



UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
ECOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE (547)

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
Spécialité Biologie et Pathologie Végétales

Présentée et soutenue publiquement par

Clémentine GERARD

Le 29 Septembre 2014

**Caractérisation d'inhibiteurs de protéases lors de l'interaction entre la Vigne
et *Botrytis cinerea*.**

Membres du jury :

Dr. M. Bardin	INRA d'Avignon, France	Rapporteur
Dr. X. Daire	INRA, Université de Bourgogne, France	Rapporteur
Pr. M.F. Bouzidi	Université de Clermont-Ferrand, France	Examineur
Pr. C. Clément	Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Président du jury
Pr. F. Baillieul	Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Co-directrice
Dr. L. Monti-Dedieu	Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Co-encadrante
Dr. F. Mazeyrat-Gourbeyre	Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Invité

Je tiens tout d'abord à remercier la région Champagne-Ardenne d'avoir participé au financement de ma thèse ainsi que l'Université de Reims Champagne Ardenne pour ses infrastructures.

Mes remerciements vont également au Professeur Christophe Clément pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour ma thèse, et pour les différents stages que j'ai réalisés au cours de mon cursus.

Je remercie mes trois encadrantes, Fabienne Baillieul, Laurence Monti-Dedieu et Florence Mazeyrat-Gourbeyre. Fabienne, merci de m'avoir suivie tout au long de cette thèse, pour tes conseils toujours pertinents et tes corrections. Laurence, merci pour ton écoute et ton soutien précieux lors de cette fin de thèse. Florence, même si ça n'a pas toujours été simple entre nous, je tiens à te remercier pour tes corrections.

J'exprime toute ma reconnaissance à Marc Bardin et à Xavier Daire pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse ainsi qu'à Mohamed-Fouad Bouzidi et Christophe Clément pour en être les examinateurs.

Je remercie Jérôme Crouzet pour l'aide qu'il m'a apportée pour la production des protéines en levures mais aussi pour son soutien et sa bonne humeur.

Je remercie chaleureusement Geneviève Billon-Grand pour cette semaine intense que j'ai passée à ses côtés chez Bayer.

Merci à Barbara Couteaux et Sandra Villaume pour les dernières plaques q-PCR.

Un grand merci également à Marine Rondeaux pour avoir continué les manip lors de ma rédaction. Je sais que ta position n'a pas toujours été facile, encore désolée pour ça. Bon courage pour ta future thèse, tu vas tout déchirer !

Merci à Charlotte Gruau pour les nombreuses discussions, les thèses, les conseils et ton soutien, bon courage pour ta fin de thèse.

Un grand merci à Damien Afoufa-Bastien. Sans toi je n'en serai certainement pas là aujourd'hui. Merci pour ton aide, les discussions, les gâteaux, même si tu n'aimes pas le Seigneur des Anneaux !

Merci beaucoup à Steven Colas avec qui j'ai débuté ma thèse. Merci pour les nombreuses discussions scientifiques ou non. Félicitation pour ta petite Claire, elle est vraiment adorable.

Merci à tous ceux avec qui j'ai eu la chance de partager le bureau : Steven, Mathilde, Barbara, Carine, Parul, Mélodie, Gaëlle, Sophie, Lidiane et Marine. J'ai passé de très bons moments avec vous. Les gâteaux, bonbons, et chocolats n'y sont probablement pas pour rien !

Jean-François, un petit bout de Picardie à toi tout seul ! Merci pour ta bonne humeur et toutes tes blagues !

Merci à Jean-Louis de m'avoir initiée à l'enseignement, j'ai été très heureuse d'apprendre les rudiments de la pédagogie à tes côtés. Merci également à tous ceux avec qui j'ai partagé mes nombreuses séances de TP.

Merci à tous les autres membres du laboratoire SDRP, Maryline, Mehdi, Léo-Paul et Claire pour les pauses gouter, Sylvain pour les infos venant de Colmar (même si elles n'étaient pas très bonnes!) et ton encadrement lors de mes Master 1 et 2, Fanja pour ton aide sur la q-PCR, Lisa, Cédric, Marie, Nathalie, Sandrine, Stephan, Éric, Essaïd, Katia, Florence F, Philippe, Alessandro, Fan, Cristina, Aziz, Patricia et Michel.

Merci à tous ceux que j'ai eu l'occasion de rencontrer lors de ma thèse.

Je tiens à remercier mes parents et mon frère pour leur soutien sans faille.

Pour finir j'aimerais remercier Gaël, pour son amour, son soutien et surtout sa patience durant ces 4 longues années passées à plus de 200 km l'un de l'autre.

Résumé

Caractérisation d'inhibiteurs de protéases lors de l'interaction entre la vigne et *Botrytis cinerea*.

Il a été montré que lors de l'infection de la baie de Pinot Noir par *B. cinerea*, des protéases fongiques pourraient être à l'origine de la dégradation d'une des protéines PR majoritaires de la baie mûre, la chitinase VvChi4D (Thèse S. Colas, 2012 ; van Sluyter *et al.*, 2013). L'hypothèse émise lors de notre étude est que des inhibiteurs de protéases de la vigne pourraient empêcher la dégradation de cette protéine de défense par les protéases de *B. cinerea*.

L'expression de deux inhibiteurs de protéases, un Potato Inhibitor I (VvPin) et un Kunitz (VvKun), ainsi que celle de trois protéases fongiques dont deux protéases acides, une protéase aspartique (BcAp8) et une protéase glutamique (BcAcp), et une protéase à sérine (BcSer), ont été suivies lors de l'infection de la baie de Pinot noir et de la feuille de vitroplants. Les résultats obtenus montrent que l'expression des deux IP est induite en même temps que celle de la protéase à sérine mais après celle des deux protéases acides du champignon. La production en système hétérologue des deux IP ainsi que l'obtention de protéases acides et de protéases à sérine dans des sécrétomes de *B. cinerea* a permis de montrer que la protéine VvKun est capable d'inhiber les protéases à sérine du champignon. En revanche, aucun des deux IP n'est capable d'inhiber les protéases acides du champignon, protéases responsables de la dégradation de la chitinase VvChi4D.

Mots clés: *Vitis vinifera*, *Botrytis cinerea*, Protéases, Inhibiteurs de protéases, Potato Inhibitor I, Kunitz.

Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne - EA 4707
Laboratoire de Stress Défenses et Reproduction des Plantes
Moulin de la Housse - Bâtiment 18
BP 1039
51687 Reims Cedex 2
France

Abstract

Characterization of protease inhibitors in the interaction between *Vitis vinifera* and *Botrytis cinerea*.

It has been shown that upon infection of the grape berry by *B. cinerea*, fungal proteases may be responsible for the degradation of VvChi4D chitinase, a PR protein of the mature berry (Thesis S. Colas, 2012; van Sluyter *et al*, 2013). The hypothesis of our study is that protease inhibitors could prevent the degradation of this defense protein by proteases of *B. cinerea*.

The expression of two protease inhibitors, a Potato Inhibitor I (VvPin) and a Kunitz (VvKun), and that of three fungal proteases, two acid proteases, an aspartic protease (BcAp8) and a glutamic protease (BcAcp) and a serine protease (BcSer) were followed during infection of Pinot Noir berry and leaf plantlets. The results obtained show that the expression of both IP is induced in the same time as the serine protease, but after the two fungal acid proteases. The heterologous production of both IP and the production of acid and serine proteases from *B. cinerea* secretomes have shown that VvKun is able to inhibit serine proteases of the fungus. However, neither IP is able to inhibit fungal acid proteases, responsible for the degradation of the chitinase VvChi4D.

Key words: *Vitis vinifera*, *Botrytis cinerea*, Proteases, Protease inhibitors, Potato Inhibitor I, Kunitz.

Sommaire

Liste des abréviations	13
Liste des figures	29
Liste des tableaux	19
Avant-Propos :	20
Synthèse bibliographique.....	22
I. <i>Botrytis cinerea</i> :.....	22
1. Cycle de développement de <i>B. cinerea</i> sur la vigne :	22
2. Mode d'infection :	23
3. Enzymes et métabolites impliqués dans l'infection :	24
a. Enzymes impliquées dans la pénétration de la surface de l'hôte :	25
b. Les métabolites toxiques :	27
c. Contournement et utilisation des défenses de la plante :	28
4. Les protéases :	29
i. Les protéases aspartiques (A):	31
ii. Les protéases à sérine (S) :	32
iii. Les protéases à cystéine (C):	33
iv. Les protéases glutamiques (G):	34
v. Les métalloprotéases (M) :	69
5. Méthodes de lutte contre <i>B. cinerea</i> chez la vigne :	36
II. Les défenses des plantes :	38
1. Défenses préformées :	38
2. Défenses inductibles :	39
a. Perception de l'agression :	39
b. Transmission du signal :	41
1. Les événements précoces :	41
a. Les flux ioniques :	41
b. La phosphorylation de protéines : les MAPK	42
c. Les formes activées de l'oxygène :	42
d. Le monoxyde d'azote (NO):	42
2. Les événements tardifs : la signalisation hormonale	43
c. Les défenses induites :	45
1. Le renforcement des parois :	46

2.	La production de phytoalexines :	46
3.	La réponse hypersensible :	47
4.	La production de protéines PR :	47
III.	Les inhibiteurs de protéases:	51
1.	Classifications des inhibiteurs de protéases :	52
a.	Les « Serpins » :	53
b.	Les « Kunitz » :	53
c.	Les “Cereal trypsin/ α -amylase inhibitors”:	54
d.	Les « Potato type I »:	54
e.	Les « Phytocystatines »:	54
f.	Les “Pro-eosinophil major basic proteins “ :	55
g.	Les “Serine carboxypeptidase Y inhibitors”:	55
h.	Les “Cytotoxic T-lymphocyte antigen”:	55
2.	Rôles des inhibiteurs de protéases chez la plante :	56
a.	Rôle des IP sur les protéases endogènes :	56
b.	Rôle des IP dans la protection contre les ravageurs et les phytopathogènes:	57
i.	Insectes et nématodes :	57
ii.	Bactéries et champignons:	58
3.	Régulation des IP chez la plante :	59
4.	Les inhibiteurs de protéase présents chez la vigne :	60
	Objectifs de la thèse :	62
	Matériel et méthodes.....	64
I.	Matériel :	65
1.	<i>Vitis vinifera</i>	65
1.1.	Baies	65
1.2.	Vitroplants	65
2.	<i>Botrytis cinerea</i>	65
3.	<i>Escherichia coli</i>	65
4.	<i>Pichia pastoris</i>	66
5.	Les plasmides	66
6.	Sécrétome de cultures cellulaires de Chardonnay	66
7.	Les anticorps	67
II.	Méthodes :	67
1.	Traitement des baies de Pinot Noir :	67

1.1. Traitements éliciteurs :	67
1.2. Infection des baies :	68
1.3. Dissection des baies :	68
2. Traitement des feuilles de vitroplants	68
2.1. Infection des feuilles de vitroplants	68
2.2. Traitements éliciteurs	69
3. Culture de <i>Botrytis cinerea</i>	69
4. Production des sécrétomes de <i>B. cinerea</i>	69
5. Culture d' <i>Escherichia coli</i>	70
5.1. Culture en milieu solide	70
5.2. Culture en milieu liquide	70
6. Extraction des ARN totaux et PCR quantitative en temps réel	70
7. Production hétérologue en <i>Pichia pastoris</i>	71
7.1. Amplification PCR des séquences d'intérêt	71
7.2. Clonage en pGEM®-T Easy	71
7.3. Clonage en pENTR™/D-TOPO®	71
7.4. Clonages en pPIC3K5 et pPIC9K	72
7.5. Electrophorèse des acides nucléiques	73
7.6. Séquençage	74
7.7. Préparation de <i>Pichia pastoris</i> compétentes	74
7.8. Transformation de <i>Pichia pastoris</i>	74
7.9. Production et purification de la protéine VvKUN hétérologue	75
7.10. Production de la protéine VvPIN par ProtéoGenix	76
8. Traitements des protéines	76
8.1. Dosage des protéines	76
8.2. Electrophorèse des protéines	77
8.3. Coloration des protéines au bleu de Coomassie	77
8.4. Western blot	77
9. Tests antigéminatifs de la protéine VvKUN sur les conidies de <i>B. cinerea</i>	78
10. Dosages d'activité protéase	78
10.1. Dégradation de la BSA	78
10.2. pNA	79
10.3. Azocaséine	79
10.4. Les protéases et inhibiteurs de protéases commerciaux	79

11. Tests d'inhibition de la dégradation de protéines	80
Chapitre 1	81
1. Les inhibiteurs de protéases :	84
1.1. VvPin : « Potato Inhibitor I »	84
1.2. VvKun : « Kunitz »	85
2. Expression des IP dans la baie saine de Pinot Noir :	85
2.1. Expression des IP au cours de la maturation de la baie :	85
2.2. Localisation de l'expression des IP dans la baie mûre de Pinot Noir :	86
3. Expression des IP et des protéases lors de l'infection naturelle des baies de Pinot Noir :	87
3.1. Expression des IP dans la baie infectée :	87
3.2. Expression des protéases de <i>B. cinerea</i> lors de l'infection naturelle de la baie de Pinot Noir	88
4. Expression des IP et des protéases lors de l'infection artificielle de baies de Pinot Noir :	89
5. Expression des protéases et des IP lors de l'infection de feuilles de vitroplants :	90
5.1. Expression des protéases de <i>B. cinerea</i> lors de l'infection de feuilles de vitroplants :	91
5.2. Expression des IP lors de l'infection de feuilles de vitroplant :	92
6. Expression des IP à la suite de traitements éliciteurs :	93
6.1. Expression des IP à la suite de traitements éliciteurs sur baies vertes :	94
6.2. Expression des IP lors de traitements éliciteurs sur baies mûres :	95
6.3. Expression des IP à la suite de traitements éliciteurs sur feuilles de vitroplants :	96
Discussion	97
Conclusion:	103
Chapitre 2	104
1. Production et activité protéase de sécrétomes de <i>B. cinerea</i>	106
1.1. Sécrétome « acide »	106
1.2. Sécrétome « neutre »	107
1.3. Activité des protéases de <i>B. cinerea</i> sur la chitinase de vigne	108
1.4. Détection des protéases fongiques et de la chitinase de vigne <i>in planta</i>	108
2. Production et caractérisation de VvKUN et VvPIN hétérologues	109
2.1. Production hétérologue de VvKUN et VvPIN	109
2.2. Activités des protéines hétérologues VvKUN et VvPIN	110
2.2.1. Activités inhibitrices de VvKUN et VvPIN	111
2.2.2. Activité antifongique de VvKUN	112
3. Activité inhibitrice des IP sur les sécrétomes de <i>B. cinerea</i>	112

3.1. Activité inhibitrice des IP sur le sécrétome « acide » de <i>B. cinerea</i>	113
3.2. Activité inhibitrice des IP sur le sécrétome « neutre » de <i>B. cinerea</i>	114
Discussion	115
Conclusion :	121
Conclusion générale et perspectives	123
Références bibliographiques.....	127

Liste des abréviations

ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AEBSF: 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
ARN: Acide RiboNucléique
ARNm: Acide RiboNucléique messenger
BABA : Acide β -aminobutyrique
BBCH: Biologische Bundesanstalt bundessortenamt and Chemical industry
Bc: Botrytis cinerea
BET: Bromure d'Ethydium
BSA: Bovine Serum Albumin
BTH : Benzo Thiadiazole
CDPK : Calcium-Dependent Protein Kinase
CWDE : Cell Wall Degrading Enzymes
DAMP : Damaged-Associated Molecular Patterns
DMSO: Diméthylsulfoxyde
Do: Densité Optique
DTT: DiThioThréitol
EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
E. necator : Erysiphe necator
EPS : ExoPolySaccharide
ET: Ethylène
ETI : Effector-Triggered Immunity
ETS : Effector-Triggered Susceptibility
FAO : Formes Activées de l'Oxygène
GFP : Green Fluorecent Protein
GLP : Germine-Like Proteins
GST: Gluthation S-Transférase
HEPES: 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine
HR : Hypersensitive Response
Ethane Sulfonique
His: Histidine
Hpi: Heures post inoculation
Hpt: Heures post traitement
IP: Inhibiteur de protéases
JA : Jasmonic Acid
kDa: kilo Dalton
LAR: Local Acquired Resistance

LB: Luria-Bertani
LTP: Lipid-Transfert Proteins
MAMP: Microbial Associated Molecular Patterns
MAPK: Mitogen-Associated Protein Kinase
MeJA: Methyl Jasmonate
MeSA: Methyl Salicylate
MW: Molecular Weight
MWCO: Molecular Weight Cut Off
NaAc: Acétate de sodium
NaCl: Chlorure de sodium
NO : Monoxyde d'azote
NT: Non traité
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
pb, kb : paires de base, kilo bases
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDB: Potato Dextrose Broth
PLA2: Phospholipase A₂
PME: Pectines Methylesterase
PMSF: PhenylMethaneSulfonylFluoride
PN: Pinot Noir
PR: Pathogenesis related
PTI: PAMP-Triggered Immunity
PVDF: PolyVinylidene DiFluoride
PVPP: PolyVinylPolyPyrrolidone
qRT-PCR: Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
rpm: rotation par minute
SA: Salicylic Acid
SAR: Systemic Acquired Resistance
SDN: Stimulateurs de Defenses Naturelles
SDS: Sodium Diodecyl Sulfate
SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TAE: Tris-Acetate-EDTA
TBS-T: Tris-Buffered Saline Tween
TCA: TriChloroacetic Acid
TEMED: TetraMethylEthyleneDiamine
U. maydis: *Ustilago maydis*
UV: Ultra-Violet
VMT: Virus de la Mosaïque du Tabac
YNB: Yeast Nitrogen Base
YPD: Yeast extract Peptone D-glucose

Liste des figures

Figure 1 : Pourriture grise sur des baies de <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Pinot Noir.	42
Figure 2 : Cycle de développement de <i>Botrytis cinerea</i> sur la vigne.	42
Figure 3 : Modes d'infection de <i>Botrytis cinerea</i> :	44
Figure 4 : Représentation schématique de la paroi d'une cellule végétale.	76
Figure 5: Principaux événements caractérisant la mise en place des défenses des plantes. .	78
Figure 6: Représentation schématique simplifiée du système de réponse immunitaire chez les plantes.....	80
Figure 7: Interactions entre les voies de signalisation.....	88
Figure 8: Formation de la papille au cours de la pénétration d'un hyphe de <i>Blumeria graminis</i> dans une cellule d'orge	90
Figure 9: Représentation schématique des différents mécanismes d'inhibition.	100
Figure 10: Schéma représentant la voie de signalisation menant à l'expression des IP de tomate.....	116
Figure 11: Carte du plasmide pGEM®-T Easy	128
Figure 12 : Carte du plasmide pENTR™/D-TOPO®	128
Figure 13: Carte du plasmide pPIC3K5	130
Figure 14: Carte du plasmide pPIC9K.....	130
Figure 15: Schéma récapitulatif des différentes étapes de clonages réalisées.....	144
Figure 16: Alignement de la séquence nucléotidique de VvPin après optimisation pour l'expression en levure <i>P. pastoris</i> par ProteoGenix (PinP) avec la séquence nucléotidique de VvPin (Pin)	150
Figure 17: Séquence de la protéine de fusion GST-PIN	150
Figure 18: Alignement des séquences protéiques des membres de la famille des Potato Inhibitor I de vigne	166
Figure 19: Alignement des Potato Inhibitor I de vigne (VvPin) d'arabette (AtPin ; AT5G43580) et de tomate (SIPI1 ; XP_004247660.1)	166
Figure 20: Alignement des séquences protéiques des membres de la famille Kunitz de vigne.	168
Figure 21: Alignement de VvKun avec l'IP de pomme de terre (StKun ; AAM08398.1)	168

Figure 22: Suivi de l'expression des gènes <i>VvPin</i> et <i>VvKun</i> par qRT-PCR au cours de la maturation des baies de Pinot Noir (2008).....	170
Figure 23: Suivi de l'expression des gènes <i>VvPin</i> et <i>VvKun</i> par qRT-PCR au cours de la maturation des baies de Pinot Noir sur trois années (2008, 2010 et 2011).....	170
Figure 24: Suivi de l'expression des gènes <i>VvPin</i> et <i>VvKun</i> par qRT-PCR dans la pellicule, la pulpe et les pépins de la baie mûre de Pinot Noir (2012)	170
Figure 25: Stades d'infection de baies botrytisées sur une grappe de Pinot Noir	172
Figure 26: Suivi de l'expression des gènes <i>VvPin</i> et <i>VvKun</i> par qRT-PCR dans les baies de Pinot Noir infectées naturellement par <i>Botrytis cinerea</i> sur quatre années (2008, 2010, 2011 et 2013).	172
Figure 27: Suivi de l'expression des gènes <i>VvPin</i> et <i>VvKun</i> par qRT-PCR dans les pépins (Pép) et un mélange pellicule/pulpe (P/P) de baie mûre de Pinot Noir aux stades S1 et S3 (2013)	174
Figure 28: Suivi de l'expression des gènes <i>BcAcp</i> , <i>BcAp8</i> et <i>BcSer</i> par qRT-PCR dans les baies de Pinot Noir (2011 et 2013) infectées naturellement par <i>Botrytis cinerea</i>	174
Figure 29: Baies de Pinot Noir (2012) détachées infectées artificiellement par <i>B. cinerea</i> souche 630.	176
Figure 30: Suivi de l'expression des gènes <i>VvPin</i> et <i>VvKun</i> par qRT-PCR dans les baies de Pinot Noir (2012) infectées artificiellement par <i>Botrytis cinerea</i> souche 630.....	176
Figure 31: Suivi de l'expression des gènes <i>BcAcp</i> , <i>BcAp8</i> et <i>BcSer</i> par qRT-PCR dans les baies de Pinot Noir (2012) infectées artificiellement par <i>Botrytis cinerea</i> souche 630.....	178
Figure 32: Feuilles de vitroplants détachées infectées par <i>B.cinerea</i> souche 630.....	180
Figure 33: Suivi de l'expression des gènes <i>BcAcp</i> , <i>BcAp8</i> et <i>BcSer</i> par qRT-PCR dans des feuilles de vitroplants détachées infectées par <i>B.cinerea</i> souche 630.....	180
Figure 34: Suivi de l'expression des gènes <i>VvPin</i> et <i>VvKun</i> par qRT-PCR dans des feuilles de vitroplants détachées et infectées (Bc) ou non (NT) par <i>B.cinerea</i> souche 630.....	184
Figure 35: Suivi de l'expression du gène <i>VvPin</i> par qRT-PCR dans des baies vertes de Pinot Noir détachées (2011) et traitées avec du MeJA, du Bion ou une blessure	186
Figure 36: Suivi de l'expression du gène <i>VvKun</i> par qRT-PCR dans des baies vertes de Pinot Noir détachées (2011) et traitées avec du MeJA, du Bion ou une blessure	186
Figure 37: Suivi de l'expression du gène <i>VvPin</i> par qRT-PCR dans des baies mûres de Pinot Noir détachées (2011) et traitées avec du MeJA, du Bion ou une blessure	188

Figure 38: Suivi de l'expression du gène <i>VvKun</i> par qRT-PCR dans des baies mûres de Pinot Noir détachées (2011 et traitées avec du MeJA, du Bion ou une blessure	188
Figure 39: Suivi de l'expression des gènes <i>VvPin</i> et <i>VvKun</i> par qRT-PCR dans des feuilles de vitroplants traitées avec du Bion ou du MeJA	190
Figure 40: Modèle proposé des voies métaboliques impliquées dans la production d'énergie mises en jeu lors de l'infection de la feuille ou de la baie par <i>B. cinerea</i>	200
Figure 41: Activité protéase globale à pH 4 et à pH 8 (dosage BSA) du sécrétome « acide » de <i>B. cinerea</i> souche 630	210
Figure 42: Activité protéase globale à pH 4 (dosage BSA) du sécrétome « acide » de <i>B. cinerea</i> souche 630, en présence d'inhibiteurs	210
Figure 43: Evolution du pH de culture de <i>B. cinerea</i> souche 630 lors de l'élaboration du sécrétome « neutre ».....	212
Figure 44: Dosage d'activité protéase globale à pH 4,5 et pH 8 (dosage Azocaséine) du sécrétome « neutre » de <i>B. cinerea</i> souche 630.....	212
Figure 45: Dosage d'activité protéase à sérine à pH 8 (dosage pNA) du sécrétome « neutre » de <i>B. cinerea</i> souche 630.	212
Figure 46: Dégradation <i>in vitro</i> de la chitinase de vigne (<i>VvChi4D</i>) par la pepsine, la subtilisine ainsi que les sécrétomes «acide» et «neutre» de <i>B. cinerea</i> souche 630 en présence ou non d'inhibiteurs chimiques (Pepstatine et PMSF)	214
Figure 47: Détection par Western blot de la protéine BcSer dans des feuilles de vitroplants détachées infectées par <i>B. cinerea</i> souche 630.....	214
Figure 48: Détection par Western blot de la protéine <i>VvChi4D</i> dans des feuilles de vitroplants détachées infectées (Bc) ou non (NT) par <i>B. cinerea</i> souche 630	216
Figure 49: Profil SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de la purification de la protéine <i>VvKun</i> His C ter par billes de nickel Ni Sépharose™ 6 Fast Flow.....	216
Figure 50: Profil SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de la séparation des protéines <i>VvPin</i> et GST par la PreScission Protease, réalisé par la société ProtéoGenix.....	218
Figure 51: Activité inhibitrice de la protéine recombinante <i>VvKun</i> sur cinq protéases commerciales	218
Figure 52: Activité protéase de la trypsine et de la subtilisine en présence de la protéine recombinante <i>VvKun</i> et d'une protéine Kunitz commerciale (<i>Glycine max</i>).....	220

Figure 53: Vérification de la fonctionnalité et de l'effet inhibiteur de la protéine hétérologue VvPIN par la visualisation de la dégradation de la BSA.....	220
Figure 54: Tests antigerminatifs réalisés à partir de conidies de <i>B. cinerea</i> souche 630.....	222
Figure 55: Dégradation <i>in vitro</i> d'un µg de BSA à pH 4 par le sécrétome « acide » de <i>B.cinerea</i> souche 630 en présence d'inhibiteurs chimiques (Pepstatine et PMSF à 1mM), de VvPin ou de VvKun.....	224
Figure 56: Suivi de la protéine hétérologue VvKun lors de la dégradation <i>in vitro</i> d'un µg de BSA à pH 4 par le sécrétome « acide » de <i>B.cinerea</i> souche 630 en présence de VvKun	224
Figure 57: Détection de la protéine VvKUN lors de l'infection naturelle de la baie de Pinot Noir (2008) par Western blot.....	224
Figure 58: Activité protéase à sérine à pH 8 (dosage pNA) du sécrétome « neutre » de <i>B. cinerea</i> souche 630 en présence ou non de VvPin et VvKun à 1µM.....	226

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des 14 familles de protéines PR présentes chez la vigne	92
Tableau 2: Familles d'inhibiteurs de protéases présentes chez la vigne ainsi que les familles de protéases inhibées, d'après MEROPS the peptidase database.	118
Tableau 3: Amorces utilisées pour les analyses par PCR quantitative en temps réel.	138
Tableau 4: Amorces utilisées pour l'amplification PCR des séquences codantes VvPin et VvKun.....	140
Tableau 5: Séquences des amorces permettant d'insérer les tags 6 Histidines en N ou C terminal des séquences d'intérêt et leur clonage directionnel dans le pENTR™/D-TOPO®..	140
Tableau 6: Séquences des amorces permettant l'insertion des sites de restriction des enzymes EcoRI (GAATTC) et NotI (CGCCGGCG) pour le clonage des séquences d'intérêt avec ou sans tag Histidine en C ou N terminal dans les vecteurs pPIC3K5 et pPIC9K.	142
Tableau 7: Conditions d'utilisation des différents anticorps utilisés en Western blot.	154

Avant-Propos :

La vigne est une Angiosperme dicotylédone de la famille des *Vitaceae*. Celle-ci est cultivée par l'homme pour la production de raisin de table, de jus de raisin et de vin. Aujourd'hui, la France est le premier producteur mondial de vin, juste devant l'Italie, avec plus de 41 millions d'hectolitres produits en 2012 (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2013). En Champagne, 30 000 hectares sont consacrés à la culture de la vigne (France AgriMer, 2013).

La production intensive, la sélection variétale et les échanges internationaux ont fragilisé l'état sanitaire de la vigne. Aussi, un grand nombre de maladies a pu être observé. Elles peuvent être causées par des bactéries (galle du collet), des virus (court-noué), des mycoplasmes (flavescence dorée) mais celles provoquées par des champignons et oomycètes phytopathogènes tels que *Plasmopara viticola* (mildiou), *Erysiphe necator* (oïdium) et *Botrytis cinerea* (pourriture grise) sont les plus répandues. Comme l'utilisation de produits phytosanitaires demeure le seul moyen de lutte efficace contre ces maladies, cette pratique a mené la France à détenir le record européen d'utilisation de produits phytosanitaires dans le secteur de la viticulture. Pour remédier à cela, de nouvelles mesures inscrites dans le « Plan Ecophyto 2018 » ont été envisagées au niveau national. Ces mesures visent, depuis 2008, une réduction de 50% de l'utilisation des produits phytosanitaires d'ici 2018. Le développement de nouveaux moyens de lutte, plus respectueux de l'environnement, pour remplacer ou diminuer l'utilisation de pesticides, est donc indispensable. La lutte biologique est l'un de ces moyens. Elle repose sur l'utilisation de microorganismes ou d'auxiliaires de culture tels que des insectes, qui vont agir directement contre les agents pathogènes et/ou stimuler les défenses naturelles de la plante et ainsi lui conférer une meilleure protection. L'utilisation de Stimulateurs des Défenses Naturelles (SDN) de la plante est une autre méthode envisagée. Cependant, la mise au point de tels moyens de lutte alternatifs à la lutte chimique nécessite de mieux comprendre les mécanismes de défense de la vigne.

Les recherches de doctorat présentées ici s'inscrivent dans ce contexte en participant à la compréhension des mécanismes de défense mis en place par la vigne lors de l'interaction avec *B. cinerea*, l'agent de la pourriture grise. Financée par la région Champagne-Ardenne, cette étude a été réalisée au sein de l'Unité de Recherche Vigne et Vin de Champagne (URVVC) EA-4707 de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.



Figure 1 : Pourriture grise sur des baies de *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir (Photo Anne-Sophie Walker © INRA).

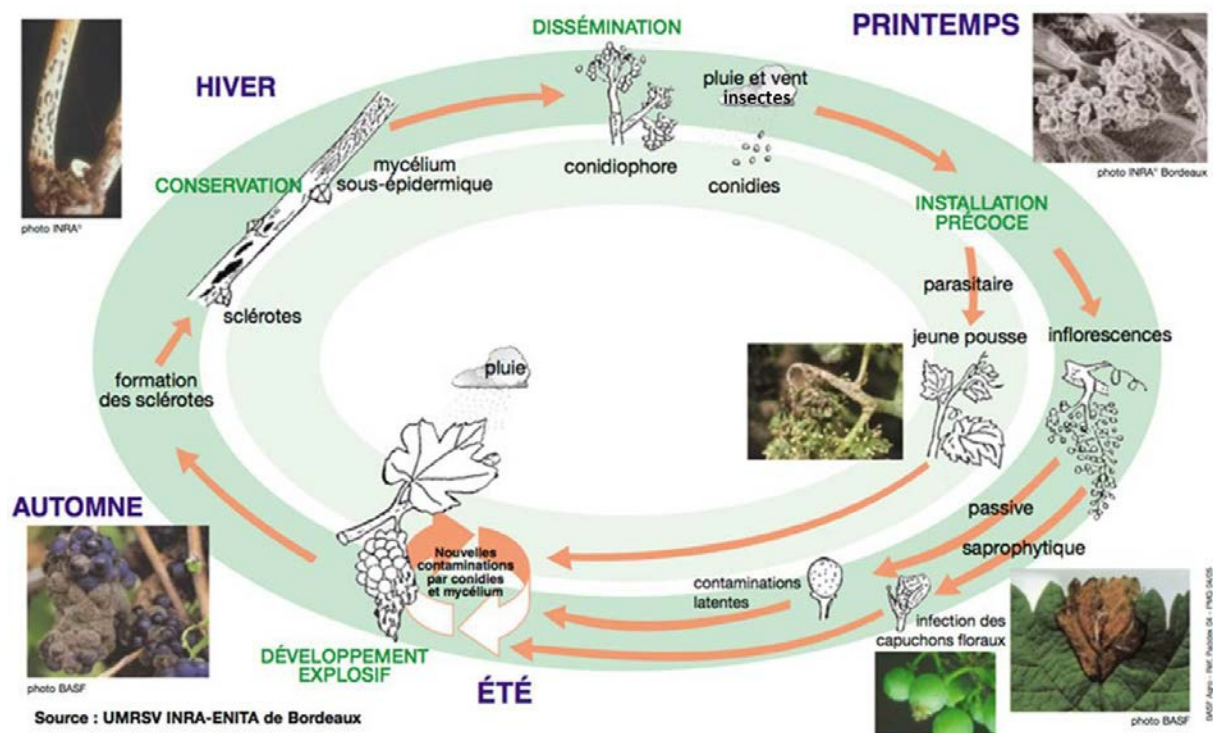


Figure 2 : Cycle de développement de *Botrytis cinerea* sur la vigne (Source : <http://www.agro.basf.fr>).

Synthèse bibliographique

I. *Botrytis cinerea* :

Botrytis cinerea est l'agent causal de la pourriture grise (Figure 1), l'une des maladies qui occasionne le plus de dommages sur la vigne et la récolte aussi bien au niveau quantitatif que qualitatif. Celui-ci a été classé second parmi les 10 champignons phytopathogènes les plus importants scientifiquement et économiquement (Dean *et al.*, 2012). En effet, chez la vigne, les pertes de récolte engendrées par ce pathogène peuvent atteindre 40 % (données 2006 ; <http://www.viniflor.fr>). Au-delà des pertes quantitatives, la pourriture grise est néfaste pour la qualité des vins de Champagne, dont elle compromet la prise de mousse et altère les arômes (Marchal *et al.*, 2002). *B. cinerea* est un champignon polyphage capable d'infecter plus de 200 plantes hôtes, aussi bien monocotylédones que dicotylédones (Williamson *et al.*, 2007). Celui-ci appartient à la division des Ascomycota, la classe des Leotiomycètes, l'ordre des Helotiales, la famille des Sclerotiniaceae et le genre *Botrytis*. *B. cinerea* désigne la forme asexuée (deutéromycète) du champignon. La forme sexuée (ascomycète), *Botryotinia fuckeliana*, quant à elle, est rarement observée dans la nature. Ce champignon phytopathogène appartient à la même famille que l'agent causal de la pourriture blanche, *Sclerotinia sclerotiorum*, capable lui aussi d'infecter plusieurs centaines d'hôtes. Ces deux pathogènes sont très souvent comparés du fait de leur proximité phylogénétique, de leur capacité à pouvoir infecter une large gamme d'hôtes mais aussi du fait de leur mode de vie nécrotrophe (Amselem *et al.*, 2011).

1. Cycle de développement de *B. cinerea* sur la vigne :

Au début du printemps, des conidies du champignon sont disséminées par le vent, la pluie ou les insectes (Figure 2). Celles-ci vont s'installer précocement sur les organes aériens de la vigne (jeunes pousses et inflorescences). Les conidies peuvent ne pas germer immédiatement (contamination latente) ou germer et infecter les tissus vivants (feuilles, fleurs ; installation parasitaire) ou morts (capuchons floraux ; installation saprophytique). Au

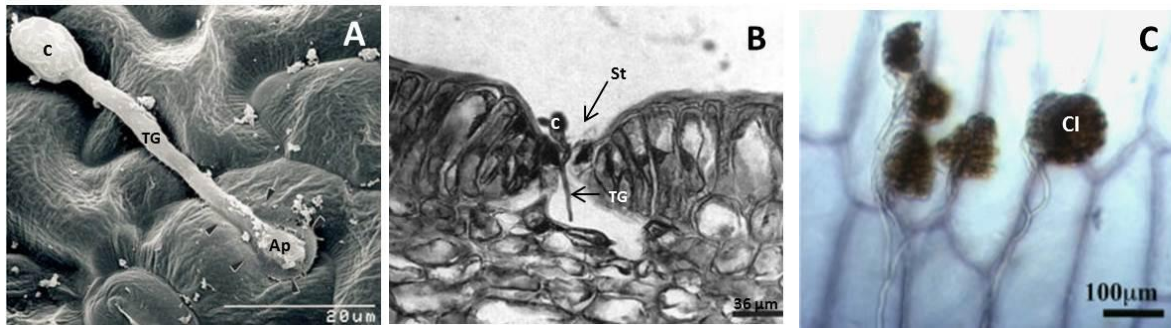


Figure 3 : Modes d'infection de *Botrytis cinerea* :

A : Germination et développement de l'appressorium (photo réalisée au MEB, modifiée d'après van Kan, 2006) ; B : Pénétration de *B. cinerea* dans les tissus de l'hôte par un stomate (photo réalisée au MO, modifiée d'après Fourie et Holz, 1994) ; C : Coussins d'infection (photo réalisée au MO, modifiée d'après Choquer *et al.*, 2007). Ap : Appressorium ; c : Conidie ; CI : Coussin d'infection ; St : Stomate ; TG : Tube Germinatif.

moment de la véraison, les baies se chargent en sucre et deviennent sensibles à l'attaque du pathogène. La contamination peut se faire soit par des conidies au niveau de blessures (occasionnées par exemple par des lépidoptères comme les tordeuses de la grappe ou par les intempéries), ou dans la zone péristomatique, soit par du mycélium présent sur des débris végétaux au niveau des grappes. A la fin de l'été, au moment de la récolte, le champignon se développe par contamination de proche en proche à partir des foyers actifs, on parle alors de développement explosif. A la fin de l'automne, le champignon forme des sclérotés, organe de conservation formé de mycélium compact (Coley-Smith et Cooke, 1971). Les sclérotés ainsi que des fragments mycéliens sous-épidermiques sont conservés pendant toute la durée de l'hiver. Au printemps, la hausse des températures (15-20°C) et l'humidité, offrent des conditions favorables au développement des sclérotés et du mycélium qui produisent alors des conidiophores sur lesquels se forment des conidies, qui vont pouvoir être disséminées à leur tour (Holz *et al.*, 2007).

2. Mode d'infection :

B. cinerea est capable d'infecter des tissus vivants sains qu'il finit par détruire (il est qualifié alors de parasite nécrotrophe), des tissus morts (il est qualifié dans ce cas de saprophyte) mais aussi des tissus blessés ou infectés par une autre maladie (il est qualifié d'opportuniste).

Pour infecter des tissus vivants sains, *B. cinerea* doit pénétrer mécaniquement dans la plante. Après avoir adhéré à la surface, si les conditions sont favorables, une conidie peut germer, et former un appressorium (Figure 3A ; Mendgen et Deising, 1993 ; Cotoras et Silva, 2005 ; van Kan, 2006). Cette structure ne semble pas capable de pénétrer les tissus par la seule pression mécanique contrairement à ce qui est observé pour la majorité des champignons formant des appressoriums. Pour pénétrer dans la plante, l'appressorium de *B. cinerea* sécrète de nombreuses enzymes, décrites dans le paragraphe suivant, capables de dégrader la surface de celle-ci (van Kan, 2006 ; Choquer *et al.*, 2007 ; Espino *et al.*, 2010). Une autre structure produite par ce champignon appelée selon les auteurs « infection cushions », appressorium complexe (Figure 3C ; Choquer *et al.*, 2007), ou encore « claw-like » (Kunz *et al.*, 2006) pourrait être impliquée dans la pénétration des tissus végétaux.

Cette structure forme un amas d'hyphes courts, multi-cloisonnés, et orientés perpendiculairement à la surface de la plante infectée (Hegedus *et al.*, 2005).

B. cinerea peut également infecter les tissus sains par les ouvertures naturelles de la plante telles que les stomates chez la nectarine (Figure 3B ; Fourie et Holz, 1994 ; Holz *et al.*, 2007) mais il peut aussi infecter via des blessures. Ces blessures peuvent avoir été occasionnées par les conditions climatiques, les insectes, les animaux ou encore d'autres agents pathogènes (Holz *et al.*, 2007). De plus, des études menées sur des fleurs de vigne infectées artificiellement ont montré que les réceptacles floraux, après la chute des capuchons, seraient des sites d'infection privilégiés (Viret *et al.*, 2004 ; Viret *et al.*, 2010). En effet, en se détachant du réceptacle floral, le capuchon laisse une petite blessure, favorable à la pénétration du pathogène.

3. Enzymes et métabolites impliqués dans l'infection :

Au cours de l'infection, *B. cinerea* va sécréter un grand nombre de protéines et de métabolites (van Kan, 2006 ; Choquer *et al.*, 2007, Espino *et al.*, 2010). Pour la plupart, les protéines produites au cours de l'infection servent à dégrader la paroi végétale et sont communément appelées CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes). Celles-ci vont notamment favoriser la pénétration de l'agent pathogène à l'intérieur de la plante et permettre la libération de glucides nécessaires à son développement (Annis et Goodwin, 1997 ; van Kan, 2006 ; Choquer *et al.*, 2007). *B. cinerea* va aussi produire des métabolites toxiques qui vont directement contribuer à la mort des cellules végétales.

Il est à noter que la plupart des enzymes de dégradation sont codées par des familles multigéniques et que le champignon se comporte différemment selon ses hôtes, ce qui rend difficile l'étude de leur rôle dans la virulence (Choquer *et al.*, 2007).

a. Enzymes impliquées dans la pénétration de la surface de l'hôte :

La première barrière rencontrée par le pathogène lors de l'infection est la cuticule, composée de cutine et de cire. Deux types d'enzymes sont impliqués dans sa dégradation, des lipases et des cutinases.

Une lipase (Lip1) produite par *B. cinerea* est capable d'hydrolyser les fonctions esters des longues chaînes d'acides gras insaturés composant la cire (Comménil *et al.*, 1995).

L'activité lipase de *B. cinerea* est inhibée *in vitro* par des anticorps anti-lipase. De plus, l'ajout de ces anticorps à une suspension conidienne de *B. cinerea*, évite la formation de lésions lors de l'infection de la feuille de tomate en empêchant la pénétration de la cuticule par le champignon (Comménil *et al.*, 1998). Chez la vigne, *B. cinerea* sécrète une lipase lors de l'infection de la feuille (Comménil *et al.*, 1999). Cette lipase n'interviendrait pas seulement dans la pénétration de la cuticule mais aussi dans la reconnaissance et l'adhésion à la surface de la feuille (Comménil *et al.*, 1999). Cependant, un mutant privé d'activité lipase par la délétion de cette lipase (Lip1), est capable d'infecter des feuilles intactes de haricots et de tomate, ce qui laisse à penser que celle-ci ne serait pas essentielle pour la pénétration de la cuticule (Reis *et al.*, 2005).

Les cutinases sont capables de dégrader la cutine, polymère d'acides gras en C₁₆ et C₁₈, contenue dans la cuticule (Annis et Goodwin, 1997). Néanmoins, la délétion d'une cutinase (CutA) chez *B. cinerea* ne réduit pas la virulence de celui-ci (van Kan *et al.*, 1997).

Après la cuticule, le champignon doit franchir la paroi végétale composée principalement de pectine, de cellulose et d'hémicellulose. Pour cela *B. cinerea* possède de nombreuses enzymes capables de dégrader ces constituants, les CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes). Celles-ci sont composées de pectinases, de cellulases et d'hémicellulases (Kars et van Kan, 2007).

Les pectines, composants majeurs de la paroi végétale, sont composées d'homogalacturonans et de rhamnogalacturonans. Les homogalacturonans très méthylés sont les pectines et les peu méthylés sont les pectates. Les enzymes capables de dégrader ces composés sont appelées pectinases. Lors de l'infection, *B. cinerea* va sécréter de nombreux types de pectinases, chacune ayant un rôle spécifique dans la dégradation (Kars

et van Kan, 2007). La plupart des pectinases ne sont pas capables de dégrader les pectines très méthylées. C'est pourquoi *B. cinerea* va sécréter des pectines méthylesterases (PME) qui vont transformer les pectines en pectates afin de faciliter la dégradation par les autres pectinases (Valette-Collet *et al.*, 2003). Cependant, un mutant incapable de produire deux PME (BcPME1 et BcPME2) n'est affecté ni dans sa croissance ni dans sa virulence (Kars *et al.*, 2005a). Pour dégrader la pectine, *B. cinerea* produit des polygalacturonases, des pectate lyases, des pectine lyases, des polyméthylgalacturonases ainsi que des rhamnogalacturonases (Annis et Goodwin, 1997 ; Fernandez-Acero *et al.*, 2010 ; Espino *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2012). *B. cinerea* possède six gènes codant des endopolygalacturonases (Kars *et al.*, 2005b). Cinq des six endopolygalacturonases de *B. cinerea* ont été produites chez *Pichia pastoris* (Kars *et al.*, 2005b). Il a été montré que deux d'entre elles (BcPG1 et BcPG2) provoquent une macération rapide et massive sur feuilles de fève (Kars *et al.*, 2005b). La délétion de *BcPG1* réduit la virulence du champignon chez la tomate et la pomme (ten Have *et al.*, 1998) et celle de *BcPG2* chez la tomate et la fève (Kars *et al.*, 2005b). La co-expression chez le tabac d'un inhibiteur de polygalacturonase de vigne (*VvPGIP1*) et de *BcPG2* a montré, sur feuille, une réduction des symptômes provoqués par BcPG2 (Joubert *et al.*, 2007). Ces deux endopolygalacturonases semblent donc être importantes pour la virulence de *B. cinerea*. L'endopolygalacturonase 1 de *B. cinerea* (BcPG1) active, sur cultures cellulaires de vigne (*Vitis vinifera* cv. Gamay), l'induction des réponses de défense de la plante (Poinssot *et al.*, 2003).

La cellulose quant à elle, peut être dégradée par des cellulases comme des endoglucanases, des cellobiohydrolases et des β -glucosidases qui vont la réduire en molécules de cellobiose et de glucose. La délétion d'une cellulase n'affecte pas la virulence du champignon (Espino *et al.*, 2005) et aucune cellobiohydrolase n'est produite lors de l'infection de la feuille de tomate (Kars et van Kan, 2007), ce qui suggère que ces deux enzymes ne sont pas nécessaires lors de l'infection.

Les hémicelluloses, composées de xylane et d'arabinane, peuvent être dégradées par des hémicellulases comme des xylanases ou des arabinases. La mutation d'un gène codant une xylanase (Xyn11A) chez *B. cinerea*, réduit la virulence du champignon sur feuille de tomate et baies de raisin (Brito *et al.*, 2006). Sa contribution dans la virulence provient de sa

capacité à induire des nécroses sur les tissus végétaux et non à son activité xylanase (Noda *et al.*, 2010).

b. Les métabolites toxiques :

B. cinerea produit de nombreux métabolites toxiques capables de provoquer la mort cellulaire, le plus connu étant le sesquiterpène botrydial (Amselem *et al.*, 2011). Celui-ci est produit pendant l'infection de la plante, provoque une chlorose des tissus et l'éclatement des cellules, ce qui va faciliter la pénétration ainsi que la colonisation de la plante (Colmenares *et al.*, 2002 ; Choquer *et al.*, 2007). Cependant, cette toxine aurait une importance différente selon les souches. En effet certaines ont besoin de botrydial pour infecter la plante alors que d'autres souches non (Deighton *et al.*, 2001 ; Siewers *et al.*, 2005).

B. cinerea, tout comme son proche parent *Sclerotinia sclerotiorum*, est connu comme étant un champignon acidificateur, producteur d'acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide succinique, l'acide malique ou encore l'acide oxalique (Verhoeff *et al.*, 1988). Grâce à ces acides, le champignon est capable d'acidifier son environnement afin de stimuler la production et l'activité de nombreuses enzymes sécrétées comme des pectinases, des protéases, des laccases ou encore des polygalacturonases (Cessna *et al.*, 2000 ; Manteau *et al.*, 2003 ; Rolland *et al.*, 2009). Chez *S. sclerotiorum*, il a été montré que l'acide oxalique supprime le burst oxydatif et induit la mort cellulaire programmée de son hôte afin de faciliter son infection (Cessna *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2008). L'utilisation d'arabettes surexprimant une oxalate decarboxylase, a également montré chez *B. cinerea*, que l'acide oxalique serait capable de supprimer le burst oxydatif (L'Haridon *et al.*, 2011). Une étude menée à la fois sur *S. sclerotiorum* et *B. cinerea* lors de l'infection de cotylédons de tournesol indiquerait que *B. cinerea* acidifierait principalement grâce aux acides succinique et citrique alors que *S. sclerotiorum* utiliserait principalement l'acide oxalique (Billon-Grand *et al.*, 2011).

En plus de ces composés toxiques, *B. cinerea* est capable de produire des formes activées de l'oxygène (FAO) telles que le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est produit pendant

l'infection, lors de la germination des conidies et dans ses « infection cushions » (Choquer *et al.*, 2007). Un mutant incapable de sécréter une superoxyde dismutase (BcSOD1), l'enzyme responsable de la production d'H₂O₂, possède une virulence réduite sur feuilles de haricots (Rolke *et al.*, 2004).

c. Contournement et utilisation des défenses de la plante :

La plante est capable de mettre en place de nombreuses réponses de défense pour se protéger lors de l'infection par un agent pathogène (Cf. II.). Cependant, certaines études suggèrent que *B. cinerea* développerait des mécanismes pour contourner certaines de ces réactions de défense.

Lors de l'infection, la plante produit des molécules issues du métabolisme secondaire, comme le resvératrol chez la vigne, connu pour son activité contre *B. cinerea* (Adrian *et al.*, 1997 ; Adrian et Jeandet, 2012). Pour détoxifier cette molécule, *B. cinerea* sécrète des enzymes telles que des stilbènes oxydases et des laccases capables de contrer cette défense phénolique (Goetz *et al.*, 1999 ; Kars et van Kan, 2007). De plus, il possède des transporteurs tels que des « ATP-binding cassette transporters » et des « major facilitator proteins » capables d'excréter hors de la cellule des métabolites toxiques tels que le resvératrol (de Waard, 1997 ; Schoonbeek *et al.*, 2001).

Une protéine de la famille des cerato-platanines ainsi qu'un exopolysaccharide (EPS), respectivement identifiés chez *B. cinerea* lors de l'infection du tabac (Shah *et al.*, 2008 ; Frias *et al.*, 2012) et de la tomate (El Oirdi *et al.*, 2011), seraient capables d'induire la synthèse d'acide salicylique (SA) chez la plante (Frias *et al.*, 2012 ; El Oirdi *et al.*, 2011). Comme il le sera expliqué dans la partie II. 2. b. ii., le SA est un antagoniste de l'acide jasmonique (JA), phytohormone responsable de la mise en place des défenses contre les agents pathogènes nécrotrophes (Glazebrook, 2005). Ainsi le pathogène réprime les réponses de défenses potentiellement actives contre lui. Le SA est aussi responsable de la mise en place de la réponse hypersensible connue pour faciliter l'infection de la plante par *B. cinerea* en provoquant la mort des cellules au niveau du point d'infection (Govrin et Levine, 2000).

Comme évoqué précédemment, lors de l'infection, *B. cinerea* sécrète une endopolygalacturonase (BcPG1) capable d'induire des réponses de défense de la plante (Poinssot *et al.*, 2003). Celle-ci induit notamment la production et l'accumulation de formes activées de l'oxygène (FAO) connues pour favoriser l'infection par les agents pathogènes nécrotrophes tels que *B. cinerea* (Govrin et Levin, 2000).

Très récemment, il a été montré que *B. cinerea* produit des petits ARN capables de détourner la machinerie d'ARN interférence de l'arabette et de la tomate afin de supprimer l'induction de l'expression de certains gènes impliqués dans la défense, notamment des kinases impliquées dans les cascades de signalisation, et une peroxiredoxine impliquée dans la détoxification d'un FAO, l' H_2O_2 (Weiberg *et al.*, 2013). Aussi, ces petits ARN fongiques pourraient être considérés comme des effecteurs.

