographie de la partie I introduction générale et de la partie II floraison

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., and Araki, T.** (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**: 1052–6.
- Ahn, J.H., Miller, D., Winter, V.J., Banfield, M.J., Lee, J.H., Yoo, S.Y., Henz, S.R., Brady, R.L., and Weigel, D.** (2006). A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *The EMBO journal* **25**: 605–14.
- Alleweldt, G. and Dettweiler, E.** (1994). The genetic resources of Vitis : world list of grapevine collections 2nd edn. (BAZ IRZ Geilweilerhof: Siebeldingen).
- Almada, R., Cabrera, N., Casaretto, J. a, Ruiz-Lara, S., and González Villanueva, E.** (2009). VvCO and VvCOL1, two CONSTANS homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds. *Plant cell reports* **28**: 1193–203.
- Arabidopsis, T. and Initiative, G.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815.
- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J., and Weigel, D.** (2006). Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS genetics* **2**: e106.
- Bogs, J., Jaffé, F.W., Takos, A.M., Walker, A.R., and Robinson, S.P.** (2007). The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant physiology* **143**: 1347–61.
- Bond, D.M., Dennis, E.S., Pogson, B.J., and Finnegan, E.J.** (2009). Histone acetylation, VERNALIZATION INSENSITIVE 3, FLOWERING LOCUS C, and the vernalization response. *Molecular plant* **2**: 724–37.
- Boss, P.K., Sreekantan, L., and Thomas, M.R.** (2006). A grapevine TFL1 homologue can delay flowering and alter floral development when overexpressed in heterologous species. *Functional Plant Biology* **33** : 31–41.
- Boss, P.K. and Thomas, M.R.** (2002). Association of dwarfism and floral induction with a grape “green revolution” mutation. *Nature* **416**: 847–50.
- Boursiquot, J.-M. and This, P.** (1999). Essai de définition du Cépage. *Le Progrès agricole et viticole* **116**: 359–361.

- Bradley, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Rothstein, S., and Coen, E.** (1996). Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature* **379**: 791–797.
- Calonje, M., Cubas, P., Martínez-Zapater, J.M., and Carmona, M.J.** (2004). Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant physiology* **135**: 1491–501.
- Carbonneau, A., Jaillard, B., and Deloire, A.** (2007). *la vigne : physiologie, terroir, culture* (Dunod).
- Carmona, M.J., Calonje, M., and Martínez-Zapater, J.M.** (2007). The FT/TFL1 gene family in grapevine. *Plant molecular biology* **63**: 637–50.
- Carmona, M.J., Chaïb, J., Martínez-Zapater, J.M., and Thomas, M.R.** (2008). A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of experimental botany* **59**: 2579–96.
- Carmona, M.J., Cubas, P., Calonje, M., and Martínez-Zapater, J.M.** (2007). Flowering transition in grapevine (*Vitis vinifera* L.) This review is one of a selection of papers presented at the symposium on *Vitis* at the XVII International Botanical Congress held in Vienna, Austria, 2005. *Canadian Journal of Botany* **85**: 701–711.
- Carmona, M.J., Cubas, P., and Martínez-Zapater, J.M.** (2002). VFL, the grapevine FLORICAULA/LEAFY ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. *Plant physiology* **130**: 68–77.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., and Coupland, G.** (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**: 1030–3.
- Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Kobayashi, Y., Araki, T., and Omura, M.** (2005). Ectopic expression of an FT homolog from citrus confers an early flowering phenotype on trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic research* **14**: 703–12.
- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R., and Yanofsky, M.F.** (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **127**: 725–34.
- Ferrier, T.** (2008). les facteurs de transcription MYB et la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes dans la baie de raisin : analyse fonctionnelle et identification de nouveaux candidats.
- FranceAgriMer** FranceAgriMer. <http://www.franceagrimer.fr/>.
- Galet, P.** (1998). *Précis d'ampélographie pratique* (Impr. Charles Dehan).

- Galet, P.** (2000). Précis de viticulture: à l'usage des ingénieurs agronomes, des étudiants en agronomie et en oenologie, des techniciens des lycées agricoles, et des professionnels de la viticulture (Impr. Charles Dehan).
- Garner, W.W. and Allard, H.A.** (1920). Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants 1. *Monthly Weather Review* **48**: 415–415.
- Hartmann, U., Hohmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H., and Huijser, P.** (2000). Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **21**: 351–360.
- Hisamatsu, T. and King, R.W.** (2008). The nature of floral signals in *Arabidopsis*. II. Roles for FLOWERING LOCUS T (FT) and gibberellin. *Journal of experimental botany* **59**: 3821–9.
- Hocquigny, S., Pelsy, F., Dumas, V., Kindt, S., Heloir, M., and Merdinoglu, D.** (2004). Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome / National Research Council Canada* **47**: 579–89.
- Hoquigny, S.** (2003). La diversité génétique intra-variétale chez la vigne : caractérisation et origines. Université Louis Pasteur Strasbourg.
- Huglin, P. and Schneider, C.** (1998). Biologie et écologie de la vigne (Tec & doc-Lavoisier).
- Jackson, S.D.** (1999). Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant physiology* **119**: 1–8.
- Jaeger, K.E. and Wigge, P. a** (2007). FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Current biology* **17**: 1050–4.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., et al.** (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**: 463–7.
- Joly, D.** (2005). Genetique moleculaire de la floraison de la vigne.
- Joly, D., Perrin, M., Gertz, C., Kronenberger, J., Demangeat, G., and Masson, J.E.** (2004). Expression analysis of flowering genes from seedling-stage to vineyard life of grapevine cv. Riesling. *Plant Science* **166**: 1427–1436.
- Kardailsky, I.** (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* **286**: 1962–1965.
- Kaufmann, K., Wellmer, F., Muiño, J.M., Ferrier, T., Wuest, S.E., Kumar, V., Serrano-Mislata, A., Madueño, F., Krajewski, P., Meyerowitz, E.M.,**

- Angenent, G.C., and Riechmann, J.L.** (2010). Orchestration of floral initiation by APETALA1. *Science* **328**: 85–9.
- Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., and Hirochika, H.** (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* **304**: 982.
- Kobayashi, Y.** (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**: 1960–1962.
- Komiya, R., Ikegami, A., Tamaki, S., Yokoi, S., and Shimamoto, K.** (2008). Hd3a and RFT1 are essential for flowering in rice. *Development* **135**: 767–74.
- Lariguet, P. and Dunand, C.** (2005). Plant photoreceptors: phylogenetic overview. *Journal of molecular evolution* **61**: 559–69.
- Lee, J.H., Yoo, S.J., Park, S.H., Hwang, I., Lee, J.S., and Ahn, J.H.** (2007). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes & development* **21**: 397–402.
- Levadoux** (1956). Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera*. *Annales de l'amélioration des plantes* **6**: 59–118.
- Li, Q.-H. and Yang, H.-Q.** (2007). Cryptochrome signaling in plants. *Photochemistry and photobiology* **83**: 94–101.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Küttner, F., and Schmid, M.** (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Current biology* **17**: 1055–60.
- Michaels, S.D. and Amasino, R.M.** (2001). Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *The Plant cell* **13**: 935–41.
- Mimida, N., Kidou, S.-I., Iwanami, H., Moriya, S., Abe, K., Voogd, C., Varkonyi-Gasic, E., and Kotoda, N.** (2011). Apple FLOWERING LOCUS T proteins interact with transcription factors implicated in cell growth and organ development. *Tree physiology* **31**: 555–66.
- Moon, J., Suh, S.-S., Lee, H., Choi, K.-R., Hong, C.B., Paek, N.-C., Kim, S.-G., and Lee, I.** (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **35**: 613–623.
- Mullins, M.G., Bouquet, A., and Williams, L.E.** (1992). *Biology of the grapevine* (Cambridge University Press).
- Navarro, C., Abelenda, J. a., Cruz-Oró, E., Cuéllar, C. a., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K., and Prat, S.** (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature*: 0–4.
- Parcy, F.** (2005). Flowering: a time for integration. *The International journal of developmental biology* **49**: 585–93.

- Pelsy, F.** (2010). Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties. *Heredity* **104**: 331–40.
- Peña, L., Martín-Trillo, M., Juárez, J., Pina, J. a, Navarro, L., and Martínez-Zapater, J.M.** (2001). Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature biotechnology* **19**: 263–7.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., and Coupland, G.** (1995). The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**: 847–57.
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y., and Wagner, D.** (1995). Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**: 675–680.
- Schmid, M., Uhlenhaut, N.H., Godard, F., Demar, M., Bressan, R., Weigel, D., and Lohmann, J.U.** (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* **130**: 6001–12.
- Shalit, A., Rozman, A., Goldshmidt, A., Alvarez, J.P., Bowman, J.L., Eshed, Y., and Lifschitz, E.** (2009). The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 8392–7.
- Sreekantan, L. and Thomas, M.R.** (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.
- Srikanth, A. and Schmid, M.** (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and molecular life sciences* **68**: 2013–37.
- Srinivasan, C. and Mullins, M.G.** (1981). Physiology of flowering in the grapevine -- a review. *Am. J. Enol. Vitic.* **32**: 47–63.
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., and Coupland, G.** (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* **410**: 1116–20.
- Sun, T., Goodman, H.M., and Ausubel, F.M.** (1992). Cloning the *Arabidopsis* GA1 Locus by Genomic Subtraction. *The Plant cell* **4**: 119–128.
- Sung, S. and Amasino, R.M.** (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**: 159–64.
- TAIR TAIR.** [Http://www.arabidopsis.org/](http://www.arabidopsis.org/).
- Vezzulli, S., Leonardelli, L., Malossini, U., Stefanini, M., Velasco, R., and Moser, C.** (2012). Pinot blanc and Pinot gris arose as independent somatic mutations of Pinot noir. *Journal of experimental botany* **63**: 6359–69.

- Walker, A.R., Lee, E., and Robinson, S.P.** (2006). Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. *Plant molecular biology* **62**: 623–35.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F., and Meyerowitz, E.M.** (1992). LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**: 843–859.
- Wellmer, F., Alves-Ferreira, M., Dubois, A., Riechmann, J.L., and Meyerowitz, E.M.** (2006). Genome-wide analysis of gene expression during early *Arabidopsis* flower development. *PLoS genetics* **2**: e117.
- Wellmer, F. and Riechmann, J.L.** (2010). Gene networks controlling the initiation of flower development. *Trends in genetics* **26**: 519–27.
- Werner, J.D., Borevitz, J.O., Uhlenhaut, N.H., Ecker, J.R., Chory, J., and Weigel, D.** (2005). FRIGIDA-independent variation in flowering time of natural *Arabidopsis thaliana* accessions. *Genetics* **170**: 1197–207.
- Wigge, P. a** (2011). FT, a mobile developmental signal in plants. *Current biology* **21**: R374–8.
- Wigge, P. a, Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U., and Weigel, D.** (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**: 1056–9.
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M.N., Maier, A., and Schwechheimer, C.** (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *The Plant cell* **19**: 1209–20.
- Wilson, R.N., Heckman, J.W., and Somerville, C.R.** (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant physiology* **100**: 403–8.

Partie III

La mise en évidence du silencing chez la vigne

Partie III - La mise en évidence du silencing chez la vigne

Chapitre I - Introduction générale

En 1928, Wingard décrivait une étude réalisée sur un tabac dont certaines feuilles avaient été infectées par le virus des tâches en anneaux du tabac, le *Tobacco ringspot virus* (Wingard, 1928). Ces feuilles étaient devenues nécrotiques et exprimaient les symptômes de l'infection. Une seconde infection avait été réalisée au niveau des feuilles supérieures et ces dernières étaient devenues résistantes et asymptomatiques. Toutefois, les mécanismes moléculaires impliqués dans une telle résistance sont restés inconnus jusqu'au début des années 2000.

Dans les années 90, le mécanisme du silencing a été une nouvelle fois découvert chez un pétunia transgénique. En effet le transgène a provoqué la production de siRNA induisant la dégradation des ARNm des gènes homologues. La manifestation de ce mécanisme est alors devenue visible, car au lieu d'obtenir des pétunias de couleur, les fleurs étaient totalement blanches (Napoli et al., 1990). Depuis, on sait que le mécanisme de « Post Transcriptionnel Gene Silencing » (PTGS) peut être induit à partir de séquences exogènes anti-sens ou sens (Waterhouse et al., 1998). Le PTGS provoqué à partir d'une forte expression d'une séquence sens est nommé le S-PTGS. Le PTGS induit à partir d'un long ARN issu d'une séquence inversée répétée (IR) est le IR-PTGS (Chuang and Meyerowitz, 2000). Aujourd'hui, plus de 1000 d'études sont menées sur ces mécanismes de défense, connus sous le terme de « silencing ».

Le silencing met en jeu des petites molécules d'ARN double brin dont la taille varie en fonction de leur rôle ; elles ont entre 21 et 26nt. Différentes voies d'action ont été mises en évidence et celles-ci diffèrent par la cible: défense virale, modification de l'hétérochromatine ou régulation de gènes du développement. Mais ce mécanisme demeure très complexe et de nombreuses questions restent encore en suspens. C'est un mécanisme capable d'amplification et de transmission de cellules à cellules à courte et longue distance. Ce mécanisme est régulé soit par lui-même soit par des mécanismes de rétrocontrôles, en effet certains miRNA ciblent les gènes codants pour les enzymes ayant un rôle dans ce mécanisme.

Les plantes n'ayant pas de système immunitaire comme les mammifères, ce mécanisme a été une découverte majeure dans la lutte antivirale et de nombreuses études sont réalisées sur *Arabidopsis* et sur les Solanacées (à la fois *N. benthamiana* et *N. tabacum*) afin de comprendre les bases génétiques et moléculaires de ces mécanismes et, dans un domaine plus appliqué, de mettre en place des systèmes de résistance contre les virus. Ainsi, des études ont également été menées chez le *Prunus* pour combattre la *Sharka* via ce mécanisme de défense (Kundu et al., 2008; Hily et al., 2004).

En revanche, le silencing peut également être utilisé afin d'améliorer des processus industriels avec, par exemple, l'obtention de peupliers transgéniques dont l'extinction du gène *cinnamyl alcool déshydrogénase* permet de faciliter et d'augmenter la production de papier (Pilate, 2003).

La vigne étant exposée à de nombreuses attaques virales (il est référencé plus de 60 virus (Martelli, 2012),) mieux comprendre ce mécanisme et la circulation des petits ARN chez la vigne permettrait de renforcer les études en cours pour la lutte antivirale. En effet, dans le vignoble, la vigne est cultivée sur des porte-greffes. Certains virus comme les *GFLV* (*Grapevine fanleaf virus*) ou *ARMV* (*Arabic Mosaic Virus*) sont transmis au niveau des racines par les nématodes du sol. La possibilité d'obtenir des porte-greffes résistants contre ces virus, permettrait de protéger le greffon qui resterait quant à lui non transgénique.

I.1. Le mécanisme du silencing

Le silencing débute par la reconnaissance d'une structure d'ARN double brin par une protéine de clivage nommée DICER. Cette protéine coupe les molécules d'ARN double brin en petites molécules d'ARN double brin nommées small interfering RNA (siRNA) ou micro RNA (miRNA). Ces molécules sont phosphorylées en 5' et possèdent deux nt non appariés en 3' (Bernstein et al., 2001; Elbashir et al., 2001; Nykänen et al., 2001). Puis, ces molécules se dirigent vers le cytoplasme où elles sont prises en charge par un complexe protéique « RNA-induced silencing complex » (RISC). Selon l'origine de ces petits ARN, ce complexe ARN et RISC va avoir des

rôles différents. Il peut reconnaître les ARN messagers cibles afin de les dégrader ou bloquer leur traduction. Il peut aussi induire des modifications épigénétiques et induire des modifications au niveau de la chromatine (**Figure 21**). La dégradation des ARN messagers cibles par le complexe ARN et RISC va induire la synthèse de petites molécules d'ARN qui sont utilisées par les RDRP afin de synthétiser de nouvelles molécules d'ARN double brin qui seront à leur tour reconnues par les protéines DICER et clivées en siRNA ce qui va permettre à ce mécanisme de s'amplifier en multipliant les sources pour la formation des siRNAs. Le silencing est un mécanisme systémique, en effet, une fois les siRNA synthétisés, ils peuvent circuler dans la plante et ainsi éteindre l'expression du gène cible de cellule à cellule jusqu'à la plante entière (**Figure 21**).

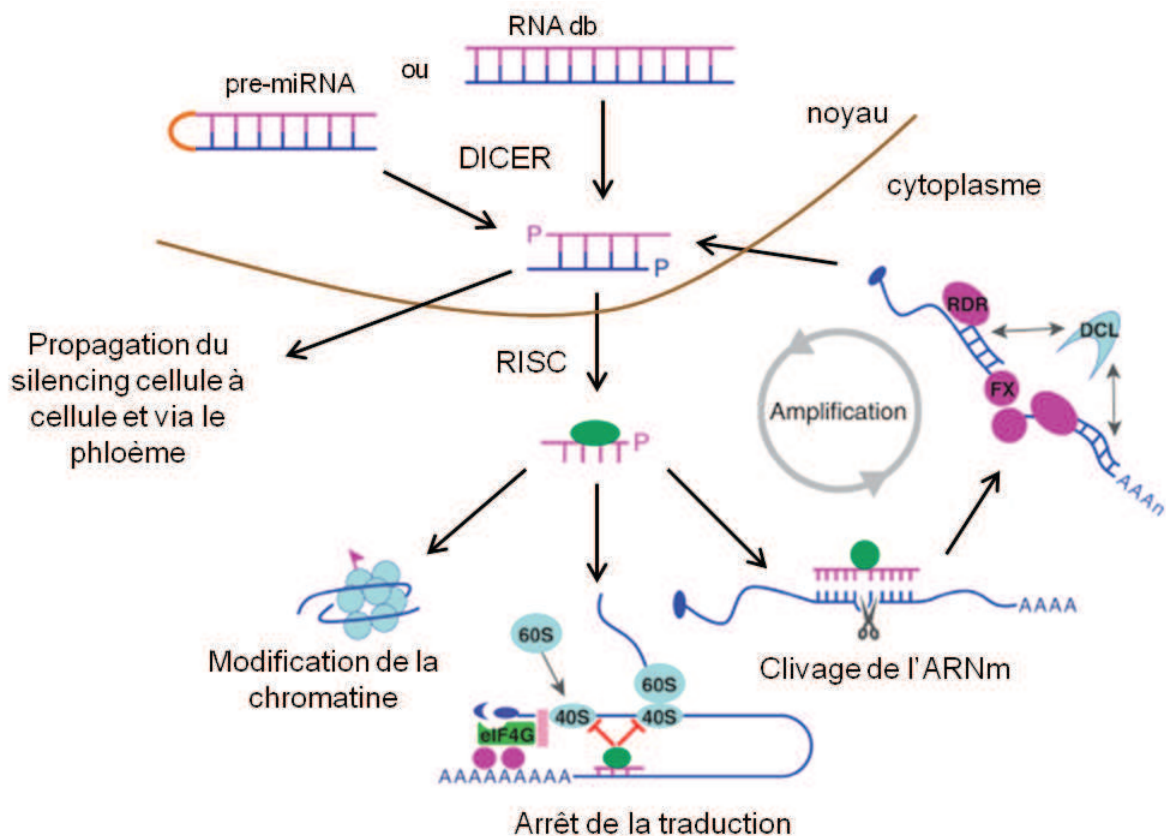


Figure 21 : Etapes clefs du silencing d'après (Li and Ding, 2006).

I.1.1. Les différents acteurs

I.1.1.a. DICER et dsRNA Binding Protein (DRB)

Les protéines DICER ou Dicer-like (DCL) ont un rôle important dans la dégradation des molécules d'ARN double brin en petites molécules d'ARN double brin de 21 à 24nt (Millar and Waterhouse, 2005; Chapman and Carrington, 2007; Grosshans and Filipowicz, 2008). Ces protéines sont très conservées et possèdent généralement plusieurs domaines ribonucléases. On y trouve un domaine DEAD, un domaine DUF283 (*Domain of Unknown Function*), un domaine PAZ, deux domaines RNase III et un domaine de liaison à l'ARN double brin (dsRDB) (**Figure 22**).

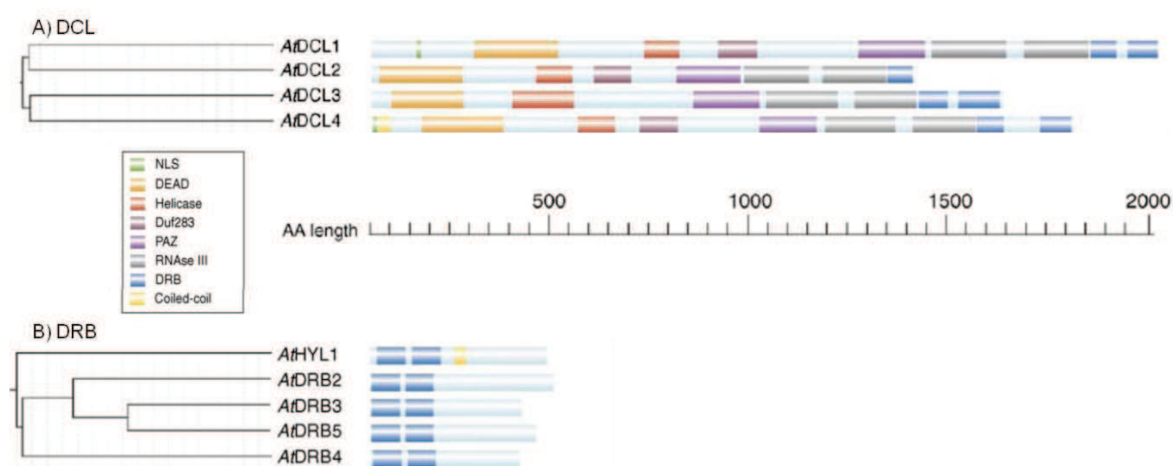


Figure 22 : DCL et DRB chez *Arabidopsis* (Vazquez, 2006)

Les domaines PAZ (Piwi Argonaute Zwill), RNaseIII et dsRDB ont un rôle dans la liaison et le clivage des molécules. La structure 3D de la protéine a permis de mettre en évidence une liaison entre le domaine PAZ et le domaine RNase III via une hélice α (Macrae et al., 2006). La distance séparant le domaine PAZ et les domaines RNase III est de 65 Å, ce qui correspond à la longueur d'une molécule d'ARN de 25pb. Le domaine de liaison à l'ARN db (dsRDB) jouerait un rôle dans la distinction des différentes molécules d'ARN et dans la liaison avec d'autres complexes effecteurs (Macrae et al., 2006). Les domaines RNase III pourraient en plus s'associer avec le domaine PIWI de la protéine (Tahbaz et al., 2004). Le domaine

PAZ pourrait également lier les molécules d'ARN simple brin (ARNsb) (Kini and Walton, 2007). Chez les eucaryotes supérieurs, le domaine DUF283 aurait un rôle dans la sélection des brins de siRNA ou miRNA en reconnaissant les 2 nucléotides sortants en 3' ou en recrutant une autre protéine dsRDB (Dlakić, 2006).

Chez *Arabidopsis thaliana*, on retrouve 4 DCL différents (DCL1 à DCL4) alors qu'un seul a été décrit chez les Vertébrés (Liu et al., 2009). Chaque DCL chez *Arabidopsis* a un rôle différent. DCL1 permet la production des miRNA. DCL2 joue un rôle dans la synthèse de nat-si-RNA et de siRNA (22nt) qui ont une fonction dans la défense contre les virus. DCL3 est à l'origine des siRNA (24nt) ayant un rôle dans la modification de la chromatine. Enfin, DCL4 produit les ta-siRNA et des siRNA (21nt) ayant un rôle dans la défense antivirale (Vaucheret, 2006; Liu et al., 2009).

Les protéines DRB (ds RNA Binding Protein) ont 2 domaines de fixation à l'ARNdb. Il en existe 4 chez *Arabidopsis*. Ces protéines ont un rôle dans le clivage et le transfert des petits ARN au niveau du complexe RISC (voir le paragraphe suivant) (Tomari et al., 2004; Chendrimada et al., 2005). Chez *Arabidopsis*, une interaction entre DCL1 et DRB1 a été mise en évidence. DRB1 est aussi connu sous le nom de HYL1 (Hyponastic leaves 1). DRB4 interagit spécifiquement avec DCL4 (Hiraguri et al., 2005). Des expériences utilisant des fusions GFP (Green Fluorescent Protein) ont montré que la localisation de HYL1 et DRB4 est nucléaire, alors que DRB2 semble avoir une localisation cytoplasmique (Hiraguri et al., 2005).

I.1.1.b. Le complexe RISC

Le complexe « RNA-induced silencing complex » (RISC) est un complexe multiprotéique dont la nature est encore mal connue. Une protéine retrouvée systématiquement dans ce complexe a été caractérisée et appartient à la famille des Argonautes (AGO) (Hannon, 2002). On dénombre chez *Arabidopsis* 10 AGO (AGO1 à AGO10). Cette protéine est caractérisée par un domaine PAZ et un domaine PIWI (Vazquez, 2006) ainsi qu'un domaine central. Le domaine PIWI est similaire à celui d'une Ribonucléase H avec un site actif conservé, constitué de la séquence d'acides aminés aspartate-aspartate-glutamate (**Figure 23**). Ce site est indispensable pour permettre à cette protéine de cliver des ARNm cibles (Song et al., 2004).

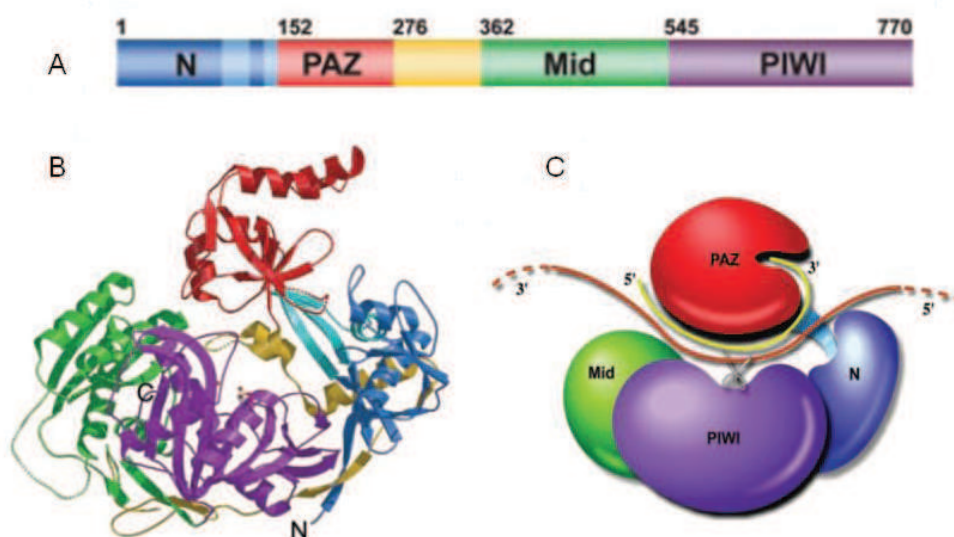


Figure 23 : La protéine Argonaute. A représente les différents domaines de la protéine, B montre la structure tridimensionnelle d'Argonaute et C est un schéma représentant la protéine Argonaute avec un siRNA en jaune et l'ARNm cible en rouge (Song et al., 2004).

Le complexe RISC via la protéine AGO incorpore un des 2 brins des petits ARN qui sera le brin guide. L'autre brin est ensuite dégradé. Le brin guide va lier 2 nucléotides en 3' avec le domaine PAZ d'Argonaute (Ma et al., 2004). La partie 5' du brin guide est localisée au niveau du domaine PIWI (Schwarz et al., 2003). Une fois le brin guide incorporé dans le complexe RISC, le complexe reconnaît des ARNm complémentaires ou ARN cibles. Ces ARNm cibles sont, par la suite, dégradés par le

complexe. Le clivage est réalisé entre le dixième et le onzième nucléotide du brin guide (Rand et al., 2005; Song et al., 2004). (**Figure 23**)

Deux types de complexes ont été mis en évidence. Le plus connu est le complexe RISC qui clive les ARNm ou inhibe la traduction. Donc il participe au silencing post transcriptionnel ou PTGS.

Le second complexe est le RITS (RNA-Induced Transcriptional Silencing complex) découvert chez *Schizosaccharomyces pombe*. Ce complexe induit une inactivation de certains gènes en agissant sur la chromatine ; on parle alors de silencing transcriptionnel ou TGS. RITS est composé du gène homologue AGO1 de levure, une nouvelle protéine Tas3 (RNA-induced transcriptional silencing complex protein) et Chp1 (Chromo domain-containing protein 1) qui possède un domaine permettant une association avec l'hétérochromatine. Les petits ARN pris en charge par le complexe RITS ont des séquences répétitives centromériques, qui aident le complexe RITS à se localiser sur l'hétérochromatine et à bloquer la transcription (Verdel et al., 2004; Sigova et al., 2004; Debeauchamp et al., 2008).

I.1.1.c. **RNA-dependent RNA polymerase et le mécanisme de transitivity**

On compte chez *Arabidopsis* 6 *RNA-dependent RNA polymerase (RDRP)* (Dalmay et al., 2000; Mourrain et al., 2000). Ces RDRP présentent un motif commun DPBB (double-psi β -barrel) très proche des DNA-dependent RNA polymerase (Iyer et al., 2003). RDR1 participe à la résistance contre certains virus : en effet l'étude sur un mutant d'*Arabidopsis* déficient pour RDR1 montre une sensibilité au virus de la mosaïque du tabac (Xie et al., 2001). RDR2 permet la synthèse de siRNA endogènes et de rétroéléments qui visent la chromatine (Xie et al., 2004). RDR6 est aussi connu sous le nom de SDE1/ SGS2 (Silencing Defective 1/Suppressor of Gene Silencing 2) (Dalmay et al., 2000; Mourrain et al., 2000).

Le mécanisme de transitivity peut être défini comme étant un mécanisme d'amplification des siRNA. En effet, on synthétise à partir de siRNA primaires des siRNA secondaires qui ciblent des régions en 3' et 5' différentes de la région

correspondante aux siRNA primaires (Voinnet et al., 1998; Vaistij, 2002). Chez la plante on retrouve à la fois des siRNA secondaires du côté 5' et 3' de l'ARNm cible. La présence de ces siRNA met en évidence une activité de RDR6 qui nécessite une amorce (primer-dépendant) du côté 5'. Par contre RDR6 n'utilise pas d'amorce (primer-indépendant) en 3' (Himber et al., 2003). Les siRNA secondaires font toujours 21nt, ce qui suggère que seule DCL4 participe à la formation de siRNAs secondaires (Dunoyer et al., 2005). (**Figure 24**)

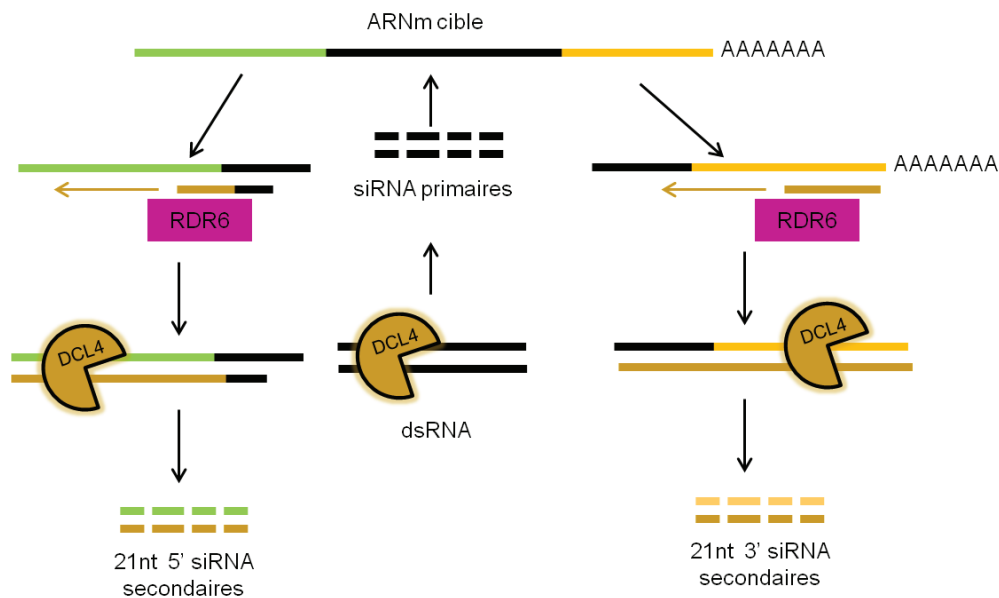


Figure 24 : Schéma représentant le mécanisme de la transitivity chez *Arabidopsis* d'après la publication (Brodersen and Voinnet, 2006).

