



HAL
open science

Impact de *Plasmopaca viticola* sur le métabolisme de l'amidon et le fonctionnement stomatique chez la vigne

Magdalena Gamm

► To cite this version:

Magdalena Gamm. Impact de *Plasmopaca viticola* sur le métabolisme de l'amidon et le fonctionnement stomatique chez la vigne. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOS054 . tel-00697015

HAL Id: tel-00697015

<https://theses.hal.science/tel-00697015>

Submitted on 14 May 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université de Bourgogne
Ecole Doctorale Environnements-Santé-STIC
Unité Mixte de Recherche INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne
Plante-Microbe-Environnement

Laboratoire de Signalisation cellulaire et moléculaire dans les réactions de défense

Thèse

pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

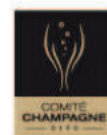
par
Magdalena GAMM

Impact de *Plasmopara viticola* sur le métabolisme de l'amidon et le fonctionnement stomatique chez la vigne.

Soutenue en octobre 2011 devant le jury composé de

C. CLEMENT, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne
A. VAVASSEUR, Directeur de Recherche, CEA Cadarache
P. COUTOS-THEVENOT, Professeur, Université de Poitiers
N. LEBORGNE-CASTEL, Maître de Conférences, Université de Bourgogne
M.C. HELOIR, Maître de Conférences, Université de Bourgogne
M. ADRIAN, Professeur, Université de Bourgogne

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Co-encadrante
Directrice de thèse



Résumé

Le mildiou est une maladie de la vigne affectant les feuilles et les baies et pouvant entraîner des diminutions importantes de la quantité et de la qualité de la vendange. L'agent responsable, *Plasmopara viticola*, un oomycète biotrophe obligatoire, provoque différentes altérations physiologiques au niveau de la feuille infectée. D'une part, il y a des accumulations anormales d'amidon au niveau des taches d'huile, symptômes caractéristiques de la maladie. D'autre part, l'infection induit une dérégulation des mouvements stomatiques. Les stomates, ouvertures naturelles permettant les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère, restent anormalement ouverts de nuit et ne se ferment plus en réponse à un stress hydrique ou à un traitement à l'ABA. Les deux parties de cette thèse avaient pour objectif de i) expliquer l'origine et le mécanisme de l'accumulation d'amidon et ii) isoler et identifier le facteur responsable de la dérégulation stomatique.

Les modifications du métabolisme de l'amidon au niveau des feuilles infectées ont d'abord été étudiées à l'aide d'une analyse transcriptomique afin d'identifier les gènes codant pour des enzymes impliquées dans ce métabolisme dont l'expression était affectée. Après validation de deux gènes de référence, une étude par qRT-PCR a permis de vérifier les changements d'expression de certains de ces gènes au cours de la cinétique de l'infection, puis les activités des enzymes correspondantes ont été déterminées. Ces approches, complétées par des dosages de l'amidon et des sucres solubles ainsi que la mesure de l'activité photosynthétique, ont permis de corrélérer différents événements avec l'infection. D'après nos résultats, l'accumulation de l'amidon dans les taches d'huile pourrait résulter d'une augmentation de sa synthèse liée à l'augmentation de l'activité AGPase, combinée à une diminution de sa dégradation par modification de l'activité des amylases. Une diminution de la photosynthèse et une augmentation de l'activité invertase traduisent une transition source-puits au niveau des taches d'huile.

La deuxième partie de la thèse a porté sur la recherche d'une molécule soluble d'origine végétale ou pathogène, sécrétée dans l'apoplasme au cours de l'infection et responsable du dysfonctionnement stomatique. Sur "épidermes isolés", les fluides apoplastiques extraits de feuilles infectées induisent une ouverture stomatique à l'obscurité et contrecarrent la fermeture induite par l'ABA à la lumière, mimant ainsi la dérégulation observée sur feuille entière. Le composé actif serait une protéine assez stable, de taille >50 kDa et modifiée post-traductionnellement par une glycosylation essentielle à son activité sur l'ouverture stomatique. Après séparation par chromatographie d'exclusion des fluides apoplastiques de feuilles infectées, deux fractions ont été retenues : une présentant une forte activité sur l'ouverture stomatique, et une seconde sans activité. Neuf protéines de vigne ont été identifiées spécifiquement dans la fraction active après une analyse comparative de ces deux échantillons par spectrométrie de masse. Des expérimentations supplémentaires seront nécessaires pour purifier et identifier la protéine recherchée.

mots clés : *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*, amidon, sucres, invertase, stomates, fluides apoplastiques

Abstract

The grapevine downy mildew affects leaves and young berries and can affect the harvest quality and quantity. The causal agent is the obligate biotroph oomycete *Plasmopara viticola* that induces severe physiological alterations in infected leaves. One is the abnormal accumulation of starch in oil spots, the characteristic symptoms of the disease. Another is a deregulation of stomatal movements. Stomata, natural openings on the leaf surface allowing gas exchanges between the plant and the atmosphere, stay abnormally open during the night and do no longer close upon water stress or ABA treatment in infected leaves. This thesis is divided into two chapters that aim to i) explain the origin and mechanism of the abnormal starch accumulation and ii) isolate and identify the compound responsible for the stomatal deregulation.

The modifications of starch metabolism in infected leaves were first studied by transcriptomic analysis allowing to identify transcriptional modifications of genes involved in starch metabolism. After the validation of two reference genes, a qRT-PCR analysis was performed in order to verify the expression alterations of some of these genes and the corresponding enzymatic activities were measured. The quantification of soluble sugars and starch, and the measurement of photosynthetic activity were included in the analysis and their alterations could be correlated with the infection. Altogether, the obtained results hint towards an increase of starch synthesis *via* an increase in AGPase activity, that, combined with a decrease of its degradation by modification of amylase activities, could be responsible for the observed starch accumulation in oil spots. Concurrently, a source-sink transition is apparent in infected leaves by decrease of photosynthetic activity and increase of a cell wall invertase activity.

The second part of this thesis dealt with a soluble molecule of plant or pathogen origin that is secreted into the apoplast during infection and could be responsible for the stomatal deregulation. The apoplastic wash fluids from infected leaves increase the stomatal aperture in the dark in grapevine epidermal peels and counteract the ABA-induced stomatal closure, thus mimicking the deregulation observed on whole leaves. The active compound seems to be a stable protein of > 50kDa with a glycosylation that is essential for its activity. After separation of the fluids by size exclusion chromatography, two fractions were compared : one active on stomatal aperture and an inactive one. 9 grapevine proteins could be identified in the active sample by mass spectrometry analysis, but further analyses are needed to purify and identify the one responsible for the stomatal deregulation.

keywords : *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*, starch, sugars, invertase, stomata, apoplastic fluids

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier **Vivienne Gianinazzi-Pearson** de m'avoir accueillie dans l'UMR Plante-Microbe-Environnement et **David Wendehenne** de m'avoir intégrée et accueillie dans son équipe.

Je tiens à remercier les membres du Jury, **Christophe Clément**, **Alain Vavasseur**, **Nathalie Leborgne-Castel** et **Pierre Coutos-Thévenot** d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse. Je remercie également **Alain Pugin** et **Richard Bligny** pour leur intérêt pour ce travail et les conseils donnés lors de mon comité de suivi de thèse.

Je tiens tout également à remercier les différents financeurs qui m'ont permis de réaliser cette thèse : le Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB), le Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne et le Conseil Régional de Bourgogne.

Un grand merci à tout l'OP2 pour ces trois ans passés ensemble, pour ce que j'ai pu apprendre et pour la bonne ambiance.

Avant tout, merci à mes encadrantes, **Marielle** et **Marie-Claire**, qui m'ont confié ce projet et m'ont guidé et accompagné jusqu'à la fin. Merci pour votre investissement, votre soutien et votre conseils. C'était un plaisir de travailler et réfléchir avec vous ! Merci pour vos regards critiques sur mes résultats et votre aide avec mes innombrables présentations/textes et ce manuscrit. Si c'était à refaire, je recommanderais ces trois ans avec vous sans hésiter !

Merci, **David**, de m'avoir accueillie dans ton équipe. Merci pour ton intérêt dans mon travail et tes conseils.

Merci à tout l'OP2 : **Adrien**, **Agnès D.**, **Agnès K.**, **Angéla**, **Angélique**, **Annick**, **Annie**, **Benoît**, **Carole**, **Emilie S.**, **Emilie V.**, **Hamid**, **Jani**, **Jérémy**, **Lucie**, **Manu**, **Patrick**, **Sandra**, **Sophie**, **Sumaira**, **Sylvain**, **Xavier**, pour les trois ans que j'ai pu passé dans la bonne ambiance du labo.

Je remercie **Stéphane** et **Olivier** d'avoir répondu à mes questions infinies patiemment et avec bonne humeur.

Merci, **Abdel**, **Annie**, **Emilie S.**, **Emilie V.** et **Sandra** d'avoir partagé les mêmes problèmes : manque de plante, la sécheresse et la chaleur en serres, l'oïdium, les cochenilles... et pour la bonne ambiance au labo. Merci d'avoir supporté ma musique et mon bordel !

Merci **Agnès D.** et **Sumaira** pour les trois ans que nous avons passés dans le même bureau et bon courage pour vos thèses !

Merci aux "jeunes" de PME : **Cosimo**, **Franck**, **Herbert**, **Iulia**, **Ivan**, **Jérôme**, **Joan**, **Leo**, **Marine**, **Manuel**, **Soukayna**, **Thomas**, **Tommaso**, **Tib**, **Virginie**,

Zhipeng pour tous les bon moments passés ensemble, les cafés le matin, les soirées chez nous ou ailleurs, les sorties, la bonne bouffe (kebab, par exemple), les jeux...

Merci à ceux qui ont contribué à cette thèse avec leur aide technique : **Alberto Ferrarini** et **Massimo Delledonne** à l'Université Vérone pour les analyses transcriptomiques, **Michel Rossignol** à Toulouse pour les analyses de spectrométrie de masse, **Richard Bligny** au CEA Grenoble pour les analyses RMN, **Nathalie Vaillant-Gaveau** à Reims pour son aide avec l'Imaging PAM, **Chantal Olivain** de MSE pour l'utilisation du microscope, **Nicolas Sicard** de l'IUT pour l'utilisation du robot Cobas Mira, **Jonathan Négrel** pour l'utilisation du spectromètre à 8 puits. Et un grand merci à mon stagiaire **Thomas Nury** pour sa patience et sa bonne humeur.

Merci à mes colocs, **Aurélien**, **Simon**, **Thibaud** et **Lucie**, pour les soirées qu'on a passé autour de notre table dans notre super appart, à manger, discuter, rigoler et jouer.

Aurélien, quelle chance d'avoir trouvé un ami comme toi ! Merci pour ces 2 ans en coloc, pour les débats, les jeux et les rires ! Hé, **Simon**, on en a gros !

Lucie (Lucka), ma collègue, assuratrice, coloc, amie, merci pour ce qu'on a partagé... les journées dehors à la falaise, les fous-rires, les mots inventés, les prises de tête, les discussions, les soirées "péniche"...

Merci à **Titi**, mon président, pour ce que tu m'as appris : des mots français. Raconter des conneries. Et un peu l'escalade aussi. Je vais essayer de mieux poser mes pieds. **Valérie**, **Solange**, **Nathalie**, **Christine**, **Jean-Luc**, **Michel**, et les autres d'Agrip, on a autant rigolé que fait l'escalade et j'espère qu'il y aura toujours assez de paille pour tout le monde.

Merci, Ben, de t'avoir moqué de moi, de m'avoir humilié (tu rêves !) et encouragé pendant les heures qu'on a passé à courir sur les marches dans la combe à la serpent ou autour de lac Kir.

Merci à tous les inconnus qui ont contribué à ma thèse sans le savoir : la boulangère qui m'a vendue mon sandwich pour midi avec le grand sourire (même tôt le matin), l'équipe de leo.org (pas un seul jour où je n'avais pas besoin de leurs dictionnaires en ligne), et tous les utilisateurs de L^AT_EX et excel qui discutent et aident dans les forums sur le net. Leurs solutions m'ont souvent sauvé la journée.

Enfin, merci aux allemands :

Danke, **Steven**! Deine Begeisterung für die Wissenschaft hat mich angesteckt, als ich mein erstes Praktikum bei den Phytos gemacht habe. Das, was ich von dir gelernt hab, hat mich auf (fast) alles hier gut vorbereitet. Danke auch an alle anderen Phytos, **Aiko**, **Karsten**, **Nickels**, **Telli** und **Tony**, ich hab gerne an meine Zeit in Bielefeld zurückgedacht.

Hey, **Sarah**, es ist nicht so leicht, über Telefon und Email ne Freundschaft aufrecht zu erhalten, aber es klappt! Jetzt bist du die Nächste, viel Erfolg!

Danke an meine Familie.

Danke, **Mama** und **Papa**, für euer Verständnis und die Ermutigungen, Ratschläge und Besuche. Gut, dass es Telefone gibt (auch, wenn ich immer im falschen Moment anrufe) und dass Skype auch Videos schickt!

Christoph, ich werde fertig, du fängst grade an, bin gespannt, was draus wird! Ich werde eh nie verstehen, worum genau es geht, aber viel Erfolg dabei! Danke, dass du mir L^AT_EX gezeigt hast, sonst würd das hier nicht so gut aussehen.

Matthias, ich zähle drauf, dass du der "coole" Onkel wirst! Mit nem Mathematiker und nem Architekten als Vergleich kann das als Musiker doch nicht so schwer sein! Ich freu mich, dass du gefunden hast, was du machen willst und wünsch dir alles Gute für deine Pläne!

Markus, jetzt erstmal Abi und dann die Uni, ich wünsch dir viel Spass in Hamburg! Bin mal gespannt, was noch kommt!

Liste des abbreviations

ABA	acide abscissique
ACT	actine
ADH2	alcool déshydrogénase 2
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	acide désoxyribonucléique génomique
ADP	adénosine di-phosphate
ADP-Glu	ADP-glucose
AGPase	ADP-glucose pyrophosphorylase
ANOVA	analysis of variance (analyse de variance)
ApL	grande sous-unité de l'AGPase (AGPase large subunit)
ApS	petite sous-unité de l'AGPase (AGPase small subunit)
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomique
ATP	adénosine tri-phosphate
ATPase	ATP synthétase
Avr	avirulence
AWF	apoplastic wash fluid (fluides apoplastiques)
AWI	fluides apoplastiques des feuilles infectées
AWS	fluides apoplastiques des feuilles témoins
BAM	β -amylase
BcPG1	endopolygalacturonase 1 de <i>Botrytis cinerea</i>
BE	branching enzyme, enzyme de branchement
CEA	commissariat à l'énergie atomique
cDNA-AFLP	cDNA amplified fragment-length polymorphism
c-hpi	hexose-phosphate isomérase cytoplasmique
c-mdh	malate déshydrogénase cytoplasmique
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
COR	coronatine
Ct	seuil des nombres de cycles (cycle threshold)
CTAB	cétyltriméthylammoniumbromide
cv	cultivar
cwInv	cell wall invertase, invertase pariétale
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DBE	debranching enzyme, enzyme de débranchement
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DTT	dithiothréitol
DO	densité optique
DPE	disproportionating enzyme, enzyme disproportionnante
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA	acide éthylèneglycoltétraacétique
EF1- α	facteur d'élongation 1 α

EP1	expressed protein
ES	erreur standard
ET	éthylène
ETI	effector-triggered immunity
FAO	formes actives de l'oxygène
FDA	fluorescéine diacétate
FDR	False Discovery Rate
Fru	fructose
Fru-6P	fructose 6-phosphate
GBSS	granule-bound starch synthase
Glu	glucose
Glu-1P	glucose 1-phosphate
Glu-6P	glucose 6-phosphate
GST	glutathion-S-transférase
GTP	guanosine tri-phosphate
GWD	α -glucan, water dikinase
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPAEC-PAD	High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (chromatographie liquide haute performance à échange d'anions avec une détection ampérométrique)
hpi	heure post-inoculation
HR	hygrométrie relative
Hrp	hypersensitive response and pathogenicity
HT	transporteur des hexoses
HXK	hexokinase
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
ISA	isoamylase
JA	acide jasmonique (jasmonic acid)
jpi	jours post-inoculation
LDA	limit-dextrinase
LPS	lipo-polysaccharide
LRR	répétitions riches en leucine
LSD	least significant difference test
Mal ²⁻	malate ²⁻
MAMP	Microbe-Associated Molecular Pattern
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
MEX	maltose exporter, transporteur du maltose
NAD ⁺	nicotinamide-adénine dinucléotide
NADH	nicotinamide-adénine dinucléotide réduit
NADP ⁺	nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate
NADPH	nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate réduit
nInv	neutral invertase, invertase cytoplasmique

NEB	New England Biolabs
NLS	signal de localisation nucléaire
NO	monoxyde d'azote
NR	nitrate réductase
N/P/K	nitrate/phosphate/potassium
NBS-LRR	nucléotide-binding site-leucine-rich repeat
OST1	open stomata 1
P	probabilité
PAL	phénylalanine ammonium lyase
PAM	pulse amplitude modulated
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PCA	acide perchlorique
PCR	polymerase chain reaction (réaction en chaîne par polymérase)
PF	poids frais
3-PGA	3-phospho-glycérate
PGI	phosphoglucose isomérase
PGM	phosphoglucose mutase
Pho2	α -glucan phosphorylase
Phot	phototropines
Pi	ortho-phosphate
pI	point iso-électrique
PK	protéine kinase
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride
PNGase F	N-Glycosidase F
p/p	poids/poids
PP2C	protéine phosphatase 2C
PR	pathogenesis-related
PRR	pathogen recognition receptor
PS	poids sec
PSII	photosystème II
PTI	PAMP-triggered immunity
pv	pathovar
p/v	poids/volume
PvACT	<i>P. viticola</i> actine
PVPP	polyvinylpolypyrrolidone
PWD	phosphoglucan, water dikinase
PYR1	Pyrabactin Resistance 1
qP	quenching photochimique
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR
qNP	quenching non-photochimique
R	résistance
RH	réaction hypersensible
RLK	receptor-like kinase
RLP	receptor-like protein

RMA	Robust Multi-Array Algorithm
RMN	résonance magnétique nucléaire
RPV	résistance à <i>Plasmopara viticola</i>
RT-PCR	PCR en temps réel
rubisco	ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/décarboxylase
SA	acide salicylique (salicylic acid)
SAM	Statistical Analysis of Microarrays
SMD3	Small nuclear ribonucleoprotein
SnRK	sucrose non fermenting (SNF1)-related protein kinase
SOD	superoxyde dismutase
SPP	sucrose phosphate phosphatase
SPS	sucrose phosphate synthase
39SRP	39S ribosomal protein
60SRP	60S ribosomal protein L18e
SRPV	Service Régional de Protection des Végétaux
STS	stilbène synthase
SS	starch synthases, amidon-synthétases
SSS	soluble starch synthase, amidon-synthétase soluble
SucP phosphatase	sucrose phosphate phosphatase, saccharose-phosphate phosphatase
SucP Synthétase	sucrose phosphate synthase, saccharose-phosphate synthétase
SURE	sucrose responsive element
SUS	sucrose synthase, saccharose synthétase
SUT	sucrose transporter, transporteur du saccharose
TM	domaine transmembranaire
TOR	Target of Rapamycin
TreP	tréhalose phosphate
Trio-P	triose-phosphates
TRX	thiorédoxine
TTSS	système de sécrétion de type III
UBE2	Ubiquitin carrier protein E2
UDP	Uridine di-phosphate
UDP-Glu	UDP-glucose
UQCC	Ubiquinol-cytochrome réductase complex chaperone
UV	ultraviolets (longueur d'onde comprise entre 100 et 380 nm)
VATP16	V-type proton ATPase
vInv	invertase vacuolaire
VPS54	Vacuolar protein sorting-associated protein 54
v/v	volume/volume
VvHT5	<i>V. vinifera</i> hexose transporter 5
ΨL	potentiel hydrique foliaire
λ	longueur d'onde

Sommaire

Introduction générale	1
1 Contexte	2
2 Interactions plantes-pathogènes	2
2.1 L'immunité induite par les PAMP	3
2.2 Effecteurs et immunité induite	4
2.3 Les gènes R	5
3 Vigne- <i>Plasmopara viticola</i>	6
3.1 Phylogénie des oomycètes	6
3.2 Le cycle de vie du mildiou	7
3.3 Les réactions de défense de la vigne contre le mildiou	8
3.4 Effet du mildiou sur la vigne	10
4 Objectifs	10
I. Dérégulation du métabolisme de l'amidon	11
Introduction	12
1 Le métabolisme de l'amidon	12
1.1 La synthèse de l'amidon	13
1.2 Le catabolisme de l'amidon	16
2 Les sucres solubles : molécules du métabolisme énergétique et de la signalisation	18
2.1 Le glucose	18
2.2 Le saccharose	19
2.3 Le tréhalose	21
3 L'influence d'une infection et la transition source-puits	22
Matériel et Méthodes	24
1 Matériel biologique	24
1.1 Matériel végétal	24
1.2 L'agent pathogène <i>Plasmopara viticola</i>	24
1.3 Prélèvement des échantillons	25
2 Dosage des sucres solubles et de l'amidon	25
2.1 Analyse des sucres solubles par spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	25

2.2	Dosage des sucres solubles par HPAEC-PAD	25
2.3	Mise en évidence de l'amidon dans les feuilles	26
2.4	Quantification de l'amidon	26
3	Mesures des activités enzymatiques	27
3.1	Extraction des protéines totales	27
3.2	Mesure de l'activité invertase	27
3.3	Mesure de l'activité tréhalase	27
3.4	Extraction des protéines chloroplastiques	27
3.5	Mesure de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase	28
3.6	Mesure des activités amylase	28
4	Activité photosynthétique	29
4.1	Mesure de la fluorescence chlorophyllienne	29
4.2	Dosage des chlorophylles	29
5	Méthodes moléculaires	29
5.1	Extraction des ARN totaux	29
5.2	Contrôle de la quantité et de la qualité des ARN totaux	30
5.3	Microarray	30
5.4	qRT-PCR	31
5.5	Estimation du développement de <i>P. viticola</i> par real time-PCR	33
6	Méthodes microscopiques	35
6.1	Visualisation de <i>P. viticola</i> par coloration histochimique au bleu d'aniline	35
6.2	Microscopie électronique à transmission	35

Résultats 37

1	Développement de <i>P. viticola</i> dans les feuilles	37
2	Accumulation de l'amidon au niveau des taches d'huile	37
3	Analyse transcriptomique au niveau des feuilles infectées	38
4	Validation des gènes de référence	38
5	Impact de l'infection par <i>P. viticola</i> sur le métabolisme de l'amidon	39
6	Impact de l'infection par <i>P. viticola</i> sur le métabolisme des sucres solubles	40
7	Tréhalose	41
8	Activité photosynthétique dans les feuilles témoins et infectées	42
9	Taches d'huile et zones adjacentes des feuilles infectées	42

Discussion 44

II. Dérégulation stomatique 55

Introduction 56

1	Les stomates	56
1.1	Les cellules de garde	56
1.2	Les mouvements stomatiques	57

1.3	Effet d'une infection sur le fonctionnement stomatique	59
2	L'apoplasme	60
2.1	Composition	61
2.2	Caractéristiques physico-chimiques	64
2.3	Rôle dans la régulation des stomates	65
Matériel et Méthodes		66
1	Matériel biologique	66
2	Isolement des fluides apoplastiques	66
2.1	Méthodologie	66
2.2	Marqueurs de contamination cytoplasmique	66
3	Modèle disques épidermiques	67
3.1	Préparation des disques épidermiques	67
3.2	Induction de l'ouverture stomatique à l'obscurité	67
3.3	Mouvements stomatiques à la lumière	68
3.4	Observation et mesure de l'ouverture stomatique	68
4	Dosage des sucres solubles	68
5	Étude du composé actif	68
5.1	Estimation de la taille	69
5.2	Traitement aux protéases	69
5.3	Traitements de déglycosylation des protéines	69
5.4	Traitement de réduction des ponts disulfures	69
6	Séparation et visualisation des protéines	70
7	Pré-purification du composé actif	70
7.1	Traitement au sulfate d'ammonium	70
7.2	Séparation par la taille: chromatographie d'exclusion	70
8	Spectrométrie de masse	70
9	Analyses statistiques	71
Résultats		72
1	Isolement des fluides apoplastiques	72
1.1	Les marqueurs de la contamination cytoplasmique	73
2	Effet des fluides apoplastiques sur les mouvements stomatiques	74
2.1	Validation du système des disques épidermiques	74
2.2	Effet des fluides apoplastiques sur les mouvements stomatiques	74
3	Le mode d'action	75
3.1	L'ATPase	75
3.2	Activité des AWI de vigne sur Arabidopsis	75
4	Sucres solubles dans les fluides apoplastiques	76
5	Caractéristiques du composé actif	76
5.1	Stabilité du composé actif	76
5.2	Taille du composé actif	77
5.3	Traitement protéasique	77
5.4	Traitement permettant la réduction des pont sulfures	77
5.5	Déglycosylation	77

6	Purification du composé actif	78
6.1	Précipitation au sulfate d'ammonium	78
6.2	Analyse des profils protéiques des AWF	78
6.3	Spectrométrie de masse 1	78
6.4	Chromatographie d'exclusion	79
6.5	Spectrométrie de masse 2	80
	Discussion	81
	Conclusion	89
	Bibliographie	92
	Annexe	124
	Données de spectrométrie de masse des fluides apoplastiques.	
	Liste des présentations et publications	
	Publication : Identification and validation of reference genes for gene expression normalization in grapevine.	
	Publication : Changes in carbohydrate metabolism in <i>Plasmopara viticola</i> -infected grapevine leaves.	

Introduction générale

1 Contexte

La viticulture est un secteur très important dans l'agriculture et l'économie de nombreux pays. En France, la surface plantée de vigne est de 840000 ha, avec une valeur de production s'élevant à 9,5 milliards d'euros (hors subvention, données de Viniflor 2009). Ceci constitue 15% de la valeur de la production agricole totale. Cependant, la viticulture est confrontée à de sérieux problèmes phytopathologiques. En effet, les cépages de *Vitis vinifera* cultivés sont sensibles à de nombreuses maladies. Des pathogènes divers peuvent affecter les feuilles, le bois, les racines et les fruits, par exemple des virus (court-noué, enroulement), des phytoplasmes (flaves-cence dorée), des bactéries (nécrose bactérienne, galle du collet, maladie de Pierce), des champignons (oïdium, pourriture grise, esca, eutypiose, pourridiés) et des oomycètes (mildiou). De nombreux traitements phytosanitaires sont appliqués au cours de l'année pour lutter contre les maladies cryptogamiques et garantir la quantité et la qualité de la vendange. Or ces traitements sont coûteux et posent des problèmes tels que : pollution de l'environnement, risques pour la santé du viticulteur, sélection de souches de microorganismes pathogènes résistantes à certains pesticides, résidus dans les vins. Dans le but de diminuer ces intrants au vignoble, différentes approches font l'objet de recherches, comme l'obtention d'hybrides ou de vignes transgéniques résistants à certaines maladies. Au laboratoire, nous travaillons au développement d'une stratégie basée sur l'activation des défenses naturelles de la vigne par des composés appelés éliciteurs. Cela implique une étude fine des événements moléculaires impliqués dans la mise en place des réactions de défense et une bonne connaissance des interactions plantes-pathogènes.

Parmi les maladies affectant les feuilles et les jeunes baies de la vigne, figure le mildiou. L'agent responsable, *Plasmopara viticola*, induit des altérations physiologiques, telles qu'une dérégulation du fonctionnement des stomates qui restent anormalement ouverts de nuit, effet probablement induit par un facteur d'origine pathogène ou végétale produit au cours de l'infection (Allègre, 2007). De plus, *P. viticola* induit des modifications du métabolisme primaire comme une diminution de la photosynthèse et une accumulation anormale de l'amidon.

Mon travail de thèse s'est focalisé sur l'interaction vigne-*P. viticola*, en particulier sur l'étude de ces deux modifications induites dans les feuilles infectées.

2 Interactions plantes-pathogènes

Les plantes sont confrontées à de nombreux microorganismes potentiellement pathogènes comme des virus, des bactéries, des champignons et des oomycètes. Les pathogènes infectent leur hôte et prélèvent des nutriments pour leur croissance et leur développement en utilisant des mécanismes différents. Un pathogène nécrotrophe induit la mort cellulaire et se nourrit à partir des cellules mortes de l'hôte. Au contraire, les pathogènes biotrophes sont capables d'infecter la plante et de se nourrir sans tuer les cellules, souvent à l'aide de structures spécialisées, les haustoria. Les

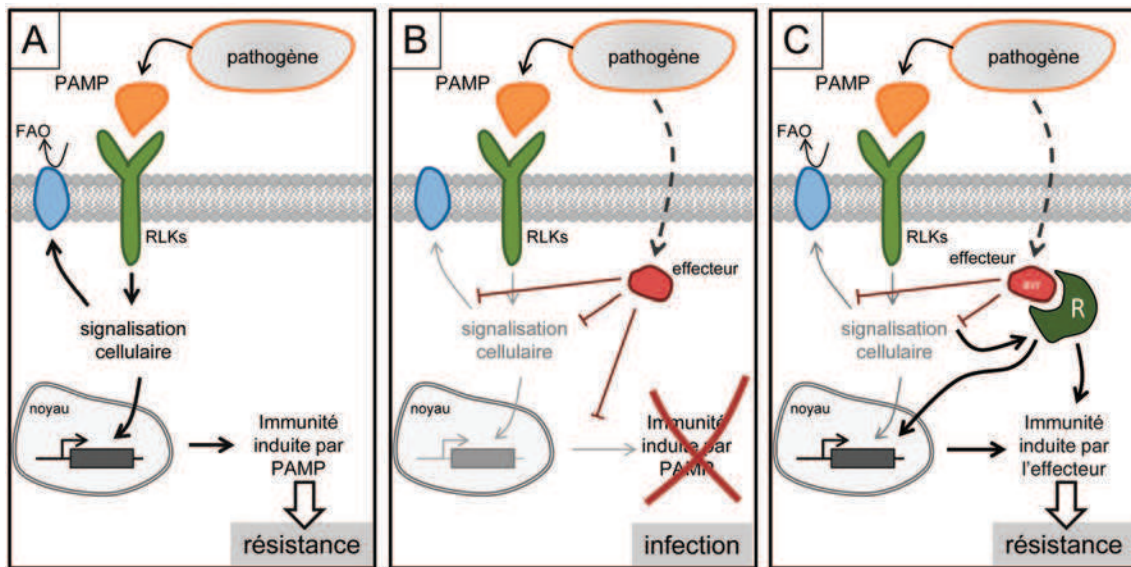


FIGURE 1 – **Modèle simplifié du système immunitaire des plantes.** A : La présence d'un pathogène est perçue par des récepteurs présents à la surface de la cellule et reconnaissant les PAMPs. Il y a alors activation des réactions de défense qui permettent à la plante de résister au pathogène. On parle de PTI (PAMP-triggered immunity). B : Le pathogène possède des effecteurs qui sont transmis dans le cytoplasme de l'hôte où ils suppriment l'induction des réactions de défense. Ce pathogène est capable d'infecter la plante qui est donc sensible. C : la plante résistante possède des protéines R qui reconnaissent les effecteurs (ou leurs effets) et induisent des réactions de défense. FAO : formes actives de l'oxygène, PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern, RLKs : Receptor-Like Kinases. D'après Bent et Mackey (2007); Pieterse *et al.* (2009).

biotrophes obligatoires sont incapables de vivre indépendamment de leur hôte et ne sont donc pas cultivables sur milieu en laboratoire. Certains pathogènes commencent l'infection par une phase biotrophe puis la poursuivent par une phase nécrotrophe : ce sont les hémibiotrophes ou biotrophes facultatifs.

Les végétaux possèdent des mécanismes de protection et de défense contre les agents pathogènes potentiels mais ces derniers ne sont pas toujours suffisants. Si l'interaction entre plante et microbe conduit au développement de la maladie, la plante est sensible et l'interaction est dite compatible. Si les systèmes de défense mis en place par la plante sont efficaces et empêchent la croissance du pathogène, la plante est résistante et l'interaction est incompatible.

Le système de défense des plantes est construit en deux niveaux. Le premier est constitué par une barrière physico-chimique constitutive, incluant la cuticule, les parois, des enzymes anti-microbiennes et des métabolites secondaires (Nürnberger *et al.*, 2004). Les microorganismes qui parviennent à franchir cette première ligne de défense seront confrontés à d'autres mécanismes de défense induits après leur perception par l'hôte. Les plantes ont en fait un système de défense rappelant le système immunitaire des animaux. Ce système immunitaire comprend deux composantes : la résistance non-spécifique induite par des éliciteurs généraux ou MAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern) (Thordal-Christensen, 2003) et la résistance race-spécifique basée sur le concept "gène pour gène" (Flor, 1947).

2.1 L'immunité induite par les PAMP

Le pathogène peut être perçu par la plante grâce à des récepteurs appelés PRR (Pathogen Recognition Receptor) présents à la surface de la cellule (Figure 1 A) (Chinchilla *et al.*, 2007; Nürnberger et Kemmerling, 2006)]. Ces récepteurs reconnaissent les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) ou MAMP, motifs moléculaires très conservés présents chez de nombreux microorganismes et absents chez les végétaux. Ils peuvent être des protéines, glycoprotéines, lipides ou glucanes. Parmi les PAMP les mieux décrits à ce jour, il y a la flagelline, les lipopolysaccharides (LPS) et le facteur d'élongation EF-Tu (origine bactérienne), la chitine (origine fongique), les heptaglycosides, les élicitines et le peptide Pep 13 d'une transglutaminase (origine oomycète) (Tableau 1) (Postel et Kemmerling, 2009). Les plantes peuvent aussi reconnaître des molécules produites lors de l'interaction, par exemple des fragments de paroi végétale ou pathogène libérés sous l'action d'enzymes apoplastiques d'origine végétale ou pathogène (Tableau 1). Ces molécules sont alors appelées DAMP [Damage-Associated Molecular Patterns, Dodds et Rathjen (2010)]. Malgré leur différence d'origine et de structure moléculaire, ces molécules sont des éliciteurs qui induisent des réactions de défense similaires.

La perception des éliciteurs déclenche rapidement une cascade de signalisation dans la cellule végétale (Garcia-Brugger *et al.*, 2006), impliquant des changements du potentiel membranaire, un efflux d'anions (Gauthier *et al.*, 2007), des changements de concentrations en calcium libre cytosolique (Lecourieux *et al.*, 2002) et nucléaire (Lecourieux *et al.*, 2005), l'induction de la production des formes actives d'oxygène

Tableau 1 – Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) et Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) reconnus par des plantes. D après Postel et Kemmerling (2009).