En réponse à l'infection, la plante produit également des protéines PR, avec un spectre d'action très large (cf II. 2. c. iv.). *B. cinerea*, est capable de produire des protéases, et plus particulièrement des protéases aspartiques, qui pourraient être capables de dégrader celles-ci. Movahedi et Heale (1990) ont montré que l'ajout d'un inhibiteur de protéases aspartiques, la pepstatine, à l'inoculum réduit drastiquement l'infection de la carotte par *B. cinerea*. Aussi, les protéases sécrétées par *B. cinerea* pourraient avoir un rôle important lors de l'infection, notamment en dégradant les protéines de défenses de la plante. Notre étude se basant sur cette hypothèse, nous nous intéresserons plus en détails aux différentes protéases sécrétées par *B. cinerea* dans la partie suivante.

4. Les protéases :

Les protéases représenteraient 2% des protéines produites chez tous les organismes, que ce soit les plantes, les animaux ou les micro-organismes (Chye *et al.*, 2006). Celles-ci sont impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques incluant une protéolyse tels que le « turnover » protéique, la maturation de protéines, la transduction du signal, la mort cellulaire programmée, le développement, ou encore les processus de symbiose (Gomes *et al.*, 2011 ; Volpicella *et al.*, 2011 ; Schaller *et al.*, 2012 ; Tsiatsiani *et al.*, 2012).

La classification fournie par la base de données MEROPS est de plus en plus utilisée au sein de la communauté scientifique (<http://merops.sanger.ac.uk>) (Rawlings *et al.*, 2012).

Cette base de données, régulièrement mise à jour, regroupe de nombreuses informations sur les protéases ainsi que leurs substrats (Rawlings, 2010). Ce site fournit une classification ainsi qu'une nomenclature pour les protéases.

Ainsi, les protéases sont actuellement divisées en 9 classes regroupées selon leur mécanisme catalytique. Les différentes classes de protéases sont les protéases aspartiques (A), les protéases à cystéine (C), les protéases glutamiques (G), les métalloprotéases (M), les protéases à asparagine (N), les mixed (P), les protéases à sérine (S), les protéases à thréonine (T) ainsi qu'une dernière nommée « unknown », comprenant les protéases sans site catalytique identifié (U).

Chaque classe comprend différentes familles. Une famille étant un ensemble de protéines homologues, identifiée par une lettre représentant le type catalytique des enzymes protéolytiques qu'il contient avec un numéro unique. Les protéases sont aussi réparties en clans, définis comme tel par MEROPS : « Un clan contient toutes les protéases qui sont apparues à partir d'une seule origine évolutive. Il contient une ou plusieurs familles possédant des relations évolutives du fait de leurs structures tertiaires similaires, ou lorsque ces structures ne sont pas disponibles, selon l'ordre des résidus du site catalytique présent et souvent selon les motifs encadrant ces sites catalytiques. »

D'après la base de données MEROPS, *B. cinerea* possède pas moins de 252 protéases réparties en 60 familles réunies en 7 classes. Il s'agit des protéases aspartiques, glutamiques, des protéases à cystéine, à sérine et à thréonine, ainsi que des métalloprotéases et des mixed.

Dans cette étude nous nous focaliserons sur les protéases sécrétées par le champignon. En effet, dans la perspective d'étudier le rôle des protéases fongiques dans la dégradation des protéines de défense de la plante, seules les protéases sécrétées sont prises en considération. L'analyse du génome de *B. cinerea* par Amselem *et al.*, (2011) a permis de s'intéresser aux protéases potentiellement sécrétées par le champignon en se basant sur la prédiction de la présence d'un peptide signal. Ainsi, *B. cinerea* serait capable de sécréter 49 protéases réparties en 19 familles réunies en 5 classes. Il s'agit des protéases aspartiques, glutamiques, des protéases à cystéine et à sérine ainsi que des métalloprotéases. Aussi, seules ces familles de protéases seront détaillées.

Pour chacune d'elles, nous présenterons un bref descriptif de la famille puis nous nous pencherons plus particulièrement sur les protéases de ces familles connues chez *B. cinerea*.

i. Les protéases aspartiques (A):

Chez les protéases aspartiques, les acides aminés essentiels à la catalyse sont deux aspartates. Il existe à ce jour 16 familles de protéases aspartiques selon MEROPS. La famille la plus représentée est celle de la pepsine (A1) (Rawlings et Barrett, 1993), elle est présente dans tout le règne vivant. La pepsine est la protéase majoritaire retrouvée dans l'estomac de tous les vertébrés. L'enzyme active est produite à partir de pepsinogène qui, par autocatalyse en présence d'acide hydrochlorique, va former la pepsine (Rao *et al.*, 1998). La grande majorité des protéases de cette famille est active à pH acide (Rao *et al.*, 1998) et a la particularité d'être inhibée par la pepstatine (Umezawa *et al.*, 1970 ; Davies, 1990).

D'après MEROPS, *B. cinerea* posséderait 24 protéases aspartiques réparties en trois familles. Les protéases aspartiques sécrétées par *B. cinerea* quant à elles font toutes partie de la famille A1 représentée par la pepsine (ten Have *et al.*, 2010 ; Amselem *et al.*, 2011). *B. cinerea* possède 13 protéases aspartiques sécrétées (ten Have *et al.*, 2010 ; Amselem *et al.*, 2011). Certaines seraient sécrétées dans le milieu extérieur (BcAP1, 5, 7, 8, 9 et 10), et d'autres seraient sécrétées mais resteraient attachées à la membrane plasmique (BcAp3, 4, 11 et 13) (ten Have *et al.*, 2004 ; ten Have *et al.*, 2010). Ces protéases sont produites sous forme de pro-peptides capables de se maturer en enzymes fonctionnelles à pH acide (ten have *et al.*, 2010 ; van Sluyter *et al.*, 2013), le pH optimal pour leur activité protéolytique (Manteau *et al.*, 2003). Un des membres de cette famille constitue à lui seul plus de 20 % des protéines sécrétées par le champignon dans différentes conditions de cultures, il s'agit de BcAp8 (ten Have *et al.*, 2010 ; Espino *et al.*, 2010). Celle-ci est retrouvée en grande quantité dans de nombreux sécrétomes réalisés dans différentes conditions. En effet, BcAp8 est produite dans des sécrétomes en présence de cellulose, pectine, amidon, glucose, paroi végétale de tomate (Fernandez-Acero *et al.*, 2010), d'extrait de fraise et d'arabette (Shah *et al.*, 2009) mais aussi en présence de métaux lourds comme le cadmium (Cherrad *et al.*, 2012). Elle est sécrétée par différentes souches de *B. cinerea* (González-Fernández *et al.*,

2013) et est très représentée dans des sécrétomes de *B. cinerea* à pH 4 mais elle est absente à pH 6 et 7 (Billon-Grand *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2012).

Un mutant de *B. cinerea* ne produisant plus BcAp8 possède une activité protéase aspartique réduite de 70 % mais n'est pas moins virulent que la souche sauvage (ten Have *et al.*, 2010). D'autres mutants ne produisant plus les protéases aspartiques 1 à 5 et des doubles mutants ne produisant plus deux d'entre elles n'ont montré aucune perte de virulence (ten Have *et al.*, 2010).

Très récemment, il a été montré que la protéase BcAp8, produite de façon hétérologue en levure *Pichia pastoris*, dégrade une chitinase de vigne présente dans le vin, chitinase réputée résistante à la dégradation (van Sluyter *et al.*, 2013).

ii. Les protéases à sérine (S) :

Les protéases à sérine, pour la plupart, comportent dans leur site actif trois résidus essentiels à la catalyse, il s'agit d'une sérine, d'une histidine et d'un aspartate (Rawlings et Barrett, 1993). Ces trois acides aminés forment la triade catalytique. Les protéases à sérine sont organisées en 53 familles selon MEROPS. Les deux familles les plus représentées sont celles de la chymotrypsine et de la trypsine (S1) et celle de la subtilisine (S8) (Rao *et al.*, 1998). Les protéases à sérine sont présentes aussi bien chez les bactéries, les archae, les champignons, les plantes, les animaux et les virus (Hedstrom, 2002). La trypsine et la chymotrypsine sont des enzymes digestives responsables de l'hydrolyse des protéines alimentaires (Rao *et al.*, 1998).

D'après MEROPS, *B. cinerea* posséderait 65 protéases à sérine regroupées en 13 familles. L'étude de son génome montre que seulement 23 protéases regroupées en 9 familles seraient susceptibles d'être sécrétées (Amselem *et al.*, 2011).

Les plus souvent rencontrées dans les études protéomiques de sécrétomes de *B. cinerea* sont les protéases à sérine de type subtilisine (S8) et sedolisine (S53) (Shah *et al.*, 2008 ; Espino *et al.*, 2010 ; Fernández-Acero *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2012). Ces deux familles sont regroupées au sein du même clan selon la base de données MEROPS, le clan des subtilases. Ces deux familles dériveraient donc d'un ancêtre commun (Siezen *et al.*, 2007).

Néanmoins, il est à noter que toutes les bases de données ne différencient pas systématiquement ces deux familles de protéases. En effet, les bases de données Pfam, Interpro, UniProt et PROSITE identifient les sedolisines de *B. cinerea* en tant que subtilisine.

Les subtilisines (S8) sont caractérisées par leur triade catalytique composée d'un aspartate, d'une histidine et d'une sérine (Asp-His-Ser). Les membres de cette famille sont actifs de pH neutre à alcalin (Siezen *et al.*, 2007).

Les sedolisines (S53) possèdent une triade catalytique différente, composée d'un acide glutamique, d'un aspartate et d'une sérine (Glu-Asp-Ser). Contrairement aux subtilisines, les membres de cette famille sont actifs à pH acide (Siezen *et al.*, 2007 ; Oda, 2012).

Ainsi, suivant l'environnement dans lequel va évoluer le champignon, il ne sécrètera pas les mêmes familles de protéases à sérine. La comparaison de sécrétomes de *B. cinerea* cultivé avec différents extraits végétaux montre que les protéases acides dont des sedolisines et les subtilisines ne sont pas retrouvées dans les mêmes sécrétomes (Shah *et al.*, 2008). Les protéases acides sont présentes dans le sécrétome additionné de feuilles d'arabettes alors que les subtilisines sont retrouvées dans le sécrétome additionné de fraise (Shah *et al.*, 2008). La comparaison de protéines sécrétées par *B. cinerea* en fonction du pH a montré qu'à pH4, celui-ci produit principalement des protéases acides dont des sedolisines, alors qu'à pH6 il sécrète des subtilisines (Li *et al.*, 2012).

Lors de l'infection de cotylédons de tournesol par *B. cinerea*, l'expression d'une subtilisine (*BcSer1*) est induite en fin d'infection lorsque le pH atteint la neutralité. Au contraire, l'expression d'une sedolisine est induite quand le pH est au plus bas et diminue lorsque celui-ci augmente (Billon-Grand *et al.*, 2011).

iii. Les protéases à cystéine (C):

Ces protéases comportent dans leur site actif deux acides aminés essentiels à la catalyse, il s'agit d'une cystéine et d'une histidine (Rao *et al.*, 1998). Selon MEROPS, il y a actuellement 78 familles de protéases à cystéine. Les familles les plus étudiées sont celles de la Papaine (C1) et des Caspases (C14). Les caspases sont notamment connues pour leur rôle déterminant lors de l'apoptose (Cohen, 1997). Les protéases à cystéine sont présentes aussi

bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes (Beers *et al.*, 2004). Le pH optimal de la plupart des membres est un pH neutre (Rao *et al.*, 1998).

D'après MEROPS, *B. cinerea* posséderait 78 protéases à cystéine regroupées en 16 familles. L'étude de son génome montre qu'une seule de ces protéases à cystéine serait susceptible d'être sécrétée (Amselem *et al.*, 2011). Cependant, cette protéase n'a, à ce jour, jamais été retrouvée lors des différentes études protéomiques réalisées sur des sécrétomes de *B. cinerea* (Shah *et al.*, 2009a ; Shah *et al.*, 2009b ; Espino *et al.*, 2010 ; Fernández-Acero *et al.*, 2010 ; Cherrad *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2012 ; González-Fernández *et al.*, 2013). De plus, à notre connaissance, aucune étude n'a révélé la présence d'une protéase à cystéine lors de l'interaction plante/ *B. cinerea*.

iv. Les protéases glutamiques (G):

Ces protéases sont aussi nommées **Eqolisines** d'après les acides aminés présents dans leur site catalytique, le glutamate (**E**) et la glutamine (**Q**) (Sims *et al.*, 2004 ; Kataoka *et al.*, 2005 ; Oda, 2012). Selon MEROPS, il y a actuellement 2 familles de protéases glutamiques. Tout comme les protéases aspartiques citées précédemment, elles sont actives à pH acide, mais sont insensibles à la pepstatine (Kataoka *et al.*, 2005). La plupart des membres de cette famille sont présents principalement chez les champignons filamenteux phytopathogènes de type Ascomycètes tels que *B. cinerea* et *S. sclerotiorum* (Sims *et al.*, 2004 ; Oda *et al.*, 2012). Le premier membre de cette famille, la scyalidopepsine, a été identifié chez le champignon lignivore *Scytalidium lignicolum* (Murao *et al.*, 1972). C'est pourquoi la fonction biologique des membres de cette famille est corrélée à la dégradation des protéines contenues dans le bois (Oda, 2012).

D'après MEROPS, *B. cinerea* posséderait 4 protéases glutamiques faisant toutes parties de la même famille, la famille G1. Cependant, seulement deux d'entre elles seraient potentiellement sécrétées (Amselem *et al.*, 2011).

Un gène codant une protéase glutamique, *Ssacp1*, a été identifié chez *S. sclerotiorum* (Poussereau *et al.*, 2001). Il a été montré que l'expression de cette protéase est induite au cours de l'infection de cotylédons de tournesol par *S. sclerotiorum*. De plus, cette expression ne serait induite qu'à un pH inférieur à 5, c'est-à-dire au pH optimal pour son activité

(Poussereau *et al.*, 2001). Cette même étude a également montré que son expression serait inhibée par le glucose et l'azote mais induite par des extraits végétaux. Un mutant de *B. cinerea* contenant le gène codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur du gène *Ssacp1* de *S. sclerotiorum* a été réalisé par agro-transformation (Rolland *et al.*, 2003). L'analyse de ce mutant a confirmé que *Ssacp1* ne s'exprime qu'à pH acide, sans source d'azote et que la présence de tissus végétaux induit la production de la protéine.

Chez *B. cinerea*, un gène codant une protéase glutamique, *BcAcp1*, a également été identifié (Rolland *et al.*, 2009). Celui-ci s'exprime lors de l'infection de la pomme et son expression n'est induite qu'en conditions acides (Rolland *et al.*, 2009). Cette même étude montre que cette protéine, d'abord produite sous forme de pro-enzyme de 35 kDa, serait maturée en une protéine fonctionnelle de 28 kDa à pH acide (Rolland *et al.*, 2009). Cette protéase est également exprimée lors de l'infection de cotylédons de tournesol mais celle-ci est réprimée dès que le pH atteint la neutralité (Billon-Grand *et al.*, 2011).

Cette protéine BcAcp1 a été identifiée dans des sécrétomes de *B. cinerea* réalisés en présence de glucose, d'extrait de tomate ou de kiwi (Espino *et al.*, 2010).

v. Les métalloprotéases (M) :

Les membres de cette famille ne possèdent pas de site catalytique défini. Ils sont caractérisés par la présence obligatoire d'un ion métallique divalent nécessaire à leur activité (Rao *et al.*, 1998). Selon MEROPS, 69 familles de métalloprotéases sont connues à travers tout le règne vivant.

D'après MEROPS, *B. cinerea* posséderait 88 métalloprotéases regroupées en 23 familles. L'étude de son génome montre que 9 de ces métalloprotéases, regroupées en 7 familles, seraient susceptibles d'être sécrétées (Amselem *et al.*, 2011). Une étude protéomique, visant à étudier les protéines sécrétées par *B. cinerea* en présence de différents métaux lourds, a montré que des métalloprotéases sont exprimées en présence de cuivre et de zinc (Cherrad *et al.*, 2012). Les auteurs suggèrent que ces enzymes pourraient avoir un rôle protecteur contre la toxicité des métaux lourds par leur capacité à piéger ceux-ci (Cherrad *et al.*, 2012).

Diverses études montrent également la présence de métalloprotéases dans des sécrétomes de *B. cinerea*, cultivé notamment en présence de glucose, d'extraits de tomate et de kiwi (Espino *et al.*, 2010), à pH4 et à pH6 (Li *et al.*, 2012) mais aussi en présence d'un extrait de paroi végétale de tomate (Fernández-Acero *et al.*, 2010). Cependant, à ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à ces protéases lors d'une interaction plante/ *B. cinerea*.

5. Méthodes de lutte contre *B. cinerea* chez la vigne :

Grâce à toutes ces « armes », *B. cinerea* provoque de nombreux dégâts sur les récoltes. Aussi, pour limiter le développement de la maladie, les viticulteurs combinent l'action de mesures préventives à celles de produits phytosanitaires. Les mesures prophylactiques ont pour objectif de prévenir l'apparition ou la propagation des maladies. Parmi celles-ci sont retrouvées la maîtrise de l'apport en azote, le contrôle de l'enherbement ou encore l'effeuillage. Ces paramètres peuvent en effet agir sur l'apparition des maladies dont la pourriture grise. Ces mesures peuvent être suffisantes dans les parcelles où le risque est faible. Cependant, dans des zones géographiques favorables au développement de la maladie comme en Champagne, l'utilisation de produits phytosanitaires est nécessaire. Leur application est généralement recommandée à la fin de la floraison (BBCH69), pour empêcher l'installation du champignon au niveau des capuchons floraux, à la fermeture de la grappe (BBCH77) mais aussi à la véraison (BBCH81) (Viret *et al.*, 2010). Cependant l'utilisation massive de ces produits provoque des phénomènes de résistance chez le champignon (Leroux *et al.*, 2007). Pour limiter ce problème, les applications de différentes matières actives sont alternées et le nombre de traitements est réduit à un ou deux par an. Mais ce phénomène de résistance chez le champignon n'est pas le seul problème. En effet, ceux-ci sont souvent néfastes pour l'environnement (Bony *et al.*, 2008) mais aussi pour la santé humaine. Ils ont aussi une incidence sur la physiologie de la vigne elle-même (Petit *et al.*, 2009) et ne sont pas toujours suffisants pour empêcher le développement de la maladie. Des méthodes complémentaires ou alternatives, plus respectueuses de l'environnement et de la santé humaine, doivent donc être développées. Parmi celles-ci, des méthodes basées sur la stimulation des défenses naturelles de la vigne sont à l'étude.

Les défenses naturelles des plantes peuvent en effet être stimulées par l'application d'éliciteurs ou SDN (Stimulateurs de Défenses Naturelles). Ces produits vont agir tel un « vaccin » pour stimuler les défenses avant l'arrivée de la maladie. A ce jour, des résultats encourageants sont obtenus en laboratoire (Sanchez *et al.*, 2012). Néanmoins, la transposition de ces techniques au vignoble s'est révélée décevante.

La lutte biologique quant à elle nécessite l'utilisation d'organismes qui vont agir directement contre les agents pathogènes et/ou stimuler les défenses naturelles de la plante. Cette approche est prometteuse pour lutter contre les infections fongiques. L'utilisation de bactéries telles que *Burkholderia* (Ait Barka *et al.*, 2002), *Acenitobacter*, *Pantoea* et *Pseudomonas* (Magnin-Robert *et al.*, 2007) induit l'expression de nombreux gènes de défense de la plante et accroît la résistance de la vigne contre des agents pathogènes fongiques dont *B. cinerea*.

Cependant, l'utilisation de ces moyens de lutte alternatifs à la lutte chimique nécessite de mieux comprendre les mécanismes de défense des plantes afin de cibler les défenses efficaces contre *B. cinerea*.

II. Les défenses des plantes :

Les plantes sont constamment en contact avec de nombreux agents pathogènes et ravageurs tels que des bactéries, des champignons, des virus, des nématodes ou encore des insectes. Pour s'en protéger, elles disposent de défenses préformées mais peuvent aussi induire des défenses en réponse à l'agression. Les nombreuses études réalisées à ce jour ont montré la complexité de la mise en place des défenses des plantes (Pieterse *et al.*, 2009 ; Thomma *et al.*, 2011). Cette synthèse bibliographique n'en présentera donc qu'un schéma global, en prenant comme exemple, dans la mesure du possible, l'interaction entre la vigne et *Botrytis cinerea*. Une première partie présentera les défenses préformées de la plante et une seconde présentera les défenses induites suite à l'infection.

1. Défenses préformées :

Les plantes possèdent des défenses dites préformées ou passives qui forment les premiers remparts face aux attaques des agents phytopathogènes ou des ravageurs. Elles comprennent des barrières physiques et des barrières chimiques.

Au sein des barrières physiques, la première est la cuticule. Celle-ci est une fine membrane composée de cutine et de cires. Elle forme une barrière hydrophobe entre la plante et le milieu extérieur, contrôlant ainsi la perte d'eau de la plante (Riederer et Schreiber, 2001). Elle est aussi la première défense à laquelle les pathogènes vont être confrontés (Kolattukudy, 1985). En effet, pour pouvoir atteindre les cellules végétales, ceux-ci vont devoir préalablement traverser cette cuticule. L'altération de celle-ci au niveau d'une blessure facilite alors leur entrée. Il a été observé ainsi que l'entrée des pathogènes dans la plante se faisait généralement par une blessure (Kolattukudy, 1985).

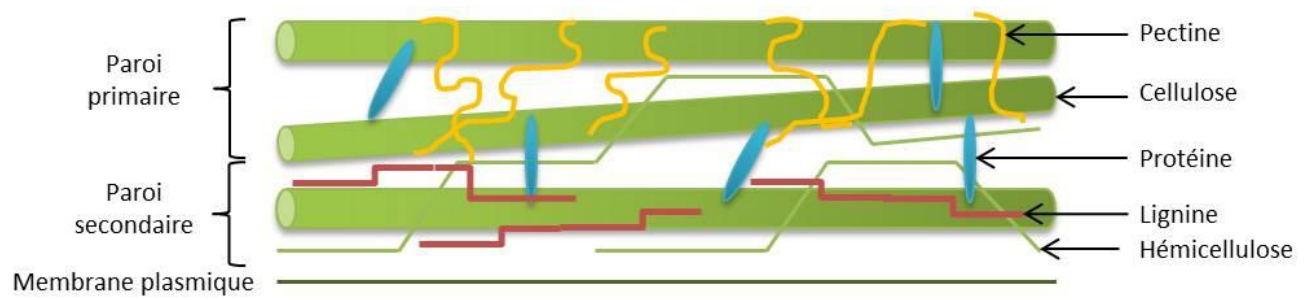


Figure 4 : Représentation schématique de la paroi d'une cellule végétale.

La seconde barrière physique est la paroi pectocellulosique. Celle-ci est composée d'un réseau complexe de polymères polysaccharidiques tels que la cellulose, l'hémicellulose et les pectines, mais aussi de lignine et de protéines (Figure 4) (Heredia *et al.*, 1995). L'analyse de sa structure permet de distinguer deux parties principales se formant successivement, la paroi primaire et la paroi secondaire. Cette structure complexe et semi-rigide encercle la membrane plasmique. Elle permet à la cellule de résister à des pressions internes et / ou externes, et représente une barrière structurelle contre les agents pathogènes (Heredia *et al.*, 1995).

Les barrières chimiques quant à elles, comprennent de divers composés antimicrobiens faisant également partie des défenses constitutives. Une grande variété de molécules, issues notamment du métabolisme secondaire et possédant des propriétés antibiotiques, constitue les phytoanticipines (van Etten *et al.*, 1994). Chez la vigne, le resvératrol, présent de manière constitutive dans plusieurs organes tels que les racines, les rameaux ou les baies (Langcake et Pryce, 1976 ; Bavaresco *et al.*, 1999) mais aussi inductible (cf. 2. c. 2.), est capable à lui seul de limiter la germination et la croissance mycélienne de *B. cinerea* (Adrian *et al.*, 1997 ; Coutos-Thévenot *et al.*, 2001 ; Adrian et Jeandet, 2012).

2. Défenses inductibles :

La mise en place des défenses induites lors de l'attaque d'un agent pathogène nécessite la perception de ce stress et la transmission de l'information via des voies de signalisation. Le signal de l'agression est alors transmis à la machinerie cellulaire qui va, *via* un ensemble d'événements précoces et tardifs, aboutir à la mise en place des réponses de défense (Figure 5). Nous allons décrire ces événements de manière globale et les illustrer, dans la mesure du possible, avec des exemples sur la vigne et *B. cinerea*.

a. Perception de l'agression :

Les plantes, comme les animaux, sont capables de percevoir et de reconnaître le non-soi et le soi modifié. Cette reconnaissance induit la mise en place des mécanismes de défense (Jones et Dangl, 2006), et définit l'immunité.

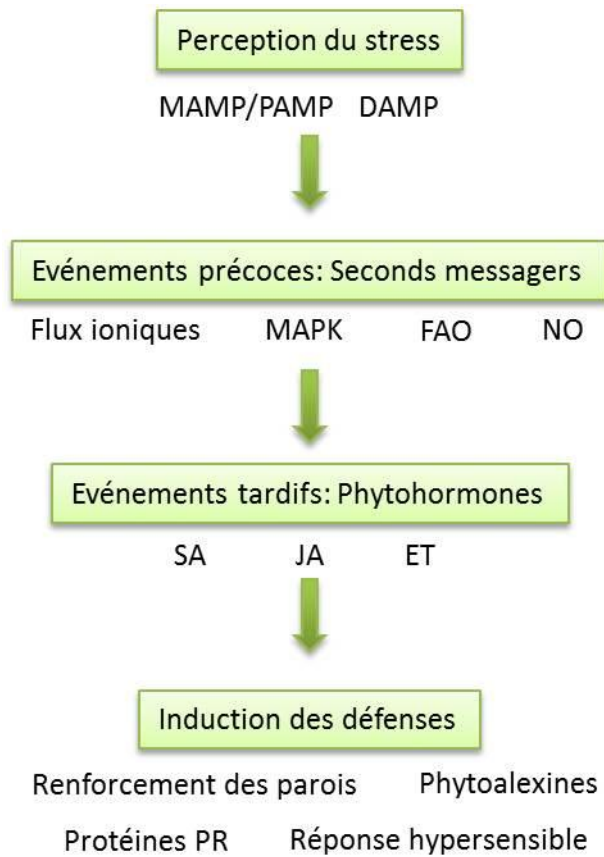


Figure 5: Principaux événements caractérisant la mise en place des défenses des plantes.

MAMP : Microbial Associated Molecular Patterns; PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns; DAMP: Damaged-Associated Molecular Patterns; MAPK: Mitogen-Associated Protein Kinase; FAO: Formes Actives de l'oxygène; NO: Monoxyde d'azote; SA: Acide Salicylique; JA: Acide Jasmonique; ET: Ethylène.

La perception de l'agression par un agent pathogène est généralement initiée par l'interaction d'une molécule avec un récepteur membranaire. Ces récepteurs, aussi appelés Pattern-Recognition Receptors (PRR), reconnaissent des motifs moléculaires issus des agents pathogènes, les Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP). Cependant le terme Microbial Associated Molecular Patterns (MAMP) lui est aujourd'hui préféré car des motifs moléculaires similaires existent également chez les micro-organismes non pathogènes (Mackey et McFall, 2006). L'interaction entre le récepteur membranaire et le PAMP/MAMP va déclencher la PAMP/MAMP-Triggered Immunity (PTI), une première réponse immune générale (Figure 6 a ; Jones et Dangl, 2006 ; Boller et Felix, 2009 ; Pieterse *et al.*, 2009). Il s'agit ici de la reconnaissance du non-soi par la plante.

La nature de ces MAMP est variée. Il peut s'agir de glycoprotéines comme l'endopolygalacturonase 1 de *B. cinerea* (Poinssot *et al.*, 2003), d'oligosaccharides (Rabea *et al.*, 2003) ou de lipides (Zeidler *et al.*, 2004 ; Varnier *et al.*, 2009). Ils peuvent provenir de la paroi des champignons comme l'ergostérol ou les sphingolipides (Umemura *et al.*, 2004 ; Lyon, 2007 ; Zhang *et al.*, 2010) ou encore de celle des bactéries comme les lipopeptides (Ongena *et al.*, 2007).

La PTI peut également être déclenchée par des molécules endogènes modifiées par l'attaque d'un agent pathogène. Elles sont appelées Damaged-Associated Molecular Patterns (DAMP). Il peut s'agir par exemple d'oligogalacturonides ou de cellulose issus de la dégradation de la paroi végétale par le pathogène (Boller et Felix, 2009). Il s'agit donc de la reconnaissance du soi modifié par la plante.

Cependant, certains agents pathogènes sont capables de contourner cette PTI en produisant des effecteurs qui vont inactiver les récepteurs membranaires ou bloquer la transmission du signal en aval (Jones et Dangl, 2006). Dans ce cas, les réponses de défense sont bloquées et la maladie se développe. On dit alors que la plante est en état d'Effector-Triggered Susceptibility (ETS), elle est donc sensible à l'agent pathogène (Figure 6 b). La plante est néanmoins capable de percevoir les effecteurs de l'agent pathogène et peut alors mettre en place une seconde vague d'immunité appelée Effector-Triggered Immunity (ETI), lui permettant ainsi de ne pas développer la maladie (Figure 6 c).

Comme cité précédemment (cf. I.3.c.), il a été montré que *B. cinerea* est capable de produire des petits ARN capables de supprimer l'expression de certains gènes impliqués

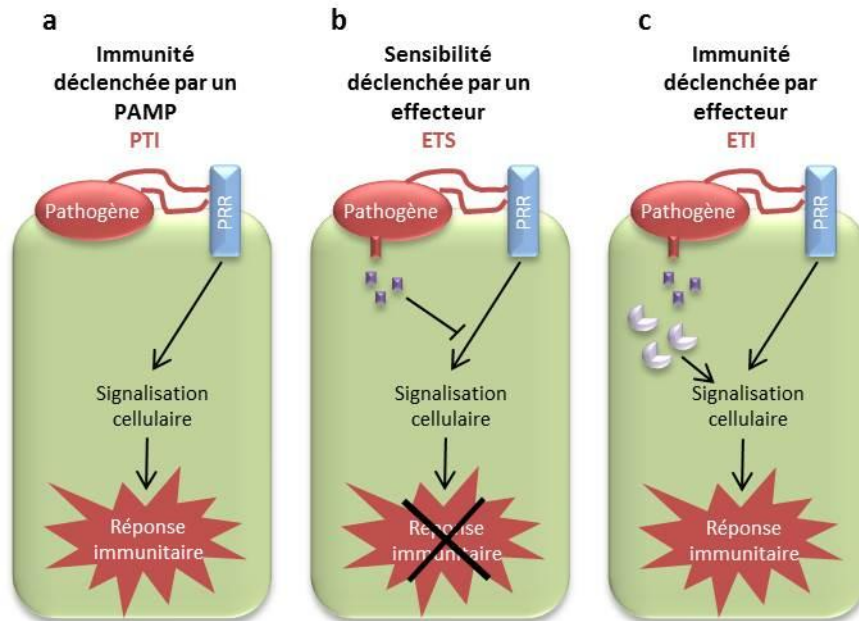


Figure 6: Représentation schématique simplifiée du système de réponse immunitaire chez les plantes (modifié d'après Pieterse *et al.*, 2009).

a : Au cours de l'infection, les PAMP/MAMP/DAMP sont reconnus par les récepteurs membranaires (PRR) de la plante ce qui va conduire à l'activation de cascades de signalisation conduisant à une première immunité appelée PTI (PAMP-Triggered Immunity) ; **b** : L'agent pathogène va produire des effecteurs (carrés violets) qui vont inactiver les récepteurs membranaires ou bloquer la transmission du signal en aval et donc supprimer la PTI, ce qui va conduire à l'état d'ETS (Effector-Triggered Susceptibility) ; **c** : Les effecteurs du pathogène sont reconnus par la plante ce qui conduit à une seconde vague d'immunité appelée ETI (Effector-Triggered Immunity).

dans la cascade de signalisation de l'arabette et de la tomate (Weiberg *et al.*, 2013). Ces petits ARN fongiques pourraient donc être considérés comme des effecteurs.

b. Transmission du signal :

Suite à la perception de l'agent pathogène par la plante, des événements de signalisation sont activés au niveau local et systémique. Ils peuvent être divisés en deux catégories, les événements précoces et les événements tardifs. Ces événements complexes peuvent varier en fonction du modèle d'étude et leur répartition en deux catégories n'est pas toujours évidente.

1. Les événements précoces :

Les événements précoces les plus couramment étudiés sont les flux ioniques, la phosphorylation des protéines ainsi que la production de formes activées de l'oxygène (FAO) et de monoxyde d'azote (NO).

a. Les flux ioniques :

La perception d'un stress est suivie par l'activation de canaux membranaires, engendrant des flux ioniques essentiels à la mise en place des réponses de défense. Parmi ces flux ioniques, l'élévation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} peut être détectée quelques secondes seulement après l'application d'un stress, suite à l'ouverture de canaux calciques (Kudla *et al.*, 2010 ; Dodd *et al.*, 2011). Ce flux de Ca^{2+} provient d'un influx depuis le milieu extracellulaire et d'un efflux à partir des réservoirs internes comme la vacuole et le réticulum endoplasmique (White et Broadley, 2003). Cette variation calcique est une étape très importante dans la signalisation cellulaire et semble indispensable à l'induction des réponses de défense (Tavernier *et al.*, 1995 ; Faurie *et al.*, 2009). Chez le tabac, une élévation de la concentration calcique intracellulaire est retrouvée en réponse à un éliciteur, la cryptogéine (Lecourieux *et al.*, 2002 ; Garcia-Brugger *et al.*, 2006). De la même façon chez la vigne, suite à la perception de l'endopolygalacturonase 1 de *B. cinerea*, une élévation de la concentration calcique intracellulaire est également retrouvée (Vendelle *et al.*, 2006). Ces signaux calciques seraient décodés par des protéines dites senseurs telles que la

calmoduline ou les CDPK (Calcium-Dependent Protein Kinase) (Kudla *et al.*, 2010 ; Dodd *et al.*, 2011 ; Hashimoto et Kudla, 2011).

b. La phosphorylation de protéines : les MAPK

Les MAPK jouent un rôle essentiel dans les réponses de défense des plantes en tant que voie de transmission du signal des récepteurs membranaires vers le noyau (Pitzschke *et al.*, 2009). Celles-ci vont activer des facteurs de transcription qui, une fois dans le noyau, vont pouvoir modifier l'expression de gènes de défense impliqués dans la synthèse de protéines PR, de phytoalexines ou encore dans le développement de la HR (Hypersensitive Response) (Pitzschke *et al.*, 2009).

Chez la vigne, il a été montré que deux MAPK sont activées suite à l'élévation par la laminarine (Aziz *et al.*, 2003), une endopolygalacturonase de *B. cinerea* (Poinssot *et al.*, 2003) ou encore des rhamnolipides (Varnier *et al.*, 2009).

c. Les formes activées de l'oxygène :

La production de formes activées de l'oxygène (FAO) résulte de la consommation de l'oxygène moléculaire. L'accumulation rapide de FAO dans les cellules constitue le « burst oxydatif ». Celui-ci est mis en place suite à la perception de l'agent pathogène et constitue l'une des premières réponses cellulaires. Il fait intervenir trois formes principales de FAO : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^-) ainsi que le radical hydroxyle ($HO^\cdot$) (Lamb et Dixon, 1997 ; Scandalios, 2005). Les FAO interviennent notamment dans l'induction de réponses de défense telles que la synthèse de protéines PR ou de phytoalexines (Mehdy, 1994 ; Green et Fluhr, 1995 ; Tenhaken *et al.*, 1995 ; Appel et Hirt, 2004 ; Aziz *et al.*, 2004). De plus, en raison de leur effet cytotoxique, les FAO peuvent agir directement contre les agents pathogènes (Mehdy, 1994 ; Lamb et Dixon, 1997). Cependant, chez le tabac, il a été montré que les FAO favoriseraient l'expansion des lésions causées par l'infection par *B. cinerea* (Asai et Yoshioka, 2009).

d. Le monoxyde d'azote (NO):

Le NO joue également un rôle important dans la mise en place des réponses de défense. En effet, celui-ci participe à l'élévation de la concentration de calcium cytosolique

(Lamotte *et al.*, 2004 ; Garcia-Brugger *et al.*, 2006 ; Lamotte *et al.*, 2006), à l'expression de gènes de défense (Parani *et al.*, 2004 ; Grün *et al.*, 2006) mais aussi à la mise en place de la HR (Lamotte *et al.*, 2004). Chez le tabac, il a été montré que le NO joue un rôle important dans la résistance de la plante face à *B. cinerea* (Asai et Yoshioka, 2009).

2. Les événements tardifs : la signalisation hormonale

A la suite des événements précoces se mettent en place des événements tardifs dans lesquels la signalisation hormonale joue un rôle majeur. Les hormones participent à la propagation du signal d'alerte de l'agression dans toute la plante. La mise en place à la fois d'une réponse locale et d'une réponse systémique nécessite la diffusion de signaux du point de l'infection jusqu'aux tissus sains. Les réponses locales comprennent la HR (cf : II. 2. c. 3.) et la LAR (Local Acquired Resistance) (Ross, 1961a). Les réponses systémiques correspondent quant à elles, à la SAR (Systemic Acquired Resistance) (Ross, 1961b ; Dorey *et al.*, 1997). Les hormones les plus impliquées lors de stress biotiques sont l'acide salicylique (SA : Salicylic Acid), l'acide jasmonique (JA : Jasmonic Acid) et l'éthylène (ET). Seules ces trois hormones seront présentées ici. Cependant d'autres hormones sont aussi impliquées dans les voies de signalisation des plantes comme l'acide abscissique, l'acide gibbérellique, les cytokinines, les auxines et les brassinostéroïdes (Bari et Jones, 2009).

L'**acide salicylique** est synthétisé par la voie de la Phénylalanine-Ammonia Lyase ou encore celle de l'Iso-Chorismate Synthase. Il intervient dans la mise en place d'une réponse systémique ou SAR (Grant et Lamb, 2006) mais peut aussi intervenir au niveau local. La seule application de SA au niveau des feuilles suffit à déclencher la SAR (Grant et Lamb, 2006). Cependant, le SA ne représente pas le signal mobile (Maier *et al.*, 2011). Des études réalisées sur le tabac et l'arabette montrent que le salicylate de méthyle (MeSA : Methyl Salicylate), obtenu à partir de la SA methyl transferase, pourrait jouer ce rôle (Park *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2011). Le MeSA serait ensuite converti en SA par une méthyle salicylate estérase, ce qui activerait les réponses de défense systémiques au niveau des feuilles (Park *et al.*, 2007 ; Heil

et Ton, 2008 ; Park *et al.*, 2009). Le SA est capable d'induire l'accumulation de protéines de défense (Ryals *et al.*, 1996 ; Sels *et al.*, 2008) permettant ainsi une meilleure résistance des plantes à de nombreux agents pathogènes. L'importance de cette hormone dans la défense a été confirmée à l'aide de mutants d'arabette ou de tabacs incapables d'accumuler le SA et/ou de le percevoir (Vernooij *et al.*, 1994 ; Lawton *et al.*, 1995). Bien que le SA soit communément associé à son efficacité dans les réponses de défense contre les agents pathogènes biotrophes, il peut aussi intervenir dans la lutte contre les agents pathogènes nécrotrophes. Chez la vigne et l'arabette, une application exogène de BTH (Benzo Thiadiazole), un analogue du SA, permet d'augmenter la résistance à *B. cinerea* (Zimmerli *et al.*, 2001 ; Iriti *et al.*, 2004).

L'**acide jasmonique** est synthétisé par la voie des octadécanoïdes à partir de l'acide linoléique et peut être méthylé par la JA-carboxyl methyl transferase en méthyle jasmonate (MeJA : Methyl Jasmonate) (Browse, 2009). Une application exogène de JA ou MeJA peut induire l'accumulation de métabolites secondaires mais aussi de protéines de défense telles que des protéines PR (Gundlach *et al.*, 1992 ; Van der Fits et Memelink, 2000 ; Devoto et Turner, 2003 ; Repka *et al.*, 2004 ; Belhadj *et al.*, 2008 ; Faurie *et al.*, 2009). Le JA est régulièrement associé à la blessure mais aussi à la défense contre les insectes et les agents pathogènes nécrotrophes (Gatehouse, 2002 ; Glazebrook, 2005 ; Bari et Jones, 2009 ; Rowe *et al.*, 2010 ; Lomate et Hirvale, 2012). Des études ont montré que des mutants d'arabette, incapables de l'accumuler et/ou de le percevoir, sont plus sensibles aux attaques d'agents pathogènes dont *B. cinerea* (Thomma *et al.*, 1998 ; Vijayan *et al.*, 1998). A l'inverse, l'accumulation de MeJA chez l'arabette par la surexpression de la JA-carboxyl methyl transferase se traduit par une meilleure résistance à *B. cinerea* (Seo *et al.*, 2001). Cependant il peut également intervenir dans la lutte contre des agents pathogènes biotrophes. L'application de MeJA sur des feuilles de vigne augmente leur résistance à *Erysiphe necator* (Belhadj *et al.*, 2006).

L'**éthylène** est un alcène volatile dont la biosynthèse fait intervenir la conversion de la méthionine en S-adénosyl-L-méthionine par l'adénosyltransférase, puis en 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) par l'ACC synthase et enfin en éthylène par l'action de l'ACC oxydase (Bleecker et Kinde, 2000). L'éthylène est régulièrement associé à la défense contre les agents pathogènes nécrotrophes en association avec le JA (Glazebrook, 2005 ; Bari

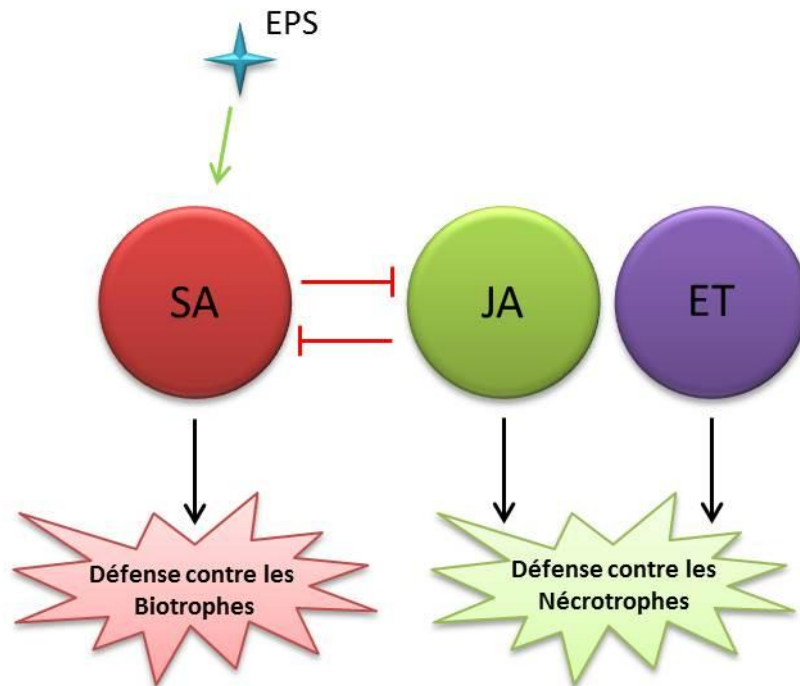


Figure 7: Interactions entre les voies de signalisation.

L'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) sont classiquement liés à la résistance contre les nécrotrophes et l'acide salicylique (SA) à la résistance contre les biotrophes. Des molécules comme l'exopolysaccharide (EPS) de *B. cinerea*, peuvent perturber cet équilibre hormonal au sein de la plante. Modifié d'après El Oirdi *et al.*, 2011.

et Jones, 2009). Des études réalisées sur des mutants d'arabette incapables de percevoir l'éthylène ont montré que ces derniers possédaient une sensibilité accrue à plusieurs agents pathogènes dont *B. cinerea* (Thomma *et al.*, 1999). Cependant il a été montré que l'application d'éthylène sur des feuilles de vigne induit une protection contre le champignon biotrophe *Erysiphe necator*. Cette protection s'accompagne de l'induction de nombreux gènes de défense ainsi que de la biosynthèse de phytoalexines (Belhadj *et al.*, 2008). Aussi, l'implication de l'éthylène vis-à-vis des agents biotrophes ou nécrotrophes n'est pas clairement établie.

L'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène régulent les réponses de défense de la plante par des interactions synergiques ou antagonistes pour conduire à la mise en place de défenses spécifiques (Glazebrook, 2005 ; Bari et Jones, 2009 ; Pieterse *et al.*, 2009). Les réponses de défense induites par le SA sont généralement associées à une résistance aux agents pathogènes biotrophes et les réponses de défense induites par le JA et l'éthylène sont plutôt associées à la résistance aux agents pathogènes nécrotrophes (Glazebrook, 2005 ; Bari et Jones, 2009). L'éthylène agirait en effet en synergie avec le JA (Xu *et al.*, 1994). Inversement, le SA agirait de manière antagoniste sur la voie du JA. Chez la tomate, il a été ainsi montré que *B. cinerea* est capable de sécréter un exopolysaccharide (EPS) qui induit la voie du SA. Par antagonisme, le SA réprime la voie du JA ce qui entraîne la répression des gènes dépendants du JA et de ce fait, une perte d'efficacité des défenses mises en place par la tomate contre l'agent pathogène nécrotrophe *B. cinerea* (El Oirdi *et al.*, 2011) (Figure 7).

Cependant, à ce jour, aucun modèle généraliste ne peut être établi. En effet, l'implication des hormones dans la mise en place du signal de défense diffère selon le modèle plante/ pathogène (Bari et Jones, 2009).

c. Les défenses induites :

Une fois les signaux précoces transmis et relayés par voie hormonale, la plante met en place des réponses de défense plus ou moins spécifiques du stress auquel elle se trouve confrontée. Celles-ci sont complexes et dépendent de la plante et de l'agent pathogène. Les

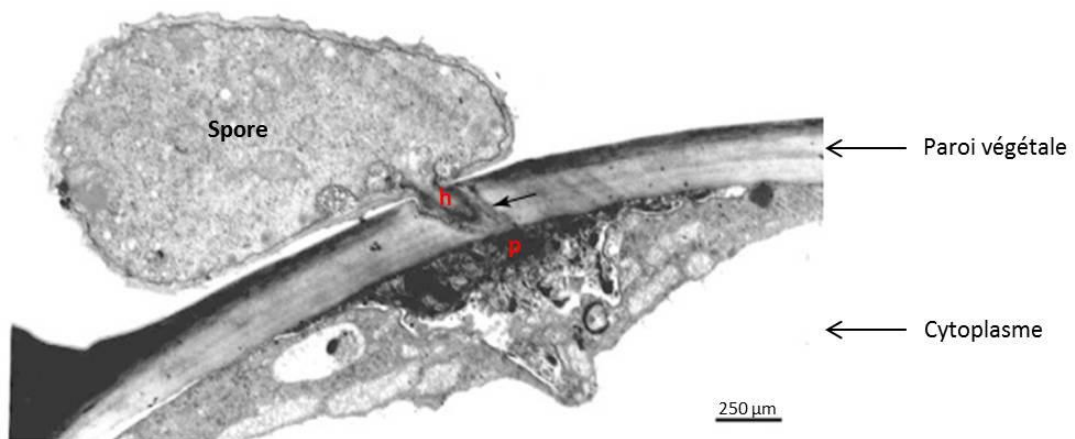


Figure 8: Formation de la papille au cours de la pénétration d'un hyphe de *Blumeria graminis* dans une cellule d'orge (modifiée d'après Vorwerk *et al.*, 2004). La paroi végétale est dégradée (flèche noire) suite à la pénétration de l'hyphe du champignon (h). Sous la paroi se forme un épaissement pariétal nommé papille (p). Photo réalisée au microscope électronique à transmission.

plus étudiées sont le renforcement des parois, la production de phytoalexines, la réponse hypersensible et la production de protéines PR.

1. Le renforcement des parois :

Comme vu précédemment, la paroi pectocellulosique est l'une des premières barrières physiques rencontrées par le pathogène. Celle-ci peut être modifiée afin de devenir plus résistante à la dégradation et à la pénétration des microorganismes nuisibles (Bechinger *et al.*, 1999 ; Hüchelhoven, 2007). L'une de ces modifications est la formation d'une papille correspondant à un épaissement localisé de la paroi (Figure 8). Cette papille va se développer au niveau de la zone de pénétration de l'hyphe fongique. Elle se compose principalement de callose, de cellulose et de lignine (Pearce, 1996 ; Hüchelhoven, 2007). La paroi peut aussi se charger en lignine ce qui la rend plus résistante à la pénétration et à la dégradation mais permet aussi de réduire la diffusion des enzymes et des toxines de l'agent pathogène (Heredia *et al.*, 1995). Chez la vigne, l'accumulation de callose a été observée après un traitement par le BABA (Acide β -aminobutyrique) et participe à sa résistance vis-à-vis de *Plasmopara viticola* (Hamiduzzaman *et al.*, 2005).

2. La production de phytoalexines :

Les phytoalexines sont définies comme étant des composés antimicrobiens de faible poids moléculaire produits par la plante après un stress d'origine biotique ou abiotique (van Etten *et al.*, 1994). Celles-ci sont de structures chimiques variées puisque 350 phytoalexines ont été caractérisées parmi 30 espèces végétales (Hammerschmidt, 1999 ; Ahuja *et al.*, 2012).

Les phytoalexines présentes chez la vigne sont des polyphénols de la famille des stilbènes. Parmi eux, les principaux sont le resvératrol, le picéide (sa forme glycosylée), le ptérostilbène (sa forme méthylée) et des polymères de resvératrol tels que les viniférines (Jeandet *et al.*, 1997 ; Ali *et al.*, 2010). Ces composés possèdent *in vitro* des propriétés antifongiques, notamment contre *B. cinerea* (Adrian *et al.*, 1997 ; Caruso *et al.*, 2011 ; Adrian et Jeandet, 2012). De plus, des plants de vigne transgéniques capables d'accumuler le

Familles	Membres types	Propriétés
PR-1	Tobacco PR-1a	Inconnue
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase
PR-4	Tobacco R	Chitinase
PR-5	Tobacco S	Thaumatine-like
PR-6	Tomato inhibitor 1	Inhibiteur de protéases
PR-7	Tomato P69	Endoprotéinase
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase
PR-9	Tobacco lignin-forming peroxydase	Peroxydase
PR-10	Parsley PR-1	Ribonucléase-like
PR-12	Radish Rs-AFP3	Défensine
PR-14	Barley LTP4	Lipid-Transfert Proteins
PR-16	Barley OxoLP	Oxalate oxydase-like
PR-17	Tobacco PRp27	Inconnue

Tableau 1: Classification des 14 familles de protéines PR présentes chez la vigne (modifié d'après Van Loon *et al.*, 2006).

resvératrol en grande quantité ont montré une meilleure résistance face à *B. cinerea* (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001).

3. La réponse hypersensible :

La réponse hypersensible (HR : Hypersensitive Response) consiste en une réponse localisée qui va entraîner une mort rapide des cellules de type « mort cellulaire programmée » au niveau du site d'infection (Dangl *et al.*, 1996). Cette mort cellulaire prive le pathogène de ressources nutritives et le confine à son site d'infection initial (Lam *et al.*, 2001 ; Nimchuk *et al.*, 2003). Cette stratégie efficace contre les agents pathogènes biotrophes, ne l'est pas contre les agents pathogènes nécrotrophes, qui auraient au contraire une croissance facilitée. En effet, une étude a montré que la croissance de *B. cinerea* est réduite sur des mutants d'arabette incapables de réaliser la HR. Celle-ci serait au contraire favorisée par l'induction de la HR par une bactérie avirulente *Pseudomonas syringae* (Govrin et Levine, 2000).