Ainsi, en multipliant le nombre de siRNA, il y a à la fois une amplification des mécanismes de défense contre le virus mais aussi une diffusion plus rapide de la résistance dans toute la plante (Himber et al., 2003). En effet, les plantes ayant une RDR6 défectueuse présentent une hypersensibilité à certains virus comme le virus de la mosaïque du concombre (Mourrain et al., 2000; Muangsan et al., 2004).

I.1.2. Les différentes voies du silencing

I.1.2.a. Les voies endogènes

i Les micro RNA

Les miRNA jouent un rôle important dans la régulation du développement des plantes en déterminant par exemple le nombre de fleurs (Aukerman and Sakai, 2003; Baker et al., 2005; Mallory and Vaucheret, 2006), la mise en place de l'asymétrie des feuilles (Juarez et al., 2004; Kidner and Martienssen, 2004; Mallory and Vaucheret, 2006) et la formation de racines latérales (Guo et al., 2005).

Les miRNA sont synthétisés à partir d'une structure en tige-boucle nommée pre-miRNA. Les pre-miRNA sont codés dans le génome sous forme de transcrits par une ARN polymérase II (Bartel, 2004). DCL1 avec la protéine HYL1 (Hyponastic leaves 1) clive la molécule de pre-miRNA en miRNA mature double brin (Reinhart et al., 2002; Hiraguri et al., 2005; Park et al., 2002; Vazquez, Gascioli, et al., 2004; Han et al., 2004; Kurihara et al., 2006).

Les miRNA matures sont ensuite méthylés par une S-adenosyl methionine (SAM)-binding methyl-transferase HEN1 (HUA ENHANCER 1) (Yu et al., 2005; Yang et al., 2006). L'ajout d'un méthyle en 3' protège les petits ARN de la dégradation (Li et al., 2005). Les miRNA sont ensuite dirigés vers le cytoplasme via une exportine-5 homologue chez les plantes nommée HASTY (Park et al., 2005). Une fois dans le cytoplasme, le complexe RISC incorpore le brin guide. AGO1 peut alors soit induire la dégradation des ARNm cibles via une exoribonucléase 4 (XRN4) (Souret et al., 2004), soit bloquer la traduction comme cela a été montré pour le miR172 (Chen, 2004; Aukerman and Sakai, 2003).

Les miRNA matures sont détectés à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Park et al., 2005), ce qui laisse supposer que les miRNA ont aussi une fonction nucléaire et agissent au niveau des modifications sur la chromatine (Bao et al., 2004).

AGO1 est également régulé via les miRNA, en effet le miR168 a pour cibles les ARNm de AGO1 (Vaucheret et al., 2004; Xie et al., 2003).

ii Les trans-acting siRNA

Ces petits ARN nommés trans-acting siRNA (tasiRNA) sont formés à partir de séquences génomiques qui donnent de longs transcrits non codants nommés pri-tasiRNA (Zhang et al., 2006; Vazquez, Vaucheret, et al., 2004; Peragine et al., 2004). Ces pri-tasiRNA ont des séquences cibles de certains miRNAs qui clivent ces longs transcrits avec AGO1. Les produits de clivages sont reconnus par RDR6 qui synthétise une molécule d'ARNdb. DCL4 entre ensuite en action et clive cette molécule d'ARNdb en petits siRNA de 21nt nommés tasiRNA (Vazquez, Vaucheret, et al., 2004; Peragine et al., 2004). Ces tasiRNA sont ensuite méthylés par HEN1 comme les miRNA et guident le complexe RISC et AGO1 vers les ARNm cibles permettant ainsi de les dégrader.

iii Les nat-siRNA et hc-siRNA

Les (nat-siRNA) ont une taille de 24nt. Ils sont produits par DCL2 et RDR6 (Borsani et al., 2005). La présence de gènes avec des séquences antisens entraîne la production de nat-siRNA primaires de 24nt via DCL2. Ces nat-siRNA reconnaissent ensuite des molécules d'ARN sb précurseurs qui sont clivées par une protéine AGO. Puis comme pour les tasiRNA, RDR6 entre en action et synthétise une molécule d'ARNdb qui via DCL1 donne des nat-siRNA secondaires de 21nt. Ce mécanisme est encore mal connu aujourd'hui, mais on suppose qu'il joue un rôle dans l'adaptation au stress (Yamada et al., 2003; Chen et al., 2005)

Les *Heterochromatin-targeted RNA* (hc-siRNA) entraînent des modifications au niveau de l'hétérochromatine. Ces petits ARN possèdent des séquences correspondant à des retrotransposons ou des répétitions centromériques. Les hc-siRNA sont synthétisés par DCL3 et RDR2 et méthylés par HEN1 (Xie et al., 2004). La taille de ces petits ARN est de 24nt et ils induisent des modifications dans la méthylation de l'ADN ou des modifications au niveau des histones avec AGO4 (Xie et al., 2004; Zilberman et al., 2003). Dans ce cas-là, AGO4 et les hc-siRNA ont un rôle important dans la maintien de l'intégrité du génome en bloquant l'activité de certains transposons (Xie et al., 2004; Zilberman et al., 2003; Ito et al., 2011). Il est

aussi possible que la protéine AGO4 soit impliquée dans le complexe RITS (Verdel et al., 2004).

I.1.2.b. Le RNA silencing « exogène »

i S-PTGS

Dans le cas du S-PTGS, le silencing est provoqué par la présence d'un ARNsb aberrant qui peut avoir par exemple une absence de coiffe en 5' (Gazzani et al., 2004). Ces molécules d'ARN sont reconnues soit par l'exoribonucléase 4 (XRN4) qui va les dégrader, soit par RDR6 qui synthétise une molécule d'ARNdb (Gazzani et al., 2004). L'ARNdb est clivé par DCL4 qui produit des siRNA de 21nt. Comme pour les miRNA, ces siRNA sont méthylés par HEN1 en 3' (Li et al., 2005). Le brin guide incorpore le complexe RISC et le dirige vers l'ARNm cible provoquant sa dégradation ou l'inhibition de la traduction. Mais ces siRNA servent également d'amorce pour la RDR6 et de nouvelles molécules d'ARNdb sont produites ainsi que des siRNA secondaires via le mécanisme de transitivity.

ii IR-PTGS

L'IR-PTGS est provoqué par la présence d'une séquence répétée inversée. Lorsque cette séquence est transcrite, la molécule d'ARN se configure directement en molécule double brin nommée épingle à cheveux (« hairpin ») ou tige-boucle. Cette structure ressemble à celle des pre-miRNA. L'ARNdb est reconnue par DCL4 ou DCL3 qui synthétisent des siRNA de 21nt ou de 24nt (**Figure 25**).

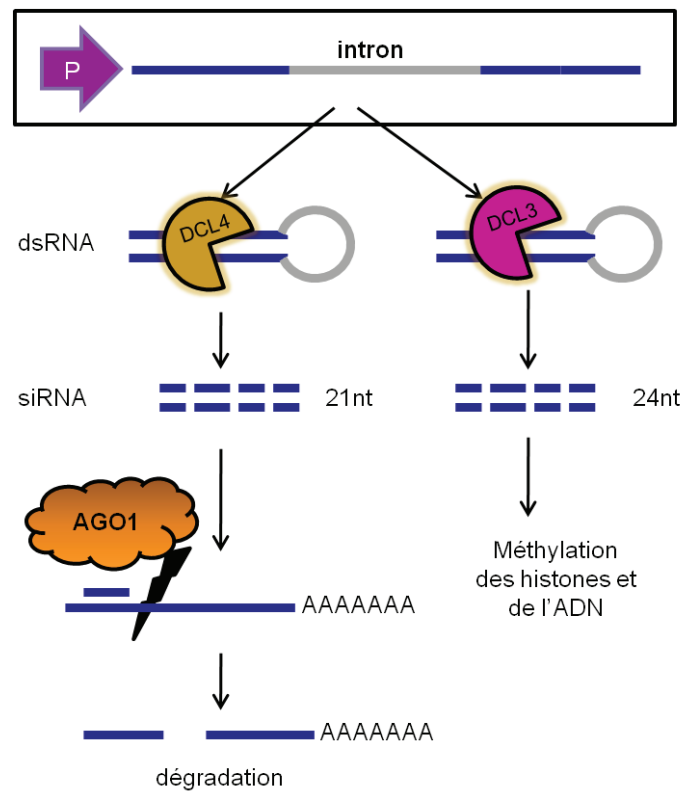


Figure 25 : Schéma représentant la voie du IR-PTGS (Inverted-repeat -PTGS) d'après la publication (Brodersen and Voinnet, 2006)

Les petits ARN de 24nt pourraient agir avec le complexe RITS (Verdel et al., 2004). En effet, ils peuvent jouer un rôle dans la méthylation de la chromatine au niveau du transgène avec le facteur Defective in RNA-Directed DNA methylation 1 (DRD1) et une protéine putative Histone Deacetylase (HDA6) (Hamilton, 2002; Zilberman et al., 2003; Llave, 2002; Kanno et al., 2005, 2004).

Les siRNA de 21nt induisent la dégradation des ARNm cibles via le complexe RISC et AGO1.

I.2. ***Les mouvements à longue et courte distance du silencing***

Pour l'étude du mouvement des siRNA, deux méthodes sont souvent utilisées. La première utilise le promoteur spécifique des cellules compagnes du phloème (SUC2) suivi d'une séquence inversée, répétée pour éteindre le gène *SULFUR* (*SUL*) (Dunoyer et al., 2005, 2007; Smith et al., 2007). L'extinction du gène *SUL* entraîne la dégradation de la chlorophylle et on observe un blanchiment autour du système vasculaire. L'autre technique consiste à transformer des plantes exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) avec une construction en tige-boucle visant la GFP (anti-GFP). On observe alors sous lumière UV la disparition de la fluorescence de la GFP (Voinnet et al., 1998). Ces constructions utilisent la voie de l'IR-PTGS avec la participation de DCL3, DCL4, AGO4 et AGO1. RDR6 et SGS3 ont été identifiés comme étant nécessaires pour le mouvement du silencing à longue distance (Schwach et al., 2005; Himber et al., 2003; Dalmay et al., 2000; Mourrain et al., 2000). On sait également que les siRNA circulent sous forme de duplex (Dunoyer, Schott, et al., 2010).

Les premières études ont montré que le PTGS chez les plantes circule de cellule à cellule par les plasmodesmes (PD) (Palauqui et al., 1997; Voinnet et al., 1998). En effet, il a été observé chez *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana benthamiana*, exprimant la GFP et agroinfiltrées avec une structure tige-boucle anti-GFP, une absence de silencing au niveau des cellules de garde des stomates chez les vieilles feuilles alors que le silencing est bien présent au niveau des stomates des jeunes feuilles. Ce résultat est expliqué par la perte de communication symplastique entre les cellules de garde des stomates chez les vieilles feuilles (Himber et al., 2003). Mais d'autres moyens de circulation ne peuvent être exclus car chez les mammifères un système de sécrétion via des vésicules a été découvert (Valadi et al., 2007; Gibbings et al., 2009).

Pour le mouvement à longue distance, des manipulations de greffage avec *Nicotiana benthamiana* et *Arabidopsis thaliana* utilisant des triples mutants *dcl2/dcl3/dcl4* montrent que les siRNA utilisent le phloème (Palauqui et al., 1997; Voinnet et al.,

1998; Brosnan et al., 2007; Molnar et al., 2010; Dunoyer, Brosnan, et al., 2010). La circulation via le phloème est favorisée par rapport au xylème, car le flux est toujours en direction des tissus puits (Tournier et al., 2006; Smith et al., 2007). Des études récentes ont montré que le signal circulait plus facilement des feuilles vers les racines. En effet, les siRNA produits par les racines circulent dans le phloème et vont éteindre l'expression de la GFP dans le greffon entraînant la disparition de la fluorescence verte. (Molnar et al., 2010) (**Figure 26**).

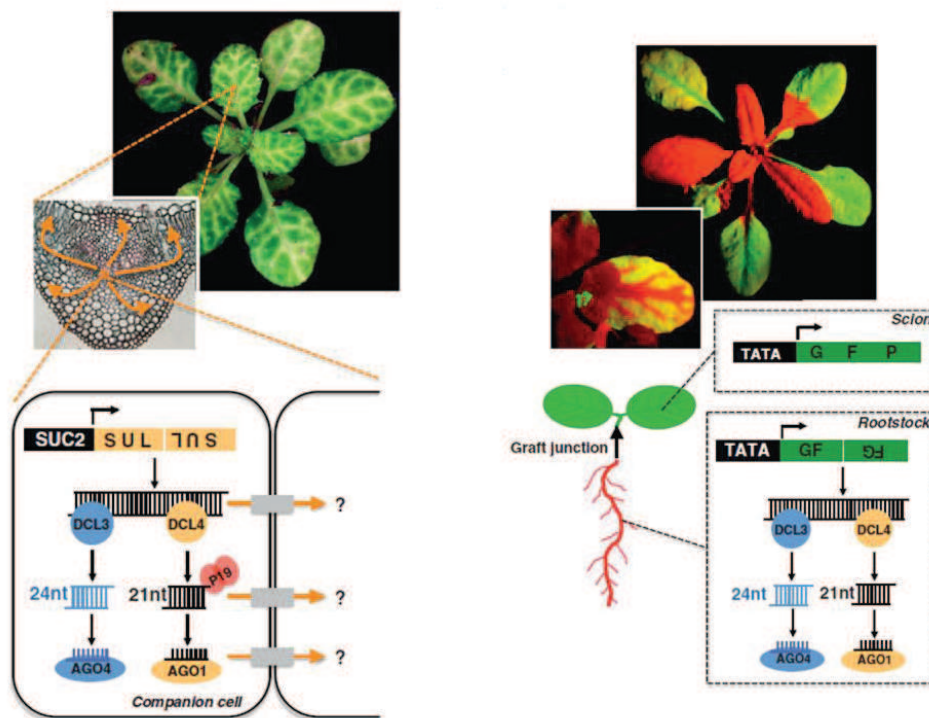


Figure 26 : Schéma représentant des modèles transgéniques dédiés aux études du mouvement à courte et longue distance chez *Arabidopsis*. A gauche, un système utilisant un promoteur spécifique des cellules compagnes du phloème (SUC2) et une séquence inversée répétée pour éteindre le gène *SULFUR* (SUL). A droite, un système permettant d'éteindre l'expression de la protéine fluorescente GFP (chez des *Arabidopsis* transgéniques) avec une séquence inversée répétée. (Brosnan and Voinnet, 2011)

Enfin, des études sur le mouvement des siRNA, ont montré que des siRNA endogènes peuvent circuler et transmettre des informations épigénétiques à d'autres lignées cellulaires (Molnar et al., 2010; Dunoyer, Brosnan, et al., 2010). Mais le mouvement des miRNA et siRNA, leurs effets sur l'épigénétique ou leurs rôles dans

la transmission restent encore méconnus, notamment dans les réponses aux stress ou dans l'hérédité épigénétique (Chitwood and Timmermans, 2010).

I.3. *Les limites du silencing*

I.3.1. Les cellules indifférenciées

Au niveau des cellules indifférenciées comme un cal ou une tumeur, ou dans les zones de fortes divisions cellulaires comme les méristèmes, le silencing ne fonctionne pas. Ici, l'étude a porté sur l'infection de plasmides virulents d'*Agrobacterium tumefaciens* qui provoquent la formation de tumeurs chez les plantes infectées. Les auteurs ont infecté une lignée transgénique d'*Arabidopsis* qui éteint la *Chalcone synthase (CHS)* via une structure tige-boucle. L'analyse moléculaire de ces plantes a montré une très faible présence de siRNA et la présence d'ARNm de la *CHS*. La plante HC est dans cette étude un témoin positif qui exprime une protéine virale suppresseur de silencing. La quantité de siRNA y est donc plus faible et des ARNm y sont toujours présents (**Figure 27**).

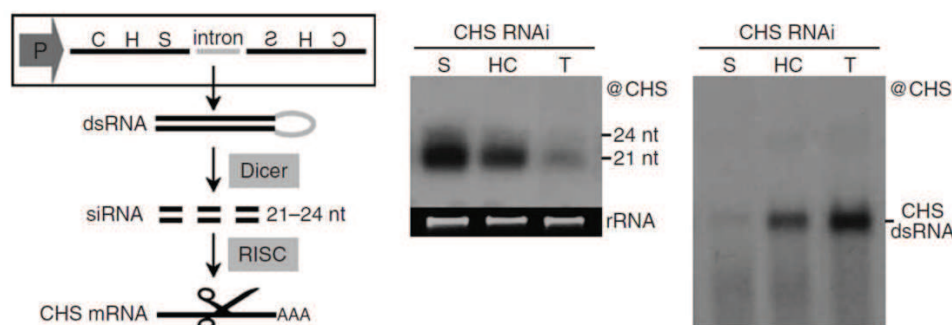


Figure 27 : Résultats montrant l'absence de silencing dans les tumeurs suite à une infection par *Agrobacterium tumefaciens*. Le schéma représente le système utilisé pour éteindre la *CHS* d'*Arabidopsis*. Au niveau des northern blot, S représente une *CHS* RNAi non infectée, HC est un témoin positif, il s'agit d'une lignée *CHS* RNAi transformée avec la protéine P1-HC-PRO qui est un suppresseur de silencing chez les potyvirus qui stabilise des ARNs db et T représente la lignée *CHS* RNAi infectée par *Agrobacterium tumefaciens*. (Dunoyer et al., 2006)

Dans ce cas, on voit bien que l'infection par *Agrobacterium tumefaciens* supprime totalement le silencing et de manière plus efficace qu'un suppresseur de silencing. La production de phytohormones suite à l'infection, nécessaire pour la prolifération des cellules transformées ou non transformées, expliquerait la suppression du silencing dans les tumeurs (Dunoyer et al., 2006). Les protéines touchées et réprimées dans ce cas-là restent encore inconnues.

I.3.2. La température

Au début des années 2000, l'équipe de Fortier met en évidence une faiblesse dans le mécanisme du silencing à basse température (Fortier and Belote, 2000). Dans son étude, des drosophiles ont été transformées avec une construction tige-boucle ciblant un gène responsable de la différenciation sexuelle, situé sur le chromosome X (*Transformer-2*). Les drosophiles femelles et homozygotes mutant pour le gène *Tra-2* ont un phénotype mâle. Ce gène a été choisi car les mutants homozygotes sont parfaitement viables et le phénotype est facilement observable chez l'adulte. Les drosophiles transformées avec la construction tige boucle présentent un phénotype femelle à 22°C et mâle à 29°C (Fortier and Belote, 2000). Par contre, l'équipe a montré qu'à basse température (22°C), le phénotype mutant n'était plus observé, mais aucune proposition sur l'origine de cette faiblesse n'a été formulée.

Puis en 2003, l'équipe de Szittyá a émis une première hypothèse sur l'origine de la sensibilité du silencing à basse température. Son équipe a mis en évidence que l'efficacité du PTGS via un virus ou un transgène est fortement réduite alors que la synthèse de miRNA n'est pas affectée par la température (Szittyá et al., 2003). L'équipe pensait que 2 DCL interviennent : l'une sensible à la température et l'autre insensible, cette dernière étant responsable de la production des miRNA importants pour le développement des plantes (Szittyá et al., 2003) (**Figure 28**).

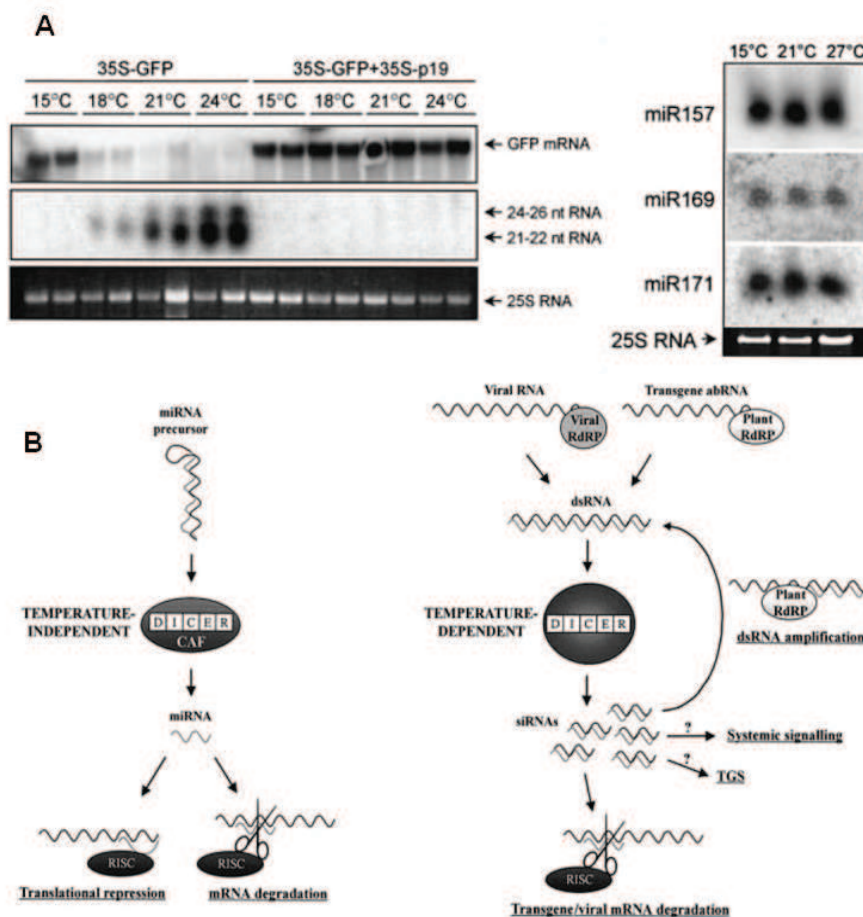


Figure 28 : Etude du silencing à basse température (Szitty et al., 2003).

En A à gauche, le northern blot illustre l'effet de la température de culture des plantes sur le silencing et l'extinction de la GFP. Une agroinfiltration a été réalisée chez des plantes non transgéniques de *N. benthamiana* avec une construction 35S-GFP induisant naturellement le silencing ou avec une construction 35S-GFP+ 35S-P19 qui est une protéine suppresseur de silencing. A droite, il s'agit d'un northern blot montrant l'accumulation des miRNA chez *Arabidopsis* cultivés à différentes températures.

En B, le schéma illustre l'hypothèse que l'équipe a émise sur les deux voies de silencing chez la plante, où la production de miRNA est indépendante de la température alors que la voie défensive dépend de la température.

En 2004, l'équipe de Kameda a également mis en évidence la sensibilité du silencing à basse température, mais chez les cellules de mammifères cultivées à 37°C (Kameda et al., 2004). Pour cette étude, l'équipe a utilisé la protéine fluorescente GFP afin de ne pas cibler un gène interne et assurer la viabilité des cellules. Différentes lignées cellulaires de mammifères ont été testées à différentes températures et un effet suppresseur du silencing à basse température (26 à 28°C) a été trouvé chez chaque lignée. L'équipe a alors conclu qu'il y a bien un effet de la

température sur le silencing d'une manière générale chez les mammifères mais sans comprendre d'où vient cette sensibilité.

Puis, l'équipe de Qu a montré en 2005 que le gène *RDR6* est faiblement exprimé à basse température chez *Nicotiana benthamiana* (Qu et al., 2005). Les RDRP sont indispensables pour le maintien du silencing lors d'une infection virale ou l'utilisation d'un transgène (Xie et al., 2001; Gómez et al., 2008; Qu et al., 2005), d'où l'importance des RDRPs dans la réponse anti-virale chez les plantes (Mourrain et al., 2000; Xie et al., 2001).

La même année, une étude a été réalisée chez la pomme de terre (Sós-Hegedus et al., 2005). Dans cette étude, l'équipe a isolé 9 lignées de pomme de terre transgéniques insensibles à la température sur 24 lignées transformées au total. Ces lignées ont été obtenues après transformation, à l'aide de 3 constructions anti-sens différentes ciblant des gènes endogènes (*StubGAL83*, *PKIN1* et *StubSNF1*). Ces 9 lignées présentent la même quantité de siRNA de 21nt à basse température (15°C) qu'à haute température (24°C). L'apparition des lignées insensibles à la température a été obtenue avec une fréquence différente en fonction des constructions. L'équipe suppose qu'il y a une influence entre l'insertion du transgène dans le génome et la sensibilité à la température. Dans cette étude, l'équipe a aussi mis en évidence une influence entre les tissus et l'efficacité du silencing. Le silencing semble beaucoup mieux fonctionner dans les feuilles que dans le tubercule et les racines (Sós-Hegedus et al., 2005).

L'équipe de Kasai en 2009, a travaillé sur le soja et la pigmentation du tégument de la graine (Kasai et al., 2009). La pigmentation du tégument est contrôlée par un locus *I*. L'allèle *I* inhibe la pigmentation du tégument entraînant la coloration jaune des graines. Ce locus est caractérisé par un gène *Glycine max inverted repeat of CHS pseudogene* (*GmIRCHS*) qui correspond à une séquence inversement répétée d'un pseudogène de la *CHS*. La fonction de ce gène n'est pas encore totalement connue, mais il est possible que la transcription de *GmIRCHS* entraîne la formation d'une molécule double brin d'ARN entraînant l'extinction du gène *CHS* responsable de la coloration du tégument. L'équipe a étudié 2 cultivars, Toyomusume, dont la coloration du tégument est sensible à la température, en effet à 15°C, le tégument

devient brun. Et le cultivar Toyoharuka insensible à la température : le tégument reste jaune après traitement à basse température. Après analyse du locus *I* chez les 2 cultivars, l'équipe a découvert que le locus *I* du cultivar insensible Toyoharuka était composé seulement d'un pseudogène de la *CHS* avec une orientation anti-sens nommé *GmASCHS* alors que le cultivar sensible possède bien le gène *GmISCHS*. L'équipe a donc émis l'hypothèse que le silencing induit par une construction anti-sens peut être insensible à la température par rapport à une construction inversée-répétée ou en tige-boucle (Kasai et al., 2009). Leurs conclusions rejoignent les résultats obtenus chez la pomme de terre où il y a la possibilité d'obtenir des plantes transgéniques insensibles au silencing avec des constructions anti-sens (Sós-Hegedus et al., 2005).

L'équipe de Wu (Wu et al., 2007) a montré que l'expression de *NtRdRP1* (l'orthologue de *RDR1* d'*Arabidopsis* chez *Nicotiana tabacum*) est réduite fortement à des températures inférieures à 20°C. Cette étude a été menée chez des *Nicotiana tabacum* transformés. Une lignée T4 a été transformée avec un transgène codant pour une protéine de capsid non traductible induisant une résistance contre le virus de la pomme de terre Y (*PVY*) (Wu et al., 2007). L'expression de *NtRdRP1* est très peu détectable à des températures inférieures à 20°C entraînant la diminution de la dégradation des ARNm codant pour la protéine de capsid du virus *PVY*. Par contre, à 25°C, l'expression de *NtRdRP1* augmente suite à l'infection par *PVY* mais aussi avec le virus X de la pomme de terre (*PVX*) et le virus de la mosaïque du tabac (*TMV*).

Les RDRP jouent un rôle important dans la réponse des plantes au stress abiotique. Une étude réalisée chez *Arabidopsis* (Willmann et al., 2011) montre que l'expression de *RDR6* est fortement réprimée en cas de stress osmotique ou de température faible (8°C) (**Figure 29**). *RDR6*, *RDR1* et *RDR5* ont des expressions qui varient fortement sous des conditions de stress par rapport à *RDR2*, *RDR3* et *RDR4* dont le niveau d'expression reste stable (**Figure 29**).

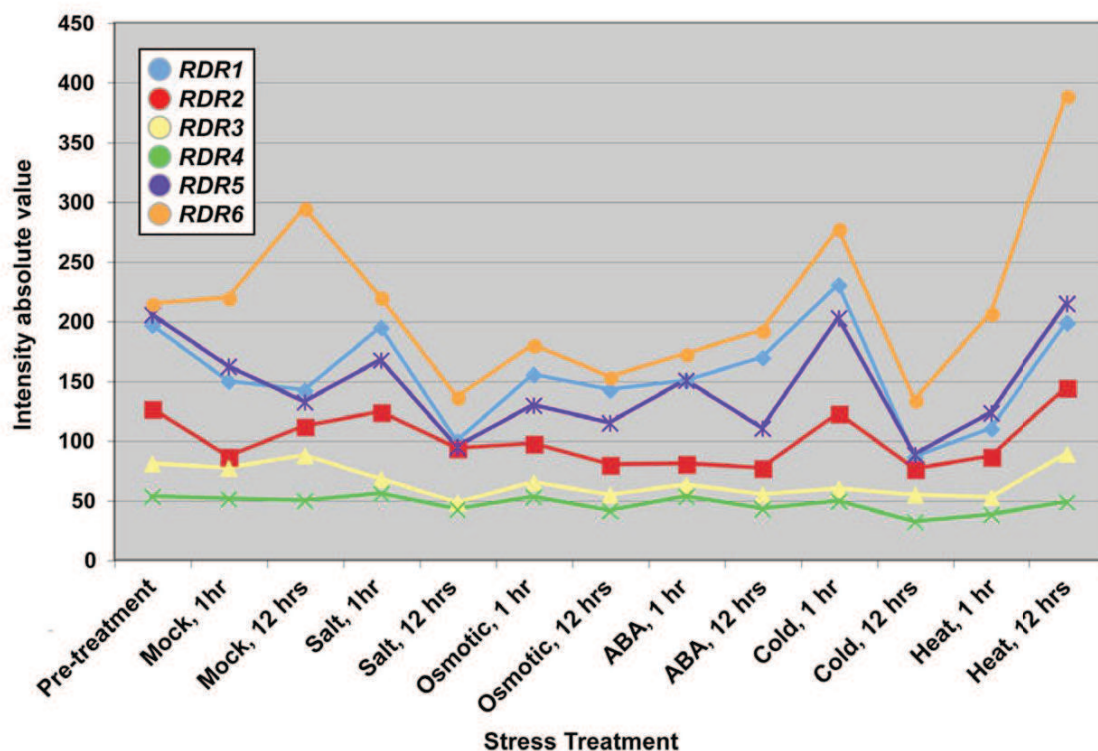


Figure 29 : Graphique montrant l'expression des *RDRP* chez *Arabidopsis* dans des conditions de stress (Willmann et al., 2011)

Mais les *RDRP* ne sont pas les seuls gènes dont l'expression est sensible à la température. Une étude, menée en 2010 par l'équipe de Kune, a montré que l'accumulation de TAS1 tasiRNA est sensible à la température chez *Arabidopsis* (Kume et al., 2010). L'accumulation de tasiRNA résulte de l'activité de DCL4 et RDR6. A basse température (4°C), on observe une accumulation de TAS RNA non clivés chez *Arabidopsis* sauvage mais non chez le mutant *dcl4-2*. Par contre, lorsque la température augmente, l'accumulation est observée chez la plante sauvage. Donc *RDR6* et *DCL4* chez *Arabidopsis* ont une activité qui est sensible à la température.

L'efficacité des *RDRP* dépend donc des conditions environnementales. Par conséquent, les transgènes visant à induire une résistance virale par exemple, ne sont pas d'une bonne efficacité à des températures inférieures à 20°C, ce qui remet en question la stabilité de telles résistances lors d'un essai en plein champ. Pour obtenir une bonne résistance, il serait alors important de réaliser également une

sélection par rapport à la température comme cela a été réalisé pour la pomme de terre (Sós-Hegedus et al., 2005).