PAMP	motif minimal	Origine	plantes sensibles
Flagelline	flag22	bactéries Gram négatif	tomate, Arabidopsis
Facteur d'élongation (EF-Tu)	elf18	bactéries Gram négatif	Arabidopsis, autres Brassicacées
Transglutaminase	motif Pep-13	Oomycètes (<i>Phytophthora</i> spp.)	persil, pomme de terre, vigne, tabac
Xylanase	TKLGE pentapeptide	champignons (<i>Trichoderma</i> spp.)	tabac, tomate
Protéine choc froid	motif RNP-1	bactéries Gram négatif, bactéries Gram positif	Solanacées
“Cellulose-binding elicitor lectin” (CBEL)	domaine conservé de liaison à la cellulose	oomycètes (<i>Phytophthora</i> spp.)	tabac, Arabidopsis
Protéines de transfert des lipides (élicitines)	non défini	oomycètes (<i>Phytophthora</i> spp., <i>Pythium</i> spp.)	tabac, navet, <i>Raphanus sativus</i>
Harpine (HrpZ)	non défini	bactéries Gram négatif (<i>Pseudomonas</i> , <i>Erwinia</i>)	concombre, tabac, tomate, Arabidopsis
Protéines inductrices de nécroses (NLP)	non défini	bactéries (<i>Bacillus</i> spp.), champignons (<i>Fusarium</i> spp.), oomycètes (<i>Phytophthora</i> spp., <i>Pythium</i> spp.)	dicotylédones
Sidérophores	non défini	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	tabac
Invertase	peptide N-mannosylé	levure	tomate
Peptidoglucane	Muropeptides	bactéries Gram positif	Arabidopsis, tabac
Chitine	oligosaccharides de la chitine	champignons	tomate, Arabidopsis, riz, blé, orge
β -Glucanes	Tetraglucosyl glucitol	champignons (<i>Pyricularia oryzae</i>)	tabac, riz, Fabaceae
fucanes sulfatés	hepta- β -glucosides ramifiés	oomycètes (<i>Phytophthora</i> spp.)	
Lipopolysaccharides (LPS)	oligo- β -glucosides lineaires	algues brunes	tabac
	oligosaccharides du fucane	algues brunes	poivron, tabac
	Lipid A lipooligosaccharides	bactéries Gram négatif (<i>Xanthomonas</i> , <i>Pseudomonas</i>)	
Rhamnolipides	Mono-/dirhamnolipides	<i>Pseudomonas</i> spp.	vigne
Ergostérol		champignons	tomate
Cérebrosides A, C	Sphingolide	champignons (<i>Magnaporthe</i> spp.)	riz
DAMP	motif minimal	Origine	plantes sensibles
Oligouronides	Oligomères	pectines de la paroi végétale	tabac, Arabidopsis
Celldextrines	Oligomères	cellulose de la paroi végétale	vigne
monomères de cutine	Dodecane-1-ol	cuticule végétale	concombre, tomate, pommier

(FAO) (Simon-Plas *et al.*, 2002), monoxyde d'azote (NO) (Lamotte *et al.*, 2004) et l'activation d'une cascade de mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998). Ces événements induisent l'expression de gènes de défense, dont ceux codant pour les protéines PR (Pathogenesis Related), enzymes lytiques ou à activité anti-microbienne (glucanases, chitinases, protéases, défensines) (van Loon *et al.*, 2006) et ceux codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse de phytoalexines (Zhao *et al.*, 2005). De plus, il y a des renforcements pariétaux pouvant impliquer des "cross-linking" et des dépôts de callose (Benhamou, 1999). Il peut aussi y avoir induction de la réaction hypersensible (RH), qui se traduit par la mort des cellules végétales en contact avec le pathogène dans le but de l'isoler et de l'empêcher de se propager (Heath, 2000). Ces réactions de défense bloquent le développement de l'agent pathogène : il y a résistance de la plante et on parle de "PAMP-triggered immunity" (PTI).

2.2 Effecteurs et immunité induite

Les agents pathogènes, au cours de leur évolution, ont développé des stratégies leur permettant de contourner ces réactions de défense. Plus généralement, ils sécrètent et transmettent des effecteurs dans la cellule végétale afin de supprimer la PTI. La plante devient alors sensible et développe la maladie (Figure 1 B). Ces effecteurs sont définis comme des molécules d'origine pathogène (toxines ou protéines effectrices) favorisant le développement du pathogène par manipulation des fonctions et structures cellulaires de l'hôte (Bent et Mackey, 2007).

De nombreux effecteurs ont été décrits. Les mieux étudiés sont ceux d'origine bactérienne transmis par le système de sécrétion de type III. Certaines souches peuvent en transmettre 20 à 30 différents qui agissent, souvent de manière redondante, sur des cibles différentes chez l'hôte. Par exemple, ils inhibent la perception des PAMP au niveau des récepteurs, interfèrent avec la cascade de signalisation des MAPK ou dégradent des composés anti-microbiens produits par l'hôte (Göhre et Robatzek, 2008). Ils peuvent posséder des activités enzymatiques de type protéases, kinases, phosphatases et E3 ubiquitin ligases (Block *et al.*, 2008). Chez les champignons et les oomycètes, de nombreux effecteurs ont également été identifiés. Ils sont produits et sécrétés à l'aide du système endomembranaire, mais le mécanisme de leur transmission dans la cellule végétale et leur cible restent peu décrits (Dodds et Rathjen, 2010). Chez les oomycètes, il peut y avoir sécrétion d'inhibiteurs de glucanases ou protéases végétales qui agissent dans l'apoplasme de l'hôte (Kamoun, 2006). De plus, des travaux récents ont montré qu'un grand nombre d'effecteurs peut être transmis dans le cytoplasme de l'hôte (Birch *et al.*, 2006). Les effecteurs RXLR propres aux Péronosporales ont des structures moléculaires caractéristiques. Ces protéines modulaires contiennent un peptide signal de sécrétion à l'extrémité N-terminale, un motif conservé RXLR-(EER) qui permet le transport dans la cellule hôte par un mécanisme inconnu à ce jour et des modules effecteurs à l'extrémité C-terminale (Kamoun, 2006). Les génomes séquencés des oomycètes contiennent des centaines de gènes codant pour les effecteurs qui font partie d'une grande famille

Tableau 2 – Protéines secrétées par des oomycètes pouvant activer / supprimer les réponses de l'immunité innée des plantes.
D après Hein *et al.* (2009).

Protéine secrétée	induit PTI?	induit ETI?	contribution possible à la virulence
GP42 (famille des transglutaminases)	Oui	Non	aucune
Famille de CBEL	Oui	Non	Adhésion à la cellule végétale
INF1 (famille des élicitines)	Oui	Non	aucune
Famille des NLP	Oui	Non	régulation de la transition biotrophe / nécrotrophe
PcF, SCR74 et SCR91	Oui	inconnue	inconnue
Famille des "Crinkling and necrosis" (Crrn)	Oui	inconnue	inconnue
Inhibiteurs des glucanases : GIP1 et GIP2	Non	inconnue	inhibent glucanases de l'hôte
EPH (inhibiteurs des protéases)	Non	inconnue	inhibent protéases de l'hôte
EPIC2B (famille des cystatines)	Non	inconnue	inhibent protéases de l'hôte
Effecteur RXLR AVR3a	Non	Oui	réprime la mort cellulaire régulée par INF1
Effecteur RXLR Avr1b	Non	Oui	réprime la mort cellulaire régulée par BAX
Effecteur RXLR ATR1	Non	Oui	réprime la PTI
Effecteur RXLR ATR13	Non	Oui	réprime la PTI

évoluant rapidement et issue d'un ancêtre commun (Morgan et Kamoun, 2007). Il y a probablement une redondance fonctionnelle importante entre ces gènes, mais les rôles précis de ces effecteurs au cours de l'infection reste encore assez peu décrits (Tableau 2).

2.3 Les gènes R

Les plantes ont à leur tour développé un mécanisme de résistance basé sur la perception des effecteurs (perception directe) ou, plus souvent, de leur effet dans la cellule (perception indirecte). Ainsi, des protéines R servent de récepteurs spécifiques à des effecteurs et permettent le déclenchement des réactions de défense, conduisant à une immunité induite par des effecteurs (Effector-Triggered Immunity, ETI). C'est la raison pour laquelle les gènes codant pour des effecteurs ont aussi été nommés gènes *avr* (pour avirulence) : leur présence chez le pathogène confère la résistance à la plante possédant le gène R correspondant (Figure 1 C). La plante est alors sensible si le pathogène possède un effecteur pour lequel une protéine R correspondante est absente. Les événements impliqués dans l'ETI ressemblent à ceux de la PTI, incluant l'induction de l'expression de gènes PR (Pathogenesis Related), les renforcements pariétaux et la production des phytoalexines (Dodds et Rathjen, 2010). Ces réponses impliquent également des hormones, notamment l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) (Pieterse *et al.*, 2009).

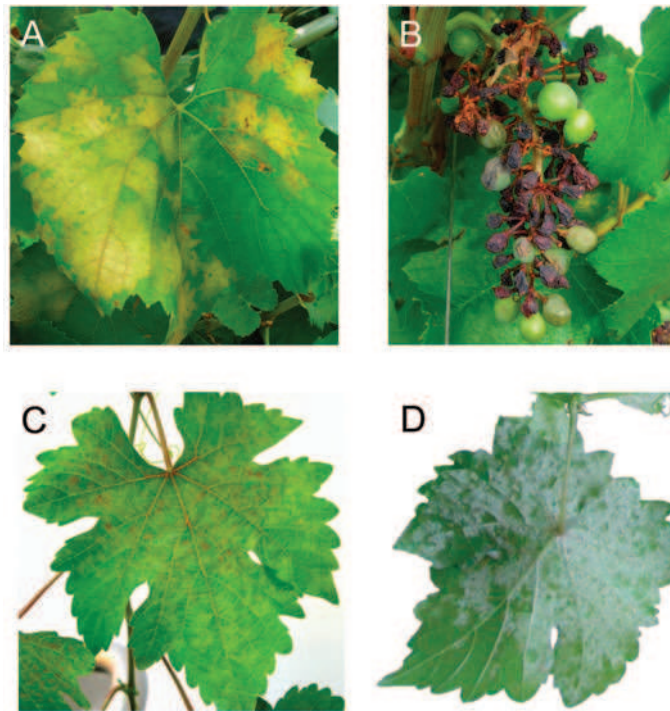


FIGURE 2 – Feuilles et baies de *Vitis vinifera* infectées par *Plasmopara viticola*. Feuille (A) et baies (B) avec les symptômes du mildiou observés au vignoble. Jeunes feuilles avec les symptômes du mildiou observés en serres : les taches d’huile à la face supérieure (C) et un duvet blanchâtre correspondant aux sporangiophores, marquant la sporulation à la face inférieure (D).

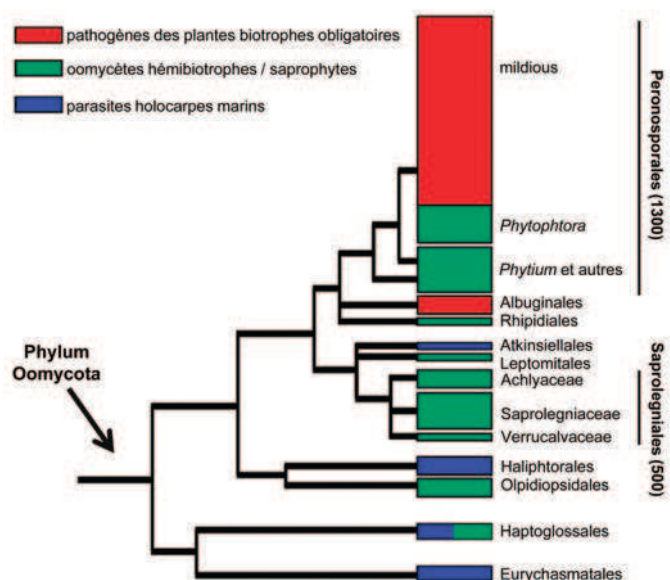


FIGURE 3 – Schéma simplifié de l’évolution des oomycètes. Le nombre des espèces est indiqué pour les deux ordres les plus importants. D’après Thines et Kamoun (2010).

3 Vigne-*Plasmopara viticola*

Parmi les maladies de la vigne, le mildiou est l'une des plus graves et reste toujours redoutée par les viticulteurs. Il est problématique surtout dans les régions caractérisées par un climat chaud et humide pendant la période de la croissance végétative de la vigne, comme en Europe, Chine, Japon et Nouvelle-Zélande. En Australie, au Chili et en Californie, la maladie a moins d'importance (Kassemeyer et Berkemann-Löhnertz, 2009).

Le mildiou est originaire des États-Unis d'où il est arrivé en Europe à la fin du 19ème siècle. Après son premier repérage à Bordeaux, il s'est disséminé rapidement dans de nombreuses régions viticoles du monde (Boso et Kassemeyer, 2008; Gobbin *et al.*, 2007), entre autres parce que les cépages de *Vitis vinifera* typiquement cultivés en Europe sont sensibles au mildiou. Les cépages américains montrent des degrés différents de résistance, peut-être en raison de la co-évolution de la vigne et de la maladie (Boso et Kassemeyer, 2008).

Le mildiou affecte les organes herbacés de la plante, dont les feuilles, inflorescences et jeunes baies. Sur feuilles, on observe des taches jaunâtres, les "taches d'huile" sur la face supérieure. Sur la face inférieure, sous la tache d'huile, un duvet blanchâtre peut apparaître en conditions humides et correspond aux sporangiophores au moment de la sporulation (Figure 2). L'agent responsable de cette maladie, *Plasmopara viticola*, est un oomycète appartenant au règne des Chromistes, à l'ordre des Péronosporales, à la famille des Péronosporacées.

3.1 Phylogénie des oomycètes

Les oomycètes constituent un groupe de pathogènes importants, pouvant infecter gravement des cultures avec un lourd impact pour l'homme. Ainsi, *Phytophthora infestans*, l'agent pathogène du mildiou de la pomme de terre, fut responsable de la grande famine européenne des années 1840. Les oomycètes ont longtemps été confondus avec les champignons en vertu de leurs modes de vie similaires. Comme les champignons, les oomycètes forment des hyphes et sont capables d'absorber des nutriments directement (mode de vie osmotrophique). De plus ils forment des spores "asexuées" par mitose pour permettre leur dissémination. Cependant, contrairement aux champignons, les oomycètes possèdent des parois composées essentiellement de glucanes sans ou avec très peu de chitine. La structure de leurs flagelles (présents sur les zoospores) souligne l'appartenance phylogénétique des oomycètes au règne des Chromistes (Thines et Kamoun, 2010). Les Péronosporales, dont *P. viticola*, nécessitent de l'eau ou une forte humidité pour toutes les étapes de leur développement. Ces organismes sont donc plus proches des algues brunes et des diatomées que des champignons (Kamoun *et al.*, 1999).

Les oomycètes se répartissent dans plusieurs groupes phylogéniques. Leurs ancêtres ont probablement été des parasites d'organismes marins dont des algues, diatomées, crustacés et nématodes (Thines et Kamoun, 2010). Aujourd'hui, plus de 60% des espèces sont des pathogènes des plantes. Parmi elles, il y a le pathogène

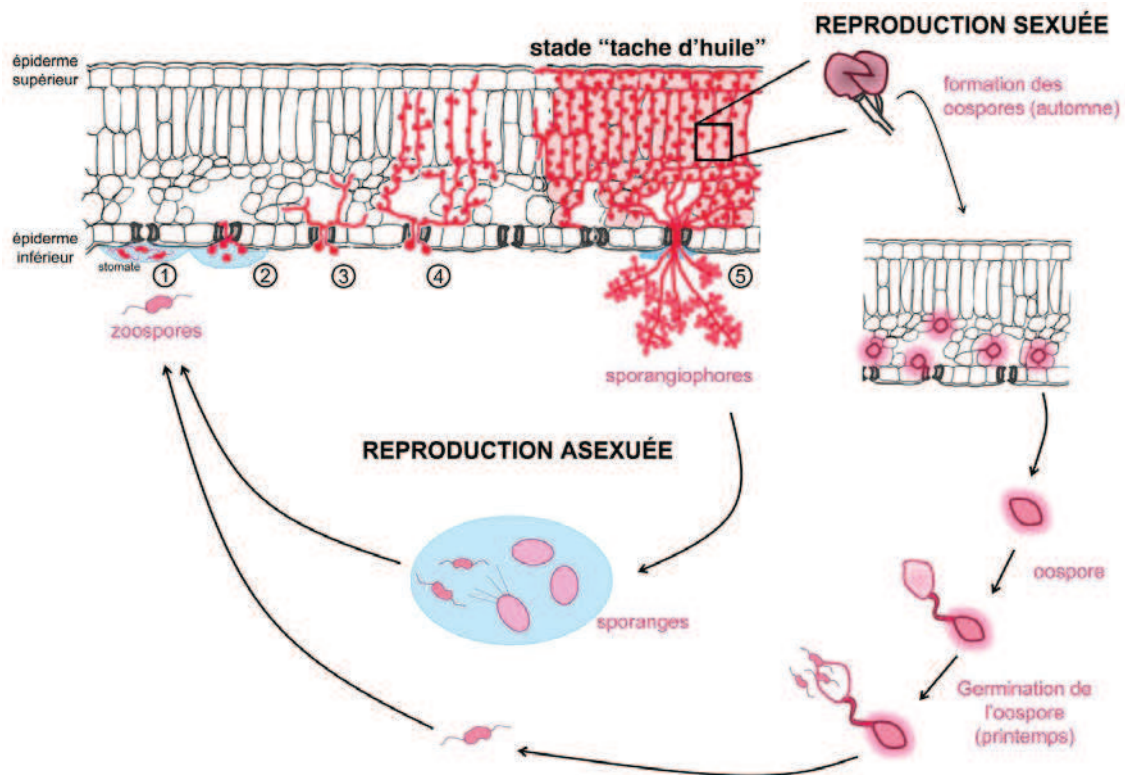


FIGURE 4 – Les cycles sexué et asexué de *Plasmopara viticola*. Des zoospores nagent dans un film de l'eau pour arriver au niveau d'un stomate (1) où elles s'enkystent et forment des tubes germinatifs puis des vésicules sous-stomatiques (2). Le pathogène développe des hyphes entre les cellules de l'hôte (3) et forme les structures spécialisées, les haustoria, qui permettent l'absorption de nutriments (4). Le cycle se termine avec la sporulation qui libère les sporanges contenant des zoospores pouvant être à l'origine d'une nouvelle infection dans le cycle asexué (5). En automne, des oospores sont formées dans les tissus infectés et hibernent dans les feuilles tombées au sol pour germer en printemps suivant et libérer des zoospores initiant l'infection primaire. Figure adaptée de Allègre (2007).

des légumineuses *Aphanomyces euteiches* (Saprolegniales) et les espèces de *Phytophthora*, *Pythium* et *Albugo* responsables des mildioux (Péronosporales). Sur la figure 3, on observe que le mode de vie parasitaire s'est développé au moins trois fois de manière indépendante lors de l'évolution de ces espèces (Thines et Kamoun, 2010). Ces parasites ont des modes de vie différents. Les oomycètes biotrophes obligatoires se sont probablement développés à partir des hémibiotrophes par prolongation de la phase biotrophe et réduction de l'impact sur l'hôte (Thines et Kamoun, 2010). Cette évolution s'est accompagnée d'une multiplication et diversification des gènes codant pour des effecteurs.

3.2 Le cycle de vie du mildiou

Le cycle asexué de *P. viticola* (Figure 4) débute par des zoospores (libérées à partir des sporanges) qui nagent à la surface des feuilles dans un film d'eau à l'aide de leurs deux flagelles. Elles se dirigent vers les stomates, probablement par chimiotactisme (Kiefer *et al.*, 2002). Quand elles arrivent au niveau d'un stomate, elles s'immobilisent (perte des flagelles), s'enkystent (formation d'une paroi) et forment un tube germinatif qui pénètre par l'ouverture des stomates appelée ostiole (Figure 5 a). Il y a formation d'une vésicule dans la chambre sous-stomatique, à partir de laquelle un hyphes primaire se forme (Figure 5 b) puis se développe entre les cellules végétales. Les hyphes coenocytiques se ramifient et forment un grand nombre d'haustoria dans les cellules parenchymateuses pour permettre la nutrition du pathogène (Figure 5 c-f). Selon les conditions environnementales, en particulier la température et l'hygrométrie, la phase d'incubation peut durer 4 à 12 jours (Galet, 1977). Dans nos conditions d'infection artificielles du cépage Marselan, les premiers symptômes de tache d'huile apparaissent 4 à 5 jours post-inoculation. La sporulation survient quand l'hygrométrie est supérieure à 80% pendant plus de 12 heures à l'obscurité. À ce stade, des sporangiophores émergent des stomates et portent des sporanges contenant des zoospores qui peuvent initier une nouvelle infection (Figure 4 & 5 g & h).

Ce cycle asexué peut se répéter plusieurs fois pendant le printemps et l'été. Les zoospores peuvent également infecter les jeunes baies tant que leur épiderme contient des stomates fonctionnels (Kennelly *et al.*, 2005). Ensuite, elles ne peuvent plus être contaminées, mais une forte infection des feuilles peut limiter l'accumulation des sucres en cours de maturation, donc affecter leur qualité. En automne, des spores sexuées (oospores ou oeufs d'hiver) se forment dans le parenchyme des feuilles infectées qui tomberont et permettent au pathogène d'hiberner au niveau du sol. Au printemps, après une phase de maturation et en conditions climatiques favorables, l'oospore germe en formant un macrosporocyste qui libère les zoospores pouvant effectuer une infection primaire (Figure 4) (Langcake et Lovell, 1980)].

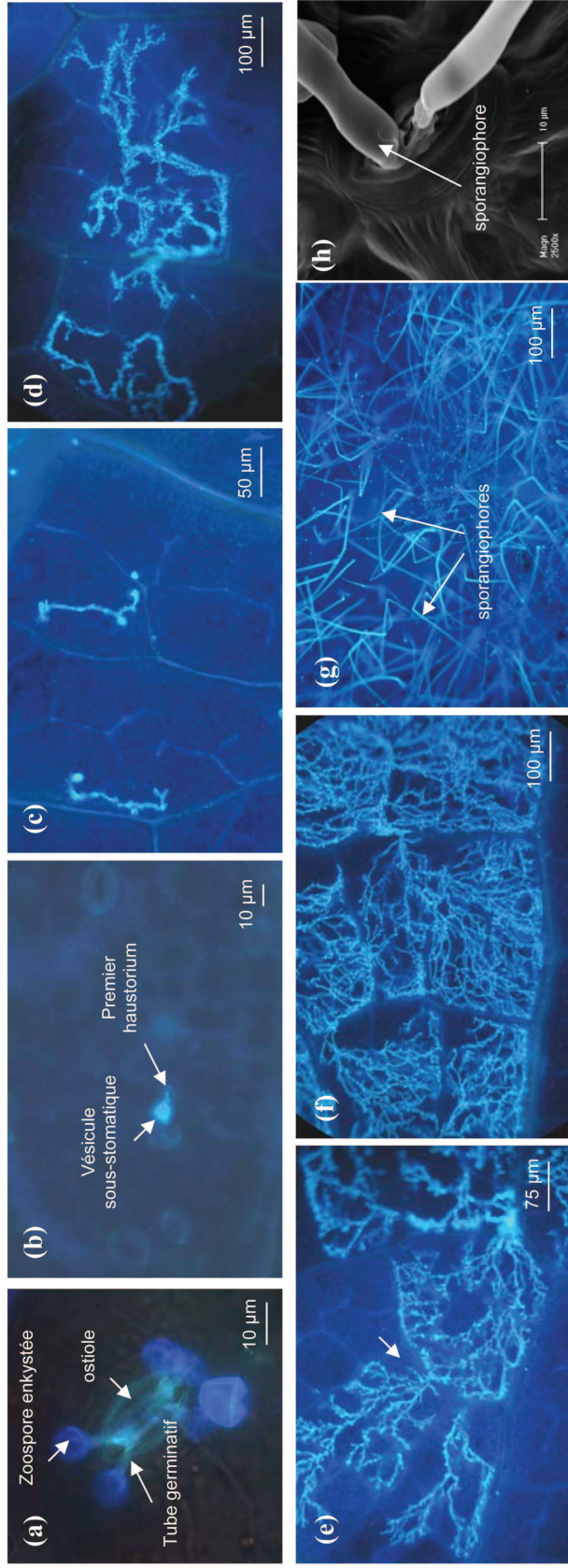


FIGURE 5 – Cinétique de colonisation d'une feuille de *V. vinifera* cv. Marselan inoculée par *P. viticola*. (a) Pénétration du tube germinatif émis par la zoospore enkystée (avant 12 hpi), (b) vésicule sous-stomatique résultant du gonflement du tube germinatif dans la chambre sous stomatique, émission d'un hyphes et formation du premier haustorium (24 hpi), (c) et (d), développement intercellulaire du mycélium, respectivement à 2 et 3 jpi. (e) Les hyphes se ramifient pour franchir les nervures secondaires et coloniser de nouvelles zones de limbe (flèche, 4 jpi), (f) développement maximal des hyphes dans la feuille; stade où les symptômes "tache d'huile" sont bien visibles en face supérieure 6 - 7 jpi, (g) vue d'ensemble d'une zone de limbe infectée après déclenchement de la sporulation (8 jpi). Les structures de *P. viticola*, révélées par le bleu d'aniline, sont observées en épifluorescence. (h) Les sporangiophores émergent de l'ostiole d'un stomate, observation en microscopie électronique à balayage. Figure de Allègre (2007).

3.3 Les réactions de défense de la vigne contre le mildiou

Les espèces de *Vitis* montrent des degrés différents de résistance / sensibilité au mildiou. Jürges *et al.* (2009) ont décrit trois types d'interactions entre *P. viticola* et les espèces de *Vitis* : a) le pathogène colonise la feuille de *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau (espèce européenne) b) le développement du pathogène est ralenti au niveau de la croissance des hyphes et de la formation des haustoria chez *Vitis riparia*, *Vitis rupestris* et *Vitis californica* (espèces américaines) c) l'oomycète montre un développement aberrant, la pénétration par les stomates est empêchée et il forme des hyphes à la surface des feuilles, sans pouvoir sporuler chez *Vitis coignetiae*, *Vitis ficifolia*, *Vitis quinquangularis* et *Vitis Jacquemontii* (espèces asiatiques). Ainsi, l'espèce européenne *V. vinifera* est généralement considérée comme sensible au mildiou. Les espèces américaines semblent ralentir la croissance du pathogène, mais permettent la terminaison de son cycle asexué, même si la sporulation est fortement réduite (Bellin *et al.*, 2009). Quelques cépages hybrides possédant une résistance partielle contre le mildiou ont été obtenus par croisement de *V. vinifera* avec des espèces américaines, dont "Solaris", "Regent" et "Bianca". Chez le genre *Muscadinia*, l'espèce *M. rotundifolia* montre une résistance totale et il y a arrêt du développement du pathogène sans sporulation (Díez-Navajas *et al.*, 2008).

Les éliciteurs et effecteurs dans la défense de la vigne contre le mildiou

Sachant que *Vitis vinifera* est capable d'activer ses réactions de défense et de se protéger contre des maladies, on peut penser que la sensibilité au mildiou est due à un défaut de perception du pathogène ou à l'inhibition des réactions de défense par des effecteurs. La vigne est capable de reconnaître des éliciteurs, dont BcPG1, l'endopolygalacturonase 1 de *Botrytis cinerea* (Poinssot *et al.*, 2003), la laminarine, un β -1,3-glucane extrait de l'algue brune *Laminaria digitata* (Aziz *et al.*, 2003), ainsi que le chitosane, le dérivé déacétylé de la chitine (Aziz *et al.*, 2006). A ce jour, des PAMPs d'oomycètes sont connus (Tableau 2), comme la cryptogéine de *Phytophthora cryptogea* (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999) et le peptide pep13 de la transglutaminase (Brunner *et al.*, 2002), mais des PAMPs spécifiques de *P. viticola* n'ont pas encore été décrits. Chez des Péronosporales pour lesquelles le génome a été séquencé, un grand nombre de gènes codant pour des effecteurs a été trouvé par recherche des homologues et quelques fonctions ont pu être décrites (Tableau 2). La non-disponibilité de la séquence génomique de *P. viticola* rend difficile la recherche des homologues de séquence de ces protéines pour ce pathogène.

Les gènes R dans la défense

La plupart des protéines de résistance R appartient à la famille NB-LRR : elles possèdent un domaine de liaison aux nucléotides (NBS, Nucleotide Binding Site) et des domaines répétés riches en leucine (LRR, Leucine Rich Repeats) (Belkadir *et al.*, 2004). Le génome de la vigne contient des gènes codant pour des protéines R de ce type (Velasco *et al.*, 2007). De plus, des analyses des QTL chez des espèces résistantes

ont permis d'identifier quelques loci importants pour la résistance à *P. viticola* : *Rpv1* (Merdinoglu *et al.*, 2003), *Rpv2* (Fischer *et al.*, 2004) et *Rpv3* (Welter *et al.*, 2007). *Rpv1* a été identifié chez *M. rotundifolia* et est localisé sur le chromosome 12. Le gène responsable de la résistance n'a pas encore été identifié mais il se trouve dans un cluster de candidats codant pour des protéines NBS-LRR (Merdinoglu *et al.*, 2003). Un locus similaire a été identifié chez *V. riparia* (Marguerit *et al.*, 2009). *Rpv2* se trouve sur le chromosome 18 du cépage "Regent" (Fischer *et al.*, 2004) et est aussi présent chez *M. rotundifolia* (Bellin *et al.*, 2009). *Rpv3* est localisé sur le chromosome 12 et a été identifié chez "Regent" (Welter *et al.*, 2007) ainsi que "Bianca" (Bellin *et al.*, 2009) dans une région riche en gènes codant pour des protéines NBS-LRR distincte de celle où se trouve *Rpv1*. Les vignes possédant ce locus induisent une RH en contact avec *P. viticola* (Bellin *et al.*, 2009). Cependant, Peressotti *et al.* (2010) ont décrit l'isolement d'une souche de *P. viticola* capable de contourner la résistance liée à *Rpv3* chez "Bianca", ce qui remet en question l'utilisation de cépages résistants possédant un seul gène de résistance.

L'activation des réactions de défense

La perception de *P. viticola* par ces protéines R potentielles pourrait être déterminante pour la résistance de la vigne. La séquence génomique de la vigne contient des gènes codant probablement pour des éléments de la signalisation identifiés par homologie avec *Arabidopsis* (Velasco *et al.*, 2007). Récemment, le rôle de deux facteurs de transcription WRKY (*VvWRKY1* et *VvWRKY2*) dans les réactions de défense a été montré (Marchive *et al.*, 2007; Mzid *et al.*, 2007). De plus, deux homologues de *NPR1* ont été identifiés chez la vigne. Cette protéine est impliquée dans la signalisation de l'acide salicylique et semble importante dans la résistance contre *P. viticola* (Le Henanff *et al.*, 2009).

Les réactions de défense mises en place par une vigne résistante en réponse à une infection par *P. viticola* incluent la production de FAO, l'induction d'une réponse hypersensible, l'augmentation d'une activité peroxydasique dans les cellules adjacentes aux régions infectées et l'accumulation de composés phénoliques (Kortekamp et Zyprian, 2003). Kortekamp (2006) et Polesani *et al.* (2010) ont montré que l'expression de gènes codant pour une glucanase (PR1), chitinase (PR3 et 4) et peroxydase (PR9) ainsi que pour des stilbène synthases était fortement induite par *P. viticola* chez *V. riparia* (résistant) comparé à *V. vinifera* (sensible). De plus, la voie de signalisation de l'acide jasmonique semble activée (Polesani *et al.*, 2010).

Une des réactions de défense la mieux décrite chez la vigne est la production des phytoalexines (Jeandet *et al.*, 2002). Ces composés appartiennent à la famille des stilbènes, incluant le *trans*-resvératrol, ses oligomères (les viniférines), ses dérivés méthylés (le *trans*-ptérostilbène) et glycosylés (le picéide, l'astringine) (Jeandet *et al.*, 2002). Les viniférines et le ptérostilbène montrent une activité anti-fongique plus forte que celle du resvératrol. Ces molécules ont un effet sur la viabilité des zoospores et inhibent la croissance de *P. viticola* (Pezet *et al.*, 2004). La forte augmentation de la production de stilbènes chez l'espèce résistante *M. rotundifolia* a été décrite comme un des facteurs déterminant pour la mise en place de la résistance

(Alonso-Villaverde *et al.*, 2011). De plus, il y a une accumulation des phytoalexines au niveau des stomates (Dai *et al.*, 1995) qui pourrait inhiber le développement du pathogène tôt dans son cycle de vie. Les stomates semblent jouer un rôle important dans la résistance. Chez Solaris, un hybride résistant, des dépôts de callose au niveau de l’ostiole semblent obstruer l’ostiole des stomates et “engluer” les zoospores enkystées (Gindro *et al.*, 2003). Les espèces américaines montrent une physiologie particulière des cellules de garde, avec une crête cuticulaire interne plus développée qui pourrait limiter, voire empêcher la pénétration du pathogène (Jürges *et al.*, 2009).

3.4 Effet du mildiou sur la vigne

Malgré ces mécanismes de défense, *P. viticola* parvient à infecter les cépages de l’espèce sensible *V. vinifera* et la maladie induit des changements profonds au niveau de la plante. Plusieurs études ont montré des altérations au niveau du métabolisme primaire et de la photosynthèse (Brem *et al.*, 1986; Hayes *et al.*, 2010; Moriondo *et al.*, 2005) et Allègre (2007) a observé une accumulation anormale de l’amidon dans les zones infectées. Il a également été montré que ce pathogène pouvait manipuler l’ouverture stomatique (Allègre, 2007; Allègre *et al.*, 2007).

4 Objectifs

Le premier objectif était de comprendre l’origine et le mécanisme de l’accumulation anormale de l’amidon dans les feuilles infectées. Pour cela, nous avons initié différentes approches : quantification des sucres solubles et de l’amidon, dosage des activités enzymatiques clés impliquées dans le métabolisme de l’amidon et quantification des transcrits des gènes codant pour ces enzymes ainsi que l’étude de l’activité photosynthétique. Ces expérimentations réalisées au cours de l’infection ont été complétées par un suivi du développement du pathogène.

Le second objectif de cette thèse était de caractériser l’origine et le mécanisme de la dérégulation des stomates. Nous sommes partis de l’hypothèse de l’existence d’un composé responsable de cette dérégulation, présent dans les fluides apoplastiques de feuilles infectées, produit par la plante ou le pathogène. Dans le but de purifier et identifier ce composé actif, les fluides apoplastiques ont été isolés puis testés à l’aide d’un modèle “disque épidermique”.

I. Dérégulation du métabolisme de l'amidon

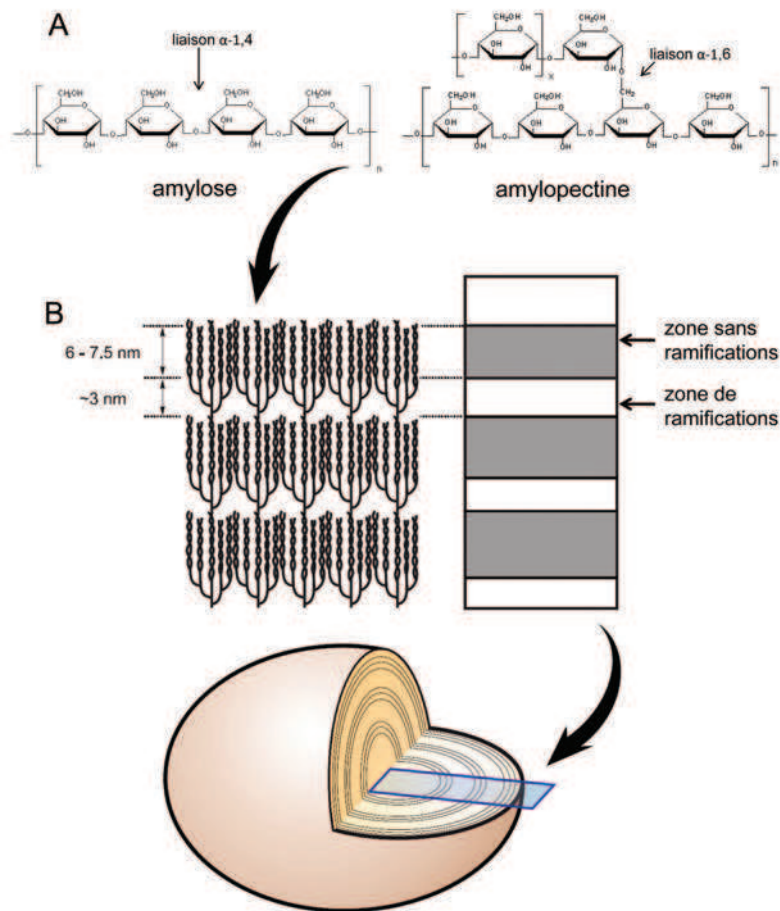


FIGURE 6 – Structure moléculaire du grain de l'amidon.

A : Structures chimiques de l'amylose et de l'amylopectine. B : Composition du grain d'amidon d'après Tetlow (2004). Les zones grises correspondent aux lamelles cristallines, les zones blanches aux lamelles amorphes.