4. La production de protéines PR :

Les protéines PR (Pathogenesis Related) ont été initialement décrites en 1970 chez le tabac suite à l'infection par le VMT (Virus de la Mosaïque du Tabac) (Gianinazzi *et al.*, 1970 ; van Loon et van Kammen, 1970). Ces protéines ont été retrouvées dans des tissus végétaux soumis aussi bien à des stress biotiques qu'abiotiques, c'est pourquoi elles ont longtemps été considérées comme des protéines de défense uniquement. Néanmoins, il a été montré que certaines d'entre elles sont impliquées dans de nombreuses étapes de développement telles que la germination, la floraison ou encore la maturation des fruits (van Loon *et al.*, 2006). Actuellement, 17 familles ont été identifiées chez de nombreuses espèces végétales et classées selon leur structure et leur activité biologique lorsque celle-ci a pu être caractérisée (van Loon *et al.*, 2006 ; Sels *et al.*, 2008).

Chez la vigne, 14 familles de protéines PR ont été identifiées à ce jour (Tableau 1). Elles peuvent s'accumuler dans différents organes (racines, tiges, feuilles, fleurs et baies), suite à l'attaque d'un agent phytopathogène tel que *B. cinerea* (Derckel *et al.*, 1998 ; Bézier *et al.*, 2002), à un stress abiotique (rayons UV-C ; Bonomelli *et al.*, 2004) et suite à différents traitements éliciteurs tels que le MeJA (Belhadj *et al.*, 2006), l'éthylène (Belhadj *et al.*, 2008)

ou encore la laminarine (Aziz *et al.*, 2003). Dans ce chapitre, nous ne nous intéresserons qu'aux familles de protéines PR présentes chez la vigne. Pour chacune de ces familles, un bref descriptif ainsi que des exemples en rapport avec la vigne et/ou *B. cinerea* seront présentés.

Les PR-1, découvertes chez le tabac en réponse au VMT (van Loon et van Kammen, 1970), sont principalement connues pour leur action antioomycètes (van Loon *et al.*, 2006) mais certaines possèdent également une activité antifongique (Niderman *et al.*, 1995), suggérant qu'elles interviendraient dans les défenses des plantes. Cependant leur mode d'action n'est toujours pas connu. Chez la vigne, des PR-1 sont exprimés en réponse à l'infection par *Oidium tuckeri* (Repka *et al.*, 2000), à la suite d'un traitement au BABA (β -AminoButyric Acid ; Hamiduzzaman *et al.*, 2005), au SA, au MeJA, au chitosan ainsi qu'à des éliciteurs provenant de *B. cinerea* (Repka, 2001 ; Repka *et al.*, 2004). Une étude réalisée sur le cépage Chardonnay met en évidence que la surexpression de *VvNPR1*, élément clé dans la voie de signalisation du SA, induit fortement l'expression de PR-1 et rend les plantes plus résistantes à *E. necator* (Le Henanff *et al.*, 2001). Ceci suggère que les PR-1 sont associées à la voie du SA.

Les PR-2 sont des endoglucanases capables de couper les liaisons β -1,3-D-glucosidiques des β -1,3-glucanes présents dans les parois des champignons et des bactéries (Leubner-Metzger et Meins, 1999). Chez la vigne, des PR-2 sont exprimées en réponse à une infection par *B. cinerea* (Renault *et al.*, 1996 ; Renault *et al.*, 2000), à l'application de SA (Renault *et al.*, 1996 ; Derckel *et al.*, 1998), et de MeJA (Repka *et al.*, 2004). Chez des mutants de vigne sur-exprimant *VvNPR1*, l'induction d'un gène codant pour une PR-2 a été observée (Le Henanff *et al.*, 2012). Cela suggère que chez la vigne, l'expression de gènes codant des PR-2 peut être induite à la fois par la voie du SA et celle du JA.

Les PR-3, 4 et 8 sont des chitinases capables d'hydrolyser *in vitro* la chitine, polysaccharide constitué d'unités de N-acétyl-glucosamine reliées par des liaisons β -1,4 (Brunner *et al.*, 1998). La chitine est un composant structural de l'exosquelette des insectes, de la carapace des crustacés et de la paroi cellulaire des champignons et des algues. Chez la vigne, une activité chitinase a été retrouvée dans la totalité des organes de la plante mais c'est dans la baie mûre que cette activité est la plus importante avec 13 isoformes mises en

évidence (Derckel *et al.*, 1996). L'expression de chitinases est induite en réponse à différents traitements tels que le MeJA (Repka *et al.*, 2004), le SA (Derckel *et al.*, 1996), les UV-C (Colas *et al.*, 2012) mais aussi suite à l'infection par *B. cinerea* (Bézier *et al.*, 2002). *In vitro*, l'isoforme majoritaire des baies mûres de Pinot Noir, VvCHI4D, a montré une action antigerminative sur les conidies de *B. cinerea*. Ainsi, les auteurs ont montré que la concentration de cette chitinase dans les baies devrait être suffisante pour inhiber complètement la germination des conidies de *B. cinerea in planta* (Derckel *et al.*, 1998). Néanmoins, une étude réalisée avec une VvCHI4D hétérologue, tend à remettre en question l'action antigerminative de cette chitinase sur les conidies de *B. cinerea* (Thèse S. Colas, 2012). Très récemment, il a été montré qu'une chitinase présente dans le vin, réputée résistante à la dégradation, est dégradée par une protéase de *B. cinerea* (van Sluyter *et al.*, 2013).

Les PR-5 sont des thaumatin-like. Ces protéines sont aussi appelées osmotines car elles peuvent être accumulées suite à un stress hydrique (Singh *et al.*, 1989) mais aussi permatines grâce à leur capacité à créer des pores dans les membranes plasmiques (Roberts et Selitrennikoff, 1990). *In vitro*, deux PR-5 de vigne ont montré une forte activité antifongique en inhibant la croissance mycélienne de *B. cinerea* notamment (Monteiro *et al.*, 2003). Néanmoins, tout comme la chitinase VvCHI4D, une thaumatine-like (VvTL1) produite en système hétérologue n'a pas montré cette activité antigerminative (Thèse S. Colas, 2012). La production de vignes transgéniques sur-exprimant *VvTL1* a mis en évidence une augmentation de la résistance des feuilles et des baies à *E. necator* (Dhekney *et al.*, 2011).

Les PR-6 sont des inhibiteurs de protéases (IP) qui ont la propriété de se fixer à des protéases et ainsi contrôler leur activité. Leur entrée dans la classification des protéines PR date de 1994 (van Loon *et al.*, 1994). Cette famille regroupe alors des inhibiteurs de protéases à sérine découverts chez la pomme de terre et la tomate produits dans les feuilles en réponse à l'attaque d'insectes (Green et Ryan, 1972). Officiellement, les PR-6 ne regrouperaient donc que des inhibiteurs de protéases à sérine. Cette définition est néanmoins discutable. En effet, elle se limite à une seule classe d'inhibiteurs de protéases, alors que tous les types d'IP peuvent interagir avec des protéases provenant de ravageurs ou d'agents pathogènes et pourraient donc jouer un rôle dans la défense des plantes (Sels *et al.*, 2008).

La classification en tant que PR des différents inhibiteurs de protéases étant de ce fait assez floue, le terme plus général d'IP lui est préféré (Sels *et al.*, 2008). La présentation de ces protéines IP sera intégrée au chapitre suivant portant sur les inhibiteurs de protéases.

Les PR-7 sont des protéases appartenant au clan des subtilases. Le premier membre de cette famille a été découvert chez la tomate suite à l'infection par *Citrus exocortis viroid* (Vera et Conejero, 1988). Depuis, de nouveaux membres ont été identifiés, notamment chez la tomate (Jordà *et al.*, 1999 ; Jordà *et al.*, 2000). Chez la vigne, aucune PR-7 n'a été identifiée lors d'une interaction avec *B. cinerea*.

Les PR-9 font partie de la famille des peroxydases (Almagro *et al.* 2009). Elles jouent un rôle important dans la défense car elles participent au renforcement des parois cellulaires en catalysant la lignification (van Loon *et al.*, 2006). Chez la vigne, des peroxydases sont exprimées en réponse à un éliciteur provenant de la paroi de *B. cinerea* et en réponse au MeJA (Repka *et al.*, 2001 ; Repka *et al.*, 2004).

La fonction des PR-10 n'est à ce jour pas connue, mais pour certaines d'entre elles, une activité ribonucléasique a pu être mesurée (Park *et al.*, 2004 ; Koistinen *et al.*, 2005). Chez la vigne, certaines PR-10 s'expriment en réponse à une infection par *Pseudomonas syringae* pv. *lisi* (Robert *et al.*, 2001), *Erysiphe necator* (Fung *et al.*, 2008) mais aussi aux UV-C (Bonomelli *et al.*, 2004). Récemment, il a été montré que la surexpression d'une PR-10 chez la vigne rendait celle-ci plus résistante à *Plasmopara viticola* (He *et al.*, 2013).

Les PR-12 font partie de la famille des défensines (Sels *et al.*, 2008). Celles-ci seraient capables de créer des pores dans les membranes plasmiques (Stec, 2006). Chez la vigne, une défensine, Vv-AMP1, possède une activité antifongique en inhibant la croissance de différents champignons phytopathogènes dont *B. cinerea* (de Beer et Vivier, 2008).

Les PR-14 sont des LTP (Lipid-Transfert Proteins) capables, *in vitro*, de transférer des lipides entre différentes membranes (Lev, 2010). Chez la vigne, il a été montré que des LTP s'accumulent dans des cultures cellulaires suite à l'élicitation par des endopolygalacturonase de *B. cinerea* ou par l'ergostérol (Gomès *et al.*, 2003).

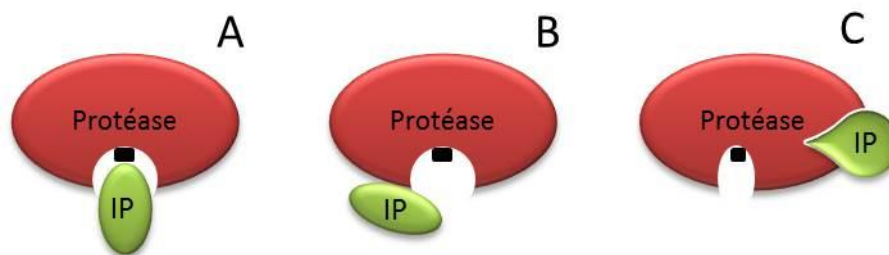


Figure 9: Représentation schématique des différents mécanismes d'inhibition.

Le carré noir représente le site actif de la protéase. A : Blocage direct du site actif. B : Fixation proche du site actif, bloquant l'accès à celui-ci. C : Interaction allostérique. Modifié d'après Bode et Huber, (2000).

Les PR-16 sont des germin-like (GLP : Germin-Like Proteins). Leur activité est variable. Certaines présentent une activité oxalate oxydase (Zhou *et al.*, 1998) ou superoxyde dismutase (Christensen *et al.*, 2004) et d'autres n'ont pas encore d'activité connue. Chez la vigne, l'expression de plusieurs GLP est induite suite à l'infection par différents champignons phytopathogènes dont *B. cinerea* (Godfrey *et al.*, 2007).

Les PR-17 sont des protéines contenant une séquence similaire à celle du site actif de certaines métalloprotéases. Cependant leur activité n'est pas encore connue (Christensen *et al.*, 2002). Chez la vigne, une PR-17 serait accumulée en condition de stress hydrique (Vincent *et al.*, 2007).

III. Les inhibiteurs de protéases:

Comme cité précédemment, les protéines de la famille des PR-6 sont des inhibiteurs de protéases (IP). Cependant, seuls les IP induits en réponse à un stress peuvent être classés dans cette famille, conformément à la définition des protéines PR (van Loon *et al.*, 2006). Dans ce chapitre, nous prendrons en considération les IP dans leur ensemble sans nous restreindre aux PR-6.

Les inhibiteurs de protéases sont des protéines ubiquitaires dans le monde vivant pouvant inhiber l'activité enzymatique de protéases endogènes ou exogènes (Turrà et Lorito, 2011). Ils agissent selon différents mécanismes (Bode et Huber, 2000 ; Habib et Fazili, 2007 ; Bateman et James, 2007) illustrés dans la figure 9. Les IP peuvent bloquer le site actif de la protéase en prenant la place du substrat selon un mécanisme de compétition (Figure 9 A). Ils peuvent aussi bloquer indirectement le site actif en empêchant l'accès du substrat à celui-ci (Figure 9 B). Les IP peuvent aussi se fixer plus loin du site actif de la protéase et inhiber celle-ci de façon allostérique. En effet, en se fixant, l'IP va modifier la structure tertiaire de la protéase et ainsi modifier la conformation de son site actif (Figure 9 C).

Dans cette partie, nous nous intéresserons tout d'abord à la classification des inhibiteurs de protéases puis à leurs rôles au sein de la plante. Nous nous pencherons enfin plus particulièrement sur les inhibiteurs de protéases présents chez la vigne.

1. Classifications des inhibiteurs de protéases :

Les IP ont été initialement regroupés suivant la classe de protéases qu'ils inhibaient. Ainsi, quatre familles d'IP ont pu être établies correspondant aux quatre classes de protéases connues : les inhibiteurs de protéases aspartiques, les inhibiteurs de protéases à sérine, les inhibiteurs de protéases à cystéine et les inhibiteurs de métalloprotéases. Cependant, l'existence d'IP capables d'inhiber des protéases de différentes classes a rendu cette classification difficile à utiliser. C'est pourquoi, il est apparu nécessaire d'en proposer une nouvelle.

La classification la plus utilisée de nos jours pour les inhibiteurs de protéases est fournie par la base de données MEROPS (Rawlings *et al.*, 2012). Celle-ci regroupe de nombreuses informations non seulement sur les protéases comme vu précédemment, mais aussi sur les inhibiteurs de protéases. Tout comme pour les protéases, ce site fournit une classification ainsi qu'une nomenclature des IP. La classification ne s'appuie plus seulement sur la classe de protéases inhibées mais aussi sur des comparaisons de séquences et de structures (Rawlings *et al.*, 2012). Le site permet également de recenser les différents IP présents dans un même organisme, qu'il soit animal, végétal, bactérien, fongique ou viral.

Une seconde base de données nommée Plant-PI, spécifiques des IP de plantes, a été créée. Les nomenclatures des familles sont harmonisées avec celles de MEROPS. Plant-PI, tout comme MEROPS, permet de recenser les différents IP présents dans une même plante. Néanmoins, les résultats fournis par les deux bases de données ne coïncident pas toujours. Dans la suite de cette étude, nous avons décidé de nous baser uniquement sur les données fournies par MEROPS.

A l'heure actuelle, les inhibiteurs de protéases sont regroupés en 74 familles dont 22 chez les plantes et 8 chez la vigne. Vu le nombre important de familles d'inhibiteurs de protéase, nous nous centrerons ici sur les 8 familles d'inhibiteurs de protéases retrouvées chez la vigne en en proposant une vue générale. Le rôle des IP et leur régulation chez les plantes seront respectivement développés dans les parties (2.) et (3.).

a. Les « Serpins » :

Cette famille, nommée I4 selon MEROPS, compte le plus grand nombre d'IP et représente la famille d'inhibiteurs de protéases la plus répandue au sein du vivant. Elle est en effet présente chez la plupart des organismes comme les bactéries, les plantes, les animaux mais aussi les virus (Irving *et al.*, 2000 ; Rawlings *et al.*, 2004b ; Law *et al.*, 2006 ; Habib et Fazili, 2007). La majorité des « serpins » inhibent des protéases à sérine mais certaines sont capables d'inhiber des protéases à cystéine telles que la caspase (C14) (Ray *et al.*, 1992) ou la papaïne (C1) (Schick *et al.*, 1998). La majeure partie des membres de cette famille possède une masse molaire supérieure à 40 kDa (Volpicella *et al.*, 2011). Cette famille est la seule chez laquelle l'inhibition est irréversible. En effet, celle-ci se fait par la mise en place de liaisons covalentes (Huntington *et al.*, 2000).

b. Les « Kunitz » :

Les membres de cette famille (I3 MEROPS) sont principalement des inhibiteurs de protéases à sérine telles que la trypsine, la chymotrypsine (S1) et la subtilisine (S8) mais peuvent aussi inhiber d'autres types de protéases comme des protéases aspartiques (A1) ou des protéases à cystéine de type papaïne (C1) (Park *et al.*, 2005 ; Ryan, 1990 ; Ritonja *et al.*, 1990 ; Oliva *et al.*, 2011).

Le premier membre de cette famille a été identifié chez le soja et cristallisé par Kunitz en 1945 (Kunitz, 1945). Celui-ci s'est basé sur des travaux réalisés un an auparavant mettant en évidence l'inhibition de l'activité de la trypsine dans la nourriture à base de soja cru fournie aux poussins (Ham et Sandstedt, 1944). Cette famille est très répandue dans le monde végétal. En effet de nombreux membres ont été retrouvés chez le peuplier (Major *et al.*, 2008 ; Philippe *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2011), la pomme de terre (Heibges *et al.*, 2003), le soja (Jofuku et Goldberg, 1989) ou encore *Arabidopsis thaliana* (Kim *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2011). La plupart des membres de cette famille a une masse moléculaire comprise entre 18 et 22 kDa et contient deux ponts disulfure (Habib et Fazili, 2007 ; Gomes *et al.*, 2011).

c. Les “Cereal trypsin/ α -amylase inhibitors”:

Les membres de cette famille (I6 MEROPS) sont présents exclusivement chez les plantes et sont à la fois des inhibiteurs de protéases à sérine ainsi que d' α -amylases (Gourinath *et al.*, 2000). La plupart ne possède que l'activité α -amylase, mais certains sont aussi capables d'inhiber des protéases à sérine de type trypsine (Mahoney *et al.*, 1984 ; Shivraj et Pattabiraman, 1981). Les membres de cette famille possèdent une chaîne d'acides aminés contenant cinq ponts disulfures avec une masse moléculaire d'environ 13 kDa (Christeller et Liang, 2005).

d. Les « Potato type I »:

Cette famille (I13 MEROPS) est très répandue chez les plantes. Le premier membre a été découvert chez la pomme de terre, et a été nommé Potato inhibitor 1 (Ryan et Balls, 1962). Par la suite d'autres membres ont été identifiés chez le riz (Singh *et al.*, 2009), le lin (Lorenc-Kubis *et al.*, 2001), la tomate (El Oirdi *et al.*, 2011 ; Abd El Rahman *et al.*, 2012) ou encore la vigne (Perazzolli *et al.*, 2010). Les membres de cette famille, aussi appelée Pin1 (Potato inhibitor 1), sont des inhibiteurs des protéases à sérine de type chymotrypsine (S1) et subtilisine (S8) (Ryan, 1990 ; Jamal *et al.*, 2012). Ils ont une masse moléculaire moyenne de 8 kDa, ne possèdent pas de ponts disulfure et sont le plus souvent monomériques (Habib et Fazili, 2007). Les « Potato type I » sont codés par des familles multigéniques dont le niveau d'expression est régulé selon le stade de développement, l'organe et l'espèce (Singh *et al.*, 2009 ; Turrà *et al.*, 2009).

e. Les « Phytocystatines »:

Les membres de cette famille (I25 MEROPS) ne sont présents que chez les plantes. Ils font partie de la grande famille des inhibiteurs de protéases à cystéine (ou cystatines) qui est très répandue aussi bien chez les animaux que chez les plantes (Gomes *et al.*, 2011 ; Volpicella *et al.*, 2011). Des phytocystatines ont été retrouvés chez de nombreux végétaux tels que le soja (Botella *et al.*, 1996 ; Solomon *et al.*, 1999), le maïs (Van der Linde *et al.*, 2012), la pomme (Ryan *et al.*, 1998), la châtaigne (Pernas *et al.*, 1999) ou encore l'orge (Martinez *et al.*, 2009).

Ils sont capables d'inhiber des protéases à cystéine comme la papaine (C1) (Benchabane *et al.*, 2010). Généralement, les membres de cette famille ont une masse moléculaire comprise entre 12 et 16 kDa et ne possèdent pas de pont disulfure.

f. Les "Pro-eosinophil major basic proteins " :

Les membres de cette famille (I63 MEROPS) sont présents chez tous les êtres vivants à l'exception des archae bactéries. Ils sont capables d'inhiber des métalloprotéases (M43) telle que la pappalysin-1 impliquée lors de la grossesse chez l'être humain (Glerup *et al.*, 2005). A ce jour, très peu d'informations sont disponibles sur cette famille d'IP.

g. Les "Serine carboxypeptidase Y inhibitors":

Les membres de cette famille (I51) sont présents chez tous les êtres vivants. Ils inhibent des protéases à sérine de type chymotrypsine (S1) (Bruun *et al.*, 1998). A ce jour, les études portant sur cette famille d'IP n'ont été réalisées que chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Bruun *et al.*, 1998 ; Mima *et al.*, 2005).

h. Les "Cytotoxic T-lymphocyte antigen":

Les membres de cette famille (I29 MEROPS) sont présents chez tous les eucaryotes à l'exception des champignons. Ils inhibent des protéases à cystéine de la famille de la papaine (C1) (Guay *et al.*, 2000 ; Rawlings *et al.*, 2004). Un membre de cette famille serait impliqué précocement lors de la grossesse chez l'humain (Cheon *et al.*, 2004). Néanmoins très peu d'études sont disponibles sur cette famille d'inhibiteurs de protéases.

2. Rôles des inhibiteurs de protéases chez la plante :

Les IP peuvent être impliqués dans de nombreux processus physiologiques faisant intervenir une activité protéolytique, que ce soit au sein même de la plante ou lors d'interactions avec d'autres organismes. Aussi nous détaillerons les rôles connus des IP sur la régulation de l'activité protéolytique endogène mais aussi leur rôle lors de l'interaction avec des ravageurs ou des agents phytopathogènes.

a. Rôle des IP sur les protéases endogènes :

La mise en place des réserves par l'accumulation de protéines dans la graine impose un contrôle de l'activité protéolytique. En effet, il a été montré que chez le riz, l'oryzacystatine (une phytocystatine) est synthétisée dans les grains immatures jusqu'à la phase de remplissage du grain pour prévenir toute protéolyse avant la phase de mobilisation des réserves (Watanabe *et al.*, 1991). Les IP se sont donc accumulés dans la graine lors de la mise en place des réserves pour contrôler toute activité protéolytique non désirée (Chye *et al.*, 2006 ; Tan-Wilson et Wilson, 2012). Lors de la germination, une partie de ceux-ci serait hydrolysée par des protéases synthétisées *de novo* (Papastoitsis et Wilson, 1991). Ainsi, les IP joueraient également un rôle de réservoir d'acides aminés mobilisables pendant la germination et le développement de la plantule (Tan-Wilson et Wilson, 2012). De plus, il a été montré que les complexes IP/protéase formés lors de la mise en place des réserves peuvent se dissocier au moment de la germination. En effet, l'imbibition de la graine provoque de nombreux changements biochimiques qui vont permettre le relargage de la protéase qui va alors hydrolyser les différentes protéines de réserve (Elpidina *et al.*, 1991). Les IP semblent donc avoir un rôle important dans le développement de la graine. Ceci est confirmé par la production de plants d'arabette sur-exprimant une phytocystatine montrant un retard dans la germination de la graine ainsi que dans la dégradation des protéines de réserve (Hwang *et al.*, 2009).

Les inhibiteurs de protéases sont aussi impliqués dans la mort cellulaire programmée. Il a été montré que l'AEBSF (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), un inhibiteur chimique de protéases à sérine, est capable d'inhiber la mort cellulaire de cellules de soja provoquée par un ajout d'H₂O₂ (Levine *et al.*, 1996). De plus, d'autres études menées sur le soja, le maïs, l'arabette ainsi que le tabac ont montré qu'une protéase à cystéine serait impliquée dans la mort cellulaire programmée et qu'une phytocystatine serait capable d'inhiber celle-ci (Solomon *et al.*, 1999 ; Belenghi *et al.*, 2003 ; Van der Linde *et al.*, 2012).

b. Rôle des IP dans la protection contre les ravageurs et les phytopathogènes:

Les animaux pour la plupart ont besoin de protéases afin de dégrader et utiliser les acides aminés constitutifs des protéines qu'ils consomment. Cette digestion des protéines est principalement extracellulaire. De nombreux micro-organismes utilisent une stratégie similaire pour la digestion de protéines alimentaires, en sécrétant des enzymes hydrolytiques dans le milieu environnant.

En raison du rôle clé des protéases dans les processus digestifs des animaux, des insectes et des micro-organismes, un grand intérêt a été porté sur les effets des inhibiteurs de protéase (Ryan, 1990), notamment dans la lutte contre les ravageurs des cultures.

i. Insectes et nématodes :

Les études sur l'effet des inhibiteurs de protéases sur les insectes ont commencé dans les années 1950 lorsque Lipke *et al.*, (1954) ont constaté qu'une fraction de protéines de soja inhibait la croissance, ainsi que l'activité protéolytique *in vitro*, du ver de farine *Tribolium confusum*. Depuis, un grand nombre d'études a été réalisé pour montrer le rôle protecteur des inhibiteurs de protéases contre les insectes herbivores (Ryan, 1990). Ce rôle protecteur s'expliquerait par un effet anti nutritif. En effet, la digestion rendue moins efficace par l'inhibition des protéases du tube digestif de l'insecte provoquerait une altération de la croissance et du développement de celui-ci (Ryan, 1990 ; Kessler et Baldwin, 2002). De nombreuses études se basant sur des expériences *in vitro*, de l'alimentation enrichie en IP ou encore des plantes transgéniques sur-exprimant des IP ont été réalisées

(Johnson *et al.*, 1989 ; Ryan, 1990 ; McManus *et al.*, 1994 ; Xu *et al.*, 1996 ; Yeh *et al.*, 1997 ; Charity *et al.*, 1999 ; Lawrence et Koundal, 2002 ; Chye *et al.*, 2006 ; Charity *et al.*, 2005 ; Major *et al.*, 2008 ; Sentilkumar *et al.*, 2010 ; Lomate et Hirvale, 2012). Par exemple, il a été montré *in vitro* que les protéases du tube digestif de *Malacosoma disstria*, un lépidoptère nuisible du peuplier, sont fortement inhibées par deux IP de peuplier de la famille des « Kunitz » produits de manière hétérologue (Major *et al.*, 2008). Sentilkumar *et al.*, (2010) ont montré que des plants de tabac transgéniques sur-exprimant à la fois un inhibiteur de protéase à sérine de patate douce et un inhibiteur de protéase à cystéine de taro (*Colocasia esculenta*), montraient une forte résistance face aux larves d'*Helicoverpa armigera*. Les larves qui s'étaient nourries des feuilles transformées mouraient ou montraient un ralentissement de croissance et de développement comparées aux larves témoins.

ii. Bactéries et champignons:

L'expression de deux IP a été suivie par Pautot *et al.*, (1991) lors de l'infection de la tomate par *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*. Il a été montré que l'expression des IP était induite plus précocement chez une lignée résistante que chez une lignée sensible à cette bactérie. Ces données suggèrent que les IP pourraient faire partie des défenses efficaces mises en place par la plante en réponse à l'infection bactérienne (Pautot *et al.*, 1991). Chez le tabac, des plants transgéniques sur-exprimant un IP se sont révélés plus résistants que les plants non transformés face à l'attaque de la bactérie *Pseudomonas solanacearum* (Charity *et al.*, 2005).

De nombreuses études ont été réalisées pour montrer l'efficacité des IP contre les champignons. Ainsi, il a été montré *in vitro* qu'un inhibiteur de trypsine de maïs, produit en système hétérologue peut inhiber la germination des conidies et ralentir la croissance mycélienne de différents pathogènes tels que *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Fusarium moniliforme* (Chen *et al.*, 1999). Un IP de la famille des « Bowman-Birk » de blé ainsi qu'un « Kunitz » et un « Potato type I » de pomme de terre peuvent également inhiber la germination des conidies et ralentir la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* (Chilosi *et al.*, 2000 ; Hermosa *et al.*, 2006). Enfin, un mélange d'IP extrait de feuilles de salade montre

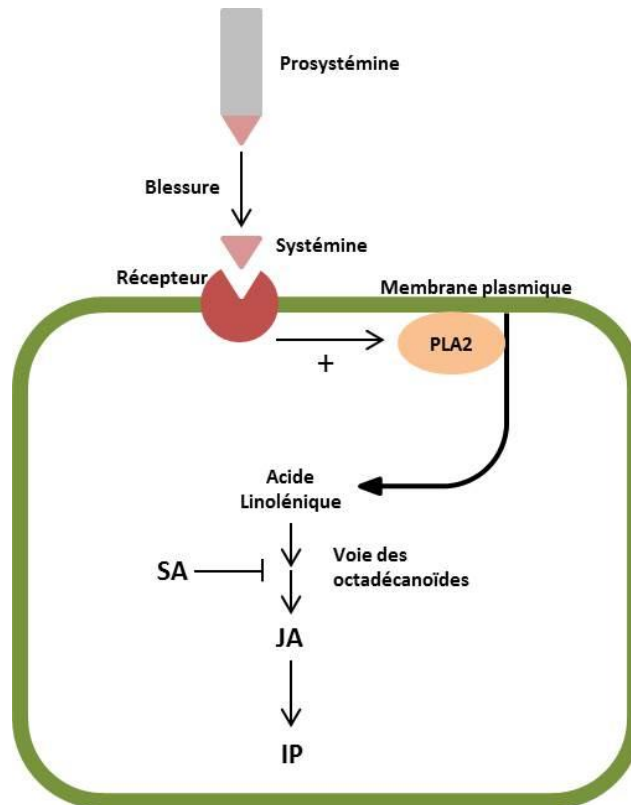


Figure 10: Schéma représentant la voie de signalisation menant à l'expression des IP de tomate (modifié d'après Gatehouse *et al.*, 2002). PLA2 : Phospholipase A₂ ; SA : Acide Salicylique ; JA : Acide Jasmonique ; IP : Inhibiteurs de protéases.

également une activité antifongique *in vitro* sur *Fusarium solani* f. sp. *Pisi* et *Botrytis cinerea* (Lorito *et al.*, 1994).

Des plants de tabac sur-exprimant un inhibiteur de chymotrypsine de *Nicotiana glauca* se sont révélés plus résistants à *Botrytis cinerea* (Charity *et al.*, 2005). Laluk *et al.*, (2011) ont montré que des plants d'arabette sur-exprimant un « Potato Type I » sont plus résistants à *Botrytis cinerea*, alors que des plants sous-exprimant cet IP se sont révélés plus sensibles. De la même façon, des plants de tomate sous-exprimant un membre de cette même famille d'IP sont eux aussi plus sensibles face à *B. cinerea* (El Oirdi *et al.*, 2011). En revanche, des plants de maïs transgéniques sous-exprimant un inhibiteur de protéases à cystéine se sont révélés plus résistants face à l'attaque du champignon biotrophe *Ustilago maydis*. Chez la plante sauvage, l'IP est induit lors de l'attaque par *U. maydis*, et inhibe une protéase à cystéine impliquée dans la mise en place de la HR nécessaire à la défense contre ce champignon biotrophe. C'est pourquoi la plante sauvage est sensible à ce pathogène. Au contraire, chez le mutant sous-exprimant cet IP, la protéase n'étant pas inhibée, la HR se met en place et stoppe le champignon biotrophe (Van der Linde *et al.*, 2012).

3. Régulation des IP chez la plante :

La plupart des études réalisées sur la régulation des IP a été effectuée sur feuilles de tomate. Les IP sont connus pour répondre à la blessure, que celle-ci soit provoquée par un insecte ou un pathogène (Pautot *et al.*, 1991 ; Doares *et al.*, 1995 ; Koiwa *et al.*, 1997 ; Lawrence *et al.*, 2002 ; Sels *et al.*, 2008 ; Lomate et Hirvale, 2012). La voie de signalisation activée lors d'une blessure est la voie du JA (Gatehouse, 2002 ; Glazebrook, 2005). L'expression des IP est donc régulée *via* la voie du JA. Chez la tomate, le premier signal de la cascade de signalisation mis en jeu lors de la blessure est un peptide de 18 acides aminés, la systémine, générée à partir d'un précurseur protéique de 200 acides aminés, la prosystémine. La systémine va se fixer à son récepteur spécifique localisé sur la membrane plasmique provoquant ainsi la dépolarisation de la membrane, l'ouverture de canaux ioniques et l'entrée d'ions Ca^{2+} , ainsi que l'activation de MAP kinases et d'une phospholipase A_2 . Il s'ensuit la libération par la membrane d'acide linoléique qui va être transformé en JA via la voie des octadécanoïdes ce qui provoque l'induction de l'expression des IP (Doares *et*

Familles	Nomenclature MEROPS	Type de protéases inhibées
Kunitz	I3	Trypsine, Chymotrypsine (S1), Subtilisine (S8), Papaine (C1), Cathepsine D (A1).
Serpins	I4	Trypsine, Chymotrypsine (S1), Subtilisine (S8), Caspase, Papaine (C1)
Cereal trypsin/ α-amylase inhibitors	I6	Trypsine (S1)
Potato type I	I13	Trypsine, Chymotrypsine (S1), Subtilisine (S8)
Phytocystatines	I25	Caspase, Papaine (C1)
Pro-eosinophil major basic proteins	I63	Metalloprotéases (M43)
Serine carboxypeptidase Y inhibitors	I51	Chymotrypsine (S1)
Cytotoxic T-lymphocyte antigen	I29	Papaine (C1)

Tableau 2: Familles d'inhibiteurs de protéases présentes chez la vigne ainsi que les familles de protéases inhibées, d'après MEROPS the peptidase database. La nomenclature MEROPS des différentes protéases citées est indiquée entre parenthèses.

al., 1995 ; Ryan *et al.*, 2000 ; Lawrence *et al.*, 2002 ; Schillmiller *et al.*, 2005 ; Sels *et al.*, 2008 ; Pearce, 2011) (Figure 10).

Chez ce même modèle, il a été montré que le SA inhibait la voie des octadécanoïdes, provoquant ainsi l'arrêt de la production de JA et donc l'inhibition de l'expression des IP (Figure 10) (Doares *et al.*, 1995 ; Lawrence *et al.*, 2002).

4. Les inhibiteurs de protéase présents chez la vigne :

Chez la vigne, les inhibiteurs de protéases, comme mentionné précédemment, appartiennent aux 8 familles suivantes : les « Kunitz » (I3 ; 8 membres), les « Serpins » (I4 ; 1 membre), les « Cereal trypsin/ α -amylase inhibitors » (I6 ; 1 membre), les « Potato type I » (I13 ; 3 membres), les « Phytocystatines » (I25 ; 4 membres), les "Pro-eosinophil major basic proteins" (I63 ; 1 membre), les « Serine carboxypeptidase Y inhibitors » (I51 ; 4 membres) et les "Cytotoxic T-lymphocyte antigen" (I29 ; 3 membres) (Tableau 2).

Les « Potato type I » et les « Kunitz » sont les deux familles le plus souvent retrouvées dans les différentes études réalisées sur la vigne. Au sein de la famille des « Potato type I », *VvPin* (AY156047), aussi nommé *VvPR6*, faisant d'ailleurs partie de notre étude, est induit en réponse à de nombreux traitements éliciteurs sur feuilles de vitroplants et de boutures, mais aussi sur cultures cellulaires. Il est notamment induit par le MeJA (Belhadj *et al.*, 2006 ; Bordiec *et al.*, 2011), l'éthylène (Belhadj *et al.*, 2008), les UV-C (Bonomelli *et al.*, 2004), la laminarine (Aziz *et al.*, 2003) ainsi que par des cellodextrines, des oligogalacturonides et des β -1,3 glucanes (Aziz *et al.*, 2004 ; Aziz *et al.*, 2007). L'expression de cet inhibiteur ainsi que celle d'un autre inhibiteur de la famille des Kunitz est également induite dans des racines de vigne infectées par le champignon *Armillaria mellea* (Perazzolli *et al.*, 2010). Une étude transcriptomique réalisée sur Cabernet Sauvignon a montré que ces deux mêmes IP étaient induits en réponse à l'eutypiose (Camps, 2008). Une autre étude transcriptomique, portant cette fois sur la localisation d'expression de gènes au niveau de la baie, a montré que les inhibiteurs de protéases présents dans la baie, y compris *VvPin*, sont préférentiellement exprimés dans le pépin plutôt que la pulpe ou la pellicule (Grimplet *et al.*, 2007).

Gindro *et al.*, (2012) ont montré que l'application sur des feuilles de vigne de deux IP chimiques, l'un inhibant les protéases à sérine et l'autre les protéases à cystéine, rend la plante plus sensible à *Plasmopara viticola* en inhibant la HR.

Objectifs de la thèse :

Comme décrit précédemment, les baies mûres contiennent une grande quantité de protéines PR possédant pour la plupart une activité contre *B. cinerea*. Malgré leur présence, la baie reste sensible à l'infection par *B. cinerea*. Des études ont montré que lors de l'infection, *B. cinerea* sécrète des protéases (Billon-Grand *et al.*, 2011). Certaines de ces protéases se sont montrées capables de dégrader une des protéines PR majoritaire de la baie mûre (Thèse S. Colas, 2012 ; van Sluyter *et al.*, 2013). Aussi, l'hypothèse émise lors de cette étude est que *B. cinerea* serait capable de contourner les défenses de la plante en dégradant les protéines PR.

C'est pourquoi nous nous sommes particulièrement intéressés aux inhibiteurs de protéases produits par la vigne. En effet, ceux-ci pourraient être capables d'inhiber les protéases du champignon et donc empêcher la dégradation des protéines de défenses. Cependant, malgré leur présence, la baie reste sensible à l'infection par *B. cinerea*. Nous nous sommes donc intéressés aux raisons pour lesquelles ces inhibiteurs semblent inefficaces lors de cette interaction. Pour cela, nous nous sommes posé les questions suivantes :

- Les inhibiteurs de protéases de vigne sont-ils exprimés au bon moment, en assez grande quantité et au bon endroit lors de l'infection ?

Pour le vérifier, l'expression des IP a tout d'abord été suivie dans les baies saines afin de connaître leur expression basale dans cet organe. La localisation de leur expression dans la baie saine et dans la baie infectée a également été étudiée afin de savoir si ceux-ci sont exprimés au niveau des sites éventuels de pénétration et de développement de *B. cinerea*. L'expression des IP ainsi que celle des principales protéases du champignon ont également été suivies par q-PCR dans les baies et les feuilles de vitroplants au cours de l'infection afin de connaître leur cinétique d'expression respective et donc savoir si les IP sont exprimés au bon moment. Des études d'élicitation de l'expression des IP ont également été réalisées sur baies et feuilles de vitroplants. Ces résultats seront présentés dans le premier chapitre.

- Les inhibiteurs de protéases de vigne sont-ils adaptés aux protéases sécrétées par *B. cinerea* lors de l'infection et peuvent-ils empêcher la dégradation de la protéine PR majoritaire de la baie de raisin par les protéases fongiques?

Pour le vérifier il a tout d'abord été nécessaire d'obtenir des protéases de *B. cinerea* et de produire les IP. Différentes familles de protéases ont pu être obtenues sous forme de sécrétomes fongiques. Les IP quant à eux ont été produits en système hétérologue (*Pichia pastoris*). L'activité des protéases ainsi que des IP a été vérifiée *in vitro*. Les IP ont ensuite été confrontés aux protéases du champignon afin de savoir si ceux-ci pourraient inhiber leur activité.

Les différentes protéases fongiques obtenues ont également été mises en contact avec une chitinase (VvChi4D, protéine PR majoritaire de la baie mûre) afin de savoir quelle(s) protéase(s) pourrait (ent) être à l'origine de cette dégradation et si les IP pourraient inhiber celle-ci. L'ensemble de ces résultats sera présenté dans le second chapitre.

Matériel et méthodes

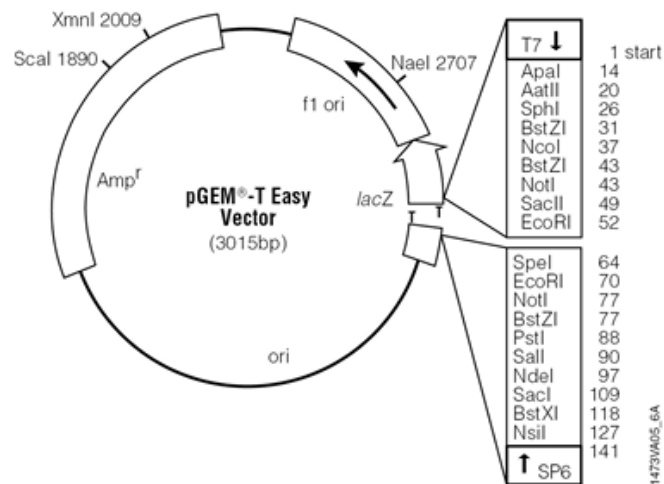


Figure 11: Carte du plasmide pGEM®-T Easy (Promega, France) utilisé pour transformer les bactéries *Escherichia coli* One Shot® TOP 10 afin de cloner les séquences codantes des gènes *VvPin* et *VvKun*.

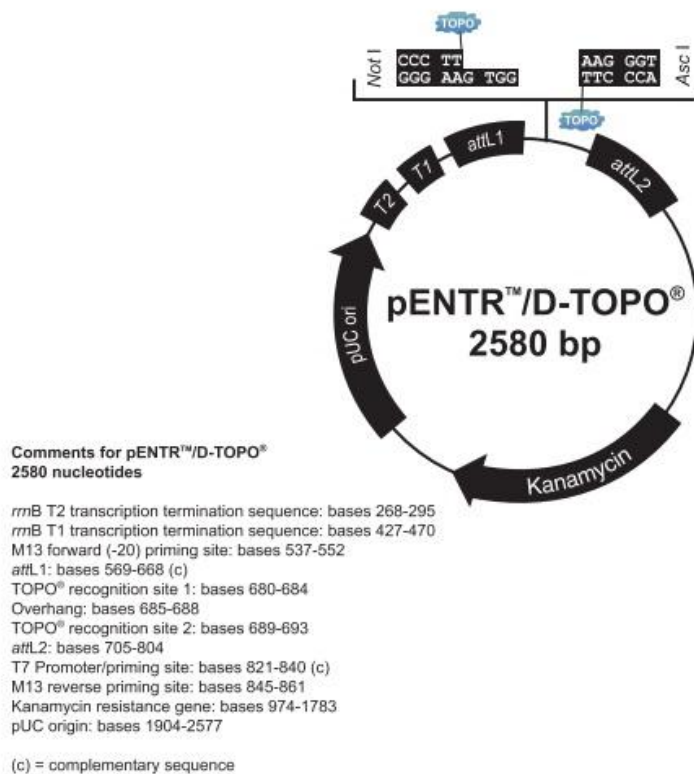


Figure 12 : Carte du plasmide pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen™).

I. Matériel :

1. *Vitis vinifera*

1.1. Baies

Des baies saines de *Vitis vinifera* L. cultivar Pinot Noir ont été récoltées au vignoble (Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne, Plumecoq, France) aux stades BBCH75, BBCH77, BBCH81 et BBCH89 de 2010 à 2013. Des baies mûres de Pinot Noir naturellement infectées par *Botrytis cinerea* ont également été récoltées. Pour ces dernières, quatre stades d'infection ont été définis selon l'intensité des symptômes observés sur baies (Manteau, 2003) (Figure).

Stade 1 : baies saines prélevées sur des grappes infectées ;

Stade 2 : baies présentant un spot d'infection de 5 à 10 mm de diamètre ;

Stade 3 : baies présentant une perte de coloration et recouvertes d'une quantité importante de conidies ;

Stade 4 : baies flétries.

1.2. Vitroplants

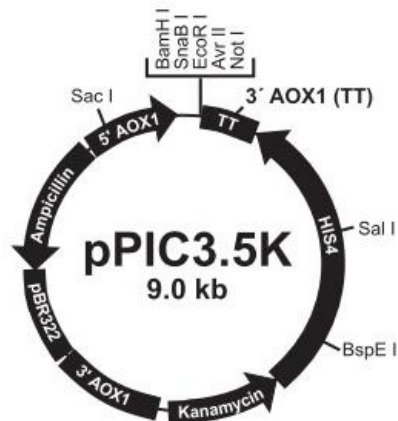
Les vitroplants utilisés lors de cette étude sont des vitroplants de Chardonnay de 8 semaines, cultivés selon Aït Barka *et al.* (2006) en chambre de culture à 26°C avec une photopériode de 16 h de jour ($200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et 8 h de nuit.

2. *Botrytis cinerea*

La souche de *Botrytis cinerea* utilisée lors de cette étude est la souche 630 prélevée initialement dans le vignoble champenois (INRA, Versailles, France).

3. *Escherichia coli*

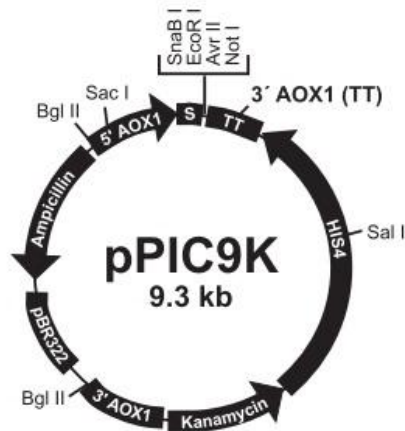
Les bactéries *Escherichia coli* One Shot® TOP 10 Chemically Competent (Invitrogen™, France), sensibles à l'ampicilline ont été utilisées pour le clonage des fragments d'intérêt (séquences codantes des gènes *VvPin* et *VvKun*).



Comments for pPIC3.5K:
9004 nucleotides

5' AOX1 promoter fragment: bases 1-937
5' AOX1 primer site: bases 855-875
Multiple Cloning Site: bases 938-968
3' AOX1 primer site: bases 1055-1075
3' AOX1 transcription termination (TT):
bases 981-1314
HIS4 ORF: bases 4242-1708
Kanamycin resistance gene: bases 5471-4656
3' AOX1 fragment: bases 5850-6607
pBR322 origin: bases 7689-7016
Ampicillin resistance gene: bases 8694-7834

Figure 13: Carte du plasmide pPIC3K5 (Invitrogen™) utilisé pour transformer les levures *P. pastoris* GS115 pour la production de la protéine VvKUN.



Comments for pPIC9K:
9276 nucleotides

5' AOX1 promoter fragment: bases 1-948
5' AOX1 primer site: bases 855-875
 α -Factor secretion signal(s): bases 949-1218
 α -Factor primer site: bases 1152-1172
Multiple Cloning Site: bases 1216-1241
3' AOX1 primer site: bases 1327-1347
3' AOX1 transcription termination (TT):
bases 1253-1586
HIS4 ORF: bases 4514-1980
Kanamycin resistance gene: bases 5743-4928
3' AOX1 fragment: bases 6122-6879
pBR322 origin: bases 7961-7288
Ampicillin resistance gene: bases 8966-8106

Figure 14: Carte du plasmide pPIC9K (Invitrogen™) utilisé pour transformer les levures *P. pastoris* GS115 pour la production de la protéine VvPIN.

4. *Pichia pastoris*

La souche de levure *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen™, France) utilisée pour la production des protéines hétérologues est incapable de synthétiser de l'histidine, acide aminé indispensable à son développement (auxotrophie provoquée par une mutation au niveau du gène *his4*).

5. Les plasmides

Les vecteurs pGEM®-T Easy (Figure 11) (Promega, France), pENTR™/D-TOPO® (Figure 12), pPIC3K5 (Figure 13) et pPIC9K (Figure 14) (Invitrogen™, France) et pK7WG2D ont été utilisés. Ces plasmides possèdent le gène de résistance à l'ampicilline ou à la kanamycine, ce qui permet un premier criblage des bactéries transformées. Les plasmides pPIC3K5 et pPIC9K sont des vecteurs navettes pouvant se répliquer aussi bien en levures qu'en bactéries. Ils possèdent le gène *his4* permettant aux levures *Pichia pastoris* GS115 transformées de synthétiser de l'histidine. Les vecteurs pENTR™/D-TOPO® et pK7WG2D quant à eux possèdent la technologie Gateway® ce qui permet par simple recombinaison de transférer une séquence d'intérêt d'un vecteur d'entrée, ici le pENTR™/D-TOPO® dans n'importe quel vecteur de destination possédant aussi cette technologie, ici le pK7WG2D.

La technologie Gateway® a été initialement choisie car le premier système de production hétérologue sélectionné (*Saccharomyces cerevisiae*) nécessitait l'utilisation d'un vecteur de destination Gateway™, le pYES2. De plus, la transformation de plants de vigne pour la surexpression de protéines nécessite également l'utilisation d'un vecteur de destination Gateway™, le pK7WG2D.

6. Sécrétome de cultures cellulaires de Chardonnay

Les cultures cellulaires de Chardonnay sont cultivées en milieu Gamborg B5 (Duchefa, France) additionné de saccharose (20 g/L) et d'acide naphthalèneacétique (0,5 g/L) à pH 5,8, sous agitation à 110 rpm, à 23°C et à l'obscurité. Après 7 jours, le milieu de culture est séparé des cellules par filtration à l'aide d'un buchner et conservé à -20°C.

Le secrétome est ensuite concentré à l'aide de Microsep™ advance centrifugal Device (Pall Corporation, USA) 10 K MWCO. La concentration protéique de celui-ci est dosée à l'aide du kit Uptima BC Assay (Interchim, France) comme expliqué en II.8.1

7. Les anticorps

Les anticorps dirigés contre la protéine VvKUN ont été réalisés par la société ProtéoGenix SAS à partir de la protéine hétérologue VvKUN produite lors de cette étude (Cf Chapitre 2).

Les anticorps utilisés pour détecter les principales protéases du champignon (BcAcp, BcAsp et BcSer) ont été fournis par le laboratoire de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie (Université Lyon 1). Ces anticorps, élaborés à partir de protéases purifiées de *Sclerotinia sclerotiorum* sont couramment utilisés pour détecter les protéines homologues chez *Botrytis cinerea* (Rolland *et al.*, 2003 ; Girard *et al.*, 2004 ; Kunz *et al.*, 2006 ; Rolland *et al.*, 2009). Ainsi, les anticorps SsAcp et SsSer sont utilisés pour détecter les protéines BcAcp1 (BC1G_14153) et BcSer1 (BC1G_04708) et l'anticorps SsAsp pour détecter la famille des protéases aspartiques de *Botrytis cinerea* (G. Billion-Grand communication personnelle).

Néanmoins, il est évident qu'en l'absence de protéases purifiées de *B. cinerea* pouvant servir de témoins positifs lors des différentes expérimentations, les résultats produits avec les anticorps de *Sclerotinia sclerotium* doivent être interprétés avec précaution.

II. Méthodes :

1. Traitement des baies de Pinot Noir :

1.1. Traitements éliciteurs :

Trois types de traitements ont été effectués sur des baies récoltées au vignoble. Un premier a consisté à blesser la baie en supprimant son pédicelle à l'aide d'un scalpel, un second et un troisième à plonger les baies dans une solution de MeJA 5 mM, DMSO 5 % (témoin DMSO 5% seul) et de Bion® 1 g.L⁻¹ (témoin non traité) respectivement, pendant 1 min. Après traitement, les baies sont placées dans des boîtes de Pétri contenant une feuille

de papier Whatman humidifiée. Les boîtes sont ensuite parafilmées et placées en chambre de culture à 20°C, avec une photopériode de 16 h de jour ($80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et 8 h de nuit. A chaque temps de la cinétique (0, 12, 24, 48, 72 et 96 heures post traitement (hpt)), les baies sont congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

1.2. Infection des baies :

Des baies mûres de Pinot Noir ont été prélevées au vignoble puis plongées dans de l'eau de Javel (0,52 %) pendant 15 min afin de les désinfecter. Après deux rinçages de 10 min dans de l'eau celles-ci sont réparties sur des portoirs remplis d'eau. Les baies sont ensuite vaporisées avec des suspensions conidiennes pré germées (Cf. 2.3.). Les portoirs sont placés en chambre de culture à 20°C, avec une photopériode de 16 h de jour ($80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et 8 h de nuit. A chaque temps de la cinétique (0, 7, 11 et 23 jours post inoculation (jpi)), les baies sont photographiées, congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

1.3. Dissection des baies :

Afin d'étudier la localisation de l'expression des IP dans la baie mure, les différents compartiments de baies de PN (pépins, pulpe et pellicule) sont séparés, congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C. Pour les baies de PN infectées naturellement par le champignon, la distinction est faite seulement entre les pépins et le reste de la baie.