Pour conclure, le silencing est un mécanisme sensible à la température de manière générale. En effet cette sensibilité a été observée chez différentes espèces végétales, (le soja, la pomme de terre, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* et *Arabidopsis*), chez les mammifères et la drosophile. La température est un facteur non négligeable et important à prendre en compte, surtout dans la lutte contre les virus.

I.4. Le silencing chez la vigne

Depuis la publication de génome du Pinot Noir 40024 (PN40024) en 2007, disponible sur le génoscope (Jaillon et al., 2007) et d'un autre clone de Pinot Noir (Velasco et al., 2007), les travaux en biologie moléculaire sur la vigne ont été facilités. Cette découverte nous permet aujourd'hui d'approfondir nos connaissances sur le silencing chez la vigne. De nombreux miRNA conservés ont été trouvés et des prédictions de cibles ont été établies (Carra et al., 2009). Il y aurait 30 miRNA conservés appartenant à 9 familles de miRNA et 4 miRNA putatifs non conservés. Durant mon master nous avons aussi mis en évidence par northern blot la présence de plusieurs miRNA très proches d'*Arabidopsis*, miR159, miR172, miR168 et miR169 (Mallory and Vaucheret, 2006). Puis, en 2010, avec l'arrivée des séquençages à très haut débit, cette technique a permis d'affiner nos connaissances. Au total, il y aurait 24 familles de miRNA conservées et 26 miRNAs connus mais non conservés découverts chez la vigne (Pantaleo, Szittyá, et al., 2010). D'autres analyses par utilisation de la technologie de « deep sequencing » ont mis en évidence de petits ARN viraux ou dérivant de séquences de viroïdes chez la vigne (Navarro et al., 2009; Pantaleo, Saldarelli, et al., 2010).

En comparant les séquences d'autres plantes, plusieurs prédictions de gènes ont été effectuées chez la vigne. D'après des données issues du Génoscope, il y aurait, par exemple 4 *DCL* nommées *VvDCL1* à 4 chez les *Vitis*, comme chez *Arabidopsis* (Liu

et al., 2009). Des lignées de vigne ont également été transformées afin d'induire le silencing et de rendre la vigne résistante au *Grapevine virus A* (GVA) ou au *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) (Muruganantham et al., 2009; Gambino et al., 2010). L'équipe de Muruganantham a utilisé la technique du Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) (Nykänen et al., 2001; Bernstein et al., 2001) afin d'induire, suite à l'infection avec le GVA modifié, une extinction de la *Phytoène désaturase* de vigne (*VvPDS*) se manifestant par le blanchiment des feuilles. En revanche, aucun résultat n'a été montré sur l'efficacité de la résistance à une infection avec le GVA. Cette manipulation a tout de même permis de montrer que le silencing fonctionne bien chez la vigne car on observe une diminution de la quantité d'ARNm codant pour la *VvPDS*, mais il manque l'analyse des petits ARN (Muruganantham et al., 2009) (**Figure 30**).

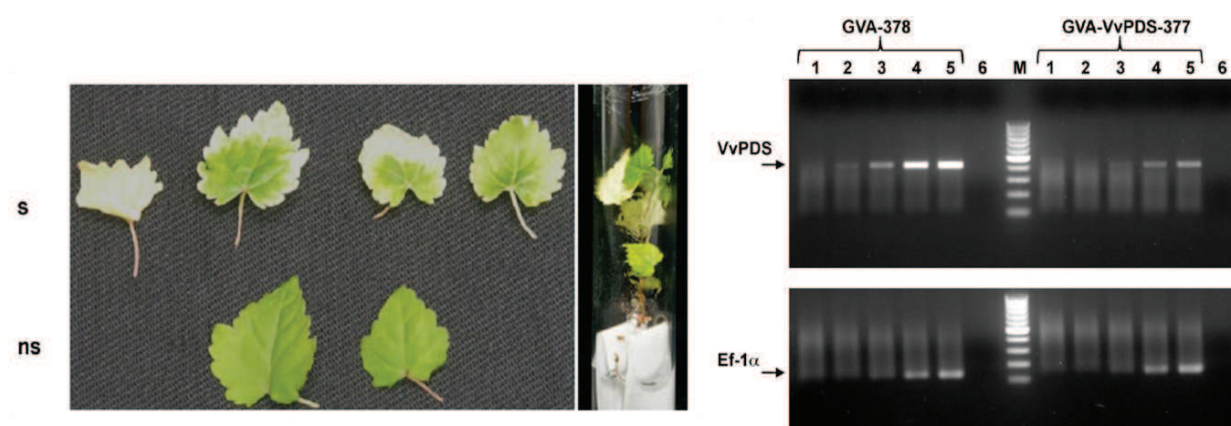


Figure 30 : Silencing induit chez la vigne par la méthode VIGS ciblant le gène *PDS* de vigne. (Muruganantham et al., 2009). *Ef-1α* est un témoin d'amplification.

A gauche on peut observer le phénotype des feuilles infectées (s) et des feuilles non infectées (ns)

A droite, la RT-PCR semi quantitative montre la réduction de l'ARNm de la *PDS* de vigne après inoculation d'un vecteur GVA vide et d'un vecteur GVA portant la séquence cible de la *PDS*.

L'équipe de Gambino a transformé des lignées de vigne avec un transgène codant pour la protéine de capsid du GFLV. Ils ont montré la présence de siRNA, mais uniquement après infections des plantes par le virus. En effet, les lignées transformées et non transformées ont produit un niveau équivalent de siRNA suite à l'infection du GFLV. Cette étude montre bien que la vigne active de manière naturelle

le mécanisme de PTGS suite à une infection au *GFLV*. (Gambino et al., 2010). Par contre, aucune donnée symptomatique n'a été présentée dans cette étude ni de quantification virale. Cela aurait permis de vérifier si les plantes transgéniques présentent une meilleure efficacité dans la lutte virale que les plantes non transformées infectées.

En revanche, pour l'instant, aucun clonage ou caractérisation de gènes impliqués dans le silencing n'a réellement été fait chez la vigne. Ce mécanisme chez la vigne, son comportement en fonction de la température ainsi que la circulation des petits ARN dans la plante sont très mal connus. Pourtant, la vigne est cultivée en association porte-greffe/greffon, il serait intéressant de mieux connaître le mécanisme de circulation des petits ARN chez la vigne, afin de développer des porte-greffes transgéniques qui protègent le greffon contre les virus.

Chapitre II - Objectif du travail de thèse sur le silencing

Le silencing est un mécanisme de contrôle post-transcriptionnel de l'expression des gènes trouvé chez les plantes, les animaux et les champignons (Voinnet, 2001). Il recrute de petites molécules d'ARN (entre 21 et 26nt) pour dégrader spécifiquement des ARN transcrits cibles. Ce mécanisme est utilisé chez les plantes comme système de défense contre les virus, transmis de manière systémique en réponse à une attaque locale de virus. Ce mécanisme est beaucoup étudié chez les plantes en particulier pour une utilisation efficace dans la résistance antivirale.

La vigne est exposée à de nombreuses maladies virales : le court noué résultant de l'infection par le *GFLV* ou *ARMV* ; les virus de l'enroulement de la famille des *Grapevine leafroll-associated virus*. Aussi, mieux connaître le mécanisme de silencing chez la vigne, pourrait permettre d'utiliser ce mécanisme comme moyen de lutte durable contre les virus. De plus, il a été mis en évidence que l'efficacité du silencing est diminuée à basse température (inférieure à 20°C) chez *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis*, les mammifères, la drosophile et la pomme de terre (Szittyá et al., 2003; Fortier and Belote, 2000; Kameda et al., 2004; Sós-Hegedus et al., 2005; Willmann et al., 2011) et certains gènes comme les *RNA-dependent RNA polymerase (RDRP)* montrent une baisse significative dans leur expression ainsi que *DCL4* (Qu et al., 2005; Kume et al., 2010). La vigne étant une plante cultivée le plus souvent en climat continental, elle est soumise à de fortes variations de température et peut rester durant le printemps à des températures inférieures à 15°C. L'infection par les virus est possible durant cette période, il est donc important de connaître le fonctionnement de ce mécanisme chez la vigne.

Dans le vignoble, la vigne est cultivée de manière greffée. Cette caractéristique a motivé la réalisation d'un essai avec un porte-greffe transgénique comme méthode de lutte contre le virus du court noué. En effet, ce virus est uniquement transmis par les nématodes au niveau du sol. Les petits ARN ont la capacité de circuler dans la plante, donc on peut émettre l'hypothèse que les petits ARN produits par le porte-greffe pourraient circuler dans la vigne et protéger le greffon contre le virus. Le greffon qui produit les raisins serait alors non-transgénique.

Le silencing avait été mis en évidence chez la vigne par une technique de VIGS (Muruganantham et al., 2009). Cette étude a mis en évidence le silencing en visant le gène *VvPDS* de la vigne. L'extinction de cette protéine cause une chlorose au niveau des feuilles et entraîne la mort de la plante. Aucun résultat n'a été donné sur le silencing au niveau des cals et du méristème. On ne peut pas voir de silencing dans les cals, dans le méristème : Cette technique entraînant la mort de la plante, on ne peut pas l'étudier dans tous les tissus et de manière fondamentale.

De plus, la majorité des études virales sont réalisées sur *Nicotiana benthamiana* ou *Arabidopsis thaliana*, car leurs manipulations sont plus faciles et rapides que la vigne. C'est le cas pour le *GFLV* qui est beaucoup étudié chez *Nicotiana benthamiana* alors que l'hôte naturel de ce virus est la vigne. Il serait alors intéressant d'obtenir un modèle d'étude vigne en partant de la lignée du PN40024 dont le génome est séquencé (Jaillon et al., 2007), de disposer d'une méthode de transformation stable qui lui est adaptée, de faire appel à un système viable pour l'étude du silencing, afin de tester les constructions et l'efficacité de la résistance aux virus directement sur la vigne, ainsi que pour tester, à terme, les questions de signalisation en réalisant des greffages.

On disposait d'une lignée PN40024 transformée par le transgène *GFP* créée au laboratoire, préalablement à mon travail de thèse. Le gène *GFP* est très souvent utilisé comme gène rapporteur du silencing, dans différents tissus différenciés ou indifférenciés (Dunoyer et al., 2006; Tournier et al., 2006; Sigova et al., 2004; Himber et al., 2003).

On peut donc se poser les questions suivantes :

- Peut-on créer un outil simple pour mettre en évidence le silencing de la vigne ?
- Comment ce mécanisme est-il régulé chez la vigne à basse température ?
- Les petits ARN du porte greffe circulent-ils vers le greffon ?

Pour répondre à ces questions, on a travaillé dans un premier temps à obtenir une vigne transgénique contenant à la fois le transgène *GFP* et la construction tige-boucle anti-GFP. Après transcription de la construction anti-GFP, l'ARN va former

une structure tige-boucle reconnue par une protéine DICER. Celle-ci va la cliver en petits ARN qui vont s'associer avec le complexe RISC à l'ARNm de la GFP entraînant sa dégradation.

Compte-tenu du temps nécessaire pour obtenir une vigne régénérée avec ces constructions (12 mois), en parallèle, j'ai réalisé des expérimentations d'hétéogreffage *in vitro* pour mettre en évidence le silencing de manière plus rapide, mais aussi pour étudier la question de la circulation des petits ARN entre le porte-greffe et le greffon chez la vigne.

Au laboratoire, la technique d'hétéogreffage *in vitro* avait été mise au point par greffage de vigne issue de culture *in vitro* sur des Chénopodes infectés avec le virus *GFLV*. Il avait été vérifié que la transmission du *GFLV* à la vigne était possible dans ces conditions.

Disposant de *Nicotiana benthamiana* transformés avec le gène *GFP* et avec les 2 constructions, *GFP* et anti-GFP, j'ai cherché à mettre en évidence le silencing de la vigne en greffant la vigne *GFP* sur *Nicotiana benthamiana* (*GFP* + anti-GFP).

Les RDRP sont à l'origine de l'amplification du mécanisme du silencing. Sachant que la température a une influence sur l'expression de *RDRP* chez *Nicotiana* (Szitty et al., 2003), j'ai cloné et caractérisé le gène orthologue à *RDR6* d'*Arabidopsis* de la vigne.

Dans cette partie, le chapitre III présentera le matériel d'étude créé pour répondre aux questions posées. Le chapitre IV présente les deux stratégies choisies pour mettre en évidence le silencing chez la vigne et les résultats. Enfin, le chapitre V reprend les différentes étapes de clonage du gène *VvRDR6* de vigne.

Chapitre III - Création du matériel

III.1. *Introduction*

Afin de mettre en évidence le silencing chez la vigne, nous avons décidé d'utiliser la protéine GFP comme gène rapporteur (Haseloff, 1997). Cette protéine a été isolée d'une méduse *Aequorea victoria* (Prendergast and Mann, 1978). Elle a la propriété lorsqu'elle est excitée à une longueur d'onde de 470nm d'émettre une lumière fluorescente verte avec un pic à 510nm.

En collaboration avec l'IBMP et l'équipe de M. Dunoyer, nous avons obtenu une construction constituée de dérivés de délétion en répétition inversée du gène *GFP* qui une fois transcrite en ARN, forme une structure en tige-boucle (**Figure 31**). Cette structure est reconnue par la protéine DICER, qui la clive et entraîne la formation de petits ARN primaires de 21 à 24nt. Dans le cas de cette construction tige-boucle anti-GFP, seule la première partie de l'ARNm de la GFP est ciblée et détruite par le complexe RISC. On met alors en évidence la présence de ces petits ARN avec des sondes spécifiques nommées @GF. Les petits ARN primaires peuvent être utilisés comme amorces par les RDRP afin de synthétiser de nouvelles molécules d'ARN double brin, qui une fois reconnues par la protéine DICER seront clivées en petits ARN secondaires de 21nt. Ces petits ARN secondaires correspondent à la partie 3' de l'ARNm codant pour la GFP. Ils sont mis en évidence avec une sonde spécifique nommée @P. La détection de ces petits ARN secondaires témoigne du bon fonctionnement du mécanisme de transitivity et de l'action des RDRP (**Figure 31**).

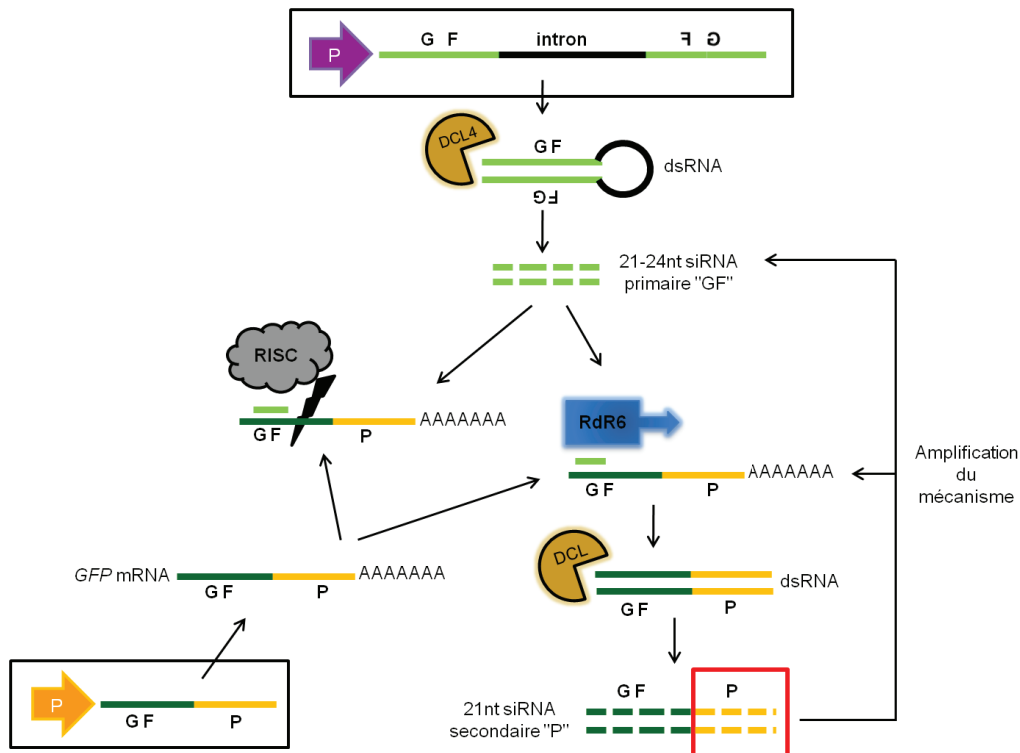


Figure 31 : Mise en évidence du silencing avec extinction de la *GFP* via une construction tige-boucle anti-*GFP*.

Au laboratoire, la transformation de la vigne est une technique qui est déjà maîtrisée. Une lignée de PN 40024 transformée avec la *GFP* (*m-gfp5-ER*) a déjà été réalisée. Les plantes de cette lignée ont été baptisées PNG15. Nous avons pu obtenir des graines de *Nicotiana benthamiana* transformées avec le transgène *GFP* (il s'agit de la lignée 16C) (Voinnet et al., 1998) et des graines de *Nicotiana b* transformées avec le transgène *GFP* et la construction tige-boucle anti-*GFP* (nommées 16COV3).

Avec ce matériel, nous avons décidé de réaliser 3 types de transformation. La première a consisté à transformer des cals de la lignée PNG15 avec la construction tige-boucle anti-*GFP*. La seconde a été de transformer des cals de PN 40024 avec la construction tige-boucle anti-*GFP*. La dernière transformation a consisté en une co-transformation de cals de PN 40024 avec le transgène *GFP* et la construction tige-boucle anti-*GFP* (**Figure 32**).

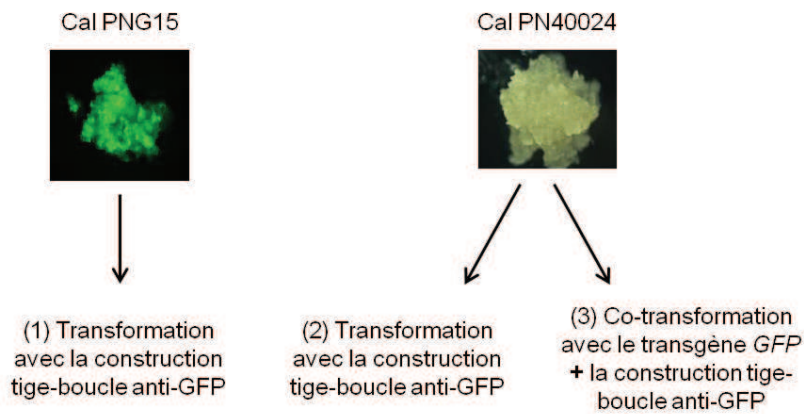


Figure 32 : Illustration des 3 processus de transformation

(1) Transformation d'un cal PNG15 avec une construction tige-boucle anti-GFP.

(2) Transformation d'un cal PN40024 avec une construction tige-boucle anti-GFP

(3) Co-transformation d'un cal PN40024 avec une construction tige-boucle anti-GFP et le transgène *GFP*

III.2. *Matériels et méthodes*

III.2.1. Culture *in vitro*

III.2.1.a. Les plantes

Les graines de *Nicotiana benthamiana* 16C (transformées avec le transgène *GFP*) et 16COV3 (transformées avec le transgène *GFP* et la construction tige-boucle anti-GFP) nous ont été fournies par Véronique Brault. Elles ont été obtenues de l'IBMP de Strasbourg.

La lignée G15 a été obtenue par le laboratoire à partir de cals embryogènes de PN40024 et d'une construction contenant le gène de la *GFP* (*m-gfp5-ER*) (Haseloff, 1997) cloné dans le vecteur pBI121 entre les sites de restrictions BamHI et SacI. Ce vecteur confère une résistance à la kanamycine.

III.2.1.b. Transformation stable de la vigne et conditions de culture en chambre climatique

La transformation stable de la vigne se réalise de la même manière que celle réalisée dans la publication « *Effect of gibberellins and VvFT on the development of latent buds, tendrils and inflorescences in grapevine* », de la partie II au chapitre III.

La construction tige-boucle anti-GFP nous a été donnée par l'IBMP (Himber et al., 2003). La construction a été clonée dans le vecteur pFGC5941 apportant une résistance au BASTA[®] chez les plantes. Cette construction est composée de la première partie du gène codant pour la *GFP* répétée et inverse, avec l'intron de la CHS au milieu (Himber et al., 2003).

La sélection des cals transformés se réalise sur le milieu MPM1 (Perrin et al., 2001) contenant du BASTA[®] (50mg/l).

III.2.1.c. Milieu Woody Plant Medium avec ou sans BAP, avec ou sans Charbon

Pour la préparation de 1000ml :

H ₂ O Ultra pure	800ml
Saccharose	15g
Woody Plant Medium avec vitamines	2,462g
Si nécessaire : BAP (1mg/ml)	En fonction de la concentration finale
H ₂ O Ultra pure QSP	1000ml

Cette solution doit être agitée jusqu'à dissolution complète pendant au minimum 15min. Il faut ensuite ajuster le pH à 6,2 et agiter à nouveau durant 30min au minimum.

Si cela est nécessaire, on peut ajouter dans la bouteille avant de verser la solution en plus de 6,5g Bacto agar, 3g de charbon actif.

La solution est ensuite stérilisée à l'autoclave programme liquide (20min à 121°C).

A la sortie de l'autoclave, il faut bien agiter la bouteille, afin de bien homogénéiser le milieu. Puis le milieu est refroidi à environ 50°C sous une hotte à flux laminaire en l'agitant de temps en temps avant de le couler dans des boîtes de Pétri et de conserver les boîtes à +4°C.

III.2.2. **Biologie Moléculaire**

III.2.2.a. **Northern blot**

i **Extraction des ARN**

L'ARN total a été isolé à partir de tissus foliaires de plantes cultivées *in vitro* par une extraction phénol/chloroforme. Les échantillons sont broyés en poudre dans de l'azote liquide et décongelés avec 5 volumes d'un tampon contenant 0,1M de NaCl, 2% SDS, 50mM de Tris/HCl, pH 9,0, 10mM EDTA, 20mM de β -mercaptoéthanol et 30mg/ml de PVP (Mallory et al., 2001). L'ARN est suspendu dans du formamide 50%.

ii **Northern blot**

Le Northern blot se réalise à partir de 5 μ g ou 7,5 μ g d'ARN totaux (Dunoyer et al., 2006). Les sondes radioactives @GF, pour la détection des siRNA provenant de la construction tige-boucle anti-GFP ont été faites par la technique de « random priming » et le fragment de klenow en présence de α -32P-dCTP (Dunoyer et al., 2006)). La sonde radioactive @P a été préparée de la même manière. Les oligonucléotides d'ADN complémentaires mR159 ont été marqués avec un [γ -32P]-ATP en utilisant l'enzyme T4 polynucléotide Kinase (New England Biolabs, Beverly, MA) et utilisés comme témoins. Les signaux radioactifs exposés à un film radiographique.

III.3. *Résultats*

III.3.1. Transformation du PNG15 avec la construction tige-boucle anti-GFP

A partir de cals embryogènes de la lignée PNG15, nous avons réalisé 8 transformations avec une construction tige-boucle anti-GFP. Au total, nous avons tenté de transformer 120 cals avec la construction tige-boucle anti-GFP et malgré des techniques de lavages différentes, les cals ont très rapidement bruni et aucun cal résistant au BASTA® n'a pu être isolé (**Figure 33**).

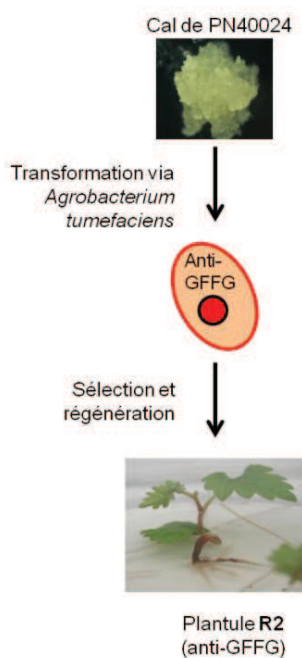
Transformation de la lignée PNG15 avec la construction anti-GFP					
nombre de transformation	Construction	Nombre de cals transformés	selection	Nombre de Cals résistants	
				Après 5 mois	conservés
6	anti-GFP	120	BASTA®	0	0

Figure 33 : Transformation de la lignée PNG15 avec la construction tige-boucle anti-GFP

La transformation de la vigne est une technique assez délicate et réaliser une seconde transformation était un pari risqué, d'autant plus que les cals de la lignée PNG15 étaient repiqués in vitro depuis plus de 18 mois. Nous avons donc décidé de prendre des cals embryogènes plus jeunes de PN40024 et de commencer par y introduire une première fois la construction tige-boucle anti-GFP.

III.3.2. Transformation du PN40024 avec la construction tige-boucle anti-GFP (lignée R2)

A partir de cals embryogènes de PN40024 plus jeunes, nous avons réalisé une transformation avec une construction tige-boucle anti-GFP. Au total, nous avons transformé 15 cals et après 5 mois de sélection avec du BASTA[®], nous avons obtenu 15 petits amas de cellules résistants et représentant 15 évènements de transformation indépendants. Neuf cals ont été amplifiés et conservés en les cultivant sur le milieu de culture HP ou MPM1. De ces cals, nous avons régénéré plus de 80 plantes nommées lignée R2 (**Figure 34**).



Transformation de la lignée PN40024 avec la construction anti-GFP							
Lignée	Construction	Nombre de cals transformés	selection	Nombre de Cals résistants		Nombre de plantes régénérées	Nombre de plantes régénérées avec analyse moléculaire
				Après 5 mois	conservés		
R2	anti-GFP	15	BASTA [®]	15	9	9	5

Figure 34 : Transformation de la lignée PN40024 avec la construction tige-boucle anti-GFP

Seules 9 plantes ont été choisies au laboratoire et 5 ont été analysées à l'aide d'un Northern blot et conservées pour les prochaines manipulations.

L'analyse moléculaire des plantes a été réalisée à l'aide d'une membrane hybridée avec une sonde radioactive dérivée de *Arabidopsis* @miR159 pour le témoin de charge, mais cette sonde s'hybride mal avec les ARN de *Nicotiana benthamiana* 16COV3 utilisé comme témoin positif (+VE). Le témoin négatif (-VE) correspond à de l'ARN extrait de PN40024 non transformé. De petits ARN de 21nt et 24nt ont été détectés après hybridation avec une sonde @GF. Ce résultat montre que toutes les plantes transgéniques obtenues de la lignée R2 produisent des petits ARN « GF », mais à des niveaux assez différents (**Figure 35**).

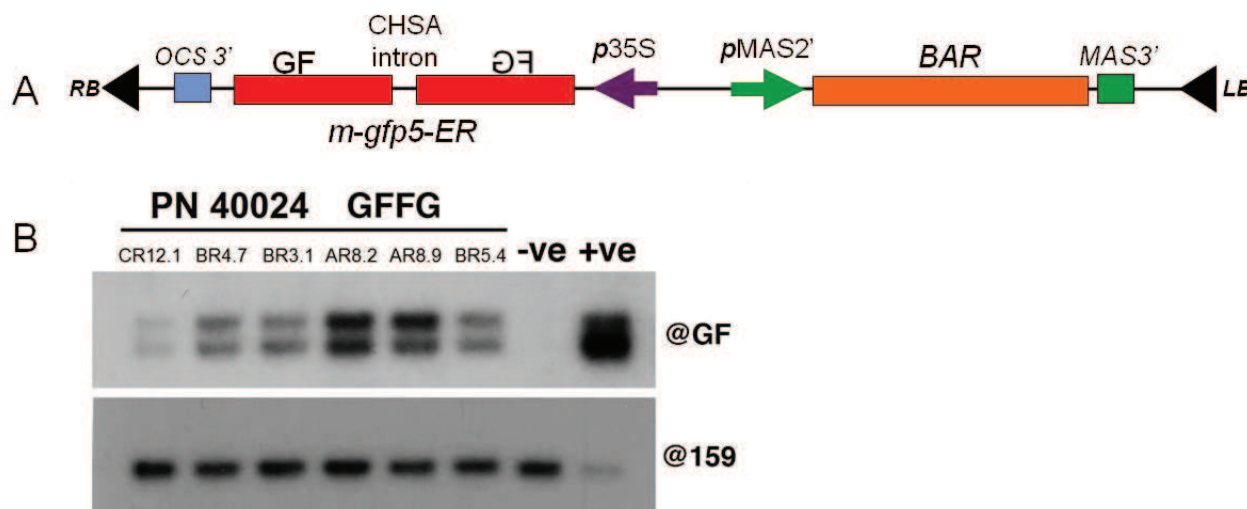


Figure 35 : Analyse moléculaire de la lignée R2

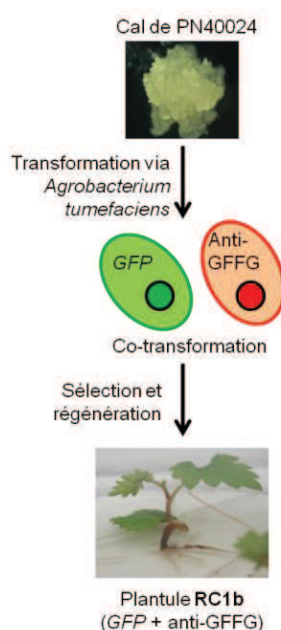
A : schéma de la construction utilisée pour la transformation

B : Northern blot avec sondes radioactives de 6 plantes régénérées indépendantes suite à la transformation R2. @159 est un témoin de charge, -VE est un témoin négatif (PN40024 non transformé) et +VE est un témoin positif (*Nicotiana benthamiana* 16C0V3)

L'analyse moléculaire de la lignée R2 nous montre que la vigne est bien capable de synthétiser de petits ARN à partir d'une structure tige-boucle. Il a fallu 12 mois pour obtenir cette lignée, qui nous a permis de réaliser des manipulations de greffages avec la lignée PNG15.

III.3.3. Co-transformation du PN40024 (lignée RC1)

La troisième transformation est une co-transformation. Nous avons mis en contact les cals embryogènes de PN40024 avec 2 agrobactéries différentes, la première possédant la construction *GFP* et la seconde la construction tige-boucle anti-GFP utilisée pour la transformation de la lignée R2. Trois séries de transformations ont été réalisées. Au total, nous avons transformé 45 cals embryogènes. Puis nous avons sélectionné les cals doublement transformés sur un milieu avec du BASTA® pour la construction tige boucle. Comme il n'y a pas de silencing dans les tissus indifférenciés, nous avons pu sélectionner les cellules transformées avec la construction *GFP* sous éclairage avec des UV, afin de ne pas surcharger le milieu par l'ajout de kanamycine et mettre toutes les chances de notre côté et ainsi de ne pas trop gêner le développement des cals transformés.



Transformation de la lignée PN40024 avec le transgène <i>GFP</i> et la construction anti-GFP							
Lignée	Construction	Nombre de cals transformés	selection	Nombre de Cals résistants		Nombre de plantes régénérées	Nombre de plantes régénérées avec analyse moléculaire
				Après 5 mois	conservés		
RC1	GFP + anti-GFP	13	kanamycine + BASTA®	13	13	2	1

Figure 36 : Co-transformation de la lignée PN40024 avec le transgène *GFP* et la construction tige-boucle anti-GFP

Nous avons sélectionné et conservé ces 13 cals fluorescents et résistants au BASTA® de la première transformation nommés RC1. Nous avons réussi à régénérer 2 plantes, dont une a été caractérisée au niveau moléculaire (**Figure 36**). Il a fallu 18 mois pour obtenir cette lignée RC1.

L'analyse moléculaire a été réalisée dans les mêmes conditions que celle de la lignée R2. Nous avons également testé la lignée PNG15 pour nous assurer qu'il n'y a pas de petits ARN dans cette lignée. Nous avons obtenu de petits ARN @GF de 21nt et 24nt chez la plante RC1 (**Figure 37**), mettant ainsi en évidence le bon fonctionnement de la construction anti-GFP. Une autre hybridation a été réalisée avec une sonde @P (**Figure 37**). Cette sonde révèle les petits ARN de 21nt issus de la dégradation du gène GFP en présence de la construction tige-boucle anti-GFP. Dans ce cas-là, nous avons obtenu un signal positif pour la lignée RC1. Ces résultats suggèrent que la construction tige-boucle anti-GFP, en présence de la séquence *GFP*, permet la production de petits ARN primaires « GF » et la production de petits ARN secondaires « P » chez la vigne.