Introduction

1 Le métabolisme de l'amidon

La photosynthèse est un mécanisme fondamental par lequel les plantes captent l'énergie solaire et la convertissent en composés chimiques assimilables : les sucres. Au sein des plantes, on distingue des organes sources et puits. Les organes sources ont une activité photosynthétique et produisent plus d'assimilats qu'ils n'en utilisent pour leur métabolisme, leur croissance ou développement et vont en exporter, sous forme de saccharose, vers les organes puits qui ont une activité photosynthétique nulle ou insuffisante à satisfaire leurs besoins en sucres. Ainsi les feuilles adultes sont des organes sources, alors que les jeunes feuilles, les fleurs, les racines, les tubercules ou les fruits sont des organes puits. Les sucres sont utilisés directement, exportés ou stockés à plus ou moins long terme.

Chez la plupart des plantes, l'amidon est la forme majeure de stockage des sucres, même s'il en existe d'autres, comme des oligosaccharides de la famille du raffinose et les fructanes chez les céréales (Zeeman *et al.*, 2007). Dans certains tissus puits, l'amidon est une forme de stockage de longue durée. Au contraire, dans les feuilles, l'amidon est synthétisé de jour à partir des sucres produits par la photosynthèse et stocké temporairement. De nuit, il est dégradé et libère des sucres dont les hexoses fructose et glucose, qui sont utilisés dans les feuilles pour leur métabolisme ou exportés sous forme de saccharose vers les organes puits. La proportion de sucres orientés vers la synthèse et le stockage d'amidon de jour dépend des conditions environnementales, en particulier de la photopériode, et peut atteindre jusqu'à 75% chez *Arabidopsis* (Smith et Stitt, 2007; Zeeman et Rees, 1999). Plus la période diurne est courte, plus une partie importante des photoassimilats est orientée vers la synthèse d'amidon.

L'amidon est un glucide complexe composé d'unités de D-glucose liées en α -1,4. Il est constitué de deux homopolymères: l'amylose, qui n'est pas ramifié, et l'amylopectine, constituant plus de 90% de l'amidon dans les feuilles (Figure 6 A). L'amylopectine est constituée de chaînes de résidus glucose (de 6 à plusieurs centaines d'unités glucose, 20 à 25 unités en moyenne) liés en α -1,4 (Smith, 2001). Certaines chaînes se lient à d'autres par des liaisons α -1,6 constituant ainsi des "points de branchement", ce qui forme une structure générale "en grappes" (Figure 6 B). Chaque molécule d'amylopectine contient au total 10 000 à 100 000 résidus glucose (Zeeman *et al.*, 2007). Des chaînes non ramifiées de 10 à 15 résidus glucose peuvent s'apparier pour former des double hélices, s'associant en lamelles cristallines alternant avec les lamelles "amorphes" contenant les points de branchement. Il en résulte une structure semi-cristalline insoluble (Hannah et James, 2008; Tetlow, 2004; Zeeman *et al.*, 2007). L'architecture moléculaire précise de l'amylopectine reste toutefois mal

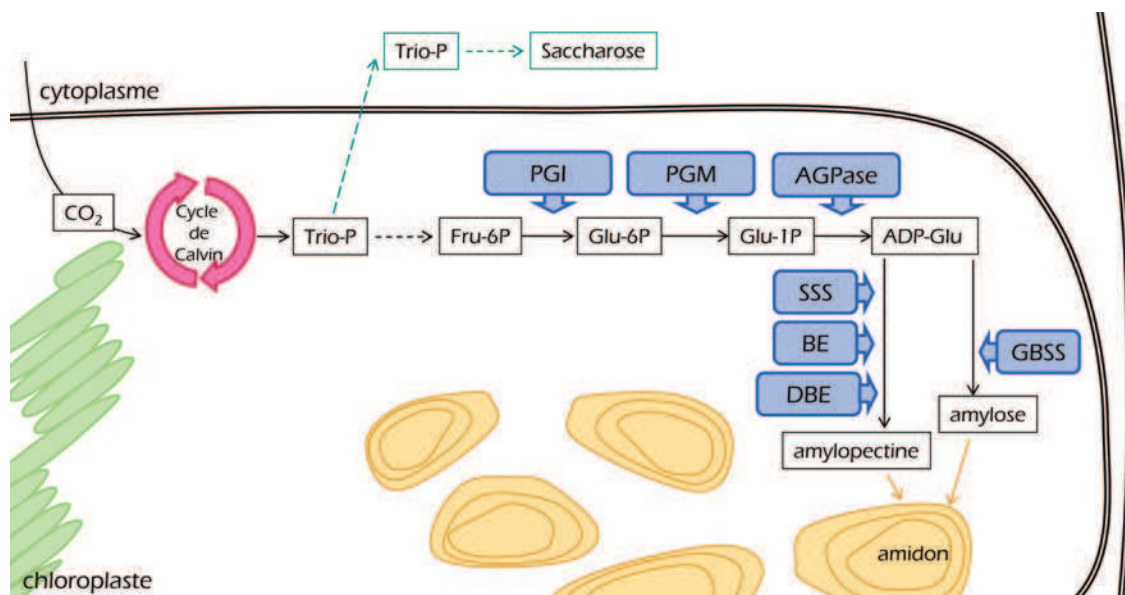


FIGURE 7 – Schéma simplifié présentant les étapes principales de la synthèse de l'amidon.

Substrats : ADP-Glu : ADP-glucose, Fru-6P : fructose 6-phosphate, Glu-1P : glucose 1-phosphate, Glu-6P : glucose 6-phosphate, Trio-P : trioses-phosphates.

Enzymes : AGPase : ADP-glucose pyrophosphorylase, BE : enzyme de branchement, DBE : enzyme de débranchement, GBSS : granule bound starch synthase, PGI : phosphoglucose isomérase, PGM : phosphoglucose mutase, SSS : amidon-synthétase soluble. D'après Zeeman *et al.* (2007).

connue.

Ces dernières années, de nombreux travaux visant à expliquer précisément les étapes du métabolisme de l'amidon ont été conduits en grande partie à l'aide de mutants d'*Arabidopsis*. Cependant, il reste encore des points obscurs, surtout pour les mécanismes du catabolisme au niveau foliaire.

1.1 La synthèse de l'amidon

Dans les chloroplastes des tissus photosynthétiques, le fructose 6-phosphate, produit par le cycle de Calvin, est utilisé par la phosphoglucose isomérase (PGI) afin de former du glucose 6-phosphate (Figure 7). La PGI est la première enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de l'amidon. D'ailleurs, le mutant d'*Arabidopsis* *pgi1* est affecté dans la synthèse de l'amidon dans les tissus photosynthétiques et en accumule moins (Yu *et al.*, 2000). Le glucose 6-phosphate est ensuite transformé en glucose 1-phosphate par la phosphoglucose mutase (PGM) (Neuhaus et Stitt, 1990). À partir du glucose 1-phosphate et de l'ATP, l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) synthétise l'ADP-glucose en libérant du pyrophosphate. Même si cette réaction est réversible, la forte activité d'une pyrophosphatase alcaline localisée dans les plastes oriente la réaction vers la synthèse d'ADP-glucose (Weiner *et al.*, 1987). De ce fait, cette réaction est considérée comme l'étape clé de la synthèse de l'amidon car elle contrôle le flux de sucres orientés vers celle-ci.

L'ADP-glucose est utilisé comme donneur de glucose pour la formation de l'amylose et de l'amylopectine. Des enzymes de la famille des amidon-synthétases catalysent la formation des liaisons osidiques α -1,4 en transférant le glucose à l'extrémité non-réductrice d'un glucane α -1,4 existant. Il existe deux groupes d'amidon-synthétases avec des isoformes très conservées (Ball et Morell, 2003) : les granule-bound-starch-synthétases (ou GBSS) qui, associées au grain d'amidon, permettent la synthèse de l'amylose (Delrue *et al.*, 1992; Hovenkamp-Hermelink *et al.*, 1987; Nelson et Rines, 1962; Tsai, 1974) et les amidon-synthétases solubles, localisées dans le stroma des chloroplastes. Elles mêmes sont divisées en 4 groupes phylogénétiques sur la base de leur séquence en acides aminés (SSI, SSII, SSIII et SSIV) (Ball et Morell, 2003). Dans les organes de réserve, il semblerait que la SSI synthétise des glucanes courts de 10 sous-unités de glucose maximum (Commuri et Keeling, 2001; Delvalle *et al.*, 2005) et que l'élongation de ces molécules soit effectuée par les SSII et SSIII (Tetlow *et al.*, 2004a). La SSIV semble avoir une fonction dans l'initiation de la formation des grains de l'amidon (Roldan *et al.*, 2007; Szydlowski *et al.*, 2009).

Des enzymes de branchement (BE) permettent les ramifications de l'amylopectine. Un segment de 6 résidus ou plus liés en α -1,4 est coupé d'une chaîne et transféré, *via* une liaison α -1,6 sur la même chaîne ou sur une chaîne adjacente (Borovsky *et al.*, 1975). Ces enzymes existent sous plusieurs isoformes, réparties en 2 classes, et semblent interagir (Nakamura, 2002). Les enzymes de débranchement (DBE) sont indispensables à la formation des grains à structure semi-cristalline. Afin d'obtenir des ramifications régulières permettant la cristallisation, les DBE pourraient éliminer certaines ramifications (Zeeman *et al.*, 2007). Il existe deux groupes d'enzymes

de débranchement (Doehlert et Knutson, 1991): les isoamylases (ISAs), qui jouent un rôle dans la synthèse de l'amidon (Burton *et al.*, 2002; Dauvillee *et al.*, 2000), et les limit-dextrinases (LDA ou pullulanases) qui sont plutôt impliquées dans la dégradation (voir chapitre 1.2).

Les enzymes de branchement, enzymes de débranchement et les amidon-synthétases pourraient former des complexes régulés par la phosphorylation, ce qui leur permettrait de coordonner leur action sur une même chaîne glucane (Ball et Morell, 2003; Tetlow *et al.*, 2004a,b).

Dans les tissus non-photosynthétiques, il existe des différences pour la synthèse de l'amidon. Dans ce cas, le saccharose qui entre dans les cellules est hydrolysé en glucose 6-phosphate dans le cytoplasme; lequel entre ensuite dans l'amyloplaste grâce à des transporteurs spécifiques (Borchert *et al.*, 1989; Kammerer *et al.*, 1998). De plus, dans certains tissus, comme dans l'endosperme des graines de céréales en développement, on trouve une isoforme cytoplasmique de l'AGPase produisant de l'ADP-glucose qui est ensuite transporté dans l'amyloplaste par un transporteur d'ADP-glucose (Denyer *et al.*, 1996; Tetlow *et al.*, 2003; Thorbjørnsen *et al.*, 1996). Ce transporteur n'a pas été identifié dans les chloroplastes et l'importance de cette voie métabolique dans les feuilles reste peu connue et fait débat (Leroch *et al.*, 2005; Neuhaus *et al.*, 2005).

La régulation de la synthèse de l'amidon: rôle clé de l'AGPase

La synthèse de l'amidon doit être finement régulée afin d'adapter le stockage de glucides aux conditions environnementales et à la disponibilité en sucres pour la plante. L'AGPase joue un rôle essentiel à ce niveau car elle contrôle le flux de glucides vers la biosynthèse de l'amidon. L'AGPase est un hétérotétramère composé de deux petites (ApS, 50 kDa) et deux grandes (ApL, 51kDa) sous-unités (Morell *et al.*, 1987; Okita *et al.*, 1990). Les petites sous-unités sont liées à l'activité enzymatique et leur présence est essentielle pour qu'il y ait synthèse, alors que le rôle majeur des grandes sous-unités est dans la régulation de l'activité enzymatique (Morell *et al.*, 1987; Okita *et al.*, 1990). Chez les végétaux, on a identifié deux gènes conservés codant pour les ApS (*ApS1* et *ApS2*) et quatre gènes, moins conservés, codant pour des ApLs (*ApL1*, *ApL2*, *ApL3* et *ApL4*) (Crevillén *et al.*, 2005).

La "composition" en sous-unités formant l'AGPase fonctionnelle peut varier entre les tissus d'une même plante (La Cognata *et al.*, 1995; Villand *et al.*, 1992). Chez *Arabidopsis* on trouve surtout l'isoforme ApL1 de la grande sous-unité dans les tissus sources, alors que ApL2, ApL3 et ApL4 sont plus présentes dans les tissus puits (Crevillén *et al.*, 2005). Concernant les petites sous-unités, ApS1 semble être l'isoforme la plus représentée dans tous les tissus (Crevillén *et al.*, 2005). Ainsi, des hétéromères différents quant à la nature de leurs grandes sous-unités formeraient des enzymes avec des caractéristiques régulatrices et catalytiques distinctes (Crevillén *et al.*, 2003).

L'expression des gènes codant pour ces sous-unités peut-être régulée par différents facteurs. En général, leur expression est adaptée à la photopériode et à l'importance de l'activité métabolique (Müller-Röber *et al.*, 1995; Nakata et Okita, 1995).

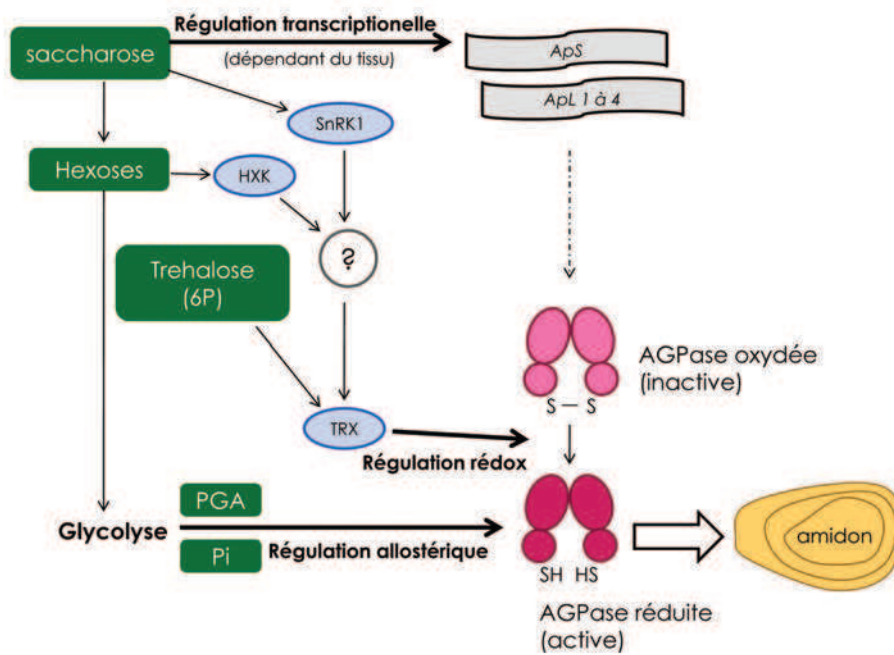


FIGURE 8 – **Régulation de l'AGPase.** AGPase : ADP-glucose pyrophosphorylase, ApS : gène codant pour la petite sous-unité de l'AGPase, ApL : gène codant pour la grande sous-unité de l'AGPase, HXK : hexokinase, SnRK1 : SNF1 related protein kinase 1, TRX : thiorédoxine, 3-PGA : 3-phosphoglycérate, Pi : phosphate inorganique (orthophosphate).

Globalement, leur expression peut être inhibée par un apport de nitrate (Scheible *et al.*, 1997) ou de phosphate (Nielsen *et al.*, 1998) et activée par des hormones telles que l'ABA, les auxines et les cytokinines (Miyazawa *et al.*, 1999; Rook *et al.*, 2001). Certains facteurs pourraient avoir un effet spécifique sur certains de ces gènes. Ainsi, le saccharose, le glucose et la lumière induisent l'expression des gènes *ApS1*, *ApL2* et *ApL3*, mais inhibent celle d'*ApL1* chez *Arabidopsis* (Sokolov *et al.*, 1998). Même si de nombreuses études ont montré que ces stimuli régulent l'expression de ces gènes, ils n'affectent en général ni la quantité, ni l'activité de l'AGPase (Nakata et Okita, 1995; Sokolov *et al.*, 1998). En effet, l'AGPase est régulée au niveau transcriptionnel, mais il y a aussi une régulation de l'activité enzymatique à différents niveaux, allostériquement et par des modifications post-traductionnelles.

L'activité de l'AGPase est régulée allostériquement par le ratio entre l'activateur 3-phospho-glycérate (3-PGA) et l'inhibiteur phosphate inorganique (Pi), ratio dépendant de la disponibilité en photoassimilats (Figure 8). Si la production de photoassimilats excède les besoins de la plante, cela induit un ratio 3-PGA / Pi élevé, stimulant l'activité AGPase et la production de l'amidon (Preiss, 1988). Ce mécanisme permet d'adapter le niveau de la synthèse de l'amidon en fonction de l'activité photosynthétique et du niveau de synthèse du saccharose (Tiessen *et al.*, 2002). La régulation allostérique pourrait dépendre de la composition de l'AGPase. En effet, les isoformes des grandes sous-unités les plus présentes dans les tissus puits (*ApL3* et *ApL4*) semblent moins sensibles au ratio 3-PGA / Pi que celle des tissus sources (*ApL1*) (Crevillén *et al.*, 2003, 2005). L'enzyme présente dans certains tissus de stockage, comme l'endosperme des graines de céréales ou les embryons du pois, montre en effet une faible activation par le 3-PGA et une faible inhibition par le Pi (Hylton et Smith, 1992; Kleczkowski *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent une potentielle différence de la régulation de cette enzyme dans les tissus photosynthétiques et non-photosynthétiques (Tetlow *et al.*, 2003).

Que ce soit dans les tissus photosynthétiques ou non-photosynthétiques, l'activité de l'AGPase est également régulée par une modification post-traductionnelle réversible de façon rédox-dépendante (Figure 8). En effet, l'enzyme est inactivée par la formation de ponts disulfure entre les résidus cystéines oxydés des domaines C-terminaux des petites sous-unités (Fu *et al.*, 1998) qui réduisent l'interaction avec le substrat, la sensibilité au 3-PGA et augmentent l'effet du Pi (Tiessen *et al.*, 2002). Ce mode de régulation permet à la plante de contrôler la synthèse d'amidon en réponse aux changements environnementaux indépendamment des concentrations en 3-PGA et Pi. L'activation de l'AGPase par réduction des ponts disulfure est vraisemblablement effectuée par des systèmes ferrédoxines / thiorédoxines (Hendriks *et al.*, 2003). Dans les feuilles, l'activation de l'AGPase dépend de la lumière et de la disponibilité en sucres (Geigenberger *et al.*, 2005). Dans les tubercules de la pomme de terre, elle est activée par le saccharose et le glucose par des mécanismes indépendants qui utilisent la "SNF1-related protein kinase 1" (SnRK1) et l'hexokinase, elles mêmes impliquées dans la signalisation des sucres (Tiessen *et al.*, 2003). Enfin, récemment, la participation du tréhalose 6-phosphate dans la régulation rédox de l'AGPase a été montrée (Fritzius *et al.*, 2001; Kolbe *et al.*, 2005; Lunn *et al.*, 2006).

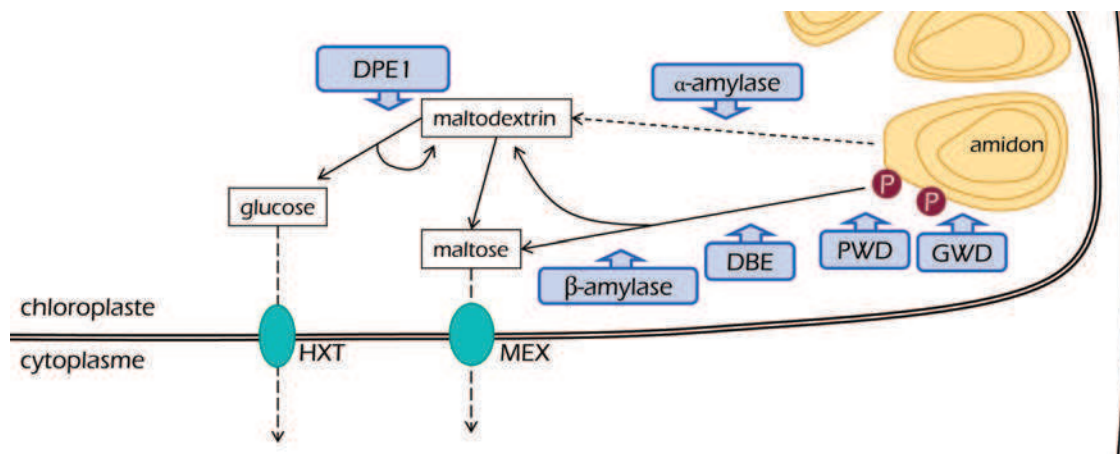


FIGURE 9 – Schéma simplifié présentant les enzymes impliquées dans le catabolisme de l'amidon au niveau des feuilles

DBE : enzyme de débranchement ; DPE1 : enzyme disproportionnante 1 ; GWD : glucan, water dikinase ; HXT : transporteur d'hexose ; MEX : transporteur du maltose ; PWD : phosphoglucan, water dikinase. D'après Zeeman *et al.* (2007).

1.2 Le catabolisme de l'amidon

La synthèse de l'amidon décrite ci-dessus utilise une voie "linéaire" et les enzymes impliquées sont globalement bien décrites. Cependant, la dégradation est beaucoup plus complexe et diffère entre les tissus sources et puits (Zeeman *et al.*, 2004). Un schéma a été retenu pour son métabolisme foliaire chez *Arabidopsis* (Figure 9), mais il pourrait y avoir des différences pour d'autres plantes. Dans l'endosperme des céréales, l' α -amylase est l'enzyme centrale de la dégradation qu'elle initie en agissant directement sur les grains d'amidon (Beck et Ziegler, 1989; Fincher, 1989). Les glucanes solubles ainsi libérés sont dégradés ultérieurement par des β -amylases et d'autres enzymes hydrolytiques. Dans les feuilles, la dégradation de l'amidon est localisée dans les chloroplastes. Chez *Arabidopsis*, l'une des trois isoformes de l' α -amylase possède un peptide signal d'adressage pour le chloroplaste (Lloyd *et al.*, 2005) mais le mutant pour ce gène ne montre pas d'altération dans la dégradation de l'amidon (Yu *et al.*, 2005). Il en est de même pour le triple mutant *amy1/amy2/amy3* (trois gènes codant pour les α -amylases). Ainsi, le rôle de l' α -amylase dans la dégradation de l'amidon au niveau foliaire reste obscur et d'autres enzymes semblent jouer un rôle plus important (Lloyd *et al.*, 2005).

Récemment, une enzyme essentielle pour la dégradation de l'amidon foliaire a été identifiée par une approche génétique en utilisant le mutant *starch excess 1* ou *sex1* d'*Arabidopsis* qui présente une hyperaccumulation nocturne d'amidon (Caspar *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 2001). Il s'agit de l' α -glucan, water dikinase (GWD) qui est responsable de la phosphorylation de l'amylopectine (Mikkelsen *et al.*, 2004; Ritte *et al.*, 2004). Une autre dikinase, la phosphoglucan, water dikinase (PWD), agit uniquement sur de l'amylopectine déjà phosphorylée (Kötting *et al.*, 2005) et augmente à son tour le taux de phosphorylation. Ces phosphorylations pourraient modifier localement la structure tridimensionnelle de l'amylopectine et ainsi faciliter l'accès d'autres enzymes hydrolytiques (Fettke *et al.*, 2009; Hejazi *et al.*, 2008).

La β -amylase (BAM) semble aussi jouer un rôle essentiel dans la dégradation de l'amidon au niveau foliaire (Lloyd *et al.*, 2005). Sa répression transcriptionnelle par des ARN antisens induit une accumulation de l'amidon dans les feuilles, liée à une réduction de sa dégradation de nuit (Scheidig *et al.*, 2002). Cette exo-amylase libère du maltose à partir de l'extrémité non-réductrice des α -1,4-glucanes (Zeeman *et al.*, 2004). Puisque la β -amylase ne peut agir sur les points de ramification α -1,6, la dégradation d'amidon nécessite l'activité préalable d'enzymes de débranchement (DBE), notamment la limit dextrinase (Lloyd *et al.*, 2005; Zeeman *et al.*, 2004). La β -amylase ne dégrade pas les α -1,4-glucanes de taille inférieure à quatre sous-unités (Zeeman *et al.*, 2004), contrairement à l'enzyme disproportionnante (DPE1) qui est donc essentielle pour la dégradation totale de l'amidon (Critchley *et al.*, 2001). À partir du maltotriose, cette enzyme hydrolyse puis transfère une unité maltose sur un malto-oligosaccharide et produit donc un malto-oligosaccharide plus long en libérant du glucose.

Les produits terminaux de la dégradation de l'amidon sont donc le maltose et, de façon moindre, le glucose, qui sont exportés du chloroplaste, grâce à des transporteurs spécifiques (Figure 9), vers le cytoplasme où ils seront métabolisés (Levi

et Gibbs, 1976; Stitt et Heldt, 1981; Stitt et Rees, 1980). Le mutant du transporteur spécifique du maltose, *maltose excess 1* ou *mex1* d'Arabidopsis, montre des concentrations élevées en maltose dans les feuilles et une inhibition de la dégradation d'amidon (Niittyla *et al.*, 2004). Au niveau cytosolique, l'enzyme disproportionnante (DPE2 ou amyломaltase) permet le catabolisme du maltose en glucose, en transférant une unité de glucose sur un hétéroglycane comme l'arabinogalactane (Weise *et al.*, 2011). Les mutants n'ayant pas la forme cytosolique de DPE2 ont un phénotype similaire aux mutants *mex1* (Lu et Sharkey, 2004). Une autre enzyme agit sur ces hétéroglycans : l' α -glucan phosphorylase (Pho2), qui libère du glucose 1-phosphate (Lu et Sharkey, 2006; Lu *et al.*, 2006; Steup, 1981). Parallèlement, une hexokinase produit du glucose 6-phosphate à partir du glucose exporté des chloroplastes ou libéré par la DPE2. Les hexoses-phosphates constituent alors des substrats pour la synthèse du saccharose qui pourra être exporté (Lu et Sharkey, 2006).

La régulation de la dégradation de l'amidon

De nuit, 95% de l'amidon accumulé dans les feuilles pendant la journée sont dégradés de manière linéaire et les sucres solubles sont utilisés sur place ou exportés vers les tissus puits (Gibon *et al.*, 2009; Hendrix et Grange, 1991; Smith et Stitt, 2007). Ce catabolisme est adapté à la longueur de la nuit, ce qui permet une disponibilité stable des sucres pendant cette période. En effet, chez Arabidopsis, il a été montré que des plantes cultivées en condition de jour court accumulent plus d'amidon dans leurs feuilles que celles cultivées en jour long. La vitesse de dégradation est adaptée car, dans les deux conditions, l'amidon est dégradé complètement à l'aube (Gibon *et al.*, 2004). De plus, la vitesse de dégradation est immédiatement adaptée à un changement de la longueur du jour (Lu *et al.*, 2005). Ces observations ont conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle l'utilisation d'amidon de nuit est régulée par un mécanisme intégrant la longueur de nuit prévue, ainsi que la concentration en amidon présente en début de nuit afin d'éviter à la fois un manque de sucres pendant la nuit et une dégradation incomplète d'amidon en fin de nuit (Graf *et al.*, 2010; Zeeman *et al.*, 2004). Les mécanismes régulant le catabolisme de l'amidon restent mal connus. Différentes hypothèses ont été récemment avancées pour un contrôle au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel : inhibition par rétro-contrôle, régulation rédox et phosphorylation réversible des protéines.

Chez Arabidopsis, l'expression de la plupart des gènes impliqués dans la synthèse d'amidon ne semble pas régulée par le rythme circadien (Smith *et al.*, 2004). Cependant, des gènes codant pour des enzymes impliquées dans sa dégradation le sont (Harmer *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2004) et semblent sous contrôle de l'horloge interne (Lu *et al.*, 2005). Même si certains gènes présentent une expression maximale à la fin de la journée (Harmer *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 2001), l'abondance des protéines correspondantes ne change pas ou très peu pendant la journée (Chia *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2001). Comme les activités des enzymes impliquées dans la dégradation d'amidon doivent être inhibées de jour afin d'éviter une dégradation d'amidon concomitante à sa synthèse, la régulation au niveau post-traductionnel semble jouer un rôle important (Fondy *et al.*, 1989; Kru-

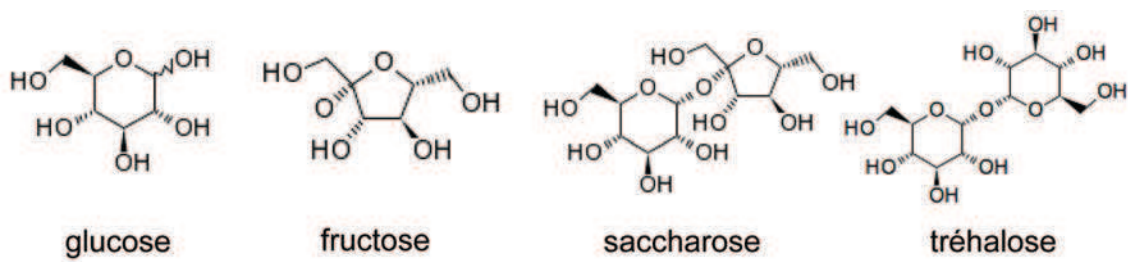


FIGURE 10 – Structures chimiques du glucose, du fructose, du saccharose et du tréhalose.

ger *et al.*, 1983; Tetlow *et al.*, 2004a; Zeeman *et al.*, 2002). Cette régulation pourrait intervenir au niveau de la GWD, dont l'activité semble essentielle pour l'initiation de la dégradation de l'amidon (Kotting *et al.*, 2010). Cette enzyme semble contrôlée par un mécanisme rédox *via* les thiorédoxines (Mikkelsen et Blennow, 2005; Mikkelsen *et al.*, 2005). D'autres enzymes de la dégradation ont été prédites comme cibles de la thiorédoxine, telle que la BAM, mais le rôle et le fonctionnement de ces mécanismes restent peu décrits (Kotting *et al.*, 2010).

2 Les sucres solubles : molécules du métabolisme énergétique et de la signalisation

Outre leur fonction de stockage et de transport d'énergie, certains sucres dont le glucose, le saccharose, le tréhalose (Figure 10) et le tréhalose 6-phosphate sont aussi considérés comme des molécules de signalisation (Rolland *et al.*, 2006), pouvant réguler la germination, la croissance, le développement végétatif et reproducteur, la sénescence, la photosynthèse, le métabolisme, le transport des tissus sources vers les tissus puits ainsi que des réponses aux stress (Roitsch, 1999; Rolland *et al.*, 2006). Les voies de signalisation induites par les sucres semblent interférer avec celles induites par des hormones, dont l'ABA, les auxines, les cytokinines et l'éthylène (Ramon *et al.*, 2008). De manière générale, des fonctions plus spécifiques des tissus "sources" comme la photosynthèse et l'export des sucres sont induites par de faibles concentrations en sucres, alors que les fonctions typiquement associées aux "puits", comme la croissance et le stockage, sont induites par des concentrations plus fortes (Rolland *et al.*, 2006). Les sucres sont "perçus" dans le cytoplasme par des hexokinases (Moore *et al.*, 2003) et au niveau membranaire par des homologues des transporteurs des sucres ou des récepteurs couplés aux protéines G (Grigston *et al.*, 2008). Les mécanismes de la "signalisation sucres" (sugar signaling) impliquent la régulation de la transcription de certains gènes *via* des facteurs de transcription : les "Sugar regulated transcription factors" (Rolland *et al.*, 2006), des éléments de promoteurs spécifiques (Grierson *et al.*, 1994) ou des complexes de répresseurs de transcription (Schouten *et al.*, 2000). Au niveau traductionnel, la "signalisation sucres" peut influencer la stabilité des ARN (Prieto *et al.*, 2000). Enfin, les sucres peuvent réguler des activités enzymatiques comme celle de la SnRK1 qui phosphoryle et inactive ainsi des enzymes du métabolisme des sucres et du nitrate (Sugden *et al.*, 1999) et celle de la "Target of Rapamycin" (TOR) kinase, qui joue un rôle dans la régulation de la synthèse des ribosomes, de la traduction et du métabolisme primaire chez les animaux et probablement aussi chez les végétaux (Smeekens *et al.*, 2010; Soulard *et al.*, 2009).

2.1 Le glucose

Ce monosaccharide est impliqué dans de nombreuses voies du métabolisme primaire. Il sert de source d'énergie en alimentant la glycolyse et la respiration, de

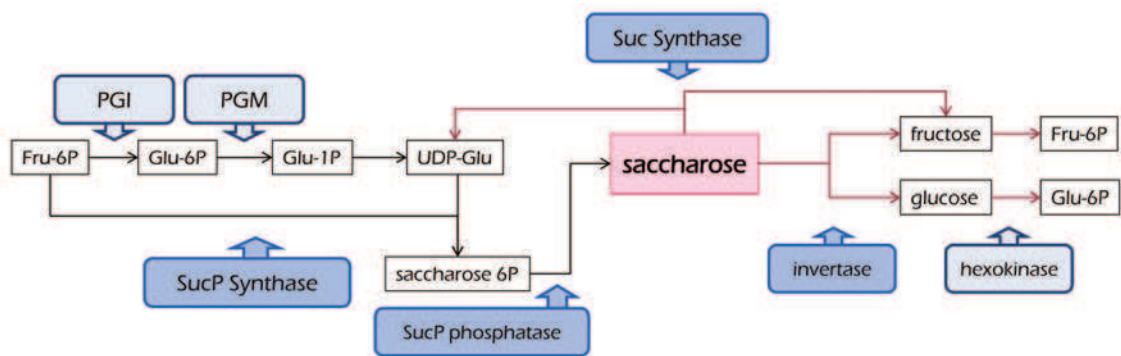


FIGURE 11 – Schéma simplifié du métabolisme du saccharose. Fru-6P : fructose 6-phosphate, Glu-1P : glucose 1-phosphate, Glu-6P : glucose 6-phosphate, PGI : phosphoglucose isomérase, PGM : phosphoglucose mutase, Suc Synthase : saccharose synthétase, SucP Synthase : saccharose phosphate synthétase, SucP phosphatase : saccharose-phosphate phosphatase, UDP-Glu : UDP-glucose

substrat pour la synthèse du tréhalose et de l'amidon et il entre dans la voie des pentoses phosphates (Granot, 2008). L'enzyme indispensable à l'entrée du glucose dans ces voies métaboliques est l'hexokinase (HXK), qui catalyse sa phosphorylation en glucose 6-phosphate.

Outre sa fonction métabolique, le glucose est aussi une molécule de signalisation qui régule des processus comme la photosynthèse et la sénescence (Dai *et al.*, 1999). Un ajout de glucose dans le milieu de culture de plantules d'*Arabidopsis* entraîne la répression de l'expression des gènes impliqués dans la photosynthèse et codant pour l'asparagine synthétase (*ASN1*) et l'induction de celle de gènes codant pour les PR-protéines (Pathogenesis Related) PR1 et PR5, la chalcone synthétase (*CHS*), la phénylalanine ammonia lyase (*PAL*) et l'AGPase (Dai *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2000). Puisqu'il participe à la régulation de gènes impliqués dans les réactions de stress, il assure une "connexion" entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire associé aux réactions de défense.

La signalisation induite par le glucose implique l'hexokinase, qui sert de "senseur" de la concentration en glucose indépendamment de sa fonction de phosphorylation du glucose (Rolland *et al.*, 2006).