2. Traitement des feuilles de vitroplants

2.1. Infection des feuilles de vitroplants

Des feuilles de vitroplants âgés de 8 semaines sont détachées puis placées dans des boîtes de Pétri contenant une feuille de papier Whatman humidifiée. Les feuilles de vitroplants sont inoculées sur la face inférieure avec 4 à 5 gouttes de 5 μL de suspension conidienne à 1.10^5 conidies. mL^{-1} ayant germé pendant 6 h. Les boîtes sont ensuite placées en chambre de culture à 20°C, avec une photopériode de 16 h de jour ($80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et 8 h de nuit.

A chaque temps de la cinétique (0, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48 et 72 heures post inoculation (hpi)), les feuilles sont photographiées, congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

2.2. Traitements éliciteurs

Des vitroplants âgés de 8 semaines sont plongés pendant 1 min dans une solution de Bion® à 1 g.L⁻¹, de MeJA 5 mM, DMSO 5 % ou d'eau. Les vitroplants sont ensuite placés en chambre de culture à 20°C, avec une photopériode de 16 h de jour (80 µmol.m⁻².s⁻¹) et 8 h de nuit. A chaque temps de la cinétique (9 heures post traitement (hpt) et 24 hpt), les feuilles sont congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

3. Culture de *Botrytis cinerea*

Des cultures liquides de *Botrytis cinerea* souche 630 sont lancées à partir de stocks glycérolés 20%. Vingt mL de milieu PDB (Potato Dextrose Broth) sontensemencés avec 200 µL de stock glycérolé puis mis en culture pendant 7 jours à 21°C à 150 rpm avec une photopériode de 16 h de jour (80 µmol.m⁻².s⁻¹) et 8 h de nuit. Cette culture est ensuite broyée au mixeur et étalée sur une gélose tomate-agar contenant 25 % (v/v) de jus de tomate commercial et 25 g.L⁻¹ d'agar. Les boîtes de Pétriensemencées sont mises en culture pendant 3 semaines à 21°C avec une photopériode de 16 h de jour (80 µmol.m⁻².s⁻¹) et 8 h de nuit pour la production de conidies.

Pour les infections, des suspensions de conidies à 1.10⁵ conidies.mL⁻¹ sont préparées dans du milieu M (4 g.L⁻¹ peptone, 4 g.L⁻¹ glucose, 1,75 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 0,75 g.L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 1,92 g.L⁻¹ acide citrique et 0,02% Tween 20 (Manteau *et al.*, 2003)). Ces suspensions sont placées à 20°C, 150 rpm pendant 6 h pour que les conidies commencent à germer.

4. Production des sécrétomes de *B. cinerea*

Le sécrétome acide de *B. cinerea* souche 630 est réalisé en ensemencant 20 mL de milieu M à pH 3 à 10⁵ conidies.mL⁻¹.

Gènes (numéro d'accèsion)	Séquences des amorces 5'-3'
<i>VvPin</i> (XM_002284411.1) Inhibiteur de protéases	Fwd AGGGAACAATCGTTACCCAAG Rev CCGATGGTAGGGACACTGAT
<i>VvKun</i> (XM_002270075.1) Inhibiteur de protéases	Fwd GTTCTTTTCTCGTTGCTGCTCAT Rev GCCTCTCCACGGATAACTG
<i>VvEF1α</i> (XM_002284888.1) Elongation Factor 1 α (Gène de ménage)	Fwd AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA Rev GAACTGGGTGCTTGATAGGC
<i>Vv60SRP</i> (XM_002270599.1) 60S Ribosomal Protein (Gène de ménage)	Fwd ATCTACCTCAAGCTCCTAGTC Rev CAATCTTGTCTCCTTTCCT
<i>BcAct</i> (XM_001553318.1) Actine (Gène de ménage)	Fwd ACGCCCTGCATTCTACGTCTCT Rev AGGATTGACTGGCGGTTTGGATT
<i>BcAcp</i> (XM_001547368.1) Protéase glutamique	Fwd CGTTACCAAGGGCAAGAGTGTT Rev CCTCCTCGAAATCTTCAACGAT
<i>BcAp8</i> (XM_001557988.1) Protéase aspartique 8	Fwd AGCTTACCCTCGGTGGAGTTG Rev GGAGATACCCAGTAGTATGAAGCA
<i>BcSer</i> (XM_001556942.1) Protéase à sérine	Fwd GCCCGAGCCAGCTTCTCTA Rev GCCAATGCCTTAATTCTAGCTACAA

Tableau 3: Amorces utilisées pour les analyses par PCR quantitative en temps réel.

Le secrétome neutre quant à lui est réalisé en ensemençant 20 mL de milieu PDB 0,1% et feuilles de vitroplants à 5% (p/v) à $1,5.10^5$ conidies.mL⁻¹. Ce milieu de culture est réalisé en mixant des feuilles de vitroplants dans du PDB 0,1% en conditions stériles.

Ceux-ci sont mis en culture pendant 7 jours à 20°C à 150 rpm avec une photopériode de 16 h de jour ($80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et 8 h de nuit. Le milieu de culture est ensuite séparé du mycélium par filtration à l'aide d'un buchner et conservé à -20°C. Le secrétome est ensuite concentré à l'aide de Microsep™ advance centrifugal Device (Pall Corporation, USA) 3 K MWCO. La concentration protéique de celui-ci est dosée à l'aide du kit Uptima BC Assay (Interchim, France) comme expliqué en II.8.1.

5. Culture d'*Escherichia coli*

5.1. Culture en milieu solide

Les bactéries *Escherichia coli* transformées sont cultivées sur le milieu solide LB (Luria-Bertani) (Milieu LB agar, Duchefa Biochemie, Pays-Bas) additionné d'ampicilline à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et incubées 24 h à 37°C.

5.2. Culture en milieu liquide

Les cultures d'*Escherichia coli* en milieu liquide sont réalisées dans du milieu LB (Duchefa Biochemie, Pays-Bas) additionné ou non d'ampicilline à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et incubées 24 h à 37°C sous agitation à 200 rpm.

6. Extraction des ARN totaux et PCR quantitative en temps réel

L'extraction des ARN totaux ainsi que la PCR quantitative en temps réel ont été réalisés selon la procédure décrite par Petit *et al.*, (2009). Les résultats sont exprimés en nombre de copies de molécules d'ARNm pour 10 000 molécules d'ARNm de *VvEF1 α* . Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 3.

Gènes (Numéro d'accèsion)	Séquences des amorces 5'-3'
<i>VvPin</i> (XM_002284411.1)	Fwd GGCATAATTAGTCGTGTGAAGG Rev GGGTGAATAAACACCAACCC
<i>VvKun</i> (XM_002270075.1)	Fwd GATTACTCAACCCACATGAGAGC Rev CAGCCAAATATTGATGTTGTGG

Tableau 4: Amorces utilisées pour l'amplification PCR des séquences codantes VvPin et VvKun.

Nom de l'amorce	Séquence 5'-3'
VvPINHisNterGF	CACCATG <u>CATCACCATCACCATCACGCATCTGAATGTGAAG</u>
VvPINGR	CTATCCGATGGTAGGGACACTGATTACGATGCCGTTTTTCGTC
VvPINGF	CACCATGGCATCTGAATGTGAAGGTAAGAGTTCCTGGCCC
VvPINHisCterGR	CTAGT <u>GATGGTGATGGTGATGTCCGATGGTAGGGACACTG</u>
VvKunHisNterGF	CACCATG <u>CATCACCATCACCATCAC</u> AAGACTACATCGTTTC
VvKunGR	TCAAGCCTTCTTGAACATAACCTTGAAGGGCACATCACTC
VvKunGF	CACCATGAAGACTACATCGTTTCTTTCTCCTTGCTGCTCATTG
VvKunHisCterGR	TCAGT <u>GATGGTGATGGTGATGAGCCTTCTTGAACATAACCTTG</u>

Tableau 5: Séquences des amorces permettant d'insérer les tags 6 Histidines en N ou C terminal des séquences d'intérêt et leur clonage directionnel dans le pENTR™/D-TOPO®. Les séquences nucléotidiques des tags 6 Histidines sont soulignées et les séquences permettant le clonage directionnel dans le pENTR™/D-TOPO® sont représentées en gras.

7. Production hétérologue en *Pichia pastoris*

7.1. Amplification PCR des séquences d'intérêt

Les séquences codantes des gènes *VvKun* et *VvPin* ont été amplifiées par PCR en utilisant une ADN polymérase haute fidélité (Advantage[®]2, Clontech, USA) grâce aux amorces listées dans le tableau 4. La matrice utilisée pour les réactions de PCR est une solution d'ADNc obtenue selon Petit *et al.*, (2009) à partir d'un extrait d'ARN total de feuille de vitroplants de Chardonnay infectées par *B. cinerea*. Les produits d'amplification obtenus sont purifiés à l'aide du kit «Nucleospin[®]Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Allemagne).

7.2. Clonage en pGEM[®]-T Easy

Les fragments purifiés sont intégrés dans le vecteur pGEM[®]-T Easy selon les recommandations du fabricant.

Les bactéries *Escherichia coli* One Shot[®] TOP 10 sont transformées avec les vecteurs pGEMT[®]-T Easy contenant les fragments d'intérêts suivant les préconisations du fournisseur. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg.mL⁻¹) puis criblées par test PCR avec les amorces citées dans le tableau 4. Une extraction d'ADN plasmidique est ensuite réalisée à partir des clones positifs à l'aide du kit Nucleospin[®]Plasmid (Macherey-Nagel, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Les séquences d'intérêt insérées dans les plasmides sont par la suite vérifiées par séquençage (Cf 1.2.3.6).

7.3. Clonage en pENTR[™]/D-TOPO[®]

Les séquences d'intérêt sont amplifiées par PCR, à partir des séquences clonées dans les vecteurs pGEM[®]-T Easy, avec les amorces listées dans le tableau 5. Ces amorces permettent (i) une insertion directionnelle des fragments d'intérêt dans le plasmide grâce à la séquence CACC (en rouge) ainsi que (ii) l'ajout des tags 6 Histidines (en bleu) en N ou C terminal de la séquence. Les amplicons obtenus sont purifiés comme précédemment à l'aide du kit «Nucleospin[®]Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Allemagne) puis intégrés dans le vecteur pENTR[™]/D-TOPO[®] selon les recommandations du fabricant.

Nom de l'amorce	Séquence 5'-3'
VvPINHisNterPF	<u>GAATTC</u> ATGCACCATCACCA
VvPINPR	<u>CGCCGGCG</u> CTATCCGATGGTAG
VvPINPF	<u>GAATTC</u> ATGGCATCTGAATG
VvPINHisCterPR	<u>CGCCGGCG</u> CTAGTGATGGTGAT
VvKunHisNterPF	<u>GAATTC</u> ATGCACCATCACCAT
VvKunPR	<u>CGCCGGCG</u> TCAAGCCTTCTTG
VvKunPF	<u>GAATTC</u> ATGAAGACTACATCG
VvKunHisCterPR	<u>CGCCGGCG</u> TCAGTGATGGTGA

Tableau 6: Séquences des amorces permettant l'insertion des sites de restriction des enzymes EcoRI (GAATTC) et NotI (CGCCGGCG) pour le clonage des séquences d'intérêt avec ou sans tag Histidine en C ou N terminal dans les vecteurs pPIC3K5 et pPIC9K.

Les bactéries *Escherichia coli* One Shot® TOP 10 sont transformées avec les vecteurs pENTR™/D-TOPO® contenant les fragments d'intérêt suivant les préconisations du fournisseur. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB contenant de la kanamycine (100 µg.mL⁻¹) puis criblées par test PCR avec les amorces citées dans le tableau 2. Une extraction d'ADN plasmidique est ensuite réalisée à partir des clones positifs à l'aide du kit Nucleospin®Plasmid (Macherey-Nagel, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Les séquences d'intérêt insérées dans les plasmides sont par la suite vérifiées par séquençage.

7.4. Clonages en pPIC3K5 et pPIC9K

Les plasmides pPIC3K5 et pPIC9K ne possédant pas la technologie Gateway™, il a été nécessaire de réaliser les clonages à l'aide d'enzymes de restriction (EcoRI et NotI). Pour cela, les sites de restriction adaptés ont dû être insérés par PCR avant et après les séquences d'intérêt grâce aux amorces listées dans le tableau 6. Les matrices utilisées pour cette réaction PCR sont les plasmides pENTR™/D-TOPO® contenant les séquences d'intérêt avec ou sans tag 6 Histidines en N ou C terminal. Les amplicons obtenus sont purifiés comme précédemment à l'aide du kit «Nucleospin®Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Allemagne) puis intégrés dans le vecteur pGEM®-T Easy selon les recommandations du fabricant. Les bactéries *Escherichia coli* One Shot® TOP 10 sont transformées avec les vecteurs pGEMT®-T Easy contenant les fragments d'intérêt suivant les préconisations du fournisseur. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg.mL⁻¹) puis criblées par test PCR avec les amorces citées dans le tableau 6.

Une extraction d'ADN plasmidique est ensuite réalisée à partir des clones positifs à l'aide du kit Nucleospin®Plasmid (Macherey-Nagel, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Les séquences d'intérêt insérées dans les plasmides sont par la suite vérifiées par séquençage.

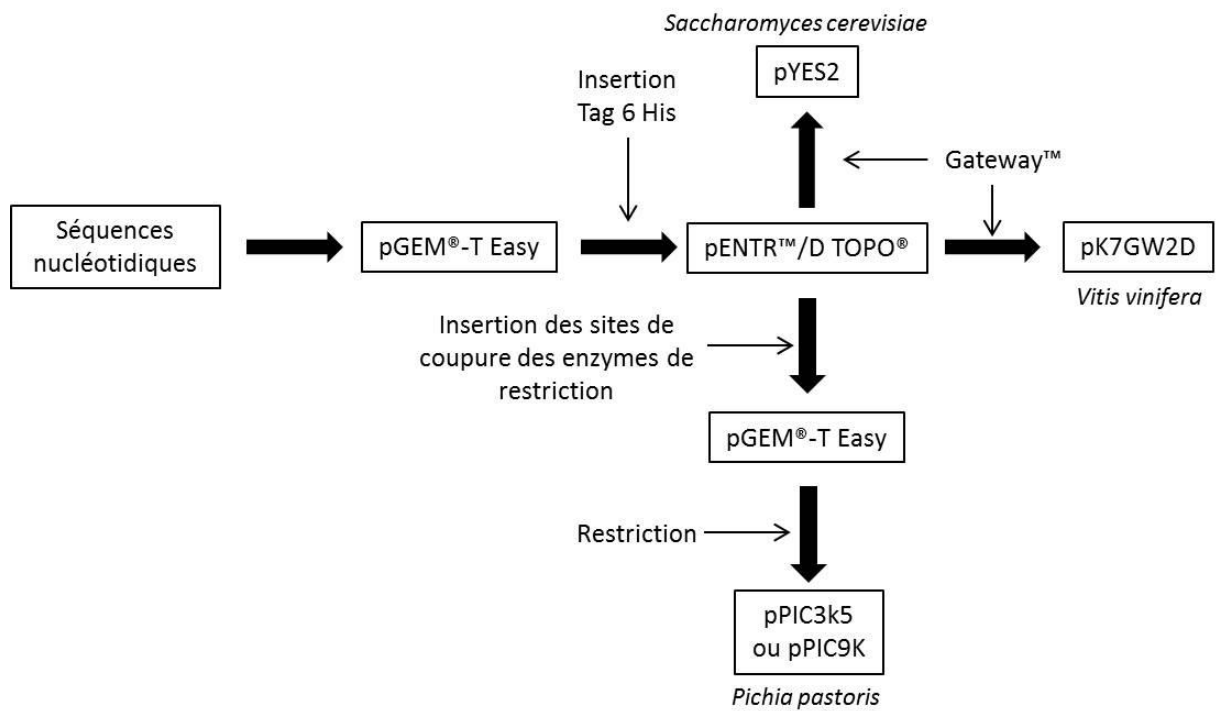


Figure 15: Schéma récapitulatif des différentes étapes de clonages réalisées.

Les plasmides pGEM®-T Easy contenant les fragments d'intérêt ainsi que les sites de restrictions adaptés sont digérés par les enzymes de restriction *EcoRI* et *NotI*. Les fragments de digestion sont ensuite purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Allemagne) après électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments *VvPin* et *VvKun* (avec ou sans tag 6 Histidines en N ou C terminal) sont respectivement insérés dans les vecteurs pPIC9K et pPIC3K5 préalablement digérés par les mêmes enzymes de restriction. La ligation est réalisée avec la T4 DNA ligase (Promega, France) selon les recommandations du fabricant. Les bactéries *Escherichia coli* One Shot® TOP 10 sont transformées avec les vecteurs pPIC9K ou pPIC3K5 contenant les fragments d'intérêts suivant les préconisations du fournisseur. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg.mL⁻¹) puis criblées par test PCR avec les amorces citées dans le tableau 5. Une extraction d'ADN plasmidique est ensuite réalisée à partir des clones positifs à l'aide du kit Nucleospin®Plasmid (Macherey-Nagel, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Les séquences d'intérêt insérées dans les plasmides sont par la suite vérifiées par séquençage.

Un récapitulatif des différentes étapes de clonages réalisées est schématisé dans la figure 15.

7.5. Electrophorèse des acides nucléiques

L'intégrité des acides nucléiques est vérifiée sur gel d'agarose à 1 % (m/v) dissout dans du TAE 0,5 % (40 mM Tris-acétate ; 1 mM EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid), pH8) et additionné de BET (Bromure d'Ethidium) à une concentration de 0,5 µg.mL⁻¹. Les dépôts sont réalisés en ajoutant à l'échantillon 20 % (v/v) de tampon de charge (2 % (p/v) Orange G (Merck Millipore, Allemagne), 50 % de glycérol (v/v), dilué dans de l'eau ultra-pure). La migration est effectuée dans du tampon TAE 0,5 % à 125 V pendant 20 min. Les acides nucléiques sont visualisés puis photographiés sous lumière UV à l'aide du système Gel Doc 2000 (BioRad, France) et la taille des fragments est estimée à l'aide d'un marqueur de taille (100 pb ou 1 kb, BioLabs®, Royaume-Uni).

7.6. Séquençage

Le séquençage des plasmides a été réalisé par la société Beckman Coulter genomics (<http://www.beckmangenomics.com>) en utilisant les amorces M13 sens (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') et M13 anti-sens (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3').

7.7. Préparation de *Pichia pastoris* compétentes

Une colonie de levure *Pichia pastoris* GS115 est étalée sur milieu solide YPD (1 % (p/v) Yeast extract (Sigma-Aldrich®, France), 2 % (p/v) peptone (Duchefa Biochemie), 2 % (p/v) D-glucose, 2 % (p/v) bacto-agar (Becton Dickinson and Company, USA)) puis incubée 48 h à 30°C. Une pré-culture est ensuite réalisée en inoculant 10 mL de milieu YPD liquide avec une seule colonie de *Pichia pastoris*, cette pré-culture est ensuite placée à 30°C sous agitation à 200 rpm pendant une nuit. La densité optique (DO) de la pré-culture est ensuite mesurée à 600 nm afin d'ensemencer une culture de 50 mL de milieu YPD à une DO de 0,1. La culture est placée dans un erlenmeyer à baffles de 250 mL et incubée à 30°C, 200 rpm jusqu'à ce que la DO atteigne 1. Les levures sont ensuite centrifugées à 800 g pendant 5 min. Le culot obtenu est resuspendu dans 8 mL de milieu YPD et 2 mL d'une solution d'HEPES (4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethan Sulfonique à 1 M, pH 8). Un volume de 250 µL de DTT 1 M est ensuite ajouté et mélangé doucement. Cette solution est incubée 15 min à 30°C puis le volume final est ajusté à 50 mL avec de l'eau stérile à 4°C. Les levures sont ensuite centrifugées à 800 g pendant 5 min et lavées avec 25 mL d'eau stérile à 4°C. Après une nouvelle centrifugation de 5 min à 800 g, le culot est resuspendu dans 2 mL de sorbitol 1 M à 4°C puis centrifugé et resuspendu dans 50 µL de sorbitol 1 M à 4°C. La suspension obtenue est directement utilisable pour la transformation par électroporation.

7.8. Transformation de *Pichia pastoris*

Un volume maximum de 5 µL de plasmides pPIC3K5 ou pPIC9K (1 à 10 µg) est ajouté à 40 µL de *Pichia pastoris* compétentes. Le mélange est placé dans une cuve d'électroporation de 2 mm (Eurogentec, France) et conservé dans la glace. L'électroporation est réalisée à l'aide de l'appareil Gene-Pulser®II (Bio-Rad) à 1500 V, 25 µF et 200 Ω.

Immédiatement après cette étape, 1 mL de sorbitol 1 M est ajouté dans la cuve et 200 µL de levures électroporées sont étalés sur milieu YNB-His (0,67 % (p/v) yeast nitrogen base without amino acids (Sigma-Aldrich®, France), 0,192 % (p/v) yeast synthetic drop-out medium supplements without histidine (Sigma-Aldrich®, France), 2 % (p/v) D-glucose, 2 % (p/v) bacto-agar), permettant de sélectionner les levures transformées. Les boîtes sont incubées 2 à 4 jours à 30°C. La transformation est ensuite vérifiée par PCR et les clones positifs sont ensemencés sur milieu YNB-His et incubés 48 h à 30°C.

7.9. Production et purification de la protéine VvKUN hétérologue

Une colonie de levures transformées est mise en pré-culture dans 10 mL de milieu BMGY (1 % (p/v) yeast extract, 2 % (p/v) peptone, 1 % (v/v) glycérol, 1,34 % yeast nitrogen base, et 10 % (v/v) de tampon phosphate 1 M à pH 6) puis placée 24 h à 30°C sous agitation à 200 rpm. Les levures sont culotées par centrifugation 5 min à 800 g et ensemencées dans 50 mL de milieu BMMY dans un erlenmeyer à baffles de 250 mL. La composition du milieu BMMY est la même que celle du milieu BMGY à l'exception du glycérol qui est remplacé par du méthanol à 1 % (v/v). Le méthanol sert ici de source de carbone et permet d'induire l'expression du gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur *AOX1* inductible par le méthanol. Les levures sont mises en culture pendant 72 h à 30°C sous agitation à 200 rpm. Pour maintenir le taux d'expression, 1 % (v/v) de méthanol est ajouté toutes les 24 h de culture. Après 72 h, le milieu est centrifugé 10 min à 5000 g. Le surnageant contenant les protéines sécrétées est concentré 10 fois. Cette étape est réalisée à l'aide de Microsep™ advance centrifugal Device (Pall Corporation, USA) 10 K MWCO.

Les protéines contenues dans le milieu concentré sont ensuite purifiées à l'aide de billes de nickel (Ni Sépharose™ 6 Fast Flow GE Healthcare, France). Deux mL de solution de billes Ni Sépharose sont prélevés et déposés dans une colonne pour que la phase liquide soit éliminée. Les billes sont ensuite lavées avec 5 mL d'eau distillée sous agitation lente pendant 3 min. Une fois l'eau éliminée par écoulement, les billes sont lavées de la même façon avec 5 mL de tampon de fixation (20 mM phosphate de sodium, 0,5 M chlorure de sodium, 20 mM imidazole, pH 7,4). Une fois le liquide éliminé, un volume de tampon de fixation ainsi que 6 mL d'échantillon sont ajoutés aux billes lavées, et le mélange est incubé 1 h sous agitation

Pin	ATGGCATCTGAATGTGAAGGTAAGAGTTCCTGGCCCCGAGCTGGTGGGAGTTCAGGGAGAG	60
PinP	ATGGCTTCTGAGTGCGAAGGTAAGTCCTCTTGGCCTGAGTTGGTTGGAGTTCAAGGTGAA	60

Pin	GTTGCTGCAGAAACCATTAAGAGGGAGAATCCTCATATCACTACTGTTGACATCTTGTTA	120
PinP	GTCGCTGCTGAAACCATCAAGAGAGAGAACCCACACATCACCAGTGTGACATCCTGTTG	120
	** *****	
Pin	GAGGGAACAATCGTTACCCAAGATTTTTACTGCACTAGGGTCCGTGTTTGGGTCGACGAA	180
PinP	GAGGGTACTATCGTTACCCAGGACTTCTACTGCACCAGAGTTAGAGTCTGGGTTGACGAA	180
	***** ** *****	
Pin	AACGGCATCGTAATCAGTGTCCCTACCATCGGATAG	216
PinP	AACGGTATCGTCATCTCCGTCCCAACTATCGGTTAG	216
	***** *****	

Figure 16: Alignement de la séquence nucléotidique de VvPin après optimisation pour l'expression en levure *P. pastoris* par ProteoGenix (PinP) avec la séquence nucléotidique de VvPin (Pin). Un astérisque (*) indique les bases entièrement conservées entre les séquences.

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIL
*RYIADKHNMMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRAYS***KDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYL**
*NGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIE***AIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGG**
*GDHPPKPR***LEVLFQGP****MASECEGKSSWPELVGVQGEVAAETIKRENPHITTVDILLEG****TIVTQDFYCTRV**
RVWVDENGIVISVPTIG

Figure 17: Séquence de la protéine de fusion GST-PIN. La séquence protéique de VvPIN est représentée en gras, celle de la GST en italique et le site de clivage de la protéase PreScission est souligné.

lente à 4°C. Le milieu est ensuite éliminé par gravité (Flowthrough) et les billes sont lavées 3 fois avec 1 mL de tampon d'élution à 100 mM d'imidazole (20 mM phosphate de sodium, 0,5 M chlorure de sodium, 100 mM imidazole, pH 7,4). L'élution est réalisée 6 fois avec 500 µL de tampon d'élution à 500 mM d'imidazole. Chaque fraction d'élution est contrôlée sur gel SDS-PAGE. Les fractions contenant les protéines Kunitz sont regroupées puis concentrées 4 fois à l'aide de Microsep™ advance centrifugal Device (Pall Corporation, USA) 10 K MWCO. Le tampon d'élution est ensuite remplacé par de l'acétate de sodium à 20 mM pH 5,2 grâce aux Microsep™ advance centrifugal Device (Pall Corporation, USA) 10 K MWCO.

7.10. Production de la protéine VvPIN par ProtéoGenix

La production de la protéine hétérologue VvPin au laboratoire ayant échoué, la production de celle-ci par la société ProtéoGenix SAS a été envisagée.

Cette société a tout d'abord synthétisé chimiquement la séquence d'ADNc de VvPin optimisée pour l'expression en levure *Pichia pastoris* (Figure 16).

Une fois synthétisée, la séquence du gène *VvPin* a été clonée dans un vecteur pPIC9K modifié contenant un tag GST. Un site de clivage spécifique à la protéase PreScission a été inséré entre le tag GST et la séquence du gène Pin (Figure 17). Deux souches de *P. pastoris* ont été transformées par électroporation avec ce plasmide, KM71 et GS115. Les tests d'expression ont été réalisés comme précédemment en milieux BMGY/BMMY.

8. Traitements des protéines

8.1. Dosage des protéines

Les protéines purifiées sont dosées à l'aide du kit Uptima BC Assay (Interchim, France) selon les recommandations du fournisseur. La concentration protéique est déterminée suivant une gamme étalon de BSA (Bovin Serum Albumine). La lecture est réalisée au spectrophotomètre à 560 nm. L'absorbance étant proportionnelle à la concentration protéique, celle-ci est calculée grâce à la gamme étalon réalisée.

8.2. Electrophorèse des protéines

Deux systèmes d'électrophorèse ont été utilisés pour séparer les protéines. Le premier est un gel SDS-PAGE (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) 15 %, composé d'un gel de concentration (4,6 % (v/v) acrylamide/bisacrylamide ; 125 mM Tris pH 6,8 ; 0,1 % (v/v) SDS ; 0,08 % (v/v) TEMED ; 0,8 % (p/v) persulfate d'ammonium) et d'un gel de séparation (15 % (v/v) acrylamide/bisacrylamide ; 375 mM Tris pH 8,8 ; 0,1 % (v/v) SDS ; 0,08 % (v/v) TEMED ; 0,08 % (p/v) persulfate d'ammonium) coulés dans le système Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, France). La migration est réalisée à 200 V pendant 1h dans du tampon de migration (25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 0,1 % (v/v) SDS). Le second système utilisé est le système d'électrophorèse horizontale Amersham™ ECL™ (GE Healthcare Life Sciences) utilisant des gels pré-coulés Amersham™ ECL™ Gel 4-20 % (GE Healthcare Life Sciences). La migration est réalisée selon les instructions du fabricant dans du tampon Amersham™ ECL™ Gel Running Buffer (GE Healthcare Life Sciences). Pour les deux systèmes, les échantillons de protéines sont additionnés de tampon Laemmli (80 mM Tris-HCl ; 2 % SDS ; 10 % glycérol ; 0,005 % bleu de Bromophénol ; 10 g.L⁻¹ DTT ; pH 6,8) puis chauffés à 95°C pendant 5 min. La masse des protéines est estimée à l'aide du marqueur de taille Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad, France).

8.3. Coloration des protéines au bleu de Coomassie

Après migration, les gels d'acrylamide sont rincés 3 fois 15 min dans de l'eau ultra-pure puis incubés 1 h sous agitation à température ambiante dans du Gel Code™ Blue Safe Protein Stain (Thermo Scientific, USA). Ils sont ensuite rincés dans des bains successifs d'eau ultra-pure sous agitation à température ambiante.

8.4. Western blot

Après migration, les gels d'acrylamide sont transférés sur des membranes de PVDF (Polyvinylidene fluoride) à l'aide d'un I Blot gel transfer System (Invitrogen™) en suivant les instructions du constructeur. Les membranes sont ensuite incubées 1 h dans du TBS-T (20 mM Tris-HCl ; 500 mM NaCl pH 7,5 ; 0,05 % Tween-20 (v/v)) contenant 3 % (m/v) de lait.

Anticorps primaires			Anticorps secondaires			
Nom	Dilution	Incubation	Nom	Dilution	Révélation	
Anti-His Tag	1/500	1 h	Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody	1/5000	West Pico	
VvCHI4D	1/10000	Température ambiante	Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody	1/10000		
VvKUN (Protéine purifiée)	1/1500					
VvKUN (Echantillons végétaux)		12h 4°C		1/60000	West Femto	
BcAcp						1/3000
BcAsp						1/2000
BcSer	1/5000					

Tableau 7: Conditions d'utilisation des différents anticorps utilisés en Western blot.

Les membranes sont ensuite incubées dans une solution d'anticorps primaires dilués dans du TBS-T Lait 3 % dans les conditions décrites dans le tableau 7, puis une heure dans une solution d'anticorps secondaires dilués également dans du TBS-T Lait 3 % (Tableau 4).

Le signal est détecté par ChemiDoc™ XRS grâce au kit SuperSignal® west pico ou west femto chemiluminescent substrat (Pierce) en suivant les instructions du fabricant.

9. Tests antigerminatifs de la protéine VvKUN sur les conidies de *B. cinerea*

Une suspension conidienne à 10^5 conidies par mL est préparée dans du PDB 12 g.L^{-1} à partir d'une culture solide de *B. cinerea* de 3 semaines. Un volume de cette suspension est ajouté à un volume de protéine hétérologue VvKUN, reprise dans du NaAc 20 mM pH 5,2, à différentes concentrations (50 et $200 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$), d'une solution de rhamnolipides à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, ou de NaAc 20 mM pH 5,2. Ces solutions sont mises en culture en plaque 96 puits à 21°C en présence de lumière ($80 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). La germination des conidies est observée au microscope inversé (Eclipse TE 300, Nikon MicroscopyU, USA) selon une cinétique de temps de 0, 6 et 24 h.

10. Dosages d'activité protéase

10.1. Dégradation de la BSA

Ce test d'activité protéase est réalisé par visualisation de la dégradation de la BSA. Ainsi $100 \text{ } \mu\text{L}$ de solution de protéase à tester sont ajoutés à $200 \text{ } \mu\text{L}$ de tampon citrate/phosphate 100 mM BSA 1 % au pH souhaité. Cette solution est placée à 37°C le temps de la cinétique. Chaque point de la cinétique est réalisé dans des tubes indépendants et en triplicats. La réaction est ensuite arrêtée aux temps voulus par l'ajout de $400 \text{ } \mu\text{L}$ de TCA (Acide Trichloracétique) 7,5 %. Les tubes sont placés 30 min dans la glace et centrifugés 10 min à 1000 g , 4°C afin de culoter les protéines non dégradées. La DO du surnageant est finalement mesurée au spectrophotomètre à 280 nm à l'aide de cuves en quartz.

10.2. *p*NA

Dans une plaque 96 puits, 40 μ L de sécrétome concentré 10 fois sont ajoutés à 150 μ L de *p*NA (*N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe *p*-nitroanilide) (Sigma-Aldrich®, France) puis laissés à température ambiante le temps de la cinétique. La lecture est réalisée au spectrophotomètre à 405nm.

10.3. Azocaséine

L'azocaséine est un produit composé de caséine conjuguée à un colorant azoïque servant de substrat lors de tests d'activité protéase. La dégradation de l'azocaséine par une enzyme va libérer le colorant dans le surnageant qui va pouvoir être analysé par spectrophotométrie (Charney et Tomarelli, 1947).

Le protocole utilisé lors de cette étude est adapté de celui donné par Billon-Grand *et al.*, (2002). Le mélange réactionnel comprend 100 μ L d'extrait enzymatique à tester, 450 μ L de tampon citrate/phosphate au pH souhaité et 50 μ L d'azocaséine (Sigma-Aldrich®, France) (L'azocaséine est diluée dans un tampon Tris/HCl pH 8 à 15 mg.mL⁻¹). Cette solution est placée à 37°C le temps de la cinétique. Chaque point de la cinétique est réalisé dans des tubes indépendants et en triplicats. La réaction est ensuite arrêtée aux temps voulus par l'ajout de 150 μ L de TCA (Acide Trichloracétique) 30 %. Les tubes sont ensuite centrifugés 10 min à 13000 g pour éliminer le substrat non digéré. Un volume de surnageant est ajouté à un volume de NaOH 1M et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 450 nm.

10.4. Les protéases et inhibiteurs de protéases commerciaux

Les protéases commerciales utilisées pour vérifier l'activité inhibitrice des IP sont la pepsine (protéase aspartique), la papaïne (protéase à cystéine) ainsi que la trypsine, la chymotrypsine et la subtilisine (protéases à sérine) (Sigma-Aldrich®, France).

Les inhibiteurs de protéase commerciaux utilisés lors de ces tests sont le PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), la leupeptine et la pepstatine (Sigma-Aldrich®, France), respectivement inhibiteurs de protéases à sérine, de protéases à cystéine et de protéases

aspartiques. Un inhibiteur protéique de type Kunitz (Sigma-Aldrich®, France) a également été utilisé.

11. Tests d'inhibition de la dégradation de protéines

Un μg de protéines à dégrader (BSA ou VvChi4D) est mis en présence des différentes protéases commerciales ou du sécrétome de *B.cinerea*. A ce mélange est ajouté 1 μg de protéines hétérologues VvKun ou VvPin ou encore des IP commerciaux tels que le PMSF, la leupeptine ou la pepstatine (à 0,1 mM final). Le tout est placé dans un tampon citrate/phosphate au pH optimal de l'enzyme testée. Les tubes sont vortexés puis placés à 37°C le temps de la cinétique (0, 30 et 60 minutes). La réaction est stoppée par l'ajout de tampon Laemmli à 2x final. Les échantillons sont stockés à -20°C en attendant leur analyse par western blot ou coloration au bleu de Coomassie.

Chapitre 1

Chapitre 1 : Expression d'inhibiteurs de protéases de vigne au cours du développement et de traitements éliciteurs ainsi que de protéases de *B. cinerea* lors de l'infection de la baie et de la feuille.

Il a précédemment été montré au laboratoire que des protéines PR de la baie sont dégradées lors de l'infection par *B. cinerea* (Manteau, 2003 ; Colas, 2012). L'hypothèse émise lors de cette étude est que celui-ci serait capable de dégrader ces protéines PR grâce à des protéases.

B. cinerea sécrète principalement trois classes de protéases, des protéases aspartiques, des protéases glutamiques et des protéases à sérine (Billon-Grand *et al.*, 2011). La protéase aspartique 8 (*BcAp8* ; BC1G_03070), protéase majoritaire des sécrétomes de *B. cinerea* (ten Have *et al.*, 2010 ; Espino *et al.*, 2010), est capable de dégrader *in vitro* une des protéines PR majoritaire de la baie mûre retrouvée dans le vin (van Sluyter *et al.*, 2013). La protéase glutamique *acp1* (*BcAcp* ; BC1G_14153), seule protéase de cette classe caractérisée chez *B. cinerea*, tout comme une protéase à sérine de type subtilisine (*BcSer* ; BC1G_04708) sont également présentes dans des sécrétomes produits sur milieux synthétiques (Espino *et al.*, 2010 ; Shah *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2012). Ces trois protéases sont aussi exprimées *in planta* lors de l'infection de cotylédons de tournesol par *B. cinerea* (Billon-Grand *et al.*, 2011).

Dans l'hypothèse d'une dégradation des protéines de défense de la baie par des protéases sécrétées par le champignon, des inhibiteurs potentiels de ces protéases ont été recherchés *in silico* chez la vigne. Aucun IP n'est connu pour inhiber les protéases glutamiques. Aussi, la recherche d'IP s'est orientée sur des familles dont des membres sont capables d'inhiber des protéases aspartiques et/ou des protéases à sérine de type subtilisine. Les protéases aspartiques sont potentiellement inhibées par des membres d'une seule famille parmi les huit familles d'IP présentes chez la vigne (tableau 2, introduction), il s'agit de la famille « Kunitz ». Les protéases de type subtilisine quant à elles sont potentiellement inhibées par trois familles d'IP : les « Kunitz », les « Serpins » et les « Potato Inhibitor I ». Deux familles ont été retenues, il s'agit des familles « Kunitz » et « Potato Inhibitor I ».

Malgré la présence de ces inhibiteurs chez la vigne, les protéines PR sont dégradées et la baie reste sensible à l'infection par *B. cinerea*. Dans ce chapitre, nous nous sommes donc intéressés aux raisons pour lesquelles ces inhibiteurs semblent inefficaces lors de cette interaction.

Tout d'abord, les deux IP de vigne choisis lors cette étude ont été étudiés *in silico*. Ensuite, afin de savoir si ceux-ci sont exprimés au niveau des sites éventuels de pénétration et de développement de *B. cinerea*, leur expression a été étudiée par qRT-PCR à la fois dans des baies saines et dans des baies infectées par le champignon. Par la suite, pour savoir si les IP sont exprimés au bon moment lors de l'infection, leur expression ainsi que celle des protéases du champignon ont été étudiées dans des baies naturellement infectées, prélevées au vignoble et dans des conditions d'inoculation artificielle réalisées au laboratoire pour connaître et comparer leur cinétique d'expression respective. Finalement, dans l'hypothèse où les IP seraient exprimés trop tardivement et/ou en quantité insuffisante, leur capacité à être élicités par différentes molécules signal sur baies et sur feuilles de vitroplants a été étudiée. Dans le chapitre suivant, nous étudierons si les IP choisis sont adaptés aux protéases de *B. cinerea* et s'ils sont capables d'inhiber la dégradation de protéines PR par des protéases du champignon.

```

XP_002284447.1 -----MAS-ECEGKSSWPELVGVQGE 20
XP_002284454.1 -----MAS-ECEGKSSWPELVGVQGE 20
XP_002284467.1 -----MAF-ECRGKTSWPELLGVQKA 20
XP_002277808.1 -----MSGPHCFGKQAWPELLGEKAE 21
XP_002269887.1 MADENQRTELPQERPQQSTTIPQEQPHQSTILLPGSVGHPSGVEVAPKTTWPEVVGMTVE 60
                  : . * :***:*

```



```

XP_002284447.1 VAAETIKRENPHITTVDILLEGTIVTQDFY--CTRVRVWVDE--NGIVISVPTIG 71
XP_002284454.1 VAAETIKRENPHITTVDIVLEGTSVTKDFY--CTRVRVWVDE--NGIVISVPTIG 71
XP_002284467.1 VAKATVERENPYVTDVEIVLEGTIVPADLVPVCTRVRVWVDE--SGIVTRVPVVG 73
XP_002277808.1 VAKETIERENPSVR-ARFIKQGHYRTMDYR--CDRVVWVTTEGQTGVVVEVPKVG 73
XP_002269887.1 EAERKIREDMPRVQ-FQVVPNCVFVTMDFN--TRRVRLHVDS--EGKVSRAPRIG 110
                  * .:.: * : . . . * ** :. . * * . * :

```

Figure 18: Alignement des séquences protéiques des membres de la famille des Potato Inhibitor I de vigne. Le motif conservé caractéristique de la famille des Potato Inhibitor I (selon <http://www.genome.jp/tools/motif/>) est grisé. Un astérisque (*) indique les résidus entièrement conservés entre les séquences. Deux points (:) indiquent les résidus ayant des propriétés fortement similaires. Un point (.) indique les résidus avec des propriétés faiblement similaires.

```

VvPin -----MASECE--GKSSWPELVGVQ 18
AtPin -----MFVIVEKNPIQNSNHKNLQ----INTFIQEKMASICEDPGKSSWPELLGAK 47
SlPi1 MESKFAHIIVFFLLATSFETLMARKEIDGPEVIELLKEFDSNLMCE--GKQMWPELIGVP 58
                  ** ** . ***:*.

```



```

VvPin GEVAAETIKRENPHITTVDILLEGTIVTQDFYCTRVRVWVDENGIVISVPTIG 71
AtPin GEDAKEVIERENPKMKAV-IILDGTVVPEIFICSRVYVWVNDGIVVQIPIIG 99
SlPi1 TKLAKEIIEKENPSITNIPILLSGPITLDYLCDRVRLFDNILGFVVQMPVVT 111
      : * * * :*** :. : * :*. * :. : * ** : : * :*:. : * :

```

Figure 19: Alignement des Potato Inhibitor I de vigne (VvPin) d'arabette (AtPin ; AT5G43580) et de tomate (SlPi1 ; XP_004247660.1). Un astérisque (*) indique les résidus entièrement conservés entre les séquences. Deux points (:) indiquent les résidus ayant des propriétés fortement similaires. Un point (.) indique les résidus avec des propriétés faiblement similaires. VvPin possède 58% d'identité avec AtPin et 47% avec SlPi1.

1. Les inhibiteurs de protéases

Dans cette étude, nous avons choisi de ne prendre en compte que les séquences de référence (RefSeq) fournies par le NCBI. En effet, il s'agit de séquences non redondantes représentant une référence stable pour les analyses comparatives.

1.1. VvPin : « Potato Inhibitor I »

Les membres de la famille des « Potato Inhibitor I » sont susceptibles d'inhiber les protéases à sérine dont celles de type subtilisine. Un IP de cette famille (n° accession protéine XP_002284447.1), dont l'expression est induite dans des feuilles de vitroplants infectées par *B. cinerea*, a été identifié au laboratoire (Bézier 2002, Bézier *et al.*, 2007). Celui-ci a tout d'abord été nommé VvPR6. En effet, par comparaison de séquences et aux vues de l'induction de son expression par un agent pathogène tel que *B. cinerea*, il a pu être classé parmi les protéines PR-6.

A ce jour, selon les données fournies par le NCBI, la vigne posséderait 5 gènes codant des protéines de la famille des « Potato Inhibitor I ». Trois d'entre eux, dont VvPr6, sont localisés sur le chromosome 5 (XP_002284447.1 ; XP_002284454.1 ; XP_002284467.1), un sur le chromosome 8 (XP_002269887.1) et un dernier sur le chromosome 13 (XP_002277808.1). Ces cinq protéines appartiennent bien à la famille des « Potato Inhibitor I » car elles possèdent le motif [FYW]-P-[EQH]-[LIV](2)-G-x(2)-[STAGV]-x(2)-A caractéristique de cette famille (Figure 18). VvPR6 a été sélectionné pour cette étude et a été renommé VvPin. Celui-ci possède respectivement 47 % et 58 % d'identité avec les « Potato Inhibitor I » de tomate (SlPI1) et d'arabette (AtPin) (Figure 19), ayant montré un effet contre *B. cinerea* (El Oirdi *et al.*, 2011 ; Laluk *et al.*, 2011). Comme tous les membres de cette famille, VvPIN est une protéine de très petite taille (71 acides aminés) dont la masse moléculaire est estimée à 8kDa.

```

XP_003634322.1 -----MKTTFLLLSFLLVAL-----ATQVAPDPLDNTG 29
XP_003634324.1 -----MYFACTATGYAFPLLRKINIYNEDYACATLLPPLFPTAQAAAPDPVLDTDI 51
XP_002266430.1 -----MKT-TSLLFSLLLIALAVK-----PFSVAAESAPDPVLDTG 36
XP_002266302.2 -----MKT-TLFLFSLLLIALAVK-----PFPVAAESSDPVLDTG 36
XP_002270111.1 -----MKT-TLFLFSLLLIALAVK-----PFPVAAESSDPVLDTG 36
XP_003634323.1 MTTPTFAFRLTTIKT-ISLLLSLLLIALALK-----PFPVAAEAAPDPVLDTG 48
XP_002265965.1 -----MKTSSLLFSLLFLIALAFN-----PLPGAAEAAPDPVLDTG 37
XP_002265535.2 -----MLRLIGAVGYIWLVMMAISSVAQ-----PSNDTNSPVLDTSG 36

XP_003634322.1 KKVQSGXNYYILPVIRGSDGG-ITTSVGNETCPLDVVDXVKALNGLPLTFTSMNPKKG 88
XP_003634324.1 KKLQSGVNYITLPVIRGX-----GNETCSLDFVQDXVEASNGLPLTFTPLNPKKG 101
XP_002266430.1 KKLRSVDYIILPVFRGRGGG-LTLASTGNETCPLDVVQEQQEVSNGLPLTFTPVNPKKG 95
XP_002266302.2 -----GVDYIILPVFRGRGGG-LTLASTGNETCPLDVVQEQQEVSNGLPLTFTPVNPKKG 54
XP_002270111.1 KQLWSGVDYIILPVIRGRGGG-LTLASTGNENCPLDVVQEQHEVSNGLPLTFTPVNPKKG 95
XP_003634323.1 KKLRSVDYIILPVIRRRGGGGLTLASTGKETCPLDVVQEQHEVSNGLPLMFIPVNPCKG 108
XP_002265965.1 KQLRSVDYIILPVIRGRGGG-LTVASVRNKTCPLDVVDKLEVSHGLPLTFTPVNPKQD 96
XP_002265535.2 QALQRGVEYYILPSTNSSGGG-LTLIN-RNGSCPLVYGQEDQASSQGYPTFAFFFEQET 94
: * * * . : . * * . * : : * * : * .. : :

XP_003634322.1 VIRVMTDHIKIFSTTTTCVQSTVWKLDEYDQSTRKLFVTTGGVERNPSIQNLSNWFRIEK 148
XP_003634324.1 VIXLLTDHNIK-SSAATCIQSTVWKLDEYDESIRKLFVTTGGVEGNLSIQTLNWFRIEK 160
XP_002266430.1 VIRVSTDHNIKFSASTICVQSTLWKL-EYDESSGQRFVTTGGVEGNPGRETLDNWFKIEK 154
XP_002266302.2 VIRVSTDHNIKFSASTICVQSTLWKL-EYDESSGQRFVTTGGVEGNPGRETLDNWFKIEK 154
XP_002270111.1 VIRVSTDHNIKFSASTICVQSTLWKL-EYDESSGQRFVTTGGVEGNPGRETLDNWFKIEK 154
XP_003634323.1 VIRVSTDHNIENFSAATICVQSTVWKL-EYDESSGQRFVTTGGVEGNPGRGTLNWFKIEK 167
XP_002265965.1 VIRVSTDHNIKFSATICAQSTVWKL-EYDESTGQRFITTGGVEGNPGRGTLNWFKIEK 155
XP_002265535.2 IIRESRDFSQVFAFTICIQSTAWRLGERDPETQRRILVTGGETG-----YFRIER 145
:* *..: : : * * * * : * * . : : : * * : * : * :

XP_003634322.1 YEDDYKLVFYPT-TCDFCRPICGD-IDIYIQDGYKRLALS-DVPLKVMFKRALSWLISFN 205
XP_003634324.1 YDDDYKLVFCST-VFYFCRPICGDSIDIYIQDGYRHLALS-DVPLKAMLKRA----- 210
XP_002266430.1 YEDDYKLVFCPT-VCDFCKPVCGD-IGIYIQNEYRRLALS-DVPFKVKFKKA----- 203
XP_002266302.2 YEDDYKLVFCPT-VCDFCKPVCGD-IGIYIQNGYRRLALS-DVPFKVMFKKA----- 162
XP_002270111.1 YEDDYKLVFCPT-VCDFCKPVCGD-IGIYIQNGYRRLALS-DVPFKVMFKKA----- 203
XP_003634323.1 YEDDNNLVFCPT-VCDFCKPVCGD-IVYIYIQDGYRRLALS-DVPFKVMFKKA----- 216
XP_002265965.1 YGDDYKLVFCPT-VCNFCVKICRD-VGVYIQGYRRLALTTDAPFRVMFKKA----- 205
XP_002265535.2 NGEGYLAWCPTDVCPICKFDCGS-AGILVENGKRLALD-GPVLSSVFKRA----- 195
:. *. : * . : : : : * * . : . : * : *

XP_003634322.1 ERDVVLECAVITYNARAVRLIEWCFK 231
XP_003634324.1 -----
XP_002266430.1 -----
XP_002266302.2 -----
XP_002270111.1 -----
XP_003634323.1 -----
XP_002265965.1 -----
XP_002265535.2 -----

```

Figure 20: Alignement des séquences protéiques des membres de la famille Kunitz de vigne. Un astérisque (*) indique les résidus entièrement conservés entre les séquences. Deux points (:) indiquent les résidus ayant des propriétés fortement similaires. Un point (.) indique les résidus avec des propriétés faiblement similaires.

```

VvKun MKTTLFLFSLLLIALAVKPPFVAAE-----SSDPVLDTGKQLWSGVDYIILPVI 51
StKun MMKCLFFLCCLLPPIVVSSTFNSQNLIDLPSSEPLPKPVLDNKGKELNPDSSYRIISIG 60
* . * : : . * * : : . * . . : : . * . * * * : * * : . * * : :

VvKun RGRGGG---LTLASTGNENCPLDVVQEQHEVSN-GLPLTFTPVNPKKGIRVSTDHNIK 107
StKun RGALGGDYVLGKSPNSDAPCPDGVFRYNSDVGCSGTPVRFIPLSTN-IFENQLNLIQFNI 119
** ** * : : : : * * . * : : : * * : * * : : . . : : :

VvKun SASTICVQSTLWKL-EYDESSGQRFVTTGGVEGNPGHETLDNWFKIEKYEDD-YKLVFCP 165
StKun PTVKLCVSYTIWKVGNLNAHLRMTLLETGGTIG---QADSSYFKIVKSSNFGYNLLYCP 175
. : . * * : * : * : : : : * * . * : : . : * * * * . : : * : * : *

VvKun T----VCDFCKP--VCGDIGIYIQNGYRRLALS-DVPFKVMFKKA 203
StKun ITPFLCPFCRDDNFCAKGVVVIQNGKRRALVNENPLDVLFFQQV 220
: * * : * : : : * * * * * : * : * : : .