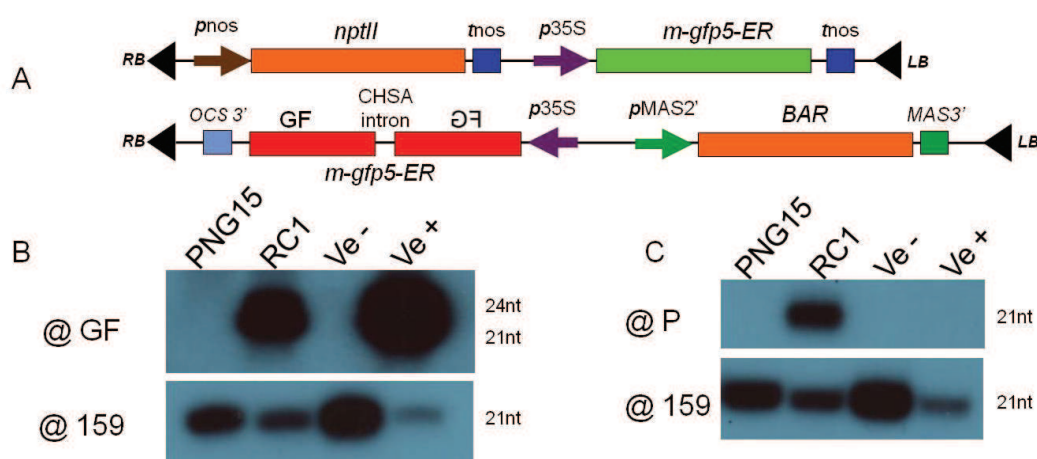


Figure 37 : Analyse moléculaire de la lignée RC1

A : schéma de la construction utilisé pour la transformation

B et C: Northern blot avec sondes radioactives @GP et @P d'une plante régénérée suite à la transformation RC1. @159 est un témoin de charge, -VE est un témoin négatif (PN40024 non transformé) et +VE est un témoin positif (*Nicotiana benthamiana* 16C0V3)

L'absence de siRNA secondaire « P » chez le témoin positif *Nicotiana benthamiana*, est probablement due au fait que la GFP n'est pas exprimée de la même manière chez tous les transformants. Il peut par exemple y avoir des transformants où la GFP peut être éteinte de manière épigénétique (Sohn et al., 2011). Dans ce cas, nous avons fait germer des graines et comme celles-ci sont des doubles transformants, les plantes sont en tout état de cause rouge. Il est alors possible, que nous soyons tombés sur un transformant où la GFP est éteinte définitivement, mais comme ce n'était que la première expérience, il faudra en refaire une autre avec une autre plante pour s'en assurer.

III.4. **Conclusion**

Nous avons obtenu 2 lignées de vignes transformées. La première R2 est transformée avec la construction tige-boucle anti-GFP et la seconde RC1 avec le transgène *GFP* et la construction tige-boucle anti-GFP. Nous avons mis 12 mois pour obtenir les plantules de la lignée R2 et 18 pour la lignée RC1. La transformation de la vigne est une technique délicate et longue, car sur les 120 cals transformés de la lignée PNG15, nous n'avons eu aucun transformant.

Durant les longs mois de sélection, une autre stratégie a été mise en place pour mettre en évidence le silencing chez la vigne via l'extinction de la GFP. Nous avons réalisé des hétérogreffages en parallèle avec des vitroplants de *Nicotiana* 16C0V3 et la lignée de vigne PNG15.

Chapitre IV - **Mise en évidence du silencing**

IV.1. ***Introduction***

La transformation stable de la vigne nécessite un temps de régénération très long. En effet plus de 12 mois ont été nécessaires entre la transformation des cals et l'obtention des plantes régénérées. Il a été décidé de mener en parallèle d'autres approches afin de mettre en évidence le silencing chez la vigne de manière plus rapide.

La technique d'hétérogreffage a été retenue. Cette technique avait déjà été réalisée avec succès au laboratoire. Avec l'obtention de graines de *Nicotiana* doublement transformées éteignant la *GFP*, la lignée de vigne PNG15 a été greffée dessus.

Entre temps, l'obtention de la lignée R2 nous a permis de réaliser des greffages avec la lignée PNG15 afin de vérifier également si les petits ARN produits circulent entre le porte-greffe et le greffon.

Enfin, l'obtention de la lignée RC1 nous a permis de mettre en évidence concrètement l'extinction de la *GFP* chez la vigne.

IV.2. **Matériels et méthodes**

IV.2.1. **Milieux de culture**

IV.2.1.a. **Milieu Tabac**

Pour la préparation de 1000ml :

H ₂ O Ultra pure	500ml
Solution stérile de macroéléments MS62 X20 (sans CaCl ₂)	25ml
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	220mg
Solution stérile de microéléments Heller X1000	1ml
Solution de vitamines Morel X1000	1ml
Myo-inositol	100mg
Saccharose	10g
H ₂ O Ultra pure QSP	1000ml

Cette solution doit être agitée jusqu'à dissolution complète pendant au minimum 15min. A l'aide d'une solution de KOH, il faut ajuster le pH à 5,8.

La solution est ensuite versée dans un flacon contenant 7g de Bacto agar.

Il faut stériliser la solution à l'autoclave programme liquide (20min à 121°C). A la sortie de l'autoclave, la bouteille est bien agitée, afin de bien homogénéiser le milieu.

Le milieu doit refroidir à environ 50°C en l'agitant de temps en temps sous une hotte à flux laminaire. Ensuite il faut ajouter 5ml de fer citrate ammoniacal à 1%. C'est à ce moment que les antibiotiques peuvent être introduits selon les besoins, avant de le couler dans des boîtes de Pétri et de conserver les boîtes à +4°C.

IV.2.1.b. Milieu Schenk

Pour la préparation de 1000ml :

H ₂ O Ultra pure	800ml
Saccharose	30g
Schenck and Hildebrandt	3,183g
Vitamines Schenck X100	10ml
Solution de vitamines Morel X1000	1ml
BAP (1mg/ml)	0,5ml
H ₂ O Ultra pure QSP	1000ml

Cette solution doit être agitée jusqu'à dissolution complète pendant au minimum 15min. Il faut ensuite ajuster le pH à 5,8.

Avant de verser la solution dans une bouteille contenant 8g d'agar, la solution est agitée durant 30min au minimum.

Le milieu est stérilisé à l'autoclave programme liquide (20min à 121°C). Puis, il faut agiter la bouteille, afin de bien homogénéiser le milieu. Introduire le(s) flacon(s) sous la hotte à flux laminaire.

Puis, le milieu est refroidi à environ 50°C en l'agitant de temps en temps sous une hotte à flux laminaire avant de le couler dans des boîtes de Pétri et de conserver les boîtes à +4°C.

IV.2.2. Observations sous loupe fluorescente

L'observation de la fluorescence émise par la protéine GFP est réalisée à l'aide d'une loupe Nikon équipée d'un lampe UV Nikon et 2 filtres. Un filtre GFP-L (EX 480/40, DM 505 et BA 510) et un filtre GFP-B (EX480/40, DM 505 et BA 535/50). Le filtre GFP-L, permet de visualiser la fluorescence émise par la GFP et la chlorophylle, alors que le filtre GFP-B ne laisse passer que la fluorescence émise par la GFP. Les photos ont été prises avec un appareil photo numérique Nikon.

IV.2.3. **RT-PCR**

IV.2.3.a. **Extraction des ARN**

L'extraction des ARN a été réalisée à partir de feuilles des *vitro-plants* de la lignée PNG15 greffés sur des *vitro-plants* de PN40024 infectés par le virus *GFLV*.

L'ARN total a été extrait à l'aide du kit Qiagen RNeasy[®] Mini (Qiagen Inc, USA) avec un tampon d'extraction complété par du PVP (10mg/ml). Le traitement à la DNase a été réalisé dans le même temps avec le kit RNase-Free DNase (Qiagen Cat. No 79254).

Le tampon RLC a été utilisé et 20 à 30mg de PVP40 (prolabo) par ml de tampon ainsi que 1% de β -mercaptoethanol ont été ajoutés extemporanément.

IV.2.3.b. **RT-PCR**

Toutes les PCR et RT-PCR sont effectuées avec un thermocycleur DNA Engine TETRAD[®] 2, (Bio Rad) pour la RT et le thermocycleur Robocycler[®] (Stratagene, La Jolla, CA) pour la PCR. Les amorces sont commandées chez Sigma[®] et diluées à l'aide d'H₂O Sigma[®] afin d'obtenir une solution concentrée à 50 μ M. Les DNA polymérases proviennent de la firme Invitrogen.

Les premiers brins d'ADNc ont été synthétisés avec 500ng d'ARN et 0,5pg (dT) 12-18 oligo Primer (Invitrogen 18418-012) à l'aide de la transcriptase inverse Superscript II[®] (Invitrogen) ou la transcriptase inverse Superscript III[®] (Invitrogen) selon le protocole du fabricant.

Environ 0,5-1 μ l d'ADNc sont amplifiés avec la Taq Polymérase DNA recombinant (Invitrogen Cat No 10342) et le couple d'amorce CPS (TTGTGCGCCCAGATCTCTCTTTACCA) et CPR (ACACATATATACACTTGGGTCTTT).

L'amplification a été réalisée dans 25µl contenant :

Tampon de PCR 10X	2,5µl
MgCl ₂ (50mM)	1µl
dNTP (5mM)	0,5µl
Amorces (50µM)	0,25µl
Taq DNA polymérase (5units/µl) (Invitrogen)	0,25µl
H ₂ O Sigma [®]	qsp 25µl

Les cycles de la PCR sont les suivants :

1 cycle à 95°C pendant 5 min,

40 cycles : 95°C durant 30s (dénaturation),
 50°C durant 30s (hybridation des amorces)
 72°C 45s (élongation)

1 cycle à 72°C pendant 10min.

L'analyse de la PCR se fait sur gel d'agarose 1,2 ou 2% (Invitrogen) dans du TAE 0,5X (dilué à partir de TAE 10X (Tris/HCl 400mM, Acide acétique 11,4ml/l et EDTA 10mM). Les échantillons sont chargés sur le gel avec un tampon de charge (0,25% BPB, 0,25% XC, 30% de glycérol). La migration a lieu dans une cuve de migration type Mupid à 100V. Puis, les gels sont colorés au BET (100µl de BET (10mg/ml Invitrogen) dans 250ml d'H₂O distillée) pendant environ 10min avant d'être observés aux UV à l'aide de l'appareil Gel Doc 1000 de Bio Rad et du programme Geldoc.

IV.3. **Résultats**

IV.3.1. **Les heterogreffages**

Pour cette expérience, le témoin négatif était constitué d'un assemblage entre les plantules de *Nicotiana benthamiana*. *Nicotiana b.* wt avec des *Nicotiana b.* 16C et la lignée de vigne PNG15 sur du *Nicotiana b.* 16C. Le greffon a émis de la fluorescence verte après excitation sous les UV durant toute la manipulation. Nous avons aussi réalisé un autre montage témoin entre une vigne PNG15 sur *Nicotiana b.* 16C afin de nous assurer que la greffe n'altère pas l'expression de la *GFP* chez la vigne et *Nicotiana b.* Aucune altération n'a été observée, le greffon et le porte-greffe restent bien fluorescents sous UV (**Figure 38**).

Un montage mettant en jeu en porte greffe le *Nicotiana b.* 16COV3 et le greffon *Nicotiana b.* 16C a été réalisé comme témoin positif pour l'extinction de la *GFP* et pour s'assurer de la bonne circulation des siRNAs (**Figure 38**).

Les montages tests ont été réalisés avec une plantule de *Nicotiana b.* 16COV3 comme porte-greffe et une plantule de vigne de la lignée PNG15 comme greffon.

Ces montages ont été réalisés stérilement en condition de culture *in vitro* dans des tubes et sur un milieu schenk pour la première manipulation et ensuite sur un milieu tabac afin d'améliorer les conditions de vie du porte-greffe.

Cinq séries d'expériences ont été réalisées successivement dans le temps. Alors qu'un seul montage témoin positif (*Nicotiana b.* 16C sur *Nicotiana b.* 16COV3) a été nécessaire pour éteindre la *GFP*, nous avons réalisé au total 21 montages avec la lignée PNG15 sur *Nicotiana b.* 16COV3. Après plus de 8 semaines, aucune extinction de la *GFP* chez la vigne greffée n'a été observée alors qu'au bout d'1 semaine l'extinction avait déjà eu lieu dans le montage témoin positif (*Nicotiana b.* 16C sur *Nicotiana b.* 16COV3 (**Figure 38**).

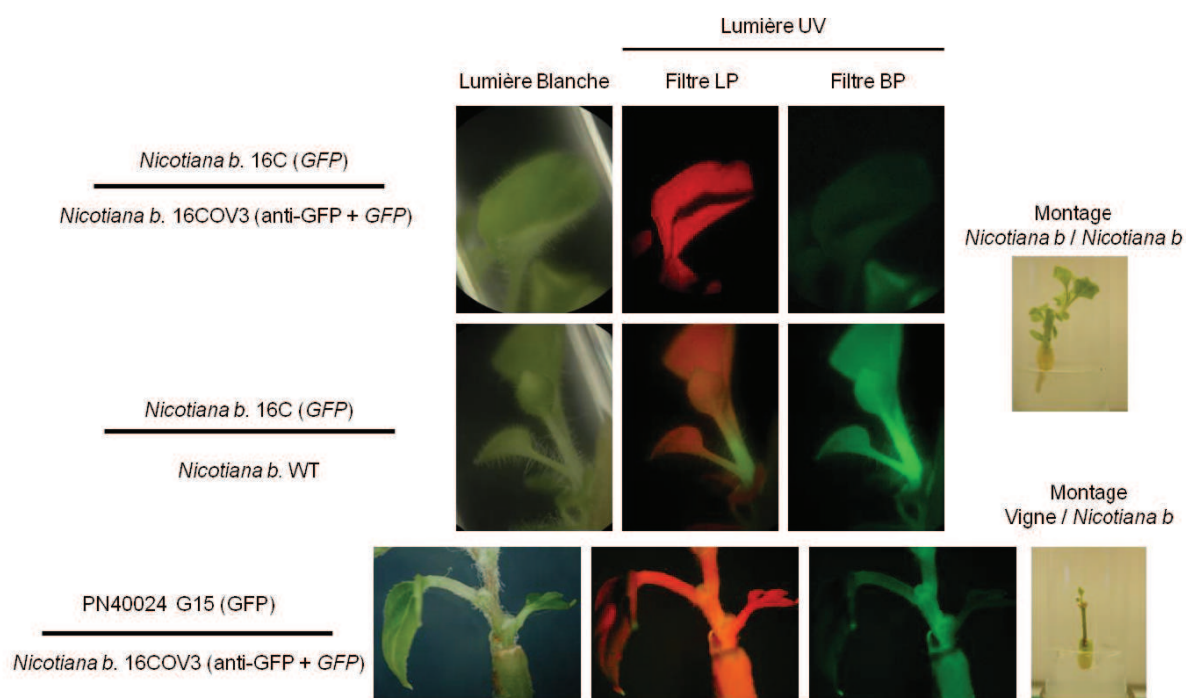


Figure 38 : Observations sous UV et lumière blanche des hétéogreffes

Pourtant, la vigne et le tabac sont transformées avec la même GFP, la m-GFP5-ER (Haseloff, 1997) donc la construction tige-boucle devrait être capable d'éteindre la GFP de la vigne. Nous avons stoppé les manipulations au bout de 8 semaines, les portes greffes n'étaient certainement plus viables, sur milieu Schenk ou sur milieu Tabac (absence de développement des racines et brunissement du porte-greffe). Ces résultats ne sont vraiment pas concluants pour la vigne. La mise en place du silencing chez la vigne est probablement beaucoup plus longue que chez *Nicotiana b.* Par conséquent, un tel assemblage n'est pas viable assez longtemps pour obtenir un résultat positif.

Entre temps, la régénération et la caractérisation de la lignée R2 ont été possibles. Nous avons choisi de poursuivre les greffes en utilisant cette fois-ci uniquement la lignée PNG15 et une lignée R2. En effet, le montage vigne sur vigne est viable plus longtemps et nous permettrait d'obtenir de meilleurs résultats.

IV.3.2. Les greffages

IV.3.2.a. PNG15 (*GFP*) sur la lignée R2 (anti-*GFP*)

Nous avons alors décidé de réaliser des greffages entre des plantes des deux lignées R2 et PNG15 (*GFP*).

Dans les premières manipulations, les montages ont été réalisés dans l'ordre suivant, la lignée R2 (porte-greffe) sous le PNG15 (greffon). On s'attend ainsi à une extinction de la fluorescence dans les parties aériennes. Puis, nous avons décidé de faire un montage dans l'autre sens car une amélioration de l'extinction a été observée chez *Arabidopsis* lorsqu'on inverse le montage (Molnar et al., 2010).

Ces montages ont été réalisés dans des conditions stériles *in vitro* dans des tubes et sur un milieu spécifique à la vigne Woody Plant Medium (WPM) céfotaxime 100mg/L sans charbon et sans BAP.

Pour la première série de greffages 72 montages lignée PNG15 sur la lignée R2 ont été réalisés avec un témoin lignée PNG15 sur la lignée PNG15. Après 9 semaines, aucune extinction de la GFP n'a été visible, les parties du greffon sont toujours vertes sous UV. Une nouvelle série de greffages a été réalisée mais il y a eu un problème dans le milieu de repiquage de la lignée R2 entraînant une grosse perte matériel et de temps car il faut au moins 6 semaines pour obtenir de nouvelles boutures de vigne. Nous avons alors réalisé une nouvelle série de greffages mais avec moins de matériel. Seuls 4 montages lignée PNG15 sur lignée R2 ont été réalisés et 8 montages dans le sens lignée R2 sur lignée PNG15. Au bout de 9 semaines, aucun résultat d'extinction n'a été observé, même en conservant les tubes dans les chambres de culture un mois ou 2 mois supplémentaires, aucune extinction n'a été mise en évidence dans les deux sens de montage (**Figure 39**).

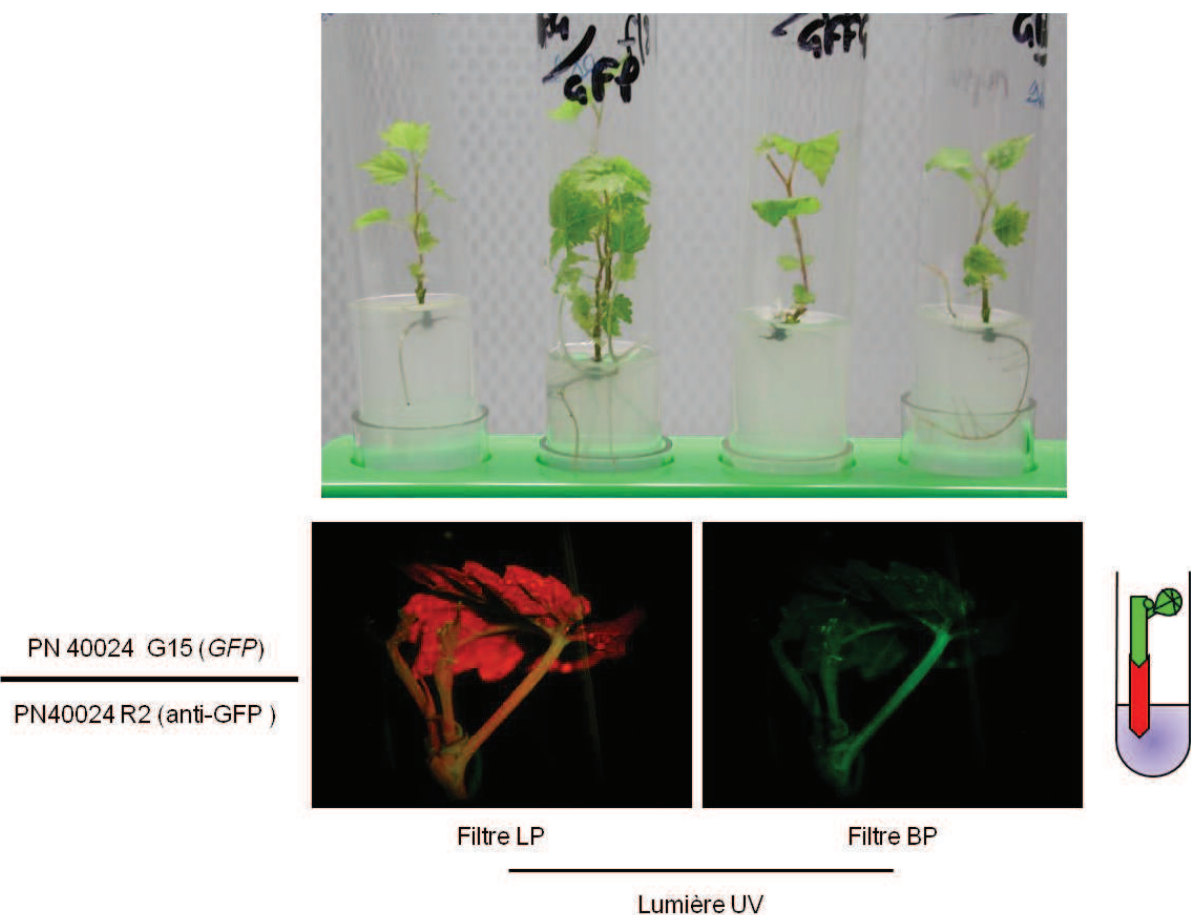


Figure 39 : Photos des montages et observations sous UV des greffes après 9 semaines

Néanmoins, les manipulations de greffages ont mieux réussi dans le temps que les manipulations d'hétérogreffages, en effet, les greffons se sont beaucoup mieux développés dans le système de greffage. Mais, ces résultats nous montrent qu'il y a peut-être un problème au niveau de la circulation des siRNAs entre le porte-greffe et le greffon chez la vigne et que le modèle *in vitro* n'est peut-être pas le meilleur pour ce genre de manipulation. En effet, ces résultats sont les mêmes que ceux obtenus avec les hétérogreffes.

Les plus belles greffes ont été congelées dans l'azote liquide et stockées dans les congélateurs -80°C afin de servir à d'éventuelles analyses moléculaires.

Très récemment, un greffon de la lignée PNG15 a été analysé par northern blot afin de voir si l'on observe la présence de siRNAs. Après une longue exposition aux UV ou une fixation chimique des petits ARNs sur la membrane, aucun siRNA n'a été mis

en évidence, ni de 21nt ou de 24nt. Seule une plante a été analysée par northern blot, d'autres ont été stockées à -80°C et pourront compléter ce résultat.

IV.3.2.b. PNG15 sur des PN40024 infectés par le *GFLV*

Afin d'aborder une autre question liée au projet nous avons décidé d'infecter des plantes de la lignée PNG15 (*GFP*) avec le virus *GFLV* afin d'obtenir un outil pour étudier si ce virus possède des propriétés de suppresseur du silencing. Nous avons alors greffé des lignées de PN40024 infectées par le *GFLV* sous la lignée PNG15. Une semaine plus tard, la caractérisation moléculaire a été effectuée en réalisant une RT-PCR sur le gène codant la protéine de capsid du virus. Toutes les plantes testées ont été positives et montrent la bande attendue à 555pb (**Figure 40**).

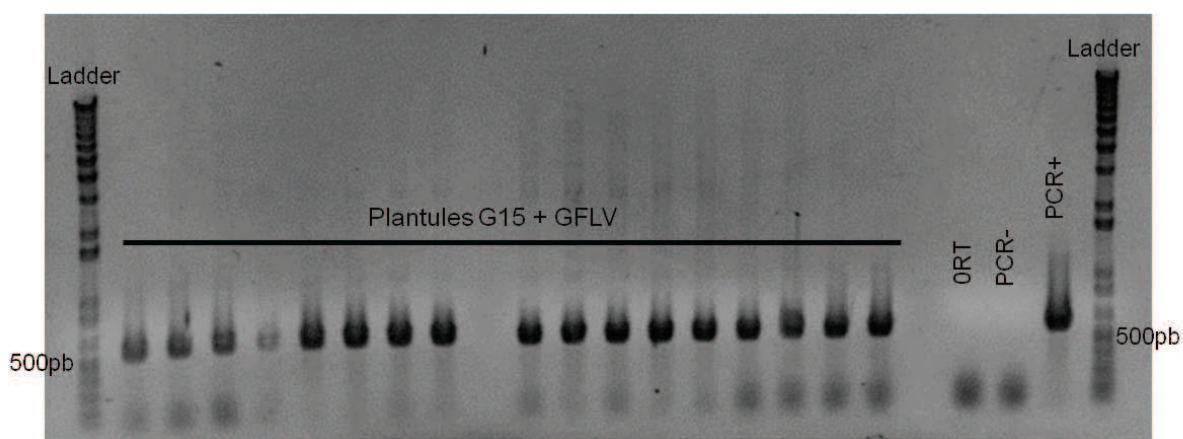


Figure 40 : Résultat de la RT-PCR réalisée à partir d'ARN de la lignée PNG15 infectée par le *GFLV*. Chaque greffon a été testé par amplification d'un fragment de 550pb de la CP du *GFLV*. Le témoin positif de PCR a été réalisé avec de l'ADNc viral purifié et les témoins négatifs de PCR et de RT sont réalisés avec de l'eau.

IV.3.3. Analyse phénotypique de la lignée RC1 (GFP + anti-GFP)

Les cals, méristèmes et les feuilles de la plante régénérée RC1 ont été observés sous une lumière blanche et UV sous une loupe. Les photos ont été prises avec le même temps d'exposition, et le même grossissement afin de mieux comparer les échantillons entre eux.

Sous lumière UV, le cal standard PN40024 n'a pas montré de fluorescence. En revanche, les cals de la lignée PNG15 et de la lignée RC1 sont fluorescents, comme cela a été observé chez *Arabidopsis* (Dunoyer et al., 2006) (**Figure 41**).

Lorsqu'on observe les feuilles avec filtre LP, la fluorescence émise par la chlorophylle est de même intensité chez la plante sauvage PN40024 et la plante transformée RC1. La lignée PNG15 présente une intensité nettement inférieure due à une forte fluorescence de la GFP. En utilisant le filtre BP, la lignée PN40024 ne présente pas de fluorescence comme cela est attendu. La lignée PNG15 émet bien la fluorescence de la GFP. Pour lignée RC1, la plantule ne fluorescence pas en vert mais rouge, néanmoins, une observation plus précise, permet de visualiser un faible signal visible au niveau du bourgeon apical (**Figure 41**).

Pour affiner l'analyse, nous avons observé le méristème des 3 plantes (PN40024, PNG15 et RC1). Avec le filtre LP, nous avons pu observer la fluorescence verte chez la plante PNG15 au niveau du bourgeon, ses stipules et ses trichomes. Pour la plante RC1, un signal légèrement vert s'observe au niveau de la feuille émergente. Avec le filtre BP, cette fluorescence est mieux visible et semble se situer uniquement à la pointe de la feuille émergente, alors que le bourgeon de la plante PNG15 fluoresce dans son ensemble (**Figure 41**).

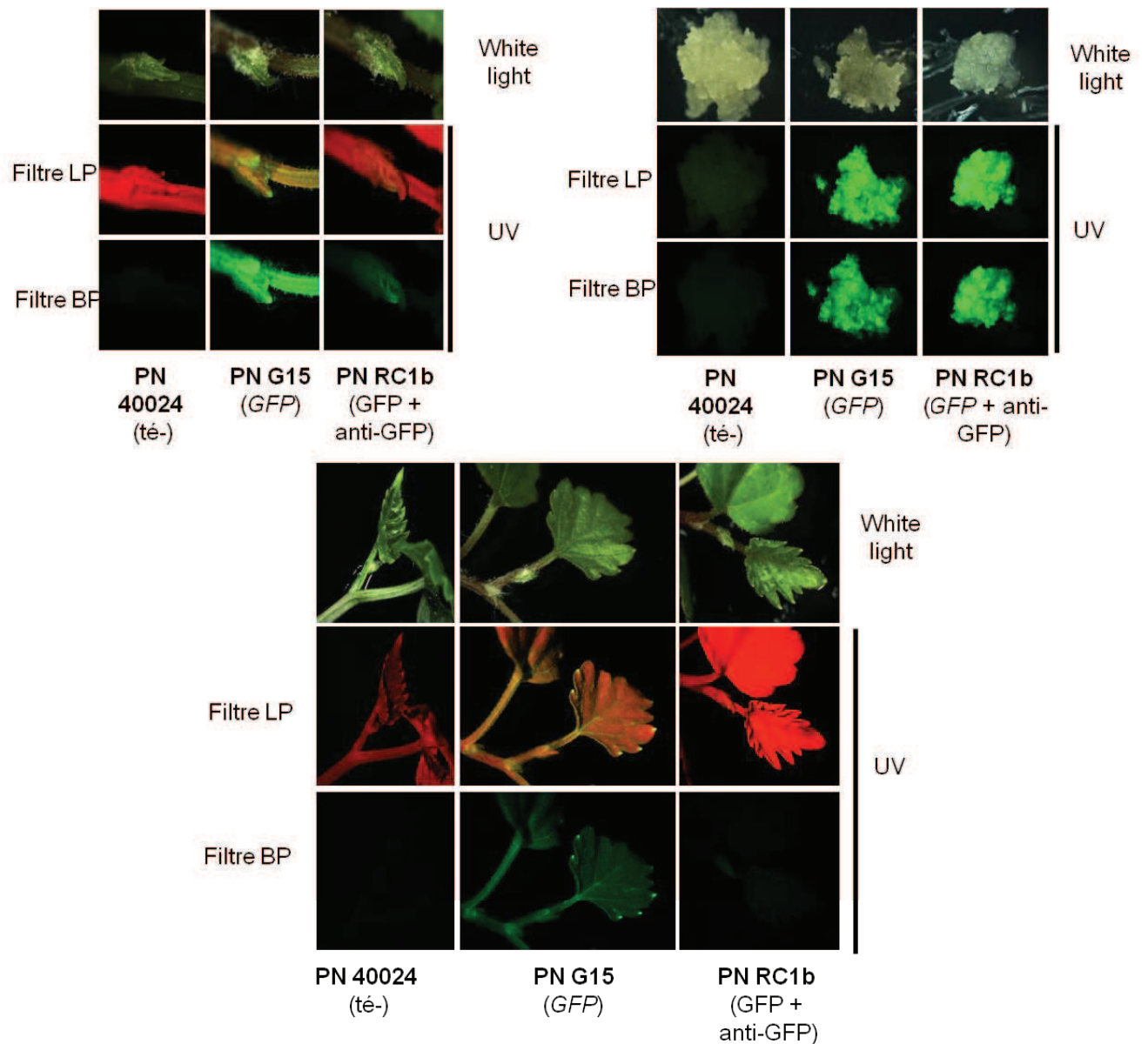


Figure 41 : Observations sous UV des cals, feuilles et méristèmes de la lignée PN40024, PNG15 et RC1

Ces observations confirment l'extinction de la GFP par la construction tige-boucle anti-GFP dans les tissus différenciés chez la vigne. Par contre, au niveau du cal embryogène ou des méristèmes apicaux, la fluorescence persiste. Nos données confirment les observations faites chez *Arabidopsis* où les zones de divisions intenses ne présentent pas de silencing (Dunoyer et al., 2006).

IV.4. *Conclusion*

La mise en évidence du silencing chez la vigne par l'extinction de la GFP, nous a permis de confirmer les premiers résultats observés chez *Arabidopsis*, à savoir un silencing efficace dans tous les tissus somatiques différenciés mais aussi l'absence de silencing au niveau des cellules indifférenciées et des zones de forte division cellulaire. L'obtention de la lignée RC1 est un outil précieux pour l'étude du silencing de manière fondamentale chez la vigne.