2.2 Le saccharose

La synthèse du saccharose

La forme principale du transport des sucres chez les plantes est le saccharose (β -D-fructofuranosyl-(2,1)- α -D-glucopyranoside, Figure 10), un disaccharide constitué de fructose et de glucose liés par une liaison osidique α - β -1,2. Le saccharose est un sucre non-réducteur, caractéristique importante car il a de fait une faible réactivité chimique qui permet son stockage et son transport. Il est synthétisé dans le cytoplasme à partir du fructose 6-phosphate et de l'UDP-glucose grâce à la saccharose-phosphate synthétase (SPS) puis la saccharose phosphate phosphatase (SPP) (Huber et Huber, 1992b) (Figure 11). Cette synthèse est régulée allostériquement au niveau de la SPS (activée par le glucose 6-phosphate et inhibée par le Pi) (Doehlert et Huber, 1983, 1984) ainsi que par la phosphorylation de cette protéine (Huber et Huber, 1992a) et la transcription du gène correspondant (Lunn et MacRae, 2003). Ces différents niveaux de régulation permettent d'adapter la synthèse du saccharose à la disponibilité en substrats, aux conditions de luminosité et aux besoins de la plante. Le saccharose synthétisé est stocké dans la vacuole ou exporté vers des cellules compagnes puis chargé dans les tubes criblés afin d'être transporté vers les organes puits. Trois mécanismes du chargement du phloème sont décrits dans la littérature (Rennie et Turgeon, 2009; Turgeon, 2010), dont deux utilisant la voie symplastique et un utilisant la voie apoplastique. Le chargement par voie apoplastique se trouve surtout chez les plantes herbacées. Chez ces plantes, les sucres sont libérés dans le milieu extracellulaire par les cellules du mésophylle et migrent dans l'apoplasme jusqu'aux cellules compagnes des tubes criblés. Le transport actif par des transporteurs spécifiques permet leur importation dans le symplasme des cellules compagnes puis l'entrée dans les tubes criblés se fait par voie symplastique. Chez

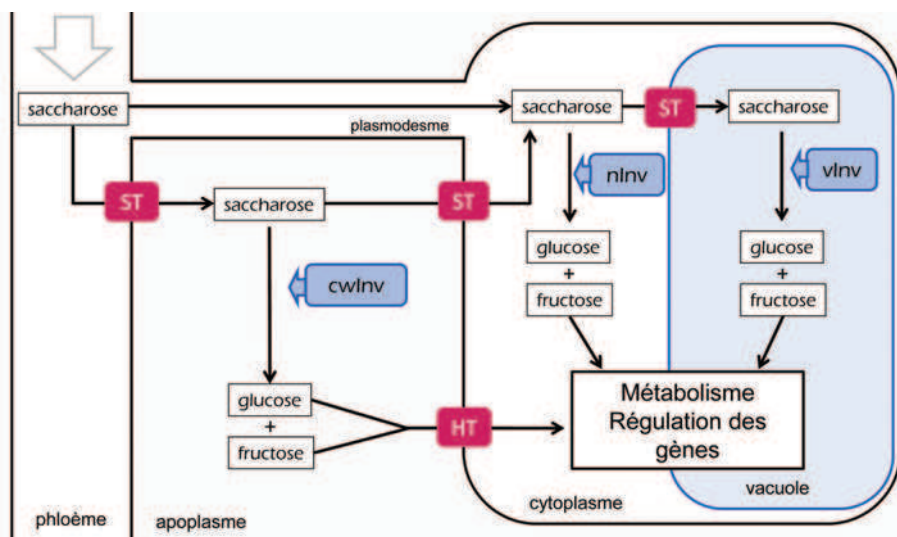


FIGURE 12 – Schéma présentant la localisation et le rôle des différentes isoformes de l'invertase chez les végétaux

HT : transporteur des hexoses ; cwInv : invertase pariétale ; nInv : invertase cytoplasmique ; vInv : invertase vacuolaire ; ST : transporteur du saccharose. D'après Roitsch et González (2004).

les plantes utilisant la voie symplastique pour charger le phloème, les sucres sont transportés des cellules du mésophylle vers les cellules compagnes des tubes criblés de manière passive à travers les plasmodesmes. Il existe deux formes de transport de saccharose dans les tubes criblés. En général, chez les espèces ligneuses, le saccharose entre dans les cellules compagnes puis les tubes criblés par diffusion suivant son gradient de concentration. Chez d'autres plantes, le saccharose est piégé sous forme de polymères [raffinose (trisaccharide) ou stachyose (tétrasaccharide)] dans les cellules compagnes puis ces polymères gagnent les tubes criblés (Winter *et al.*, 2000).

Le saccharose ou autres polymères arrivant dans les organes puits sont hydrolysés afin de permettre l'utilisation du glucose et fructose.

L'utilisation du saccharose : l'invertase

Le saccharose peut être hydrolysé par deux enzymes : la saccharose synthétase (SUS) et l'invertase (Figure 11). La dégradation par la SUS libère du fructose et de l'UDP-glucose, substrat pour la synthèse de constituants des parois cellulaires. L'invertase joue un rôle plus important dans la dégradation du saccharose. Elle catalyse le clivage irréversible du saccharose en glucose et fructose (Roitsch et González, 2004). On en distingue trois isoenzymes selon leur localisation, leur pH optimum et leur point isoélectrique (Figure 12). L'invertase vacuolaire a un pH optimum de 5,0 - 5,5 (Husain *et al.*, 2001) et régule l'import du saccharose, ainsi que sa concentration et sa mobilisation dans la vacuole (Koch, 2004; Roitsch et González, 2004). L'invertase cytoplasmique, dite alcaline ou neutre, est active à pH 6,8 - 8,0 (Roitsch et González, 2004). Son rôle dans l'hydrolyse du saccharose reste peu décrit (Winter *et al.*, 2000). Enfin, l'invertase pariétale a un pH optimum de 3,0 - 5,5 (Roitsch et González, 2004). Cette enzyme est liée à la paroi par une liaison ionique. Dans les tissus puits, elle clive le saccharose libéré du phloème et régule simultanément l'import des sucres et la concentration en saccharose dans l'apoplasme (Winter *et al.*, 2000). L'expression des gènes codant pour des invertases varie selon les types de tissus et est régulée par des signaux internes et externes comme les sucres (le glucose ou le saccharose) et des stress abiotiques et biotiques (Koch, 2004; Roitsch, 1999; Roitsch *et al.*, 2003). La plupart des phytohormones induit leur transcription (Fotopoulos, 2005), suggérant un rôle des invertases dans la connexion hormone - métabolisme. Enfin, il y a aussi une régulation post-traductionnelle des invertases par la présence d'inhibiteurs protéiques (Greiner *et al.*, 1998).

Événements contrôlés par le saccharose

Le saccharose semble jouer un rôle important dans la régulation des processus métaboliques. Comme il est facilement dégradé en glucose et fructose, il est difficile de distinguer les effets induits par le saccharose seul de ceux induits par les hexoses (Hanson et Smeekens, 2009). Néanmoins, plusieurs effets ont pu lui être attribués, comme l'activation de la synthèse des anthocyanes (Solfanelli *et al.*, 2006) et de l'amidon (Hendriks *et al.*, 2003; Lunn *et al.*, 2006). Les effets du saccharose sont

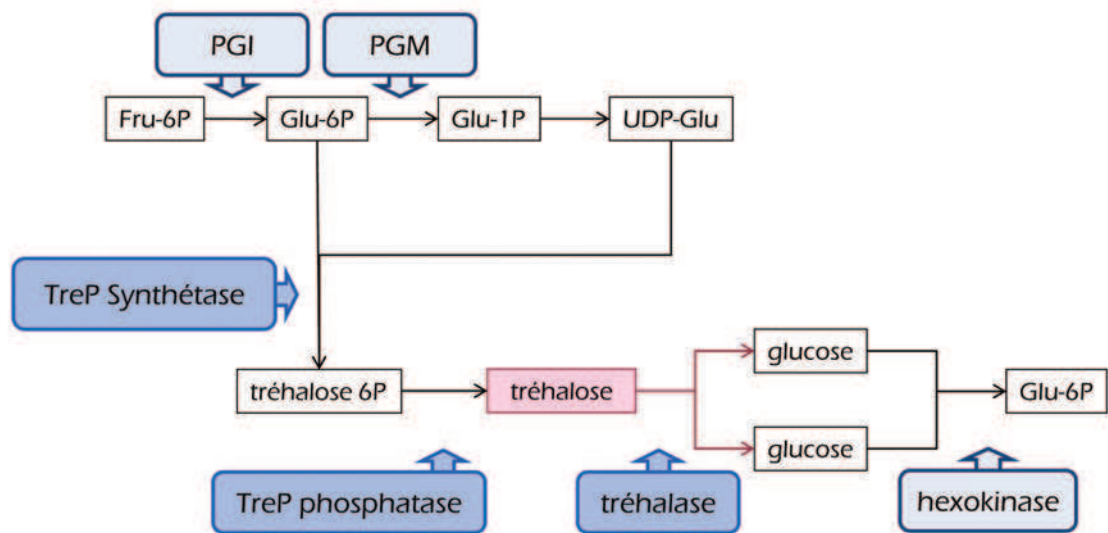


FIGURE 13 – Schéma simplifié de la voie métabolique du tréhalose

Fru-6P : fructose 6-phosphate, Glu-1P : glucose 1-phosphate, Glu-6P : glucose 6-phosphate, PGI : phosphoglucose isomérase, PGM : phosphoglucose mutase, TreP : tréhalose phosphate.

décrits surtout au niveau de la régulation de l'expression de gènes (Wind *et al.*, 2010) et pourraient impliquer, dans certains cas, des éléments de promoteurs spécifiques comme le "sucrose responsive element" (SURE) (Grierson *et al.*, 1994) ou la classe S1 de facteurs de transcription bZIP chez *Arabidopsis* qui lui semble spécifique (Weltmeier *et al.*, 2009). Aucun récepteur spécifique du saccharose n'a pu encore être identifié (Wind *et al.*, 2010). Selon Barker *et al.* (2000), le transporteur de saccharose SUT2 pourrait être un senseur du saccharose chez *Arabidopsis*, mais cette hypothèse reste à valider. Chez la vigne, une analyse de la séquence génomique a pu révéler la présence de gènes codant pour trois groupes phylogénétiques de transporteurs de saccharose et sept groupes phylogénétiques de transporteurs de monosaccharides (Afoufa-Bastien *et al.*, 2010). La structure de leur promoteur indique que certains pourraient être régulés par des sucres, mais leur rôle dans la perception du saccharose reste obscur.

2.3 Le tréhalose

Le métabolisme du tréhalose

Le tréhalose est un disaccharide non-réducteur constitué de deux unités glucose liées en α,α -1,1. Chez la plupart des eucaryotes, la tréhalose phosphate synthétase permet la synthèse du tréhalose 6-phosphate à partir de l'UDP-glucose et du glucose 6-phosphate. Le tréhalose 6-phosphate est ensuite déphosphorylé par la tréhalose phosphate phosphatase (Figure 13). Le tréhalose ainsi formé peut être dégradé par la tréhalase qui libère deux molécules de glucose (Paul *et al.*, 2008). Ce disaccharide est en concentration importante chez les bactéries, champignons et arthropodes où il est la forme de transport des sucres, une source d'énergie et le point de départ de la synthèse de la chitine (Merzendorfer et Zimoch, 2003).

Chez les végétaux, plusieurs gènes codant pour les enzymes de la synthèse du tréhalose ont été identifiés, suggérant un rôle important de ce dernier (Kolbe *et al.*, 2005; Ramon *et al.*, 2007). Cependant, il n'est produit qu'en quantités très faibles (de l'ordre du μM) et serait rapidement dégradé par la tréhalase; ce qui semble exclure un rôle dans le transport ou le stockage d'énergie. Il semble plutôt jouer un rôle dans les réactions aux stress abiotiques. En effet, sa production est augmentée dans certaines conditions, comme la sécheresse, le froid et la salinité (Fernandez *et al.*, 2010). Le tréhalose agit également dans les interactions plante - microbe (Fernandez *et al.*, 2010). Dans le cas d'une symbiose de la plante avec des bactéries du genre *Rhizobium* ou des champignons ectomycorhiziens, le tréhalose semble jouer un rôle non seulement de protection osmotique, mais aussi dans la régulation du métabolisme de l'hôte (Farias-Rodriguez *et al.*, 1998; Nehls, 2008; Suarez *et al.*, 2008). Dans les interactions plante - pathogène, une accumulation du tréhalose a été décrite (Brem *et al.*, 1986; Brodmann *et al.*, 2002; Isidorov *et al.*, 2008) et pourrait jouer un rôle important pour le pathogène ainsi que pour la plante, même si les détails de son implication dans l'infection restent obscurs (Fernandez *et al.*, 2010).

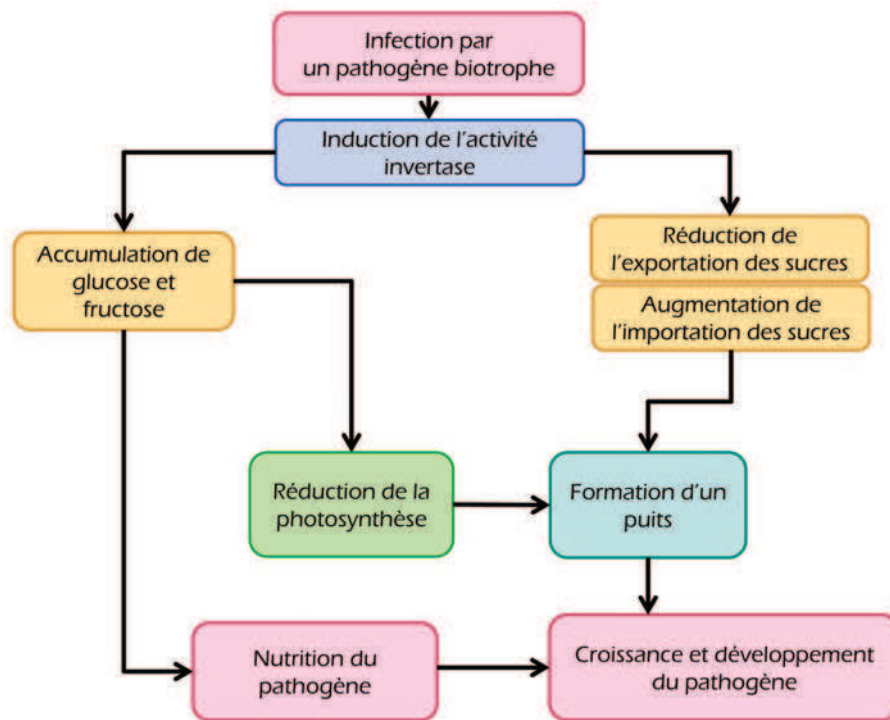


FIGURE 14 – Modèle de la transition source-puits induite lors de l'infection d'une plante par un pathogène biotrophe.
D'après Walters et McRoberts (2006).

Le rôle du tréhalose dans la signalisation

Des expériences ont montré que des altérations du métabolisme du tréhalose ont des effets sur la croissance végétative, la capacité photosynthétique (Pellny *et al.*, 2004), l'embryogenèse (Eastmond *et al.*, 2002), la floraison (Satoh-Nagasawa *et al.*, 2006), l'utilisation du saccharose (Schluepmann *et al.*, 2003) et le métabolisme de l'amidon (Kolbe *et al.*, 2005). Ces effets ont plutôt été attribués au tréhalose 6-phosphate. Le tréhalose et le tréhalose 6-phosphate sont décrits comme des molécules "signal", synthétisées en fonction de la concentration en hexoses et en UDP-glucose (Merzendorfer et Zimoch, 2003), "communiquant" l'état énergétique du cytoplasme aux chloroplastes. Concernant la régulation du métabolisme de l'amidon, une accumulation de ce dernier a été observée dans les feuilles d'*A.thaliana* cultivées sur un milieu enrichi en tréhalose (Wingler *et al.*, 2000). De plus, le tréhalose 6-phosphate active l'AGPase par un mécanisme rédox et inhibe la dégradation de l'amidon par inhibition de la β -amylase au niveau transcriptionnel.

3 L'influence d'une infection et la transition source-puits

La régulation de la production, du transport et de l'utilisation des glucides par la plante permet de garder un équilibre entre les tissus sources et puits qui est essentiel pour sa croissance et son développement. L'infection des feuilles, donc des tissus sources, par un pathogène perturbe cet équilibre et peut provoquer une transition source-puits. Lors de cette transition, les régions infectées perdent ou diminuent leur fonction "source" (diminution de l'activité photosynthétique et de l'export du saccharose) et acquièrent des caractéristiques "puits" (import et hydrolyse du saccharose).

Dans le modèle présenté par Walters et McRoberts (2006) l'infection d'une feuille par un pathogène biotrophe entraîne l'augmentation d'une activité invertase qui joue un rôle déterminant dans la transition source-puits (Fig. 14). Cette augmentation a été observée pour de nombreuses interactions plantes - pathogènes, par exemple chez des plantes infectées par des bactéries (Kocal *et al.*, 2008; Sturm et Chrispeels, 1990), virus (Baumert *et al.*, 2001), champignons nécrotrophes (Benhamou *et al.*, 1991) et biotrophes (Chou *et al.*, 2000; Fotopoulos *et al.*, 2003; Roitsch *et al.*, 2003; Voegelé *et al.*, 2006). Cette invertase peut être d'origine végétale et / ou pathogène. Par exemple, avec une approche immunologique, Jobic *et al.* (2007) ont montré l'implication d'une invertase fongique dans l'interaction *Helianthus annuus* - *Sclerotinia sclerotiorum*. Dans des baies de *V. vinifera* infectées par *Botrytis cinerea*, l'activité d'une invertase fongique a aussi été observée (Ruffner *et al.*, 1990; Ruiz et Ruffner, 2002). Dans l'interaction *Vicia faba* - *Uromyces fabae*, il y a induction de l'expression de gènes codant pour des invertases pathogènes et végétales (Voegelé *et al.*, 2006).

Dans les interactions plantes - pathogènes, l'activité invertase peut jouer un rôle pour l'hôte ainsi que pour l'agent pathogène. D'une part, pour la plante, elle sert à mobiliser l'énergie nécessaire à la mise en place des réactions de défense.

Certains auteurs suggèrent même de considérer l'invertase comme une protéine PR (Roitsch *et al.*, 2003; Swarbrick *et al.*, 2006). D'autre part, l'induction de l'activité invertase et la libération des hexoses dans l'apoplasme qui en résulte peut servir à la nutrition et donc au développement du pathogène. Les champignons semblent préférentiellement utiliser des hexoses (Biemelt et Sonnewald, 2006; Voegelé *et al.*, 2001) qu'ils mobilisent par une augmentation de la dégradation du saccharose soit par l'expression d'une invertase fongique (Voegelé *et al.*, 2006), soit par l'induction de l'invertase végétale, par exemple *via* la production des cytokinines (Walters et McRoberts, 2006). L'accumulation des hexoses au site d'infection peut réprimer la photosynthèse (Scholes *et al.*, 1994) et induire l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme "puits" et les réactions de défense (Ehness *et al.*, 1997). De plus, la dégradation du saccharose à son lieu de synthèse induit des changements de l'import / export des sucres dans les tissus infectés et y marque une transition "source-puits" (Walters et McRoberts, 2006).

Pour l'interaction vigne - *P. viticola*, Polesani *et al.* (2008) ont montré par une approche cDNA-AFLP une modification de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des sucres ainsi que dans la signalisation. Brem *et al.* (1986) ont décrit l'augmentation d'une activité invertase acide dans des feuilles infectées par *P. viticola* et *Erysiphe necator*. Récemment, Hayes *et al.* (2010) ont montré des différences dans l'expression des gènes codant pour une invertase pariétale et des transporteurs d'hexoses au niveau de ces feuilles. Les feuilles infectées par *P. viticola* montrent une réduction de la photosynthèse et de l'assimilation du carbone (Moriondo *et al.*, 2005) et une accumulation anormale d'amidon dans les zones infectées (Allègre, 2007). L'infection semble donc profondément affecter le métabolisme des sucres et de l'amidon. L'objectif de cette partie de thèse est de comprendre l'origine et le mécanisme de l'accumulation anormale d'amidon dans les feuilles infectées. Pour cela, nous avons initié différentes approches : quantification des sucres solubles et de l'amidon, dosage des activités enzymatiques clés impliquées dans le métabolisme de l'amidon et quantification des transcrits des gènes codant pour ces enzymes ainsi que l'étude de l'activité photosynthétique. Ces expérimentations réalisées au cours de l'infection ont été complétées par un suivi du développement du pathogène.

Matériel et Méthodes

1 Matériel biologique

1.1 Matériel végétal

Des plantes herbacées du cépage Marselan (Cabernet Sauvignon x Grenache Noir, Obtention INRA, 1961) sont produites sous serres. Des boutures herbacées à un oeil sont réalisées à partir de pieds-mères puis introduites dans des minimottes (Fertiss, Puteaux SA) et placées sous miniserres chauffées pendant environ trois semaines. Elles sont alors rempotées dans des pots individuels (10 x 10 x 8 cm) dans un substrat terreau-sable-perlite (4/1/1 ; v/v/v) puis placées en serres où elles sont arrosées quotidiennement à l'eau, avec un apport nutritif hebdomadaire [Plantprod N-P-K (20/20/20)]. La température est de $25 \pm 4^\circ\text{C}$ de jour et $18 \pm 7^\circ\text{C}$ de nuit, l'hygrométrie relative (HR) moyenne est de $50 \pm 10\%$ et la variation de la photopériode naturelle est compensée par un éclairage pendant l'hiver. Une fumigation de soufre (lampe à soufre Nivola B V, Fluidosoufre) hebdomadaire (de nuit) prévient les risques d'infection par l'oïdium. Dans ces conditions, les plantes atteignent 6-8 feuilles étalées environ cinq semaines après le repotage et sont utilisées à ce stade pour les expérimentations.

1.2 L'agent pathogène *Plasmopara viticola*

Une souche de *Plasmopara viticola* [(Berk. & Curt.) Berl. et de Toni] fournie par l'ancien SRPV (Service Régional de Protection des Végétaux) de Beaune est entretenue par repiquages successifs depuis 2001 sur des plantes herbacées de Marselan. Pour l'entretien de l'agent pathogène et la préparation des plantes infectées, les sporanges de *P. viticola* sont collectés en balayant la surface inférieure des feuilles sporulantes avec un pinceau puis mis en suspension dans de l'eau osmosée. Après comptage à l'aide d'une cellule de Malassez, la concentration de la suspension est ajustée à 10^4 sporanges ml^{-1} . L'inoculation s'effectue sur la surface inférieure des feuilles de vigne à l'aide d'un pulvérisateur manuel et les plantes sont placées dans une chambre humide pendant une nuit à humidité relative saturée puis replacées en serres dans les conditions décrites ci-dessus. Les plantes témoins sont traitées à l'eau dans les mêmes conditions. Après 4-5 jours post inoculation (jpi), les taches d'huile, symptômes caractéristiques de la maladie, apparaissent sur les feuilles infectées. À 8 jpi, lorsque les symptômes sont très marqués, les plantes infectées sont placées une nuit dans une chambre saturée en vapeur d'eau afin de provoquer la sporulation. Les feuilles peuvent alors servir de source d'inoculum.

1.3 Prélèvement des échantillons

Pour toutes les expériences, les feuilles de rang 2 et 3 sous l'apex (sensibles à la maladie) sont prélevées à la fin de la nuit (condition obscurité) ou après 10 heures de lumière (condition lumière). Pour les extractions d'ARN, d'ADN, de sucres solubles, de protéines totales et d'amidon ainsi que pour la coloration au bleu d'aniline, les feuilles sont prélevées à 1, 3, 5 et 7 jours post inoculation (jpi). Pour les autres analyses, les échantillons sont prélevés à 6 ou 7 jpi. Six plantes sont utilisées par condition et trois répétitions biologiques sont effectuées.

Pour certaines analyses, des disques foliaires (diamètre de 4 mm) sont prélevés dans les taches d'huile et les zones adjacentes des feuilles infectées à 6 jpi ainsi que sur des plantes témoins. Ce matériel est congelé immédiatement dans de l'azote liquide et utilisé pour la quantification de l'amidon, l'extraction des ARN et la détection de l'activité invertase comme décrit ci-dessous.

2 Dosage des sucres solubles et de l'amidon

2.1 Analyse des sucres solubles par spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Pour l'extraction des sucres solubles, 475 μl d'acide perchlorique 70 % et 250 μl de maléate 500 mM (standard interne) sont ajoutés à 5 g de feuilles broyées dans l'azote liquide. Après centrifugation à 24 000 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant est récupéré puis 500 μl d'hydrogénocarbonate de potassium (KHCO_3) saturé sont ajoutés afin d'ajuster le pH à 5 - 5,2. Après une deuxième centrifugation (10 min à 20 000 g), le surnageant est récupéré puis lyophilisé. 200 μl d'eau lourde sont ensuite additionnés et les échantillons sont centrifugés (5 min à 10 000 g). Le surnageant est repris puis congelé à -20°C. Après ajustement du pH à 7, les échantillons ont ensuite été analysés à l'aide du spectromètre RMN (model AMX 400, Bruker Billerica MA) au Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale (Richard Bligny, CEA Grenoble) dans les conditions préalablement décrites par Jobic *et al.* (2007).

2.2 Dosage des sucres solubles par HPAEC-PAD

Les feuilles sont broyées dans l'azote liquide puis lyophilisées. 1 ml d'éthanol 80 % est ajouté à 50 mg de lyophilisat. Les échantillons sont placés dans un bain ultrasonique à 80°C durant 30 min puis centrifugés pendant 10 min à 15 000 g . Le glucose, fructose, saccharose et tréhalose sont quantifiés par HPAEC-PAD (chromatographie d'échange d'anions couplée à une détection ampérométrique pulsée; ICS 3000 Dionex Instrument, Dionex Corp.) par l'UPSP PROXISS (G. Alcaraz, Agrosup Dijon).

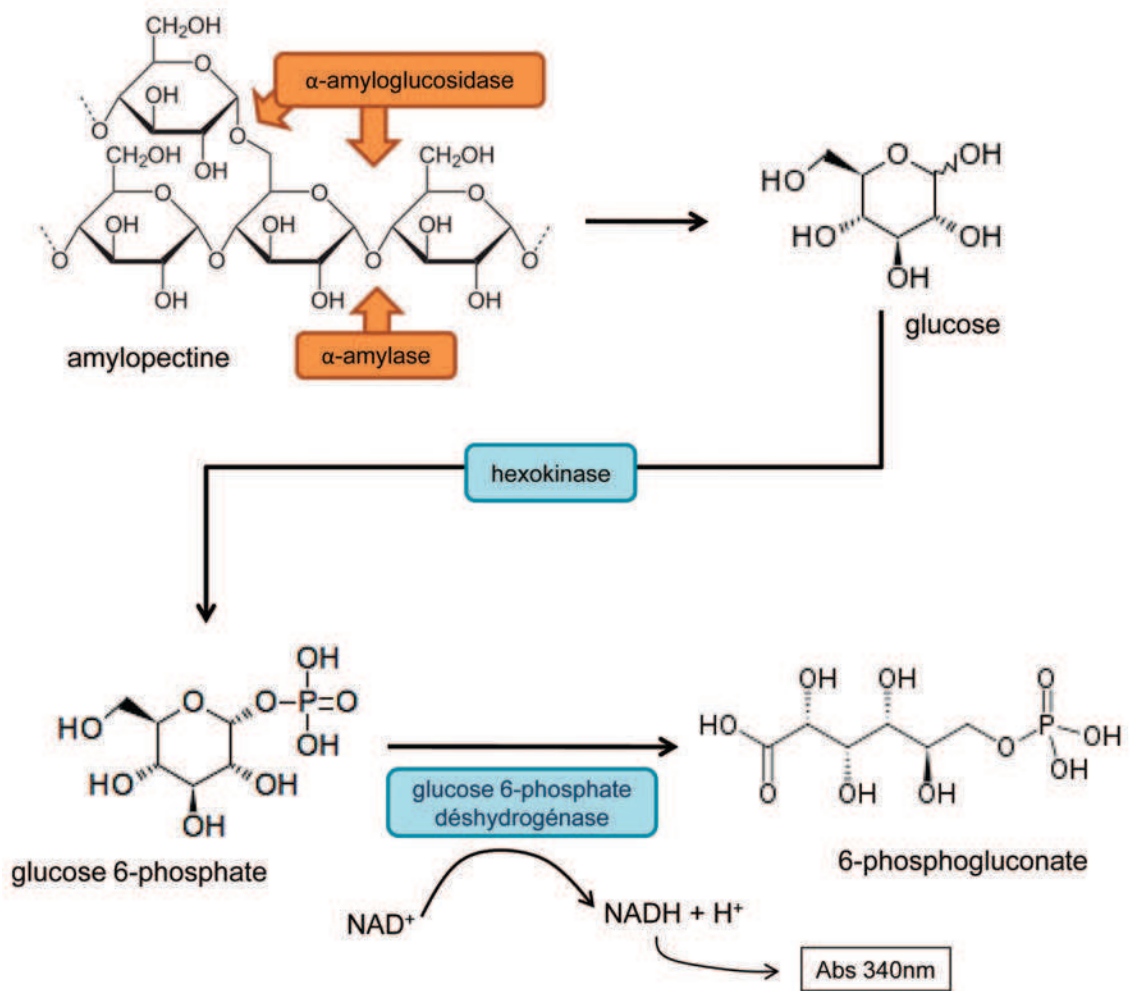


FIGURE 15 – **Quantification de l'amidon.** Après extraction, l'amidon est dégradé par l' α -amylglucosidase et l' α -amylase. Le glucose libéré est phosphorylé puis oxydé en 6-phosphogluconate. Le NADH produit au cours de la dernière réaction enzymatique est détecté par spectrophotométrie.

2.3 Mise en évidence de l'amidon dans les feuilles

Les feuilles sont décolorées dans de l'éthanol absolu pendant 10 min à 90°C, rincées avec de l'eau ultrapure et incubées dans une solution de lugol diluée [1/16 (v/v), Sigma Aldrich] pendant 10 min. Après rinçage, les feuilles sont photographiées immédiatement. L'amidon est coloré en bleu-violet.

2.4 Quantification de l'amidon

Afin de déterminer la quantité d'amidon dans les feuilles, celui-ci est extrait, dégradé et le glucose libéré lors de la réaction est dosé.

Extraction de l'amidon

L'extraction de l'amidon est réalisée selon les protocoles de Smith et Zeeman (2006) et d'Eimert *et al.* (1995) modifiés. 5 g de feuilles sont broyées dans l'azote liquide puis mélangés avec 5 ml d'éthanol 70 %. Chaque échantillon est chauffé pendant 3 min à 98°C puis centrifugé (3 min, 3 000 g). Le culot est repris dans 5 ml d'éthanol 70 % et l'extraction est répétée trois fois pour obtenir un culot décoloré qui est repris au final dans 5 ml de KOH 1M. Le mélange est incubé à 98°C pendant 1h. Après refroidissement, le mélange est neutralisé par 500 μ l d'acide phosphorique (H_3PO_4 1M).

Dégradation de l'amidon

De l'acétate de sodium 200 mM pH 5,5 est ajouté à chaque échantillon neutralisé (1/1, v/v). 12 u.ml⁻¹ d' α -amylglucosidase et 1 u.ml⁻¹ d' α -amylase sont ajoutées pour cataboliser l'amidon (Figure 15). Pour chaque échantillon, deux tubes sont incubés avec les enzymes, deux autres sont incubés avec le même volume d'eau ultra-pure (les blancs). Après 4h d'incubation à 37°C, les échantillons sont chauffés à 98°C pendant 4 min pour arrêter les réactions enzymatiques.

Dosage du glucose

Le glucose libéré est phosphorylé puis oxydé en 6-phosphogluconate. Le NADH produit au cours de la dernière réaction enzymatique est détecté par spectrophotométrie [Figure 15, Smith et Zeeman (2006)]. Pour cela, 50 μ l de l'échantillon sont placés dans 10 vol de tampon (Hepes-KOH 10 mM pH 7,5; ATP 0,5 mM; NAD⁺ 1 mM; MgCl₂ 4 mM). L'absorbance est mesurée à 340 nm (niveau de base) puis 2 u.ml⁻¹ d'hexokinase et 2 u.ml⁻¹ de glucose 6-phosphate déshydrogénase sont ajoutées pour initier la réaction enzymatique. L'absorbance est mesurée à 340 nm pendant 10 min, jusqu'à ce que la DO_{340nm} atteigne un plateau. La différence entre les valeurs d'absorption mesurées avant (niveau de base) et à la fin de la réaction permet de calculer la concentration en glucose.

3 Mesures des activités enzymatiques

3.1 Extraction des protéines totales

Les protéines sont extraites selon Dancer *et al.* (1990). 1 ml de tampon d'extraction [Hepes-KOH 500 mM pH 7,2; MgCl₂ 5 mM; acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 1 mM; acide éthylèneglycoltétraacétique (EGTA) 1 mM; dithiothréitol (DTT) 1 mM; Triton X-100 0.1 % (v/v); phénylméthanesulfonylfluoride (PMSF) 1 mM; polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) 2,5 % (p/v)] est ajouté à 100 mg de feuilles préalablement broyées dans l'azote liquide. Après centrifugation (15 min, 14 000 *g*, 4°C), le surnageant contenant la fraction soluble de protéines est transféré dans un nouveau tube et le culot contenant la fraction insoluble est repris dans 1 ml de tampon d'extraction. La concentration protéique dans la fraction soluble est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). Les activités enzymatiques sont analysées immédiatement dans les deux fractions.

3.2 Mesure de l'activité invertase

D'après Dancer *et al.* (1990), l'activité des invertases peut être mesurée à partir des fractions soluble et insoluble de l'extrait protéique. Pour la détection de l'activité des invertases neutres, chaque fraction est placée dans 20 vol de tampon Hepes-KOH 20 mM pH 7,5 contenant 100 mM de saccharose comme substrat. Pour les invertases acides, les extraits sont incubés dans 20 vol d'une solution d'acétate de sodium 100 mM pH 4,5 contenant 100 mM de saccharose comme substrat. Après 3h d'incubation à 25°C, les tubes sont chauffés à 98°C pendant 4 min afin d'arrêter toute activité enzymatique. Les blancs sont préparés de la même façon mais chauffés immédiatement. Les activités invertases sont mesurées en dosant le glucose libéré (cf. paragraphe 2.4).

3.3 Mesure de l'activité tréhalase

L'activité tréhalase est quantifiée dans la fraction soluble de l'extrait protéique selon le protocole décrit par Brodmann *et al.* (2002). 10 μ l de l'extrait sont incubés dans 200 μ l de tampon (Hepes-KOH 20 mM; pH 6,3) contenant du tréhalose 10 mM comme substrat. Après 60 min à 37°C, les échantillons sont chauffés à 98°C pendant 4 min afin d'arrêter toute activité enzymatique. L'activité de la tréhalase est mesurée en dosant le glucose libéré (cf. paragraphe 2.4)

3.4 Extraction des protéines chloroplastiques

10 g de feuilles sont broyées avec du sable de fontainebleau dans 100 ml de tampon d'extraction préparé extemporanément [Hepes-KOH 50 mM pH 8,0; sorbitol 330 mM; acide ascorbique 5 mM; cystéine 5 mM; EDTA 2 mM; PMSF 1 mM; PVPP 2,5 % (p/v)]. Après filtration entre deux couches de Miracloth (mailles à 35 μ m), l'échantillon est centrifugé (200 *g*, 20 min, 4°C). Le surnageant est transféré dans

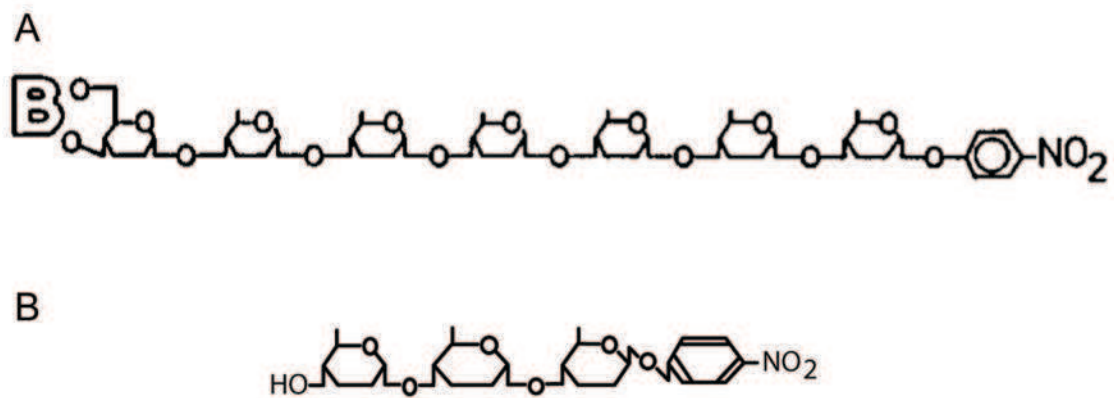


FIGURE 16 – Substrats spécifiques des amylases utilisés dans les kits de Megazyme. A : *p*-nitrophényl maltoheptaoside dont la fonction non-réductrice a été protégée (protection représentée par le “B”), B : *p*-nitrophényl- β -D-maltotrioside. D’après Megazyme.

un nouveau tube et centrifugé (6 000 g , 25 min, 4°C). Le culot est lavé avec 1 vol de tampon de lavage (Hepes-KOH 50 mM pH 8,0 ; sorbitol 330 mM ; EDTA 2 mM ; PMSF 1 mM), repris dans 1 vol de tampon (Hepes-KOH 10 mM pH 8,0 ; MgCl₂ 5 mM ; PMSF 1 mM), incubé sur glace pendant 10 min et centrifugé (10 000 g , 25 min, 4°C). Les protéines contenues dans le surnageant sont concentrées avec un filtre Microcon (30 kDa, Millipore). La concentration protéique est estimée par la méthode de Bradford (Bradford 1976).