```

Figure 21: Alignement de VvKun avec l'IP de pomme de terre (StKun ; AAM08398.1). Un astérisque (*) indique les résidus entièrement conservés entre les séquences. Deux points (:) indiquent les résidus ayant des propriétés fortement similaires. Un point (.) indique les résidus avec des propriétés faiblement similaires. VvKun possède 34% d'identité avec StKun.

1.2. VvKun : « Kunitz »

Parmi les IP de vigne, seule la famille « Kunitz » comporterait des membres susceptibles d'inhiber des protéases aspartiques. En effet, le seul inhibiteur de protéases aspartiques connu chez les végétaux fait partie de la famille des « Kunitz », et a été identifié chez la pomme de terre (Heibges *et al.*, 2003b).

A ce jour, selon les données fournies par le NCBI, la vigne posséderait 8 gènes codant des protéines de la famille « Kunitz » (Figure 20). Sept d'entre eux sont situés sur le chromosome 17, le dernier quant à lui n'a pas de localisation chromosomique connue. Certains sont identifiés sous le nom Miraculine-like. Les Miraculine-like sont un sous-groupe de la famille des Kunitz présentant une forte homologie de séquence avec les Miraculines, protéines ayant la particularité de transformer un goût amer en goût sucré (Masuda *et al.*, 1995). Le « Kunitz » de vigne présentant le plus d'homologie avec l'inhibiteur de protéases aspartiques de pomme de terre (Heibges *et al.*, 2003b) a été choisi pour cette étude. Celui-ci a été nommé VvKun (n° accession protéine XP_002270111) et partage 34 % d'identité avec l'IP de pomme de terre (Figure 21 ; Heibges *et al.*, 2003b). D'après sa séquence protéique, sa masse moléculaire est estimée à 22kDa avec le peptide signal, et 20 kDa sans celui-ci.

2. Expression des IP dans la baie saine de Pinot Noir

L'expression des deux IP a tout d'abord été suivie au cours de la maturation des baies de Pinot Noir pour déterminer si ceux-ci pourraient constituer des défenses préformées de la baie. Toujours dans ce but, la localisation de leur expression dans la baie mûre a également été étudiée.

2.1. Expression des IP au cours de la maturation de la baie

L'expression de VvPin et VvKun a été analysée dans des baies entières de Pinot Noir récoltées en 2008 à quatre stades de développement (Figure 22). L'expression basale des deux IP au stade BBCH 75, correspondant à des baies vertes de la taille de petits pois, est

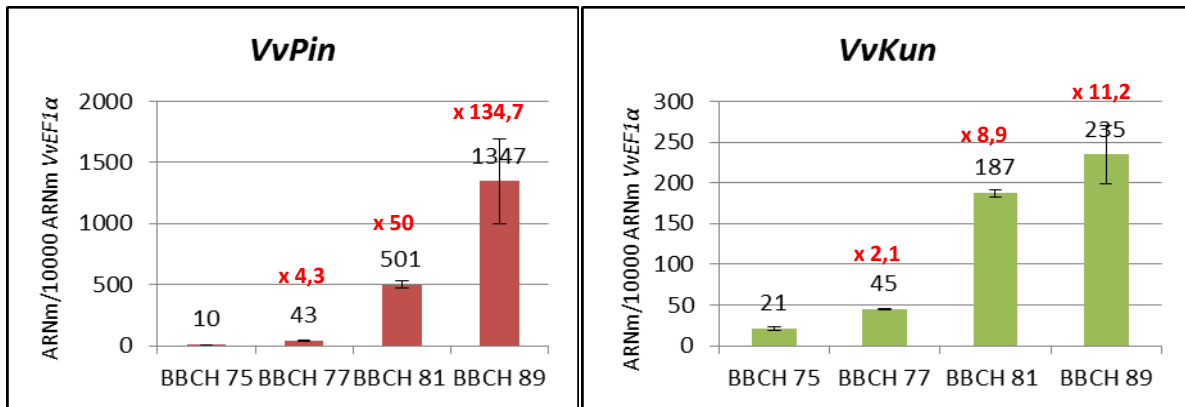


Figure 22: Suivi de l'expression des gènes *VvPin* et *VvKun* par qRT-PCR au cours de la maturation des baies de Pinot Noir (2008). BBCH 75 : Baie verte de la taille d'un petit pois ; BBCH 77 : Fermeture de la grappe ; BBCH 81 : Début de la véraison ; BBCH 89 : Baie mûre. La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en normalisant par rapport au gène *VvEF1α*. Les résultats sont exprimés en nombre de transcrits pour 10000 *VvEF1α*. Les histogrammes représentent la moyenne des duplicats $\pm$ l'écart type. En rouge : Facteurs d'induction par rapport au stade BBCH 75.

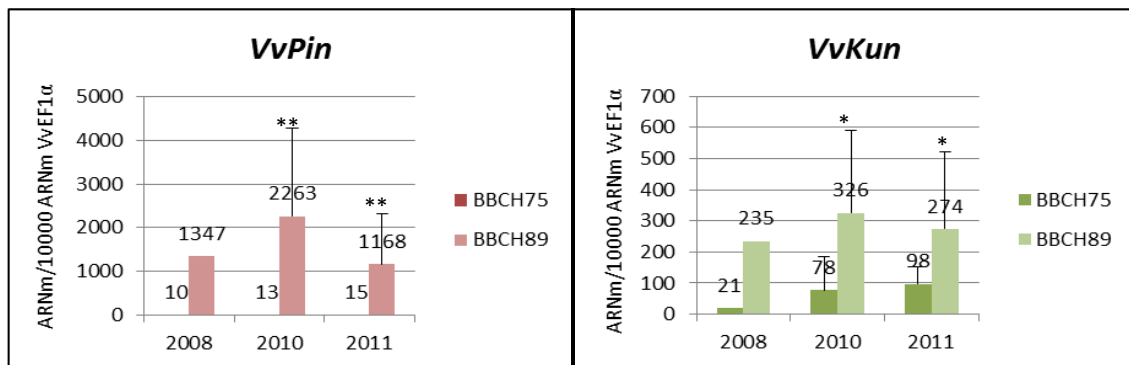


Figure 23: Suivi de l'expression des gènes *VvPin* et *VvKun* par qRT-PCR au cours de la maturation des baies de Pinot Noir sur trois années (2008, 2010 et 2011). BBCH 75 : Baie verte de la taille d'un petit pois ; BBCH 89 : Baie mûre. La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en normalisant par rapport au gène *VvEF1α*. Les résultats sont exprimés en nombre de transcrits pour 10000 *VvEF1α*. Les histogrammes pour 2010 et 2011 représentent la moyenne de 5 à 8 lots $\pm$ l'écart type. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les stades BBCH selon Mann-Whitney (** $P < 0,001$ et * $P < 0,05$).

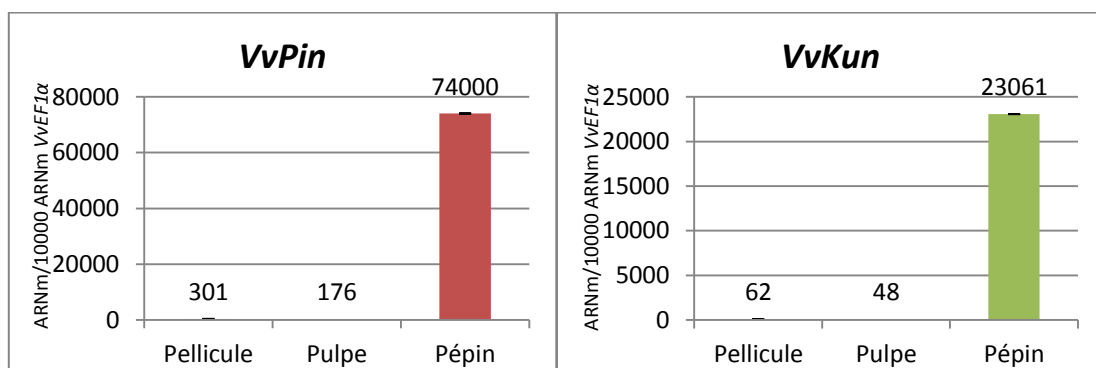


Figure 24: Suivi de l'expression des gènes *VvPin* et *VvKun* par qRT-PCR dans la pellicule, la pulpe et les pépins de la baie mûre de Pinot Noir (2012). La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en normalisant par rapport au gène *VvEF1α*. Les résultats sont exprimés en nombre de transcrits pour 10000 *VvEF1α*. Les histogrammes représentent la moyenne des duplicats $\pm$ l'écart type.

très faible. En effet, seulement 10 et 21 molécules d'ARNm de *VvPin* et *VvKun* respectivement sont détectées pour 10000 molécules d'ARNm de *VvEF1α*. Ce niveau augmente progressivement au cours de la maturation de la baie. Entre le stade BBCH 75 et le stade BBCH 89, l'expression des IP est induite 134,7 fois pour *VvPin* et 11,2 fois pour *VvKun*. Le taux d'expression des deux gènes a été validé sur deux autres années (2010 et 2011) pour les stades BBCH75 (baies vertes petits pois) et BBCH89 (baies mûres) en réalisant 5 à 8 lots différents par modalité (Figure 23). Le taux d'expression basal faible au stade BBCH 75 est confirmé pour *VvPin*. Il est plus élevé et surtout assez variable pour *VvKun* d'un lot à l'autre même au sein d'une même année (Figure 23). Concernant le stade BBCH89, une augmentation de la quantité des ARNm codant les deux IP est mesurée par rapport au stade BBCH75, mais les taux sont là encore assez variables et ce pour les deux IP.

L'expression des IP est donc induite au cours de la maturation de la baie. L'accumulation d'ARNm de *VvPin* est toujours supérieure à celle d'ARNm de *VvKun* au stade BBCH89. Les deux IP pourraient donc faire partie des défenses préformées de la baie mûre. Pour le confirmer, la localisation de leur expression tissulaire au sein de la baie a été étudiée.

2.2. Localisation de l'expression des IP dans la baie mûre de Pinot Noir

Une accumulation des ARNm des deux IP ayant été démontrée dans la baie mûre, l'analyse a été approfondie en différenciant différents tissus de la baie mûre : la pellicule, la pulpe ainsi que les pépins (Figure 24). Les inhibiteurs de protéases sont en effet connus pour être exprimés dans les graines lors de la mise en place des réserves (Cf. III.2.a.).

Par rapport à l'accumulation des ARNm dans la baie mûre complète qui ne donne qu'un aperçu global (Figure 23), l'analyse des différents tissus révèle des différences d'accumulation drastiques (figure 24). L'accumulation des ARNm codant les deux IP est faible dans la pellicule et la pulpe de la baie mûre de Pinot Noir. En revanche elle est très élevée dans les pépins, d'un facteur 250 à 480 fois par rapport à la pellicule/pulpe selon le gène considéré. Ce différentiel d'accumulation entre pellicule/pulpe et pépins a également été mesuré sur un autre prélèvement (Figure 27).

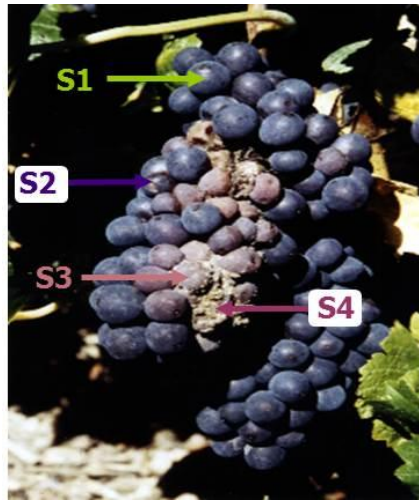


Figure 25: Stades d'infection de baies botrytisées sur une grappe de Pinot Noir : Stade 1 (S1) : Baies saines prélevées sur des grappes infectées ; Stade 2 (S2) : Baies présentant un spot d'infection de 5 à 10 mm de diamètre ; Stade 3 (S3): Baies présentant une perte de couleur et recouvertes d'une quantité importante de conidies ; Stade 4 (S4): Baies complètement flétries.

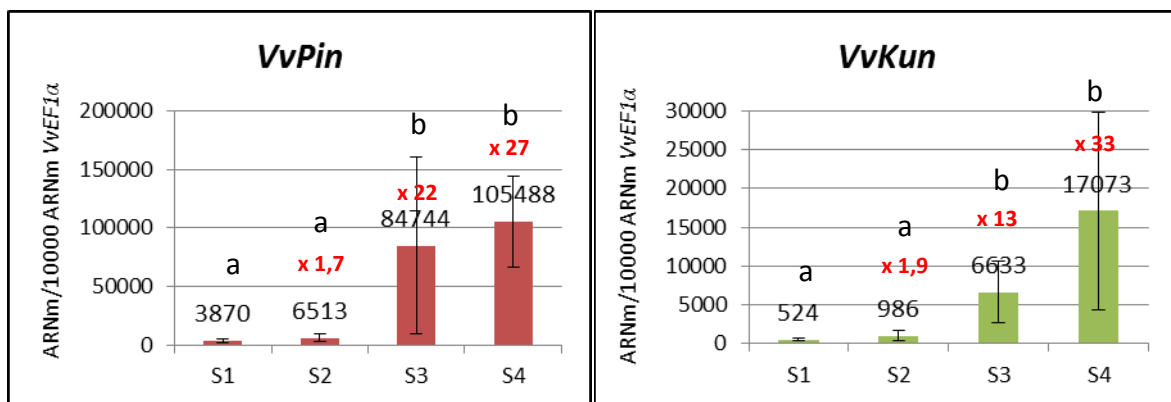


Figure 26: Suivi de l'expression des gènes *VvPin* et *VvKun* par qRT-PCR dans les baies de Pinot Noir infectées naturellement par *Botrytis cinerea* sur quatre années (2008, 2010, 2011 et 2013). La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en normalisant par rapport au gène *VvEF1α*. Les résultats sont exprimés en nombre de transcrits pour 10000 *VvEF1α*. Les histogrammes représentent la moyenne des résultats obtenus sur 5 lots répartis sur 4 années $\pm$ l'écart type. Les histogrammes présentant la même lettre ne présentent pas de moyennes significativement différentes à $P < 0,05$ selon Mann-Whitney. Stades d'infection ; Stade 1 : Baies saines prélevées sur des grappes infectées ; Stade 2 : Baies présentant un spot d'infection de 5 à 10 mm de diamètre ; Stade 3 : Baies présentant une perte de couleur et recouvertes d'une quantité importante de conidies ; Stade 4 : Baies complètement flétries. Expérience réalisée sur des baies de Pinot Noir de 2008, 2010, 2011 et 2013. En rouge : Facteurs d'induction par rapport au stade S1.

Ces résultats mettent en évidence que dans la baie mûre de Pinot Noir, les gènes codant les deux IP sont exprimés en majorité dans les pépins.

3. Expression des IP et des protéases lors de l'infection naturelle des baies de Pinot Noir

L'expression des deux IP ainsi que celle de trois protéases du champignon ont été analysées lors de l'infection de la baie de Pinot Noir. Il s'agissait ainsi de vérifier que les IP s'exprimaient suffisamment tôt par rapport aux différentes protéases pour être potentiellement efficaces.

Par ailleurs, afin de savoir si les IP s'expriment dans les sites stratégiques de pénétration/développement du champignon, leur localisation tissulaire (pépins, pellicule/pulpe) lors de l'infection a également été étudiée.

3.1. Expression des IP dans la baie infectée

L'expression des deux IP a été analysée au cours de l'infection naturelle de la baie de Pinot Noir. Des grappes partiellement botrytisées ont été récoltées au vignoble en 2008, 2010, 2011 et 2013, et les baies ont été réparties en quatre stades d'infection pour l'analyse (Figure 25). Un échantillonnage en 2012 n'a pu être réalisé faute de pourriture grise dans la parcelle de prélèvement cette année-là. Sur les quatre années étudiées, entre le stade S1 et le stade S4, l'expression de *VvPin* est en moyenne induite 27 fois et celle de *VvKun* 33 fois (Figure 26). Aux stades d'infection les plus avancés, S3 et S4, l'accumulation des ARNm codant les deux IP est assez variable d'une année à l'autre ce qui se traduit par des écarts types importants (Figure 26). L'expression des deux IP est donc induite au cours de l'infection de la baie par *B. cinerea*.

Il est à noter que le taux de base des baies mûres saines (Figures 22 et 23) est inférieur au taux retrouvé dans les baies au stade S1 (figure 26). En effet, les résultats obtenus en baies S1 sont 4 et 2 fois supérieurs pour *VvPin* et *VvKun* respectivement par rapport à ceux obtenus en baies saines. Cette différence est probablement due au décalage de temps entre les différents échantillonnages. En effet, les baies botrytisées sont récoltées en moyenne une semaine après les baies mûres saines.

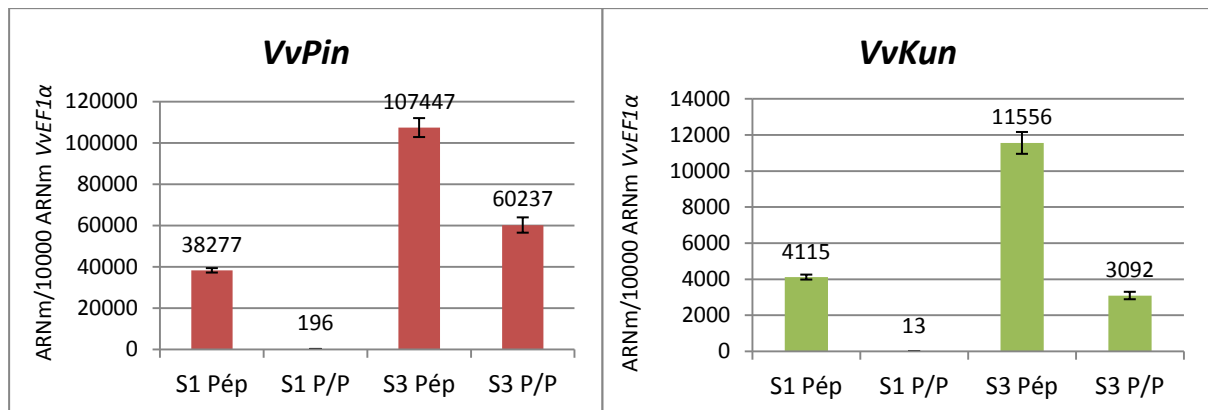


Figure 27: Suivi de l'expression des gènes *VvPin* et *VvKun* par qRT-PCR dans les pépins (Pép) et un mélange pellicule/pulpe (P/P) de baie mûre de Pinot Noir aux stades S1 et S3 (2013). La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en normalisant par rapport au gène *VvEF1α*. Les résultats sont exprimés en nombre de transcrits pour 10000 *VvEF1α*. Les histogrammes représentent la moyenne des duplicats $\pm$ l'écart type. Expérience réalisée sur vingt baies mûres de Pinot Noir botrytisées récoltées au vignoble.

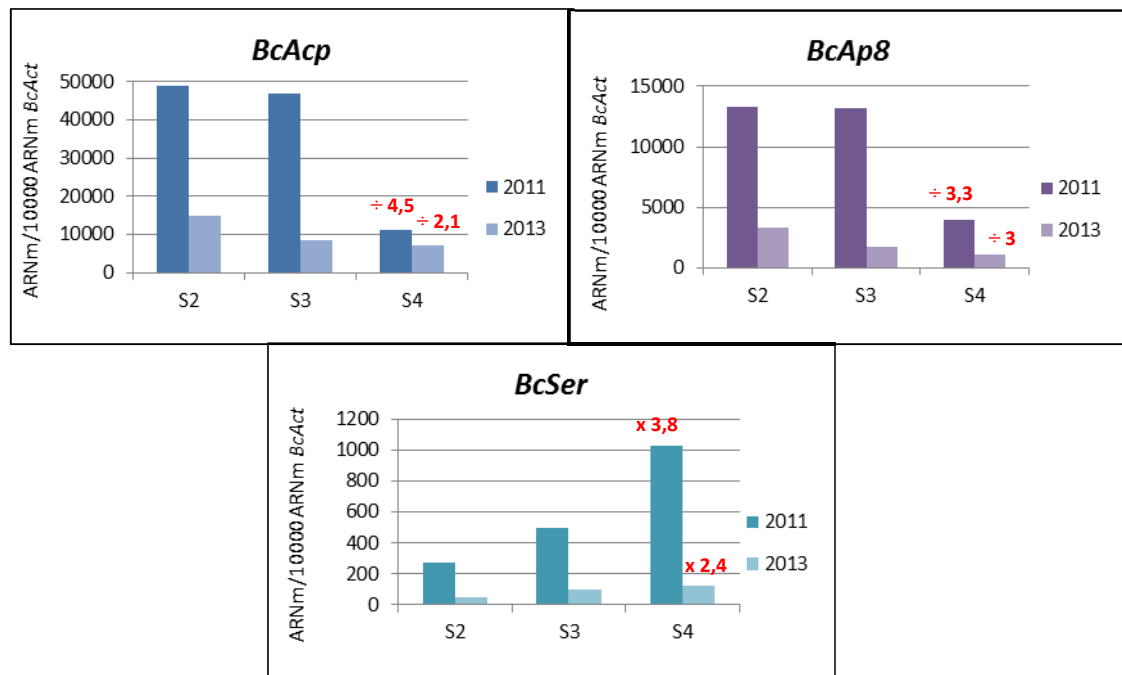


Figure 28: Suivi de l'expression des gènes *BcAcp*, *BcAp8* et *BcSer* par qRT-PCR dans les baies de Pinot Noir (2011 et 2013) infectées naturellement par *Botrytis cinerea*. La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en normalisant par rapport au gène *BcAct*. Les résultats sont exprimés en nombre de transcrits pour 10000 *BcAct*. Les histogrammes représentent la moyenne des duplicats. S2, S3, S4 : Stades d'infection ; Stade 2 : Baies présentant un spot d'infection de 5 à 10 mm de diamètre ; Stade 3 : Baies présentant une perte de couleur et recouvertes d'une quantité importante de conidies ; Stade 4 : Baies complètement flétries. En rouge : Facteur d'induction par rapport au stade S2.

Nous nous sommes ensuite intéressés à distinguer l'accumulation des ARNm codant les deux IP entre les pépins et un mélange pellicule/pulpe de baies sans symptôme (S1) et de baies infectées au stade S3 (Figure 27).

Dans les baies S1, l'accumulation des ARNm de *VvPin* et *VvKun* a lieu principalement dans les pépins (Figure 27), comme dans les baies saines de stade BBCH89 (Figure 24). Dans la baie infectée de stade S3, une accumulation importante des ARNm *VvPin* et *VvKun* est mesurée à la fois dans les pépins et la pellicule/pulpe (Figure 27). Cette accumulation est plus importante dans les pépins que dans la pellicule/pulpe, mais en comparaison au taux mesuré dans les baies S1, au stade S3, l'expression de *VvPin* et *VvKun* n'est induite que 2,8 fois dans les pépins alors qu'elle est induite 200 à 300 fois dans le reste de la baie. L'infection par *B. cinerea* induit donc beaucoup plus fortement l'expression des IP dans la pellicule et la pulpe que dans les pépins. Ce résultat montre que lors de l'infection par le champignon, une accumulation importante des ARNm codant les deux IP s'effectue au niveau des sites de développement de *B. cinerea* que sont la pellicule et la pulpe.

3.2. Expression des protéases de *B. cinerea* lors de l'infection naturelle de la baie de Pinot Noir

L'expression de trois protéases du champignon (*BcAcp*, *BcAp8* et *BcSer*) a été analysée lors de l'infection naturelle de la baie de Pinot Noir sur les années 2011 et 2013 (Figure 28). Entre ces deux années, les taux d'expression des différents gènes étant très variables, nous présenterons ici les résultats obtenus pour les deux années et non une valeur moyennée.

La protéase glutamique *BcAcp* et la protéase aspartique *BcAp8* présentent un profil d'expression similaire, bien que les ARNm de *BcAcp* s'accumulent plus fortement que ceux de *BcAp8*. Le taux d'ARNm de *BcAcp* et *BcAp8* est élevé dès le début de l'infection de la baie (stade S2), se maintient au stade S3 (année 2011) ou diminue légèrement (année 2013) pour atteindre le taux minimum au stade S4. Pour les deux années, le taux des ARNm des deux protéases est de 2 à 4,5 fois inférieur au stade S4 par rapport au stade S2. Contrairement aux deux protéases acides, l'accumulation des ARNm codant la protéase à sérine *BcSer* est faible en début d'infection mais augmente tout au long de celle-ci pour atteindre des niveaux 2,4 à 3,8 fois plus élevés au stade S4.

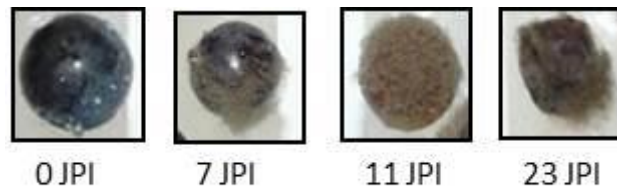


Figure 29: Baies de Pinot Noir (2012) détachées infectées artificiellement par *B. cinerea* souche 630. JPI : Jours post inoculation.

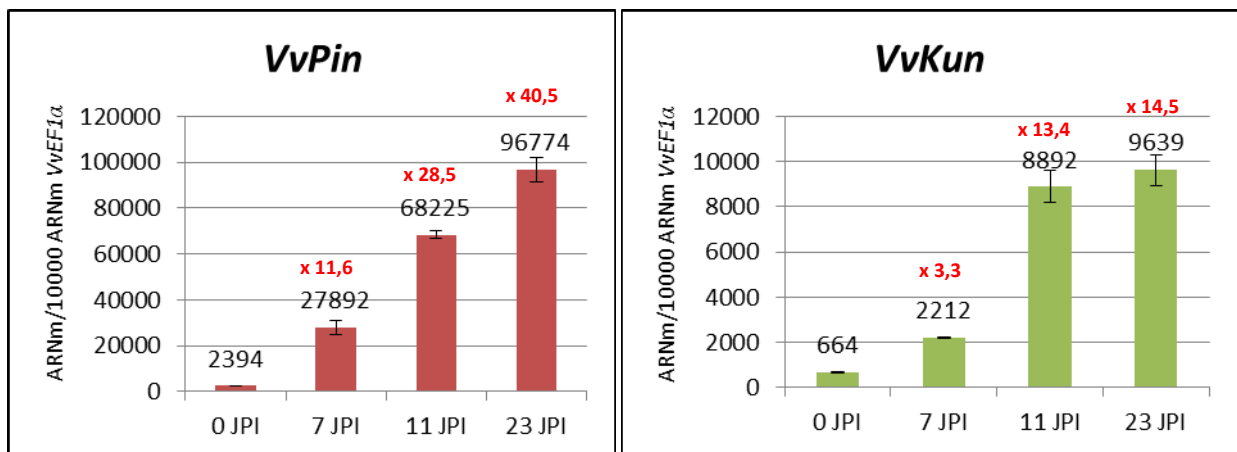


Figure 30: Suivi de l'expression des gènes *VvPin* et *VvKun* par qRT-PCR dans les baies de Pinot Noir (2012) infectées artificiellement par *Botrytis cinerea* souche 630. La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en normalisant par rapport au gène *VvEF1α*. Les résultats sont exprimés en nombre de transcrits pour 10000 *VvEF1α*. JPI : Jours post inoculation. En rouge : facteurs d'induction par rapport à 0 JPI. Expérience réalisée une fois sur 10 baies de chaque stades.

Durant l'infection de la baie de Pinot Noir, les protéases acides sont donc exprimées en premier. La protéase à sérine est quant à elle exprimée en fin d'infection. L'expression des deux IP (Figure 26) est donc induite en même temps que l'expression de la protéase à sérine et après celle des deux protéases acides.

4. Expression des IP et des protéases lors de l'infection artificielle de baies de Pinot Noir

Des baies mûres de Pinot Noir ont été récoltées au vignoble en 2012, année sans pourriture grise dans notre parcelle de prélèvement, et ont été infectées en laboratoire par vaporisation de la surface des baies avec *B. cinerea* souche 630, isolée du vignoble champenois (Giraud *et al.*, 1997 ; Fournier *et al.*, 2003). Cette expérience nous permet d'introduire la notion de temps dans la cinétique d'infection de la baie et de disposer d'une référence *B. cinerea* au temps 0. Les baies à 0 jours post inoculation (JPI) correspondent à des baies congelées juste après inoculation. A 7 JPI, les baies présentent quelques spots d'infection avec sporulation (Figure 29). A 11 JPI, les baies présentent une perte de couleur et sont recouvertes de manière homogène d'une quantité importante de conidies ce qui est comparable au stade S3 du vignoble. A 23 JPI, les baies sont complètement flétries ce qui est comparable au stade S4 du vignoble.

L'expression des deux IP (Figure 30) et celle des protéases de *B. cinerea* (Figure 31) ont donc été étudiées sur ces quatre stades (de 0 à 23 JPI). Néanmoins, cette expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois, il ne s'agit ici que de résultats préliminaires.

A 0 JPI, l'expression des deux IP est comparable à celle retrouvée dans les baies S1 du vignoble (Figure 30). Leur expression est induite dès 7 JPI d'un facteur 11,6 pour *VvPin* et 3,3 pour *VvKun* et ne cesse d'augmenter au cours de l'infection comme observé au vignoble sur les différentes années testées (Cf. Figure 26). A 23 JPI, l'expression de *VvPin* est induite 40,5 fois par rapport à 0 JPI et celle de *VvKun* est induite 14,5 fois.

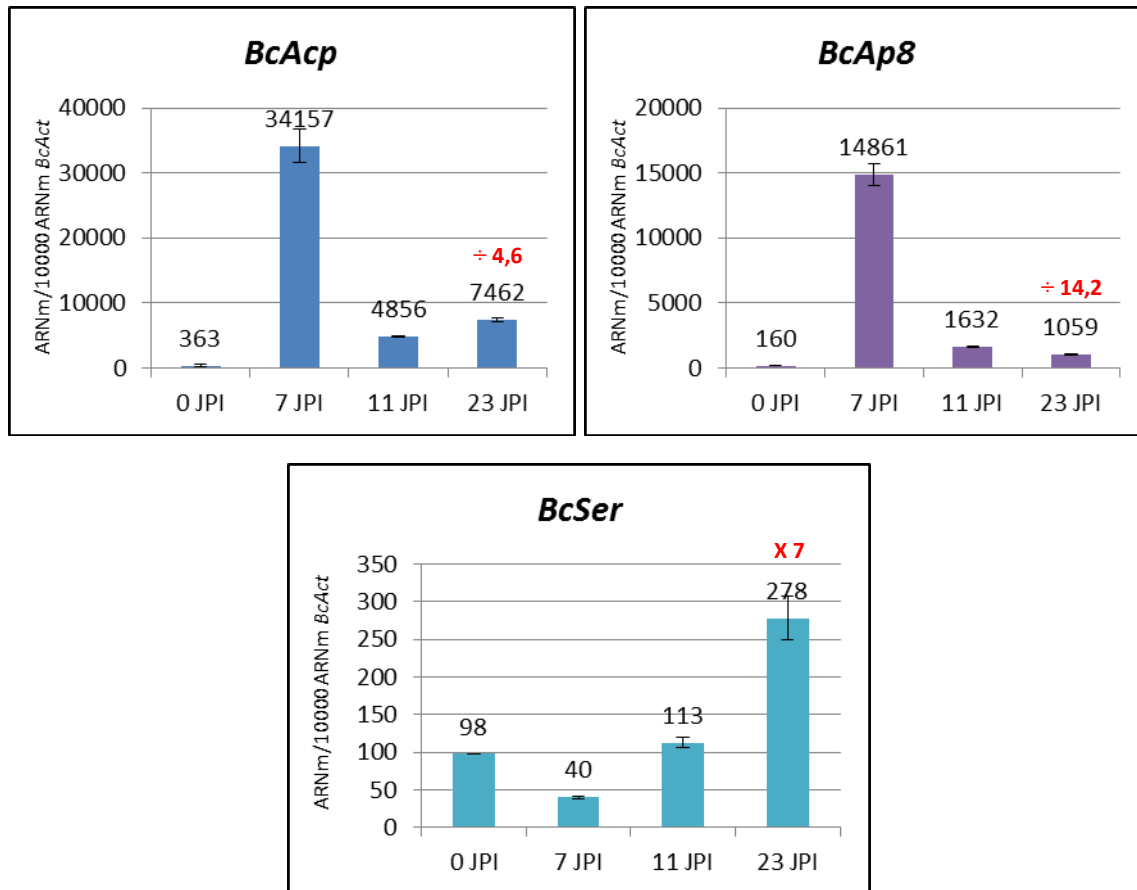


Figure 31: Suivi de l'expression des gènes *BcAcp*, *BcAp8* et *BcSer* par qRT-PCR dans les baies de Pinot Noir (2012) infectées artificiellement par *Botrytis cinerea* souche 630. La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en normalisant par rapport au gène *BcAct*. Les résultats sont exprimés en nombre de transcrits pour 10000 *BcAct*. JPI : Jours post inoculation. En rouge : facteurs d'induction par rapport à 7 JPI.

Concernant les trois protéases de *B. cinerea*, il est à noter que leur expression est déjà détectée au niveau des baies saines seulement inoculées avec les conidies germées (Figure 31). Aussi, leur expression à 0 JPI n'est pas en rapport avec une réaction d'attaque de la part du champignon mais plus probablement avec son développement et notamment sa germination. L'accumulation des ARNm codant la protéase glutamique *BcAcp* et la protéase aspartique *BcAp8* est très importante 7 JPI. Leur quantité chute ensuite à 11 JPI et conserve un taux similaire jusqu'à 23 JPI. Entre le taux maximal à 7 JPI et le taux minimal à 11 ou 23 JPI, l'expression de *BcAcp* chute environ d'un facteur 5 et celle de *BcAp8* d'un facteur 14. Contrairement aux deux protéases acides, les ARNm codant la protéase à sérine *BcSer* sont moins présents à 7 JPI qu'à 0 JPI, puis leur quantité augmente régulièrement pour atteindre un niveau 7 fois plus élevé à 23 JPI qu'à 7 JPI.

Comme dans les baies naturellement infectées au vignoble, durant l'infection artificielle de la baie de Pinot Noir, l'expression des gènes codant les deux protéases acides est précoce et maximale en début d'infection alors que l'expression du gène codant la protéase à sérine est plus tardive et maximale en fin d'infection. Les profils d'induction des gènes codant les deux IP sont similaires et ils sont également comparables à celui du gène codant la protéase à sérine. Aussi, cette méthode d'infection de baies au laboratoire semble assez bien retranscrire les événements mesurés au vignoble mais permet de travailler en conditions contrôlées, que ce soit au niveau de l'inoculum fongique, de la température, de l'humidité ou encore du temps. Cependant, il s'agit ici de résultats préliminaires nécessitant d'être répétés.

5. Expression des protéases et des IP lors de l'infection de feuilles de vitroplants

La composition des baies et des feuilles de vigne étant très différente, un différentiel d'expression des armes d'attaque du champignon, dont celle des protéases, peut être attendu. Aussi, l'expression des protéases du champignon ainsi que celle des inhibiteurs de protéases de vigne ont été suivies lors de l'infection artificielle de feuilles de vitroplants.

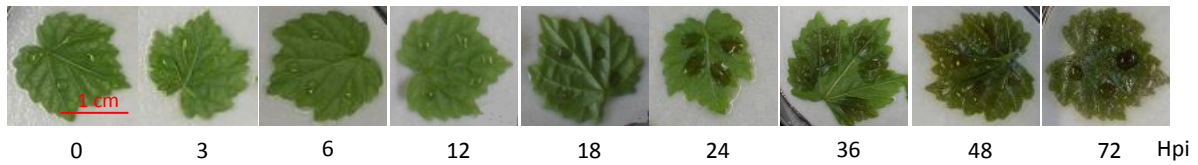


Figure 32: Feuilles de vitroplants détachées infectées par *B.cinerea* souche 630. Infection avec 4 à 5 gouttes de suspension conidienne à 10^5 conidies.mL⁻¹ prégermée pendant 6h. Hpi : Heures post inoculation.

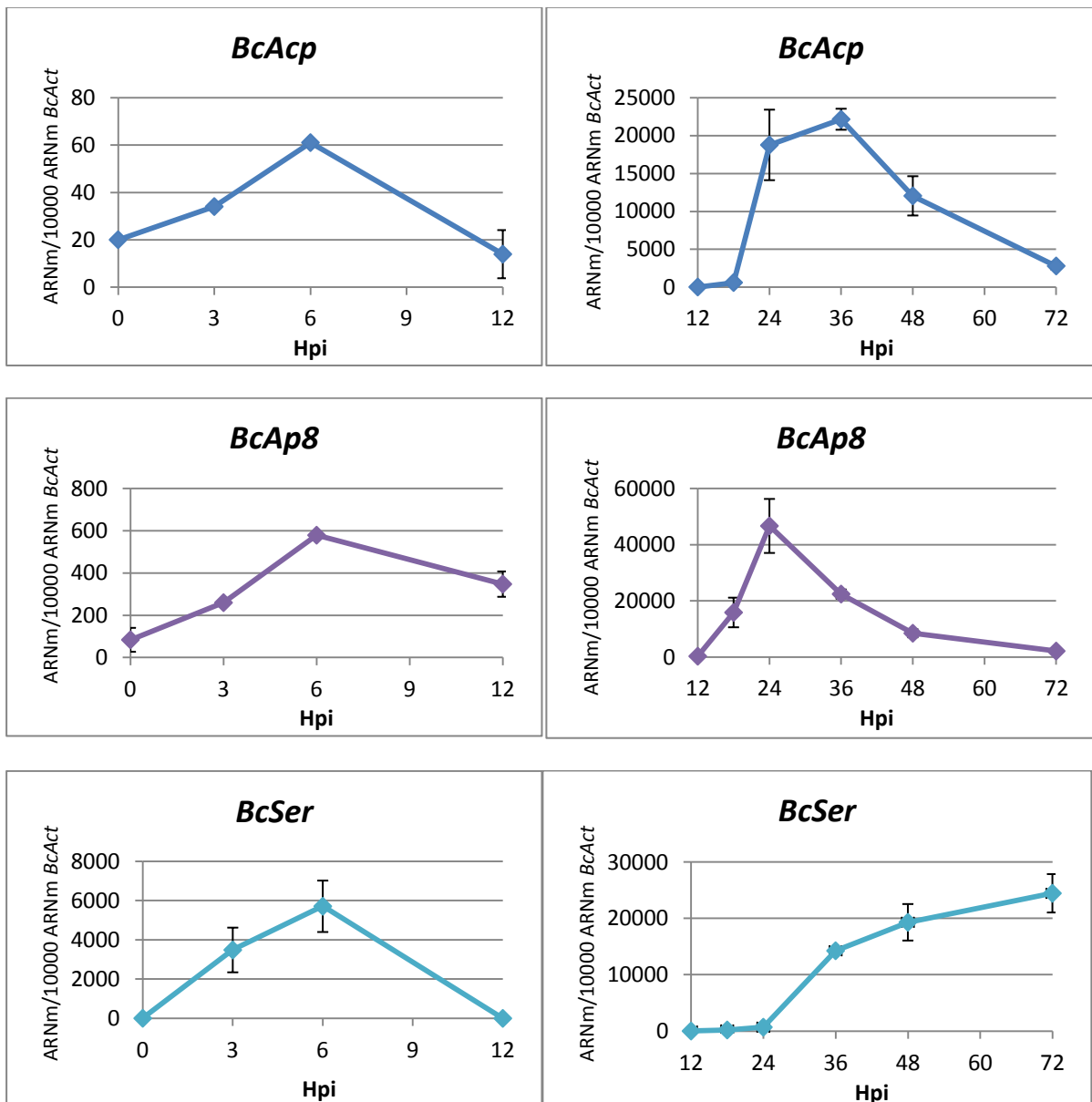


Figure 33: Suivi de l'expression des gènes *BcAcp*, *BcAp8* et *BcSer* par qRT-PCR dans des feuilles de vitroplants détachées infectées par *B.cinerea* souche 630. La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en normalisant par rapport au gène *BcAct*. Les résultats sont exprimés en nombre de transcrits pour 10000 *BcAct*. Les graphiques représentent la moyenne des duplicats $\pm$ l'écart type d'une expérimentation représentative parmi trois. Hpi: Heures post inoculation.

L'utilisation de ce matériel végétal nous a permis d'établir une cinétique de temps très précise permettant notamment de mettre en relation les symptômes avec l'expression des différentes protéases.

La figure 32 montre l'évolution des feuilles de vitroplants lors de l'infection par *B.cinerea* souche 630. Entre 0 et 6 Hpi aucun changement n'est visible. A partir de 12 Hpi, les gouttes contenant les conidies du champignon commencent à devenir brunâtres. A 18 Hpi, les gouttes sont bien brunes et un début de nécrose est observable. A 24 Hpi, les nécroses sont nettes et commencent à dépasser le diamètre de la goutte. A 36 Hpi, les nécroses se sont étendues au-delà de la goutte et mesurent environ 5 mm. A 48 Hpi la feuille est complètement infectée par le champignon et à 72 Hpi le champignon a sporulé.

5.1. Expression des protéases de *B. cinerea* lors de l'infection de feuilles de vitroplants

L'expression des protéases du champignon a été analysée lors de l'infection de feuilles de vitroplant (Figure 33). Cette expérience a été réalisée trois fois et a montré les mêmes tendances globales mais avec des niveaux d'expression très différents. Aussi une seule des trois manipulations sera représentée.

L'expression de la protéase glutamique *BcAcp* est induite lors de l'infection de la feuille de vitroplants. Son taux est minime à 0 Hpi et atteint un premier pic à 6 Hpi où son expression est induite 3 fois par rapport au temps 0 Hpi. Ensuite, son expression diminue jusqu'à 12 Hpi pour revenir à son taux basal. A partir de 18 Hpi, l'expression de *BcAcp* est induite et atteint son maximum à 36 Hpi où son taux est 1107 fois plus important que son taux basal puis, l'expression de *BcAcp* décroît jusqu'à 72 Hpi pour atteindre un niveau 8 fois inférieur au maximum.

L'expression de la protéase aspartique *BcAp8* est également induite lors de l'infection de la feuille de vitroplant. Tout comme *BcAcp*, l'expression de *BcAp8* connaît un pic à 6 Hpi. En effet son expression est induite 7 fois par rapport au niveau basal de 0 Hpi puis, son expression diminue jusqu'à 12 Hpi pour atteindre un niveau 2 fois inférieur. A partir de 18 Hpi, l'expression de *BcAp8* est induite et atteint son maximum à 24 Hpi où son taux est 556

fois plus important que son taux basal. Ensuite, l'expression de *BcAp8* décroît jusqu'à 72 Hpi pour atteindre un niveau 21 fois inférieur au maximum.

L'expression de la protéase à sérine *BcSer* est aussi induite au cours de l'infection de la feuille de vitroplant. Comme les deux protéases acides, l'expression de *BcSer* connaît un pic à 6 Hpi. En effet son expression est induite 817 fois par rapport au niveau basal de 0 Hpi. Ensuite, son expression diminue jusqu'à 12 Hpi pour atteindre un niveau nul. A partir de 24 Hpi, son niveau d'expression augmente progressivement pour atteindre son maximum à 72 Hpi où son taux est 3494 fois plus élevé qu'à 0 Hpi.

Les trois protéases s'expriment donc toutes transitoirement à 6 Hpi alors qu'aucun symptôme n'est observable sur les feuilles. Les deux protéases acides sont ensuite exprimées transitoirement dès 18 Hpi c'est-à-dire au moment où les premières nécroses commencent à apparaître sur les feuilles. Elles atteignent leur maximum d'expression quand la protéase à sérine commence à s'exprimer c'est-à-dire au moment où les nécroses commencent à s'étendre. La protéase à sérine, contrairement aux deux protéases acides, continue à s'exprimer tout au long de l'infection jusqu'à ce que la feuille soit complètement nécrosée et que le champignon sporule.

Comme lors de l'infection de la baie de Pinot Noir, deux phases peuvent être différenciées concernant l'expression de ces trois protéases. Une première phase au cours de laquelle l'expression des deux protéases acides est fortement induite puis une seconde au cours de laquelle leur expression chute pour laisser place à celle de la sérine protéase. Cependant, il est à noter que la protéase à sérine est beaucoup plus exprimée en feuille qu'en baie. En effet son expression est en moyenne induite d'un facteur 7 en baie et d'un facteur 3494 en feuille.

5.2. Expression des IP lors de l'infection de feuilles de vitroplant

L'expression des deux IP a également été suivie pour pouvoir la comparer à celle des protéases de *B. cinerea*.

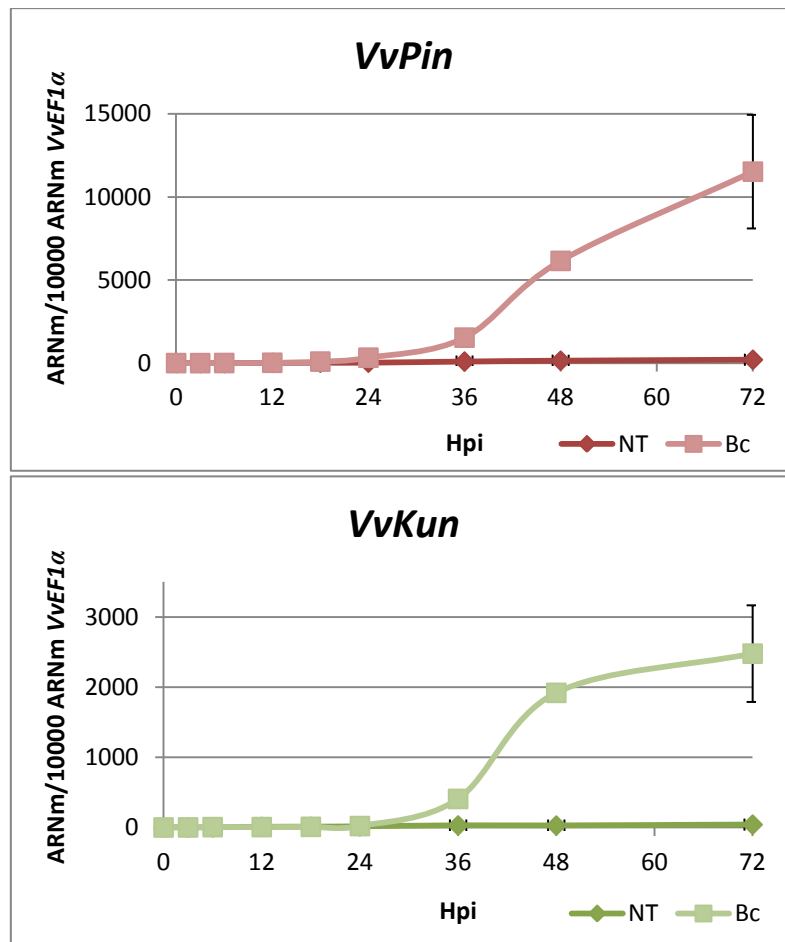


Figure 34: Suivi de l'expression des gènes VvPin et VvKun par qRT-PCR dans des feuilles de vitroplants détachées et infectées (Bc) ou non (NT) par *B.cinerea* souche 630. La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en normalisant par rapport au gène *VvEF1α*. Les résultats sont exprimés en nombre de transcrits pour 10000 *VvEF1α*. Les graphiques représentent la moyenne des duplicats $\pm$ l'écart type d'une expérimentation sur les deux réalisées. NT: Feuilles détachées non infectées; Bc: Feuilles détachées infectées avec *B.cinerea* souche 630.

L'expression de *VvPin* et *VvKun* est très faible dans les feuilles de vitroplants saines (Figure 34). En effet seulement 1 à 3 molécules d'ARNm des deux IP sont présentes dans celles-ci avant l'infection. La mise en survie des feuilles détachées provoque une légère induction des deux IP. En effet, dans les feuilles non traitées (NT), l'expression de *VvPin* est induite 44 fois entre 0 Hpi et 72 Hpi et 13 fois pour *VvKun* (non visible sur la figure 34).

Dans les feuilles infectées par *B.cinerea*, l'expression de *VvPin* et *VvKun* est respectivement induite dès 24h et 36h après l'inoculation avec le champignon. Entre 0 Hpi et 72 Hpi l'expression de *VvPin* est induite 201 fois et celle de *VvKun* 1839 fois. L'expression des deux IP est donc induite en réponse à l'infection par le champignon.

Les deux IP sont donc exprimés en même temps que la protéase à sérine et après les deux protéases acides tout comme dans les baies naturellement infectées et dans les baies infectées au laboratoire.

6. Expression des IP à la suite de traitements éliciteurs

Les résultats obtenus indiquent que les IP auraient à la fois une localisation et une cinétique d'expression non optimales pour pouvoir contrer l'attaque de *B. cinerea* puisque leur expression est initialement localisée dans les pépins et induite après celle des protéases acides du champignon. Aussi, leur capacité à être élicités a été recherchée afin de savoir si leur expression pourrait être induite avant l'infection par le champignon et si oui, par quelle voie de signalisation.

L'expression des deux IP a donc été suivie à la fois sur baies vertes (BBCH 75) et sur baies mûres (BBCH 89) de Pinot Noir en réponse à différents traitements. Ces deux échantillonnages ont été choisis car au vignoble *B. cinerea* attaque préférentiellement les baies mûres. Néanmoins, si les deux IP sont efficaces contre lui, il serait intéressant d'induire leur expression avant même l'infection du champignon c'est-à-dire avant la maturité de la baie.

Un premier traitement consistant en une blessure obtenue par détachement du pédicelle de la baie, a été retenu comme traitement de référence.

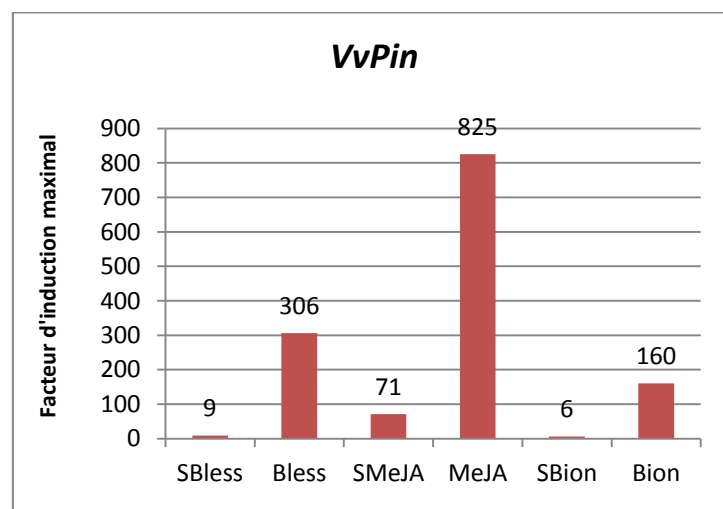


Figure 35: Suivi de l'expression du gène *VvPin* par qRT-PCR dans des baies vertes de Pinot Noir détachées (2011) et traitées avec du MeJA, du Bion ou une blessure. La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en utilisant l'expression du gène *VvEF1α* comme contrôle. Les résultats représentent les facteurs d'induction maximaux obtenus pour les différents traitements par rapport aux baies non traitées d'une expérimentation représentative. MeJA : Methyl Jasmonate ; Bless : Blessure ; SBless, SMeJA, SBion : Témoins correspondant aux différents traitements. Taux de base dans les baies vertes : 17 ARNm/10000 ARNm *VvEF1α* (non illustré).