Néanmoins, les résultats négatifs des manipulations d'hétéogreffes et de greffages ne permettent pas de mettre en évidence la circulation des petits ARN chez la vigne. D'autres conditions expérimentales devront être testées. L'utilisation des plantes en pot ou en serre serait probablement mieux adaptée, car la formation de cals au niveau du point de greffe est peut-être trop importante et pourrait altérer la propagation du silencing (**Figure 42**).

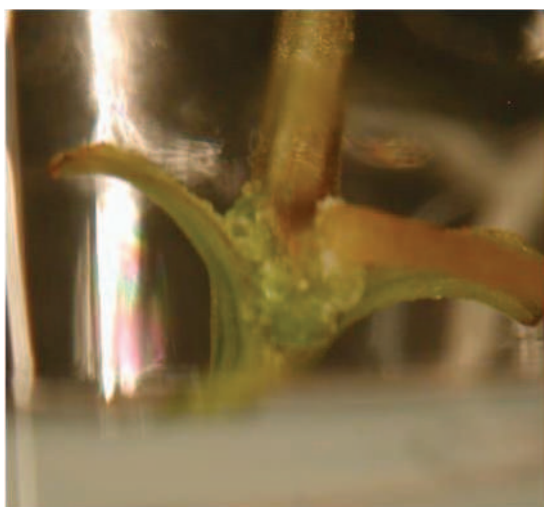


Figure 42 : Photo d'un cal au point de greffe vigne sur vigne.

L'obtention de la lignée PNG15 infectée avec le virus GFLV offre aussi des perspectives dans l'étude de suppresseur de silencing chez ce virus et dans son hôte.

Chapitre V - Clonage de RDR6

V.1. *Introduction*

L'analyse moléculaire de la lignée silencée RC1 a montré que des siRNA secondaires sont produits, démontrant ainsi que les mécanismes de transitivity sont fonctionnels chez la vigne. Ceux-ci font appel à RDR6 qui a donc un rôle potentiellement important dans l'amplification du silencing, point crucial pour la résistance aux virus chez la vigne, par exemple. Par contre, chez *Nicotiana b.*, il a été montré que le silencing est sensible aux températures inférieures à 20°C (Szittyá et al., 2003). Puis, plus tard, il a été démontré que l'expression du gène *NbRDR6* est fortement diminuée à des températures inférieures à 20°C (Qu et al., 2005). Il nous a donc semblé important de mieux comprendre la régulation de l'expression de *VvRDR6* et, notamment, de la sensibilité de cette dernière aux stress abiotiques.

Disposant de la séquence du génome du PN40024 (Jaillon et al., 2007), la recherche de gènes orthologues chez la vigne est facilitée, mais les gènes ne sont pas toujours bien annotés, vraisemblablement à cause du séquençage qui a été fait en shot-gun. Le clonage de ce gène a été envisagé dans un premier temps afin de connaître son architecture et la taille réelle de l'ADNc.

V.1.1. RDR6 chez Arabidopsis

Chez *Arabidopsis*, le gène codant pour la protéine RDR6 est situé au niveau du chromosome 3. Il est composé de 2 exons, le premier est composé de 158pb, le deuxième de 907pb, séparés par 1 intron de 421pb. Le cadre de lecture ouvert est composé de 4012pb. Ce gène a également été décrit chez d'autres espèces (Yang et al., 2010) et l'architecture de ces orthologues est pratiquement identique avec 2 exons et 1 intron sauf chez *Physcomitrella patens* où il y a 4 exons et 3 introns (**Figure 43**).

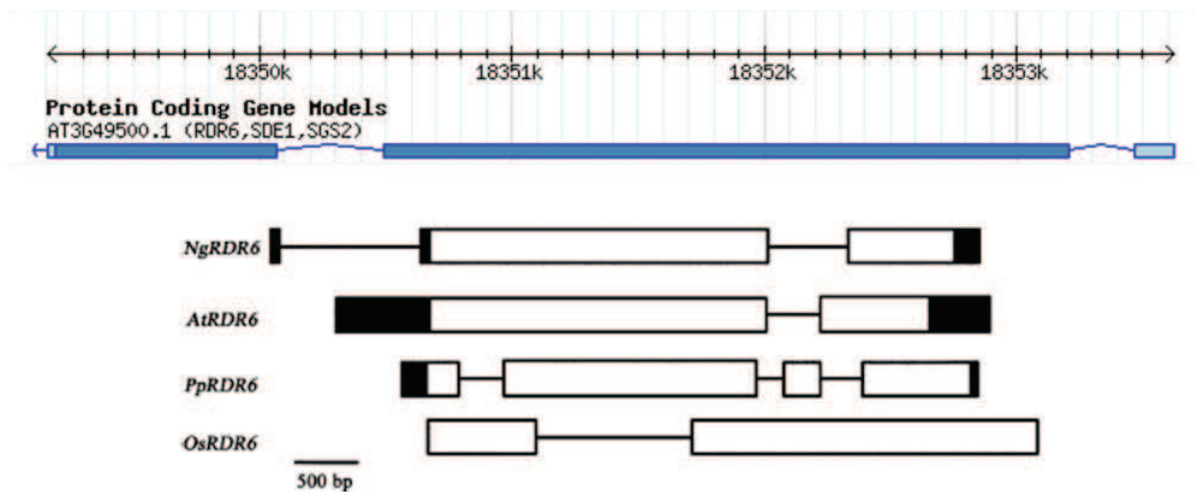


Figure 43 : Annotation du gène *AthRDR6* sur le site TAIR (TAIR) et représentation schématique du gène *RDR6* chez d'autres espèces, *Nicotiana glutinosa*, *Oryza sativa* et *Physcomitrella patens* (Yang et al., 2010). Les rectangles représentent les exons et les traits les introns.

V.1.2. Séquence du PN40024 du génoscope

Sur le site du génoscope (Genoscope), où la séquence du PN40024 est disponible depuis 2007 (Jaillon et al., 2007), nous avons réalisé un BLASTP sur la séquence 12X avec la séquence protéique de *RDR6* d'*Arabidopsis*. La protéine putative GSVIVT01035851001 est celle qui présente le plus d'homologies de séquence avec la séquence de *RDR6* d'*Arabidopsis* (**Figure 44**).

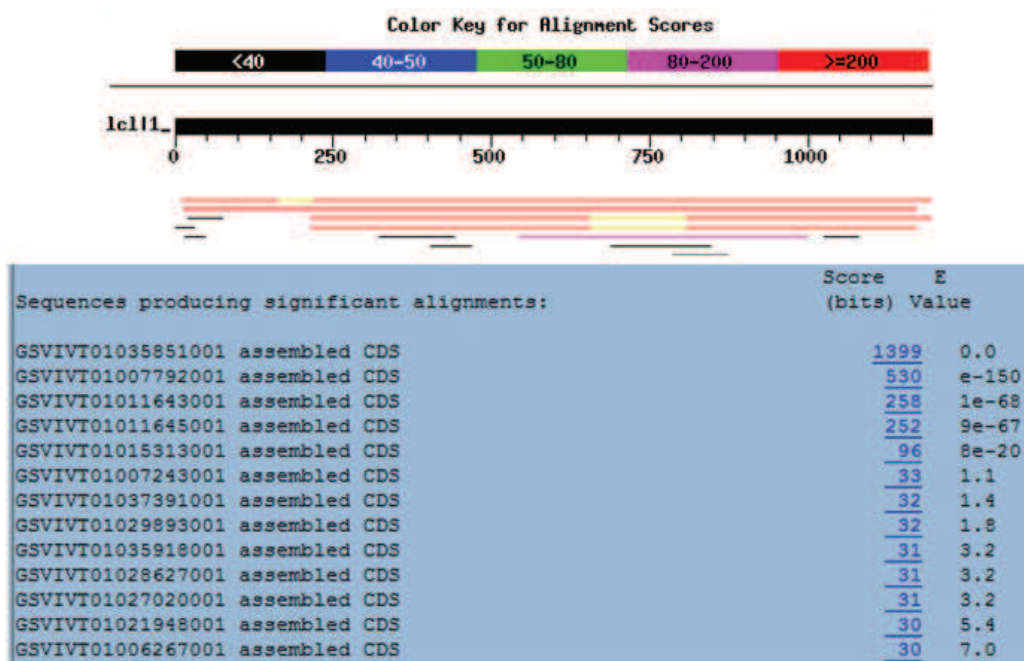


Figure 44 : Résultat du BLASTP réalisé sur le site du génoscope (Genoscope) à partir de la séquence protéique d'*AthRDR6* (TAIR).

Le gène correspondant à la protéine putative GSVIVT01035851001 est situé sur le chromosome 4 et est composé de 4852pb. Il est composé de 5 exons et 4 introns. Les exons sont constitués respectivement de 90pb, 27pb, 60pb, 2052pb et 879pb. Les introns se composent de 78pb, 144pb, 237pb et 997pb (**Figure 45**). Avec ces données, nous avons pu créer des amorces afin d'amplifier la séquence génomique ou de réaliser des RT-PCR sur des extraits d'ARN de vigne.

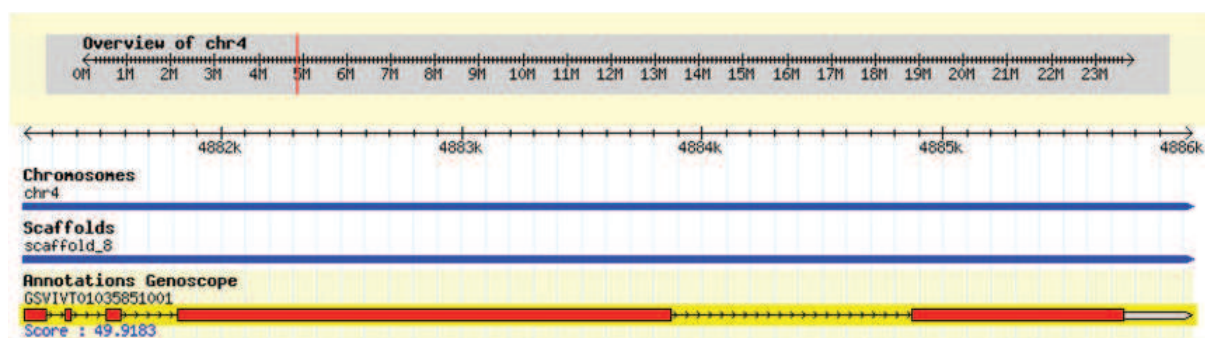


Figure 45 : Annotation du gène putatif RDR6 de vigne GSVIVT01035851001 sur le site du génoscope (Genoscope)

V.2. **Matériels et méthodes**

V.2.1. **Matériel végétal**

Les extractions d'ADN et d'ARN ont été réalisées à partir de feuilles de *vitro-plants* de PN40024 bouturé sur le milieu woody plant medium sans BAP et sans charbon (le milieu est décrit dans le paragraphe III.2.1.c).

V.2.2. **Milieu LB (Lysogeny broth)**

Pour une solution de 1000ml :

Tryptone	10g/l
Yeast Extract	5g/l
NaCl	10g/l
H ₂ O Ultra pure	Qsp 1000ml

Dans la bouteille, il faut ajouter 15g/l d'Agar. Le milieu est ensuite autoclavé. Une fois le milieu refroidi (environ 50°C), 5ml de fer citrate ammoniacal à 1% est ajouté, ainsi que les antibiotiques selon les besoins, avant de le couler dans des boîtes de Pétri conservées +4°C.

V.2.3. **Extraction d'ADN**

L'extraction d'ADN se réalise à l'aide du kit Nucléospin-Plant II de Macherey Nagel.

Cent mg de matériel frais sont broyés dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon (préalablement refroidis à -20°C) où avec le Tissuelyser II (Qiagen) directement dans un tube de 2ml à l'aide de billes d'acier froides.

On ajoute 400µl de tampon PL1 avec 10µl de RNase A, avant de vortexer 2 à 3 fois. Le lysat est ensuite filtré et clarifié par centrifugation de 2min à 11000g à l'aide d'une

colonne violette. L'éluât est transféré dans un nouveau tube de 2ml sans toucher le culot. On ajoute 450µl de tampon PC avant de fixer l'ADN sur la membrane de silice à l'aide de la colonne verte. Une centrifugation de 1min à 11000g est effectuée.

Puis, on réalise le lavage de la membrane avec 400µl de tampon de lavage PW1. Une nouvelle centrifugation de 1min à 11000g est effectuée avant 2 nouveaux lavages à l'aide de 700µl puis 200µl du tampon PW2.

L'élution de l'ADN est pratiquée en 2 fois avec 50µl de solution (25µl de tampon PE et 25µl d' H₂O Sigma®) avec une incubation de 5min à 70°C et une centrifugation d'1min à 11000g.

Enfin, l'extrait d'ADN est prêt à être déposé sur gel d'agarose ou mesuré au Nanodrop.

V.2.4. **RT-PCR**

V.2.4.a. **Extraction des ARN**

L'ARN total a été extrait à l'aide du kit Qiagen RNeasy® Mini (Qiagen Inc, USA) avec un tampon d'extraction complété par du PVP (10mg/ml). Le traitement à la DNase a été réalisé dans le même temps avec le kit RNase-Free DNase (Qiagen Cat. No 79254).

Le tampon RLC a été utilisé. 20 à 30mg de PVP40 (prolabo) par ml de tampon et 1% de β-mercaptoethanol ont été ajoutés extemporanément.

V.2.4.b. **RT-PCR**

Toutes les PCR et RT-PCR sont effectuées dans un thermocycleur DNA Engine TETRAD® 2, (Bio Rad) pour la RT et le thermocycleur Robocycler® (Stratagene, La Jolla, CA) pour la PCR. Les amorces sont commandées chez Sigma® et diluées à l'aide d'H₂O Sigma® afin d'obtenir une solution concentrée à 50µM.

Les premiers brins d'ADNc ont été synthétisés avec 500ng d'ARN et 0,5pg (dT) 12-18 oligo Primer (Invitrogen 18418-012) à l'aide de la transcriptase inverse Superscript III[®] (Invitrogen) selon le protocole du fabricant.

Environ 0,5-1µl d'ADNc sont amplifiés avec la Taq Polymérase DNA recombinant (Invitrogen Cat No 10342). L'amplification a été réalisée dans 25µl contenant :

Tampon de PCR 10X	2,5µl
MgCl ₂ (50mM)	1µl
dNTP (5mM)	0,5µl
Amorces (50µM)	0,25µl
Taq DNA polymérase (5units/µl)(Invitrogen)	0,25µl
H ₂ O Sigma [®]	qsp 25µl

Les cycles de la PCR sont les suivants :

1 cycle à 95°C pendant 5min,

35 à 40 cycles : 95°C durant 30s (dénaturation),

30s à la température des amorces (**Figure 46**)

72°C pour l'élongation, le temps étant adapté à la longueur du fragment amplifié (selon les caractéristiques de vitesse de l'enzyme du fabricant, 1min/kb)

1 cycle à 72°C pendant 10min.

nom	Sequence (5'-3')	coordonnées en pb	Tm
seqrdr6f2	GCCCAAACATGCTGTGATAAAATGC	678-703	65
seqrdr6f3	AAGTGATCACATCAAATTCCTTTCCCC	1551-1576	65-67
seqrdr6f4	CTAGGATCTTTGTGCCATCTGGG	2391-2413	66-67
seqrdr6f5	GGAAAACCTGTATTACTGGCTATGTTG	3261-3287	56-67
seqrdr6f6	ATCCTAGGCAAAATGTATCGCC	4092-4113	64-68
seqrdr6r1	CGGCAGTTCTGTAATAGACAAAAGG	800-824	65
seqrdr6r2	CCCTCAACTGGTTAGATGAGAATGC	1658-1682	65-67
seqrdr6r3	CCATGCTTTAAGAAACAATTCTCAA	2492-2517	65-67
seqrdr6r4	GCATCAACATTGTCCTACTCTACCAG	3326-3351	66-67
seqrdr6r5	CATTGATGAAATCAGCAGATCCTGG	4206-4230	56-67
seqrdr6f4rev	CCCAGATGGCACAAGATCCTAG	2391-2413	67-68
seqrdr6r1rev	CCTTTTGTCTATTACAGAACTGCCG	800-824	67-68
VvRDR6f1	TTGGGACCTGGATTGGAACATTCTG	91-118	65-67
VvRDR6r1	GTGCCTTGCAGCCAAGAGCT	4760-4780	64-67-68

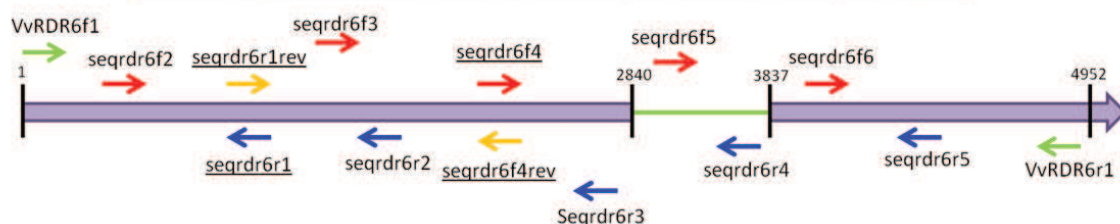


Figure 46 : Tableau des amorces pour le séquençage de *VvRDR6*

L'analyse de la PCR se fait sur gel d'agarose 1,2 ou 2% (Invitrogen) dans du TAE 0,5X (dilué à partir de TAE 10X (Tris/HCl 400mM, Acide acétique 11,4ml/l et EDTA 10mM). Les échantillons sont chargés sur gel avec un tampon de charge (0,25% BPB, 0,25% XC, 30% de glycérol). La migration a lieu dans une cuve de migration type Mupid à 100V. Puis, les gels sont colorés au BET (100µl de BET (10mg/ml Invitrogen) dans 250ml d'H₂O distillée) pendant environ 10min avant d'être observés aux UV à l'aide de l'appareil Gel Doc 1000 de Bio Rad et du programme Geldoc.

V.2.5. 3' et 5' RACE PCR

V.2.5.a. 3' RACE PCR

La 3' RACE PCR consiste en une RT utilisant une amorce oligodt particulière, l'Adapter Primer (AP). Elle permet d'amplifier la partie 3' de l'ADNc en incluant la queue polyA

La partie 3' de la séquence spécifique est reconnue pendant la PCR par l'amorce 3'Abridged Universal Amplification Primer (AUAP). (**Figure 47**).

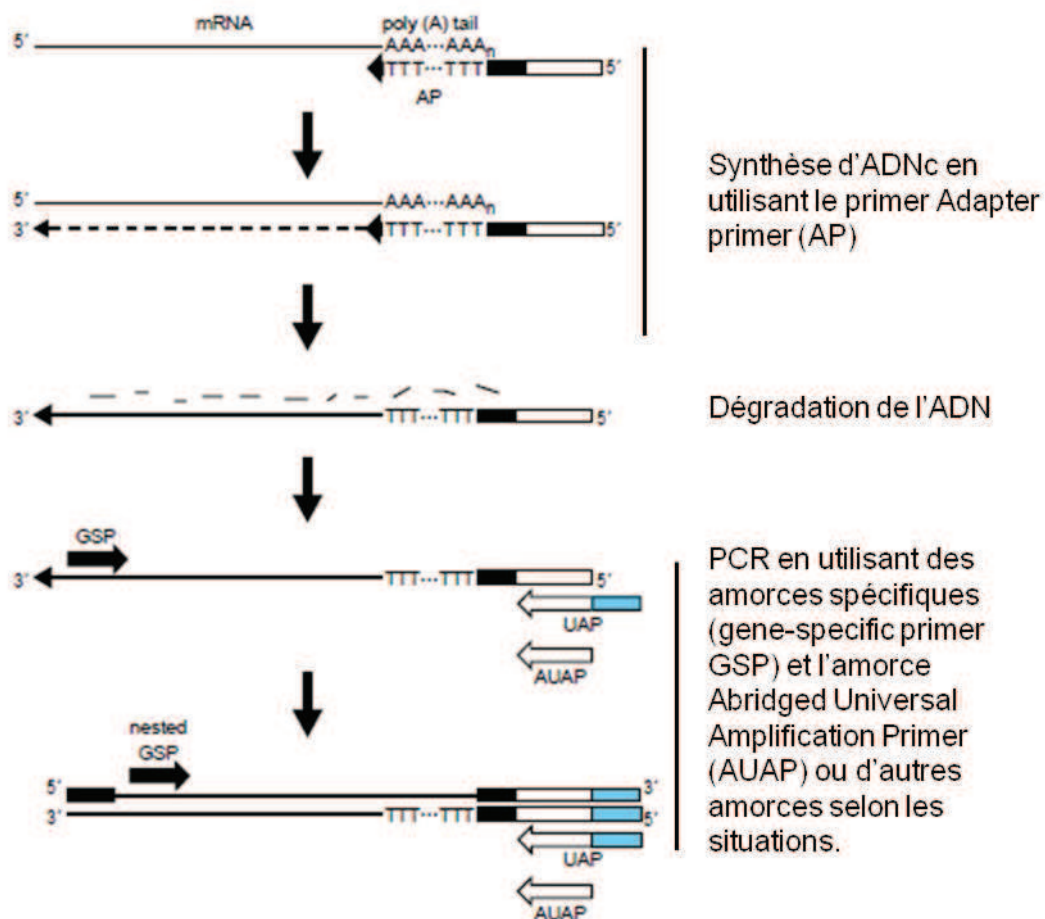


Figure 47 : Schéma représentant la technique de 3' RACE PCR (Invitrogen, 2004a).

Pour cette manipulation, nous avons utilisé le kit 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (catalog no. 18373-019 Invitrogen™) et suivi les indications fournies par le fabricant (Invitrogen, 2004a). Nous avons dessiné une amorce sens spécifique à notre gène, seqrdr6f qui formera notre couple d'amorces avec l'amorce 3'AUAP (**Figure 46**).

Les conditions de RT sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe IV.2.3.b. Nous avons utilisé l'amorce AP à la place de l'oligod(T).

Pour la PCR, nous sommes partis de 5µl de la RT au 1/5^{ème} ou 2µl de RT pure avec le couple d'amorces seqrdr6f et 3'AUAP fourni par le kit.

L'ADNc est amplifié avec la Platinum® Taq DNA polymerase high Fidelity (Invitrogen Cat No 11304-011).

L'amplification a été réalisée dans 25µl contenant :

Tampon X10 Hifi	2,5µl
MgSO ₄ (50mM)	1µl
dNTP (5mM)	0,5µl
Amorces (50µM)	0,25µl
Platinum [®] Taq DNA pol	0,25µl
H ₂ O Sigma [®]	qsp 25µl

Les cycles de la PCR sont les suivants:

1 cycle à 95°C pendant 5min,

35 cycles : 95°C durant 30s (dénaturation),
 68°C durant 40s (hybridation des amorces)
 68°C durant 40s (élongation)

1 cycle à 68°C pendant 10min.

L'analyse de la 3'RACE-PCR se fait sur gel d'agarose 1,2% comme décrit dans le paragraphe V.2.4.b.

V.2.5.b. 5' RACE PCR

La 5' RACE PCR consiste en une RT avec un primer spécifique au gène d'intérêt. L'ADNc est ensuite purifié à l'aide d'une colonne de purification S.N.A.P. Puis une queue dCTP est accrochée sur la partie 5' de l'ADNc. Une première PCR utilise un primer Abridged Anchor Primer (AAP) qui possède une séquence polyG et une séquence spécifique en 5'. Puis une deuxième PCR peut être réalisée avec l'amorce Universal Amplification Primer (UAP) qui reconnaît la séquence spécifique en 5' de l'amorce AAP (**Figure 48**).

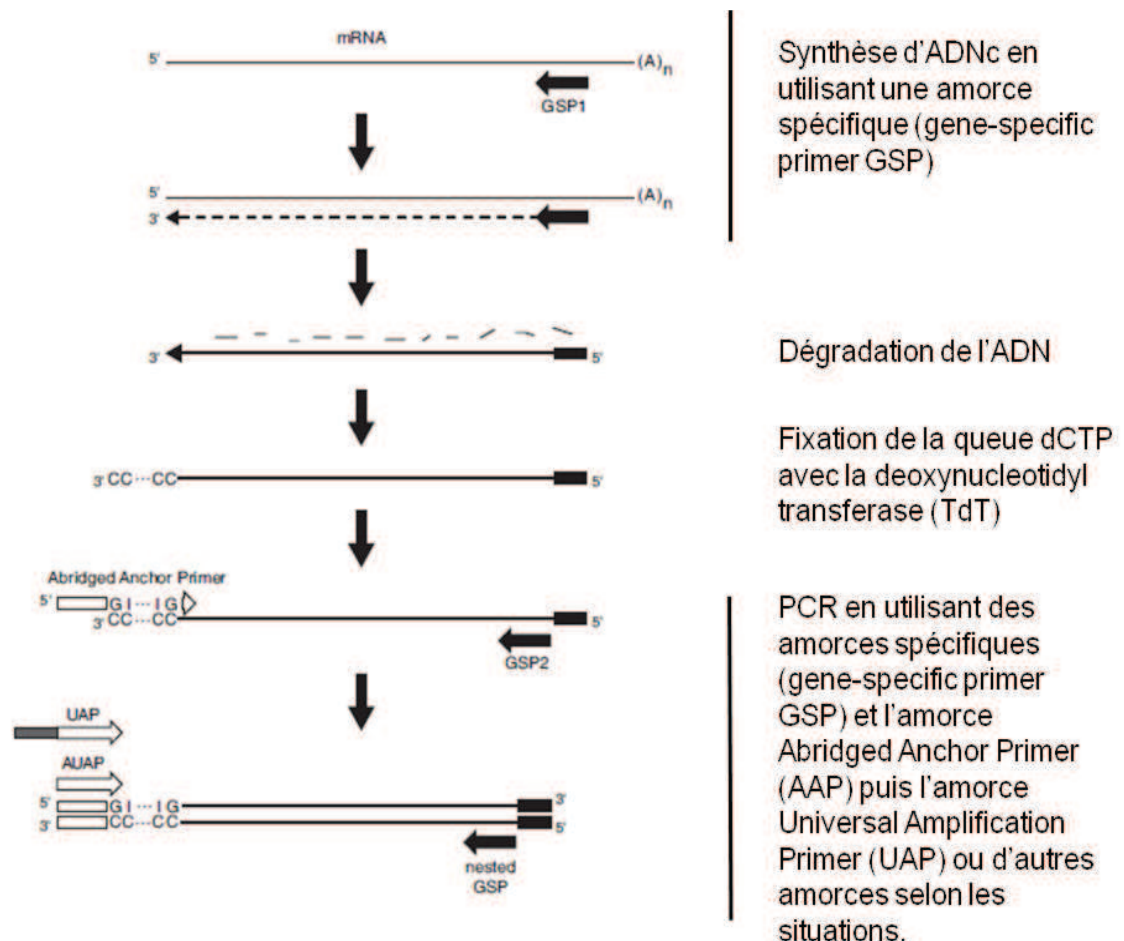


Figure 48 : Schéma représentant la technique de 5' RACE PCR.(Invitrogen, 2004b)

Pour cette manipulation, nous avons utilisé le kit 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (catalog no. 18374-058 Invitrogen™) et suivi les indications fournies par la fabricant (Invitrogen, 2004b)

L'amorce gène spécifique utilisée pour réaliser la RT est l'amorce seqrdr6r2 (**Figure 46**). Les conditions de RT sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe IV.2.3.b. Nous avons utilisé l'amorce seqrdr6f2 à la place de l'oligo (dT).

Puis, nous avons ensuite purifié la RT à l'aide de la colonne S.N.A.P. fournie avec le kit. Une queue dCTP est fixée à l'aide d'une Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) sur le cDNA et 2,5µl cette réaction ont été utilisés pour réaliser une première PCR avec la Platinum® Taq DNA polymerase high Fidelity (Invitrogen Cat No 11304-011).

L'amplification a été réalisée dans 25µl contenant :

Tampon X10 Hifi	2,5µl
MgSO ₄ (50mM)	1µl
dNTP (5mM)	0,5µl
Amorces (10µM)	1µl
Platinum [®] Taq DNA pol	0,2µl
H ₂ O Sigma [®]	qsp 25µl

Cette première PCR est réalisée avec le couple d'amorce AAP (fourni avec le kit) et l'amorce seqrdr6r2 (**Figure 46**).

Les cycles de la PCR sont les suivants :

1 cycle à 95°C pendant 5min,

35 cycles : 95°C durant 30s (dénaturation),
 55°C durant 30s (hybridation des amorces)
 68°C durant 2min (élongation)

1 cycle à 68°C pendant 10min.

Puis une seconde PCR est réalisée en partant de 2,5µl de la première PCR diluée au 1/100^{ème}.

L'amplification a été réalisée à l'aide de la Platinum[®] Taq DNA polymerase high Fidelity (Invitrogen Cat No 11304-011) dans 25µl contenant :

Tampon X10 Hifi	2,5µl
MgSO ₄ (50mM)	1µl
dNTP (5mM)	0,5µl
Amorces (10µM)	1µl
Platinum [®] Taq DNA pol	0,2µl
H ₂ O Sigma [®]	qsp 25µl

Cette seconde PCR est réalisée avec le couple d'amorce UAP (fourni avec le kit) et l'amorce seqrdr6r1 (**Figure 46**).

Les cycles de la PCR sont les suivants :

1 cycle à 95°C pendant 5min,

40 cycles : 95°C durant 30s (dénaturation),
 60°C durant 30s (hybridation des amorces)
 68°C durant 2min (élongation)

1 cycle à 68°C pendant 10min.

L'analyse de la seconde PCR de la 5'RACE-PCR se fait sur gel d'agarose 1,2% comme décrit dans le paragraphe V.2.4.b.

V.2.6. **Clonage et séquençage**

V.2.6.a. **Clonage**

Les clonages se réalisent à l'aide de deux kits de clonage d'Invitrogen en fonction de la taille des fragments. Pour le clonage d'un fragment de PCR de 3 à 10kb, on utilise le kit TOPO[®] XL PCR cloning kit (pCR[®] -XL-TOPO[®]). Pour des fragments plus petits, on utilise le kit TOPO TA Cloning[®] Dual Promoteur. Les vecteurs sont ensuite introduits dans les bactéries compétentes *E. coli* ONE Shot Mach-1[™]-T1[®] (Invitrogen C8620-03)

La réaction de clonage se déroule dans 5µl avec 4µl de produits de PCR purifiée (cf le paragraphe V.2.6.c) et 1µl PCR-XL-TOPO vecteur. La réaction est incubée 5min à température ambiante. La réaction est stoppée en ajoutant 1µl de la solution 6X TOPO Cloning Stop.

Pour transformer les bactéries compétentes One Shot Mach-1™ -T1®, on décongèle une ampoule dans de la glace. Elle contient 50µl de bactéries, on peut y ajouter jusqu'à 10% de la réaction TOPO cloning. On mélange le tout et on place le tube dans la glace durant 30min avant de réaliser un choc thermique dans un bain-marie à 42°C pendant 30s. Le tube est ensuite mélangé doucement et posé 2min dans la glace. 250µl de S.O.C. Medium est ajouté dans le tube qui est placé dans l'agitateur à 37°C avec une vitesse de 200 RPM durant 1h. Les bactéries sont ensuite étalées à l'aide de billes de verres stériles dans une boîte de Pétri contenant un milieu LB avec de la kanamycine (50µg/ml). La boîte est incubée toute la nuit à 37°C puis stockée à 4°C jusqu'à la réalisation d'une PCR de contrôle sur les colonies.

Pour la PCR, on prélève un peu de la colonie sous la hotte à bactériologie à l'aide d'un cure-dent et on le plonge dans le tube de PCR contenant le mix, les amorces et une Taq polymérase.

On réalise une PCR selon le protocole invitrogen dans les mêmes conditions que celles décrites au paragraphe V.2.4 avec le couple d'amorces M13rev (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') et M13fw (5'-GTTGTAAAACGACGGCCAG-3') dont le Tm est de 56°C.

V.2.6.b. Minipréparation (Miniprep)

Les miniprep sont réalisées à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid QuickPure de Macherey-Nagel.

La veille, il faut mettre en route dans l'après-midi, une culture bactérienne. A l'aide d'un cure-dent stérile, piquer la colonie isolée et le plonger dans un tube de bactériologie avec environ 3ml de milieu LB et l'antibiotique (kanamycine à 50µg/ml). L'incubation dure toute la nuit à 37°C sous agitation, 200rpm.