3.5 Mesure de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase

L'activité AGPase est mesurée en direction de la phosphorolyse comme décrit par Tiessen *et al.* (2002). Pour permettre l'activation de l'enzyme, 30 μ l de l'extrait protéique chloroplastique sont au préalable incubés (10 min à 4 °C) dans 200 μ l d'une solution contenant de l'ADP-glucose 1 mM et DTT 5 mM. La réaction débute par l'addition de 50 μ l de cet extrait activé à 350 μ l de tampon de réaction (Hepes-KOH 50 mM pH 7,8 ; MgCl₂ 5 mM ; glucose 1,6-bisphosphate 10 μ M ; NAD 0,6 mM ; Na-Pi 2,5 mM ; phosphoglucosmutase 1 u.ml⁻¹ ; glucose 6-phosphate déshydrogénase 2,5 u.ml⁻¹ ; ADP-glucose 1 mM). L'absorbance est mesurée à 340 nm pendant 30 min afin de suivre la formation du NADH. Des témoins sont préparés sans ADP-glucose. L'activité enzymatique mesurée par volume est rapportée à la concentration protéique déterminée auparavant.

3.6 Mesure des activités amylase

Les activités α - et β -amylases des extraits protéiques chloroplastiques sont mesurées en utilisant respectivement les kits "Ceralpha" et "Betamyl-3" (Megazyme) selon les instructions du fabricant en diluant les extraits dans les tampons fournis [1/10 ; (v/v)].

Le mélange réactionnel du kit "Ceralpha" contient le substrat spécifique pour l' α -amylase (le p -nitrophényl maltoheptaoside dont la fonction non-réductrice a été protégée, Figure 16 A) et des concentrations saturantes d'amyloglucosidase et d' α -glucosidase. Lors de la dégradation du substrat par l' α -amylase, l'amyloglucosidase et l' α -glucosidase hydrolysent immédiatement le fragment p -nitrophényl-maltosaccharide pour produire de manière stœchiométrique du glucose et du p -nitrophénol.

Le kit "Betamyl-3" contient le substrat pour la β -amylase, le p -nitrophényl- β -D-maltotrioside (Figure 16 B). Son hydrolyse libère du maltose et du p -nitrophényl- β -D-glucose. Ce dernier est immédiatement clivé par une α -glucosidase qui libère du glucose et du p -nitrophénol.

Le p -nitrophénol libéré lors de ces réactions est quantifié par la mesure de son absorbance à 410 nm. Les activités enzymatiques sont exprimées en unités Ceralpha pour l' α -amylase et en unités Betamyl-3 pour la β -amylase. Une unité d'activité est la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μ M de p -nitrophénol par minute dans les conditions décrites ci-dessus.

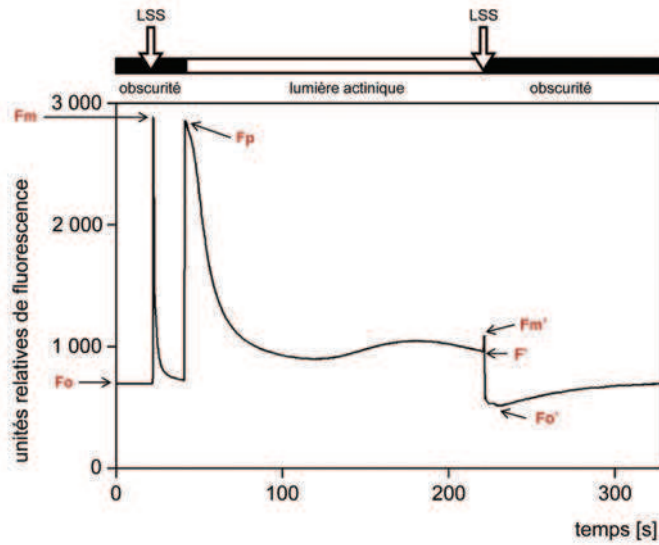


FIGURE 17 – Analyse de la fluorescence chlorophyllienne à l'aide des flashes de lumière sursaturante. Après pré-incubation à l'obscurité, la feuille est éclairée par une lumière très faible modulée (lumière analytique), ce qui permet de déterminer F_0 , la fluorescence de base, puis on applique un flash de lumière sursaturante qui ferme tous les centres PSII, la fluorescence atteint son niveau maximal F_m , puis retombe au niveau F_0 . Ensuite, la feuille est éclairée par la lumière actinique, qui induit un premier maximum de fluorescence F_p , puis la fluorescence reste stable à un niveau F' . Un deuxième flash de lumière sursaturante permet de mesurer la valeur F'_m . LSS : lumière sursaturante.

Tableau 3 – Paramètres de l'activité photosynthétique déterminés à partir des mesures de la fluorescence chlorophyllienne des feuilles.

Paramètre	Fonction	Formule	référence
$\frac{F_v}{F_m}$	rendement quantique maximum pour la photochimie du PSII (mesuré à l'obscurité)	$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$	Kitajima et Butler (1975)
Φ_{PSII}	rendement quantique opérationnel du PSII (mesuré à la lumière)	$\Phi_{\text{PSII}} = \frac{F'_m - F'}{F'_m}$	Genty <i>et al.</i> (1989)
q_P	quenching photochimique concentration relative des centres ouverts	$q_P = \frac{F'_m - F'}{F'_m - F'_0}$	Schreiber <i>et al.</i> (1986) van Kooten et Snel (1990)
q_{NP}	quenching non-photochimique	$q_{\text{NP}} = \frac{F_m - F'_m}{F'_m}$	van Kooten et Snel (1990)

4 Activité photosynthétique

4.1 Mesure de la fluorescence chlorophyllienne

La fluorescence chlorophyllienne est mesurée sur feuilles non détachées des plantes à l'aide d'un fluorimètre IMAGING-PAM (Walz). Les mesures sont effectuées à la surface supérieure de la partie centrale des feuilles après pré-incubation à l'obscurité pendant 30 min. Les valeurs déterminées au cours de ces analyses (Figure 17) sont utilisées afin de calculer plusieurs paramètres photosynthétiques (Tableau 3).

Pour chaque image, les moyennes des valeurs des paramètres déterminés sont utilisées. Les images de $\frac{Fv}{Fm}$ sont présentées à l'aide d'un code "couleur" entre 0,000 (noir) et 1,000 (mauve).

4.2 Dosage des chlorophylles

3 g de feuilles sont broyées avec du sable de fontainebleau et du carbonate de calcium dans 20 ml de méthanol 95 % (v/v). Les échantillons sont filtrés sur filtre plissé puis analysés par spectrophotométrie à 645 nm et 663 nm. Les taux de chlorophylle a, chlorophylle b et chlorophylles totales sont déterminés selon la formule de Wellburn et Lichtenthaler (1984).

5 Méthodes moléculaires

5.1 Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée selon le protocole de Reid *et al.* (2006). 500 mg de feuilles sont broyées dans l'azote liquide et placés dans 5 ml de tampon d'extraction préchauffé à 65°C [Tris-HCl 300 mM pH 8,0 ; EDTA 25 mM ; NaCl 2M ; cetyltriméthylammoniumbromide (CTAB) 2 % (p/v) ; PVPP 2 % (p/v) ; spermidine trihydrochloride 0,05 % (p/v) ; β -mercaptoéthanol 2 % (v/v)]. Après une incubation (10 min à 65°C) sous forte agitation, le mélange est extrait à deux reprises avec 5 ml de chloroforme/ alcool isoamylique (24/1 ; v/v) et centrifugé (15 min, 3 200 g, 4°C). La phase aqueuse supérieure contenant les acides nucléiques est transférée dans un nouveau tube et centrifugée (20 min, 24 000 g, 4°C) afin d'éliminer tout matériel insoluble restant. Pour permettre la précipitation des acides nucléiques, 0,1 vol d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et 0,6 vol d'isopropanol sont ajoutés au surnageant et l'échantillon est placé à -80°C pendant 30 min. Après centrifugation (3 200 g, 30 min à 4°C), le culot est repris dans 1 ml de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM). Les ARN totaux sont sélectivement précipités une nuit à 4°C par addition de 0,3 vol de chlorure de lithium 10 M. Après centrifugation (30 min, 20 000 g, 4°C), le culot est lavé à l'éthanol 70 %, séché puis repris dans 50 μ l d'eau DEPC (diéthyl pyrocarbonate). Les traces éventuelles d'ADN dans les échantillons sont éliminées en effectuant un traitement DNase à l'aide du kit "DNase1"

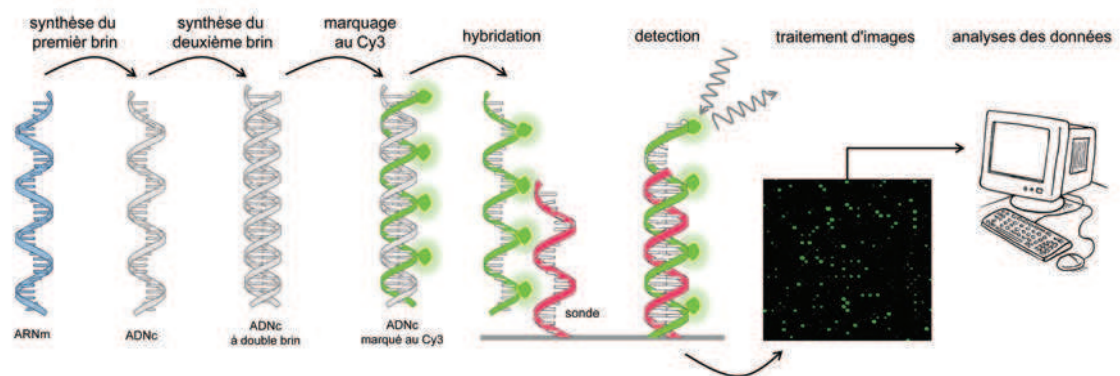


FIGURE 18 – Schéma de la préparation des échantillons pour une analyse microarray. Le premier et le deuxième brin d'ADNc sont synthétisés à partir des ARNm. Après marquage des ADNc au Cy3TM, les échantillons sont hybridés avec les sondes fixées sur la lame de microarray. La fluorescence détectée pour chaque sonde traduit la quantité de transcrite du gène correspondant. Les données d'expression sont obtenues après la détection de la fluorescence à l'aide d'un analyse d'image bioinformatique.

(Sigma Aldrich) selon les instructions du fournisseur. Les ARN sont utilisés pour des analyses d'expression des gènes par microarrays et par qRT-PCR.

5.2 Contrôle de la quantité et de la qualité des ARN totaux

La concentration et la pureté des ARN totaux sont déterminées par spectrophotométrie (Nanodrop 1000, Thermo Scientific). La mesure de l'absorbance à 260 nm permet de quantifier les ARN et le calcul des ratio 260nm/280nm ($>1,9$) et 260nm/230nm ($>1,8$) permet d'estimer la contamination en protéines et en composés organiques, respectivement. Pour l'analyse microarray, la qualité des ARN est vérifiée en utilisant un bioanalyseur Agilent 2100 équipé d'une puce "RNA Nano LabChip" (Agilent Technologies). Cette analyse permet notamment une évaluation non biaisée de l'intégrité des ARN totaux par le calcul du rapport des ARN 28S/18S. Pour les analyses par qRT-PCR, la qualité des ARN est vérifiée en effectuant une électrophorèse en conditions non dénaturantes sur gel d'agarose (2 %) dans du tampon TAE (Tris-HCl 20 mM; EDTA 0,5 mM; acétate de sodium 2,5 mM). Après 10 min de coloration dans un bain de bromure d'éthidium (0,2 %), les ARN sont visualisés sous UV dans l'appareil Molecular Imager GelDocTMXR (BioRad).

5.3 Microarray

Description de la puce

L'analyse microarray a été effectuée au Centre de génomique fonctionnelle à l'Université de Vérone (Italie) en utilisant la puce NimbleGen "grape whole genome Microarray" [(12 X 135K) Roche NimbleGen]. Celle-ci est basée sur le génome 12x de la vigne obtenu à partir d'un génotype quasi-homozygote (97 %) de Pinot noir [PN 40024; Jaillon *et al.* (2007)]. Elle comporte 12 chambres indépendantes permettant d'analyser 12 échantillons simultanément. Dans chaque chambre, 29 582 transcrits putatifs sont représentés par 4 sondes (oligonucléotides de 60 mers) à raison d'un replicat technique. Ils sont distribués de façon aléatoire dans la chambre.

Préparation et hybridation des échantillons

Les ARNm extraits de feuilles témoins ou infectées par *P. viticola* (7 jpi, à l'obscurité) sont utilisés pour l'analyse microarray. Toutes les étapes et les protocoles utilisés pour la préparation et l'hybridation des échantillons sur la lame microarray sont détaillés sur le site de Nimblegen (<http://www.nimblegen.com>; NimbleGen array user guide). Brièvement (Figure 18), les premiers et deuxièmes brins d'ADNc sont synthétisés à partir de 10 μ g d'ARN totaux en utilisant le kit "Superscript Double-Strand cDNA Synthesis Kit" d'Invitrogen (Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur. Après un traitement RNase et une étape de purification, la qualité et la quantité des ADNc sont vérifiées à l'aide du Bioanalyseur "Agilent 2100" et du Nanodrop (cf. paragraphe 5.2) Les ADNc servent alors de matrice pour la synthèse des ADNc marqués au fluorochrome cyanine 3 (Cy3TM) en

Tableau 4 – Caractéristiques des gènes étudiés en qRT-PCR

Nom de l'enzyme	annotation du gène chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	amorces 5'-3'	NCBI accession
AGPase	APL1 (ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE LARGE SUBUNIT 1) glucose-1-phosphate adenylyltransferase	GCTGATATCACCAATTTCTTGTCTGTATCTACTTCCATTGCCT	XM_002281033.1
α -amylase	AMY1 (ALPHA-AMYLASE-LIKE) alpha-amylase	TCCATCCATATCTATGACCAC CAAGTTTGAAGGTTGAAGGT	XM_002285177.1
β -amylase	BAM4 (BETA-AMYLASE 4) beta-amylase/ catalytic/ cation binding	TACCATACACTATCACACCC CATAATCCAGCCTTATCAAACC	XM_002265662.1
amidon synthétase soluble	SSI1 (SUPPRESSOR OF SALICYLIC ACID INSENSITIVITY 1) starch synthase/ transferase	TTACCTCTGAAATCAGCACCA TCCACAAAATACCCAGTCTACAC	XM_002277336.1
saccharose-phosphate synthétase	ATSPS3F (sucrose phosphate synthase 3F) sucrose-phosphate synthase/ transferase	AGTTCCAAACGAAAATTCCTCC ACCACATATTTAACCTGACCAC	XM_002271362.1
tréhalase	TRE1 (TREHALASE 1) alpha,alpha-trehalase/ trehalase	TAACTCGGATGCTTCTGTGG ATTGTGCTTGTGTCTTGTAGG	XM_002263662.1
cell wall invertase	ATBFRUCT1 beta-fructofuranosidase/ hydrolase	CGCTGGACTAAAGCACAAACA CAGACCCCTTATCTGGGACA	XM_002279752.1
tréhalose 6-phosphate synthétase	ATTPS1 (TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE) alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (UDP-forming)	TGTTGACGTTGTCCAGGGTA CATCTCATCCTTCCCCAGA	XM_002285596.1

utilisant le kit “NimbleGen One-Color DNA Labeling”, selon les recommandations du fabricant. Les ADNc marqués sont ensuite hybridés sur la lame microarray, à 42°C durant 18 h, à l’aide du système d’hybridation de NimbleGen “NimbleGen Hybridization System”.

Détection et analyse d’images

Après trois étapes de lavage dans des tampons spécifiques (NimbleGen Wash Buffer Kit), la lame est scannée pour mesurer l’intensité de fluorescence [Axon GenePix 4400A Microarray scanner (Molecular Devices), λ_{ex} 550 nm, λ_{em} 570 nm]. L’analyse des images est réalisée à l’aide du logiciel NimbleScan (Roche NimbleGen). Après séparation des 12 images obtenues pour la puce (une par chambre), une grille est posée sur chaque image afin d’identifier la position de chaque sonde sur l’image. Des analyses préliminaires permettent d’évaluer la qualité des données à partir de la qualité de l’image, puis l’intensité de la fluorescence de chaque sonde est listée par le logiciel. Ces données brutes sont ensuite traitées à l’aide du “Robust Multi-Array Algorithm” (RMA). Après soustraction du bruit de fond, les données sont normalisées sur la fluorescence globale par la normalisation des quantiles. Un modèle linéaire permet de traduire les données normalisées de fluorescence pour chaque sonde en données brutes d’expression de gènes.

Analyse statistique

Les données d’expression sont ensuite analysées afin d’identifier les gènes réprimés (facteur d’activation $<0,5$) ou induits (facteur d’activation >2) dans les feuilles infectées par rapport aux feuilles témoins. Le facteur d’activation (ratio d’expression entre feuilles infectées et témoins) est calculé pour les trois répétitions biologiques et un t-test de Student est effectué (two class-unpaired test ; $p < 0,05$). Les données sont également analysées par la méthode SAM (“Statistical Analysis of Microarrays”) à l’aide du logiciel “SAM Version 3.09c” (Université de Stanford). Les facteurs d’activation des gènes sont comparés aux écart-types trouvés entre les répétitions biologiques. Pour chaque gène, une valeur est attribuée sur la base de ces analyses et un seuil est défini pour estimer le pourcentage de faux positifs [False Discovery Rate ; FDR $< 5\%$ Tusher *et al.* (2001)]. La liste de gènes obtenue par l’analyse SAM est utilisée pour exclure des gènes trouvés différentiellement exprimés lors du t-test.

5.4 qRT-PCR

Détermination et validation des amorces

Pour chaque gène étudié, le couple d’amorces (Tableau 4) est déterminé en utilisant le logiciel PerlPrimer (Marshall, 2004) à partir des séquences nucléotidiques de *Vitis vinifera* cv. Pinot noir (Jaillon *et al.*, 2007) disponibles sur le site du Génoscope (<http://www.genoscope.cns.fr/>). Les critères pour le choix des amorces sont (i) une taille d’environ 20 paires de bases, (ii) une température de fusion d’environ 60 °C,

Tableau 5 – Caractéristiques des gènes candidats pour la normalisation des qRT-PCRs

Symbole	annotation du gène	fonction suggérée	identifiant NCBI	amorces 5'-3'	taille du produit [pb]	Tm [°C]
<i>ADH2</i>	Alcohol dehydrogenase 2	métabolisme anaérobie	XM_002281263.1	GACCATGTTCTTCCCTGTATTCAC GTAGCACCAAGACCTGTAGAG	292	83,47
<i>39SRP</i>	39S ribosomal mitochondrial L41-A	élément de la protéine ribosome large subunit (39S)	XM_002285709.1	GACTGACTTCAAGCTTAAACC GATATAACAGGGAATACAGCAC	281	81,93
<i>UBE2</i>	Ubiquitin carrier protein E2 16 kDa proteolipid subunit	dégradation des protéines	XM_002275879.1	CATCCTTCAGGACAAAGTGGT GAGCTTTACAGATATACGAAACCG	299	81,07
<i>VATP16</i>	V-type proton ATPase	transport	XM_002269086.1	CTTCTCCTGTATGGGAGCTG CCATAACAACCTGGFACAATCGAC	112	85,23
<i>60SRP</i>	60S ribosomal protein L18e	élément de la grande sous-unité ribosomique (60S)	XM_002270599.1	ATCTACCTCAAGCTCCTAGTC CAATCTGTCCCTCCTTTTCTT	165	82,39
<i>VPS54</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein 54	interaction des protéines, transport rétrograde	XM_002272141.1	ATTTGTTGGATGGTGATGAG TAATGAAAGGGAGAAGACGA	263	81,11
<i>UQCC</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex chaperone	inconnue	XM_002264785.1	CAAAAGTATGAGGGTATCCGA GTATGCCCAAATCAACACC	250	80,3
<i>SMD3</i>	Small nuclear ribonucleo-protein SmD3	épissage des pré-ARNm	AM435088.2	GCTCTGTTGTTGAAGATGGG GGAAAGCAGTTTGTAGCATCAG	156	82,51
<i>EP1</i>	not annotated (expressed protein)	inconnue	XM_002278976.1	ACATGGGTTCTGGTATAATGG ATAAAGATTGCCCTCTCAGGT	173	81,21
18S rRNA	18S ribosomal RNA	petite sous-unité ribosomique	GQ849399	GCCCTATCAACTTTCGATGG TGGATGTGGTAGCCGTTTCT	109	82,62
<i>ACT1</i>	actin 1	protéine de structure du cytosquelette	XM_002265440.1	CCACCTTGATCTTCATGCTGC CACCTCCCATGCTATCCTTCGTC	295	83,67
<i>EF1-α</i>	EF1-α elongation factor	traduction	XM_002284888.1	AACCAAAAATATCCGGGAGTAAAGA GAACTGGGTGCTTGATAGGC	150	82,7

(iii) une taille du produit d'amplification comprise entre 120 et 150 paires de bases et (iv) un taux de GC entre 40 et 60 %. Les amorces sont comparées aux séquences génomiques par une analyse Blast afin de vérifier leur spécificité. Elles sont également validées par PCR en utilisant 20 ng d'ADN, 200 μ M dNTPs, 500 nM d'amorces sens et antisens, 25 u.ml⁻¹ de taq DNA polymerase et le tampon associé (New England Biolabs) dans un volume final de 20 μ l. Le programme d'amplification est le suivant: 95°C pendant 15 min (activation de l'enzyme et dénaturation initiale); 45 cycles à 95°C pendant 20 s (dénaturation), 60°C pendant 30 s (hybridation), 72°C pendant 30 s (élongation). Les amplicons sont visualisés sur gel d'agarose (2 %), purifiés à l'aide du kit "QIAquick PCR Purification" (Qiagen) et séquencés par la méthode de Sanger (Genoscreen, France).

Reverse transcription

Les ADNc sont synthétisés à partir de 4 μ g des ARN totaux à l'aide du kit "SuperScriptTMIII Reverse Transcriptase" (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur et en utilisant un mélange d'oligo-dT et d'oligo-d(N)₆ (1/1).

Amplification

L'amplification est réalisée à l'aide du kit "ABsoluteTMQPCR SYBR Green ROX Mix" (Thermo Scientific) en utilisant 5 ng d'ADNc et 500 nM des amorces spécifiques. La réaction est effectuée dans un thermocycleur (LightCycler 480, Roche Applied Science) dans les conditions suivantes: 95°C pendant 15 min (activation de la Taq polymérase et dénaturation initiale); 40 cycles à 94°C pendant 20 s (dénaturation), 60°C pendant 30 s (hybridation des amorces), 72°C pendant 30 s (élongation, détection de la fluorescence à la fin de cette phase). Une analyse des courbes de fusion permet de vérifier la spécificité des produits.

Choix et validation des gènes de référence

À partir des données de l'analyse microarray, neuf gènes pouvant servir de contrôle interne sont sélectionnés d'après les critères suivants: (i) expression au-dessus du bruit de fond (intensité de la fluorescence > 1000) (ii) expression stable (facteur d'activation de 1,0) (iii) fonctions différentes afin de diminuer la probabilité d'une co-régulation (Tableau 5). Trois gènes souvent utilisés dans des études d'expression de gènes chez la vigne sont inclus: *ACT1*, *EF1- α* et l'ARNr 18S. Des couples d'amorces spécifiques de ces gènes sont définis (Tableau 5) puis validés comme décrit ci-dessus et utilisés en qRT-PCR dans les conditions décrites ci-dessus. Les échantillons d'ADNc utilisés pour cette étude sont ceux préparés pour les analyses d'expression de gènes réalisées par ailleurs. Les analyses de données sont effectuées à l'aide de trois logiciels couramment utilisés pour évaluer la stabilité de l'expression des gènes de référence.

Genorm (Vandesompele *et al.*, 2002) suppose que les expressions de deux gènes de référence idéaux ne varient pas entre eux dans des conditions différentes, à condition

qu’il n’y ait pas de co-régulation. À partir des valeurs d’expression, le logiciel calcule la variation moyenne du rapport de l’expression d’un gène par rapport à tous les autres et donne une valeur de stabilité (M) à chaque candidat. Cette valeur sera d’autant plus faible que l’expression du gène sera stable.

Le modèle mathématique utilisé par le logiciel Normfinder (Andersen *et al.*, 2004) regroupe les gènes étudiés en plusieurs sous-groupes (ici : “témoin” et “infectée”) et calcule les variations intra- et inter-groupes pour déterminer une valeur de stabilité pour chaque gène. Les gènes considérés comme les plus stables sont ceux qui présentent les variations intra- et inter-groupes les plus faibles.

Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) effectue une analyse statistique basée sur les valeurs de Ct. Les gènes dont la déviation standard est inférieure à 1 sont désignés comme des gènes de référence potentiels. Les données obtenues pour ces gènes sont utilisées pour calculer la moyenne géométrique de leurs valeurs Ct, l’indice “Bestkeeper”. Les valeurs Ct de chaque gène sont ensuite comparées à l’indice “Bestkeeper” afin de calculer le coefficient de corrélation de Pearson et la probabilité associée. Le gène dont l’expression est la plus proche de l’indice “Bestkeeper” est considéré comme le plus stable.

GeNorm, Normfinder et Bestkeeper sont utilisés selon les conditions et restrictions décrites par les auteurs.

Analyses des données

A partir des données de fluorescence, les valeurs Ct sont calculées en utilisant le logiciel LightCycler 480 (Roche Applied Science) et l’efficacité d’amplification est déterminée à l’aide du logiciel LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009). Chaque échantillon est traité en triplicat technique et les moyennes des valeurs de Ct et d’efficacité d’amplification sont utilisées.

Le facteur d’activation Q de l’expression du gène cible est calculé à l’aide de l’efficacité de l’amplification (E) et la valeur Ct obtenues pour les échantillons de feuilles infectées I et témoins T en utilisant les amorces pour le gène cible G et le gène de référence R :

$$Q = \left(\frac{E_{G,I}^{Ct}}{E_{G,T}^{Ct}} \right) / \left(\frac{E_{R,I}^{Ct}}{E_{R,T}^{Ct}} \right).$$

La moyenne géométrique des valeurs Ct obtenues pour les gènes *VATP16* et *60SRP* est utilisée pour la normalisation après avoir validé la stabilité de leur expression dans nos conditions (cf. paragraphe ci-dessus).

5.5 Estimation du développement de *P. viticola* par real time-PCR

Le développement de *P. viticola* dans les feuilles peut être estimé en calculant le coefficient d’infection qui correspond au ratio entre la teneur en ADN du pathogène

Tableau 6 – Amorces spécifiques utilisées pour l'estimation du développement de *P. viticola*.

Nom	amorces 5'-3'	référence
<i>PvACT</i>	GTTCGAGACGTTCAACGTGC CATGATGGTCTGGAACGTGC	Schmidlin <i>et al.</i> (2008)
<i>VvHT5</i>	GTCGCTTGGAAGAAGGAAAG CCTACTTTGTCGACAGATAGACG	Hayes <i>et al.</i> (2010)

et celle de la plante. Après extraction à partir des feuilles infectées, les teneurs en ADN de la plante et du pathogène sont estimées par real time-PCR en utilisant des amorces spécifiques (Tableau 6). Des courbes d'étalonnage de concentrations sont préparées pour l'ADN de la plante (feuilles témoins) et du pathogène (sporangies) afin de pouvoir déterminer la relation entre les valeurs Ct mesurées et la concentration en ADN.

Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN de feuilles témoins ou infectées par *P. viticola* est effectuée d'après le protocole de Porebski *et al.* (1997). 500 mg de feuilles broyées dans l'azote liquide sont mélangés à 5 ml de tampon d'extraction [Tris 100 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; CTAB 2 % (p/v); β -mercaptoéthanol 0,3 % (v/v); PVPP 2,5 % (p/v)] et incubés à 60°C pendant 30 min. 6 ml de chloroforme/ alcool isoamylique (24/1; v/v) sont ajoutés et le mélange est centrifugé à 3 200 g pendant 20 min. Après répétition de l'extraction au chloroforme/alcool isoamylique sur la phase aqueuse, 0,5 vol NaCl 5 M et 2 vol d'éthanol 95 % (-20°C) sont ajoutés à la phase supérieure et le mélange est incubé 1h à -20°C pour permettre la précipitation des acides nucléiques. Après centrifugation à 3 200 g pendant 6 min, le culot est lavé à l'éthanol 70 % (4°C), séché à l'air libre, puis repris dans 300 μ l de tampon TE. 3 μ l de RNase A (10 mg.ml⁻¹; Sigma Aldrich) sont ajoutés et le mélange est incubé à 37°C pendant 30 min. Pour éliminer les protéines résiduelles, 150 μ l de phénol et 150 μ l de chloroforme sont ajoutés au culot. Le mélange est vortexé brièvement puis centrifugé (20 000 g, 15 min, 4°C) et la phase supérieure est transférée dans un nouveau tube. 50 μ l de tampon TE sont ajoutés à la phase phénolique et le mélange est à nouveau centrifugé. La phase aqueuse est récupérée et ajoutée à la première. L'ADN est précipité durant une nuit à -20°C par addition de 0,1 vol d'acétate de sodium 2M et de 2 vol d'éthanol absolu. Après centrifugation à 20 000 g pendant 20 min, le culot est lavé à l'éthanol 70 %, séché et repris dans 100 μ l de tampon TE. La concentration et la pureté de l'ADN sont déterminées par spectrophotométrie (cf. paragraphe 5.2). L'ADN des sporangies récoltés à partir de feuilles sporulantes est extrait suivant le même protocole.

PCR en temps réel

Les amorces utilisées pour l'amplification sont détaillées dans le Tableau 6. La RT-PCR est réalisée à l'aide du kit "ABSoluteTMQPCR SYBR Green ROX Mix"(Thermo Scientific) en utilisant 100 ng d'ADN et 500 nM des amorces spécifiques dans les conditions précédemment décrites (cf. paragraphe 5.4). La seule modification consiste en la détection de la fluorescence à 81°C, après la phase d'élongation, afin de ne détecter que les produits d'amplification spécifiques.

6 Méthodes microscopiques

6.1 Visualisation de *P. viticola* par coloration histochimique au bleu d'aniline

Les disques foliaires (0,5 cm de diamètre) sont fixés et dépigmentés dans du méthanol absolu pendant une nuit à température ambiante puis clarifiés une nuit dans une solution aqueuse d'hydrate de chloral (2,5 %, p/v). Après deux rinçages au tampon phosphate (100 mM, pH 8), les disques sont colorés pendant deux jours à température ambiante dans une solution filtrée de bleu d'aniline (0,05 %; p/v; tampon phosphate 100 mM; pH 8). Les disques sont ensuite montés entre lame et lamelle dans la solution de bleu d'aniline puis la face inférieure est examinée en épifluorescence (microscope DMLB, Leica microsystems) sous filtre UV (λ_{ex} 340 à 380 nm, $\lambda_{\text{ém}}$ 425 nm). Dans ces conditions, les structures de l'oomycète fluorescent en bleu clair.

6.2 Microscopie électronique à transmission

Fixation-déshydratation

Des fragments foliaires (2 mm x 5 mm environ) sont prélevés à 4°C dans du tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,2) à partir de feuilles issues de plantes témoins ou infectées (6 jpi), à l'obscurité. Les échantillons sont fixés 1h sous vide dans des piluliers individuels contenant du glutaraldéhyde à 2,5 % (v/v) préparé dans du tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,2; 4°C), puis la nuit à 4°C. Ils sont rincés 3 fois 1h dans du tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,2; 4°C) et post-fixés pendant 1h au tétraoxyde d'osmium 1 % (v/v, dans du tampon cacodylate 0,2 M; pH 7,2; 4°C). Les échantillons sont alors déshydratés à température ambiante dans des bains successifs d'éthanol [(30 % - 100 %, v/v), 30 minutes dans chaque bain], puis deux bains d'oxyde de propylène pendant 30 minutes.

Inclusion en résine

Les échantillons sont placés 2h à température ambiante dans des bains successifs de résine (Résine Epon 812, Merck) / oxyde de propylène [(1-2; 1-1; 2-1 (v/v)], puis une nuit dans un bain de résine pure avant d'être inclus dans de la résine (polymérisation à 60°C durant 48 h).

Réalisation des coupes, contraste et observations

Des coupes transversales ultrafines (90 nm d'épaisseur) sont réalisées à l'aide d'un ultra-microtome (Reichert ultracut E, Leica) équipé d'un diamant "ultra" (2 mm, 45°) et collectées sur des grilles de cuivre (300 mesh copper, Pelanne Instruments). Avant l'observation, les échantillons sont doublement contrastés avec l'acétate d'uranyle (2,5 %, p/v) et le citrate de plomb (2,5 %, p/v). Les grilles séchées

sont observées au microscope électronique à transmission (Hitachi 600, 75 kV). Pour chaque traitement, au moins 5 blocs sont étudiés, les échantillons provenant de 3 plantes distinctes.