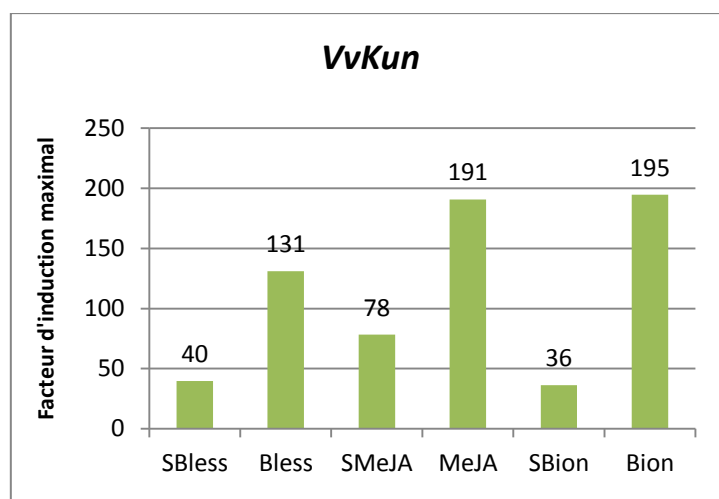


Figure 36: Suivi de l'expression du gène *VvKun* par qRT-PCR dans des baies vertes de Pinot Noir détachées (2011) et traitées avec du MeJA, du Bion ou une blessure. La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en utilisant l'expression du gène *VvEF1α* comme contrôle. Les résultats représentent les facteurs d'induction maximaux obtenus pour les différents traitements par rapport aux baies non traitées d'une expérimentation représentative. MeJA : Methyl Jasmonate ; Bless : Blessure ; SBless, SMeJA, SBion : Témoins correspondant aux différents traitements. Taux de base dans les baies vertes : 129 ARNm/10000 ARNm *VvEF1α* (non illustré).

En effet, les IP étant connus pour répondre à la blessure (Ryan, 1990), ce stress nous permet de savoir si les deux IP choisis dans cette étude réagissent de la même façon que la majorité des IP connus. Les traitements au Bion et au MeJA ont été choisis dans le but de savoir si la voie du SA ou celle du JA est impliquée dans l'expression des deux IP.

Ces tests ont été réalisés sur trois lots de baies collectés sur deux années (2010 et 2011). Les graphiques présentés en figures 35 à 38 montrent les résultats obtenus sur un des deux lots de 2011, ceux des deux autres lots montrant la même tendance mais des niveaux d'expression différents. Ces graphiques représentent l'induction maximale observée, sur une cinétique allant de 0 à 96 hpt, de l'expression des deux IP pour chaque traitement par rapport à des baies non traitées. Leur expression a également été suivie sur feuilles de vitroplants en réponse au MeJA et au Bion afin de savoir si cet organe réagit de la même façon que les baies.

6.1. Expression des IP à la suite de traitements éliciteurs sur baies vertes

Les figures 35 et 36 montrent respectivement l'induction maximale de l'expression de *VvPin* et *VvKun* dans des baies vertes (BBCH 75) de Pinot Noir lors des trois traitements choisis.

Le taux d'expression basal faible observé dans les baies vertes non traitées (résultats non illustrés), soit 17 et 129 molécules d'ARNm pour *VvPin* et *VvKun* respectivement, confirme les résultats illustrés par la figure 23 ainsi que la variabilité d'expression de *VvKun* dans cet organe.

La mise en survie des baies sans traitement préalable (SBless, SMeJA et SBion) semble induire l'expression des deux IP, et plus fortement de *VvKun*. En effet, l'expression de *VvPin* est induite entre 6 et 71 fois dans les différents témoins et entre 36 et 78 fois pour *VvKun*.

L'expression de *VvPin* est induite 306 fois par la blessure, 825 fois par l'exposition au MeJA et 160 fois en présence de Bion par rapport à une baie non traitée. Son expression est donc plus fortement induite par le MeJA que par les deux autres traitements réalisés.

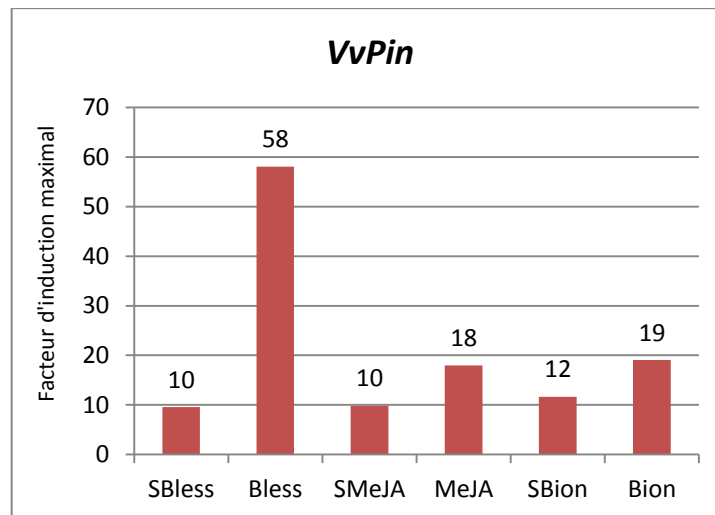


Figure 37: Suivi de l'expression du gène *VvPin* par qRT-PCR dans des baies mûres de Pinot Noir détachées (2011) et traitées avec du MeJA, du Bion ou une blessure. La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en utilisant l'expression du gène *VvEF1α* comme contrôle. Les résultats représentent les facteurs d'induction maximaux obtenus pour les différents traitements par rapport aux baies non traitées d'une expérimentation représentative. MeJA : Methyl Jasmonate ; Bless : Blessure ; SBless, SMeJA, SBion : Témoins correspondant aux différents traitements. Taux de base dans les baies mûres : 610 ARNm/10000 ARNm *VvEF1α* (non illustré).

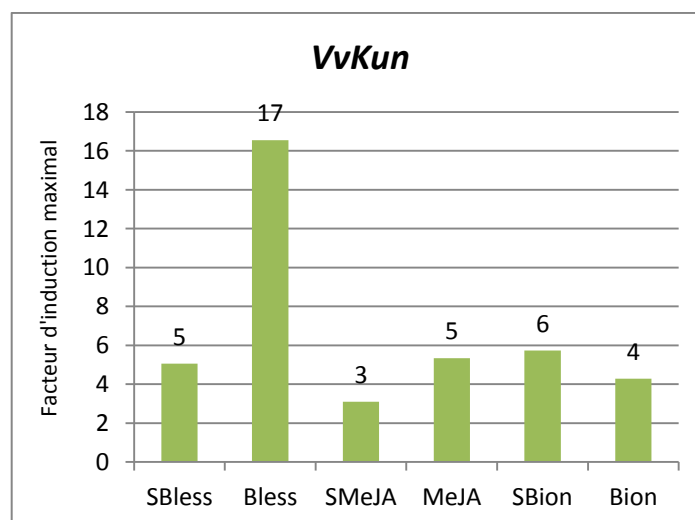


Figure 38: Suivi de l'expression du gène *VvKun* par qRT-PCR dans des baies mûres de Pinot Noir détachées (2011) et traitées avec du MeJA, du Bion ou une blessure. La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en utilisant l'expression du gène *VvEF1α* comme contrôle. Les résultats représentent les facteurs d'induction maximaux obtenus pour les différents traitements par rapport aux baies non traitées d'une expérimentation représentative. MeJA : Methyl Jasmonate ; Bless : Blessure ; SBless, SMeJA, SBion : Témoins correspondant aux différents traitements. Taux de base dans les baies mûres : 178 ARNm/10000 ARNm *VvEF1α* (non illustré).

L'expression de *VvKun* quant à elle est induite 131 fois lors de la blessure, 191 fois par l'exposition au MeJA et 195 fois en présence de Bion par rapport à une baie non traitée. Les inductions maximales ainsi observées sont à peu près équivalentes entre les différents traitements.

En conclusion, les trois traitements, blessure et exposition au MeJA et au Bion, induisent donc l'expression des deux IP *VvPin* et *VvKun* dans la baie verte de Pinot Noir.

6.2. Expression des IP lors de traitements éliciteurs sur baies mûres :

Les figures 37 et 38 montrent respectivement l'induction maximale de l'expression de *VvPin* et *VvKun* dans des baies mûres (BBCH 89) de Pinot Noir lors des trois traitements choisis.

Le taux d'expression basal observé dans les baies mûres non traitées (résultats non illustrés), soit 610 et 178 molécules d'ARNm pour *VvPin* et *VvKun* respectivement, confirme la variabilité d'expression des deux IP dans cet organe (Cf. Figure 23).

Dans la baie mûre de Pinot Noir, l'expression de *VvPin* est induite 58 fois par la blessure. Les deux autres traitements quant à eux ne semblent pas induire l'expression de *VvPin*. En effet, son expression est induite entre 18 et 19 fois par le MeJA et le Bion respectivement alors que leurs témoins respectifs l'induisent entre 10 et 12 fois. L'expression de *VvKun* quant à elle est induite 17 fois par la blessure. Tout comme *VvPin*, les deux autres traitements ne semblent pas induire son expression puisque celle-ci augmente d'un facteur 4 à 5 en présence du Bion et du MeJA respectivement alors que leurs témoins respectifs l'induisent entre 3 et 6 fois.

En baie mûre, l'expression des deux IP ne semble induite qu'en réponse à la blessure et non par les deux molécules signal testées.

L'induction de l'expression des deux IP est beaucoup plus élevée en baies vertes qu'en baies mûres. En effet, l'expression de *VvPin* est induite d'un facteur 306, 825 et 160 en réponse à la blessure, au MeJA et au Bion respectivement en baies vertes alors qu'en baies mûres son expression n'est induite qu'en réponse à la blessure et seulement d'un facteur 58.

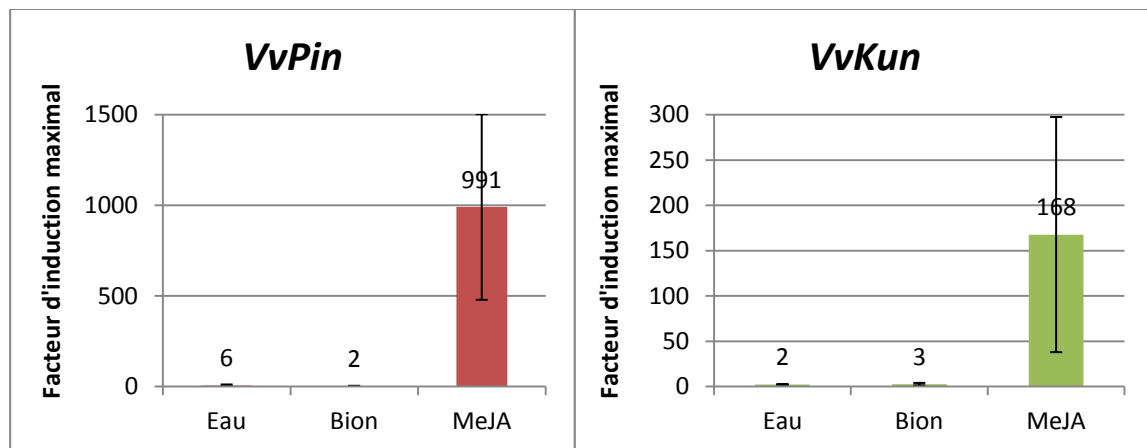


Figure 39: Suivi de l'expression des gènes *VvPin* et *VvKun* par qRT-PCR dans des feuilles de vitroplants traitées avec du Bion ou du MeJA. La quantité de transcrits est calculée à partir de duplicats selon la méthode des courbes standard en utilisant l'expression du gène *VvEF1α* comme contrôle. Les résultats représentent la moyenne des facteurs d'induction maximaux obtenus pour les différents traitements par rapport aux feuilles non traitées de deux répétitions biologiques $\pm$ les écarts types. MeJA : Methyl Jasmonate. Taux de base dans les feuilles de vitroplants : 2 ARNm *VvPin*/10000 ARNm *VvEF1α* et 3 ARNm *VvKun*/10000 ARNm *VvEF1α* (non illustré).

Pour ces trois mêmes traitements, l'expression de *VvKun* quant à elle est induite d'un facteur 131, 191 et 195 en baies vertes alors qu'en baies mûres elle n'est induite que d'un facteur 17 par la blessure et n'est pas induite pour les deux autres traitements.

6.3. Expression des IP à la suite de traitements éliciteurs sur feuilles de vitroplants

L'expression des deux IP a également été suivie sur feuilles de vitroplants en réponse à des traitements éliciteurs tels que le Bion et le MeJA (Figure 39). Le taux d'expression basal extrêmement faible observé dans les feuilles non traitées (résultats non illustrés), soit 2 et 3 molécules d'ARNm pour *VvPin* et *VvKun* respectivement, confirme les résultats illustrés dans la figure 34.

Ainsi, comme le montre la figure 39 représentant les facteurs d'induction moyens obtenus sur deux répétitions biologiques, l'expression de *VvPin* et *VvKun* est fortement induite dans les feuilles de vitroplants traitées au MeJA. En revanche, l'expression des deux IP n'est pas induite dans les feuilles de vitroplants en réponse au traitement par le Bion.

Sur feuille de vitroplants, l'expression des deux IP est donc induite très fortement en réponse au MeJA et non au Bion alors qu'en baies vertes leur expression est induite par ces deux molécules et qu'en baies mûres aucune de celles-ci ne semble efficace.

Discussion

L'expression des deux IP, *VvPin* et *VvKun*, est induite au cours de la maturation de la baie de Pinot Noir. Une variabilité dans leur taux d'expression a été observée lors de la maturation, celle-ci pourrait en partie être expliquée par les échantillonnages réalisés. En effet, les différents stades de développement des baies ont été définis uniquement sur des critères visuels sans prendre en compte les indices de maturation tels que les taux de sucre ou encore de polyphénols.

Dans la baie, l'expression des IP est localisée majoritairement au sein des pépins. Ce résultat de localisation est en accord avec une analyse transcriptomique réalisée sur baies de Cabernet Sauvignon, qui a montré que trois IP, deux Potato Inhibitor I dont *VvPin* et une phytocystatine, sont majoritairement exprimés dans les pépins relativement à la pellicule et à la pulpe (Grimplet *et al.*, 2007).

L'accumulation d'IP dans les pépins au cours de la maturation, peut être mise en relation avec leur rôle potentiel dans la mise en place des réserves de la graine et le contrôle de l'activité protéolytique. Une étude suggère que les protéases responsables de la dégradation des réserves protéiques seraient des protéases à sérine de type subtilases (Schaller *et al.*, 2012). L'accumulation d'IP tels que des Potato Inhibitor I ou des Kunitz, pouvant potentiellement inhiber ce type de protéases, pourrait donc s'expliquer.

En revanche, même s'ils sont accumulés tout au long de la maturation de la baie, *VvPin* et *VvKun* sont naturellement peu exprimés dans la pellicule pourtant lieu privilégié de pénétration du champignon, ce qui laisserait penser qu'ils ne pourraient pas constituer des défenses préformées efficaces. Néanmoins, il n'est pas impossible que *B. cinerea* s'installe très précocement dans la baie. Plusieurs auteurs ont montré qu'il pourrait en effet se développer sur les capuchons floraux sénescents de la fleur et contaminer la base du réceptacle, menant alors à une infection latente (McClellan et Hewitt, 1973 ; Keller *et al.*, 2002 ; Pezet *et al.*, 2003 ; Viret *et al.*, 2004 ; Sanzani *et al.*, 2012). La présence d'IP dans les pépins aurait ainsi un rôle protecteur de la graine dont la fonction principale, rappelons-le, est d'assurer la pérennité et la propagation de l'espèce. Cette dernière peut être réalisée par des animaux qui, en consommant les baies, vont disséminer les pépins.

Les IP pourraient ainsi prévenir leur dégradation par des protéases digestives d'animaux, ou encore de bactéries ou de champignons tels que *B. cinerea*. Pour cela, les IP pourraient faire partie des défenses préformées efficaces des pépins.

L'expression de *VvPin* et de *VvKun* est induite lors de l'attaque de la baie par *B. cinerea*. Ceux-ci peuvent donc bien être considérés comme des protéines PR (van Loon *et al.*, 2006) et plus particulièrement des PR-6 même si initialement cette famille ne comprenait que des « Potato Inhibitor I » (Green et Ryan, 1972 ; van Loon *et al.*, 1994 ; Sels *et al.*, 2006). Lors de l'attaque, l'expression des IP est fortement induite au niveau des sites de pénétration/développement potentiels du champignon que sont la peau et la pulpe. Nous pouvons donc en déduire que *VvPin* et *VvKun* font bien partie des défenses mises en place par la plante lors de l'infection par *B. cinerea*. Néanmoins, l'induction de l'expression de ceux-ci en réponse à l'agent pathogène n'implique pas qu'ils soient efficaces contre *B. cinerea*.

Que ce soit dans la baie infectée naturellement ou artificiellement par *B. cinerea*, ou dans la feuille infectée artificiellement, les deux IP s'expriment en même temps que la subtilisine de *B. cinerea*. Dans ces deux organes, la subtilisine étudiée s'exprime en fin d'infection lorsque l'organe est complètement dégradé. Dans la baie, en plus d'être tardive, l'expression de *BcSer* est très faible, aussi si les IP sont adaptés à l'inhibition de cette protéase, ce qui sera vérifié dans le second chapitre, leur action semble peu adaptée à la défense de la plante.

Pourtant, il a été montré chez la tomate, qu'un « Potato Inhibitor I » (SIPI I) serait potentiellement important dans la résistance face à *B. cinerea* puisque des feuilles sous-exprimant cet IP sont plus sensibles à *B. cinerea* (El Oirdi *et al.*, 2011). Chez l'arabette, des plants sur-exprimant un « Potato Type I » sont plus résistants à *B. cinerea*, alors que des plants sous-exprimant cet IP se sont révélés plus sensibles (Laluk *et al.*, 2011). Néanmoins, la protéine *VvPIN* ne possède que 47 % et 58 % d'identité respectivement avec ces deux IP, ce qui pourrait en partie expliquer leurs différences. De plus, une étude portant sur l'évolution de la famille des « Potato Inhibitor I » a montré qu'il s'agit d'une famille très ancienne d'IP qui a connu des divergences avant même la différenciation entre les monocotylédones et les

eudicotylédones (Beuning *et al.*, 1994), compliquant ainsi les analyses fonctionnelles par comparaisons de séquences des différents membres de cette famille.

L'inhibiteur VvKun a été sélectionné car il pourrait potentiellement inhiber des protéases aspartiques. En effet, il s'agit de l'IP de vigne de la famille « Kunitz » le plus proche de l'IP de pomme de terre, connu pour inhiber des protéases aspartiques. Il a néanmoins été montré que des membres de cette famille, même fortement homologues, peuvent présenter des propriétés inhibitrices différentes (Major et Constabel, 2008 ; Heibges *et al.*, 2003b). Donc même si leurs séquences protéiques sont proches, leurs fonctions peuvent être totalement différentes.

Ici, l'expression de VvKun est induite après celle de la protéase aspartique BcAp8. Aussi, même si VvKun est capable d'inhiber des protéases aspartiques telles que BcAp8, ce qui sera vérifié dans le chapitre 2, son expression semble trop tardive pour pouvoir être efficace.

Dans l'objectif d'induire précocement l'expression des deux IP afin qu'ils soient présents avant l'arrivée des protéases de *B. cinerea*, et de connaître les voies de signalisation responsables de leur expression, des tests d'éllicitation ont été réalisés sur baies et feuilles.

La blessure effectuée sur les baies vertes et les baies mûres de Pinot Noir a été réalisée afin de savoir si les deux IP choisis réagissaient comme la majorité des IP connus dans la littérature (Pautot *et al.*, 1991 ; Doares *et al.*, 1995 ; Koiwa *et al.*, 1997 ; Lawrence *et al.*, 2002 ; Sels *et al.*, 2008 ; Purushottam *et al.*, 2012). Leur expression s'est révélée induite par la blessure en baies mûres et encore plus fortement induite en baies vertes. VvPin et VvKun réagissent donc bien comme des IP. La voie de signalisation associée à la blessure est la voie du JA. L'expression des IP est induite en baies vertes ainsi qu'en feuilles de vitroplants par le MeJA. Une étude a montré que l'expression de VvPin est également induite par le MeJA sur feuilles de boutures de Cabernet Sauvignon (Belhadj *et al.*, 2003). Ce résultat confirme l'association des IP à la voie du JA (Sels *et al.*, 2008) et donc à la défense contre les agents pathogènes nécrotrophes tels que *B. cinerea* (Gatehouse, 2002 ; Glazebrook, 2005 ; Bari et Jones, 2009 ; Rowe *et al.*, 2010 ; Lomate et Hirvale, 2012).

L'expression des IP est induite par le Bion en baies vertes, ce qui signifie que les deux IP seraient également induits par le SA dans cet organe. Ce résultat semble surprenant car le

SA est connu comme étant un antagoniste de la voie du JA (Glazebrook, 2005 ; Bari et Jones, 2009 ; Pieterse *et al.*, 2009), voie de signalisation associée aux IP (Sels *et al.*, 2008). De plus, une étude a récemment montré que l'expression de *VvPin* serait réprimée par le Bion en feuilles de boutures de Cabernet Sauvignon (Dufour *et al.*, 2013). Le fait que l'expression des IP soit induite en baies vertes à la fois par le MeJA et le Bion semble confirmer une interconnexion des voies de signalisation dépendant du JA et du SA.

Le MeJA induit l'expression des deux IP en baies vertes, sur feuilles de vitroplants mais non en baies mûres, mais aussi l'expression de *VvPin* en cultures cellulaires (Bordiec *et al.*, 2011). Le Bion quant à lui induit l'expression des deux IP en baies vertes et de *VvPin* en cultures cellulaires (Bordiec *et al.*, 2011) mais il n'induit pas l'expression des deux IP sur feuilles de vitroplants et en baies mûres. La réaction face aux molécules signal appliquées semble donc dépendre de la nature ainsi que de l'âge de l'organe concerné, ce qui est en accord avec Bari et Jones (2009).

Le profil d'expression des trois protéases de *B. cinerea* (BcAp8, BcAcp et BcSer) est constant quel que soit l'organe infecté. En effet, que ce soit sur feuille ou sur baie, les deux protéases acides, *BcAcp* et *BcAp8*, sont exprimées transitoirement en début d'infection tandis que la protéase à sérine *BcSer* est exprimée en fin d'infection. Notons que cette dernière est nettement moins exprimée dans les baies que dans les feuilles infectées. La protéase glutamique BcAcp et la protéase aspartique BcAp8 ont un pH optimal acide alors que BcSer a un pH optimal plutôt alcalin (Billon-Grand *et al.*, 2011). Les trois protéases ne peuvent donc pas être actives simultanément. Deux phases ont ainsi pu être mises en évidence lors de l'infection de feuilles de vitroplants et de baies : une première phase dite acide qui permettrait l'expression de *BcAp8* et *BcAcp* et une seconde phase dite alcaline, qui permettrait l'expression de la subtilisine *BcSer*. La différenciation de ces deux phases est moins nette lors de l'infection de la baie car la subtilisine est moins exprimée dans cet organe.

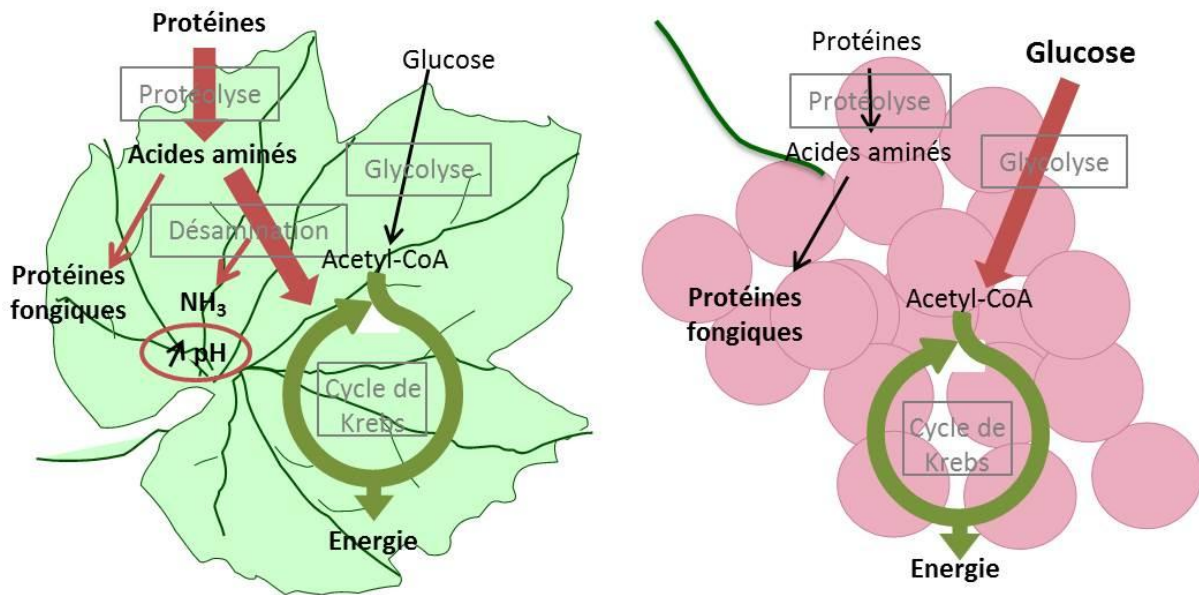


Figure 40: Modèle proposé des voies métaboliques impliquées dans la production d'énergie mises en jeu lors de l'infection de la feuille ou de la baie par *B. cinerea*.

Dans la feuille, la principale source de carbone du champignon, le glucose, est très peu présente. Pour pouvoir produire de l'énergie via le cycle de Krebs, *B. cinerea* doit trouver une autre source de carbone. Celle-ci peut provenir de la dégradation des protéines de la plante par des protéases du champignon. Les acides aminés ainsi libérés sont utilisés pour la production de protéines fongiques et une autre partie est dégradée par désamination. Ce processus mènerait à la formation d'ammoniac (NH_3) (St Leger *et al.*, 1999) dont l'accumulation provoque une alcalinisation de la feuille et de molécules intermédiaires pouvant entrer dans le cycle de Krebs et donc fournir de l'énergie. En l'absence de glucose, le champignon dégraderait donc majoritairement les protéines et provoquerait une alcalinisation. Dans notre étude, les deux protéases acides BcAp8 et BcAcp seraient donc exprimées en début d'infection pour dégrader les protéines afin de produire des protéines fongiques. Par la suite l'accumulation d'ammoniac entraînant une augmentation du pH, les protéases acides ne pourraient plus s'exprimer et laisseraient leur place à la subtilisine pour laquelle les conditions seraient devenues optimales (St Leger *et al.*, 1999 ; Yike, 2011).

Dans la baie, le glucose n'est pas limitant, et sa métabolisation par la glycolyse puis le cycle de Krebs produirait l'énergie nécessaire à la survie du champignon. La dégradation des protéines en acides aminés par les protéases du champignon serait donc uniquement réalisée afin de produire de nouvelles protéines fongiques. Les acides aminés n'étant plus désaminés, il n'y aurait plus de production d'ammoniac et donc pas d'alcalinisation du pH dans la baie. Cela pourrait expliquer pourquoi la subtilisine BcSer ne s'exprime que très peu lors de l'infection de la baie.

Afin d'expliquer l'existence de ces deux phases dans la baie et dans la feuille, le modèle suivant est proposé et décrit dans la figure 40.

Dans la feuille (Figure 40), la principale source de carbone du champignon, le glucose, est très peu présente. Pour pouvoir produire de l'énergie *via* le cycle de Krebs, *B. cinerea* doit trouver une autre source de carbone. Celle-ci peut provenir de la dégradation des protéines de la plante par des protéases du champignon. Les acides aminés ainsi libérés sont utilisés pour la production de protéines fongiques et une autre partie est dégradée par désamination. Ce processus mènerait à la formation d'ammoniac (NH_3) (St Leger *et al.*, 1999), dont l'accumulation provoque une alcalinisation de la feuille, et de molécules intermédiaires pouvant entrer dans le cycle de Krebs et donc fournir de l'énergie. En l'absence de glucose, le champignon dégraderait donc majoritairement les protéines et provoquerait une alcalinisation. Dans notre étude, les deux protéases acides BcAp8 et BcAcp seraient donc exprimées en début d'infection pour dégrader les protéines afin de produire des protéines fongiques. Par la suite, l'accumulation d'ammoniac entraînant une augmentation du pH, les protéases acides ne pourraient plus s'exprimer et laisseraient leur place à la subtilisine pour laquelle les conditions seraient devenues optimales (St Leger *et al.*, 1999 ; Yike, 2011). De plus, l'expression de *BcAcp* étant réprimée par les sources métabolisables de soufre et d'azote produites par la dégradation des acides aminés, le sulfate et l'ammoniac, il n'est pas surprenant de voir son expression chuter en fin d'infection (Rolland *et al.*, 2009).

Dans la baie (Figure 40), le glucose n'est pas limitant, et sa métabolisation par la glycolyse puis le cycle de Krebs produirait l'énergie nécessaire à la survie du champignon. La dégradation des protéines en acides aminés par les protéases du champignon serait donc uniquement réalisée afin de produire de nouvelles protéines fongiques. Les acides aminés n'étant plus désaminés, il n'y aurait plus de production d'ammoniac et donc pas d'alcalinisation du pH dans la baie. Cela pourrait expliquer pourquoi la subtilisine *BcSer* ne s'exprime que très peu lors de l'infection de la baie.

Les protéases sécrétées par les champignons jouent un rôle important dans leur nutrition (Yike, 2011). Il a été montré récemment que la protéase aspartique 8 de *B. cinerea* est capable de dégrader une protéine PR de vigne de la classe des chitinases (VvChi4D ; van

Sluyter *et al.*, 2013). Nous pouvons nous demander si la dégradation de cette protéine, impliquée dans la défense de la plante, est une réaction de défense de la part du champignon pour prévenir l'action néfaste de celle-ci ou est simplement liée à sa fonction de nutrition. Un mutant de *B. cinerea* ne produisant plus la protéase aspartique 8, ne s'est pas révélé moins virulent que la souche sauvage, aussi bien sur feuilles que sur fruits (ten Have *et al.*, 2010). Cette protéase ne semble donc pas indispensable aussi bien à la survie qu'à la virulence du champignon. Aussi, la dégradation de la chitinase par la protéase aspartique 8 ne semble pas indispensable à l'infection de *B. cinerea*. Néanmoins, on peut se demander si chez ce mutant, d'autres protéases, telles que la protéase glutamique BcAcp1 ou les autres protéases aspartiques, ne pourraient pas compenser cette perte aussi bien au niveau de la nutrition que de la virulence.

Conclusion:

Deux inhibiteurs de protéases ont été sélectionnés lors de cette étude, *VvPin* et *VvKun*, faisant respectivement partie des familles des Potato Inhibitor I et des Kunitz. Ces familles peuvent potentiellement inhiber des protéases aspartiques et des subtilisines connues pour être produites par *B. cinerea* (Billon-Grand *et al.*, 2011).

L'expression de *VvPin* et *VvKun* est principalement localisée au sein des pépins de la baie mûre de Pinot Noir. Ils sont de ce fait naturellement éloignés des zones de pénétration et de développement privilégiées du champignon que sont la peau et la pulpe. Lors de l'attaque de la baie par *B. cinerea*, ceux-ci sont toutefois exprimés dans ces zones et sont donc idéalement localisés. Néanmoins, l'expression des deux IP est induite après l'expression de deux protéases acides de *B. cinerea*, *BcAp8* et *BcAcp*, mais en même temps que celle d'une protéase à sérine, *BcSer* que ce soit en baies ou en feuilles.

Dans l'objectif d'induire précocement l'expression des deux IP afin qu'ils soient présents avant l'arrivée des protéases de *B. cinerea*, et de connaître les voies de signalisation responsables de leur expression, des tests d'élicitation ont été réalisés sur baies et feuilles. Ceux-ci ont montré que l'expression des deux IP est induite par le Bion et le MeJA dans les baies vertes, uniquement par le MeJA dans les feuilles de vitroplants et par aucune de ces molécules dans les baies mûres.

Chapitre 2

Chapitre 2 : Les inhibiteurs de protéases de vigne sont-ils adaptés aux protéases sécrétées par *B. cinerea* lors de l'infection et peuvent-ils empêcher la dégradation d'une des protéines PR majoritaires de la baie de raisin par les protéases fongiques?

D'après le premier chapitre de notre étude, des protéases acides (BcAp8 et BcAcp) ainsi qu'une protéase à sérine (BcSer) sont exprimées par *B. cinerea* lors de l'infection de la baie et de la feuille. Afin de savoir si VvPin et VvKun sont capables d'inhiber ces protéases, une approche *in vitro* a été envisagée par confrontation des IP aux protéases fongiques. Pour cela, les deux IP de vigne ont été produits en système hétérologue dans la levure *Pichia pastoris*. Leur fonctionnalité a été vérifiée sur des protéases commerciales correspondant aux différentes familles de protéases. Concernant les protéases de *B. cinerea*, leur production en système hétérologue nécessitant trop de temps et leur purification à partir de sécrétomes fongiques étant très fastidieuse, la production de différents sécrétomes exprimant les différentes protéases a été envisagée. Deux sécrétomes ont donc été obtenus, l'un contenant des protéases acides et l'autre des protéases à sérine.

Lors de l'infection de la baie, une des deux protéines PR majoritaires de la baie de Pinot Noir, la chitinase VvChi4D est dégradée (Thèse Sébastien Manteau, 2003). Une étude menée au laboratoire a montré que cette même chitinase, produite en système hétérologue, est dégradée *in vitro* par des protéases aspartiques de *B. cinerea* (Thèse Steven Colas, 2012). Récemment, il a également été montré que cette chitinase, issue de la baie et retrouvée dans le vin, est dégradée par la protéase aspartique 8 de *B. cinerea* produite en système hétérologue (van Sluyter *et al.*, 2013). Les protéases aspartiques semblent donc jouer un rôle important dans la dégradation de la chitinase par *B. cinerea*. Néanmoins, d'autres protéases pourraient être impliquées dans sa dégradation. Il a été montré chez la pomme de terre qu'une protéase à sérine de type subtilisine de *Fusarium eumartii* est capable de dégrader une chitinase ainsi qu'une glucanase (Olivieri *et al.*, 2002). Nous avons donc étudié si des protéases à sérine (telles que BcSer) pourraient également intervenir dans la dégradation de VvChi4D.

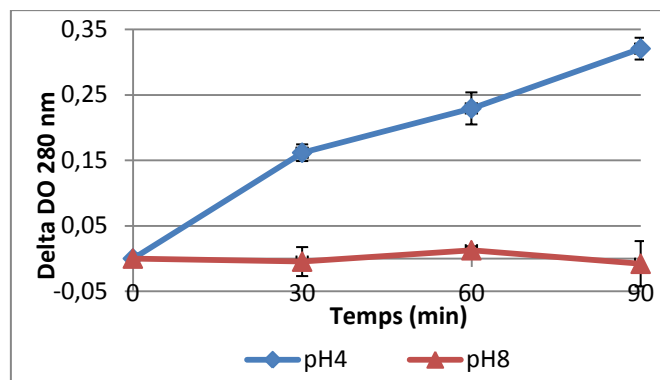


Figure 41: Activité protéase globale à pH 4 et à pH 8 (dosage BSA) du sécrétome « acide » de *B. cinerea* souche 630. Le sécrétome « acide » à 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ final est mis au contact d'une solution de BSA à 1% reprise dans du tampon citrate/phosphate à pH 4 ou pH 8. Les résultats représentent la moyenne de triplicats d'un même sécrétome $\pm$ l'écart type et sont exprimés en évolution de la DO par rapport au temps 0 min. La manipulation a été réalisée deux fois sur des sécrétomes différents.

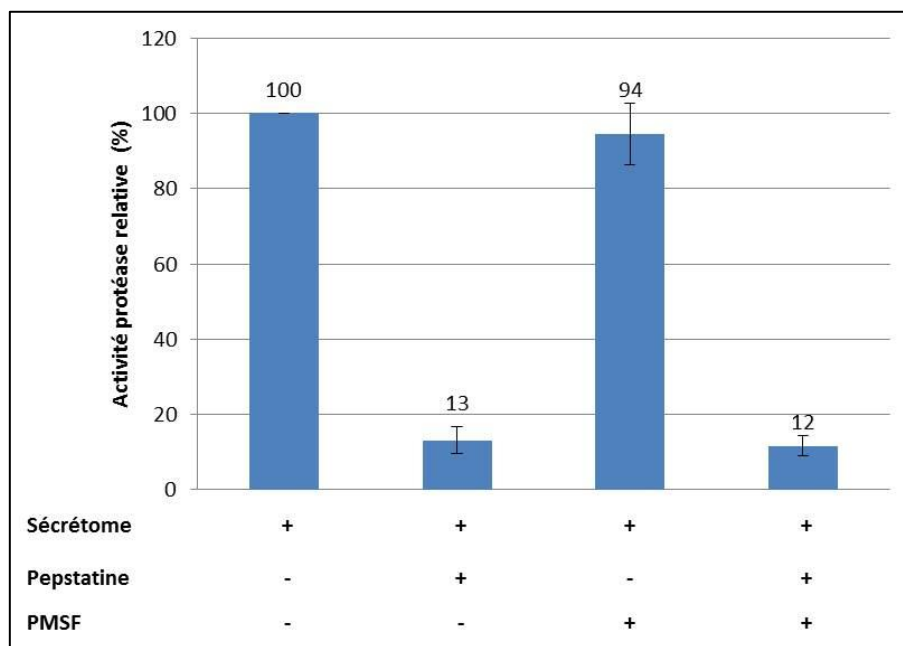


Figure 42: Activité protéase globale à pH 4 (dosage BSA) du sécrétome « acide » de *B. cinerea* souche 630, en présence d'inhibiteurs. Le sécrétome « acide » à 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ final est mis au contact d'une solution de BSA à 1% reprise dans du tampon citrate/phosphate à pH 4 en présence de PMSF à 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, de pepstatine à 8 μM ou de PMSF et de pepstatine. Les résultats représentent la moyenne de quatre répétitions biologiques $\pm$ l'écart type et sont exprimés en activité protéase relative à l'activité protéase du sécrétome seul.

1. Production et activité protéase de sécrétomes de *B. cinerea*

Lors de cette étude, différentes conditions de culture ont été testées pour obtenir des sécrétomes susceptibles de contenir les différentes protéases du champignon, des protéases aspartiques telles que BcAp8 et des protéases à sérine telles que BcSer. Deux types de sécrétomes ont été produits, un sécrétome dit « acide » et un sécrétome dit « neutre ».

1.1. Sécrétome « acide »

Un sécrétome dit « acide » a été réalisé dans le but d'obtenir des protéases acides. Pour cela une culture de *B. cinerea* a été réalisée dans du milieu M à pH 3,1 durant 7 jours (Manteau *et al.*, 2003).

Afin d'identifier les protéases présentes dans ce sécrétome, des tests d'activité ont été réalisés sur celui-ci à pH 4 et pH 8 pour différencier les protéases acides des autres protéases (figure 41). Comme le montre la figure 41, les protéases présentes dans ce sécrétome sont actives à pH 4 mais pas à pH 8. Ainsi ce sécrétome ne possède probablement que des protéases acides.

Pour vérifier cette hypothèse, un second test d'activité protéase a été réalisé en utilisant deux IP chimiques, la pepstatine et le PMSF, inhibiteurs respectifs de protéases aspartiques et de protéases à sérine. Comme le montre la figure 42, les protéases contenues dans ce sécrétome sont inhibées à 87 % par la pepstatine mais ne sont pas significativement inhibées par le PMSF. De plus, l'addition des deux inhibiteurs conduit à la même inhibition que l'ajout de pepstatine seule. Les protéases présentes majoritairement dans le sécrétome « acide » sont donc bien des protéases aspartiques.

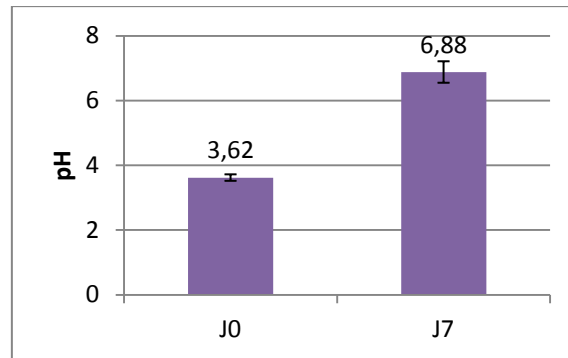


Figure 43: Evolution du pH de culture de *B. cinerea* souche 630 lors de l'élaboration du sécrétome « neutre ». Le pH du milieu est mesuré avant l'ensemencement puis au bout de 7 jours de culture. Les résultats représentent la moyenne des pH mesurés sur quatre cultures de *B. cinerea* souche 630 lors de l'élaboration du sécrétome « neutre » $\pm$ l'écart type.

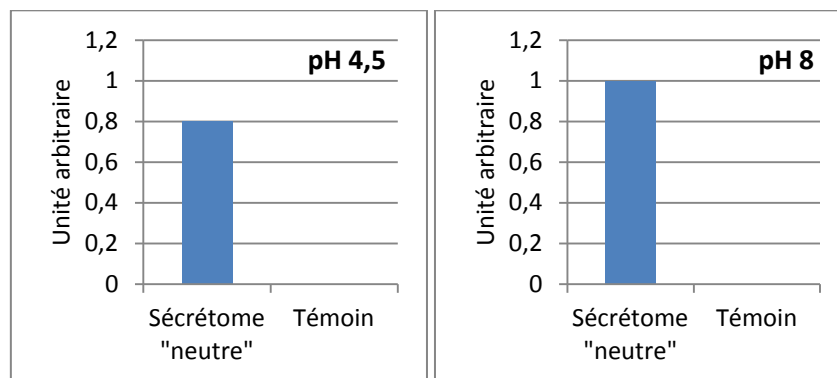


Figure 44: Dosage d'activité protéase globale à pH 4,5 et pH 8 (dosage Azocaséine) du sécrétome « neutre » de *B. cinerea* souche 630. Unité arbitraire = 0,001 U DO/min. Cent μ L de sécrétome « neutre » à 100 μ g mL^{-1} final est mis au contact de 50 μ L d'une solution d'azocaséine à 0,15% Tris-HCl 0,1M pH8 et 450 μ L de tampon citrate/phosphate à pH 4,5 ou pH 8. Le témoin correspond au milieu seul. La manipulation a été réalisée une fois en triplicats.

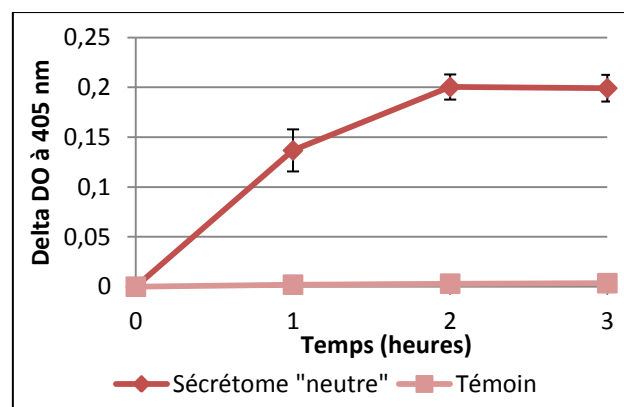


Figure 45: Dosage d'activité protéase à sérine à pH 8 (dosage pNA) du sécrétome « neutre » de *B. cinerea* souche 630. 40 μ L de sécrétome concentré 10 fois sont ajoutés à 150 μ L de pNA (*N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe *p*-nitroanilide) puis laissés à température ambiante le temps de la cinétique. La lecture est réalisée au spectrophotomètre à 405nm. Les résultats représentent la moyenne de triplicats $\pm$ l'écart type et sont exprimés en delta DO par rapport au temps 0h. Manipulation représentative de deux réplicats biologiques.

1.2. Sécrétome « neutre »

Un secrétome dit « neutre » a été réalisé dans le but d'obtenir des protéases à sérine. De nombreuses conditions de cultures ont été testées avant de pouvoir identifier une activité sérine protéase. Le seul secrétome présentant l'activité protéase recherchée a été réalisé dans un milieu pauvre additionné de feuilles de vitroplants mixées selon Hermosa *et al*, (2006).

L'évolution du pH de la culture de *B. cinerea* souche 630 servant à l'élaboration du secrétome « neutre » a été analysée (Figure 43). Le pH de la culture venant d'être inoculée est de 3,62. Au bout de 7 jours de culture, celle-ci s'est fortement alcalinisée et atteint le pH de 6,88. Ce pH final, voisin de la neutralité, est à l'origine du nom de ce secrétome.

Comme précédemment, afin d'identifier les protéases présentes dans ce secrétome, des tests d'activité protéase globale ont été réalisés à pH acide et alcalin (Figure 44). Le dosage d'activité protéase globale est cette fois réalisé par dosage à l'Azocaséine car le secrétome « neutre » s'est révélé incapable de dégrader la BSA. Le pH acide utilisé ici est de 4,5, l'azocaséine flocculant à un pH inférieur.

Comme le montre la figure 44, ce secrétome contient des protéases actives à pH 4,5 ainsi qu'à pH 8. Le témoin, composé uniquement du milieu de culture, ne montre quant à lui aucune activité protéase, que ce soit à pH 4,5 ou à pH 8. L'extrait de feuilles de vitroplants présent dans le milieu ne posséderait donc pas d'activité protéase. Le secrétome « neutre » contiendrait donc des protéases actives à pH acide ainsi que des protéases actives à pH alcalin. Pour déterminer si des protéases à sérine font partie de ces protéases actives à pH alcalin, un dosage d'activité spécifique aux protéases à sérine a été utilisé (Figure 45). Comme le montre la figure 45, des protéases à sérine sont présentes dans le secrétome « neutre ». Aucune activité protéase à sérine n'est détectée dans le témoin.

Les deux familles de protéases recherchées ont donc été obtenues. Des protéases aspartiques sont présentes dans le secrétome « acide » et des protéases à sérine, mais aussi des protéases actives à pH acide, sont présentes dans le secrétome « neutre » de *B. cinerea*.

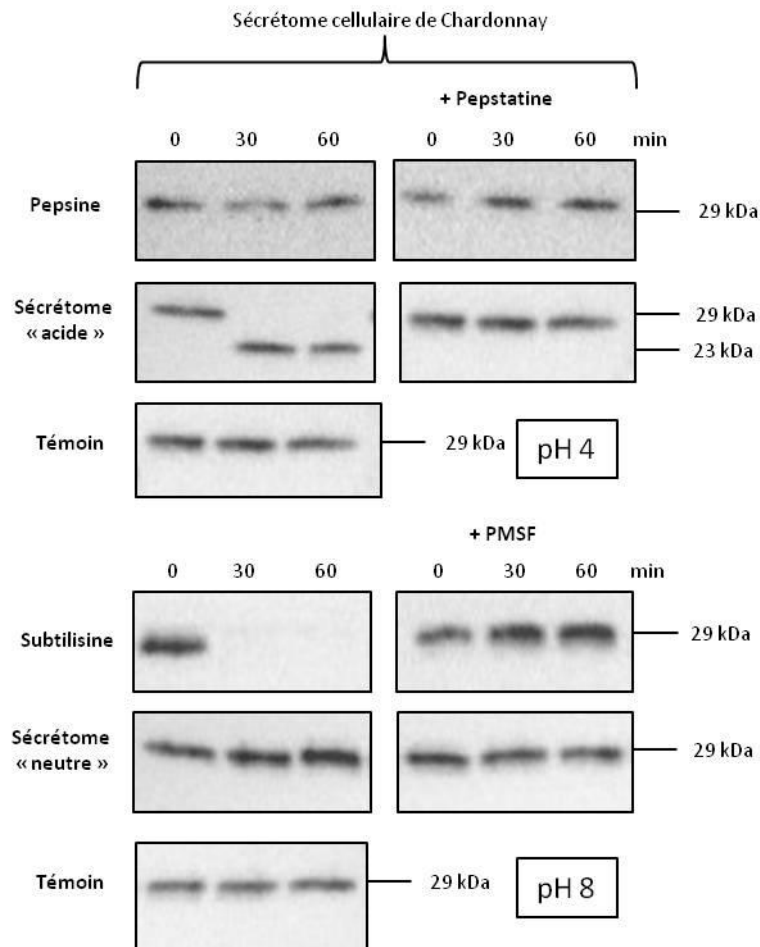


Figure 46: Dégradation in vitro de la chitinase de vigne (VvChi4D) par la pepsine, la subtilisine ainsi que les sécrétomes «acide» et «neutre» de *B.cinerea* souche 630 en présence ou non d'inhibiteurs chimiques (Pepstatine et PMSF). Un μg de sécrétome cellulaire de Chardonnay est mis au contact d' 1 μg de sécrétome fongique, ou 0,01 μg de pepsine ou 0,02 μg de subtilisine avec ou sans inhibiteurs (Pepstatine et PMSF à 0,1mM). L'activité de la pepsine et du sécrétome «acide» est testée à pH 4 et l'activité de la subtilisine et du sécrétome «neutre» est testée à pH 8. Après migration en gel SDS-PAGE, la protéine VvChi4D est révélée par Western blot grâce aux anticorps anti-VvChi4D. Le témoin correspond au sécrétome cellulaire de Chardonnay seul. Trois réplicats biologiques ont été réalisés.

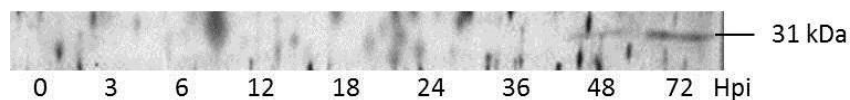


Figure 47: Détection par Western blot de la protéine BcSer dans des feuilles de vitroplants détachées infectées par *B.cinerea* souche 630. Infection avec 4 à 5 gouttes de suspension conidienne à 10^5 conidies.mL⁻¹ prégermée pendant 6h. Western blot réalisé à partir de 3 μg d'extraits protéiques. Hpi : Heures post inoculation. Deux réplicats biologiques, identiques à ceux ayant servi dans le premier chapitre, ont été réalisés.

1.3. Activité des protéases de *B. cinerea* sur la chitinase de vigne

Afin d'identifier les protéases de *B. cinerea* capables de dégrader la chitinase de vigne *in vitro*, celle-ci, présente dans le sécrétome de cellules de Chardonnay, a été confrontée aux deux sécrétomes obtenus lors de cette étude. La capacité de dégradation de deux protéases commerciales, la pepsine et la subtilisine, a également été étudiée en parallèle (Figure 46). L'activité de la pepsine et du sécrétome « acide » de *B. cinerea* a été testée à pH 4 et celle de la subtilisine et du sécrétome « neutre » à pH 8. En présence de pepsine ou du sécrétome « neutre », la chitinase ne semble pas dégradée. En présence du sécrétome « acide », la bande de 29 kDa correspondant à la chitinase disparaît pour laisser place à une bande de 23 kDa encore présente au bout de 60 min. Enfin, en présence de subtilisine, la bande de 29 kDa disparaît complètement au bout de 30 min. En présence des inhibiteurs adaptés, aucune dégradation n'est observée. Aucune dégradation n'est observée dans les témoins correspondant au sécrétome cellulaire de Chardonnay seul à pH 4 ou à pH 8.

La chitinase semble donc dégradée par la subtilisine et le sécrétome « acide ». En revanche elle ne semble pas dégradée par les protéases à sérine présentes dans le sécrétome « neutre » à pH 8 et par la pepsine.

1.4. Détection des protéases fongiques et de la chitinase de vigne *in planta*

Les trois protéases du champignon (BcAcp, BcAsp et BcSer) ainsi que la chitinase de vigne VvChi4D ont été recherchées *in planta* dans les feuilles de vitroplants et les baies infectées. Il est à noter que ces échantillons ont également servi au suivi de l'expression des deux IP et des trois protéases du champignon dans le premier chapitre.

L'expression des trois protéases du champignon a été suivie par western blot. Aucun signal n'a pu être observé pour les deux protéases acides lors de l'infection des feuilles de vitroplants. Pour la protéase à sérine, une bande de 31 kDa est observable dès 48 hpi (Figure 47). Cette protéase est donc présente dans la feuille de vitroplant 48 h après l'inoculation avec le champignon.