Le lendemain, un trouble dense de bactéries dans le milieu L.B doit être visible. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 11000g, pendant 2-3min avant d'éliminer le surnageant. Puis les bactéries sont remises en suspension dans 250µl tampon A1 et

bien vortexées, après on ajoute 250µl de tampon A2. On mélange par inversion le tube (6-8 fois) sans vortexer. Enfin 300µl tampon A3 sont ajoutés et les tubes sont de nouveau mélangés par inversion (6-8 fois) sans vortexer. Le lysat est ensuite clarifié en centrifugeant à 11000g pendant 5min.

L'ADN est ensuite fixé sur la colonne NucléoSpin Plasmid en y déposant le surnageant et en centrifugeant 11000g, pendant 1min. La membrane est lavée à l'aide de 450µl de tampon AQ, suivi d'une centrifugation à 11000g pendant 2mn. Après l'assèchement de la membrane en centrifugeant une nouvelle fois à 11000g pendant 1 min, on élue l'ADN avec 25µl de tampon AE et 25µl d'H₂O Sigma® et en centrifugeant une dernière fois 1min à 11000g.

V.2.6.c. Purification de fragments PCR

La purification des fragments de PCR sur gel a été réalisé avec le kit de Quiagen 28704, QIAquick GEL Extraction Kit et en suivant le protocole du fabricant.

Une fois la migration du gel à 0,8% d'agarose à 100V terminée, les bandes d'intérêt sont observées sous UV et récupérées dans un tube de 2ml à l'aide d'un scalpel. Le tube est pesé et 3 volumes de tampon QG y sont ajoutés (sachant que 1 volume correspond à 100µl pour 100mg de gel). Le tube est ensuite incubé 10min à 50°C et vortexé légèrement toutes les 2 ou 3min afin de bien dissoudre l'agarose. Un volume d'isopropanol est ajouté et le mix est ensuite transvasé sur une colonne afin d'y fixer les fragments d'ADN. Après centrifugation, l'éluat est jeté et on ajoute 500µl de tampon QB. Puis après une nouvelle centrifugation, 750µl de tampon PE sont ajoutés sur la colonne suivi d'une centrifugation. Avant l'élution, une nouvelle centrifugation est recommandée. L'élution se réalise avec 50µl d'H₂O Sigma®.

L'échantillon est prêt pour une quantification avec le logiciel « Nanodrop », et prêt à être envoyé à la société de séquençage Genoscreen (Genoscreen). Les séquences obtenues sont ensuite étudiées à l'aide du logiciel libre GENTle (GENTle).

V.3. Résultats

V.3.1. Séquençage de l'ADNg VvRDR6

Les coordonnées du gène *VvRDR6* sur le génoscope (Genoscope) sont de 4881183pb à 4886034pb, mais 288pb de la partie 3' sont grisées et ne font pas partie de la séquence protéique. Afin d'être sûrs de bien englober la totalité du gène, nous avons dessiné nos amorces en prenant l'intervalle 4881000 à 4886000pb. Le couple d'amorce, RDR6f1 et RDRr1, a été retenu (4881017 à 4885703pb) et la taille du fragment attendu est de 4,687kb. La taille du gène sur le génoscope (Genoscope) ne comprenant pas les nt grisés de 4,564kb, nous avons encadré largement la partie 5' cependant il nous manque environ 50pb dans la partie 3' du gène *VvRDR6*.

Le résultat de la PCR a mis en évidence une bande unique d'environ 4,7kb (**Figure 49**).

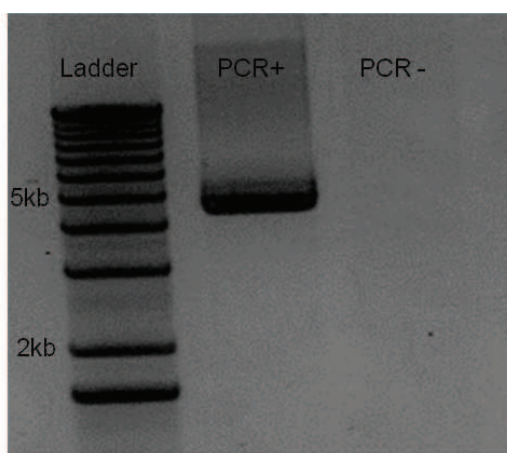


Figure 49 : Résultat de la PCR à partir d'ADN du PN40024 avec les amorces RDR6f1 et RDR6r1. (RT+ représente la PCR avec de l'ADN et une bande à environ 4,6kb est attendue, RT – représente le témoin négatif de PCR sans ADN.)

Nous avons ensuite purifié cette bande et cloné le produit de PCR dans un vecteur commercial : le pCR-XL-TOPO[®]. Nous l'avons introduit dans des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) commerciales : les One Shot[®] Mach[™] 1-T1[®] Chemically Competent Cells d'Invitrogen. Sur milieu LB contenant de la kanamycine (50µg/ml), nous avons sélectionné les colonies transformées et résistantes. Puis nous avons

réalisé une PCR de contrôle à partir des colonies avec des amorces M13fw (M13 forward) et M13rev (M13 reverse) afin de nous assurer que les vecteurs n'étaient pas vides.

Avant d'envoyer les miniprep à séquencer à l'entreprise Genoscreen (Genoscreen), nous avons dessiné 10 amorces internes à notre produit de clonage à l'aide du logiciel GENTle (GENTle) car le séquençage ne couvre que 800pb. Chaque couple d'amorces amplifie un fragment de taille d'environ 800pb se chevauchant d'au moins 200pb du côté 3' et 5' afin d'obtenir un bon recouvrement au niveau des séquences.

Les 11 minipreps ont été chacune séquencées à l'aide des 6 amorces sens de chaque couple. Les premiers résultats de séquençage ont montré un problème au niveau de 2 amorces et nous avons alors séquencé les 11 minipreps avec les amorces rev des 2 couples posant problème.

Après analyse des séquences et des alignements, nous avons obtenu sans surprise, la séquence génomique correspondant bien à la séquence GSVIVT01035851001 du Génoscope.

V.3.2. Séquençage de l'ADNc VvRDR6

V.3.2.a. Séquençage de l'ADNc

Afin de vérifier si notre gène est bien exprimé, nous avons réalisé une RT-PCR à partir d'ARN extraits de feuilles de *vitro*-plants de PN40024. Nous avons réalisé une RT dans un premier temps avec une amorce oligo(dT).

Nous avons vérifié si nos 6 couples d'amorces ayant servi pour le séquençage de l'ADN génomique ne se trouvent pas positionnés sur un intron. Nous avons alors éliminé 3 amorces se trouvant sur un intron et défini 5 nouveaux couples d'amorces compatibles avec les indications du Génoscope (Genoscope). Nous avons ensuite réalisé une PCR pour chaque couple à partir d'ADNc issus de la RT.

Nous avons finalement retenu 4 couples couvrant pratiquement la totalité de l'ADNc et se chevauchant sur 200pb environ. Parmi ces amorces, on retrouve les amorces RDR6f1 et RDR6r1 qui nous ont servi à amplifier l'ADNg. Ceci nous indique que nos

amorces n'encadraient pas suffisamment le gène dans la partie 5' et 3' (**Figure 50**). Une petite partie interne de l'ADNc n'est pas recouverte par les 4 couples d'amorces, nous avons alors créé un cinquième couple d'amorces (seqrdr61rev et seqrdr6f4rev) couvrant cette zone et chevauchant les autres parties amplifiées.

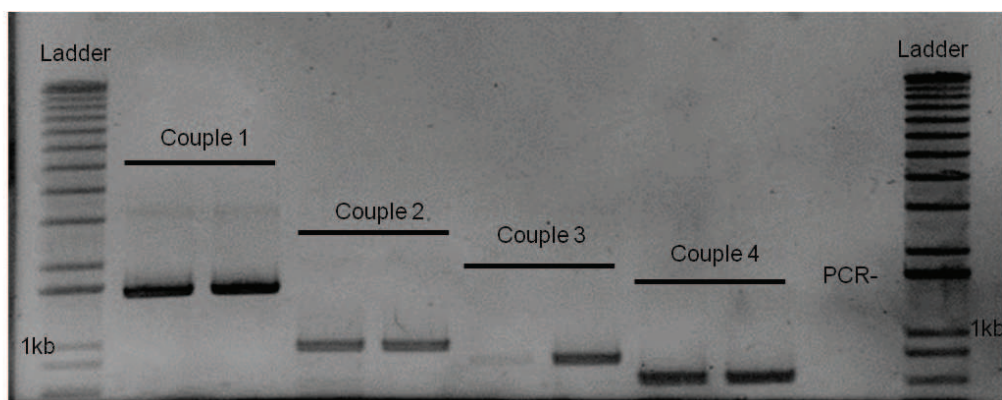


Figure 50 : Résultat de la RT-PCR sur le gène *VvRDR6* à partir d'ARNs extraits de feuilles de PN40024.

Pour la PCR, nous avons utilisé quatre couples d'amorces, le couple 1 (RDR6f1-seqrdr6r2), le couple 2 (seqrdr6f3-seqrdr6r3), le couple 3 (seqrdr6f4-seqrdr6r5) et le couple 4 (seqrdr6f5-RDR6r1)

Chaque produit de PCR issu de chaque couple d'amorces a été cloné dans un vecteur TOPO[®] TA Cloning[®] d'Invitrogen. Ces vecteurs ont ensuite été introduits dans des bactéries One Shot[®] Mach[™] 1-T1[®] Chemically Competent Cells d'Invitrogen. Les colonies poussant sur le milieu LB contenant de la kanamycine (50µg/ml) ont été testées par PCR en utilisant les amorces M13fw et M13rev afin de s'assurer que le vecteur ne soit pas vide.

Enfin, 5 colonies pour chaque couple d'amorces ont été envoyées à Genoscreen (Genoscreen) afin d'être séquencées à l'aide des amorces M13rev et M13fw. Nous avons obtenu, au final, 10 séquences à analyser pour chaque couple d'amorces. Pour le cinquième couple supplémentaire, nous avons envoyé 8 minipreps à Genoscreen obtenues de la même manière que les 4 autres couples.

Finalement, les 56 séquences ont été parfaitement validées, ce qui nous a permis de compléter les nt manquants et les erreurs afin d'obtenir une séquence correcte et de bons recouvrements entre les séquences de chaque couple.

Cependant, dans la mesure où les amorces ne couvrent pas l'intégralité de la partie 3' et la partie 5', nous avons décidé de compléter le séquençage en réalisant une manipulation de 3' et 5' RACE PCR.

V.3.2.b. 3' et 5' RACE PCR

i 3' RACE PCR

Dans un premier temps, Il a fallu optimiser cette manipulation. Nous avons ensuite testé plusieurs ADN polymérase à haute-fidélité, des concentrations d'ADNc et la concentration ainsi que les températures d'hybridation de nos amorces et de celles du kit. Nous avons finalement sélectionné l'amorce seqrdr6f avec celle du kit 3' AUAP car les températures d'hybridations sont compatibles et nous donnent une bande spécifique à 900pb qui peut être séquencée en une seule fois.

Deux RT avec l'amorce AP ont été réalisées avec des quantités d'ARNs différentes (1µg et 500ng) issus de feuilles de vitro-plants du PN40024. Puis 4 PCR ont été réalisées à partir de chaque RT avec le couple d'amorces seqrdr6f-3'AUAP. Pour chaque PCR, une bande d'environ 900pb a été produite, purifiée et clonée dans le vecteur TOPO® TA Cloning® d'Invitrogen (**Figure 51**). Le vecteur a ensuite été introduit dans la bactérie E.coli One Shot® Mach™ 1-T1®. Au total, 17 colonies ont été testées positives par PCR à l'aide du couple d'amorces M13rev/fw.

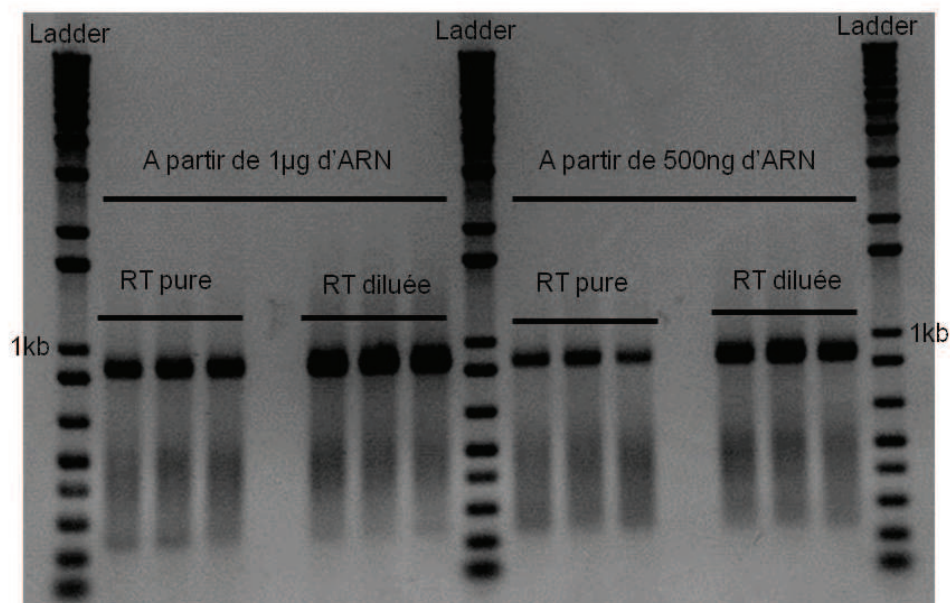


Figure 51 : Résultat de la 3' RACE PCR à partir d'ARN extrait de feuilles de PN40024.

Le couple utilisé pour la PCR est seqdr6f6 – 3'RACE AUAP. Différentes conditions ont été testées. Nous sommes partis pour la RT de deux quantités d'ARN, 1µg ou 500ng, puis pour la PCR nous avons soit utilisé la RT pure ou utilisé la RT diluée au 1/5^{ème}.

Les minipreps ont été envoyées à Génoscreen (Genoscreen) et ont été séquencées chacune à l'aide des amorces M13rev et M13fw.

Sur les 34 séquences obtenues, seules 9 ont pu être exploitées. Nous avons ainsi pu réaliser un très bon recouvrement entre nos différentes séquences et corriger les nt absents ou faux.

ii 5' RACE PCR

Nous avons choisi de tester dans un premier temps les amorces que nous avons utilisées pour séquencer l'ADNg et l'ADNc avant de dessiner de nouvelles amorces. Une RT a été réalisée à partir d'ARN de feuilles de *vitro*-plant de PN40024 et de l'amorce seqdr6r2. Puis 3 couples d'amorces ont été testés afin de voir si d'une part la RT avait fonctionné, et d'autre part pour définir les couples d'amorces dans l'éventualité d'une deuxième PCR. Finalement la PCR a fonctionné avec l'amorce seqdr6r2 (servant aussi pour la RT) et l'amorce seprdr6r1 qui se trouve plus en amont. Cette amorce pourra donc être utilisée dans le cas d'une deuxième PCR.

Après l'optimisation de la PCR en utilisant plusieurs ADN polymérases haute-fidélité et la fixation de la queue dCTP, nous avons réalisé une double PCR, la première avec le couple AAP-seqrdr6r2 et la seconde avec le couple UAP-seqrdr6r1 avec 3 répétitions. Le produit des 2 PCR a donné 2 bandes, une à 850pb et une autre à 1kb. Chaque bande a été purifiée séparément et clonée dans le vecteur TOPO® TA Cloning® d'Invitrogen. Le tube contenant la bande à 1kb est noté « a » et celui avec la bande à 850pb « a' » (**Figure 52**).

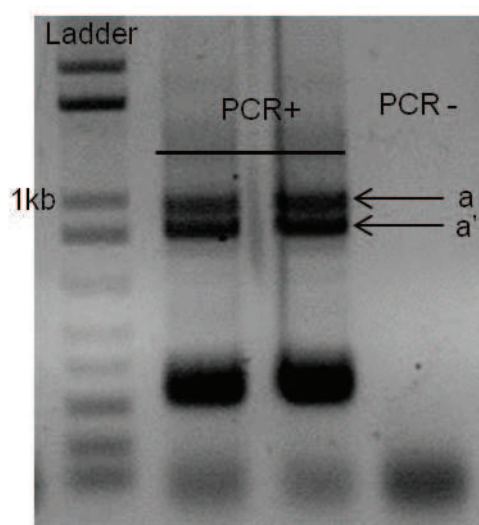


Figure 52 : Résultat de la 5' RACE PCR. La RT a été réalisée à partir d'ARN extraits de feuilles de PN40024 et avec l'amorce seqrdr6r2. Puis deux PCR successives ont été réalisées, la première avec le couple seqrdr6r2-AAP et la seconde avec le couple UAP-seqrdr6r1. PCR – représente le témoin négatif de PCR (sans ADNc).

Après transformation des *E.coli* One Shot® Mach™ 1-T1®, 10 colonies pour le tube « a » et 11 colonies pour le tube « a' » ont été testées positives. Les minipreps ont été envoyées à Genoscreen (Genoscreen) et chacune a été séquencée à l'aide des amorces M13rev et M13fw. Sur les 42 séquences, 21 séquences n'ont pas pu être exploitées car il y a eu un problème de séquence doublée ou une chute de signal après la présence d'un polyG.

L'analyse a tout de même pu être réalisée et aucune différence entre les séquences du tube « a » et « a' » n'a été constatée : les 2 bandes sont très certainement le résultat de l'amplification des 2 produits de PCR successives. Nous avons pu ainsi compléter la partie 5' de l'ADNc qui nous manquait.

V.4. Conclusion

Après recouplement des différentes séquences obtenues de RT-PCR et celles obtenues en 5' et 3' RACE PCR, la séquence de l'ADNc du gène *VvRDR6* a pu être établie et correspond bien à celle du génoscope (Genoscope). Par contre, le découpage du gène n'est absolument pas celui prédit sur le site. Le gène a une architecture proche du gène *AtRDR6*. Il est composé de 2 exons de 2840pb et 1115pb ainsi que d'un intron de 997pb. L'ADNc est de 3955pb et l'ADNg de 4952pb (**Figure 53**).

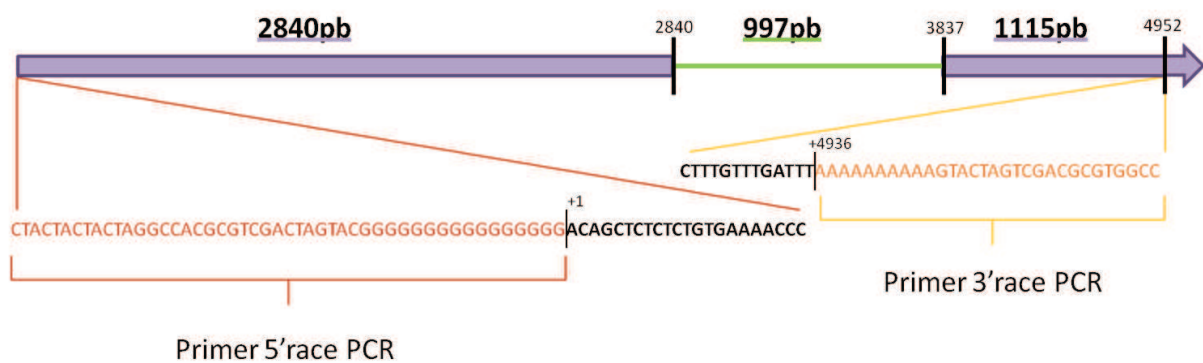


Figure 53 : Architecture du gène *RDR6* de vigne après séquençage de l'ADNc

Nous avons essayé de trouver les codons ATG potentiels avec le logiciel GENTle (GENTle), les premiers ATG sont situés à 29nt, puis 125nt, et 152pb, alors que celui du génoscope (Genoscope) est placé à 191nt par rapport au +1 de notre séquence quel que soit le cadre de lecture utilisé.

Chapitre VI - Discussion et perspectives

L'obtention d'une vigne transformée avec le gène *GFP* et une construction tige-boucle anti-GFP, nous permet d'étudier le mécanisme du silencing dans des conditions de basses températures afin de mieux caractériser ce mécanisme chez une plante pérenne et d'améliorer nos connaissances dans l'utilisation de ce mécanisme pour une lutte anti-virale.

Tout d'abord, le silencing est un mécanisme sensible à basse température chez différentes espèces, pourtant, chez la vigne, en condition *in vitro* et dans des plantes sevrées cultivées en terre, aucune sensibilité n'a été mise en évidence même à 4°C. En effet une quantité équivalente de siRNA « GF » de 21nt a été détectée par northern blot. Chez *Arabidopsis*, nous avons observé une diminution de la quantité de siRNA à partir de 15°C et une détection extrêmement faible à 4°C. L'intensité de fluorescence de la GFP est également sensiblement plus forte à partir de 15°C chez *Arabidopsis* alors qu'elle ne change pas chez la vigne. Ces résultats montrent que le silencing n'a pas la même sensibilité face aux basses températures chez les plantes, car d'autres études chez le tabac, ont montré une absence de siRNA dès 15°C (Szittyá et al., 2003; Wu et al., 2007).

Dans notre étude, nous utilisons une construction en tige-boucle (IR-PTGS) alors que les autres études utilisent des constructions sens (S-PTGS) ou anti-sens (A-PTGS). On peut supposer que l'IR-PTGS est plus efficace à basse température que le S-PTGS ou A-PTGS. Effectivement, chez le tabac, les *RDRP* ont une expression qui est sensible à la température (Wu et al., 2007; Szittyá et al., 2003), or pour initier le silencing, l'IR PTGS n'a pas besoin de la synthèse d'une molécule d'ARN db par une *RDRP*. Nous avons observé le même phénomène chez *Arabidopsis* où l'expression de *RDR6* est fortement diminuée à partir de 15°C et absente à 4°C. Par contre, chez la vigne, l'expression de *VvRDR6* est sensiblement plus faible, mais l'expression de ce gène reste plus élevée que chez *Arabidopsis*. Le maintien de l'expression de *VvRDR6* chez la vigne à 4°C peut expliquer le maintien de la présence de siRNA, car le mécanisme de transitivity est conservé alors que ce n'est plus le cas chez *Arabidopsis*.

Une récente étude a également montré chez *Arabidopsis* une sensibilité à haute température (30°C) (Zhong et al., 2013). En effet, lorsqu'on augmente la température de 22°C à 30°C, on observe chez *Arabidopsis* une diminution dans l'efficacité du S-PTGS et du A-PTGS. L'expression de *SUPPRESSOR of GENE SILENCING 3* (SGS3) est également fortement diminuée, entraînant une réduction des tasiRNA à 30°C (Zhong et al., 2013). L'équipe a également mis en évidence des modifications épigénétiques au niveau de la méthylation de l'ADN, parlant de « mémoire épigénétique induite par la chaleur ». Cette mémoire peut être maintenue dans la descendance durant plusieurs générations.

Une expérience à haute température, pourrait compléter nos résultats ainsi qu'une étude sur la méthylation ou le polymorphisme des promoteurs des gènes *RDRP* ou *DCL*. Il serait également important d'étudier la méthylation des promoteurs de ces gènes au niveau des bourgeons latents et de regarder s'il y a des variations d'une année à l'autre. En effet, le bourgeon latent est le seul organe qui passe l'été et l'hiver avant de se développer au printemps. De plus, la vigne est multipliée de manière végétative, ce mode de multiplication a permis d'accumuler de nombreuses mutations somatiques, il est alors possible que sa « mémoire épigénétique induite par la chaleur » soit très différente par rapport à celle d'*Arabidopsis* ou celle du tabac. Comme il n'y a pas de croisement ou de brassage génétique dans la multiplication de la vigne, cette mémoire doit être sophistiquée. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'expression de *VvRDR6* n'est pas sensible à la température.

Il a aussi été montré que les miRNA artificiels ne sont pas sensibles à la température (Niu et al., 2006). Par conséquent, l'expression de *DCL1* ne devrait pas être sensible à la température. Par contre, une étude chez *Arabidopsis* a mis en évidence que *DCL4* a une activité sensible à la température (Kume et al., 2010). L'expression des *DCL* de vigne à différentes températures apporterait des informations permettant de compléter l'analyse du silencing chez la vigne.

Donc, par rapport à la température, l'IR-PTGS et les miRNA artificiels seraient les techniques les plus efficaces pour induire le silencing dans une lutte anti-virale chez les plantes d'intérêt agronomique (Jelly et al., 2012). Mais en observant les northern blot de notre étude, on remarque que la quantité de siRNA secondaire « P » chez la vigne reste beaucoup plus faible que celle observée chez *Arabidopsis*. En effet, la quantité de siRNA « GF » chez la vigne est nettement supérieure à celle des siRNA

« P » alors que chez *Arabidopsis* les siRNA « GF » et « P » sont détectés avec la même intensité. Cette différence montre que chez la vigne, la transitivity est peut être moins efficace que chez *Arabidopsis*. Comme l'expression de *VvRDR6* ne semble pas être en cause, il faudrait étudier l'expression de *DCL4* ou de *SGS3* de vigne et réaliser des études fonctionnelles chez *Arabidopsis*, afin de s'assurer qu'il s'agit bien des orthologues en question (Wang et al., 2011).

Par ailleurs, un autre point important est la circulation à longue distance et sa mise en évidence chez la vigne. L'obtention des lignée RC1 (*GFP* + anti-*GFP*), R2 (anti-*GFP*) et le PNG15 (*GFP*), nous permet d'étudier ce mécanisme dans les conditions les plus proches de celles en parcelle. Nos résultats préliminaires de greffages en condition *in vitro* n'ont pas permis de tirer de conclusion quant à une circulation longue distance des siRNA. En effet, en greffant des vignes exprimant la *GFP* sur un porte-greffe de *Nicotiana benthamiana* (anti-*GFP* + *GFP*) ou sur une vigne exprimant la tige-boucle (anti-*GFP*), aucun des montages n'a montré une extinction de la *GFP*, même partielle chez le greffon.

Il a été montré chez *Arabidopsis* que la circulation des siRNA peut se réaliser dans les deux sens : du porte-greffe vers le greffon et du greffon vers le porte-greffe (Molnar et al., 2010). Une circulation est donc possible via le phloème mais également via le xylème. Chez les plantes herbacées comme le tabac et *Arabidopsis*, le système de greffage permet de mettre en évidence la circulation à longue distance (Molnar et al., 2010; Md. Ali et al., 2013).

Mais chez les plantes ligneuses comme la vigne ou le pommier, cette circulation n'est pas aussi simple à mettre en évidence. La composition des parois cellulaires des vaisseaux conducteurs des plantes ligneuses est différente de celle des plantes herbacées. En effet, le xylème des plantes ligneuses est beaucoup plus riche en lignine que celui des plantes herbacées. Une équipe a réalisé des greffages de pommiers en condition *in vitro* et en serre afin d'étudier la circulation des siRNA à longue distance (Flachowsky et al., 2012). L'équipe a mis en évidence le silencing avec deux stratégies. La première est l'utilisation d'un porte-greffe transformé avec une construction tige-boucle ciblant le gène rapporteur *gusA* et d'un greffon transformé avec une construction *35S-gusA*. La seconde stratégie consiste en

l'extinction d'un gène endogène *Mdans* ayant un rôle dans la synthèse des anthocyanes. Le porte greffe éteint le gène *Mdans* et le greffon utilisé possède des feuilles rouges. Cette équipe a montré qu'il y avait une diminution de l'expression du gène *gusA* et une disparition de la coloration rouge des feuilles dans les conditions *in vitro*. Par contre, l'équipe observe une extinction partielle, principalement autour des vaisseaux conducteurs des feuilles (**Figure 54**). En revanche, aucune extinction n'est observée dans les conditions de greffages en serre (Flachowsky et al., 2012).

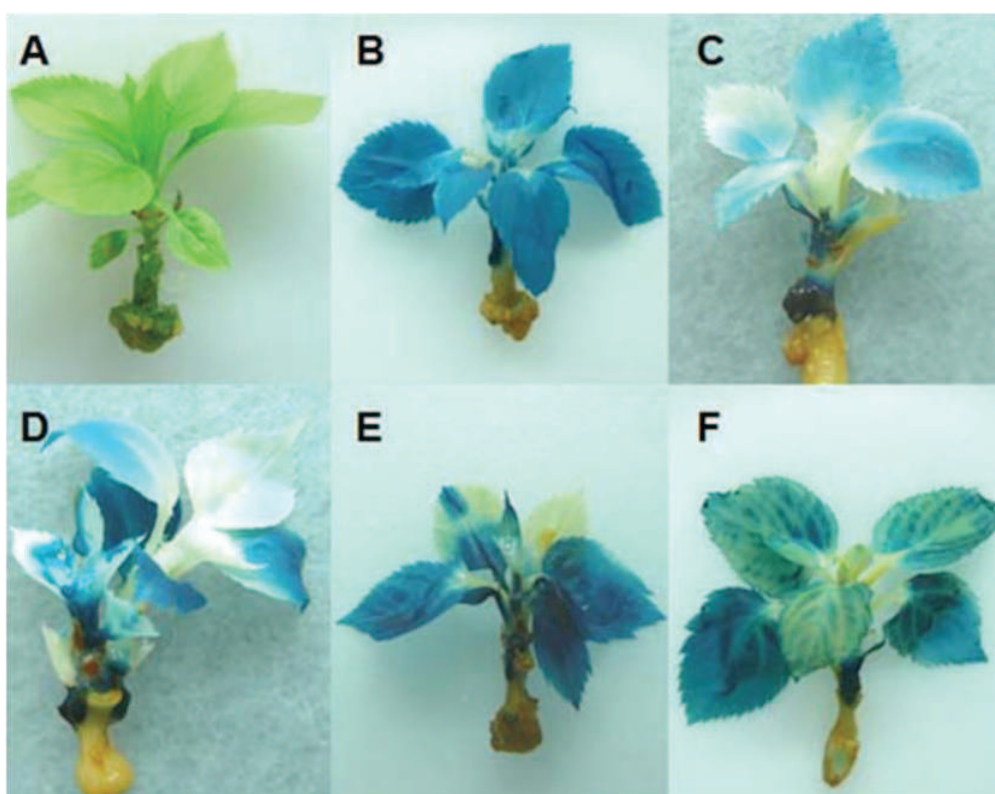


Figure 54 : Expériences de microgreffages chez le pommier (Flachowsky et al., 2012).

(A et B) Microgreffes composées d'un greffon transformé *gusA* sur un porte-greffe non transformé (A) avant la coloration GUS et (B) après la coloration. (C-F) Microgreffes composées d'un greffon transformé *gusA* sur un porte-greffe transformé HPR-*gusA*.

Nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats en condition *in vitro* avec la vigne. Cependant, en comparant les photos des montages avec les nôtres, on peut remarquer que chez la vigne la synthèse de cal au niveau du point de greffe est plus importante. La formation de cal pourrait bloquer la circulation à longue et courte distance du silencing (Dunoyer et al., 2006). En effet, nous avons également observé

comme, chez les vignes co-transformées anti-GFP + *GFP*, chez *Arabidopsis*, une absence de silencing dans les cals et les méristèmes où les cellules sont en forte division.

Une étude a été réalisée sur l'expression des gènes au niveau du point de greffe chez la vigne (Cookson et al., 2013). L'équipe a montré qu'au niveau du point de greffe, on observe l'activation des mêmes gènes que ceux exprimés au printemps, lorsque la vigne commence sa croissance végétative après le repos hivernal. En effet, de nombreux gènes sont exprimés de manières différentes à 3 jours et à 28 jours après le greffage. Ces gènes ont un rôle dans le métabolisme secondaire de la plante, le développement du xylème et du phloème. *Arabidopsis* et le tabac étant des plantes annuelles, elles n'ont pas dans leur développement une reprise de croissance comme les plantes pérennes au printemps. Par conséquent, le greffage de plante annuelle doit engendrer certainement moins de modifications de l'expression des gènes qu'un greffage avec des plantes pérennes ou ligneuses.

D'autres conditions de greffage devraient compléter nos résultats. Peut-être que les conditions en serre seraient mieux adaptées, car la formation de cal serait moins importante et le greffage en serre serait plus proche des conditions en parcelle.