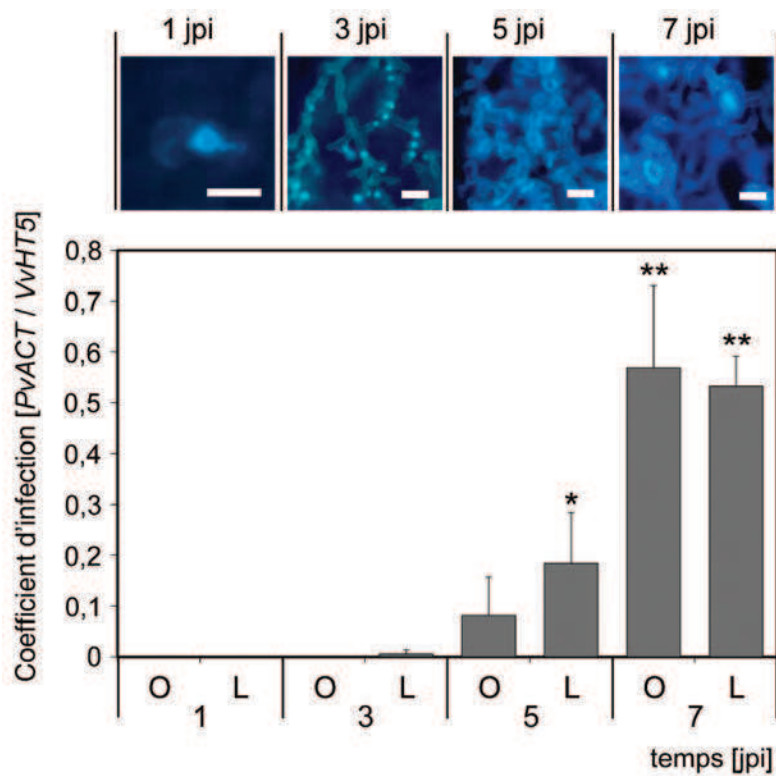


FIGURE 19 – Développement de *P. viticola* dans des feuilles de *V. vinifera* cv. **Marselan**. Observation de feuilles infectées en microscopie à fluorescence après coloration au bleu d'aniline et évolution du coefficient d'infection (1 à 7 jpi). Les images présentent les différents stades de développement de *P. viticola*. Les barres blanches correspondent à 10 μ m. Les images sont représentatives de trois répétitions biologiques. Le coefficient d'infection représente le ratio entre la teneur en ADN d'origine pathogène (*PvACT*) et végétale (*VvHT5*) quantifiée par RT-PCR. Les échantillons foliaires ont été prélevés à la lumière (L) et à l'obscurité (O). Les données correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques \pm écart-type. Les astérisques (*) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

Résultats

1 Développement de *P. viticola* dans les feuilles

Le développement de *P. viticola* dans les feuilles de vigne a été suivi par des observations en microscopie à fluorescence après coloration au bleu d'aniline ainsi que par l'évolution du coefficient d'infection. Ce dernier correspond au ratio entre la teneur en ADN du pathogène et celle de la plante déterminées après RT-PCR sur l'ADN génomique avec les amorces *VvHT5* (plante) et *PvACT* (pathogène). La cinétique de l'infection dans nos conditions correspond à ce qui a été décrit auparavant (Trouvelot *et al.*, 2008). À 1 jpi, des zoospores ont atteint les stomates, s'enkystent et certaines ont initié la germination (Figure 19). Le coefficient d'infection est nul jusqu'à 3 jpi car l'ADN de l'oomycète n'a pu être détecté avant. À ce stade, les hyphes en développement forment des haustoria en contact avec les cellules du mésophylle de l'hôte. Ensuite, les hyphes progressent dans les tissus et se ramifient. Le coefficient d'infection augmente significativement à partir de 5 jpi, quand le pathogène a bien colonisé les tissus foliaires. Ce stade correspond à l'apparition des symptômes "taches d'huile" à la face supérieure de la feuille. À 7 jpi, le coefficient d'infection est maximal et les symptômes sont bien visibles sur toute la feuille. À ce stade, l'oomycète est présent dans les chambres sous-stomatiques et est prêt à sporuler si les conditions d'humidité le permettent.

2 Accumulation de l'amidon au niveau des taches d'huile

Une coloration au lugol a permis de visualiser l'amidon dans les feuilles témoins et infectées par *P. viticola*. À 7 jpi, les feuilles témoins prélevées à l'obscurité ne montrent pas de coloration (Figure 20 A), contrairement aux feuilles infectées qui présentent une coloration bleue - violette dans les zones correspondant aux symptômes "taches d'huile" (Figure 20 B). À la lumière, l'amidon est présent de manière homogène au niveau des feuilles témoins, mais il semble préférentiellement accumulé au niveau des "taches d'huiles" dans les feuilles infectées (données non présentées).

Des coupes ultrafines ont été réalisées à partir de feuilles témoins et infectées par *P. viticola* (6 jpi, obscurité) puis observées en microscopie électronique à transmission. Dans les cellules du parenchyme lacuneux des feuilles témoins, les chloroplastes semblent contenir peu d'amidon localisé dans quelques grains peu volumineux (Figure 20 C). Dans les feuilles infectées, les chloroplastes contiennent des grains d'amidon anormalement volumineux mais cela ne semble toutefois pas altérer leur structure (Figure 20 D).

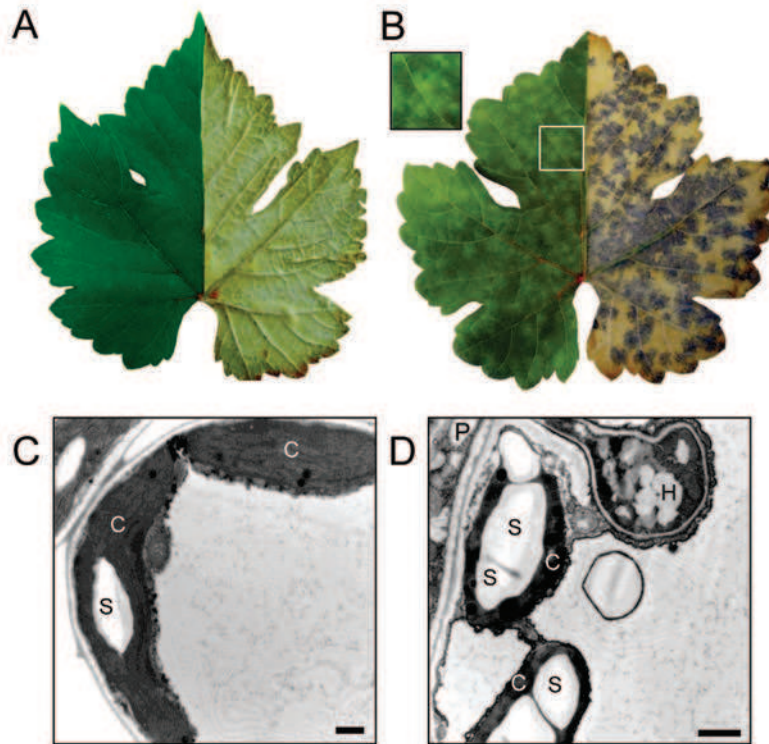


FIGURE 20 – Observation de l'amidon dans les feuilles de vigne témoins et infectées par *P. viticola*, à l'obscurité. (A) et (B): la partie gauche de chaque image correspond à une photo d'une feuille témoin (A) et infectée (B) à 7 jpi. La partie droite représente la même feuille après clarification et coloration au lugol. L'encart représente le grossissement d'une "tache d'huile". (C) et (D): images de cellules du parenchyme lacuneux dans des feuilles témoins (C) et infectées (D) à 7 jpi, observées en microscopie électronique à transmission. H : haustorium, P : hyphes de *P. viticola*, C : chloroplastes, S : grains d'amidon. Les barres noires correspondent à 1 μm .

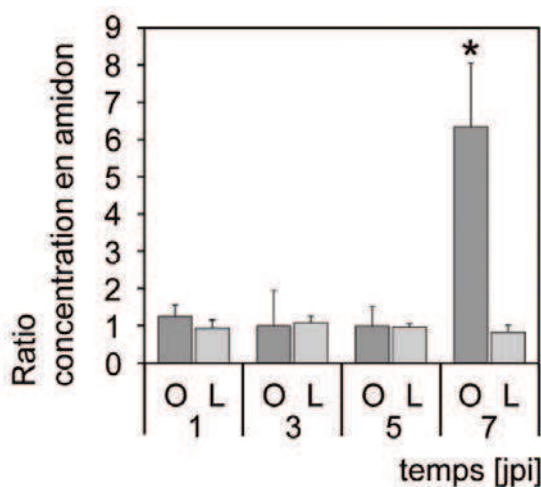


FIGURE 21 – Ratio entre la teneur en amidon des feuilles infectées par *P. viticola* (1 à 7 jpi) et celle des feuilles témoins. Les échantillons ont été prélevés à la lumière (L) et à l'obscurité (O). Les teneurs en amidon ont été déterminées par mesure du glucose libéré après une digestion enzymatique. Les données correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques \pm écart-types. Les astérisques (*) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

La teneur en amidon de ces feuilles a été déterminée par dosage du glucose libéré après dégradation enzymatique. Pour les feuilles témoins, les teneurs sont respectivement de 13 et 0,8 mg glucose.g⁻¹ PF à la lumière et à l'obscurité. De 1 à 5 jpi, les teneurs sont similaires dans les feuilles infectées, d'où une valeur d'environ 1 pour un ratio des teneurs des feuilles témoins et infectées (Figure 21). Cependant, à 7 jpi et à l'obscurité, les teneurs sont environ 6 fois plus importantes dans les feuilles infectées (Figure 21).

3 Analyse transcriptomique au niveau des feuilles infectées

Une analyse transcriptomique a été effectuée avec la puce NimbleGen “grape whole genome Microarray” afin d'évaluer l'effet de l'infection sur l'expression génique des feuilles de vigne (7 jpi, à l'obscurité). Parmi les 30 000 gènes étudiés, environ 3 100 ont une expression modifiée par l'infection (soit 11 %, dont 5 % induits et 6 % réprimés, Figure 22). Parmi eux, 5,4 % sont liés au métabolisme des glucides (incluant des gènes impliqués dans le métabolisme de l'amidon et des sucres solubles) et 0,6 % sont liés à la photosynthèse (Figure 23, Tableau 7).

L'expression des gènes codant pour des isoformes de l'AGPase (ADP-glucose pyrophosphorylase), amidon-synthétase soluble, PWD (phosphoglucan, water-dikinase), β -amylase, SPS (saccharose-phosphate synthétase) et TPS (tréhalose phosphate synthétase) est réprimée, alors qu'elle est induite pour les gènes codant pour une α -amylase, invertase et tréhalase (Tableau 7). Parmi les gènes dont l'expression est réprimée, on en trouve également certains impliqués dans la photosynthèse, comme ceux codant pour la ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase / decarboxylase (Rubisco) large subunit, des chlorophylle synthétases et une chlorophylle a / b binding protein. Enfin, l'expression d'un gène codant pour la chlorophyllase est induite (Tableau 7).

4 Validation des gènes de référence

Afin d'étudier par qRT-PCR les variations de l'expression de gènes dans les feuilles de vigne infectées par *P. viticola*, nous avons préalablement identifié des gènes de référence. Des gènes candidats ont été choisis à partir des données de l'analyse transcriptomique décrite précédemment. Neuf ont été retenus sur la base d'une expression supérieure au niveau de base, un ratio d'expression de 1 entre feuilles infectées et témoins (supposant une expression égale entre les deux conditions) et leur appartenance à des groupes fonctionnels différents. De plus, des gènes fréquemment utilisés pour des études sur la vigne ont été inclus: *EF-1 α* (codant pour un facteur d'élongation), *ACT1* (codant pour l'actine) et l'ARN ribosomique 18S (Tableau 5). Lors de la validation de la spécificité des amorces, le gène *EF-1 α* a été exclu de cette étude. En effet, l'utilisation du couple d'amorces réalisées précédemment pour des études sur le cépage Cabernet Sauvignon, résulte en un deuxième produit

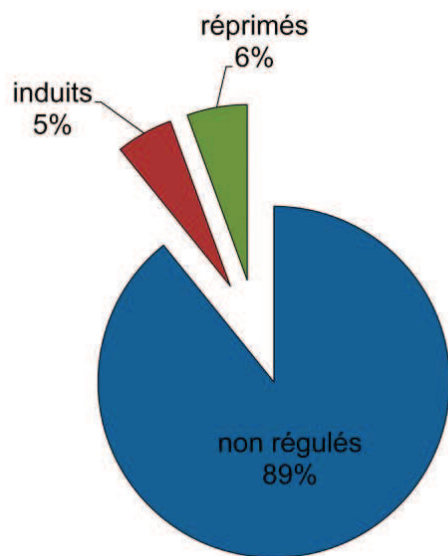


FIGURE 22 – Pourcentages des gènes régulés par l'infection des feuilles de la vigne par *P. viticola*. Données représentant les gènes réprimés ou induits parmi 30 000 gènes de vigne étudiés par analyse transcriptomique.

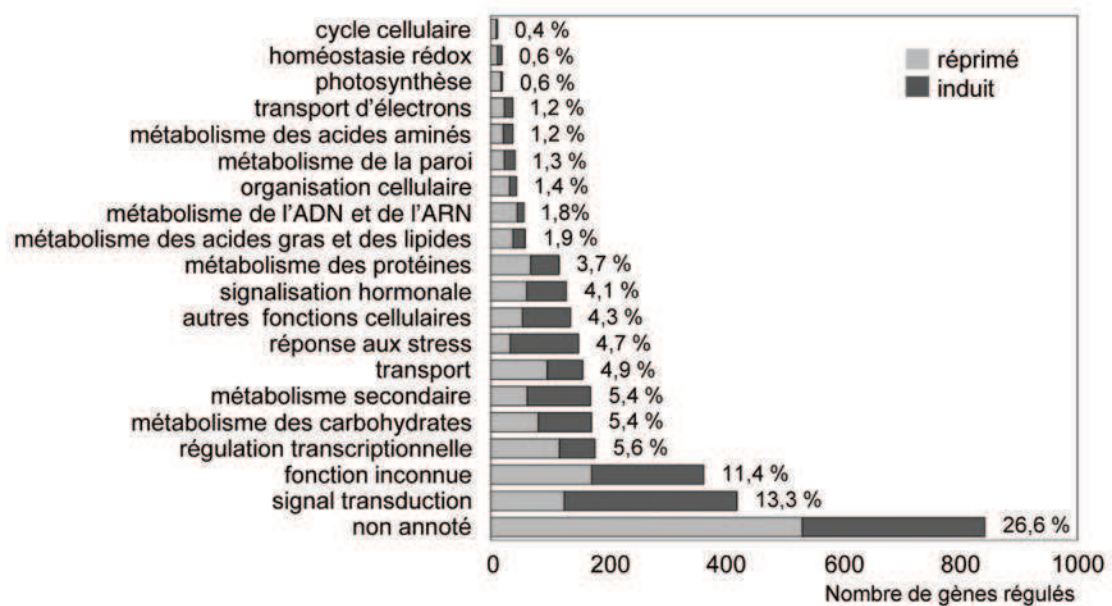


FIGURE 23 – Catégories fonctionnelles des gènes dont l'expression varie après infection des feuilles de vigne par *P. viticola*. Une analyse transcriptomique à l'aide de la puce NimbleGen "grape whole genome Microarray" effectuée à partir de feuilles infectées (7jpi) et témoins a permis d'identifier des gènes réprimés (barres grises) et induits (barres noires). Les valeurs indiquées à côté des barres correspondent au pourcentage de gènes régulés dans la catégorie fonctionnelle par rapport à l'ensemble des gènes régulés.

Tableau 7 – Gènes impliqués dans le métabolisme des glucides et la photosynthèse et dont l'expression est modifiée dans des feuilles de vigne infectées par *P. viticola*.

identifiant NCBI	annotation	facteur d'activation
XM_002277244.1	PSI type II chlorophyll a/b-binding protein	0,2
XM_002285596.1	α,α -trehalose-phosphate synthase	0,23
XM_002271784.1	Pullulanase	0,24
XM_002271362.1	Sucrose-phosphate synthase	0,25
AM424156.2	Phosphoglucan, water dikinase	0,25
XM_002273572.1	Granule-bound starch synthase	0,27
XM_002269194.1	Fructose-1,6-bisphosphatase	0,29
XM_002264472.1	Photosystem II reaction center W protein, chloroplastic	0,31
XM_002267433.1	Ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	0,31
XM_002281033.1	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase (large subunit 1) (AGPase)	0,32
XM_002277336.1	Soluble starch synthase	0,32
XM_002264197.1	Photosystem I reaction center subunit V, chloroplastic	0,36
XM_002263758.1	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic	0,43
XM_002265928.1	Starch debranching enzyme	0,44
XM_002263235.1	Chlorophyll synthase, chloroplastic	0,46
XM_002265662.1	β -amylase	0,47
XM_002270449.1	α -glucan, water dikinase	0,76
XM_002266894.1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, chloroplastic	2,22
XM_002266491.1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, cytoplasmic	2,33
XM_002263662.1	Trehalase	2,89
XM_002279752.1	β -fructofuranosidase (invertase)	3,02
XM_002271938.1	Chlorophyllase-1	9,98
XM_002282148.1	α -amylase	13,53

Tableau 8 – Classement des gènes de référence candidats en fonction de leur stabilité évaluée à l'aide des trois logiciels Bestkeeper, Normfinder et GeNorm, pour des échantillons extraits à partir des feuilles infectées par *P. viticola*.

	BestKeeper	Normfinder	GeNorm	conclusion
1	<i>VATP16</i>	<i>VATP16</i>	<i>60SRP</i> & <i>UQCC</i>	<i>VATP16</i>
2	<i>60SRP</i>	<i>60SRP</i>	<i>VATP16</i>	<i>60SRP</i>
3	<i>UQCC</i>	<i>UQCC</i>	<i>SMD3</i>	<i>UQCC</i>
4	<i>VPS54</i>	<i>SMD3</i>	<i>VPS54</i>	<i>SMD3</i>
5	<i>ACT1</i>	<i>ADH2</i>	<i>EP1</i>	<i>VPS54</i>
6	<i>SMD3</i>	<i>VPS54</i>	<i>ADH2</i>	<i>ADH2</i>
7	<i>ADH2</i>	<i>EP1</i>	<i>UBE2</i>	<i>EP1</i>
8	<i>39SRP</i>	<i>39SRP</i>	<i>39SRP</i>	<i>ACT1</i>
9	<i>EP1</i>	<i>UBE2</i>	<i>ACT1</i>	<i>39SRP</i>
10	<i>UBE2</i>	<i>ACT1</i>	ARNr 18S	<i>UBE2</i>
11		ARNr 18S		ARNr 18S

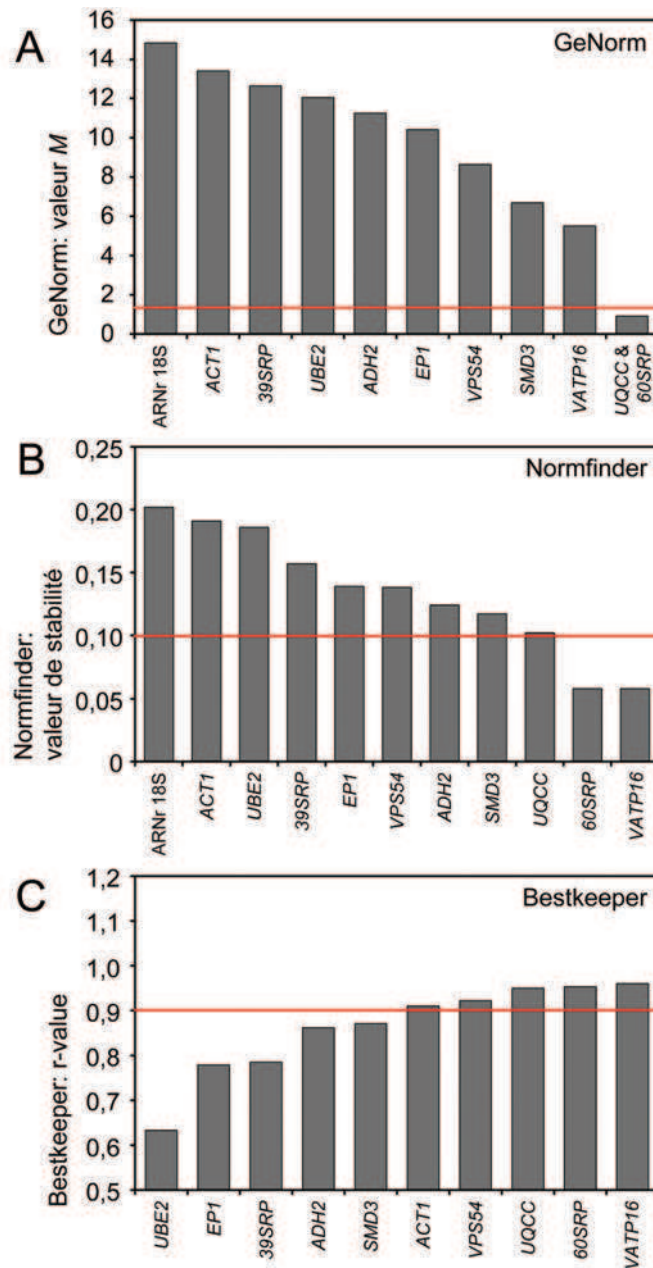


FIGURE 24 – Stabilité des gènes de référence candidats estimée à l'aide des logiciels geNorm (A), Normfinder (B) et Bestkeeper (C). Les gènes sont listés du moins stable (à gauche) au plus stable (à droite) en fonction des valeurs de stabilité obtenues. Les seuils à 1,5 (GeNorm), 0,1 (Normfinder) et 0,9 (Bestkeeper) ont été fixés selon les valeurs décrites dans la littérature (Andersen *et al.*, 2004; Pfaffl *et al.*, 2004; Vandesompele *et al.*, 2002).

chez Marselan (données non présentées). Les autres amorces ont pu être validées et permettent d'obtenir un seul produit spécifique.

Le niveau d'expression de ces gènes a été déterminé dans des échantillons de feuilles infectées ou non par *P. viticola*, prélevés à 0 (témoin), 1, 3, 5 et 7 jpi, avec trois répétitions biologiques. La stabilité d'expression de ces gènes a été analysée à l'aide de trois logiciels dédiés: GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) et Normfinder (Andersen *et al.*, 2004).

GeNorm indique *UQCC* et *60SRP* et Normfinder *VATP16* et *60SRP* comme les deux gènes les plus stables (Figure 24 A & B, Tableau 8). Pour l'analyse Bestkeeper, ce logiciel analysant un maximum de 10 gènes, l'ARNr 18S a été écarté car il s'est avéré être le moins stable dans les autres analyses. Avec ce logiciel, *VATP16*, *60SRP* et *UQCC* apparaissent les plus stables (Figure 24 C, Tableau 8).

Selon la méthode décrite par Exposito-Rodriguez *et al.* (2008), des valeurs comprises entre 1 (pour le gène le plus stable) et 11 (gène le moins stable) ont été attribuées aux gènes en fonction de leur classement relatif obtenu pour les trois logiciels. La somme de ces valeurs est ainsi utilisée pour établir un classement final (Tableau 8). Les gènes ayant le plus de variabilité sur l'ensemble de ces analyses sont l'ARNr 18S, *UBE2*, *39SRP* et *ACT1* qui ne conviennent donc pas comme gènes de référence dans nos conditions. Les gènes *UQCC*, *VATP16* et *60SRP* sont les trois mieux classés. Le nombre de gènes de référence à utiliser pour la normalisation étant d'au moins deux (Vandesompele *et al.*, 2002), nous avons retenu *VATP16* et *60SRP* pour nos expériences.

5 Impact de l'infection par *P. viticola* sur le métabolisme de l'amidon

Des études par qRT-PCR de l'expression de gènes ont été effectuées afin de valider les variations observées dans les résultats de l'analyse transcriptomique et de les étudier pendant la cinétique de l'infection en conditions de lumière et d'obscurité. Nous avons suivi l'expression de gènes codant pour des enzymes clés de la synthèse (AGPase, amidon synthétase soluble) et de la dégradation (α -amylase et β -amylase) de l'amidon.

L'expression des deux gènes impliqués dans la synthèse de l'amidon est réprimée uniquement à la fin de l'infection. En effet, celle du gène codant pour l'AGPase l'est à 7 jpi à l'obscurité et à la lumière (Figure 25 A), alors que celle du gène codant pour la soluble starch synthétase l'est à partir de 5 jpi (Figure 25 B). L'expression du gène codant pour la β -amylase est réprimée à 7 jpi et seulement à la lumière (Figure 25 C) alors que celle du gène codant pour l' α -amylase est induite à partir de 5 jpi, à la lumière et à l'obscurité, avec un maximum à 7 jpi à la lumière (Figure 25 D).

Les activités de l'AGPase, α -amylase et β -amylase ont été mesurées dans des feuilles témoins et infectées (7 jpi). L'activité AGPase est plus élevée dans les feuilles infectées que dans les témoins, avec $0,72 \pm 0,3$ et $0,55 \pm 0,08$ ng glucose.mg⁻¹

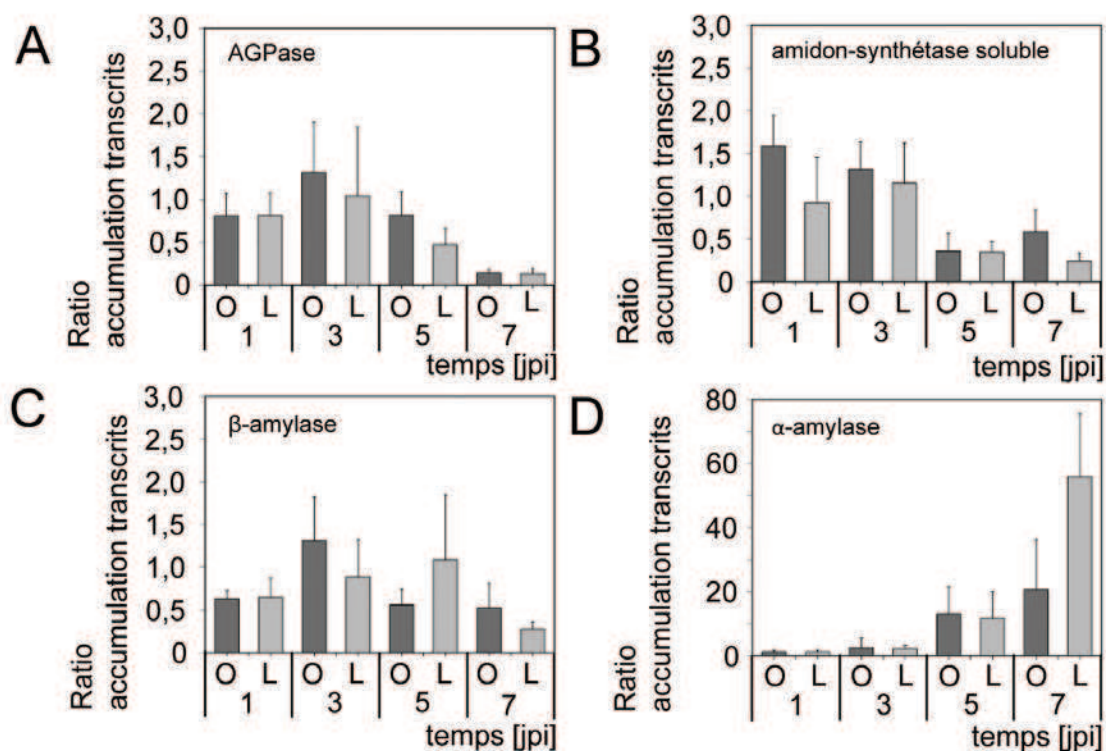


FIGURE 25 – Variation de l'expression des gènes codant pour une AGPase (A), amidon-synthétase soluble (B), β -amylase (C) et α -amylase (D) au cours de l'infection. Les feuilles ont été prélevées à la lumière (L) et à l'obscurité (O) au cours de l'infection par *P. viticola* (de 1 à 7 jpi). Les données d'expression ont été normalisées par rapport à celles de *VATP16* et *60SRP*. Les résultats présentés correspondent au ratio entre les valeurs obtenues pour les feuilles infectées et celles obtenues pour les feuilles témoins. Les données correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques \pm écart-types.

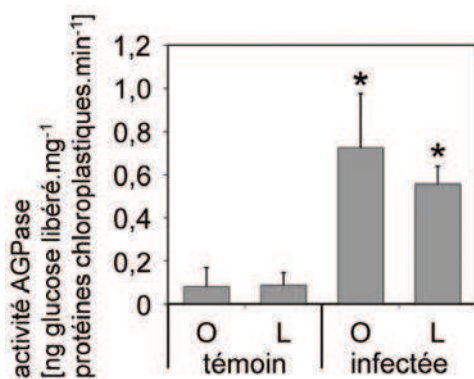


FIGURE 26 – Activité de l'AGPase dans des feuilles témoins et infectées par *P. viticola* (7 jpi). Les échantillons ont été prélevés à la lumière (L) et à l'obscurité (O). Les données correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques \pm écart-types. Les astérisques (*) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

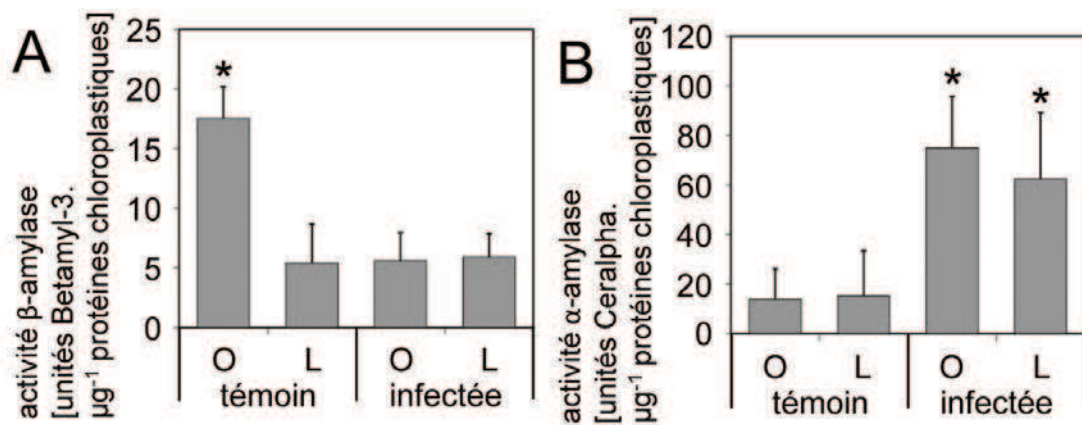


FIGURE 27 – Activités de la β -amylase (A) et de l' α -amylase (B) dans des feuilles témoins et infectées par *P. viticola* (7 jpi). Les échantillons ont été prélevés à la lumière (L) et à l'obscurité (O). Les données correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques \pm écart-types. Les astérisques (*) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

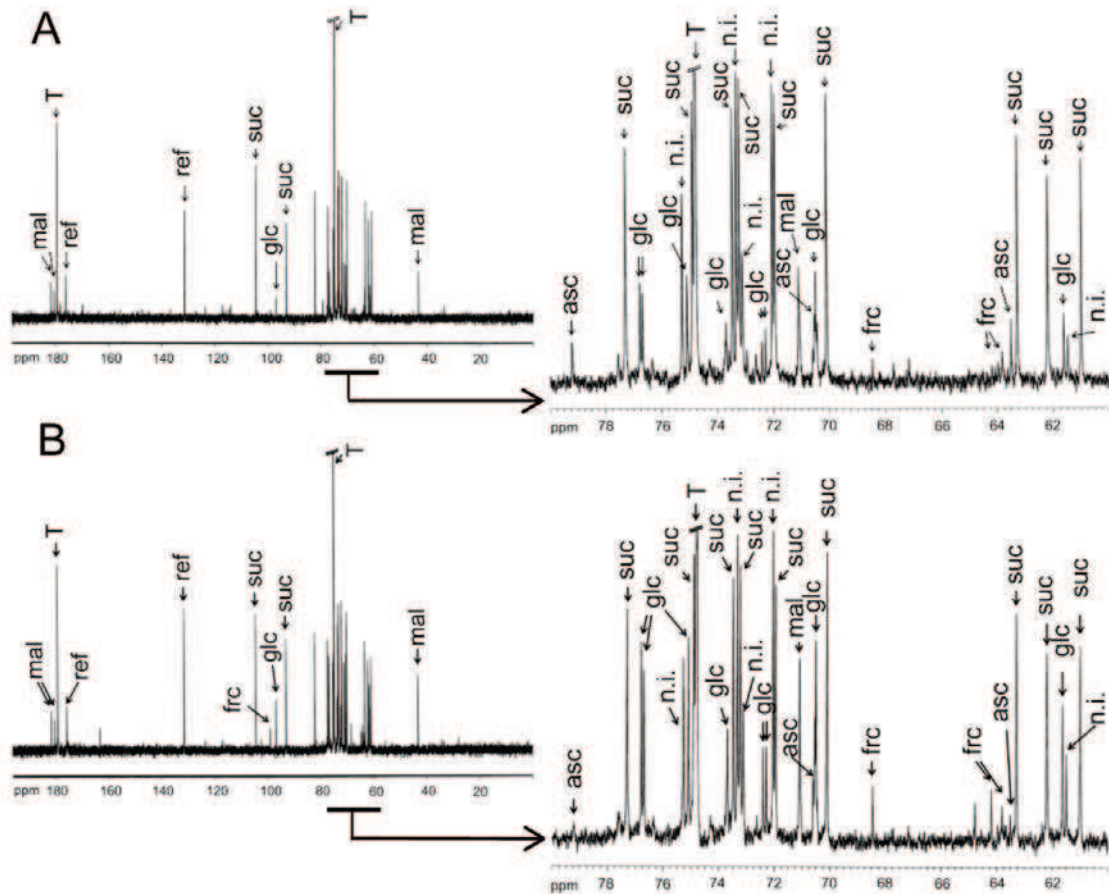


FIGURE 28 – Spectres ^{13}C -RMN obtenus à partir d'extraits de feuilles témoins (A) et infectées par *P. viticola* (B). Les analyses ont été réalisées à partir de feuilles prélevées à 6 jpi, à l'obscurité. asc : ascorbate, T : tartrate, mal : malate, glc : glucose, frc : fructose, suc : saccharose, ref : référence, n.i. non identifié. Les données correspondent à une expérience représentative de trois répétitions biologiques. ppm : parties par millions

protéines chloroplastiques.min⁻¹ (obscurité et lumière) par rapport à $0,07 \pm 0,08$ et $0,08 \pm 0,05$ ng glucose.mg⁻¹protéines chloroplastiques.min⁻¹ (obscurité et lumière, respectivement), respectivement (Figure 26).

Dans les feuilles témoins, la β -amylase a une activité plus élevée à l'obscurité (17 ± 3 unités Betamyl-3. μ g⁻¹ protéines chloroplastiques) qu'à la lumière (5 ± 3 unités Betamyl-3. μ g⁻¹ protéines chloroplastiques). Dans les feuilles infectées, l'activité est similaire à l'obscurité et à la lumière et correspond à celle des échantillons témoins à la lumière (Figure 27 A). L'activité de l' α -amylase est similaire à la lumière et à l'obscurité dans les feuilles témoins (14 ± 12 unités ceralpha. μ g⁻¹ protéines chloroplastiques) et elle est plus élevée dans les feuilles infectées (76 ± 21 unités ceralpha. μ g⁻¹); à la lumière comme à l'obscurité (Figure 27 B).

6 Impact de l'infection par *P. viticola* sur le métabolisme des sucres solubles

Des analyses ¹³C-RMN ont été réalisées (feuilles témoins et infectées, 6 jpi, obscurité) afin de vérifier si l'infection par *P. viticola* affectait aussi le métabolisme des sucres solubles. Le fructose et le glucose semblent en plus fortes concentrations dans les feuilles infectées que dans les feuilles témoins alors que c'est l'inverse pour le saccharose (Figure 28).

Au vu de ces résultats, les sucres solubles dont le glucose, le fructose et le saccharose ont été analysés dans des feuilles témoins et infectées (1 à 7 jpi) par chromatographie liquide haute performance à échange d'anions avec une détection ampérométrique (HPAEC-PAD) (Figure 29). À l'obscurité, des concentrations de 9 mg glucose.g⁻¹ poids sec (PS), 6 mg fructose.g⁻¹ PS et 13 mg saccharose.g⁻¹ PS ont été déterminées pour les feuilles témoins. Des concentrations similaires sont présentes dans les feuilles infectées de 1 à 5 jpi, comme l'indique le ratio de 1 entre les deux types d'échantillons. Cependant, à 7 jpi, les teneurs en glucose et fructose sont significativement plus élevées dans les feuilles infectées (facteur $\sim 2,5$) alors que celle en saccharose ne varie pas (Figure 29 A). À la lumière, dans les feuilles témoins, les concentrations sont d'environ 11 mg glucose.g⁻¹ PS, 8,5 mg fructose.g⁻¹ PS et 30 mg saccharose.g⁻¹ PS. De 1 à 5 jpi, les concentrations sont similaires pour les feuilles témoins et infectées. Cependant, à 7 jpi, on note une diminution de la teneur en saccharose (facteur 1,8) dans les feuilles infectées (Figure 29 B), alors que celles de glucose et fructose ne varient pas.