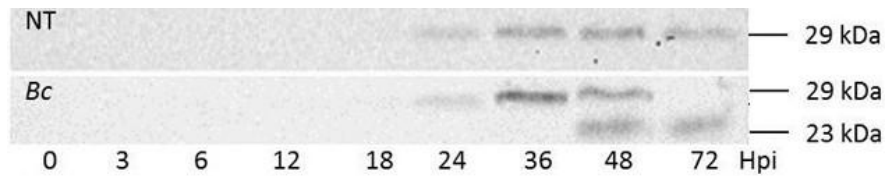


Figure 48: Détection par Western blot de la protéine VvChi4D dans des feuilles de vitroplants détachées infectées (Bc) ou non (NT) par *B. cinerea* souche 630. Infection avec 4 à 5 gouttes de suspension conidienne à 10^5 conidies.mL⁻¹ prégermée pendant 6h. Western blot réalisé à partir de 3 µg d'extraits protéiques. Hpi : Heures post inoculation. Cette manipulation a été réalisée deux fois.

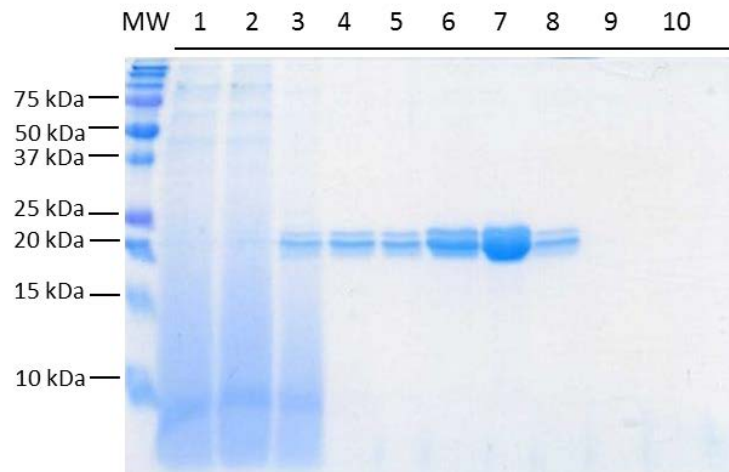


Figure 49: Profil SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de la purification de la protéine VvKun His C ter par billes de nickel Ni Sépharose™ 6 Fast Flow. 1: Flow through, 2-4: Lavages successifs à 100 mM d'imidazole, 5-10: Elutions successives à 500 mM d'imidazole. MW: marqueur de poids moléculaire.

L'expression de la protéine VvChi4D a également été suivie par western blot (Figure 48). Dans les feuilles de vitroplants détachées mais non infectées par *Botrytis cinerea* (NT), une bande de 29 kDa correspondant à VvChi4D est visible à partir de 24 Hpi et celle-ci s'intensifie à partir de 36 Hpi. Cette protéine est donc induite en réponse à la mise en survie des feuilles de vitroplants détachées. Dans les feuilles infectées par *B. cinerea* (Bc), cette même bande apparaît à 24 Hpi et s'intensifie à 36 Hpi. A 48 Hpi une bande supplémentaire de 23 kDa apparaît. A 72 Hpi, la bande de 29 kDa disparaît mais celle de 23 kDa est toujours présente. La protéine VvChi4D semble donc dégradée lors de l'infection à partir de 48 Hpi.

Concernant les baies de Pinot Noir infectées au vignoble, aucun signal correspondant aux trois protéases du champignon n'a pu être observé. En ce qui concerne la protéine VvChi4D, il a été montré précédemment au laboratoire, que celle-ci semble dégradée à partir du stade S2 et disparaît complètement au stade S4 (Manteau *et al.*, 2003 ; Colas, 2012).

2. Production et caractérisation de VvKUN et VvPIN hétérologues

Afin de pouvoir les confronter aux sécrétomes de *B. cinerea* contenant soit des protéases aspartiques soit des protéases à sérine, les deux IP ont été produits en système hétérologue.

2.1. Production hétérologue de VvKUN et VvPIN

La production hétérologue des deux IP a tout d'abord été initiée par transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à l'aide d'un vecteur Gateway (pYES2GW, Invitrogen®, France). Cependant, les rendements de production étant faibles pour VvKUN et nuls pour VvPIN, un second système d'expression a été testé.

La transformation de la levure *Pichia pastoris* avec le vecteur pPIC3K5 a permis d'obtenir de très bons rendements pour la protéine VvKUN hétérologue puisqu'en moyenne 3 g/L de protéines ont été obtenus par production. La purification de VvKUN a été réalisée grâce à l'insertion d'un tag de 6 histidines placé en position C terminale de la protéine. Ce tag, composé de seulement 6 résidus histidine, augmente la masse de la protéine d'environ 1 kDa et permet la purification de celle-ci. L'analyse par SDS PAGE des différentes phases de purification (Figure 49) révèle la présence de deux bandes, à environ 20 kDa et 22 kDa.

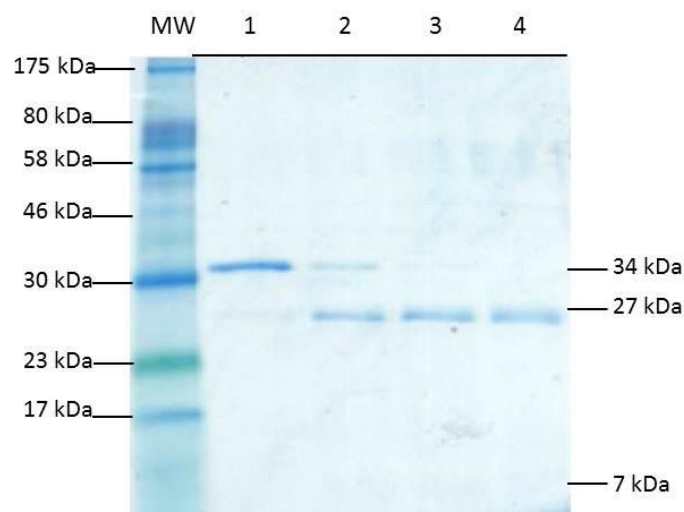


Figure 50: Profil SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de la séparation des protéines VvPin et GST par la PreScission Protease, réalisé par la société ProtéoGenix. La séparation est analysée à différents temps : 1 : 0 min ; 2 : 30 min ; 3 : 60 min ; 4 : 90 min après ajout de l'enzyme. MW : marqueur de poids moléculaire.

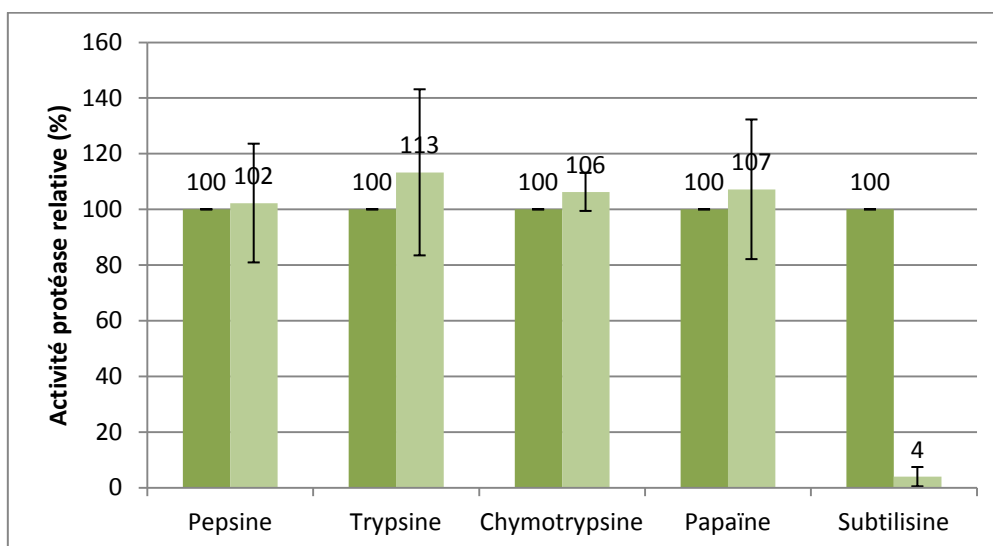


Figure 51: Activité inhibitrice de la protéine recombinante VvKun sur cinq protéases commerciales: Dosage de la dégradation de la BSA. Les protéases à $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ final sont mises au contact d'une solution de BSA à 1% reprise dans du tampon citrate/phosphate à pH 4 pour la pepsine ou pH 8 pour les autres protéases. Vert foncé : Activité des protéases seules ; Vert clair : En présence de la protéine recombinante VvKun ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Les résultats représentent la moyenne de quatre manipulations $\pm$ l'écart type et sont exprimés en activité protéase relative à l'activité de chaque protéase.

D'après les analyses *in silico*, la masse de la protéine VvKUN est estimée à 19,8 KDa et correspondrait donc à la bande inférieure. La bande supérieure pourrait correspondre à la protéine VvKUN sous une forme glycosylée. Cette purification a permis la production, par la société ProtéoGenix, d'anticorps dirigés contre la protéine VvKUN.

La production de la protéine VvPin ayant une nouvelle fois échouée, nous nous sommes tournés vers la société ProtéoGenix pour la production de cette protéine. La séquence complète d'ADNc de VvPin a tout d'abord été synthétisée chimiquement et optimisée pour la production par *Pichia pastoris*. Des nucléotides ont en effet été remplacés par des nucléotides utilisés préférentiellement par la levure pour coder certains acides aminés (Figure 16). Cette séquence a ensuite été clonée dans le vecteur pPIC3K5 et additionnée d'un tag MAT (Metal Affinity Tag). Ce tag, dérivé du tag à 6 histidines, ne comporte lui aussi que 6 acides aminés et augmente la masse de la protéine d'environ 1 KDa. Aucune protéine recombinante n'a cependant pu être détectée dans ces conditions. Un second test a été réalisé par la société en vue de produire la protéine VvPIN. La séquence optimisée de VvPin a cette fois été clonée dans le vecteur pPIC9K (plasmide optimisé pour la sécrétion de protéines hétérologues) et additionnée d'un tag GST (Glutathion S-Transférase). Ce tag, beaucoup plus gros que les deux précédents, a une masse d'environ 27 KDa mais peut être clivé de la protéine. La protéine de fusion GST-PIN de 34 KDa a été produite (Figure 50, puits 1) et après clivage du tag GST de 27 KDa par la PreScission Protease (Figure 50, puits 2 à 4) la protéine VvPIN a finalement été obtenue. Néanmoins, comme le montre la figure 50, la protéine VvPIN n'est pas très visible et au final, la quantité de protéine hétérologue obtenue est très faible, seulement 0,2 mg de protéines VvPIN ayant été produit.

2.2. Activités des protéines hétérologues VvKUN et VvPIN

Les activités inhibitrices des deux protéines hétérologues ont été testées pour vérifier leur fonctionnalité et déterminer leurs cibles protéiques. L'activité antifongique de VvKUN a également été testée. Pour VvPIN, la très faible quantité de protéines recombinantes obtenue ne nous a pas permis de réaliser ce test.

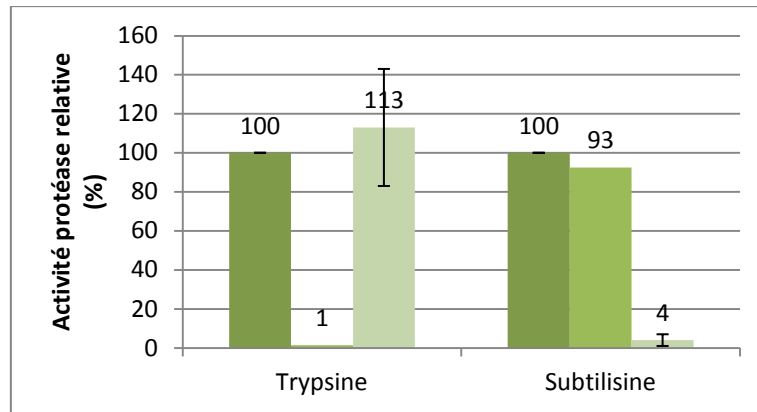


Figure 52: Activité protéase de la trypsine et de la subtilisine en présence de la protéine recombinante VvKun et d'une protéine Kunitz commerciale (*Glycine max*): Dosage de la dégradation de la BSA. Les protéases à 100 µg mL⁻¹ final sont mises au contact d'une solution de BSA à 1% reprise dans du tampon citrate/phosphate à pH 8. Vert foncé : Activité des protéases seules ; Vert moyen : En présence de la protéine commerciale de la famille Kunitz (100 µg.mL⁻¹); Vert clair : En présence de la protéine recombinante VvKun (100 µg.mL⁻¹). Les résultats représentent la moyenne de deux manipulations ± l'écart type et sont exprimés en activité protéase relative à l'activité de chaque protéase.

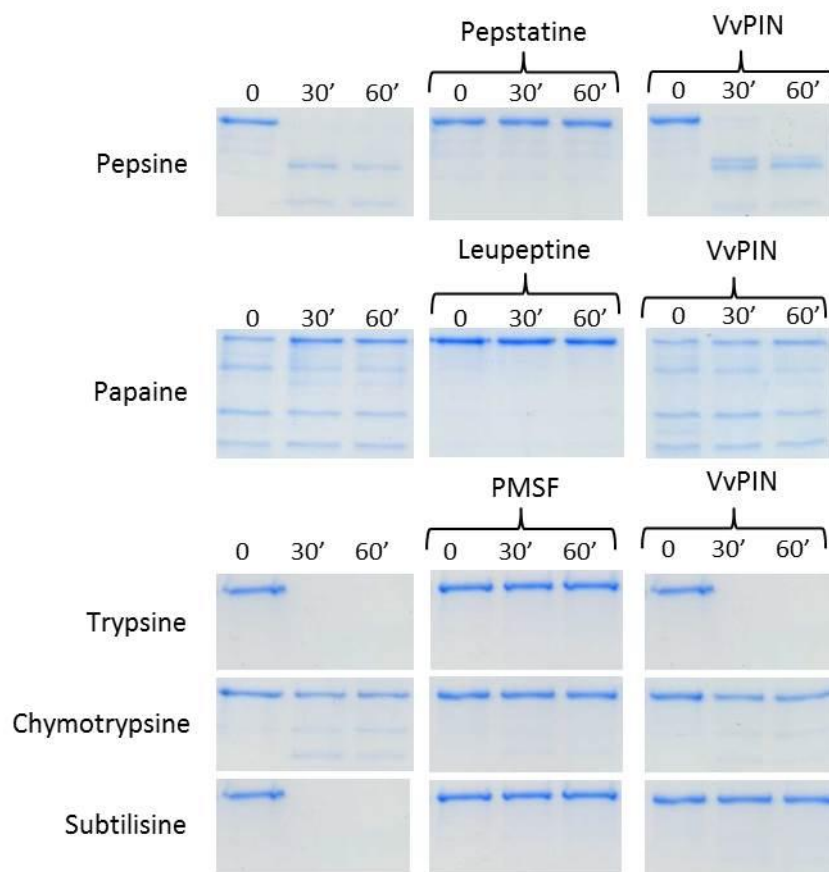


Figure 53: Vérification de la fonctionnalité et de l'effet inhibiteur de la protéine hétérologue VvPIN par la visualisation de la dégradation de la BSA. Un µg de BSA est mis au contact des différentes protéases commerciales (Pepsine (0,01 µg), Papaine (0,1 µg), Trypsine (0,5 µg), Chymotrypsine (0,3 µg), et Subtilisine (0,02 µg)), en présence ou non des inhibiteurs chimiques associés (Pepstatine, Leupeptine et PMSF à 0,1mM) ou de la protéine hétérologue VvPin (1 µg) dans un tampon citrate/phosphate à pH 4 pour la pepsine et à pH 8 pour les autres protéases. Trois réplicats techniques ont été réalisés.

2.2.1. Activités inhibitrices de VvKUN et VvPIN

Afin de savoir si la protéine VvKun produite en système hétérologue est bien fonctionnelle, des dosages d'activité protéase ont été réalisés sur des protéases commerciales en présence ou non de VvKun (Figure 51).

Ainsi il a été montré que la protéine hétérologue VvKun n'inhibe pas l'activité protéase de la trypsine, de la chymotrypsine (protéases à sérine), de la papaïne (protéase à cystéine) ni de la pepsine (protéase aspartique). En revanche elle montre un très fort effet inhibiteur de l'activité protéase de la subtilisine (protéase à sérine) (Figure 51).

Un inhibiteur de protéase commercial de la famille des Kunitz, vendu comme inhibiteur de trypsine, a été utilisé pour comparer son action inhibitrice à celle de la protéine recombinante VvKun. Comme le montre la figure 52, une inhibition totale de l'activité de la trypsine est constatée en présence de la protéine Kunitz commerciale. En revanche, la protéine recombinante VvKun n'a aucun effet inhibiteur de l'activité de la trypsine. Sachant que la protéine VvKun inhibe l'activité de la subtilisine, le test a également été réalisé sur celle-ci. Ainsi, comme le montre la figure 52, VvKun inhibe fortement la subtilisine alors que la protéine Kunitz commerciale n'a qu'une faible activité inhibitrice sur celle-ci.

Contrairement à la protéine hétérologue VvKUN, des dosages d'activité protéase en présence de VvPin n'ont pas pu être réalisés car ils nécessitaient l'utilisation d'une trop forte quantité de protéine hétérologue. Afin de savoir si la protéine recombinante VvPin produite par la société ProtéoGenix est bien fonctionnelle, des tests de dégradation de la BSA ont donc été réalisés avec des protéases commerciales en présence ou non de VvPin (Figure 53). En présence de la pepsine, la BSA est dégradée au bout de 30 min et des bandes de dégradations sont visibles. La BSA est également dégradée par la trypsine et la subtilisine au bout de 30 min. En présence de papaïne ou de chymotrypsine, la dégradation de la BSA est moins prononcée mais différentes bandes de dégradation peuvent être observées dès 0 min pour la papaïne et dès 30 min pour la chymotrypsine. En présence des inhibiteurs chimiques adaptés, tels que la pepstatine pour la pepsine, la leupeptine pour la papaïne et le PMSF pour les trois protéases à sérine, la BSA

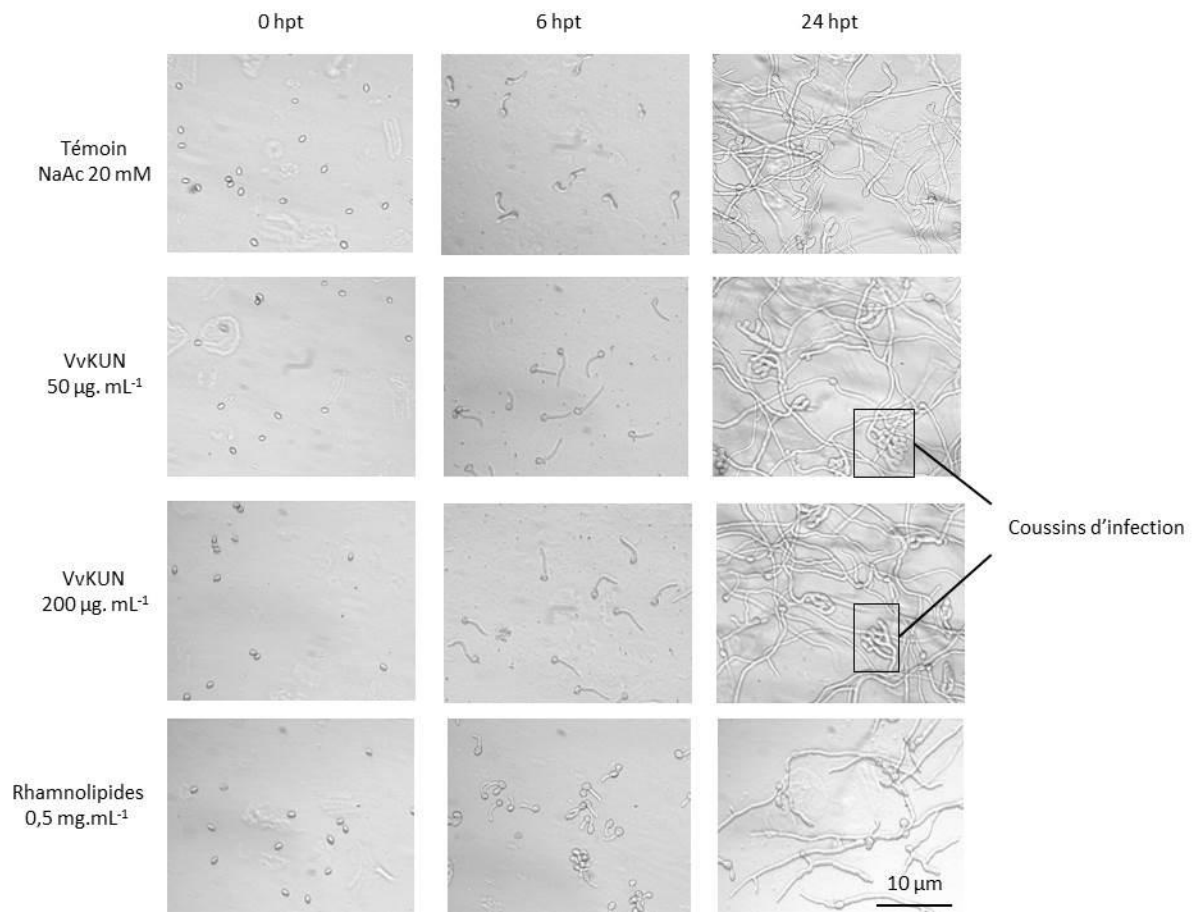


Figure 54: Tests antigerminatifs réalisés à partir de conidies de *B. cinerea* souche 630. Un volume d'une suspension de 10^5 conidies par mL dans du PDB à 12 g.L^{-1} est mélangé à un volume de protéine hétérologue VvKUN à différentes concentrations solubilisée dans du NaAc 20 mM, pH 5,2 ou dans un volume de rhamnolipides à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Les conidies sont mises en culture en plaque 96 puits à 21°C en présence de lumière et la germination est observée au microscope inversé selon une cinétique de temps de 0, 6 et 24 hpt. hpt : heure post traitement. La manipulation a été réalisée trois fois.

n'est pas dégradée. En présence de la protéine hétérologue VvPin, seule la dégradation de la BSA par la subtilisine est stoppée. De ce fait, la fonctionnalité de VvPin de par son activité inhibitrice contre les protéases de type subtilisine a pu être vérifiée.

2.2.2. Activité antifongique de VvKUN

L'action antifongique directe sur la germination des conidies de *B. cinerea* souche 630 de la protéine VvKUN a été étudiée et comparée à celle des rhamnolipides (Figure 54) dont l'effet antifongique direct est connu (Varnier *et al.*, 2009).

A 6 hpt, l'ensemble des conidies témoins a germé alors qu'en présence de rhamnolipides, seules quelques conidies commencent à germer. En présence de la protéine VvKUN, les conidies ont toutes germées et l'hyphe formé est plus grand que celui des conidies témoins.

A 24 hpt, le mycélium s'est formé dans les puits témoins alors qu'en présence de rhamnolipides, les conidies ayant germé présentent une croissance mycélienne très ralentie. En présence de la protéine VvKUN, le mycélium s'est formé et présente des amas d'hyphe courts et ramifiés à ses extrémités pouvant s'apparenter à des coussins d'infection (Choquer *et al.*, 2007). La protéine VvKUN accélérerait donc la germination des conidies de *B. cinerea* et provoquerait la formation de structures pouvant s'apparenter à des coussins d'infection.

3. Activité inhibitrice des IP sur les sécrétomes de *B. cinerea*

L'activité inhibitrice des deux IP a été suivie par des tests de dégradation de la BSA par les protéases fongiques, déposés sur gel d'acrylamide pour le sécrétome « acide » ou par dosage spectrophotométrique du pNA pour le sécrétome « neutre », ce dernier ne dégradant pas la BSA.

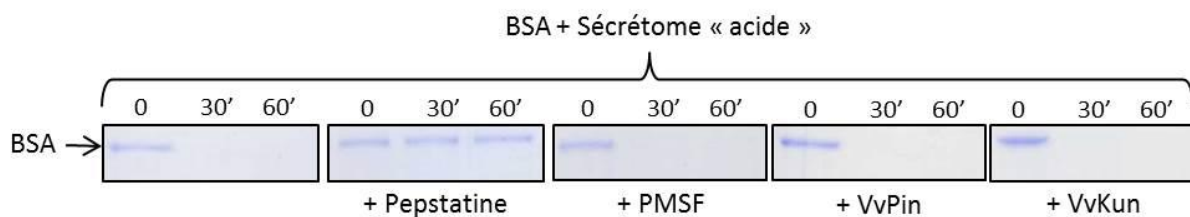


Figure 55: Dégradation in vitro d'un μg de BSA à pH 4 par le sécrétome « acide » de *B.cinerea* souche 630 en présence d'inhibiteurs chimiques (Pepstatine et PMSF à 1mM), de VvPin ou de VvKun (1 μg). La manipulation a été réalisée une fois en présence de VvPin et deux fois en présence de VvKun.

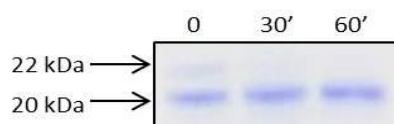


Figure 56: Suivi de la protéine hétérologue VvKun lors de la dégradation in vitro d'un μg de BSA à pH 4 par le sécrétome « acide » de *B.cinerea* souche 630 en présence de VvKun (1 μg). La manipulation a été réalisée deux fois.



Figure 57: Détection de la protéine VvKUN lors de l'infection naturelle de la baie de Pinot Noir (2008) par Western blot. Western blot réalisé à partir d'un volume constant d'extraits protéiques de baies de Pinot Noir. Stades d'infection : Stade 1: Baies saines prélevées sur des grappes infectées; Stade 2: Baies présentant un spot d'infection de 5 à 10 mm de diamètre; Stade 3: Baies présentant une perte de couleur et recouvertes d'une quantité importante de conidies; Stade 4: Baies complètement flétries. Cette manipulation a également été réalisée en 2009, 2010 et 2011 et a montré des résultats similaires.

3.1. Activité inhibitrice des IP sur le sécrétome « acide » de *B. cinerea*

L'activité inhibitrice de VvPin et VvKun a été testée *in vitro* sur la dégradation de la BSA par le sécrétome « acide » de *B. cinerea*. Ce sécrétome contenant majoritairement des protéases aspartiques, la réaction a été réalisée à pH 4. Comme le montre la figure 55, la BSA est dégradée par le sécrétome « acide » dès 30 min. En présence de pepstatine, inhibiteur de protéases aspartiques, cette dégradation est totalement inhibée. Le PMSF, inhibiteur de protéases à sérine, n'inhibe pas la dégradation de la BSA. Ces résultats sont en accord avec la figure 42, et confirment la présence majoritaire de protéases aspartiques dans ce sécrétome. En présence des deux IP hétérologues, VvPin et VvKun, la BSA est totalement dégradée au bout de 30 min. VvPin et VvKun n'inhibent donc pas l'activité des protéases aspartiques contenues dans le sécrétome « acide ».

La figure 56 montre l'évolution de la protéine hétérologue VvKUN lors du test de dégradation de la BSA par le sécrétome « acide » de *B. cinerea*. A 0 min, les deux bandes de la protéine hétérologue sont visibles. Au bout de 30 min l'intensité de la bande de 22 kDa commence à diminuer et la bande disparaît complètement à 60 min. L'intensité de la bande de 20 kDa quant à elle n'évolue pas au cours de la cinétique. La forme supposée glycosylée de la protéine hétérologue VvKUN serait donc dégradée par les protéases aspartiques contenues dans le sécrétome « acide » de *B. cinerea*.

Ceci peut être rapproché de ce qui se passe *in planta*. En effet, l'expression de la protéine VvKUN a été suivie par western blot lors de l'infection de la baie de Pinot Noir. La figure 57 montre une bande de 20 kDa au stade S1, il s'agit de la protéine VvKUN. Au stade S2, l'intensité de cette bande diminue et disparaît complètement aux stades S3 et S4. La protéine VvKun semble donc disparaître de la baie au cours de l'infection.

In vitro, l'isoforme de 22 kDa est dégradée par les protéases aspartiques de *B. cinerea* alors que celle de 20 kDa ne semble pas affectée par celles-ci. En revanche, *in planta*, l'isoforme de 20 kDa est dégradée lors de l'infection de la baie de Pinot Noir par *B. cinerea*.

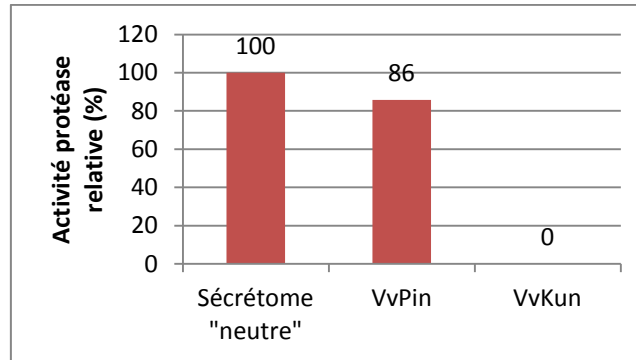


Figure 58: Activité protéase à sérine à pH 8 (dosage pNA) du sécrétome « neutre » de *B. cinerea* souche 630 en présence ou non de VvPin et VvKun à 1 μ M. 40 μ L de sécrétome concentré 10 fois sont ajoutés à 150 μ L de pNA (*N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe *p*-nitroanilide). La lecture est réalisée au spectrophotomètre à 405nm. Les résultats sont exprimés en activité protéase relative à l'activité du sécrétome « neutre ». Manipulation réalisée une fois.

3.2. Activité inhibitrice des IP sur le sécrétome « neutre » de *B. cinerea*

L'activité inhibitrice de VvPin et VvKun sur le sécrétome « neutre » de *B. cinerea* a été testée *in vitro* par un dosage spectrophotométrique spécifique aux protéases à sérine (dosage pNA), car ce sécrétome ne dégrade pas la BSA à pH alcalin. La réaction a été réalisée à pH 8, pH optimal des protéases à sérine. Comme le montre la figure 58, en présence de VvPin, une activité protéase résiduelle de 86 % est observée pour le sécrétome « neutre » alors qu'en présence de VvKun, aucune activité résiduelle n'est détectée. VvPin inhiberait donc faiblement l'activité protéase à sérine du sécrétome « neutre » alors que VvKun l'inhiberait totalement.

VvKun hétérologue est donc capable d'inhiber, à pH alcalin, les protéases à sérine contenues dans le sécrétome « neutre » alors que VvPin ne les inhibe que très peu. En revanche, aucun des deux IP n'est capable d'inhiber les protéases aspartiques contenues dans le sécrétome « acide » de *B. cinerea*.

Discussion

L'objectif principal de ce chapitre était d'étudier si les protéines VvPin et VvKun sont capables d'inhiber des protéases de *B. cinerea*. Comme vu précédemment dans le premier chapitre, l'expression des protéases BcAp8, BcAcp et BcSer est induite lors de l'infection de la baie et de la feuille. Aussi, nous avons cherché à obtenir des protéases acides telles que des protéases aspartiques ainsi que des protéases à sérine telles que des subtilisines. Pour cela nous nous sommes orientés sur la production de sécrétomes contenant les différents types de protéases. Les protéases glutamiques n'étant inhibées par aucun IP de plantes, nous nous sommes donc concentrés sur la production de deux sécrétomes, l'un contenant des protéases aspartiques et l'autre des protéases à sérine.

Un sécrétome « acide » contenant majoritairement des protéases aspartiques a été obtenu dans du milieu M à pH 3,1 durant 7 jours. En effet, à pH 4, l'ajout de pepstatine, inhibiteur de protéases aspartiques, réduit de 87 % l'activité de celui-ci alors que l'ajout de PMSF, inhibiteur de protéases à sérine, n'a pas d'effet significatif. Les 12 % d'activité protéase résiduelle en présence de pepstatine et de PMSF pourraient être dus à la présence d'autres protéases acides insensibles à ces inhibiteurs telle que la protéase glutamique BcAcp notamment (Sims *et al.*, 2004).

Le sécrétome « neutre » est plus complexe que le sécrétome « acide ». En effet, celui-ci présente une activité protéase à pH 4,5 et à pH 8. Il contient donc plusieurs familles de protéases. L'utilisation de pNA, substrat spécifique aux protéases à sérine, confirme la présence de telles protéases dans ce sécrétome. Ceci peut être mis en parallèle avec les résultats et le modèle proposé dans le chapitre 1 dans lequel deux phases peuvent clairement être identifiées lors de l'infection de la feuille : une première, permettant aux protéases acides de s'exprimer puis une seconde caractérisée par une alcalinisation du milieu et permettant aux protéases à sérine de s'exprimer à leur tour.

Lors de l'élaboration du sécrétome « neutre », les feuilles de vitroplants broyées constituent la seule source de nutriments pour le champignon, ces deux phases sont retrouvées avec d'abord production de protéases aspartiques puis de protéases à sérine.

Les différentes protéases de *B. cinerea* ont donc été obtenues dans des conditions très différentes. Les protéases aspartiques ont été produites dans un milieu acide alors que les protéases à sérine semblent avoir besoin d'une alcalinisation du milieu de culture pour être produites. Ces résultats sont en accord avec Li *et al.*, (2012) qui ont montré l'effet du pH sur la sécrétion de protéines par *B. cinerea*. Des profils protéiques très différents ont été obtenus à pH 4 et à pH 6. A pH acide, la majorité des protéases produites sont des protéases acides telles que des protéases aspartiques et des sédolisines alors qu'à pH 6 des protéases à sérine de type subtilisine sont identifiées. Le pH, bien qu'il soit un élément important pour la production des différentes protéases (Denison, 2000 ; Poussereau *et al.*, 2001 ; Billon-Grand *et al.*, 2002 ; Rolland *et al.*, 2009), n'est cependant pas le seul élément à prendre en compte. Pour la production de protéases à sérine notamment, le champignon semble avoir besoin d'un substrat. Il peut s'agir de gélatine (Abidi *et al.*, 2007), de feuilles d'algue, de protéines de soja (Abidi *et al.*, 2011), de fraise (Shah *et al.*, 2008) ou de pectine de pomme (Li *et al.*, 2012). Dans notre étude, les feuilles de vitroplants broyées semblent donc avoir servi de substrat.

La chitinase VvChi4D, présente dans le sécrétome de cultures cellulaires de Chardonnay, est dégradée par les protéases présentes dans le sécrétome « acide » de *B. cinerea*. Cette dégradation est inhibée en présence de pepstatine. La chitinase serait donc dégradée *in vitro* par des protéases aspartiques. Ce résultat est en accord avec des résultats obtenus précédemment au laboratoire concernant VvChi4D, produite en système hétérologue (Thèse S. Colas, 2012). Une étude récente a montré que la protéase aspartique 8 de *B. cinerea*, produite en système hétérologue, est capable de dégrader la chitinase VvChi4D présente dans le vin (van Sluyter *et al.*, 2013). Dans cette même étude, les auteurs constatent comme nous, que la pepsine n'est pas capable de dégrader la chitinase de vigne à moins de la chauffer fortement. La pepsine semble donc agir différemment des protéases aspartiques de *B. cinerea*.

La dégradation de la chitinase par la subtilisine commerciale pourrait nous laisser penser que les protéases à sérine de type subtilisine seraient capables de la dégrader.

Dans la feuille de vitroplant infectée artificiellement par *B. cinerea*, la chitinase commence à être dégradée dès 48 hpi alors que la feuille est déjà complètement infectée par le champignon. Au moment où la chitinase commence à être dégradée, la protéase à sérine de type subtilisine BcSer est détectée dans la feuille. Ce résultat *in planta* aurait également pu nous laisser penser que la protéase à sérine BcSer aurait pu être responsable de la dégradation de la chitinase. Une étude a montré qu'une subtilisine de *Fusarium eumartii* est capable de dégrader une chitinase de pomme de terre (Olivieri *et al.*, 2002). Les protéases présentes dans le sécrétome « neutre » ne semblent en revanche pas capables de dégrader la chitinase de vigne *in vitro* dans les conditions testées. Celle-ci ne serait donc pas dégradée par les protéases à sérine présentes dans ce sécrétome.

La production hétérologue des deux IP a été envisagée par transformation d'organismes eucaryotes tels que les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*. Les levures, dont *S. cerevisiae* et *P. pastoris*, contrairement à la bactérie *Escherichia coli*, sont capables de réaliser des modifications post-traductionnelles nécessaires au bon repliement de la protéine ainsi qu'à son activité (Yesilirmak et Sayers, 2009). La disponibilité de vecteurs Gateway chez *S. cerevisiae* et non chez *P. pastoris*, nous a orienté vers l'utilisation de la première souche pour la production de VvPin et VvKun. Néanmoins, les rendements très faibles obtenus pour la production de VvKun ainsi que l'échec de la production de VvPin chez *S. cerevisiae* nous ont obligé à nous orienter vers un second système de production. La levure *P. pastoris* étant considérée comme le meilleur système de production de protéines hétérologue en terme de rendements (Cereghino et Cregg, 2000 ; Cregg *et al.*, 2000 ; Daly et Hearn, 2005 ; Macauley-Patrick *et al.*, 2005 ; Yesilirmak et Sayers, 2009), nous nous sommes donc orientés vers ce second système de production.

La protéine hétérologue VvKun a été produite au laboratoire par *P. pastoris* à de très bons rendements. La protéine semble avoir été obtenue sous deux isoformes, l'une à 22 kDa et l'autre à 20 kDa. La taille de la protéine mature VvKun est estimée *in silico* à 20 kDa, ce qui est confirmé *in planta* par le western blot réalisé sur les baies de Pinot Noir botrytisées (Figure 57). L'isoforme à 22 kDa pourrait être une forme glycosylée de la protéine VvKun. En

effet, la levure *P. pastoris* est connue pour glycosyler fortement les protéines hétérologues qu'elle produit (Cregg *et al.*, 2000). L'analyse *in silico* de la séquence en acides aminés de VvKun met en évidence un site potentiel de O-glycosylation (serveur NetOGlyc 4.0) mais aucun site de N-glycosylation (serveur NetNGlyc 1.0). Dans la plante en revanche, cette glycosylation ne semble pas avoir lieu car une seule bande de 20 kDa est observée.

La protéine hétérologue VvPin quant à elle, a finalement été produite par la société ProtéoGenix, également *via P. pastoris*, mais à de très faibles quantités par rapport à celles obtenues pour la protéine VvKun. Néanmoins, le rendement obtenu pour la production de VvPin reste dans la moyenne des productions de protéines de plantes par *P. pastoris* (Cregg *et al.*, 2000).

Des IP de vigne ont déjà été produits en système hétérologue (Perrazzolli *et al.*, 2010). Dans cette étude, les auteurs ont cherché à produire deux Potato Inhibitor I dont VvPin ainsi qu'un Kunitz de vigne *via* la bactérie *E. coli*. Seuls les deux Potato Inhibitor I ont pu être produits, mais aucune inhibition de croissance n'a pu être observée sur *B. cinerea* pour ces deux protéines.

L'effet anti *B. cinerea* de la protéine hétérologue VvKun produite lors de notre étude a été recherché. L'ajout de VvKun à une suspension conidienne de *B. cinerea* semble accélérer la croissance mycélienne du champignon et provoquer la formation de coussins d'infection. La majorité des études portant sur l'inhibition de la germination de champignons par des inhibiteurs de protéases sont réalisées avec d'autres familles d'IP telles que des cystatines (Joshi *et al.*, 1998 ; Pernas *et al.*, 1999 ; Yang et Yeh, 2005) ou des Bowman-Birk (Chilosi *et al.*, 2000). Des Kunitz de pomme de terre ont été produits en système hétérologue *via* la levure *Saccharomyces pombe* (Heibges *et al.*, 2003b). L'activité inhibitrice de quatre d'entre eux a été recherchée sur la croissance mycélienne de différents champignons, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium culmorum*, *Neurospora crassa* et *Fusarium naganal*. Seul *Fusarium moniliforme* a été affecté par les inhibiteurs testés. Ces quatre protéines inhibent différemment mais spécifiquement la croissance mycélienne de ce champignon. À ce jour, aucune étude n'a montré de promotion de croissance mycélienne par un inhibiteur de protéase. Concernant la formation de coussins d'infection, aucune étude ne s'est penchée à

ce jour sur la raison de leur formation chez *B. cinerea* (Kunz *et al.*, 2006 ; Choquer *et al.*, 2007).

Les tests d'activité réalisés sur différents types de protéases commerciales en présence des protéines VvPin et VvKun ont montré que les deux IP hétérologues inhibent spécifiquement l'activité protéase de la subtilisine. Des activités similaires ont déjà été identifiées pour des Potato Inhibitor I de sangsue (Bode *et al.*, 1986 ; Heinz *et al.*, 1991) ainsi que pour des Kunitz de pomme de terre (Walsh et Twitchell, 1991 ; Heibges *et al.*, 2003b ; Revina *et al.*, 2004) et de *Canavalia lineata* (Terada *et al.*, 1994).

Les protéases responsables de la dégradation des protéines de réserves présentes dans les pépins seraient des protéases de type subtilisine (Schaller *et al.*, 2012). D'après les résultats obtenus dans le premier chapitre, les deux IP seraient présents majoritairement dans les pépins. Ces résultats sont en accord avec leur rôle potentiel dans le contrôle de l'activité protéolytique au sein de la graine lors de la mise en place des réserves.

Contrairement à la protéine hétérologue VvKun, la protéine Kunitz commerciale issue du soja n'inhibe pas l'activité de la subtilisine mais celle de la trypsine. Ainsi la diversité d'action des membres de cette famille d'inhibiteurs de protéases (Park *et al.*, 2005 ; Ryan, 1990 ; Ritonja *et al.*, 1990 ; Oliva *et al.*, 2011) est illustrée par notre étude.

Aucun des deux IP hétérologues n'est capable d'inhiber l'activité des protéases aspartiques contenues dans le sécrétome « acide » de *B. cinerea*. Ce résultat n'est pas surprenant car ceux-ci ne sont pas capables d'inhiber l'activité de la pepsine commerciale. VvKun avait été sélectionné pour sa capacité potentielle à inhiber les protéases aspartiques. D'après le chapitre 1, l'expression de celui-ci est induite tardivement par rapport à celle de la protéase aspartique 8 lors de l'infection de la baie. La protéine VvKun semble également dégradée lors de cette infection. En effet, bien que son expression soit induite (Figure 26), la protéine quant à elle disparaît (Figure 57). Nous avons montré ici qu'en plus d'être incapable d'inhiber les protéases aspartiques, VvKun semble dégradé par celles-ci *in vitro*.

VvKun est capable d'inhiber totalement l'activité à pH alcalin des protéases contenues dans le sécrétome « neutre » de *B. cinerea*. Ce sécrétome contiendrait donc des

protéases de type subtilisine aux vues de leur activité inhibitrice spécifique à ce type de protéase. VvKun serait donc capable d'inhiber l'activité de protéases à sérine de *B. cinerea* *in vitro*. Comme vu dans le premier chapitre, l'expression des deux IP ainsi que celle de la protéase à sérine BcSer sont induites en même temps lors de l'infection. En revanche, même si VvKun est capable d'inhiber une protéase à sérine de *B. cinerea*, celui-ci se fait dégrader avant l'arrivée de cette protéase dans la baie. Aussi, les protéases aspartiques sont probablement responsables de la dégradation de la protéine VvKun lors de l'infection de la baie.

Conclusion :

L'objectif principal de ce second chapitre était d'obtenir à la fois des protéases de *B. cinerea* ainsi que VvPin et VvKun afin de savoir si ces deux IP pouvaient inhiber les protéases du champignon.

D'après le chapitre 1, une protéase aspartique (BcAp8) ainsi qu'une subtilisine (BcSer) sont exprimées par *B. cinerea* lors de l'infection de la baie. Aussi, la production de ces deux types de protéases sous forme de sécrétome fongique a été recherchée. Des protéases aspartiques ont pu être obtenues dans le sécrétome « acide ». Des protéases à sérine ont également été obtenues. L'utilisation d'une technique de dosage spécifique de ce type de protéases a en effet montré leur présence dans le sécrétome « neutre ».

Les deux IP de vigne, VvPin et VvKun ont été produits en système hétérologue *P. pastoris*. Leur fonctionnalité a tout d'abord été testée sur différentes protéases commerciales. Il s'est avéré que ces deux IP sont des inhibiteurs spécifiques de protéases à sérine de type subtilisine.

La confrontation des deux sécrétomes fongiques et des deux IP hétérologues *in vitro* a montré que VvKun serait capable d'inhiber totalement l'activité des protéases à sérine de *B. cinerea* contenues dans le sécrétome « neutre », alors que VvPin ne l'inhibe que très peu. En revanche, aucun des deux IP n'est capable d'inhiber les protéases aspartiques contenues dans le sécrétome « acide ». De plus, l'isoforme glycosylée de la protéine hétérologue VvKun semble même dégradée *in vitro* par les protéases aspartiques de *B. cinerea*. L'utilisation du mutant B05.10ΔAp8 (ten Have *et al.*, 2010), incapable de produire la protéase aspartique 8, ou l'utilisation de la protéase aspartique 8 produite en système hétérologue (van Sluyter *et al.*, 2013) pourraient nous permettre de savoir si cette protéase est à l'origine de la dégradation de VvKun.

Dans le premier chapitre, il a été montré que la protéase aspartique 8 est exprimée précocement lors de l'infection de la baie et de la feuille de vitroplant par rapport à la protéase à sérine BcSer et les deux inhibiteurs VvPin et VvKun. Au cours de l'infection de la baie par *B. cinerea*, la protéine VvKun semble dégradée. Ainsi, même si VvKun est capable

d'inhiber des protéases à sérine de *B. cinerea* telles que BcSer, il se fait probablement dégrader par les protéases aspartiques avant l'arrivée de celles-ci.

Les protéases aspartiques contenues dans le sécrétome « acide » sont capables de dégrader la chitinase VvChi4D contrairement aux protéases à sérine contenues dans le sécrétome « neutre » de *B. cinerea* dans nos conditions. Néanmoins, la dégradation de la chitinase par la subtilisine commerciale et les résultats obtenus sur feuilles de vitroplants pourraient nous laisser penser que la protéase à sérine BcSer pourrait aussi jouer un rôle dans la dégradation de la chitinase dans cet organe. Aussi, il serait intéressant d'étudier d'autres conditions de culture afin d'optimiser la production des protéases à sérine de *B. cinerea*. Dans notre étude, seule la dégradation de la chitinase a été analysée. Lors de l'infection de la baie par *B. cinerea*, la majorité des protéines de baie semblent dégradée, il serait donc intéressant d'étudier la dégradation d'autres protéines de la baie afin de savoir si les protéases aspartiques sont responsables de la dégradation de l'ensemble de ces protéines.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives :

Lors de l'infection par *B. cinerea*, des protéines de défense, dont une des protéines PR majoritaires de la baie de raisin VvChi4D, semblent dégradées par des protéases du champignon (Thèse S. Colas, 2012). L'hypothèse émise au début de notre travail était que des inhibiteurs de protéases présents chez la vigne pourraient empêcher la dégradation de cette protéine de défense par des protéases fongiques.

Trois familles de protéases ont principalement été décrites lors du phénomène infectieux par *B. cinerea* sur cotylédons de tournesol : des protéases aspartiques, une protéase glutamique ainsi qu'une protéase à sérine de type subtilisine (Billon-Grand *et al.*, 2011). Deux inhibiteurs de protéases ont été sélectionnés pour cette étude, un Potato Inhibitor I (*VvPin*) pouvant inhiber des protéases à sérine et un Kunitz (*VvKun*) pouvant potentiellement inhiber des protéases aspartiques et des protéases à sérine également.

Durant l'infection de la baie et de la feuille, une protéase aspartique BcAp8, une protéase glutamique BcAcp et une protéase à sérine de type subtilisine BcSer, sont exprimées. L'expression des deux IP est également induite lors de l'infection de la baie et de la feuille.

L'obtention de protéases aspartiques et de protéases à sérine par la production de sécrétomes fongiques ainsi que la production en système hétérologue de *VvPin* et *VvKun* a permis de mettre en évidence l'inhibition de protéase de *B. cinerea* par un inhibiteur de protéases de vigne. En effet, la protéine hétérologue *VvKun*, en plus de son activité inhibitrice sur une subtilisine commerciale, s'est révélée capable d'inhiber *in vitro* des protéases à sérine de *B. cinerea*.

Lors de l'infection de la baie, l'expression de *VvKun* est induite au même moment que l'expression de la protéase à sérine de type subtilisine *BcSer*. De plus, l'expression de *VvKun*, initialement localisée dans les pépins de la baie mûre, est induite dans les endroits stratégiques de pénétration/développement du champignon que sont la pellicule et la pulpe lors de l'infection. *VvKun* serait donc induit au bon moment et au bon endroit pour inhiber la protéase à sérine *BcSer*. Toutefois, l'expression de la protéase à sérine n'étant induite qu'en

fin d'infection aussi bien en baie qu'en feuilles, son inhibition n'empêcherait en rien la mort de l'organe.

De plus, la chitinase VvChi4D ne semble pas dégradée par les protéases à sérine de *B. cinerea* obtenues lors de notre étude. Elle serait en revanche dégradée par des protéases aspartiques, et plus particulièrement la protéase aspartique 8, comme l'avaient précédemment montré d'autres auteurs (Thèse S. Colas, 2012 ; van Sluyter *et al.*, 2013). *In vitro*, ces protéases aspartiques semblent également capables de dégrader en partie la protéine VvKun hétérologue. Et *in planta*, la protéine VvKun semble dégradée au cours de l'infection de la baie. L'expression de la protéase aspartique 8 lors de l'infection de la baie et de la feuille est induite bien avant celle de VvKun. Cette protéase, présente précocement dans la baie ou la feuille, pourrait donc en effet dégrader la protéine VvKun.

L'induction de l'expression de VvKun et VvPin, même si elle semble possible par le MeJA principalement, ne pourrait donc en aucun cas être bénéfique pour la plante lors de l'infection par le champignon.

Les IP sélectionnés lors de cette étude ne se sont donc pas révélés capables d'empêcher la dégradation de la chitinase VvChi4D en inhibant des protéases aspartiques de *B. cinerea*. Il serait donc intéressant de rechercher d'autres IP de vigne pouvant potentiellement inhiber des protéases aspartiques. Pour cela l'étude devrait se porter sur les différents Kunitz présents chez la vigne.

Néanmoins, notre étude montre pour la première fois qu'un inhibiteur de protéases de vigne est capable d'inhiber l'activité de protéases à sérine de *B. cinerea*. Pour en connaître plus sur la protéase inhibée par VvKun, il serait intéressant de purifier les protéases à sérine obtenues et de les identifier par séquençage.

Les protéases aspartiques semblent capables de dégrader de nombreuses protéines végétales, il serait intéressant de savoir si celles-ci sont à l'origine de la dégradation de l'ensemble des protéines de la baie ou si les protéases à sérine interviennent également dans ce processus.

La production de vignes sur-exprimant les IP VvPin et VvKun est actuellement en cours (collaboration avec l'INRA de Colmar, Plateforme de transformation vigne, Unité Mixte de Recherche Santé de la Vigne et Qualité du Vin). Les vignes transformées devraient permettre d'évaluer l'impact potentiel des deux IP lors de l'infection de la plante par *B. cinerea*. Néanmoins, ceux-ci ne pouvant apparemment pas inhiber la dégradation des protéines de défense par les protéases aspartiques, d'autres hypothèses pourraient être envisagées quant à leur rôle au sein même de la plante. En effet, ces deux IP inhibant spécifiquement les protéases de type subtilisine, un rôle dans la régulation de la mort cellulaire programmée serait à envisager (Levine *et al.*, 1996).

Références bibliographiques

- Abd El Rahman, T., El Oirdi, M., Gonzalez-Lamothe, R., & Bouarab, K. (2012). Necrotrophic pathogens use the salicylic acid signaling pathway to promote disease development in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25(12), 1584–93.
- Abidi, F., Chobert, J.-M., Haertlé, T., & Marzouki, M. N. (2011). Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. *Process Biochemistry*, 46(12), 2301–2310.
- Abidi, F., Limam, F., & Marzouki, M. N. (2007). Purification and Characterization of an Alkaline Protease Prot 1 from *Botrytis cinerea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 141, 361–376.
- Adrian, M., & Jeandet, P. (2012). Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia*, 83(8), 1345–50.
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L. a., & Bessis, R. (1997). Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, Against *Botrytis cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold. *Journal of Chemical Ecology*, 23(7), 1689–1702.
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17(2), 73–90.
- Ait Barka, E., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J.-C., & Belarbi, A. (2002). Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*, 24(2), 135–142.
- Ali, K., Maltese, F., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 9(3), 357–378.
- Almagro, L., Gómez Ros, L. V, Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, a, & Pedreño, M. a. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 377–90.