Ces récentes études sur le silencing, nous ont montré qu'il existe des différences entre la vigne et *Arabidopsis*. Ce mécanisme reste complexe et de nombreuses questions importantes subsistent. La circulation des siRNA chez les plantes ligneuses va peut-être révéler des informations scientifiques très différentes de ce qui est décrit chez les herbacées. La circulation fonctionne-t-elle du porte-greffe vers le greffon ? Les expériences de greffage *in vitro* n'étant pas concluantes, est-ce la formation de cal qui bloque cette circulation ? Ou les conditions de cultures en serre seraient-elles plus favorables ? La vigne a une croissance active à des températures qui dépassent les 20 à 30°C. Le silencing est-il également résistant à haute température chez la vigne ? La « mémoire épigénétique induite par la chaleur » chez la vigne varie-t-elle dans le bourgeon latent année après année ?

La mise en place de cet outil végétal à partir du PN40024 dont le génome a été séquencé (Jaillon et al., 2007) et sa caractérisation moléculaire, représente un modèle d'étude chez la vigne pour l'étude silencing et pour répondre à ces

problématiques. L'obtention de ce modèle d'étude nous permet, ainsi, de mieux répondre aux enjeux agronomiques afin de définir la stratégie la plus efficace, notamment pour une lutte contre les virus.

Publication

RNA silencing is resistant to low-temperature in grapevine

Marjorie Romon¹, Isabelle Soustre-Gacougnolle², Carine Schmitt¹, Mireille Perrin¹, Yannick Burdloff¹, Elodie Chevalier¹, Jérôme Mutterer³, Christophe Himber³, Jérôme Zervudacki³, Thomas Montavon³, Aude Zimmermann³, Taline Elmayan⁴, Hervé Vaucheret⁴, Patrice Dunoyer³, Jean E. Masson^{1*}.

(1) UMR 1131, INRA- Université de Strasbourg. 28 Rue de Herrlisheim, 68021 Colmar, France.

(2) Université de Haute Alsace, Laboratoire Vigne, Biotechnologies et Environnement. 33 rue de Herrlisheim, 68000 Colmar, France.

(3) Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, UPR2357. 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France.

(4) Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech, Route de St-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France.

(*) Corresponding author: Jean.masson@colmar.inra.fr

Authors contribution

All authors contributed to experimental design and approaches and performed the experiments and analyses. P.D., HV and J.M wrote de manuscript.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Vineyards face severe damages due to viruses against which environmental-friendly protections are lacking. RNA silencing is a natural defence mechanism against viruses in plants and transgenes expressing viral RNA-derived sequences were previously shown to confer silencing-based enhanced resistance against the cognate virus in several species¹. Consequently, several biotech programs were launched to generate virus-resistant grapevines (*Vitis vinifera* L.), without success yet^{2,3}. Also, the relevance of this approach was still open as this perennial plant undergoes long growth periods at low temperatures where RNA silencing is inhibited^{4,5}. Here, we present an efficient transformation procedure on a fully sequenced Pinot Noir-derived accession, and showed that inverted-repeat constructs trigger a highly efficient silencing reaction in all somatic tissues. Moreover, we show that RNA silencing in grape is resistant to far lower temperature than any other species⁴⁻⁹ tested to date. Therefore our results not only open grapevines to silencing-based reverse genetic studies but also pave the way towards engineering efficient virus-resistance in this species.

Grapevine is cultivated worldwide on 8M ha. Almost all acreage consists in vinifera scions, which give rise to qualitative grapes for food or wines, grafted on rootstocks. These rootstocks are complex hybrids between wild *Vitis* species and *Vitis vinifera*, which were mostly selected for resistance to phylloxera, but also adaptive criteria to specific soil composition. For example, the champagne is produced from bunches of *V. vinifera* c.v. Pinot Noir, Pinot Meunier and Chardonnay, which are highly heterozygous accessions vegetatively propagated since centuries^{10, 11}. These scions are grafted on the few rootstocks adapted to the characteristic limestone of the Champagne areas, the 41B and SO4, mainly. Vineyards and wild species, in their natural habitat, are hosting a wide collection of different viruses, among which the *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV) series are the most damaging¹². Therefore, grape breeders thought that combining highly valuable rootstocks with virus-resistance would help improving grapevine culture. However, the quest for natural resistance to these viruses has failed until now.

RNA silencing is a natural defence mechanism against invading viruses in plants, and entails the production, from double-stranded (ds)RNA precursors, of virus-derived small interfering RNAs (siRNAs) by DICER-LIKE enzymes. Upon their incorporation into specific Argonaute (AGO)-containing effector complexes, these siRNAs guide post-transcriptional gene silencing (PTGS) of the viral genomes through RNA cleavage¹³. In plants, RNA silencing can be experimentally induced by transgene loci expressing inverted-repeat constructs (IR-PTGS)¹⁴, or by highly transcribed sense transgenes (S-PTGS)^{15, 16}. In this latter case, the dsRNA precursors are produced through the action of the endogenous RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6 (RDR6), which convert single-stranded RNA into dsRNA. Importantly, if the transgene that undergoes PTGS carries viral sequences, the plant becomes resistant to infection by the homologous virus because both transgene mRNA and viral RNA are targeted by the transgene-derived siRNA. This strategy initially coined pathogen-derived resistance, was shown to confer resistance in a large number of species^{1, 17}.

Given the efficiency and sequence-specificity of the RNA silencing mechanism, quite a number of projects attempted to produce transgenic grapevine rootstocks expressing virus-derived sequences to confer resistance against GFLV. With respect to grape, generating silencing-based virus-resistant transgenic rootstock seemed a particularly adapted strategy. Indeed, given that RNA silencing in plants functions in a non-cell autonomous manner and has the potential to propagate from rootstocks to scions^{18, 19}, this approach will preserve the genetic complexity of the scion material which gives rise to bunches while conferring them

enhanced resistance. Unfortunately, transgenic grapes generated so far have failed to show efficient protection against the targeted viruses^{2, 3}.

Of note, all these previous attempts to obtain RNA silencing-based virus resistance in grapevine relied on S-PTGS^{2, 3}. However, IR-constructs are known to trigger a much more potent silencing reaction than S-PTGS²⁰ and have already been successfully used to elicit strong antiviral defence in other plant species^{21, 22}. Therefore, as a first step towards implementing the best strategy to obtain virus-resistant transgenic grapevines, we first decided to address the efficiency of IR-PTGS against a transgene in this species.

To do so, we developed an efficient transformation procedure on the sequenced PN40024 accession, which derived from a near homozygous inbred Pinot Noir line obtained by successive selfings²³. Despite considerable and long-lasting efforts, it is well-known that the grape genus remains rather recalcitrant to stable transformation, with the exception of few accessions for which the best transformation efficiencies to be expected range from 1-33 transgenic plant/g of embryogenic callus (EC) treated²⁴. Even though Pinot Noir is reputed for being refractory to *in vitro* culture²⁵, the transformation procedure developed here on the PN40024 line allowed us to routinely produce between 10-100 independent transgenic plant/g of EC (**Table 1** and data collected by our transformation platform over a two-year period; plateforme-transfovine@colmar.inra.fr).

The EC were initiated from somatic cells after anther filament cultures with an efficiency of $4.09 \pm 1.25\%$ EC/anther plated (data not shown) and these EC lines could be maintained *in vitro* using established protocols^{25, 26}. The friable EC were then transformed, following our improved procedure, to express an IR-construct corresponding to the 5' part ('GF') of a GFP transgene²⁷. Six to eight months after the initial transformation, several transgenic plants were regenerated indicating that the PN40024 line is amenable to embryogenic callus induction and to stable transformation. Northern analysis of six independent GFFG transgenic grape lines showed that they all accumulated, although to various levels, both 21nt- and 24nt-long siRNA corresponding to the 'GF' sequence (**Figure 1A**), indicating that dsRNA is similarly processed in *Vitis* than in the other plant species tested to date. The EC line GFFG#4, which accumulates the highest level of GF siRNAs, was selected for a second round of transformation with a GFP transgene (referred to hereafter as GFFG/GFP lines). In parallel, wild-type EC were directly co-transformed with both transgenes (referred to hereafter as GFFG+GFP lines). Double transgenic plants, based on their resistance against both kanamycin (conferred by the GFP transgene) and BASTA®

(conferred by the GFFG transgene), were regenerated and two independent transgenic grape lines of each were selected for further analysis.

Northern analysis revealed that all these lines accumulated both 21nt- and 24nt-long siRNA corresponding to the 'GF' sequence (**Figure 1B**). Moreover, these so-called primary siRNAs that are directly processed from the IR-construct also direct production of 21nt-long secondary siRNAs from the GFP mRNA, through the activity of RDR6. This process coined 'transitivity', is involved in amplification of the RNA silencing response²⁸. Transitivity can be measured by the relative accumulation of secondary siRNAs with sequence of the non-overlapping 3' part of the GFP transgene ('P')²⁷. These secondary 'P' siRNAs were readily detectable in all GFFG/GFP and GFFG+GFP transgenic lines tested indicating the functionality of this process in grapevine (**Figure 1B**).

Observation under UV light revealed that EC from GFFG+GFP lines were as fluorescent as our control transgenic *Vitis* line expressing only the GFP transgene (**Figure 1C**). This observation is in agreement with previous results showing that cell dedifferentiation and proliferation induced by exogenous hormone treatments was shown to be sufficient to suppress GFP silencing in the growing calli²⁹. However, upon regeneration, the GFFG+GFP grape lines accumulated very low to undetectable levels of GFP in all somatic tissues examined such as leaves, stems and roots, whereas transgenic GFP grape lines remained bright green fluorescent (**Figure 1C**). This was confirmed by quantification of the fluorescence signal (**Figure 1D**) and similar observations were obtained with 8 independent GFFG+GFP or GFFG/GFP transgenic grape lines over a 1.5 year period (data not shown). Of note, a faint, but visible, GFP expression level was observed in the apical meristems and, on occasions, in the tip of some rootlets of the GFFG/GFP or GFFG+GFP lines (**Figure 1C** and data not shown). Thus, as previously observed in other plant species, IR-constructs trigger in *Vitis* a potent RNA silencing reaction in somatic tissues but is, somehow, less efficient in actively dividing cells²⁹⁻³¹.

RNA silencing in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* and *Solanum tuberosum* was previously shown to function at 20-26°C but becomes inhibited at 15°C^{4,5}. In contrast to these herbaceous species, perennial grapevines are often exposed in vineyards, or in their natural habitat, to far lower temperatures than this 15°C breaking-point. Therefore, in order to assess if the IR-PTGS approach can be implemented in the field to trigger efficient virus resistance in *Vitis*, we next assessed the temperature-sensitivity of RNA silencing in this species. To do so, after a 3-4 weeks growth period at 26°C, GFFG+GFP, GFFG/GFP or GFP grape plantlets were transferred for another 4-8 weeks cultivation period at 26°C, 15°C, 10°C

or 4°C. Similar experiments were also conducted with a transgenic *Arabidopsis* expressing the same GFP and GF-IR transgenes²⁷. Although these low temperatures slowed down the growth of both *Arabidopsis* and *Vitis*, plants continued to develop and initiate new leaves. Interestingly, in these newly formed leaves, GFP silencing was maintained in the GFFG/GFP and GFFG+GFP *Vitis* transgenic lines, even at temperature as low as 4°C (**Figure 2A**). This was confirmed by quantitative RT-PCR of the GFP mRNA (**Figure 2B**). We ruled out that the low GFP level was due to an inhibition of the 35S-driven GFP transgene transcription rate, in response to cold treatment, as both GFP fluorescence and mRNA steady-state levels were high in the GFP-expressing transgenic grape lines and remained steady from 26°C to 4°C (**Figure 2A and 2B**). Moreover, northern analysis revealed that neither the ‘GF’ nor the ‘P’ siRNA accumulation were altered by the cold treatments in the GFP-silenced lines, further supporting that RNA silencing, at least when triggered by IR constructs, operates efficiently in *Vitis* at temperatures as low as 4°C (**Figure 2D**). By contrast, GFP silencing in *Arabidopsis* was released at 4°C (**Figure 2C**). This inhibition was correlated with a strong decrease in both ‘GF’ and ‘P’ siRNA accumulation at this temperature (**Figure 2D**). Remarkably, IR-PTGS and siRNA production do not seem to be affected in *Arabidopsis* grown at 15°C or even 10°C (**Figure 2C and 2D**), suggesting that, as opposed to S-PTGS which was already hindered at these temperatures^{4, 5}, IR-PTGS is more resistant to low temperature, in agreement with previous observations²².

Given that these two PTGS processes mainly differ by their dependency upon RDR6 activity³², we next assessed the expression level of this RdRP by quantitative RT-PCR, in both *Vitis* and *Arabidopsis*. In this latter, a 10-fold reduction of RDR6 transcripts levels was observed in plants grown at 15°C and 10°C compared to the 26°C control plants, whereas RDR6 mRNAs were barely detectable at 4°C (**Figure 2E**). This effect most likely explains the temperature-sensitivity of S-PTGS in *Arabidopsis*, and suggests that the low levels of AtRDR6 at 15°C or 10°C are still sufficient to promote secondary siRNA production during IR-PTGS (**Figure 2D**), but deficient to initiate the RNA silencing reaction triggered by sense transgenes³². In sharp contrast, RDR6 transcripts levels in *Vitis* were not significantly altered, even in plants grown at 4°C (**Figure 2E**). This resistance to low temperature was not specific to the PN40024 accession as it was also observed in the cultivated Pinot Noir clone 162 (data not shown) and, therefore, may reflect a property of grapevine accessions cultivated worldwide in the vineyards.

The efficient transformation procedure developed here (**Table 1**) and the efficiency of IR-PTGS in grapevine, not only open this species to “fast” reverse genetic studies for basic or applied research but also pave the way towards implementing the best strategy to generate silencing-based virus-resistant *Vitis*. Indeed, our results collectively indicate that IR-constructs trigger a potent and temperature-resistant RNA silencing reaction in this species (**Figure 2A and 2B**). This resistance to low temperatures is, at least, partly explained by the observation that, despite a genomic organization similar to the one found in *Arabidopsis*, VvRDR6 expression is not altered by cold treatment up to 4°C (**Figure 2E**). Therefore, neither primary (and RDR6-independent) nor secondary (and RDR6-dependent) siRNAs accumulation are altered (**Figure 2D**), ensuring a strong, stable and amplified silencing reaction through the range of temperatures tested (**Figure 2A-2C**). This unaltered activity of RDR6 to low temperature in grapevine probably helps these perennial plants, which undergo cold stress every winter, to cope with pathogens all along the year, as this protein plays a crucial role in antiviral defence³³⁻³⁵. Whether other perennial plants, such as poplar or fruit trees, exhibit similar RDR6 resistance to low temperature remains to be addressed. Finally, despite the efficiency of IR-PTGS in most grapevine tissues, it should be noted that occasional GFP fluorescence was observed in the apical region of some rootlets (**Figure 1C**). Interestingly, the *Xiphinema Index* nematodes, which are specific vectors of GFLV, perforate the grape roots at this particular 1-2mm rootlet region. After a first attack, such feeding zones become then attractive to other nematodes where they feed and reproduce³⁶. Therefore, we cannot yet fully exclude that, upon feeding, *X. index* can inject GFLV particles into those scarce and silencing defective rootlet tissues where it could replicate and thus build up a reservoir for possible disease spread in the entire vine. This will certainly deserve careful examination in the future.

Acknowledgments

This work was supported by a specific grant of INRA–GAP-BV (Institut National de la Recherche Agronomique) to H.V and J.E.M, joint grants from the CIVA (Comité Interprofessionnel des Vins d’Alsace) and the Conseil Régional Alsace. M.R. had a stipend from CIVA-CRA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

METHODS

Plant material, initiation of embryogenic callus and plant regeneration

Pinot-derived line 40024 plants are growing in the field, in our repository. Collection of immature inflorescences and all steps from embryogenic callus (EC) induction to plant regeneration were conducted following described protocols^{25, 26}. After 3 weeks on B medium, however, EC from the line 40024 were cultured on modified WPM (BAP 0.25 mg/l and 2.4D 1mg/l and activated charcoal 3g/l) for one month, and then transferred onto modified MPM1 (BAP 0.05 mg/l, 2.4D 0.3 mg/l) for two 3-weeks periods. MPM01 medium²⁵ was used for EC long term maintenance. Control and transgenic grape plantlets were grown in vitro on WPM²⁶ at 26°C± 0.5°C, 80%RH (Relative humidity), 16h light at 2500 lux (Osram, Biolux) and 8h dark at 25°C± 0.5°C. Arabidopsis seeds (Col0) and GFFG/GFP line²⁷ were germinated on modified MS medium³⁷ in the same growth conditions than grapevine until cotyledon-first leaf developmental stage and then, transferred to the different temperatures regimes with the grape plantlets.

Agrobacterium-mediated transformation

Friable EC were sub-cultured at three-week intervals on MPM01 medium. Transformation with *Agrobacterium* strain C58pMP90 was performed two days after EC transfer onto fresh medium. *Agrobacterium* used harboured either the pBIN19-GFP (which confers kanamycin resistance) or the pFGC5941-GFFG (which confers BASTA resistance) binary vectors, and were previously described²⁷. The *Agrobacterium* was maintained on YEB (Yeast extract broth) solid medium supplemented with rifampicin (50 mg/l), kanamycin (50 mg/l), gentamycin (20 mg/l). A single colony was pre-cultured for 2 days in 3ml YEB supplemented with antibiotics. A 20 µl aliquot was transferred into 10 ml YEB liquid medium containing antibiotics supplemented with 750 µl PCV (Packed Cell Volume) of 2-week old fresh EC of Thomson Seedless. The culture was grown overnight on an orbital shaker at 28°C and 200 rpm. When optical density (OD600) reached 0.8, the culture was centrifuged at 3500g for 10 min and the pellet was re-suspended in MPM01 liquid medium, pH 5.2 to final OD600 0.3 and mixed with 10-15 calli (2-3 week-old) of 50 µl PCV in 2 ml-Eppendorf tubes. After 10 min on a gyratory shaker (at 20-22°C), EC were collected by blotting on filter paper, transferred (as 50 µl PCV aliquots) onto solid MPM01 supplemented with acetosyringone 100µM and vacuum infiltrated (700mbars, 5 min, twice). After 4 days culture at 20°C in the dark, EC were washed three times with MPM01 liquid medium supplemented with cefotaxim 600 mg/l, blotted dry

and placed (as 50 µl PCV aliquots) onto MPM01 medium containing cefotaxim 600 mg/l. Plates were incubated in the dark, at 28°C, 80% RH.

Selection and regeneration of transgenic grape plants

After 1-2 weeks culture, EC were transferred onto MPM1 medium supplemented with kanamycin 25 mg/l for GFP construction and BASTA® (50 mg/l) for GF-FG hairpin construction. EC treated the same way, without bacteria, were used as controls. EC were sub-cultured at three-week intervals onto fresh medium until GFP-fluorescent isolated sectors resistant to kanamycin or/and to BASTA® emerged. These sectors were picked and transferred onto fresh medium and plants were regenerated following the step-wise MPM series²⁵, however with media supplemented with Cefotaxime 600mg.l⁻¹. Transgenic plants were maintained as cuttings on WPM supplemented with active charcoal (3g/l) and Cefotaxime (300mg.l⁻¹).

RNA Analysis

Total RNA was extracted from Grapevine and *Arabidopsis* tissues using the Tri-Reagent (Sigma, St Louis, MO) according to the manufacturer's instructions. RNA gel blot analysis of low-molecular-weight RNA was performed using 15 µg of total RNA, as described previously²⁹. Ethidium bromide staining of total RNA before transfer was used to confirm equal loading. Radio-labeled probes @GF and @P were made by random priming reactions in the presence of α -32P-dCTP²⁷. DNA oligonucleotides complementary to miR159 were end-labelled with γ -32P-ATP using T4 PNK (New England Biolabs, Beverly, MA). After probing, the membranes were exposed to X-ray films.

The cDNA synthesis used the Invitrogen® kit, oligodT primers and 100-500ng total RNAs out of which the equivalent of 20ng cDNAs were used for qRT-PCR with 10µl SsoFast™ EvaGreen® Supermix and 300nM of each primer, V.v RDR6 s TTGCATGGCAAGCCCTTGAAAG ; V.v RDR6 r CCAGCAAAGTACTCATCACGGC ; V.v UBQ s GTGGTATTATTGAGCCATCCTT ; V.v UBQ r AACCTCCAATCCAGTCATCTAC ; for grapevine and A.t RDR6 s GCAACCTCATCTTGGATGGC ; A.t RDR6 r CATCCCGAGAAACCAATGTCCC ; A.t ExP s GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC ; A.t ExP r GGTCCGACATACCCATGATCC ; A.t GAPDH 600b s AGGTGGAAGAGCTGCTTCCTTC ; A.t GAPDH 600b r GCAACACTTTCCCAACAGCCT, for *Arabidopsis*. These reactions (95°C, 30 sec, 40 cycles 95°C, 5 sec and 60°C, 5 sec and finally 75°C, 10 sec for data acquisition with *Arabidopsis*

and 80°C for grapevine) were performed in 96-well plates with CFX96™ Real-Time System C1000 Touch Thermal Cycler using SsoFast™ EvaGreen® Supermix. Data were analyzed using the BioRad Manager Software. For GFP transcript analysis, GFP s CAC-AAC-GTA-TAC-ATC-ATG-GCA-GAC, GFP r GAT-TGT-GTG-GAC-AGG-TAA-TGG-TTG-TC (95°C, 5mn, 35 cycles 95°C, 30 sec and 60°C, 3 sec, 72°C 50 sec and finally 78°C, 10 sec for data acquisition) conditions were used. Relative transcript levels were calculated using the reference ubiquitin gene for grapevine and ExP (AT5G12240) or GAPDH600b (AT1G13440) for Arabidopsis according to Paffl³⁸. Mean and deviations were calculated with data from three full experimental repetitions.

Microscopy and image processing:

Green-fluorescent-protein-derived expression in calli, embryos and developing plantlets were observed under a Nikon SMZ 1500 microscope (Nikon Corp., Tokyo, Japan) equipped with illumination from a Nikon UV lamp passed through a Nikon filter set with a 465 - 495 nm band pass excitation filter, a 505 nm dichroic mirror and a 510 or 535 nm band pass barrier filter. Photographs were taken with a Nikon 4.1 mega pixel digital camera attached to the microscope. To allow comparison, the magnification and acquisition characteristics were kept constant for the embryogenic calli, buds and the same stands true for the first leaf of all samples. Images were analyzed with ImageJ software version 1.46 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). This consisted in measuring total intensities in green channel of acquired color images. Occasional pixels showing saturated values were excluded from the measurement area by thresholding. Intensities were normalized against measured area, yielding a mean grey value, and allowing comparison across different samples. Deviations were calculated from data obtained in 3 independent repetitions with 5-10 plants for each experiment. The data obtained are shown using value for the GFP line and the silenced line grown at 26°C as references in figures 1 and 2, respectively.

REFERENCES

1. Prins, M. *et al.* Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology*. **1**, 73–83 (2008).
2. Vigne, E., Komar, V. & Fuchs, M. Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus. *Transgenic Research*. **13**, 165–179 (2004).
3. Gambino, G. *et al.* Transgene silencing in grapevines transformed with GFLV resistance genes: analysis of variable expression of transgene, siRNAs production and cytosine methylation. *Transgenic Research*. **19**, 17–27 (2010).
4. Szittyá, G. *et al.* Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J*. **22**, 633–40 (2003).
5. Wu, X.L. *et al.* RNA silencing-mediated resistance is related to biotic / abiotic stresses and cellular RdRp expression in transgenic tobacco plants. *BMB Rep*. **41**, 376–81 (2008).
6. Kasai, A. *et al.*, Molecular mechanism of seed coat discoloration induced by low temperature in yellow soybean. *Plant and Cell Physiology*. **50**, 1090–1098 (2009).
7. Griesbach, R.J., Beck, R.M., Hammond, J. & Stommel, J.R. Gene expression in the Star mutation of *Petunia hybrida* Vilm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **132**, 680–690 (2007).
8. Fortier, E. & Belote, J.M. Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. *Genesis*. **4**, 240–244 (2000).
9. Kameda, T., Kenji, I., Yang, L., Kunihiko, T. & Sugiyama, T. A. hypothermic-temperature-sensitive gene silencing by the mammalian RNAi. *Biochemical and Biophysical Research communications*. **315**, 559–602 (2004).
10. Bowers, J. *et al.* Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France. *Science*. **285**, 1562–1565 (1999).
11. Boursiquot, J.M., *et al.* Parentage of Merlot and related winegrape cultivars of southwestern France: discovery of the missing link. *Aust J Grape Wine Res*. **15**, 144–155 (2009).
12. Martelli, G.P. Grapevine Virology Highlights: 2010–2012. Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, California, USA October 7–14, 13–32 (2012).
13. Ding, S.W. & Voinnet, O. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*. **130**, 413–426 (2007).

14. Chuang, C.F., & Meyerowitz, E.M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 4985-90 (2000).
15. Que, Q., Wang, H.Y., English, J. & Jorgensen, R.A. The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *Plant Cell* **9**, 1357–1368 (1997).
16. Vaucheret, H., Nussaume, L., Palauqui, J.C., Quillere, I. & Elmayan, T. A Transcriptionally Active State Is Required for Post-Transcriptional Silencing (Cosuppression) of Nitrate Reductase Host Genes and Transgenes. *Plant Cell*. **8**, 1495-1504 (1997).
17. Beachy, R.N. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol*. **8**, 215-20 (1997).
18. Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M. & Vaucheret, H. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J*. **16**, 4738-45 (1997). Erratum in: *EMBO J*. **17**, 2137 (1998).
19. Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. & Baulcombe, D.C. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*. **95**, 177-87 (1998).
20. Wesley, S. V. *et al.* Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J*. **27**, 581–590 (2001).
21. Kalantidis, K., Psaradakis, S., Tabler, M. & Tsagris, M. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol Plant Microbe Interact*. **8**, 826-33 (2002).
22. Hu, Q., Niu, Y., Zhang, K., Liu, Y & Zhou, X. Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to tobacco mosaic virus and cucumber virus. *Virology Journal*. **8**, 2-11 (2011).
23. Jaillon, O. *et al.* The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*. **449**, 463-467 (2007).
24. Bouquet, A., Torregrosa, L., Iocco, P. & Thomas, M.R. Grapevine (*Vitis vinifera* L.) *Methods Mol. Biol*. **344**, 273-85 (2006).

25. Perrin, M. *et al.* Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells. *Plant Sci.* **161**, 107-116 (2001).
26. Perrin, M., Gertz, C. & Masson, J.E. High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19 grapevine genotypes grown worldwide. *Plant Sci.* **167**, 1343-1349 (2004).
27. Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard G., Ritzenthaler, C. & Voinnet, O. Transitivity-dependent an-independent cell-to-cell movement of RNA Silencing. *Embo J.* **22**, 4523-4533 (2003).
28. Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. & Baulcombe, D.C. An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell.* **101**, 543–553 (2000).
29. Dunoyer, P., Himber, C. & Voinnet, O. Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent Agrobacterium infections. *Nature Genetics.* **38**, 258-263 (2006).
30. Beclin, C., Berthomé, R., Palauqui, J.C., Tepfer, M. & Vaucheret H. Infection of Tobacco or *Arabidopsis* Plants by CMV Counteracts Systemic Post-transcriptional Silencing of Nonviral (Trans)Genes. *Virology.* **252**, 313-317 (1998).
31. Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. & Baulcombe, D.C. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell.* **95**, 177-87 (1998).
32. Béclin, C., Boutet, S., Waterhouse, P. & Vaucheret, H. A Branched Pathway for Transgene-Induced RNA Silencing in Plants. *Current Biology.* **12**, 8684-688 (2002).
33. Voinnet, O. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci.* **7**, 317-28 (2008).
34. Wang, X.B. *et al.* RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 484-9 (2010).
35. Garcia-Ruiz, H. *et al.* Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell.* **22**, 481–496 (2010).
36. Weischer, B. & Wyss, U. Feeding behavior and pathogenicity of xiphinema index on grapevine roots. *Nematologica.* **22**, 319-325 (1976).
37. Masson, J. & Paszkowski, J. The culture response of Arabidopsis thaliana protoplasts is determined by the growth conditions of the donor plants. *Plant Journal.* **5**, 829-833 (1992).

38. Pfaffl, M.W. A *new mathematical* model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2003-2007 (2001).

Figures

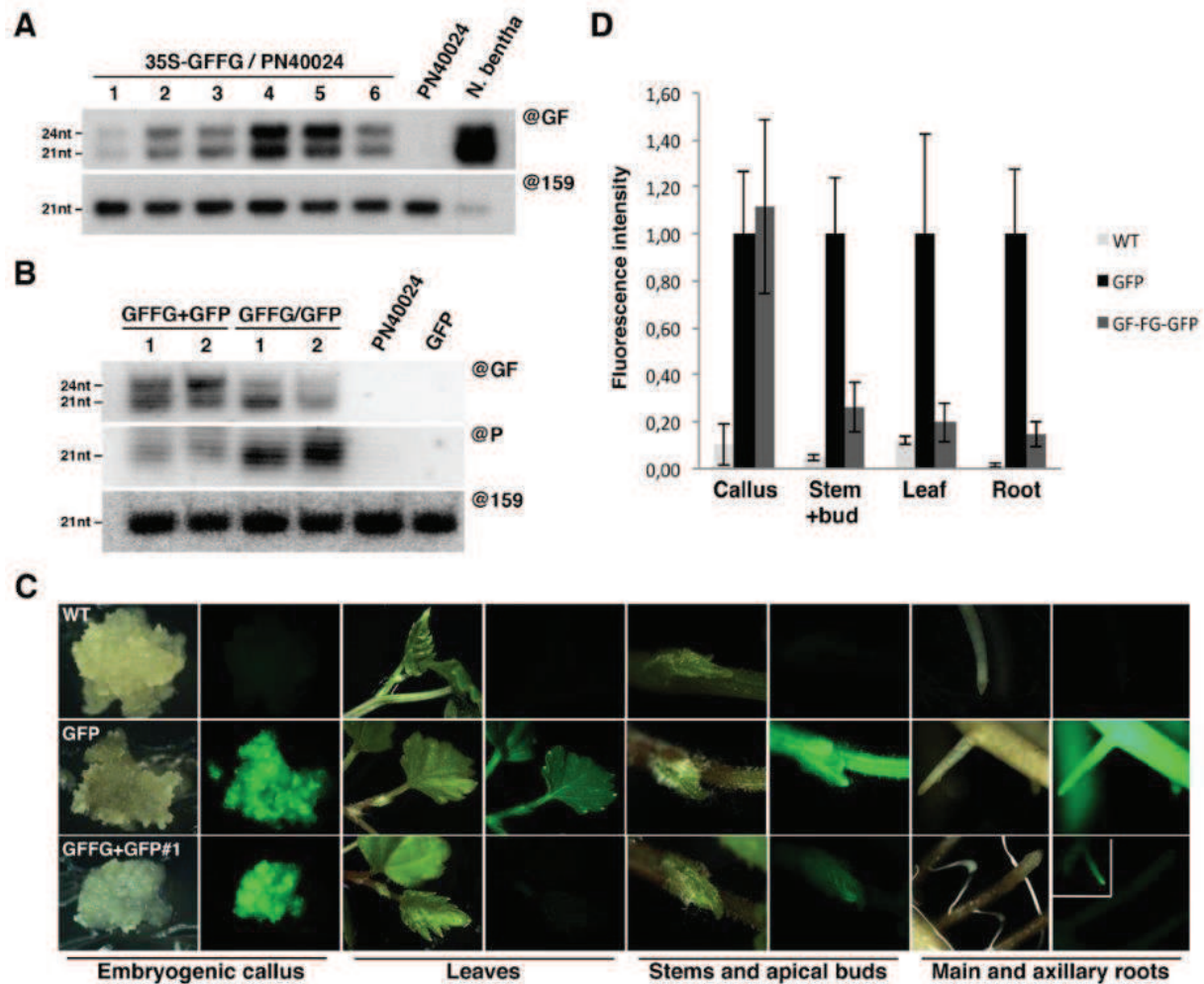


Figure 1. Efficient RNA silencing in grapevine triggered by inverted-repeat constructs. (A) Northern analysis of ‘GF’ siRNA (@GF) and miRNA (@159) accumulation in transgenic grapevines (PN40024 accession) expressing an inverted-repeat (IR) construct. (B) Northern analysis of ‘GF’ siRNA, ‘P’ secondary siRNA (@P) and miRNA (@159) accumulation in transgenic grapevines (PN40024 accession) expressing GFP either alone (GFP) or together with the GFFG IR construct. (C) Silencing of the GFP is efficient in somatic tissues of GFFG+GFP transgenic grapevines but is impaired in meristematic tissues such as apical bud or occasional root apex and suppressed in calli. (D) Semi-quantitative analysis of the fluorescence in the tissues depicted in (C). Fluorescence intensity is represented as grey level intensity/pixel. Means and standard deviations are calculated from at least 3 experimental repetitions of 5 different plants.