Afin de mieux comprendre les variations observées, l'expression des gènes codant pour la saccharose phosphate synthétase et l'invertase pariétale, deux enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation du saccharose, a été analysée par qRT-PCR (Figure 30). L'expression du gène codant pour la saccharose phosphate synthétase est réprimée à 5 jpi à l'obscurité, et à 7 jpi, à l'obscurité et à la lumière (Figure 30 A). L'expression du gène codant pour l'invertase pariétale est induite à partir de 5 jpi à l'obscurité et à la lumière (Figure 30 B). Ces résultats sont concordants avec ceux de l'analyse transcriptomique (Tableau 7).

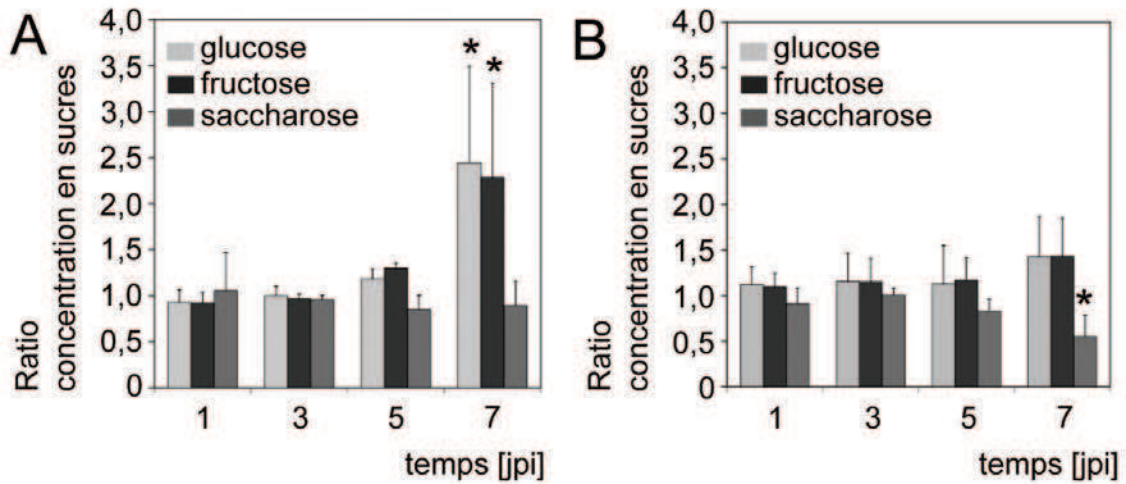


FIGURE 29 – Ratios des teneurs en glucose, fructose et saccharose entre des feuilles de vigne infectées par *P. viticola* et témoins. Les échantillons ont été prélevés au cours de l'infection (de 1 à 7 jpi) à l'obscurité (A) ou à la lumière (B) et analysés par HPAEC-PAD. Les données correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques \pm écart-types. Les astérisques (*) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$)

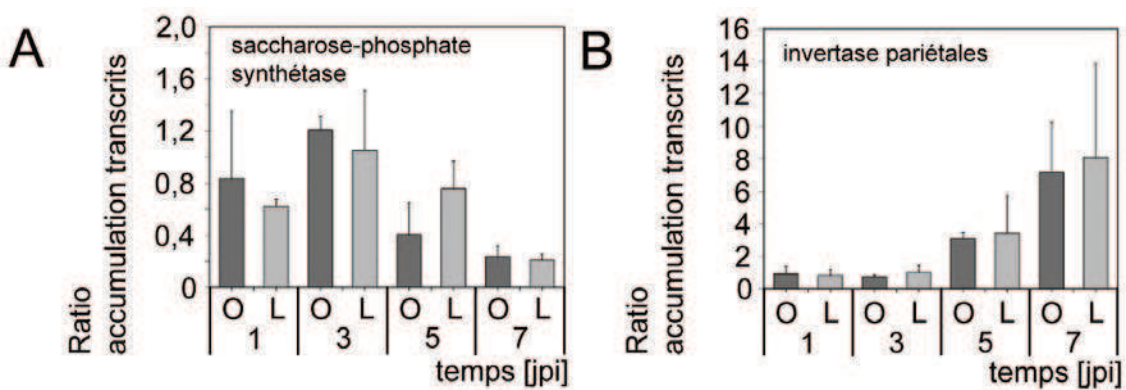


FIGURE 30 – Expression relative des gènes codant pour une saccharose-phosphate synthétase (A) et une invertase pariétale (B). Les échantillons foliaires ont été prélevés à la lumière (L) et à l'obscurité (O) au cours de l'infection des feuilles de vigne par *P. viticola* (1 à 7 jpi). Les données d'expression ont été normalisées par rapport à l'expression des gènes de référence *VATP16* et *60SRP*. Les valeurs obtenues pour les feuilles infectées ont été rapportées aux valeurs témoins correspondantes. Les données correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques \pm écart-types.

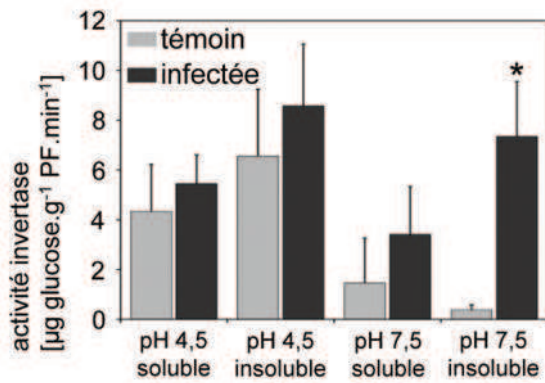


FIGURE 31 – **Activité invertase mesurée à pH 4,5 et 7,5 dans des fractions solubles et insolubles d’extraits protéiques de feuilles témoins et infectées par *P. viticola* (7 jpi).** Les échantillons ont été prélevés à l’obscurité. Les données représentent la moyenne de trois répétitions biologiques ± écart-types. Les astérisques (*) indiquent une différence significative entre les feuilles témoins et infectées ($P < 0,05$).

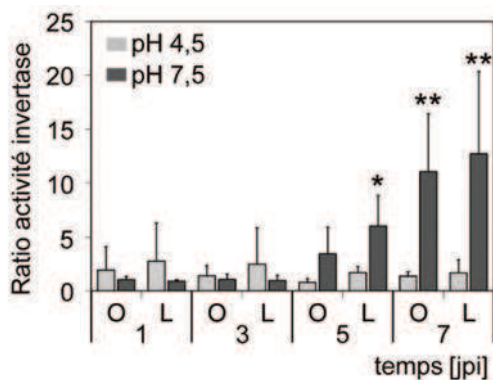


FIGURE 32 – **Activité de l’invertase mesurée à pH 4,5 et pH 7,5 et au cours de l’infection par *P. viticola*.** Ratio entre l’activité enzymatique des fractions insolubles d’extraits foliaires de feuilles infectées par *P. viticola* et celle des feuilles témoins. Les échantillons ont été prélevés à l’obscurité (O) et à la lumière (L). Les données représentent la moyenne de trois répétitions biologiques ± écart-types. Les astérisques (*) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

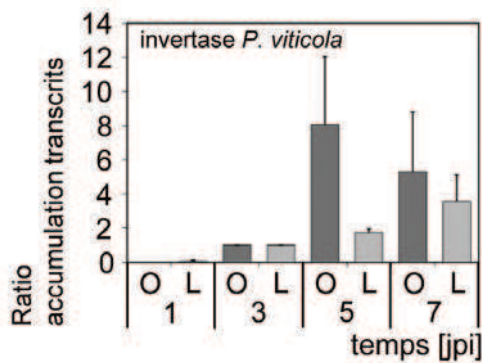


FIGURE 33 – **Expression relative du gène codant pour une invertase de *P. viticola*.** Les échantillons foliaires ont été prélevés à l’obscurité (O) et à la lumière (L), au cours de l’infection (1 à 7 jpi). Les données d’expression ont été normalisées par rapport à l’expression du gène *PvACT*. Les données correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques ± écart-types.

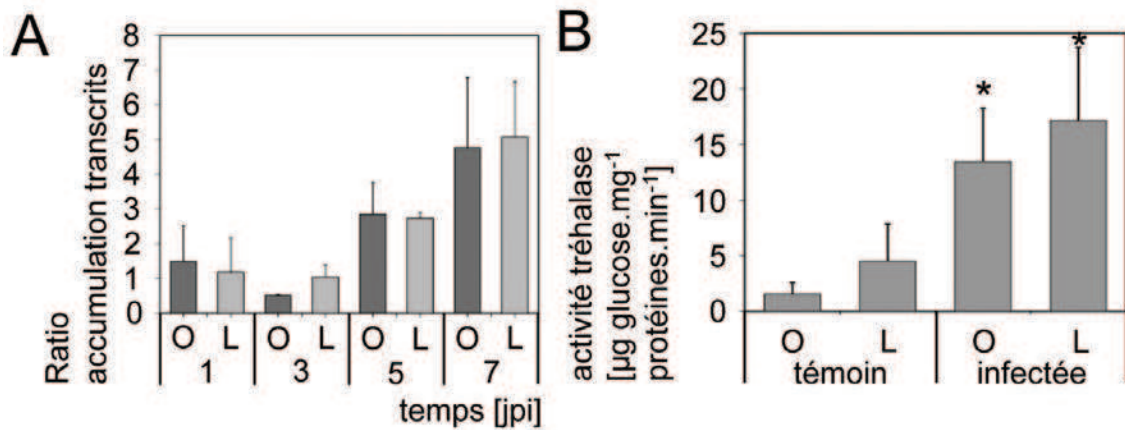


FIGURE 34 – Suivi de l'expression du gène (A) et mesure de l'activité (B) de la tréhalase. A: Les données d'expression ont été normalisées par rapport à l'expression des gènes de référence *VATP16* et *60SRP*. Les échantillons ont été prélevés au cours de l'infection (1 à 7 jpi) à l'obscurité (O) ou à la lumière (L). Les valeurs obtenues pour les feuilles infectées ont été rapportées aux valeurs témoins correspondantes. Les données correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques \pm écart-types. B: L'activité a été mesurée dans la fraction soluble d'un extrait protéique de feuilles témoins et infectées par *P. viticola*. Les données correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques \pm écart-types. Les astérisques (*) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

Tableau 9 – Concentration en tréhalose [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS] dans des feuilles de vigne témoins et infectées par *P. viticola*. Le tréhalose a été quantifié par HPAEC-PAD au niveau de feuilles prélevées à la lumière et à l'obscurité au cours de l'infection (1 à 7 jpi). Les données correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques \pm écart-types.

		1 jpi	3 jpi	5 jpi	7 jpi
obscurité	témoin	traces	traces	traces	traces
	infectée	traces	traces	$0,29 \pm 0,21$	$2,41 \pm 1,1$
lumière	témoin	traces	traces	traces	traces
	infectée	traces	traces	$1,34 \pm 0,31$	$5,16 \pm 4,07$

Chez les plantes, les invertases existent en plusieurs isoformes qui se distinguent par leur localisation cellulaire et leur pH optimum. Afin de vérifier l'influence de l'infection sur l'activité invertase, celle-ci a été mesurée dans les fractions soluble et insoluble d'extraits protéiques de feuilles témoins et infectées, à pH 4,5 et 7,5 (Figure 31). Dans la fraction soluble, aucune différence statistiquement significative ne peut être notée entre les feuilles témoins et infectées, quelque soit le pH. Pour la fraction insoluble, dans laquelle se trouvent les invertases pariétales, il n'y a pas de différences entre les feuilles témoins et infectées à pH 4,5 (décrit comme pH optimum pour les invertases pariétales). Cependant, à pH 7,5, l'activité invertase est plus élevée dans les feuilles infectées que dans les témoins, avec une activité respective de $7,35 \pm 2,2$ et $0,38 \pm 0,2 \mu\text{g}$ glucose formé.g⁻¹ PF.min⁻¹.

L'activité invertase a ensuite été mesurée dans les fractions insolubles d'extraits protéiques de feuilles témoins et infectées, au cours de l'infection (Figure 32). À pH 4,5, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les feuilles témoins et infectées. Cependant, à pH 7,5, on note une augmentation significative de cette activité dans les feuilles infectées à partir de 5 jpi et qui s'accroît au cours du temps, indépendamment des conditions lumière / obscurité. L'activité invertase a également été mesurée dans les fractions solubles des extraits protéiques au cours de l'infection, mais aucune différence significative n'a été détectable (données non présentées).

Ainsi l'activité de l'invertase présente dans la fraction insoluble mesurée à pH 7,5 augmente de façon concomitante avec l'induction de l'expression du gène codant pour une invertase pariétale décrite dans le paragraphe précédent. Sachant que les oomycètes ont leurs propres invertases, l'expression d'un gène codant pour une invertase de *P. viticola* a également été suivie au cours de l'infection. Celle-ci est activée à partir de 5 jpi et surtout à l'obscurité (Figure 33).

7 Tréhalose

L'analyse HPAEC-PAD a également permis de quantifier la tréhalose. Pour les témoins et pour les stades précoces de l'infection (1 à 3 jpi), ce disaccharide n'a été détecté qu'en traces. Dans les feuilles infectées, la concentration en tréhalose augmente au cours de temps pour atteindre $2,41 \pm 1,1$ mg.g⁻¹ PS à l'obscurité et $5,16 \pm 4,07$ mg.g⁻¹ PS à la lumière à 7 jpi (Tableau 9).

L'étude transcriptomique a montré que l'expression du gène codant pour la tréhalose 6-phosphate synthétase est réprimée dans les feuilles infectées alors que celle du gène codant pour la tréhalase est induite (Tableau 7) et que celle du gène codant pour la tréhalose 6-phosphate phosphatase ne varie pas (données non présentées).

Sur la base de ces résultats, nous avons suivi par qRT-PCR l'expression du gène codant pour la tréhalase dans les feuilles témoins et les feuilles infectées (0 à 7 jpi), et comparé l'activité de l'enzyme à 7 jpi. Ces expérimentations ont été réalisées pour des échantillons prélevés à la lumière et à l'obscurité. Dans les feuilles infectées, les transcrits du gène codant pour la tréhalase s'accumulent à partir de 5 jpi à la lumière et à l'obscurité (Figure 34 A). On note aussi une augmentation de

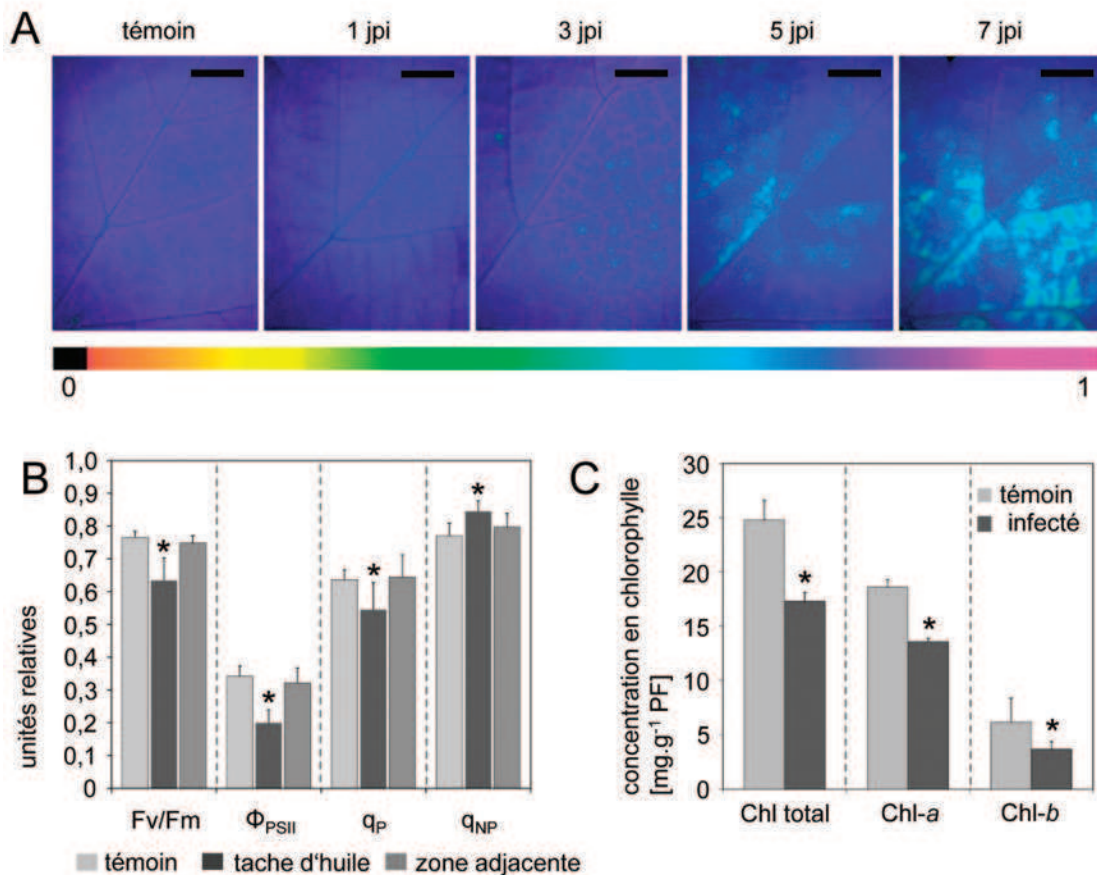


FIGURE 35 – Mesure de l'activité photosynthétique par la fluorescence chlorophyllienne et détermination de la teneur en chlorophylles dans des feuilles témoins et infectées par *P. viticola*. A: Efficacité maximale de PSII (F_v / F_m). Images représentant la fluorescence chlorophyllienne dans des feuilles témoins et infectées par *P. viticola* au cours de l'infection (1 à 7 jpi). Les différences de fluorescence sont traduites par un échelle de couleur de noir (0) à mauve (1). La barre représente 0.5 cm. B: valeurs obtenues pour F_v / F_m , le rendement quantique de PSII (Φ_{PSII}), le quenching photochimique (q_P) et non-photochimique (q_{NP}). Dans des feuilles infectées, les mesures ont été effectuées dans des taches d'huile et dans des zones adjacentes sans symptômes. Les données correspondent à la moyenne de 35 répétitions \pm écart-types. Les astérisques (*) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$). C: teneurs en chlorophylles. Les données correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques \pm écart-types. Les astérisques (*) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

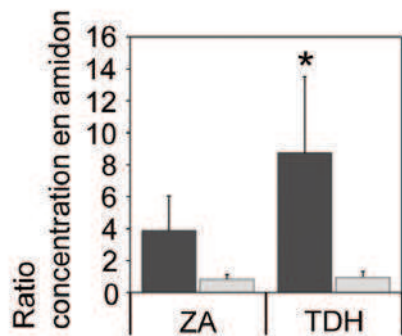


FIGURE 36 – **Ratio entre la teneur en amidon des taches d’huile (TDH) et des zones adjacentes (ZA) des feuilles infectées par *P. viticola* (6 jpi) et celle des feuilles témoins.** Les échantillons ont été prélevés à l’obscurité (barres noires) ou à la lumière (barres grises). Les valeurs correspondent à la mesure du glucose libéré après une digestion enzymatique de l’amidon. Les données correspondent à la moyenne de deux répétitions biologiques \pm écart-types. Les astérisques (*) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

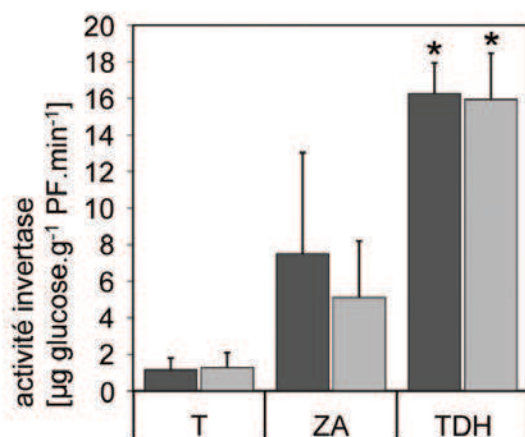


FIGURE 37 – **Activité de l’invertase mesurée à pH 7,5 dans des feuilles témoins (T), les taches d’huile (TDH) et zones adjacentes (ZA) des feuilles infectées (6 jpi).** L’activité a été mesurée dans la fraction insoluble d’un extrait protéique de feuilles prélevées à l’obscurité (barres noires) et à la lumière (barres grises). Les données correspondent à la moyenne de deux répétitions biologiques \pm écart-types. Les astérisques (*) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

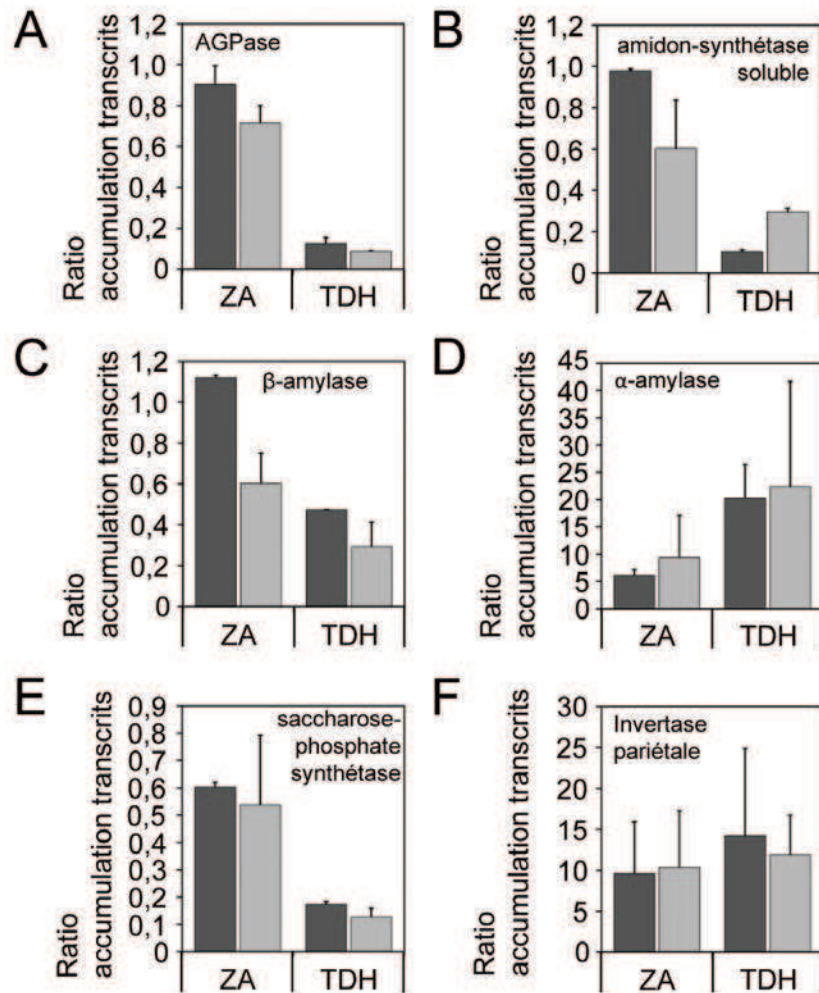


FIGURE 38 – Expression relative des gènes codant pour une AGPase (A), une amidon-synthétase soluble (B), une β -amylase (C), une α -amylase (D), une saccharose-phosphate synthétase (E) et une invertase pariétale (F) analysée par qRT-PCR dans des feuilles témoins (référence), les taches d’huile (TDH) et les zones adjacentes (ZA) des feuilles infectées (6 jpi). Les échantillons foliaires ont été prélevés à l’obscurité (barres noires) et à la lumière (barres grises). Les données d’expression ont été normalisées par rapport à l’expression des gènes de référence *VATP16* et *60SRP*. Les valeurs obtenues pour les feuilles infectées ont été rapportées à celles des témoins correspondants. Les données correspondent à la moyenne de deux répétitions biologiques \pm écart-types.

l'activité tréhalase en fin d'infection (7jpi). En effet, l'activité tréhalase correspond à la libération de $1,56 \pm 1,03 \mu\text{g glucose.mg}^{-1} \text{ protéine.min}^{-1}$ à l'obscurité et $4,52 \pm 3,36 \mu\text{g glucose.mg}^{-1} \text{ protéine.min}^{-1}$ à la lumière pour les feuilles témoins. Pour les feuilles infectées, l'activité est de $13,46 \pm 4,8 \mu\text{g glucose.mg}^{-1} \text{ protéine.min}^{-1}$ à l'obscurité et $17,13 \pm 6,59 \mu\text{g glucose.mg}^{-1} \text{ protéine.min}^{-1}$ à la lumière (Figure 34 B).

8 Activité photosynthétique dans les feuilles témoins et infectées

L'activité photosynthétique des feuilles témoins et infectées (1 à 7 jpi) a été étudiée à partir d'analyses de la fluorescence de la chlorophylle. Dans les feuilles infectées, l'efficacité maximale du photosystème II (PSII, $\frac{Fv}{Fm}$) diminue à partir de 5 jpi dans les zones infectées (Figure 35 A). Les images de fluorescence obtenues à 7 jpi ont été utilisées pour déterminer les valeurs de $\frac{Fv}{Fm}$, le rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}), le "quenching" photochimique et non-photochimique (q_P et q_{NP}) dans les feuilles témoins ainsi que dans deux zones des feuilles infectées : dans les "taches d'huile" et dans les zones adjacentes. Le rapport $\frac{Fv}{Fm}$ est plus petit dans les "taches d'huile" comparé aux feuilles témoins ($0,63 \pm 0,06$ et $0,76 \pm 0,02$, respectivement). On note aussi des valeurs inférieures pour Φ_{PSII} ($0,19 \pm 0,04$ à $0,34 \pm 0,03$, respectivement) et q_P ($0,54 \pm 0,08$ à $0,63 \pm 0,03$, respectivement). Cependant, la valeur de q_{NP} est plus élevée ($0,84 \pm 0,03$ à $0,77 \pm 0,04$, respectivement). Pour ces paramètres, nous n'avons pas observé de différence entre les zones dépourvues de symptômes des feuilles infectées et les feuilles témoins (Figure 35 B).

Les teneurs en chlorophylles ont été déterminées pour les feuilles témoins et infectées (7 jpi). La concentration en chlorophylles totales est plus faible dans les feuilles infectées comparé aux feuilles témoins ($17,3 \pm 0,8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ PS}$ et $24,8 \pm 1,8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ PS}$, respectivement). Cette différence résulte surtout d'une réduction de la teneur en chlorophylle a (Figure 35 C).

9 Taches d'huile et zones adjacentes des feuilles infectées

Afin de préciser si les dérégulations décrites ci-dessus concernent la feuille infectée dans son ensemble ou sont spécifiques des "taches d'huile", certaines analyses ont été réalisées sur des échantillons provenant spécifiquement des taches d'huile et des zones adjacentes dépourvues de symptômes. À la lumière, les teneurs en amidon des taches d'huile et des zones adjacentes sont similaires à celles des feuilles témoins (comme l'indique la valeur du ratio d'environ 1). En revanche, à l'obscurité, il y a plus d'amidon dans les feuilles infectées que dans les témoins, mais cette différence n'est statistiquement significative qu'au niveau des "taches d'huile", qui contiennent 8 fois plus d'amidon que le témoin (Figure 36).

L'activité invertase a été mesurée à pH 7,5 dans ces échantillons. Celle-ci est de $1,16 \pm 0,6 \mu\text{g glucose formé.g}^{-1} \text{PF.min}^{-1}$ dans les feuilles témoins, à l'obscurité et à la lumière. Elle semble plus élevée ($7,49 \pm 5,5 \mu\text{g glucose formé.g}^{-1} \text{PF.min}^{-1}$ à l'obscurité) dans les zones adjacentes, mais cette différence n'est pas statistiquement significative. Dans les "taches d'huile", cette activité est statistiquement significativement plus élevée (environ $16 \mu\text{g glucose formé.g}^{-1} \text{PF.min}^{-1}$), à la lumière comme à l'obscurité (Figure 37).

L'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de l'amidon et du saccharose a également été étudiée dans ces deux zones. L'expression des gènes codant pour l'AGPase et l'amidon-synthétase est réprimée dans les taches d'huile à la lumière comme à l'obscurité; ce qui correspond aux observations faites sur feuille entière. L'expression de ces gènes dans les zones adjacentes ne semble pas différente de celle des feuilles témoins (Figure 38 A & B). Pour la β -amylase, les résultats ont été similaires (Figure 38 C). L'expression du gène codant pour l' α -amylase est induite à l'obscurité et à la lumière dans les zones adjacentes et surtout dans les taches d'huile (Figure 38 D). L'expression du gène codant pour la saccharose-phosphate synthétase est réprimée dans les taches d'huile mais pas dans les zones adjacentes (Figure 38 E). Enfin, l'expression du gène codant pour l'invertase est induite dans les zones adjacentes et les taches d'huile sans différence entre les échantillons prélevés à la lumière et à l'obscurité (Figure 38 F).

Discussion

Dans les organes photosynthétiques tels que les feuilles, l'amidon s'accumule au cours de la journée et est dégradé de nuit. Ces processus sont finement régulés et adaptés aux conditions environnementales afin de garantir à la plante une disponibilité en sucres suffisante pour toute la durée de la nuit. Dans des feuilles de vigne infectées par *Plasmopara viticola*, une accumulation anormale de l'amidon a été observée en fin de nuit. Des colorations au lugol ont permis de voir que cet amidon est accumulé dans les "taches d'huile", symptômes caractéristiques de la maladie, à partir de 3 jpi. La méthode de quantification de l'amidon ne détecte cette accumulation anormale qu'à 7 jpi, probablement dû à un effet "dilution" par les tissus non infectés.

Des modifications du métabolisme de l'amidon ont déjà été décrites pour d'autres interactions plante - pathogène et sont souvent accompagnées par des altérations profondes au niveau du métabolisme glucidique. Les effets de l'infection dépendent du modèle étudié. Chez *Pisum sativum*, une diminution de la teneur en amidon due à une réduction de l'activité de l'AGPase a été observée dans des feuilles infectées par *Erysiphe pisi* (Storr et Hall, 1992). Cependant, les teneurs en sucres réducteurs et en saccharose ne sont pas modifiées. Lors de l'infection des jeunes feuilles de *Zea mays* par *Ustilago maydis*, Horst *et al.* (2008) ont observé une réduction de la synthèse de l'amidon et du saccharose, ainsi qu'une quantité importante d'hexoses. Dans les feuilles de *Solanum lycopersicum* infectées par *Phytophthora infestans*, les teneurs en amidon et en saccharose diminuent au cours de l'infection, alors que le glucose et surtout le fructose s'accumulent (Judelson *et al.*, 2009). Une augmentation de la teneur en amidon a été observée dans les feuilles d'*Helianthus annuus* infectées par le virus SuCMoV, qui induit également une accumulation des sucres solubles, tout en diminuant l'activité photosynthétique (Rodriguez *et al.*, 2010). Enfin, l'infection de feuilles de *Citrus sinensis* par la bactérie *Candidatus liberibacter* induit l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse de l'amidon et provoque l'accumulation de ce dernier et du saccharose (Kim *et al.*, 2009).

La dérégulation du métabolisme de l'amidon a souvent été décrite sur la base de modifications de l'expression des transcrits des gènes codant pour des enzymes impliquées dans cette voie métabolique. Nous avons initié une analyse transcriptomique à l'aide d'une puce "vigne" (NimbleGen "grape whole genome Microarray") afin d'étudier les changements globaux de l'expression de gènes dans les feuilles infectées (7 jpi, à l'obscurité). Parmi les 30 000 gènes étudiés, 11% ont une expression modulée par l'infection dont environ la moitié est réprimée et la seconde induite. Parmi eux, nous avons identifié des gènes codant pour des isoformes d'enzymes impliquées dans les métabolismes de l'amidon, du saccharose, du tréhalose et dans la photosynthèse.

Afin de valider ces résultats par qRT-PCR, il a été nécessaire d'identifier des gènes de référence. Cette technique permet d'étudier les changements d'expression de gènes par la quantification de leurs transcrits. Les données d'expression sont normalisées par rapport à un ou plusieurs gène(s) de référence dont l'expression est supposée stable, afin d'éviter d'intégrer des variations liées à l'extraction des ARN ou à la production des ADNc. Généralement, les gènes de référence utilisés ont une fonction cellulaire "basale" et sont supposés être exprimés de manière constante dans tous les échantillons. Parmi les plus utilisés, on peut citer ceux codant pour l'actine (Fluck *et al.*, 2005; Fung *et al.*, 2008), l'ubiquitine (Lund *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2010), des facteurs d'élongation (Abbal *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2010) ou les sous-unités ribosomiques (Bas *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2010). Toutefois, plusieurs études ont montré que l'expression de ces gènes pouvait varier (Bas *et al.*, 2004; Guenin *et al.*, 2009; Tricarico *et al.*, 2002), soulignant l'importance de valider la stabilité de leur expression pour chaque expérimentation conduite. Pour la vigne, Reid *et al.* (2006) ont validé des gènes codant pour la GAPDH (glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase), l'actine, l'EF1- α et une protéine de la famille SAND comme gènes de référence pour des études sur baies de Cabernet Sauvignon, mais aucune validation n'a été publiée pour des feuilles de vigne.

À partir des données microarray, des gènes de référence candidats ont été choisis. Leur expression dans des échantillons de feuilles témoins ou infectées par *P. viticola*, prélevés au cours de l'infection, a été mesurée et les données analysées à l'aide de trois logiciels dédiés : GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) et Normfinder (Andersen *et al.*, 2004). Ces derniers utilisent des modèles mathématiques différents afin d'identifier un ou plusieurs gènes les mieux adaptés pour la normalisation des échantillons analysés. Ces analyses statistiques ont permis d'identifier les trois gènes *60SRP*, *VATP16* et *UQCC* comme les plus stables et donc les mieux adaptés pour être utilisés comme gènes de référence dans notre étude. Le nombre de gènes de référence à utiliser pour la normalisation étant d'au moins deux (Vandesompele *et al.*, 2002), les deux en tête du classement final, *VATP16* et *60SRP* ont été retenus pour nos expériences. Les gènes ayant le plus de variabilité sur l'ensemble de ces analyses ont été l'ARNr 18S, *UBE2*, *39SRP* et *ACT1* qui ne conviennent donc pas comme gènes de référence dans nos conditions. Ceci inclut deux gènes, l'ARNr 18S et *ACT1*, qui sont habituellement utilisés pour la normalisation des résultats de qRT-PCR chez la vigne. De plus, il s'est avéré lors de cette étude que les amorces utilisées pour *EF-1 α* ne sont pas adaptées à l'étude d'expression chez le cépage Marselan, probablement à cause de différences de séquence entre le cépage Marselan et le Cabernet Sauvignon, pour lequel ces amorces ont été réalisées. Ensemble, ces résultats confirment ce qui était décrit dans la littérature pour la variabilité d'expression des sous-unités ribosomiques (Tricarico *et al.*, 2002; Wong et Medrano, 2005) et la nécessité de valider les amorces et la stabilité de l'expression de gènes de référence utilisés pour ses conditions expérimentales.