- Amselem, J., Cuomo, C. a, van Kan, J. a L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Dickman, M. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics*, 7(8), e1002230.
- Annis, S. L., & Goodwin, P. H. (1997). Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of PLant Pathology*, 103, 1–14.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–99.
- Asai, S., & Yoshioka, H. (2009). Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to nectrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(6), 619–29.
- Aziz, A., Gauthier, A., Bezier, A., Poinssot, B., Joubert, J.-M., Pugin, A., Baillieul, F. (2007). Elicitor and resistance-inducing activities of b-1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with b -1,3 glucans and a-1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany*, 1–10.
- Aziz, A., Heyraud, A., & Lambert, B. (2004). Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*, 218(5), 767–74.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., & Pugin, A. (2003). Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection Against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(12), 1118–1128.
- Bavaresco L., Fregoni C., Cantu E., Trevisan M., (1999) Stilbene compounds: From the grapevine to wine. *Drugs Under Experimental and Clinical Research* 25: 57-63.
- Bari, R., & Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 473–88.

- Bechinger, C., Giebel, K., Schnell, M., Leiderer, P., Deising, H., & Bastmeyer, M. (1999). Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5435), 1896–9.
- Beers, E. P., Jones, A. M., & Dickerman, A. W. (2004). The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry*, 65, 43–58.
- Belenghi, B., Acconcia, F., Trovato, M., Perazzolli, M., Bocedi, A., Polticelli, F., Delledonne, M. (2003). AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. *European Journal of Biochemistry*, 270, 2593–2604.
- Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M.-F., & Mérillon, J.-M. (2006). Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9119–25.
- Belhadj, A., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M.-F., & Mérillon, J.-M. (2008). Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5781–7.
- Benchabane, M., Schlüter, U., Vorster, J., Goulet, M., & Michaud, D. (2010). Biochimie Plant cystatins. *Biochimie*, 1–10.
- Beuning, L. L., Spriggs, T. W., & Christeller, J. T. (1994). Evolution of the proteinase inhibitor I family and apparent lack of hypervariability in the proteinase contact loop. *Journal of Molecular Evolution*, 39(6), 644–654.
- Bézier, A., Lambert, B., & Baillieul, F. (2002). Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 111–120.
- Billon-grand, G., Rasclé, C., Droux, M., Rollins, J. A., & Poussereau, N. (2011). pH modulation differs during sunflower cotyledon colonization by the two closely related necrotrophic fungi *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Plant Pathology*, 1–11.

- Bleecker, a B., & Kende, H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 1–18.
- Bode, W., & Huber, R. (2000). Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477(1-2), 241–52.
- Bode, W., Papamokos, E., Musil, D., Seemuelierl, U., & Fritz, H. (1986). Refined 1.2 Å crystal structure of the complex formed between subtilisin Carlsberg and the inhibitor eglin c. Molecular structure of eglin and its detailed interaction with subtilisin. *The EMBO Journal*, 5(4), 813–818.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379–406.
- Bonomelli, A., Mercier, L., Franchel, J., Baillieul, F., Benizri, E., & Mauro, M. (2004). Response of Grapevine Defenses to UV – C Exposure. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(1), 52–60.
- Bony, S., Gillet, C., Bouchez, a, Margoum, C., & Devaux, a. (2008). Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: field and mesocosm surveys. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 89(3), 197–203.
- Bordiec, S., Paquis, S., Lacroix, H., Dhondt, S., Ait Barka, E., Kauffmann, S., Dorey, S. (2011). Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. pisi in grapevine cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, 62(2), 595–603.
- Botella, M. A., Xu, Y., Prabha, T. N., Zhao, Y., Narasimhan, M., Wilson, K. A., Hasegawa, P. M. (1996). Differential Expression of Soybean Cysteine Proteinase Inhibitor Genes during Development and in Response to Wounding and Methyl Jasmonate. *Plant Physiology*, 112, 1201–1210.

- Brito, N., Espino, J. J., & González, C. (2006). The endo-beta-1,4-xylanase xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(1), 25–32.
- Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 183–205.
- Brunner, F., Stintzi, a, Fritig, B., & Legrand, M. (1998). Substrate specificities of tobacco chitinases. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 14(2), 225–34.
- Bruun, A. W., Svendsen, I., Sørensen, S. O., Kielland-brandt, M. C., & Winther, J. R. (1998). A High-Affinity Inhibitor of Yeast Carboxypeptidase Y Is Encoded by TFS1 and Shows Homology to a Family of Lipid Binding Proteins. *Biochemistry*, 37, 3351–3357.
- Camps, C. (2008). Etude transcriptomique de la réponse de la Vigne (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) au champignon ascomycète vasculaire *Eutypa lata*, responsable de l'eutypiose.
- Caruso, F., Mendoza, L., Castro, P., Cotoras, M., Aguirre, M., Matsuhira, B., Antonioletti, R. (2011). Antifungal activity of resveratrol against *Botrytis cinerea* is improved using 2-furyl derivatives. *PloS One*, 6(10), e25421.
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66.
- Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B., & Low, P. S. (2000). Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *The Plant Cell*, 12(11), 2191–200.
- Charity, J. A., Anderson, M. A., Bittisnich, D. J., Whitecross, M., & Higgins, T. J. V. (1999). Transgenic tobacco and peas expressing a proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* have increased insect resistance. *Molecular Breeding*, 5, 357–365.
- Charity, J. A., Hughes, P., Anderson, M. A., Bittisnich, D. J., Whitecross, M., & Higgins, T. J. V. (2005). Pest and disease protection conferred by expression of barley B-hordeothionin

- and *Nicotiana glauca* proteinase inhibitor genes in transgenic tobacco. *Functional Plant Biology*, 32, 35–44.
- Chen, Z., Brown, R. L., Lax, A. R., & Cleveland, T. E. (1999). Inhibition of Plant-Pathogenic Fungi by a Corn Trypsin Inhibitor Overexpressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1320–1324.
- Cheon, Y.-P., De Mayo, F. J., Bagchi, K., & Bagchi, I. C. (2003). Induction of Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-2 Beta, a Cysteine Protease Inhibitor in Decidua: A Potential Regulator of Embryo Implantation. *Journal of Biological Chemistry*, 1–33.
- Cherrad, S., Girard, V., Dieryckx, C., Gonçalves, I. R., Dupuy, J.-W., Bonneau, M., Poussereau, N. (2012). Proteomic analysis of proteins secreted by *Botrytis cinerea* in response to heavy metal toxicity. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 4(8), 835–46.
- Chilosi, G., Caruso, C., Caporale, C., Leonardi, L., Bertini, L., Buzi, A., Buonocore, V. (1999). Antifungal Activity of a Bowman-Birk-type Trypsin Inhibitor from Wheat Kernel. *Journal of Phytopathology*, 148, 477–481.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.-M., Simon, A., & Viaud, M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphagous pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1), 1–10.
- Christensen, A. B., Cho, B. H., Næsby, M., Gregersen, P. L., Brandt, J., Madriz-Ordeñana, K., Thordal-Christensen, H. (2002). The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology*, 3(3), 135–44.
- Christensen, A. B., Thordal-Christensen, H., Zimmermann, G., Gjetting, T., Lyngkjær, M. F., Dudler, R., & Schweizer, P. (2004). The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(1), 109–17.

- Chye, M.-L., Sin, S.-F., Xu, Z.-F., & Yeung, E. C. (2006). Serine proteinase inhibitor proteins: Exogenous and endogenous functions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 42(2), 100–108.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*, 326 1, 1–16.
- Colas, S., Afoufa-Bastien, D., Jacquens, L., Clément, C., Baillieul, F., Mazeyrat-Gourbeyre, F., & Monti-Dedieu, L. (2012). Expression and *in situ* localization of two major PR proteins of grapevine berries during development and after UV-C exposition. *PloS One*, 7(8), 1–10.
- Coley-Smith J. R. and Cooke R. C. (1971). Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology*, (9), 65–92.
- Colmenares, a J., Aleu, J., Durán-Patrón, R., Collado, I. G., & Hernández-Galán, R. (2002). The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology*, 28(5), 997–1005.
- Commenil, P., Belingheri, L., & Dehorter, B. (1998). Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52, 1–14.
- Commenil, P., Belingheri, L., Dehorter, B., & Bauw, G. (1999). Molecular characterization of a lipase induced in *Botrytis cinerea* by components of grape berry cuticle. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 37–43.
- Comménil, P., Belingheri, L., Sancholle, M., & Dehorter, B. (1995). Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Botrytis cinerea*. *Lipids*, 30(4), 351–6.
- Cotoras, M., & Silva, E. (2005). Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. *Mycologia*, 97(2), 485–92.
- Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, a, Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Boulay, M. (2001). *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic

- plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 901–10.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16, 23–52.
- Daly, R., & Hearn, M. T. W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition* 18(2), 119–38.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. a., & Richberg, M. H. (1996). Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *The Plant Cell*, 8(10), 1793–1807.
- Davies, D. R. (1990). The structure and function of the aspartic proteinases. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, (19), 189–215.
- De Beer, A., & Vivier, M. a. (2008). Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity. *BMC Plant Biology*, 8, 75.
- De Waard, M. A. (1997). Significance of ABC Transporters in Fungicide Sensitivity and Resistance. *Pestic. Sci.*, 51, 271–275.
- Dean, R., Van Kan, J. a L., Pretorius, Z. a, Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–30.
- Deighton, N., Muckenschnabel, I., Colmenares, a J., Collado, I. G., & Williamson, B. (2001). Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 57(5), 689–92.
- Denison, S. H. (2000). pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 29(2), 61–71.

- Derckel, J., Legendre, L., Audran, J., Haye, B., & Lambert, B. (1996). Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science*, 119, 31–37.
- Derckel, J.-P., Audran, J.-C., Haye, B., Lambert, B., & Legendre, L. (1998). Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and beta-1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiologia Plantarum*, 104, 56–64.
- Devoto, A., & Turner, J. G. (2003). Regulation of jasmonate-mediated plant responses in arabidopsis. *Annals of Botany*, 92(3), 329–37.
- Dhekney, S. a., Li, Z. T., & Gray, D. J. (2011). Grapevines engineered to express cisgenic *Vitis vinifera* thaumatin-like protein exhibit fungal disease resistance. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(4), 458–466. 3
- Doares, S. H., Narváez-vpsquez, J., Conconi, A., & Ryan, C. A. (1995). Salicylic Acid Inhibits Synthesis of Proteinase Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant Physiology*, 108, 1741–1746.
- Dodd, A. N., Kudla, J., & Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 593–620.
- Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M., Saindrenan, P., Fritig, B., Biologie, I. De, & Pasteur, U. L. (1997). Spatial and Temporal Induction of Cell Death, Defense Genes, and Accumulation of Salicylic Acid in Tobacco Leaves Reacting Hypersensitively to a Fungal Glycoprotein Elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10(5), 646–655.
- Dufour, M. C., Lambert, C., Bouscalt, J., Mérillon, J. M., & Corio-Costet, M. F. (2013). Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*, 62(2), 370–382.

- El Oirdi, M., El Rahman, T. A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M. C., Daayf, F., Bouarab, K. (2011). *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *The Plant Cell*, 23(6), 2405–21.
- Elpidina, E. N., Voskoboinikova, N. E., Belozersky, M. A., & Dunaevsky, Y. E. (1991). Localization of a metalloproteinase and its inhibitor in the protein bodies of buckwheat seeds. *Planta*, 185, 46–52.
- Espino, J. J., Brito, N., Noda, J., & Gonza, C. (2005). *Botrytis cinerea* endo- β -1, 4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66, 213–221.
- Espino, J. J., Gutiérrez-Sánchez, G., Brito, N., Shah, P., Orlando, R., & González, C. (2010). The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics*, 10(16), 3020–34.
- Faurie, B., Cluzet, S., & Mérillon, J.-M. (2009). Implication of signaling pathways involving calcium, phosphorylation and active oxygen species in methyl jasmonate-induced defense responses in grapevine cell cultures. *Journal of Plant Physiology*, 166(17), 1863–77.
- Fernández-Acero, F. J., Colby, T., Harzen, A., Carbú, M., Wieneke, U., Cantoral, J. M., & Schmidt, J. (2010). 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors. *Proteomics*, 10(12), 2270–80.
- Fourie, J. F., & Holz, G. (1995). Initial Infection Processes by *Botrytis cinerea* on Nectarine and Plum Fruit and the Development of Decay. *Phytopathology*, 85(1), 82–87.
- Fournier, E., Levis, C., Fortini, D., Leroux, P., Giraud, T., & Brygoo, Y. (2003). Characterization of Bc-hch, the *Botrytis cinerea* Homolog of the *Neurospora crassa* het-c Vegetative Incompatibility Locus, and Its Use as a Population Marker. *Mycologia*, 95(2), 251.
- Frías, M., Brito, N., & González, C. (2012). Short communication the *Botrytis cinerea* ceratoplatanin *BcSpl1* is a potent inducer of systemic acquired resistance (SAR) in tobacco and generates a wave of salicylic acid expanding from the site of application. *Molecular Plant Pathology*, 1–6.

- Fung, R. W. M., Gonzalo, M., Fekete, C., Kovacs, L. G., He, Y., Marsh, E., Qiu, W. (2008). Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiology*, 146(1), 236–49.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Pugin, A. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(7), 711–24.
- Gatehouse, J. A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores : a dynamic interaction. *New Phytologist*, 156, 145–169.
- Gindro, K., Berger, V., Godard, S., Voinesco, F., Schnee, S., Viret, O., & Alonso-villaverde, V. (2012). Plant Physiology and Biochemistry Protease inhibitors decrease the resistance of *Vitaceae* to *Plasmopara viticola*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 74–80.
- Giraud, T., Brygoo, Y., Levis, C., & Leroux, P. (1997). RFLP Markers Show Genetic Recombination (*Botrytis cinerea*) and Transposable Elements Reveal Two Sympatric Species. *Molecular Biology and Evolution*, 14(11), 1177–1185.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205–27.
- Glerup, S., Boldt, H. B., Michael, T., Sottrup-jensen, L., Linda, C., Oxvig, C., Giudice, L. C. (2005). Proteinase Inhibition by Proform of Eosinophil Major Basic Protein (pro-MBP) Is a Multistep Process of Intra- and Intermolecular Disulfide Rearrangements. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 9823–9832.
- Godfrey, D., Able, A. J., & Dry, I. B. (2007). Induction of a grapevine germin-like protein (VvGLP3) gene is closely linked to the site of *Erysiphe necator* infection: a possible role in defense? *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(9), 1112–25.
- Goetz, G., Fkyerat, A., Métais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R., & Pont, V. (1999). Resistance factors to grey mould in grape berries : identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry*, 52, 759–767.

- Gomès, E., Sagot, E., Gaillard, C., Laquittaine, L., Poinssot, B., Sanejouand, Y.-H., Coutos-Thévenot, P. (2003). Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cells in response to fungal elicitor treatments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(5), 456–64.
- Gomes M.T.R., Oliva M.L., Lopes M.T.P, Salas C.E. (2011) Plant proteinases and inhibitors: An overview of biological function and pharmacological activity. *Current Protein and Peptide Science* 12:417-436.
- González-Fernández, R., Aloria, K., Valero-Galván, J., Redondo, I., Arizmendi, J. M., & Jorrín-Novo, J. V. (2013). Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. *Journal of Proteomics*.
- Gourinath, S., Alam, N., Srinivasan, a., Betzel, C., & Singh, T. P. (2000). Structure of the bifunctional inhibitor of trypsin and α -amylase from ragi seeds at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 56(3), 287–293.
- Govrin, E. M., & Levine, a. (2000a). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology : CB*, 10(13), 751–7.
- Govrin, E. M., & Levine, a. (2000b). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology : CB*, 10(13), 751–7.
- Grant, M., & Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 414–20.
- Green, R., & Fluhr, R. (1995). UV-B-Induced PR-1 Accumulation Is Mediated by Active Oxygen Species. *The Plant Cell*, 7, 203–212.
- Green, T. R., & Ryan, C. a. (1972). Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism against Insects. *Science (New York, N.Y.)*, 175, 776–777.
- Grimplet, J., Deluc, L. G., Tillett, R. L., Wheatley, M. D., Schlauch, K. A., Cramer, G. R., & Cushman, J. C. (2007). Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics*, 187(8), 1–23.

- Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S., & Durner, J. (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 507–16.
- Guay, J., Falgoutret, J., Ducret, A., Percival, M. D., & Mancini, J. A. (2000). Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. *European Journal of Biochemistry*, 267, 6311–6318.
- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M., & Zenk, M. H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(6), 2389–93.
- Habib, H., & Fazili, K. M. (2007). Plant protease inhibitors : a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology*, 2(3), 68–85.
- Ham, W. E., & Sandstedt, R. M. (1944). A proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soy bean meal. *Journal of Biological Chemistry*, 154, 505–506.
- Hamiduzzaman, M. M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J.-M., & Mauch-Mani, B. (2005). beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(8), 819–29.
- Hammerschmidt, R. (1999). Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*, (37), 285–306.
- Hashimoto, K., & Kudla, J. (2011). Calcium decoding mechanisms in plants. *Biochimie*, 93(12), 2054–9.
- He, M., Xu, Y., Cao, J., Zhu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Fu, Z. (2013). Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection. *Protoplasma*, 250(1), 129–40.
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), 4501–24.

- Hegedus, D. D., & Rimmer, S. R. (2005). *Sclerotinia sclerotiorum*: when “to be or not to be” a pathogen? *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 177–84.
- Heibges, a, Glaczinski, H., Ballvora, a, Salamini, F., & Gebhardt, C. (2003). Structural diversity and organization of three gene families for Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 269(4), 526–34.
- Heibges, a, Salamini, F., & Gebhardt, C. (2003). Functional comparison of homologous members of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 269(4), 535–41.
- Heil, M., & Ton, J. (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science*, 13(6), 264–72.
- Heinz, D. W., Priestle, J. P., Rahuel, J., Wilson, K. S., & Grütter, M. G. (1991). Refined crystal structures of subtilisin novo in complex with wild-type and two mutant eglins. Comparison with other serine proteinase inhibitor complexes. *Journal of Molecular Biology*, 217(2), 353–371.
- Heredia, A., Jimnez, A., & Guilln, R. (1995). Composition of plant cell walls. *Z Lebensm Unters Forsh*, 200, 24–31.
- Hermosa, M. R., Turra, D., Fogliano, V., Montea, E., & Lorito, M. (2006). Identification and characterization of potato protease inhibitors able to inhibit pathogenicity and growth of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 68, 138–148.
- Holz G., Coertze S., Williamson B. (2007). The ecology of *Botrytis* on Plant surfaces. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Edited by Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynsky and N. Delen. 9-27.
- Hückelhoven, R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 101–27.
- Huntington, J. a, Read, R. J., & Carrell, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 407(6806), 923–6.

- Hwang, J. E., Hong, J. K., Je, J. H., Lee, K. O., Lee, S. Y., Kim, D. Y., & Lim, C. O. (2009). Regulation of seed germination and seedling growth by an *Arabidopsis* phytocystatin isoform, AtCYS6. *Plant Cell Report*, 28, 1623–1632.
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., & Faoro, F. (2004). Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4406–13.
- Irving, J. A., Pike, R. N., Lesk, A. M., & Whisstock, J. C. (2000). Phylogeny of the Serpin Superfamily : Implications of Patterns of Amino Acid Conservation for Structure and Function. *Genome Research*, 10, 1845–1864.
- Jamal, F., Pandey, P. K., Khan, M. Y., & Singh, D. (2012). Serine protease inhibitors in plants : nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemistry Reviews*.
- Jeandet, P., Breuil, A. C., Adrian, M., Weston, L. A., Debord, S., Meunier, P., Bessis, R. (1997). HPLC Analysis of Grapevine Phytoalexins Coupling Photodiode Array Detection and Fluorometry. *Analytical Chemistry*, 69, 5172–5177.
- Jofuku, K. D., & Goldberg, R. B. (1989). Kunitz Trypsin Inhibitor Genes Are Differentially Expressed during the Soybean Life Cycle and in Transformed Tobacco Plants. *The Plant Cell*, 1, 1079–1093.
- Johnson, R., Narvaez, J., An, G., & Ryan, C. (1989). Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants : Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 9871–9875.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–9.
- Jorda, L. (1999). A Genomic Cluster Containing Four Differentially Regulated Subtilisin-like Processing Protease Genes Is in Tomato Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 274(4), 2360–2365.

- Jordá, L., Conejero, V., & Vera, P. (2000). Characterization of P69E and P69F, two differentially regulated genes encoding new members of the subtilisin-like proteinase family from tomato plants. *Plant Physiology*, 122(1), 67–74.
- Joshi, B. N., Sainani, M. N., Bastawade, K. B., Gupta, V. S., & Ranjekar, P. K. (1998). Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246(2), 382–7.
- Joubert, D. a, Kars, I., Wagemakers, L., Bergmann, C., Kemp, G., Vivier, M. a, & van Kan, J. a L. (2007). A polygalacturonase-inhibiting protein from grapevine reduces the symptoms of the endopolygalacturonase BcPG2 from *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana* leaves without any evidence for *in vitro* interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(4), 392–402.
- Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. a E., & van Kan, J. a L. (2005). Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 43(2), 213–25.
- Kars, I., Mccalman, M., Wagemakers, L., & Van Kan, J. A. L. (2005). Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis : Bcpme1 and Bcpme2 are dispensable for virulence of strain B05. 10. *Molecular Plant Pathology*, 6(6), 641–652.
- Kars I. and van Kan J.A.L. (2007). Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Edited by Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynsky and N. Delen. 99-118.
- Kataoka, Y., Takada, K., Oyama, H., Tsunemi, M., James, M. N. G., & Oda, K. (2005). Catalytic residues and substrate specificity of scytalidoglutamic peptidase, the first member of the eqolisin in family (G1) of peptidases. *FEBS Letters*, 579(14), 2991–4.
- Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory : The Emerging Molecular Analysis. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 299–328.

- Kim, J., Baek, S.-A., & Im, K.-H. (2009). Overexpression of a Kunitz-type trypsin inhibitor (AtKTI1) causes early flowering in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation*, 59(1), 75–81.
- Kim, K. S., Min, J.-Y., & Dickman, M. B. (2008). Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(5), 605–12.
- Koistinen, K. M., Soininen, P., Venäläinen, T. a, Häyrinen, J., Laatikainen, R., Peräkylä, M., Kärenlampi, S. O. (2005). Birch PR-10c interacts with several biologically important ligands. *Phytochemistry*, 66(21), 2524–33.
- Koiwa, H., Bressan, R. A., & Hasegawa, P. M. (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*, 2(10), 379–384.
- Kolattukudy, P. E. (1985). Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 23, 223–250.
- Kudla, J., Batistic, O., & Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *The Plant Cell*, 22(3), 541–63.
- Kunitz, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, 101(2635), 668–669.
- Kunz, C., Vandelle, E., Rolland, S., Poinssot, B., Bruel, C., Cimerman, A., Boccara, M. (2006). Characterization of a new, nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. *The New Phytologist*, 170(3), 537–50.
- L'Haridon, F., Besson-Bard, A., Binda, M., Serrano, M., Abou-Mansour, E., Balet, F., Métraux, J.-P. (2011). A permeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity. *PLoS Pathogens*, 7(7), e1002148.
- Laluk, K., & Mengiste, T. (2011). The Arabidopsis extracellular UNUSUAL SERINE PROTEASE INHIBITOR functions in resistance to necrotrophic fungi and insect herbivory. *The Plant Journal*, 68, 480–494.

- Lam, E., Kato, N., & Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411(6839), 848–53.
- Lamb, C., & Dixon, R. a. (1997). the Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 251–275.
- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., Besson, A., Pugin, A., & Wendehenne, D. (2006). Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca^{2+} concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 40(8), 1369–76.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-legrand, A., Pugin, A., Wendehenne, D., & Lebrun-garcia, A. (2004). Analysis of Nitric Oxide Signaling Functions in Tobacco Cells Challenged by the Elicitor Cryptogein. *Plant Physiology*, 135, 516–529.
- Langcake, P., & Pryce, R. J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9, 77–86.
- Law, R. H. P., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. a, Wong, W., Whisstock, J. C. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology*, 7(5), 216.
- Lawrence, P. K., & Koundal, K. R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5(1), 93–109.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., & Ryals, J. (1995). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8(6), 863–870.
- Le Henanff, G., Farine, S., Kieffer-Mazet, F., Miclot, A.-S., Heitz, T., Mestre, P., Chong, J. (2011). *Vitis vinifera* VvNPR1.1 is the functional ortholog of AtNPR1 and its overexpression in grapevine triggers constitutive activation of PR genes and enhanced resistance to powdery mildew. *Planta*, 234(2), 405–17.

- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., & Pugin, A. (2002). Analysis and Effects of Cytosolic Free Calcium Increases in Response to Elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* Cells. *The Plant Cell*, 14, 2627–2641.
- Lelievre, J.-M. (1997). Ethylene and fruit ripening, 101(4), 727–739.
- Leroux P., Elad Y., Williamson B., Tudzynsky P., Delen N. (2007) Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Edited by Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynsky and N. Delen. 195-222
- Leubner-Metzger, G., & Meins, F. J. (1999). Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*, 49–76.
- Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(10), 739–50.
- Levine, A., Pennell, R. I., Alvarez, M. E., Palmer, R., & Lamb, C. (1996). Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology*, 6(4), 427–437.
- Li, B., Wang, W., Zong, Y., Qin, G., & Tian, S. (2012). Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis. *Journal of Proteome Research*, 11(8), 4249–60.
- Lipke, H. (1954). Effect of Soybean Inhibitors on Growth of *Tribolium confusum*. *Agricultural and Food Chemistry*, 2(8), 410–414.
- Liu, P.-P., von Dahl, C. C., Park, S.-W., & Klessig, D. F. (2011). Interconnection between methyl salicylate and lipid-based long-distance signaling during the development of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Physiology*, 155(4), 1762–8.
- Lomate, P. R., & Hivrale, V. K. (2012). Wound and methyl jasmonate induced pigeon pea defensive proteinase inhibitor has potency to inhibit insect digestive proteinases. *Plant*

Physiology and Biochemistry : PPB / Société Française de Physiologie Végétale, 57, 193–9.

- Lorenc-Kubis, I., Kowalska, J., Pochron, B., Zuzlo, A., & Wilusz, T. (2001). Isolation and Amino Acid Sequence of a Serine Proteinase Inhibitor from Common Flax (*Linum usitatissimum*) Seeds. *Chembiochem*, 2, 45–51.
- Lorito, M., Broadway, R. M., Hayes, C. K., Woo, S. L., Noviello, C., Williams, D. L., & Harman, G. E. (1994). Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7(4), 525–527.
- Lyon, G. (2007). Agents That Can Elicit Induced Resistance, 9–29.
- Ma, Y., Zhao, Q., Lu, M.-Z., & Wang, J. (2010). Kunitz-type trypsin inhibitor gene family in *Arabidopsis* and *Populus trichocarpa* and its expression response to wounding and herbivore in *Populus nigra*. *Tree Genetics & Genomes*, 7(2), 431–441.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast (Chichester, England)*, 22(4), 249–70.
- Mackey, D., & McFall, A. J. (2006). MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology*, 61(6), 1365–71.
- Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagianti, S., & Aziz, A. (2007). Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and β -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 118(1), 43–57.
- Mahoney, W. C., Hermodson, M. a, Jones, B., Powers, D. D., Corfman, R. S., & Reeck, G. R. (1984). Amino acid sequence and secondary structural analysis of the corn inhibitor of trypsin and activated Hageman Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(13), 8412–6.

- Maier, F., Zwicker, S., Hückelhoven, A., Meissner, M., Funk, J., Pfitzner, A. J. P., Proteins, N. O. F. P. (2011). Nonexpressor of pathogenesis-related proteins1 (NPR1) and some NPR1-related proteins are sensitive to salicylic acid. *Molecular Plant Pathology*, 12(1), 73–91.
- Major, I. T., & Constabel, C. P. (2008). Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. *Plant Physiology*, 146(3), 888–903.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., & Legendre, L. (2003). Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(3), 359–66.
- Marchal R., Tabary I., Valade M., Moncomble D., Viaux L., Robillard B., Duteurtre B., Jeandet P. (2002) Influence de la pourriture grise sur les propriétés moussantes des champagnes. Le vigneron champenois 6 : 52-64.
- Martinez, M., Cambra, I., Carrillo, L., Diaz-mendoza, M., & Diaz, I. (2009). Characterization of the Entire Cystatin Gene Family in Barley and Their Target Cathepsin L-Like Cysteine-Proteases , Partners in the Hordein Mobilization during Seed Germination 1 [W]. *Plant Physiology*, 151, 1531–1545.
- Masuda, Y., Nirasawa, S., Nakaya, K., & Kurihara, Y. (1995). Cloning and sequencing miraculin of a cDNA encoding a taste-modifying protein. *Gene*, 161, 175–177.
- Mcmanus, M. T., WHITE, D. W. R., & McGregor, P. G. (1994). Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. *Transgenic Research*, 3, 50–58.
- Mehdy, M. C. (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiology*, 105(2), 467–472.
- Mendgen, K., & Desing, H. (1993). Infection structures of fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. *New Phytol.*, (124), 193–213.

- Mima, J., Hayashida, M., Fujii, T., Narita, Y., Hayashi, R., Ueda, M., & Hata, Y. (2005). Structure of the Carboxypeptidase Y Inhibitor I C in Complex with the Cognate Proteinase Reveals a Novel Mode of the Proteinase – Protein Inhibitor Interaction. *Journal of Molecular Biology*, 346, 1323–1334.
- Monteiro, S., Barakat, M., Piçarra-Pereira, M. a, Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2003). Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology*, 93(12), 1505–12.
- Movahedi S., Heale J.B. (1990) The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36:303-324.
- Murao, S., Oda, K., Matsushita, Y. (1972) New acid proteases from *Scytalidium lignicolum* M-133. *Agric.Biol.Chem.*36, 1647-1650.
- Niderman, T., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., Witterswill, C. H. (1995). Pathogenesis-Related PR-1 Proteins Are Antifungal. *Plant Physiology*, 108, 17–27.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B. F., & Dangl, J. L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, 37, 579–609.
- Noda, J., Brito, N., & González, C. (2010). The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity. *BMC Plant Biology*, 10, 38.
- Oda, K. (2012). New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *Journal of Biochemistry*, 151(1), 13–25.
- Olivieri, F., Zanetti, E., Oliva, C. R., Covarrubias, A. A., & Casalongu, C. A. (2002). Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 63–72.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084–90.

- Papastoitis, G., & Wilson, K. A. (1991). Initiation of the Degradation of the Soybean Kunitz and Bowman-Birk Trypsin Inhibitors by a Cysteine Protease. *Plant Physiology*, 96, 1086–1092.
- Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D. W., & Goldman, S. L. (2004). Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*, 2(4), 359–66.
- Park, C.-J., Kim, K.-J., Shin, R., Park, J. M., Shin, Y.-C., & Paek, K.-H. (2004). Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *The Plant Journal*, 37(2), 186–198.
- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., & Klessig, D. F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5847), 113–6.
- Park, S.-W., Liu, P.-P., Forouhar, F., Vlot, a C., Tong, L., Tietjen, K., & Klessig, D. F. (2009). Use of a synthetic salicylic acid analog to investigate the roles of methyl salicylate and its esterases in plant disease resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(11), 7307–17.
- Park, Y., Choi, B. H., Kwak, J.-S., Kang, C.-W., Lim, H.-T., Cheong, H.-S., & Hahm, K.-S. (2005). Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6491–6.
- Pautot, V., Holzer, F. M., & Walling, L. L. (1991). Differential expression of Tomato proteinase inhibitor I and II genes during bacterial pathogen invasion and wounding. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4(3), 284–292.
- Pearce, R. B. (1996). Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytologist*, 132, 203–233.
- Perazzolli, M., Bampi, F., Faccin, S., Moser, M., Luca, F. De, Ciccotti, A. M., Moser, C. (2010). *Armillaria mellea* Induces a Set of Defense Genes in Grapevine Roots and One of Them

- Codifies a Protein with Antifungal Activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(4), 485–496.
- Pernas, M., López-solanilla, E., Sánchez-monge, R., Salcedo, G., & Rodríguez-palenzuela, P. (1999). Antifungal Activity of a Plant Cystatin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(7), 624–627.
- Petit, A.-N., Wojnarowiez, G., Panon, M.-L., Baillieul, F., Clément, C., Fontaine, F., & Vaillant-Gaveau, N. (2009). Botryticides affect grapevine leaf photosynthesis without inducing defense mechanisms. *Planta*, 229(3), 497–506.
- Philippe, R. N., Ralph, S. G., Külheim, C., Jancsik, S. I., & Bohlmann, J. (2009). Poplar defense against insects: genome analysis, full-length cDNA cloning, and transcriptome and protein analysis of the poplar Kunitz-type protease inhibitor family. *The New Phytologist*, 184(4), 865–84.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 308–16.
- Pitzschke, A., Schikora, A., & Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 421–6.
- Poinssot, B., Vandelle, E., Bentéjac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Pugin, A. (2003). The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(6), 553–64.
- Poussereau, N., Creton, S., Billon-Grand, G., Rascle, C., & Fevre, M. (2001). Regulation of *acp1*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 3), 717–26.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V, Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457–65.

- Rao, M. B., Tanksale, a M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3), 597–635.
- Rawlings, N. D. (2010). Peptidase inhibitors in the MEROPS database. *Biochimie*, 92(11), 1463–83.
- Rawlings, N. D., & Barrett, a J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical Journal*, 290 1, 205–18.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), D343–50.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., & Barrett, A. J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *The Biochemical Journal*, 378(Pt 3), 705–16.
- Ray, C. a, Black, R. a, Kronheim, S. R., Greenstreet, T. a, Sleath, P. R., Salvesen, G. S., & Pickup, D. J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell*, 69, 597–604.
- Reinbothe, C., Springer, A., Samol, I., & Reinbothe, S. (2009). Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *The FEBS Journal*, 276(17), 4666–81.
- Reis, H., Pfiffi, S., & Hahn, M. (2005). Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 6(3), 257–267.
- Renault, A.S., Deloire, A., Bierne, J. (1996). Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 35(1), 49–52.
- Renault, A. S., Deloire, A., Letinois, I., Kraeva, E., Tesniere, C., Ageorges, A., Bierne, J. (2000). Beta-1,3-Glucanase Gene Expression in Grapevine Leaves as a Response to Infection With *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(1), 81–87.

- Repka, V. (2001). Elicitor-stimulated induction of defense mechanisms and defense gene activation in grapevine cell suspension cultures. *Biologia Plantarum*, 44(4), 555–565.
- Repka, V., Fischerová, I., & Šilhárová, K. (2004). Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biologia Plantarum*, 48(2), 273–283.
- Repka, V., Kubikova, J., & Fischerova, I. (2000). Immunodetection of PR-16like proteins in grapevine leaves infected with *Oidium tuckeri* and in elicited suspension cell cultures. *Vitis*, 39(3), 123–127.
- Revina, T. a, Speranskaya, a S., Kladnitskaya, G. V, Shevelev, a B., & Valueva, T. a. (2004). Subtilisin protein inhibitor from potato tubers. *Biochemistry*, 69(10), 1092–1098.
- Riederer, M., & Schreiber, L. (2001). Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany*, 52(363), 2023–32.
- Ritonja, a, Krizaj, I., Mesko, P., Kopitar, M., Lucovnik, P., Strukelj, B., Turk, V. (1990). The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. *FEBS Letters*, 267(1), 13–5.
- Robert, N., Ferran, J., Breda, C., Coutos-th, P., Buffard, D., & Esnault, R. (2001). Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv . pisi : Expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 249–261.
- Roberts, W. K., & Selitrennikoff, C. P. (1990). Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Journal of General Microbiology*, 136(9), 1771–1778.
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K.-M., Tudzynski, P. (2004). Functional analysis of H₂O₂ -generating systems in *Botrytis cinerea* : the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1). *Molecular Plant Pathology*, 5(1), 17–27.

- Rolland, S., Bruel, C., Rascle, C., Girard, V., Billon-Grand, G., & Poussereau, N. (2009). pH controls both transcription and post-translational processing of the protease *BcACP1* in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 6), 2097–105.
- Rolland, S., Jobic, C., Fèvre, M., & Bruel, C. (2003). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. *Current Genetics*, 44(3), 164–71.
- ROSS, A. F. (1961). Systemic Acquired Resistance Induced by Localized Virus Infections in Plants. *Virology*, 14, 340–358.
- Rowe, H. C., Walley, J. W., Corwin, J., Chan, E. K.-F., Dehesh, K., & Kliebenstein, D. J. (2010). Deficiencies in jasmonate-mediated plant defense reveal quantitative variation in *Botrytis cinerea* pathogenesis. *PLoS Pathogens*, 6(4), 1–18.
- Ryals, J. a., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, a., Steiner, H. Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, 8(10), 1809–1819.
- Ryan, C. a. (1990). Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28(1), 425–449.
- Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway : differential activation of plant defensive genes, 1477, 112–121.
- Ryan, C. A., & Balls, K. A. (1962). An inhibitor of chymotrypsin from *Solanum tuberosum* and its behavior toward trypsin. *Biochemistry*, 48, 1839–1844.
- Ryan, S. N., Laing, W. A., & Mc Manus, M. T. (1998). A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. *Biochemistry*, 49(4), 957–963.
- Sanchez, L., Courteaux, B., Hubert, J., Kauffmann, S., Renault, J.-H., Clément, C., Dorey, S. (2012). Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling

- pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. *Plant Physiology*, 160(3), 1630–41. doi:10.1104/pp.112.201913
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38(7), 995–1014.
- Schaller, A., Stintzi, A., & Graff, L. (2012). Subtilases - versatile tools for protein turnover, plant development, and interactions with the environment. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 52–66.
- Schick, C., Pemberton, P. a, Shi, G. P., Kamachi, Y., Cataltepe, S., Bartuski, a J., Silverman, G. a. (1998). Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry*, 37(15), 5258–66.
- Schilmiller, A. L., & Howe, G. A. (2005). Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 369–377.
- Schoonbeek, H., Del Sorbo, G., & De Waard, M. a. (2001). The ABC transporter *BcatrB* affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(4), 562–71.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M. a, Cammue, B. P. a, & De Bolle, M. F. C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 46(11), 941–50.
- Senthilkumar, R., Cheng, C., & Yeh, K. (2010). Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 65–75.
- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., Choi, Y. D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4788–93.

- Shah, P., Gutierrez-sanchez, G., Orlando, R., & Bergmann, C. (2009). A Proteomic Study of Pectin Degrading Enzymes Secreted by *Botrytis cinerea* Grown in Liquid Culture. *Proteomics*, 9(11), 3126–3135.
- Shah, P., Iii, J. A. A., Orlando, R., Mubarek, H. El, Podila, G. K., & Davis, M. R. (2009). Comparative Proteomic Analysis of *Botrytis cinerea* Secretome research articles. *Journal of Proteome*, 8, 1123–1130.
- Shivaraj, B., & Pattabiraman, N. (1981). Natural plant enzyme inhibitors. Characterization of an unusual alpha-amylase/trypsin inhibitor from ragi (*Eleusine coracana* Geartn.). *Biochemistry Journal*, 193, 29–36.
- Siewers, V., Viaud, M., Jimenez-Teja, D., Collado, I. G., Gronover, C. S., Pradier, J.-M., Tudzynski, P. (2005). Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(6), 602–12.
- Siezen, R. J., Renckens, B., & Boekhorst, J. (2007). Evolution of Prokaryotic Subtilases : Genome-Wide Analysis Reveals Novel Subfamilies With Different Catalytic Residues. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 67, 681–694.
- Sims, A. H., Dunn-Coleman, N. S., Robson, G. D., & Oliver, S. G. (2004). Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 239(1), 95–101.
- Singh, A., Sahi, C., & Grover, A. (2009). Chymotrypsin protease inhibitor gene family in rice : Genomic organization and evidence for the presence of a bidirectional promoter shared between two chymotrypsin protease inhibitor genes. *Gene*, 428, 9–19.
- Singh, N. K., Nelson, D. E., Kuhn, D., Hasegawa, P. M., & Bressan, R. a. (1989). Molecular Cloning of Osmotin and Regulation of Its Expression by ABA and Adaptation to Low Water Potential. *Plant Physiology*, 90(3), 1096–101.
- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., & Levine, A. (1999). The Involvement of Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants. *The Plant Cell*, 11, 431–443.

- Stec, B. (2006). Plant thionins--the structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(12), 1370–85.
- Tan-wilson, A. L., & Wilson, K. A. (2012). Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*, 145, 140–153.
- Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J. P., & Pugin, a. (1995). Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. *Plant Physiology*, 109(3), 1025–1031.
- Ten Have, a, Mulder, W., Visser, J., & van Kan, J. a. (1998). The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(10), 1009–16.
- Ten Have, A., Dekkers, E., Kay, J., Phylip, L. H., & van Kan, J. a L. (2004). An aspartic proteinase gene family in the filamentous fungus *Botrytis cinerea* contains members with novel features. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 7), 2475–89.
- Ten Have, A., Espino, J. J., Dekkers, E., Van Sluyter, S. C., Brito, N., Kay, J., van Kan, J. a L. (2010). The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal Genetics and Biology* 47(1), 53–65.
- Tenhaken, R., Levine, a, Brisson, L. F., Dixon, R. a, & Lamb, C. (1995). Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4158–63.
- Terada, S. (1994). Purification and Characterization of Two Kunitz Family Subtilisin Inhibitors from Seeds of *Canavalia lineata*. *Journal of Biochemistry*, 115, 392–396.
- The Mendeley Support Team. (2011). Getting Started with Mendeley. *Mendeley Desktop*. London: Mendeley Ltd. Retrieved from <http://www.mendeley.com>
- Thomma, B. P., Eggermont, K., Penninckx, I. a, Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct

- microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 15107–11.
- Thomma, B. P., Eggermont, K., Tierens, K. F., & Broekaert, W. F. (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 121(4), 1093–102.
- Thomma, B. P. H. J., Nürnberger, T., & Joosten, M. H. a J. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell*, 23(1), 4–15.
- Tsiatsiani, L., Gevaert, K., & Van Breusegem, F. (2012). Natural substrates of plant proteases: how can protease degradomics extend our knowledge? *Physiologia Plantarum*, 145(1), 28–40.
- Turra, D., Bellin, D., Lorito, M., & Gebhardt, C. (2009). Genotype-dependent expression of specific members of potato protease inhibitor gene families in different tissues and in response to wounding and nematode infection. *Journal of Plant Physiology*, 166, 762–774.
- Umemura, K., Tanino, S., Nagatsuka, T., Koga, J., Iwata, M., Nagashima, K., & Amemiya, Y. (2004). Cerebroside Elicitor Confers Resistance to *Fusarium* Disease in Various Plant Species. *Biochemistry and Cell Biology*, 94(8), 813–818.
- Umezawa H., Aoyagi T., Morishima H., Matsuzaki M., Hamada M. (1970) Pepstatin, a new inhibitor produced by Actinomycetes. *Journal of Antibiotics* (Tokyo) 23 (5):259-262.
- Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C., & Boccara, M. (2003). Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *Bcpme1* reduces virulence on several host plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(4), 360–7.
- Van der Fits, L., & Memelink, J. (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5477), 295–7.

- Van der Linde, Karina Hemetsberger, C., Kastner, C., Kaschani, F., van der Hoorn, R. A. L., Kumlehn, J., & Doehlemann, G. (2012). A Maize Cystatin Suppresses Host Immunity by Inhibiting Apoplastic Cysteine Proteases. *The Plant Cell*, 24, 1285–1300.
- Van Kan, J. a L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11(5), 247–53.
- Van Kan, J. a, van't Klooster, J. W., Wagemakers, C. a, Dees, D. C., & van der Vlugt-Bergmans, C. J. (1997). Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10(1), 30–8.
- Van Loon, L. C., & van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide from Disc Electrophoresis tabacum of the Soluble “Samsun” Leaf Proteins NN’ *Nicotiana*. *Virology*, 40, 199–211.
- Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T., & Conejero, V. (1994). Recommendations for Naming Plant Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(3), 245–264.
- Van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135–62.
- Van Sluyter, S. C., Warnock, N. I., Schmidt, S., Anderson, P., van Kan, J. a L., Bacic, A., & Waters, E. J. (2013). Aspartic Acid Protease from *Botrytis cinerea* Removes Haze-Forming Proteins during White Winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(40), 9705–11.
- Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentéjac, M., & Alain, P. (2006). Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in *BcPG1*-elicited grapevine defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(4), 429–40.
- VanEtten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. a., & Farmer, E. E. (1994). Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus “Phytoanticipins.” *The Plant Cell*, 6(9), 1191–1192.

- Varnier, A.-L., Sanchez, L., Vatsa, P., Boudesocque, L., Garcia-Brugger, A., Rabenoelina, F., Dorey, S. (2009). Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant, Cell & Environment*, 32(2), 178–193.
- Vera, P., Conejero, V., Biotechnologia, D. De, Valencia, U. P. De, & Vera, C. De. (1988). Pathogenesis-Related Proteins of Tomato. *Plant Physiology*, 87, 58–63.
- Vernooij, B., Friedrichya, L., Reist, R., Kolditzjawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Ryals, J. (1994). Salicylic Acid 1s Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but 1s Required in Signal Transduction. *The Plant Cell*, 6, 959–965.
- Verhoeff K, Leeman M., Peer R., Posthuma L., Nelleke S., Eijk G.W. (1988) Changes in pH and the production of organic acids during colonization of tomato petioles by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 122:327-336.
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C. a, Cook, R. J., & Browse, J. (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 7209–14.
- Vincent, D., Ergül, A., Bohlman, M. C., Tattersall, E. a R., Tillett, R. L., Wheatley, M. D., Cramer, G. R. (2007). Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. *Journal of Experimental Botany*, 58(7), 1873–92.
- Viret, O., Bloesch, B., Dubuis, P., & Gindro, K. (2010). Epidémiologie de *Botrytis cinerea* et stratégies de lutte. *Revue Suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 42(3), 162–167.
- Viret, O., Keller, M., Jaudzems, V. G., & Cole, F. M. (2004). *Botrytis cinerea* Infection of Grape Flowers: Light and Electron Microscopical Studies of Infection Sites. *Phytopathology*, 94(8), 850–7.
- Volpicella, M., Leoni C., Costanza A., De Leo F., Gallerani R., Ceci L.R. (2011) Cystatins, Serpins and other Families of Protease Inhibitors in Plants. *Current Protein and Peptide Science* 12:386-398.

- Vorwerk, S., Somerville, S., & Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 9(4), 203–9.
- Walsh, T. a, & Twitchell, W. P. (1991). Two kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers. *Plant Physiology*, 97(1), 15–18.
- Watanabe, H., Abe, K., Emori, Y., Hosoyama, H., & Arai, S. (1991). Molecular Cloning and Gibberellin-induced Expression of Multiple cysteine proteinases of rice seeds (Oryzains). *The Journal of Biological Chemistry*, 266(25), 16897–16902.
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Jin, H. (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6154), 118–23.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). Calcium in plants. *Annals of Botany*, 92(4), 487–511.
- Williamson, B., & Tudzynski, B. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant*, 8, 561–580.
- Xu, D., Xue, Q., Mcelroy, D., Mawal, Y., Hilder, V. A., & L, R. W. (1996). Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, *CpTi*, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. *Molecular Breeding*, 2, 167–173.
- Xu, Y., Chang, P., Liu, D., Narasimhan, M. L., Raghothama, K. G., Hasegawa, P. M., & Bressan, R. a. (1994). Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. *The Plant Cell*, 6(8), 1077–1085.
- Yang, a H., & Yeh, K. W. (2005). Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. *Kaosiung* no. 1). *Planta*, 221(4), 493–501.
- Yeh, W., Lin, I., Tuan, J., Chen, M., & Kao, S. (1997). Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Report*, 16, 696–699.

- Yesilirmak, F., & Sayers, Z. (2009). Heterologous expression of plant genes. *International Journal of Plant Genomics*, 2009, 296482.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Durner, J. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15811–6.
- Zhang, Y., Yang, X., Liu, Q., Qiu, D., Zhang, Y., Zeng, H., Mao, J. (2010). Purification of novel protein elicitor from *Botrytis cinerea* that induces disease resistance and drought tolerance in plants. *Microbiological Research*, 165(2), 142–51.
- Zhou, F., Zhang, Z., Gregersen, P. L., Mikkelsen, J. D., de Neergaard, E., Collinge, D. B., & Thordal-Christensen, H. (1998). Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiology*, 117(1), 33–41.
- Zimmerli, L., Métraux, J. P., & Mauch-Mani, B. (2001). beta-Aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 126(2), 517–23.

Caractérisation d'inhibiteurs de protéases lors de l'interaction entre la vigne et *Botrytis cinerea*.

Il a été montré que lors de l'infection de la baie de Pinot Noir par *B. cinerea*, des protéases fongiques pourraient être à l'origine de la dégradation d'une des protéines PR majoritaires de la baie mûre, la chitinase VvChi4D (Thèse S. Colas, 2012 ; van Sluyter *et al.*, 2013). L'hypothèse émise lors de notre étude est que des inhibiteurs de protéases de la vigne pourraient empêcher la dégradation de cette protéine de défense par les protéases de *B. cinerea*.

L'expression de deux inhibiteurs de protéases, un Potato Inhibitor I (VvPin) et un Kunitz (VvKun), ainsi que celle de trois protéases fongiques dont deux protéases acides, une protéase aspartique (BcAp8) et une protéase glutamique (BcAcp), et une protéase à sérine (BcSer), ont été suivies lors de l'infection de la baie de Pinot noir et de la feuille de vitroplants. Les résultats obtenus montrent que l'expression des deux IP est induite en même temps que celle de la protéase à sérine mais après celle des deux protéases acides du champignon. La production en système hétérologue des deux IP ainsi que l'obtention de protéases acides et de protéases à sérine dans des sécrétomes de *B. cinerea* a permis de montrer que la protéine VvKun est capable d'inhiber les protéases à sérine du champignon. En revanche, aucun des deux IP n'est capable d'inhiber les protéases acides du champignon, protéases responsables de la dégradation de la chitinase VvChi4D.

Mots clés: *Vitis vinifera*, *Botrytis cinerea*, Protéases, Inhibiteurs de protéases, Potato Inhibitor I, Kunitz.

Characterization of protease inhibitors in the interaction between *Vitis vinifera* and *Botrytis cinerea*.

It has been shown that upon infection of the grape berry by *B. cinerea*, fungal proteases may be responsible for the degradation of a PR protein of the mature berry VvChi4D chitinase (Thesis S. Colas, 2012; van Sluyter *et al.*, 2013). The hypothesis of our study is that protease inhibitors could prevent the degradation of this defense protein by proteases of *B. cinerea*.

The expression of two protease inhibitors, a Potato Inhibitor I (VvPin) and a Kunitz (VvKun), and that of three fungal proteases, an aspartic protease (BcAp8), a glutamic acid protease (BcAcp) and a serine protease (BcSer) were followed during infection of Pinot Noir berry and leaf plantlets. The results obtained show that the expression of IP is induced both in the same time as the serine protease, but after that the two fungal acid proteases. The heterologous production of both IPs and the production of acid and serine proteases from *B. cinerea* secretoms have shown that VvKun is capable to inhibit serine proteases of the fungus. However, neither IP is capable of inhibiting fungal acid proteases, responsible for the degradation of the chitinase VvChi4D.

Key words: *Vitis vinifera*, *Botrytis cinerea*, Proteases, Protease inhibitors, Potato Inhibitor I, Kunitz.

Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne - EA 4707
Laboratoire de Stress Défenses et Reproduction des Plantes
Moulin de la Housse - Bâtiment 18
BP 1039
51687 Reims Cedex 2
France