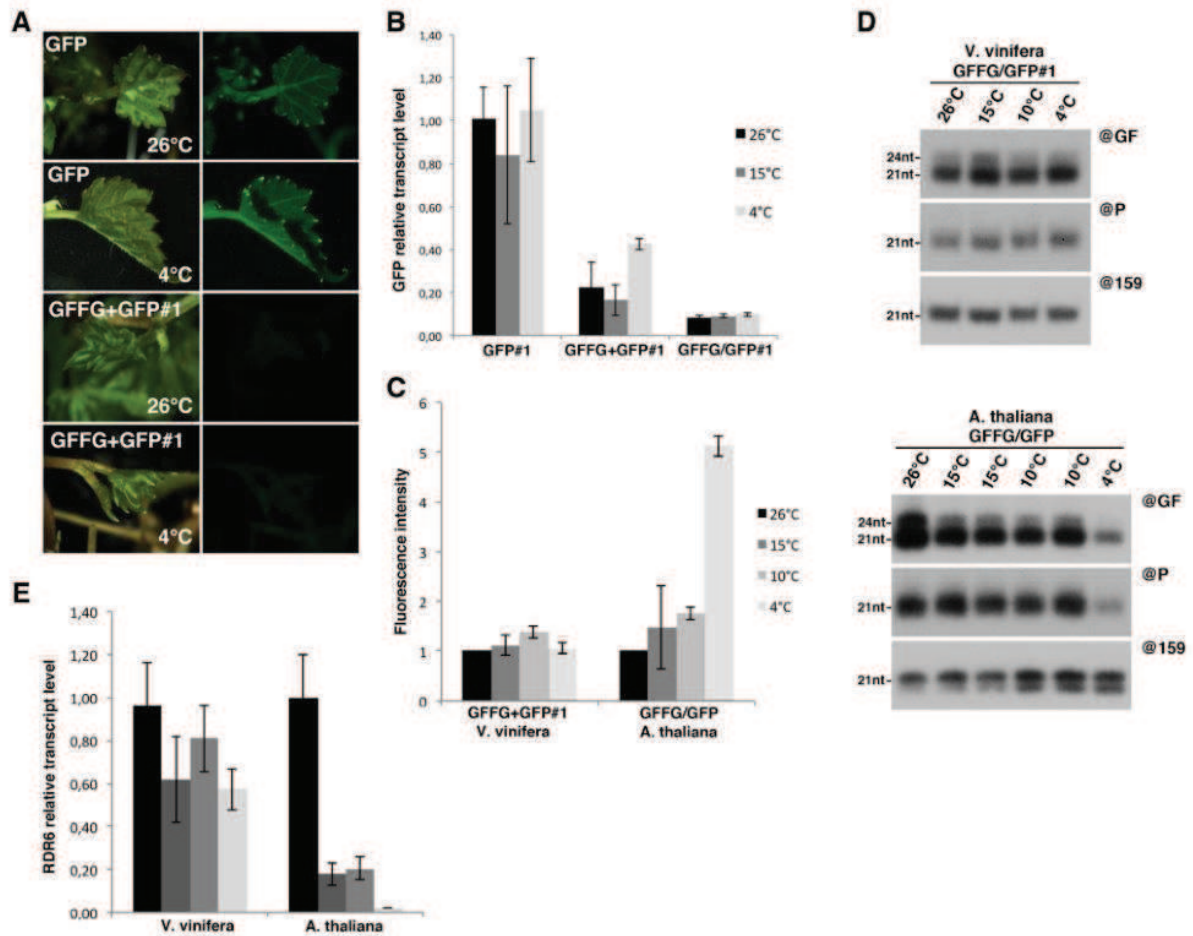


Figure 2. RNA silencing is resistant to low-temperature in grapevines. (A) Silencing of the GFP is maintained in grapevines grown at 4°C. (B) Quantitative real-time PCR of the GFP mRNA in GFP expressing or GFP-silenced grapevines grown at 26°C, 15°C or 4°C. mRNA levels were normalized to that of the reference ubiquitin gene for grapevine and ExP (AT4G26410) and GAPDH600b (AT1G13440) for Arabidopsis. (C) Semi-quantitative analysis of the fluorescence in GFFG/GFP transgenic grapevines or Arabidopsis grown at 26°C, 15°C, 10°C or 4°C. (D) Northern analysis of ‘GF’ siRNA, ‘P’ secondary siRNA (@P) and miRNA (@159) accumulation in GFFG/GFP transgenic grapevines (top panels) or Arabidopsis (bottom panels) grown at various temperatures. (E) Quantitative real-time PCR of RDR6 mRNA in grapevines or Arabidopsis grown at 26°C, 15°C or 4°C. mRNA levels were normalized similarly to the experience depicted in (B).

Table 1

Genotype	Constructs	Number of experiments/ EC inoculated	Mass of EC inoculated in g	Number of transgenic EC obtained	Transformation efficiency
PN40024	GFP	3/30	3	>300	100
PN40024	GF-FG	2/15	1.5	9	6
PN40024	GF-FG + GFP	2/13	1.3	13	10
GF-FG lines	GFP	5/47	4.7	142	30.21

Transformation efficiency= number of transgenic EC /gram of Embryogenic callus according to Bouquet et al., (2006). 1 embryogenic callus of 100 µl PCV

Bibliographie de la partie III Silencing

- Aukerman, M.J. and Sakai, H.** (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant cell* **15**: 2730–41.
- Baker, C.C., Sieber, P., Wellmer, F., and Meyerowitz, E.M.** (2005). The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in *Arabidopsis*. *Current biology* **15**: 303–15.
- Bao, N., Lye, K.-W., and Barton, M.K.** (2004). MicroRNA binding sites in *Arabidopsis* class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Developmental cell* **7**: 653–62.
- Bartel, D.** (2004). MicroRNAs Genomics, Biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281–297.
- Bernstein, E., Caudy, a a, Hammond, S.M., and Hannon, G.J.** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363–6.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., and Zhu, J.-K.** (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* **123**: 1279–91.
- Brodersen, P. and Voinnet, O.** (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in genetics* **22**: 268–80.
- Brosnan, C.A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N.A., Waterhouse, P.M., and Carroll, B.J.** (2007). Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 14741–6.
- Brosnan, C.A. and Voinnet, O.** (2011). Cell-to-cell and long-distance siRNA movement in plants: mechanisms and biological implications. *Current opinion in plant biology* **14**: 580–7.
- Carra, A., Mica, E., Gambino, G., Pindo, M., Moser, C., Pè, M.E., and Schubert, A.** (2009). Cloning and characterization of small non-coding RNAs from grape. *The Plant Journal* **59**: 750–63.
- Chapman, E.J. and Carrington, J.C.** (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature reviews. Genetics* **8**: 884–96.
- Chen, J., Sun, M., Hurst, L.D., Carmichael, G.G., and Rowley, J.D.** (2005). Genome-wide analysis of coordinate expression and evolution of human cis-encoded sense-antisense transcripts. *Trends in genetics* **21**: 326–9.

- Chen, X.** (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* **303**: 2022–5.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R.** (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**: 740–4.
- Chitwood, D.H. and Timmermans, M.C.P.** (2010). Small RNAs are on the move. *Nature* **467**: 415–9.
- Chuang, C.F. and Meyerowitz, E.M.** (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 4985–90.
- Cookson, S.J., Clemente Moreno, M.J., Hevin, C., Nyamba Mendome, L.Z., Delrot, S., Trossat-Magnin, C., and Ollat, N.** (2013). Graft union formation in grapevine induces transcriptional changes related to cell wall modification, wounding, hormone signalling, and secondary metabolism. *Journal of experimental botany*.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D.C.** (2000). An *RNA-dependent RNA polymerase* gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**: 543–553.
- Debeauchamp, J.L., Moses, A., Noffsinger, V.J.P., Ulrich, D.L., Job, G., Kosinski, A.M., and Partridge, J.F.** (2008). Chp1-Tas3 interaction is required to recruit RITS to fission yeast centromeres and for maintenance of centromeric heterochromatin. *Molecular and cellular biology* **28**: 2154–66.
- Đlakić, M.** (2006). DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold. *Bioinformatics* **22**: 2711–4.
- Dunoyer, P., Brosnan, C. a, Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., Himber, C., and Voinnet, O.** (2010). An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *The EMBO journal* **29**: 1699–712.
- Dunoyer, P., Himber, C., Ruiz-Ferrer, V., Alioua, A., and Voinnet, O.** (2007). Intra- and intercellular RNA interference in *Arabidopsis thaliana* requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nature genetics* **39**: 848–56.
- Dunoyer, P., Himber, C., and Voinnet, O.** (2005). DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature genetics* **37**: 1356–60.
- Dunoyer, P., Himber, C., and Voinnet, O.** (2006). Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nature genetics* **38**: 258–63.

Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J.C., and Voinnet, O. (2010). Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science* **328**: 912–6.

Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development* **15**: 188–200.

Flachowsky, H., Tränkner, C., Szankowski, I., Waidmann, S., Hanke, M.-V., Treutter, D., and Fischer, T.C. (2012). RNA-Mediated Gene Silencing Signals Are Not Graft Transmissible from the Rootstock to the Scion in Greenhouse-Grown Apple Plants *Malus* sp. *International journal of molecular sciences* **13**: 9992–10009.

Fortier, E. and Belote, J.M. (2000). Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. *Genesis* **26**: 240–4.

Gambino, G., Perrone, I., Carra, A., Chitarra, W., Boccacci, P., Torello Marinoni, D., Barberis, M., Maghuly, F., Laimer, M., and Gribaudo, I. (2010). Transgene silencing in grapevines transformed with GFLV resistance genes: analysis of variable expression of transgene, siRNAs production and cytosine methylation. *Transgenic research* **19**: 17–27.

Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D., and Sablowski, R. (2004). A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* **306**: 1046–8.

Genoscope Genoscope. <http://www.genoscope.cns.fr/spip/>.

Genoscreen Genoscreen. <http://www.genoscreen.fr/>.

GENTle GENTle. <http://gentle.magnusmanske.de/>.

Gibbings, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology* **11**: 1143–9.

Gómez, G., Martínez, G., and Pallás, V. (2008). Viroid-induced symptoms in *Nicotiana benthamiana* plants are dependent on RDR6 activity. *Plant physiology* **148**: 414–23.

Grosshans, H. and Filipowicz, W. (2008). Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature* **451**: 414–6.

Guo, H., Xie, Q., Fei, J., and Chua, N. (2005). MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. *The Plant cell* **17**: 1376–86.

Hamilton, A. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal* **21**: 4671–4679.

- Han, M.-H., Goud, S., Song, L., and Fedoroff, N.** (2004). The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 1093–8.
- Hannon, G.J.** (2002). RNA interference. *Nature* **418**: 244–51.
- Haseloff, J.** (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 2122–2127.
- Hily, J.-M., Scorza, R., Malinowski, T., Zawadzka, B., and Ravelonandro, M.** (2004). Stability of gene silencing-based resistance to Plum pox virus in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions. *Transgenic Research* **13**: 427–436.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., and Voinnet, O.** (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* **22**: 4523–4533.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., and Fukuhara, T.** (2005). Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* **57**: 173–88.
- Invitrogen, M.** (2004a). 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends.
- Invitrogen, M.** (2004b). 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0. Control.
- Ito, H., Gaubert, H., Bucher, E., Mirouze, M., Vaillant, I., and Paszkowski, J.** (2011). An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature* **472**: 115–9.
- Iyer, L.M., Koonin, E. V, and Aravind, L.** (2003). DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. *BMC Structural Biology* **23**: 1–23.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., et al.** (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**: 463–7.
- Jelly, N.S., Schellenbaum, P., Walter, B., and Maillot, P.** (2012). Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos. *Transgenic research* **21**: 1319–27.

- Juarez, M.T., Kui, J.S., Thomas, J., Heller, B.A., and Timmermans, M.C.P.** (2004). microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature* **428**: 84–8.
- Kameda, T., Ikegami, K., Liu, Y., Terada, K., and Sugiyama, T.** (2004). A hypothermic-temperature-sensitive gene silencing by the mammalian RNAi. *Biochemical and biophysical research communications* **315**: 599–602.
- Kanno, T., Huettel, B., Mette, M.F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., Kreil, D.P., Matzke, M., and Matzke, A.J.M.** (2005). Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nature genetics* **37**: 761–5.
- Kanno, T., Mette, M.F., Kreil, D.P., Aufsatz, W., Matzke, M., and Matzke, A.J.M.** (2004). Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. *Current biology* **14**: 801–5.
- Kasai, A., Ohnishi, S., Yamazaki, H., Funatsuki, H., Kurauchi, T., Matsumoto, T., Yumoto, S., and Senda, M.** (2009). Molecular mechanism of seed coat discoloration induced by low temperature in yellow soybean. *Plant & cell physiology* **50**: 1090–8.
- Kidner, C.A. and Martienssen, R.A.** (2004). Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* **428**: 81–4.
- Kini, H.K. and Walton, S.P.** (2007). In vitro binding of single-stranded RNA by human Dicer. *FEBS letters* **581**: 5611–6.
- Kume, K., Tsutsumi, K., and Saitoh, Y.** (2010). TAS1 trans-Acting siRNA targets are differentially regulated at low temperature, and TAS1 trans-Acting siRNA mediates temperature-controlled At1g51670 expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**: 1435–1440.
- Kundu, J.K., Briard, P., Hily, J.M., Ravelonandro, M., and Scorza, R.** (2008). Role of the 25-26 nt siRNA in the resistance of transgenic *Prunus domestica* graft inoculated with plum pox virus. *Virus genes* **36**: 215–20.
- Kurihara, Y., Takashi, Y., and Watanabe, Y.** (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* **12**: 206–12.
- Li, F. and Ding, S.-W.** (2006). Virus counterdefense : diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annual review of microbiology* **60**: 503–31.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., and Chen, X.** (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Current biology* **15**: 1501–7.
- Liu, Q., Feng, Y., and Zhu, Z.** (2009). Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Functional & integrative genomics* **9**: 277–86.

- Llave, C.** (2002). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *The Plant cell* **14**: 1605–1619.
- Ma, J.-B., Ye, K., and Patel, D.J.** (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* **429**: 318–22.
- Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., and Doudna, J. a** (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* **311**: 195–8.
- Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L., and Vance, V.B.** (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Society* **13**: 571–583.
- Mallory, A.C. and Vaucheret, H.** (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature genetics* **38 Suppl**: S31–6.
- Martelli, G.P.** (2012). Grapevine virology highlights: 2010-2012. Proceedings of the 17th congress of ICVG.
- Md. Ali, E., Kobayashi, K., Yamaoka, N., Ishikawa, M., and Nishiguchi, M.** (2013). Graft Transmission of RNA Silencing to Non-Transgenic Scions for Conferring Virus Resistance in Tobacco. *PLoS one* **8**: e63257.
- Millar, A. a and Waterhouse, P.M.** (2005). Plant and animal microRNAs: similarities and differences. *Functional & integrative genomics* **5**: 129–35.
- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R., and Baulcombe, D.C.** (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* **328**: 872–5.
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, a M., Nikic, S., Picault, N., Rémoué, K., Sanial, M., Vo, T. a, and Vaucheret, H.** (2000). *Arabidopsis* *SGS2* and *SGS3* genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**: 533–42.
- Muangsan, N., Beclin, C., Vaucheret, H., and Robertson, D.** (2004). Geminivirus VIGS of endogenous genes requires *SGS2/SDE1* and *SGS3* and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **38**: 1004–14.
- Muruganantham, M., Moskovitz, Y., Haviv, S., Horesh, T., Fenigstein, A., Preez, J. Du, Stephan, D., Burger, J.T., and Mawassi, M.** (2009). Grapevine virusA-mediated gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Vitis vinifera*. *Journal of virological methods* **155**: 167–74.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a Chimeric *Chalcone Synthase* Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell* **2**: 279–289.

- Navarro, B., Pantaleo, V., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, G., Di Serio, F., and Burgyán, J.** (2009). Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant-viroid interaction. *PloS one* **4**: e7686.
- Niu, Q.-W., Lin, S.-S., Reyes, J.L., Chen, K.-C., Wu, H.-W., Yeh, S.-D., and Chua, N.-H.** (2006). Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nature biotechnology* **24**: 1420–8.
- Nykänen, a, Haley, B., and Zamore, P.D.** (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* **107**: 309–21.
- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M., and Vaucheret, H.** (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *The EMBO journal* **16**: 4738–45.
- Pantaleo, V., Saldarelli, P., Miozzi, L., Giampetruzzi, A., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, G., and Burgyan, J.** (2010). Deep sequencing analysis of viral short RNAs from an infected Pinot Noir grapevine. *Virology* **408**: 49–56.
- Pantaleo, V., Szittyá, G., Moxon, S., Miozzi, L., Moulton, V., Dalmay, T., and Burgyan, J.** (2010). Identification of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis. *The Plant Journal* **62**: no–no.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., and Poethig, R.S.** (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3691–6.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., and Chen, X.** (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current biology* **12**: 1484–95.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L., and Poethig, R.S.** (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & development* **18**: 2368–79.
- Perrin, M., Martin, D., Joly, D., Demangeat, G., This, P., and Masson, J.E.** (2001). Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells. *Plant Science* **161**: 107–116.
- Pilate, G.** (2003). Poplar trees with modified lignin: genetic engineering in the paper industry. *Médecine sciences : M/S* **19**: 18–20.
- Prendergast, F.G. and Mann, K.G.** (1978). Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*. *Biochemistry* **17**: 3448–3453.

- Qu, F., Ye, X., Hou, G., Sato, S., Clemente, T.E., and Morris, T.J.** (2005). RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of virology* **79**: 15209–17.
- Rand, T. a, Petersen, S., Du, F., and Wang, X.** (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* **123**: 621–9.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P.** (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & development* **16**: 1616–26.
- Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L., and Baulcombe, D.C.** (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant physiology* **138**: 1842–52.
- Schwarz, D.S., Hutvágner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D.** (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**: 199–208.
- Sigova, A., Rhind, N., and Zamore, P.D.** (2004). A single Argonaute protein mediates both transcriptional and posttranscriptional silencing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes & development* **18**: 2359–67.
- Smith, L.M., Pontes, O., Searle, I., Yelina, N., Yousafzai, F.K., Herr, A.J., Pikaard, C.S., and Baulcombe, D.C.** (2007). An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **19**: 1507–21.
- Sohn, S.-H., Choi, M.S., Kim, K.-H., and Lomonossoff, G.** (2011). The epigenetic phenotypes in transgenic *Nicotiana benthamiana* for CaMV 35S-GFP are mediated by spontaneous transgene silencing. *Plant Biotechnology Reports* **5**: 273–281.
- Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L.** (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **305**: 1434–7.
- Sós-Hegedus, A., Lovas, A., Kondrák, M., Kovács, G., and Bánfalvi, Z.** (2005). Active RNA silencing at low temperature indicates distinct pathways for antisense-mediated gene-silencing in potato. *Plant molecular biology* **59**: 595–602.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P., and Green, P.J.** (2004). AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Molecular cell* **15**: 173–83.
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Bánfalvi, Z., and Burgyán, J.** (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *The EMBO journal* **22**: 633–40.

- Tahbaz, N., Kolb, F. a, Zhang, H., Jaronczyk, K., Filipowicz, W., and Hobman, T.C.** (2004). Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO reports* **5**: 189–94.
- TAIR TAIR.** [Http://www.arabidopsis.org/](http://www.arabidopsis.org/).
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P.D.** (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* **306**: 1377–80.
- Tournier, B., Tabler, M., and Kalantidis, K.** (2006). Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFP *Nicotiana benthamiana* plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **47**: 383–94.
- Vaistij, F.E.** (2002). Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *The Plant cell* **14**: 857–867.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötval, J.O.** (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* **9**: 654–9.
- Vaucheret, H.** (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & development* **20**: 759–71.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., and Bartel, D.P.** (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & development* **18**: 1187–97.
- Vazquez, F.** (2006). *Arabidopsis* endogenous small RNAs: highways and byways. *Trends in plant science* **11**: 460–8.
- Vazquez, F., Gasciolli, V., Crété, P., and Vaucheret, H.** (2004). The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Current biology* **14**: 346–51.
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gasciolli, V., Mallory, A.C., Hilbert, J.-L., Bartel, D.P., and Crété, P.** (2004). Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Molecular cell* **16**: 69–79.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., Fitzgerald, L.M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, T., Facci, M., Mitchell, J.T., Perazzolli, M., Eldredge, G., et al.** (2007). A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PloS one* **2**: e1326.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I.S., and Moazed, D.** (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303**: 672–6.

- Voinnet, O.** (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* **17**: 449–459.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., and Baulcombe, D.C.** (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**: 177–87.
- Wang, X.-B., Jovel, J., Udomporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.-X., Gasciolli, V., Vaucheret, H., and Ding, S.-W.** (2011). The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* **23**: 1625–38.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., and Wang, M.-B.** (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 13959–13964.
- Willmann, M.R., Endres, M.W., Cook, R.T., and Gregory, B.D.** (2011). The functions of RNA-dependent RNA polymerases in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **9**: e0146.
- Wingard, S.A.** (1928). Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *J. Agric. Res.* **37**: 127–153.
- Wu, X., Hou, W., Wang, M., Zhu, X., Li, F., Zhang, J., Li, X., and Guo, X.-Q.** (2007). RNA silencing-mediated resistance is related to biotic / abiotic stresses and cellular RdRp expression in transgenic tobacco plants. *BMB reports*: 376–381.
- Xie, Z., Fan, B., Chen, C., and Chen, Z.** (2001). An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6516–21.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., and Carrington, J.C.** (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS biology* **2**: E104.
- Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C.** (2003). Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Current biology* **13**: 784–789.
- Yamada, K., Lim, J., Dale, J.M., Chen, H., Shinn, P., Palm, C.J., Southwick, A.M., Wu, H.C., Kim, C., Nguyen, M., Pham, P., Cheuk, R., Karlin-Newmann, G., Liu, S.X., Lam, B., Sakano, H., Wu, T., Yu, G., Miranda, M., Quach, H.L., et al.** (2003). Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome. *Science* **302**: 842–6.
- Yang, H., Wang, M., Gao, Z., Zhu, C., and Guo, X.** (2010). Isolation of a novel RNA-dependent RNA polymerase 6 from *Nicotiana glutinosa*, NgRDR6, and analysis

of its response to biotic and abiotic stresses. *Molecular Biology Reports* **38**: 929–937.

Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B., and Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic acids research* **34**: 667–75.

Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., and Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* **307**: 932–5.

Zhang, B., Pan, X., Cannon, C.H., Cobb, G.P., and Anderson, T.A. (2006). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **46**: 243–59.

Zhong, S.-H., Liu, J.-Z., Jin, H., Lin, L., Li, Q., Chen, Y., Yuan, Y.-X., Wang, Z.-Y., Huang, H., Qi, Y.-J., Chen, X.-Y., Vaucheret, H., Chory, J., Li, J., and He, Z.-H. (2013). Warm temperatures induce transgenerational epigenetic release of RNA silencing by inhibiting siRNA biogenesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 9171–9176.

Zilberman, D., Cao, X., and Jacobsen, S.E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**: 716–9.

Résumés

Résumés

Rôle du gène de floraison *VvFT* dans la mise en place de la floraison chez la vigne.

La floraison résulte de l'intégration de signaux à la fois environnementaux et endogènes à la plante. Les voies de signalisation correspondantes ont été largement étudiées chez *Arabidopsis thaliana*. La photopériode est perçue au niveau des feuilles. En condition de jour long, des photorécepteurs vont activer l'expression du gène *Flowering locus T* (*FT*). Le gène *FT* intègre également d'autres voies activatrices de la floraison, notamment les voies impliquant les gibbérellines. Cette hormone active aussi un autre gène intégrateur de la floraison *Supressor of overexpression of CO1* (*SCO1*). Le gène *FT* code pour un facteur de transcription qui circule depuis les feuilles via le phloème vers le méristème pour induire la floraison. *FT* serait le fameux « florigène » décrit depuis plusieurs siècles. La protéine *Ft* fonctionne dans le méristème en hétéro-dimère en interagissant avec la protéine *Fd* pour activer l'expression des gènes *APETALA 1* (*AP1*) et *LEAFY* (*LFY*) qui vont induire la formation des organes floraux.

De nombreux orthologues de gènes de floraison ont été caractérisés chez la vigne et une partie des fonctions sont conservées. Les gibbérellines activent le débourrement des bourgeons latents et stimulent la formation de vrilles mais contrairement à *Arabidopsis*, celles-ci semblent inhiber la formation d'inflorescences. Par ailleurs, comme la floraison de la vigne n'est pas sensible à la photopériode, on peut se demander si l'orthologue du gène *FT* (*VvFT*) a tout de même un rôle intégrateur au niveau des feuilles et s'il active l'expression de l'orthologue du gène *LFY* (*VFL*). Dans la première partie de ma thèse, afin de mieux comprendre les rôles respectifs de *FT* et des gibbérellines dans la floraison de la vigne, nous avons conduit une analyse moléculaire avec un matériel original : (i) un porte-greffe 41B transformé avec une construction contenant le gène *VvFT* sous contrôle du promoteur 35S et (ii) une plante naine, dérivée du Pinot Meunier, insensible aux voies de signalisation

impliquant les gibbérellines, suite à une mutation dans le gène *GA-INSENSITIVE* (*GAI*).

Nous avons réalisé une analyse quantitative de l'expression des gènes de floraison *VvFT* et *VFL* à partir d'ARNs extraits de feuilles, de vrilles, de bourgeons latents et d'inflorescences de la vigne naine, du transformant du porte-greffe 41B 35S::*VvFT* et du cépage Riesling 49. Des transcrits du gène *VvFT* sont difficilement détectables dans les feuilles et les bourgeons. A l'inverse, des niveaux très élevés sont détectés dans les inflorescences, plus particulièrement chez un cépage très florifère, le Riesling, suggérant un lien entre floraison et *VvFT*. Dans les vrilles, les niveaux de transcrits de *VvFT* sont également élevés, quoique 4 à 10 fois inférieurs à ceux observés dans les inflorescences. Chez la vigne naine, les gibbérellines inhibent significativement l'expression de *VvFT*. Le développement de ces organes semble bloqué au profit d'une transformation en inflorescence.

Nous avons étudié le niveau de transcrits de *VFL* comme indicateur moléculaire de transition vers la floraison. Dans les feuilles, le niveau de *VFL* est faible chez tous les génotypes, à l'exception du transformant 41B 35S::*VvFT* sans pour autant que nous ayons observé de différenciation de bourgeons floraux à partir des feuilles. Dans les vrilles, les niveaux de *VFL* observés sont en accord avec ce qui est publié. Pourtant, comme les gibbérellines bloquent l'expression de *VvFT* dans les vrilles, on pouvait s'attendre à une expression plus élevée de *VFL* alors que ces vrilles se transforment en inflorescences. Les différences les plus marquées ont été observées dans les bourgeons latents et les inflorescences avec des niveaux de transcrits de 10 à 100 fois plus élevés que dans les organes végétatifs. Nos résultats suggèrent que *VvFT* ainsi que les gibbérellines activent l'expression de *VFL* dans les bourgeons latents alors que leur action est opposée dans les inflorescences.

Notre étude montre que les gibbérellines ou/et le gène *VvFT* activent les gènes de floraison comme *VFL*, mais avec des réponses très différentes entre la vrille, les bourgeons latents et les inflorescences. Il y a bien au moins deux voies d'activation de la floraison chez la vigne, une impliquant *VvFT* et l'autre les gibbérellines, et

celles-ci sont distinctes et n'impliquent pas une perception d'un signal de 'type florigène' au niveau de la feuille, contrairement à ce qui est décrit chez *Arabidopsis*.

Mise en évidence des mécanismes d'extinction génique chez la vigne et de leurs réponses face aux stress abiotiques.

Une partie des réactions de défenses face aux agressions biotiques, comme celles dues aux virus, implique notamment un mécanisme de défense nommé le « silencing ». La première étape de ce mécanisme commence par la reconnaissance par les protéines DICER 2 (DCL2) et DICER 4 (DCL4) de l'ARN viral double brin. Puis ces DCL vont cliver cet ARN en petites molécules d'ARN de 21nt appelées siRNA. Ces siRNA vont être pris en charge par le complexe protéique RNA-induced silencing complex (RISC) pour cibler les ARN complémentaires et les dégrader. Mais ces siRNA servent également d'amorces pour des RNA polymérases RNA dépendantes (*RdR*) qui vont amplifier ainsi le système avec la production de siRNA secondaires. Ces petits ARNs circulent de cellule à cellule et, ainsi, assurent une systémie dans la plante. Chez *Arabidopsis* et *Nicotiana benthamiana*, ce mécanisme semble ne plus fonctionner à une température inférieure à 15°C avec, notamment, une expression de *RdR6* et *RdR1* très fortement diminuée. Une mise en évidence complète au niveau phénotypique et moléculaire n'a pas été proposée, à ce jour, chez la vigne. De plus, les études de la sensibilité de ces mécanismes à basse température et de la systémie, ont toute leur importance chez une plante pérenne comme la vigne, cultivée sous forme d'assemblage entre un porte-greffe et un greffon et exposée à de grandes amplitudes de températures.

Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons produit des plantes transgéniques de la lignée PN40024 contenant soit le gène codant la GFP, soit une construction tige-boucle GF-FG, soit les deux. Les cals embryogènes transgéniques GFP sont fluorescents ainsi que les plantes qui en sont dérivées. Les cals embryogènes transgéniques GFP+GF-FG sont également fluorescents. Par contre, nous avons observé une disparition totale de la fluorescence chez ces PN40024 GFP+GF-FG, dès l'apparition des premières feuilles, lors de la régénération et chez la plante entière. Au cours de la multiplication végétative de ces plantes, la GFP est éteinte dans les feuilles différenciées alors que les zones méristématiques conservent une fluorescence. L'étude moléculaire a mis en évidence des petits ARNs de 21nt et 24nt

produits à partir de la construction tige-boucle GF-FG. Des petits ARNs secondaires de 21nt produit à partir de la séquence de la GFP ont été également détectés. Ainsi, nos résultats au niveau phénotypique et moléculaire montrent, pour la première fois, que le silencing fonctionne chez la vigne avec (i) une extinction de la GFP associée à la différenciation des tissus somatiques (ii) une production de petits ARNs et (iii) une production de petits ARNs secondaires suggérant que le système d'amplification impliquant RdR6 et RdR1 est actif chez la vigne, du moins à 26°C.

Nous avons cloné le gène *RdR6* de la vigne à partir de la séquence référence du Pinot Noir 40024 disponible sur le site du Genoscope. Alors que les analyses en bioinformatique prédisent un gène composé de cinq exons et quatre introns et une taille totale de 4852nt, nos résultats montrent que la séquence de *VvRdR6* exprimée fait 4936nt et que le gène est organisé en deux exons et un intron. Cette architecture est semblable à celle trouvée chez *Arabidopsis*.

Le matériel végétal modèle que nous avons produit et le clonage de *RdR6* vont permettre une étude approfondie des réponses du silencing de la vigne aux stress abiotiques ainsi qu'une étude de la systémie en réalisant des greffages. Ce matériel permettra également de cribler une large collection de virus de vigne afin de mettre en évidence d'éventuelles protéines suppresseur de silencing.