En complément de l'étude microarray, l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon, du saccharose et du tréhalose a été

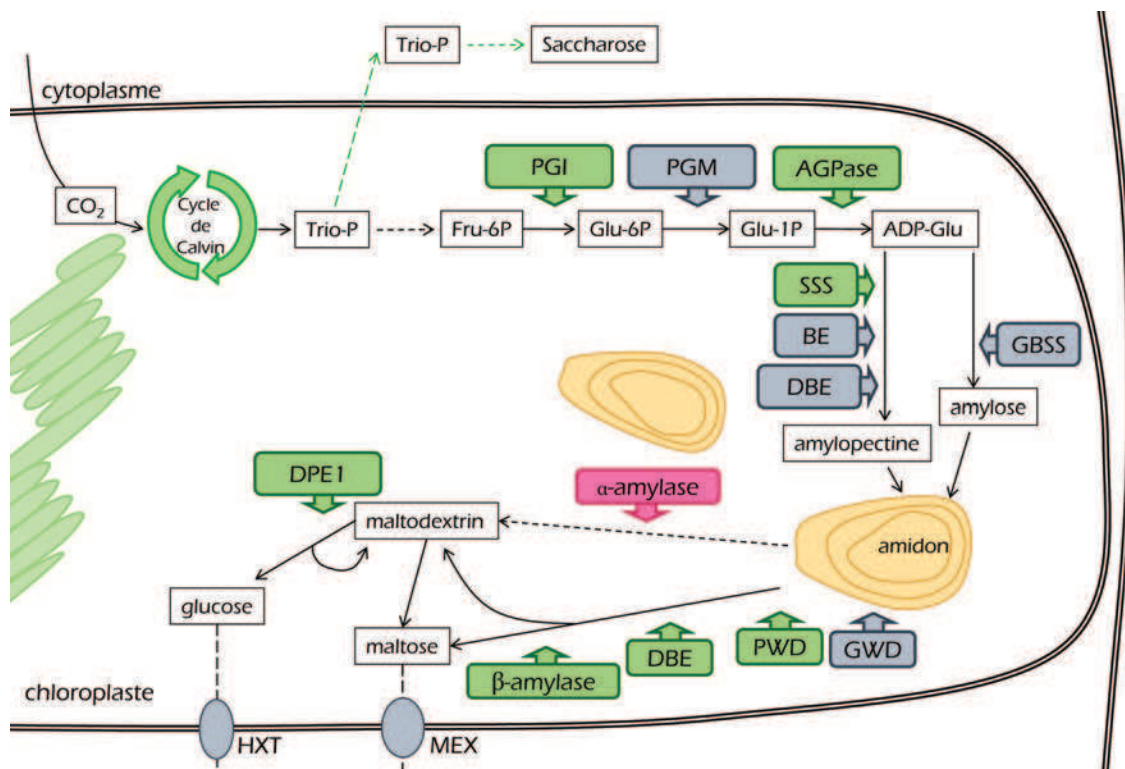


FIGURE 39 – Représentation schématique des altérations d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de l'amidon dans les feuilles de vigne infectées par *P. viticola*. Les enzymes sont marquées en vert, si le gène codant a été trouvé réprimé dans l'analyse microarray, et rouge s'il a été trouvé induit. ADP-Glu : ADP-glucose, AGPase : ADP-glucose pyrophosphorylase, BE : branching enzyme, DBE : debranching enzyme, Fru-6P : fructose 6-phosphate, GBS : granule bound starch synthase, Glu-1P: glucose 1-phosphate, Glu-6P : glucose 6-phosphate, HXT : transporteur d'hexose, PGI : phosphoglucose isomerase, PGM : phosphoglucose mutase, SSS : soluble starch synthase, DBE : debranching enzyme; DPE1 : disproportionating enzyme 1; GWD : glucan, water dikinase; MEX: maltose exporter; PWD : phosphoglucan, water dikinase.

suivie par qRT-PCR en utilisant des amorces correspondant à l'isoforme la plus affectée d'après les données transcriptomiques. Cette analyse a permis d'étudier leur expression au cours de l'infection dans les échantillons prélevés à l'obscurité et à la lumière. Afin de compléter l'analyse des transcrits, l'activité de ces enzymes a également été étudiée.

Concernant la synthèse de l'amidon (Figure 39), deux gènes codant pour des isoformes de la PGI sont réprimés parmi les quatre présents sur la puce. Il en est de même pour sept des douze gènes codant pour l'amidon-synthétase [dont 6 de l'amidon-synthétase soluble (SSS) et un pour la granule bound starch synthase (GBSS)]. L'expression des gènes codant pour les autres isoformes ainsi que pour la PGM et les enzymes de branchement (BE) n'est pas affectée. Pour l'AGPase, parmi les six gènes annotés, deux codent pour l'ApS (petite sous-unité), deux pour l'ApL1 (grande sous-unité 1) et deux pour l'ApL2 (grande sous-unité 2). Seule l'expression de deux gènes codant pour les isoformes de la grande sous-unité ApL1 est réprimée dans les feuilles infectées. Une analyse par qRT-PCR a permis de confirmer que l'expression d'un gène codant pour ApL1 était réprimée à la fin de l'infection. L'activité de l'AGPase a également été mesurée. À 7 jpi, elle est plus élevée dans les feuilles infectées que dans les témoins, ce qui semble en contradiction avec les données de l'expression de gènes. Chez *Arabidopsis*, des changements d'expression de gènes n'entraînent pas forcément de modification au niveau de l'abondance de cette protéine ou de son activité enzymatique. En effet, la régulation de l'AGPase est complexe et implique des mécanismes post-traductionnels (Gibon *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2004). Trois mécanismes sont impliqués dans sa régulation : une forte régulation allostérique par le ratio entre l'activateur 3-PGA et l'inhibiteur Pi (Preiss, 1988), l'état rédox de l'enzyme (Kolbe *et al.*, 2006; Tiessen *et al.*, 2003) et les taux en sucres dont le saccharose, glucose, tréhalose et tréhalose 6-phosphate (Kolbe *et al.*, 2005; Tiessen *et al.*, 2003). La sensibilité de l'AGPase envers ces mécanismes de régulation dépend entre autres de sa composition en sous-unités (Crevillén *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis*, la sous-unité ApL1 est celle la plus exprimée dans les tissus source, alors que les sous-unités ApL2, ApL3 et ApL4 semblent jouer un rôle plus important dans les tissus puits (Crevillén *et al.*, 2005). Comme l'expression du gène *ApL1* est réprimée, l'augmentation de l'activité AGPase pourrait résulter d'un changement dans la composition en sous-unités de l'enzyme dans les feuilles infectées, remplaçant les grandes sous-unités préférentiellement utilisées dans les tissus source vers celles utilisées dans les tissus puits. Cependant, on ne peut écarter les autres hypothèses selon lesquelles l'augmentation de l'activité AGPase serait due aux autres mécanismes de régulation. On pourrait imaginer une accumulation de 3-PGA ou une altération de l'état rédox dans les tissus infectés. Enfin, l'activité de l'AGPase peut aussi être affectée par les changements des teneurs en sucres solubles liés à l'infection.

La voie du catabolisme de l'amidon est également affectée par l'infection (Figure 39). Dans les feuilles, la dégradation de l'amidon débute par une phosphory-

lation du polymère par les GWD et PWD, puis d'autres enzymes interviennent, dont les β -amylases et les enzymes de débranchement (DBE). D'après l'étude transcriptomique, l'expression des gènes codant pour les trois isoformes de la PWD est réprimée, ainsi que celle d'une isoforme de la DBE. Pour les dix isoformes de la β -amylase, l'expression de trois gènes est également réprimée. Seule l'expression de gènes codant pour des isoformes de l' α -amylase est induite (quatre isoformes sur sept). Ces modifications se retrouvent au niveau des activités enzymatiques avec une diminution de celle de la β -amylase et une augmentation de celle de l' α -amylase dans les feuilles infectées. Alors que la β -amylase est l'enzyme typiquement décrite comme étant impliquée dans la dégradation de l'amidon dans les feuilles (Lloyd *et al.*, 2005; Scheidig *et al.*, 2002), l' α -amylase semble jouer un rôle plus important dans les tissus puits (Lloyd *et al.*, 2005). Nos résultats suggèrent que l'infection par *P. viticola* induit un changement de l'amylase utilisée pour la dégradation de l'amidon dans les feuilles : de l'enzyme "source" β -amylase à l'enzyme "puits" α -amylase. Ces changements au niveau transcriptionnel et enzymatique pourraient entraîner une perte d'efficacité de la dégradation de l'amidon expliquant les accumulations anormales observées.

En plus d'une dérégulation du métabolisme de l'amidon, l'infection des feuilles par des pathogènes comme des virus, des champignons, des bactéries et des oomycètes, peut induire une dérégulation du métabolisme des sucres solubles (Horst *et al.*, 2008; Jobic *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2010). Dans des feuilles de blé infectées par *Erysiphe graminis*, une accumulation de l'amidon est accompagnée par une accumulation de saccharose, fructose et glucose et une augmentation de l'activité invertase (Wright *et al.*, 1995). Une observation similaire a été faite pour les feuilles d'*A. thaliana* infectées par *Albugo candida* (Chou *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 1996). Enfin, dans les feuilles de tabac, *Phytophthora nicotianae* induit une diminution de l'export du saccharose et une accumulation des hexoses (Scharte *et al.*, 2005).

Pour les interactions plante - pathogène, les sucres jouent un double rôle. Ils servent au pathogène pour sa nutrition, permettant sa croissance et son développement, et à la plante comme une source d'énergie utile à la mise en place des réactions de défense. De plus, les sucres solubles sont reconnus en tant que molécules de signalisation (Roitsch, 1999) et, entre autres, ils régulent l'expression de gènes codant pour les protéines PR (Roitsch, 1999), induisent des gènes impliqués dans le métabolisme "puits", comme celui codant pour l'invertase, et répriment ceux liés au métabolisme "source", comme ceux impliqués dans l'activité photosynthétique (Rolland *et al.*, 2006).

Dans les feuilles de vigne infectées par *P. viticola* (7 jpi), les teneurs en glucose et fructose sont élevées à l'obscurité, alors que celle en saccharose est diminuée à la lumière. Ces évolutions s'accompagnent de changements d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du saccharose. En effet, l'analyse transcriptomique a révélé que l'expression de gènes codant pour quatre isoformes de la saccharose-phosphate synthétase (SPS) est réprimée dans les feuilles infectées alors que celle

de sept des neuf gènes codant pour des isoformes de l'invertase est induite. Ces variations ont été validées par qRT-PCR pour des gènes codant pour une SPS et une invertase. Nos résultats sont conformes à ceux de Hayes *et al.* (2010), qui ont décrit une augmentation de l'expression de gène codant pour une invertase pariétale dans des feuilles de vigne infectées par *P. viticola*.

L'invertase existe sous plusieurs isoformes avec des localisations cellulaires, des pH optima et des points iso-électriques différents. L'activité de l'invertase a donc été mesurée dans les fractions soluble et insoluble d'un extrait protéique de feuilles témoins et infectées. Seule la fraction insoluble a présenté, à pH neutre, une activité invertase plus forte dans les feuilles infectées (activité croissante au cours de l'infection). Une augmentation de l'activité invertase a été décrite dans de nombreuses interactions plantes - pathogènes comme dans les plantes infectées par des virus (Herbers *et al.*, 2000), des bactéries (Sturm et Chrispeels, 1990) et des champignons (Benhamou *et al.*, 1991; Fotopoulos *et al.*, 2003; Voegelé *et al.*, 2006). Dans ces interactions, l'invertase semble jouer un rôle essentiel dans la mobilisation de l'énergie pour le pathogène ou l'hôte et son activité est centrale lors de la transition source - puits dans les feuilles infectées. Comme la plante et le pathogène possèdent des isoformes de cette enzyme, il est souvent difficile de déterminer l'origine de l'activité enzymatique observée pendant l'interaction. *P. viticola* étant un biotrophe obligatoire, il a été impossible de détecter spécifiquement l'activité invertase chez cet oomycète. Dans le génome de l'oomycète *P. infestans*, il existe une séquence codant pour une invertase à partir de laquelle nous avons réalisé des amorces spécifiques. Celles-ci nous ont permis de suivre l'expression d'une invertase du pathogène au cours de l'infection des feuilles de vigne. Les analyses ont montré une augmentation de l'expression du gène à partir de 5 jpi. Il semblerait que l'expression soit plus marquée à l'obscurité. Ces observations, ajoutées à celles d'une accumulation des hexoses de nuit et une diminution du saccharose de jour dans les feuilles infectées, sont peut-être à associer à des différences jour / nuit dans les phases de développement de *P. viticola*. Cette hypothèse concorde avec l'observation que le pathogène sporule pendant la nuit (Rumbolz *et al.*, 2002). Généralement, les invertases pariétales végétales sont décrites comme ayant un pH optimum plutôt acide (Roitsch *et al.*, 2003). Les invertases solubles et pariétales trouvées dans les feuilles de vigne par Ruffner *et al.* (1990) avaient un pH optimum acide. De plus, l'invertase de *P. viticola* serait également plutôt acide, d'après les homologues de séquence de ce gène avec celles des bases de données. Curieusement, seule l'activité de l'invertase insoluble à pH 7,5 augmente dans les feuilles infectées. Une invertase pariétale végétale avec un pH optimum neutre n'a été préalablement décrite que dans un cas : dans des cultures cellulaires de riz (Hsiao *et al.*, 2002). Malheureusement, il n'a pas été possible de purifier l'invertase en question afin de mieux étudier ses caractéristiques (données non présentées). Nous ne pouvons donc pas conclure si l'activité observée correspond à une invertase particulière présente chez la vigne ou à une isoenzyme du pathogène.

En plus d'une augmentation de l'expression du gène codant pour l'invertase pariétale, Hayes *et al.* (2010) ont observé un effet de l'infection des feuilles de vigne par

P. viticola sur l'expression du gène codant pour le transporteur d'hexose *VvHT5*. L'expression de ce gène est également fortement induite dans les feuilles infectées au cours de l'infection dans nos conditions (données non présentées). Ces observations suggèrent des changements de transport des hexoses à travers la membrane plasmique. La plante pourrait induire ces transporteurs afin d'augmenter l'import des hexoses servant à la mise en place des réactions de défense.

Le métabolisme du tréhalose est également altéré dans les feuilles infectées. Ce disaccharide n'a pu être détecté dans les feuilles témoins, alors qu'il s'accumule au cours de l'infection. Dans les feuilles infectées, l'étude transcriptomique a montré une diminution de l'expression des gènes codant pour quatre isoformes de la tréhalose phosphate synthétase (parmi les 14 annotés sur la puce) et l'induction de l'expression de celui codant pour une tréhalase. Cette dernière observation a été validée par qRT-PCR. Ces modifications s'accompagnent d'une augmentation de l'activité de la tréhalase dans les feuilles infectées. De la même façon, Brodmann *et al.* (2002) ont observé une accumulation du tréhalose dans les racines d'*A. thaliana* infectées par *Plasmodiopara brassicae*, avec l'activation d'une tréhalase aux niveaux transcriptionnel et enzymatique. Les auteurs ont suggéré que la plante induit la tréhalase afin de se protéger des effets du tréhalose produit par le pathogène.

Une augmentation de la teneur en tréhalose dans les feuilles de vigne infectées par *P. viticola* a déjà été décrite par Brem *et al.* (1986) au moment de la sporulation. Les auteurs ont attribué la production du tréhalose au pathogène, ce sucre n'étant pas connu chez les plantes à cette époque-là. Depuis, les gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme du tréhalose ont été identifiés chez les plantes (Paul, 2007) où ce sucre jouerait un rôle dans la régulation de la croissance, du développement et du métabolisme (Goddijn et Smeekens, 1998). L'expression de ces gènes induite en réponse à des stress abiotiques (le froid, la sécheresse et la salinité) et les altérations du métabolisme de tréhalose s'accompagnent généralement d'une accumulation de ce sucre (Fernandez *et al.*, 2010). Le tréhalose semble également impliqué dans les interactions plante - pathogène (Fernandez *et al.*, 2010). Peu d'études ont décrit une accumulation de tréhalose dans les organes infectés par les pathogènes (Fernandez *et al.*, 2010). Chez *Arabidopsis* il active l'expression de gènes codant pour des facteurs de transcription liés à la défense et une protéine PR (Schluepmann *et al.*, 2004). Chez le blé, il confère une protection contre *Blumeria graminis* via la formation de papilles, la production d' H_2O_2 et une augmentation des activités PAL et peroxydases (Renard-Merlier *et al.*, 2007). Chez le pathogène *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, le tréhalose est produit par le pathogène en réaction à un stress osmotique (Kurz *et al.*, 2010) et semble important pour l'infection des feuilles de tomate (Freeman *et al.*, 2010).

De plus, comme le tréhalose est très peu présent chez la plupart des plantes, on lui attribue un rôle de signalisation plutôt qu'une fonction énergétique (Paul, 2007). Chez *Arabidopsis*, un apport de tréhalose induit l'expression du gène codant pour l'ApL3, et augmente l'activité de l'AGPase, provoquant une augmentation de

la production d'amidon (Fritzius *et al.*, 2001; Kolbe *et al.*, 2005; Ramon et Rolland, 2007; Wingler *et al.*, 2000). Dans les racines du soja, il modifie les activités de la saccharose synthétase et de l'invertase (Müller *et al.*, 1998). Le tréhalose 6-phosphate, précurseur du tréhalose, joue également un rôle important dans la régulation du métabolisme de la plante. Ce sucre régule la synthèse de l'amidon par un mécanisme de régulation rédox de l'AGPase (Kolbe *et al.*, 2005; Lunn *et al.*, 2006; Schlupepmann *et al.*, 2003). Ainsi, on pourrait imaginer que l'accumulation du tréhalose joue un rôle dans la dérégulation des métabolismes de l'amidon et des sucres solubles dans les feuilles de vigne infectées par *P. viticola*. Cependant, nous ne sommes pas en mesure de déterminer s'il est d'origine végétale ou pathogène. Enfin, il aurait été intéressant de déterminer aussi les teneurs en tréhalose 6-phosphate au cours de l'infection car lui aussi pourrait jouer un rôle majeur dans les dérégulations observées.

Les voies métaboliques de l'amidon et des sucres solubles étant régulées par le rythme circadien (Graf et Smith, 2011; Lu *et al.*, 2005; Smith et Stitt, 2007; Smith *et al.*, 2004; Zeeman *et al.*, 2007), l'expression des gènes et les activités enzymatiques ont été étudiées à l'obscurité et à la lumière. Dans nos conditions, certains gènes tels que ceux codant pour la β -amylase (plus exprimé à l'obscurité); l'invertase et la tréhalase (plus exprimés à la lumière) ont montré une régulation jour / nuit qui n'a pas été altérée par l'infection. Toutefois, la présentation graphique que nous avons choisie pour ces résultats ne permet pas de visualiser cette régulation, puisque les valeurs sont rapportées à celles des témoins. Parmi les activités enzymatiques mesurées, seule celle de la β -amylase a montré une régulation circadienne dans les feuilles témoins. Comme cela a été décrit ci-dessus, la régulation circadienne de l'expression de gènes ne se retrouve souvent pas pour les activités enzymatiques qui sont fortement régulées par des modifications post-traductionnelles (Lu *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2004).

Dans les interactions entre une plante et un pathogène biotrophe, une augmentation de l'activité invertase et une accumulation des hexoses sont souvent corrélées à une diminution de la photosynthèse. L'analyse transcriptomique a montré que l'expression des gènes codant pour une chlorophylle synthétase, une chlorophylle a / b binding protein et des sous-unités de la Rubisco est réprimée dans les feuilles infectées, alors que celle d'un gène codant pour une chlorophyllase est induite. Ces observations ont été corrélées avec une diminution de la teneur en chlorophylle dans les feuilles infectées par *P. viticola*, comme décrit précédemment par Moriondo *et al.* (2005).

L'analyse de paramètres photosynthétiques des feuilles témoins et infectées, obtenus à partir de l'analyse de la fluorescence de la chlorophylle, a montré des différences entre les taches d'huile et les feuilles témoins. Dans les taches d'huile, mais pas dans les zones adjacentes d'une feuille infectée, on observe une diminution du rendement quantique maximal ($\frac{F_v}{F_m}$) et opérationnel (Φ_{PSII}) et du quenching photochimique ainsi qu'une augmentation du quenching non-photochimique. Pour l'interaction vigne - *P. viticola*, Cséfalvay *et al.* (2009) ont identifié $\frac{F_v}{F_m}$ et Φ_{PSII} comme les

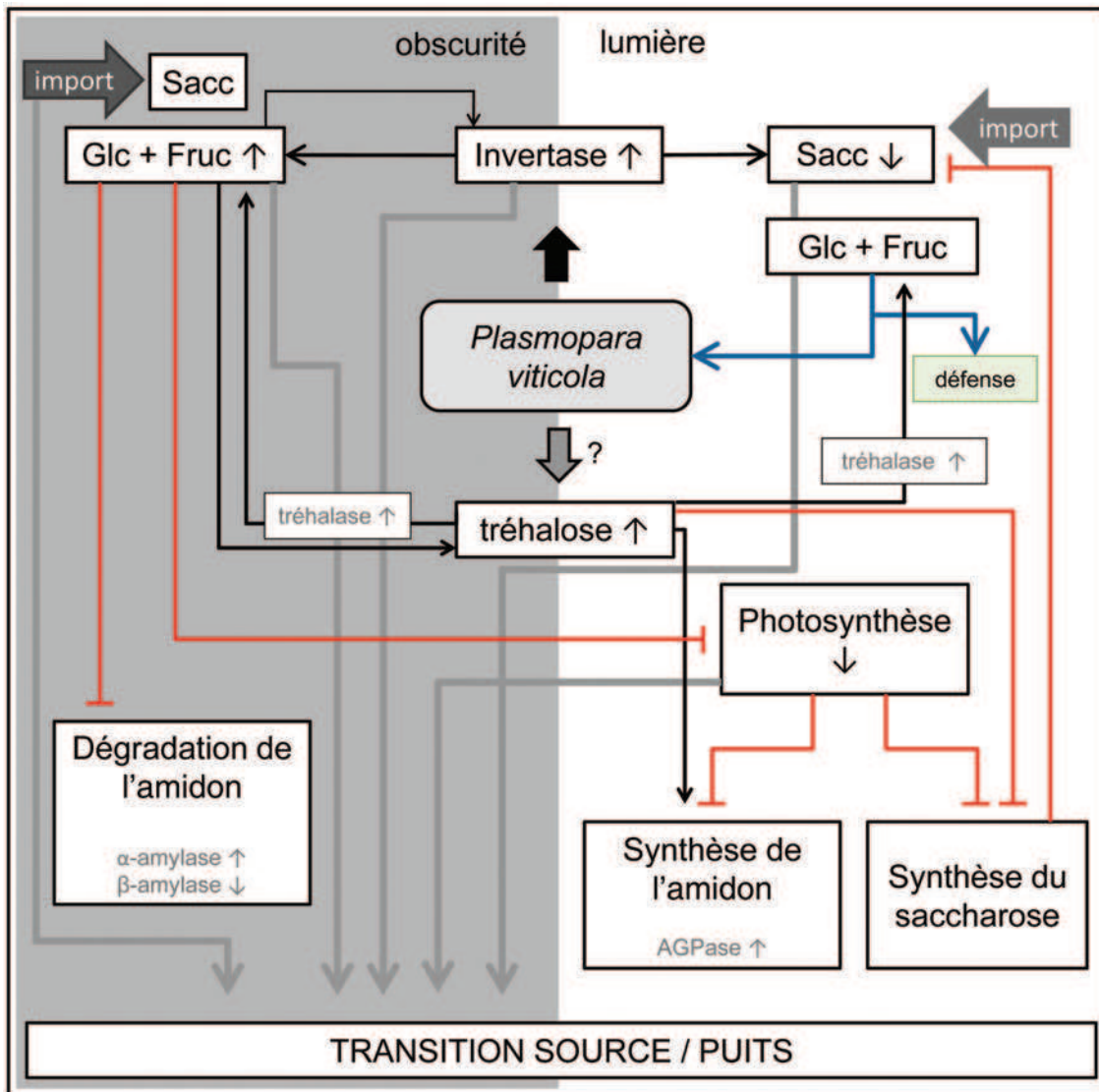


FIGURE 40 – Représentation schématique des relations hypothétiques entre les effets observés au niveau du métabolisme des carbohydrates et au niveau de la photosynthèse lors de l'infection d'une feuille de vigne par *P. viticola*.

paramètres photosynthétiques les plus sensibles à l'infection dans leurs conditions. Ils ont observé une diminution de ces valeurs à partir de 3 jpi, 2 jours avant l'apparition des symptômes. Des observations similaires ont pu être faites dans nos conditions, même si le cycle d'infection était plus court. Comme nous, Cséfalvay *et al.* (2009) ont localisé la diminution de $\frac{Fv}{Fm}$ dans les taches d'huile. Paradoxalement, Moriondo *et al.* (2005) n'ont pas détecté de différence de cette valeur entre les feuilles témoins et les feuilles infectées. Une diminution de la valeur de $\frac{Fv}{Fm}$ a souvent été décrite pour des plantes exposées aux stress biotiques et abiotiques. Au niveau des feuilles infectées par des champignons bio- et nécrotrophes, on note souvent une diminution de l'activité photosynthétique (Berger *et al.*, 2007; Chou *et al.*, 2000; Scharte *et al.*, 2005; Swarbrick *et al.*, 2006) corrélée à une diminution de la teneur en chlorophylles (Scholes *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1995). Dans les feuilles d'orge infectées par *Blumeria graminis*, la diminution de l'activité photosynthétique est corrélée avec une augmentation de l'activité invertase, une accumulation d'hexoses et une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la photosynthèse (Swarbrick *et al.*, 2006). Ces événements sont à la base des altérations de la production et du transport des sucres et marquent une transition source - puits dans les tissus infectés (Walters et McRoberts, 2006). Nous avons observé l'ensemble de ces événements dans les feuilles de vigne infectées par *P. viticola*.

L'analyse des différences dans l'expression de gènes, activité photosynthétique et activité invertase entre les taches d'huile et les zones adjacentes de la même feuille vont dans le même sens. Même si quelques modifications étaient faiblement visibles dans les zones adjacentes, ces effets étaient probablement liés à la difficulté technique de prélever spécifiquement ces deux zones.

La figure 40 résume les événements observés dans les feuilles de vigne infectées par *P. viticola* au niveau du métabolisme de l'amidon, du saccharose, du tréhalose et de la photosynthèse. Même si les résultats obtenus lors de cette thèse ne permettent pas de conclure sur les relations entre les différentes dérégulations observées et leur enchaînement, il est possible de formuler des hypothèses sur la base de la littérature.

L'infection de la feuille par *P. viticola* induit l'activité d'une invertase (d'origine végétale ou pathogène). De jour, celle-ci pourrait entraîner une dégradation accrue du saccharose, donc la diminution de sa concentration. Les hexoses libérés pourraient être utilisés par *P. viticola* pour sa nutrition et / ou par la plante pour ses défenses. L'accumulation des hexoses de nuit pourrait s'expliquer par une diminution de leur mobilisation par le pathogène et / ou par la plante.

Les hexoses pouvant réguler l'expression de gènes impliqués dans la photosynthèse (Dai *et al.*, 1999; Krapp *et al.*, 1993), ils pourraient être impliqués dans la diminution de l'activité photosynthétique. Les gènes codant pour des protéines impliquées dans la photosynthèse sont régulés par des rythmes circadiens et par les teneurs en hexoses et montrent une expression maximale en début de journée (Covington *et al.*, 2008). Le glucose, qui est accumulé à la fin de la nuit, pourrait réprimer l'expression matinale des gènes codant pour la chlorophylle a / b binding protein et des sous-unités de la Rubisco (Krapp *et al.*, 1993) et ainsi entraîner la

réduction de la photosynthèse. De plus, les hexoses induisent l'activité invertase chez certaines plantes (Cheng *et al.*, 1999), ce qui pourrait entraîner une auto-activation de celle-ci. Les hexoses pourraient également servir à la plante ou au pathogène comme substrats pour la synthèse du tréhalose, qui s'accumule dans les feuilles infectées. Le tréhalose a été décrit comme pouvant inhiber la synthèse du saccharose (Müller *et al.*, 1998) et induire la synthèse de l'amidon par activation de l'AGPase (Fritzius *et al.*, 2001; Kolbe *et al.*, 2005; Ramon et Rolland, 2007; Wingler *et al.*, 2000). Sa dégradation par la tréhalase libère du glucose qui vient enrichir le pool de glucose libéré *via* l'invertase. La diminution de la photosynthèse réduit la disponibilité en énergie et en substrats pour la production de l'amidon et du saccharose et ceci pourrait accentuer la diminution de la teneur en saccharose de jour. Les besoins en sucres des régions infectées pourraient être satisfaits par un arrêt de l'export et une augmentation de l'import du saccharose. L'accumulation de l'amidon observée pourrait résulter de la combinaison d'une synthèse accrue induite par une activité AGPase plus importante et d'une réduction de sa dégradation liée à une modification de la voie catabolique (rôle de l' α -amylase).

Les altérations décrites ci-dessus dans les feuilles infectées ont été surtout observées aux stades tardifs de l'infection, à 5 et 7 jpi. L'estimation du développement de l'oomycète par coloration au bleu d'aniline et la mesure du coefficient d'infection ont confirmé qu'à ce stade, les feuilles étaient fortement colonisées par le pathogène. À 7 jpi, stade auquel la plupart des modifications ont été observées, *P. viticola* forme des structures sous-stomatiques et semble préparer sa sporulation. On pourrait donc supposer que les altérations observées sont corrélées à une forte mobilisation d'énergie par le pathogène afin de préparer ce stade clé. Une contrainte de ces analyses est l'utilisation de feuilles entières. Il est possible que les modifications décrites surviennent dans les taches d'huiles plus tôt pendant l'infection, mais ne soient pas détectées au niveau de la feuille entière à cause d'un effet de "dilution" par les tissus non-infectés. Les analyses de l'expression de gènes, de l'activité invertase et de la teneur en amidon ont montré des différences entre les taches d'huile et les zones adjacentes. Malheureusement, cette séparation des tissus n'est possible que dans les stades tardifs de l'infection, quand les symptômes sont déjà bien visibles sur la feuille et ne permet donc pas de vérifier l'existence d'une dérégulation dans les temps précoces après inoculation. De plus, la présence du pathogène dans les zones sans symptômes ne peut pas être exclue. D'ailleurs, des analyses supplémentaires ont montré la présence d'ARN du pathogène dans certains échantillons (données non présentées). Ainsi, les hyphes de l'oomycète qui envahissent les tissus adjacents à une "tache d'huile" pourraient déjà induire des modifications locales avant apparition des symptômes.

Perspectives

L'accumulation de l'amidon dans les taches d'huile pourrait être due en partie à une augmentation de l'activité de l'AGPase dans les feuilles infectées. L'expression des gènes codant pour les grandes sous-unités ApL1 est réprimée, mais l'activité enzymatique plus forte de l'AGPase pourrait résulter d'une modification de sa composition sous-unitaire. Afin de confirmer cette hypothèse il faudrait conduire une analyse plus fine de l'expression des gènes codant pour les autres sous-unités et comparer les caractéristiques des enzymes isolées des feuilles infectées et témoins, comme cela a déjà été réalisé chez *Arabidopsis* pour distinguer entre les AGPase "source" et "puits" (Crevillén *et al.*, 2003). De plus, il serait intéressant de quantifier des régulateurs allostériques et d'analyser l'état rédox pour étudier le rôle des autres mécanismes de régulation de l'AGPase dans les feuilles infectées.

La voie de dégradation de l'amidon semble également affectée par l'infection. La β -amylase, prédominante dans les feuilles, semble être "remplacée" par l' α -amylase, caractéristique des tissus puits. Afin de mieux caractériser ces modifications, il serait intéressant d'étudier plus en détail la composition en amylases des feuilles témoins et infectées, par exemple à l'aide d'une électrophorèse native suivie d'une détection spécifique de l'activité amylase, comme décrit par Lin *et al.* (1988). Il serait également possible de comparer les caractéristiques enzymatiques de ces amylases et leur activité.

Une accumulation de tréhalose a été observée dans les feuilles infectées, accompagnée d'une augmentation de l'activité tréhalase. D'après la littérature, le tréhalose et son précurseur, le tréhalose 6-phosphate, sont impliqués dans la régulation du métabolisme de l'amidon et des sucres solubles, ainsi que de la photosynthèse. Afin de compléter les analyses effectuées sur le métabolisme du tréhalose dans le contexte de cette thèse, il serait intéressant de quantifier le tréhalose 6-phosphate afin de déterminer s'il pourrait être également impliqué dans les modifications métaboliques observées dans les feuilles infectées. Dans ce contexte, il serait aussi intéressant d'étudier l'origine de la tréhalase pour déterminer si elle est produite par la plante dans le but de se protéger contre l'accumulation du tréhalose ou par le pathogène pour utiliser ce sucre comme source d'énergie.

Dans les feuilles infectées, on observe une augmentation d'une activité invertase dans la fraction insoluble, à pH 7,5. Curieusement, les invertases pariétales sont généralement décrites avec un pH optimum acide. Cette enzyme présente dans les feuilles infectées pourrait donc être une isoforme particulière ou une enzyme du pathogène. Les premiers essais que nous avons conduits pour isoler cette enzyme n'ont pas permis de la solubiliser suffisamment pour pouvoir étudier ses caractéristiques. L'étude de sa séquence en acides aminés par spectrométrie de masse et l'analyse des caractéristiques enzymatiques pourraient permettre d'élucider son origine et son implication dans l'infection.

L'activité invertase semble associée à une transition source-puits qui se manifeste également par une diminution de l'activité photosynthétique. D'après la littérature, la transition source-puits induite par l'infection d'une feuille par un pathogène bio-

trophe est souvent accompagnée par des changements du transport des sucres. Des expériences utilisant du saccharose marqué permettraient d'étudier les effets de l'infection sur les imports et exports de ce sucre dans les feuilles infectées et dans les taches d'huile. De plus, il serait intéressant d'étudier l'expression des gènes codant pour des transporteurs de sucres au cours de l'infection.

Afin de distinguer plus spécifiquement entre les tissus ou cellules infectées et non-infectées et dans le but d'observer le métabolisme des glucides également dans les cellules du pathogène, il serait possible d'utiliser la méthode de la microdissection par laser pour récupérer ces échantillons spécifiques (Chandran *et al.*, 2010; Fosu-Nyarko *et al.*, 2010; Klink et Matthews, 2008). L'expression de gènes dans ce matériel pourrait alors être spécifiquement analysée par des méthodes transcriptomiques.

II. Dérégulation stomatique

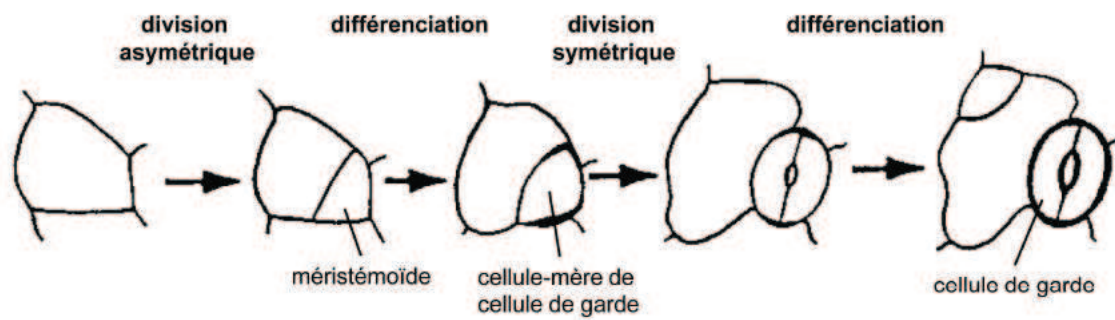


FIGURE 41 – Étapes du développement d'un stomate. D'après Zhao et Sack (1999).

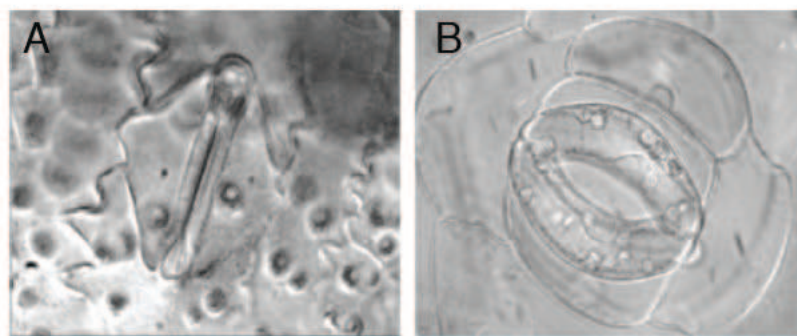


FIGURE 42 – Formes typiques des stomates. A : Cellules de garde en forme d'haltère chez le riz et B: cellules de garde en forme de haricot chez *Commelina*. D'après Hetherington et Woodward (2003).

Introduction

1 Les stomates

Les stomates sont des structures spécialisées localisées au niveau de l'épiderme et permettant les échanges gazeux (dioxyde de carbone, oxygène et vapeur d'eau) entre l'intérieur et l'extérieur de la plante. Ils sont constitués de deux cellules de garde qui entourent un pore, l'ostiole, et, en fonction de l'espèce, d'un certain nombre de cellules subsidiaires.

Lors du développement de la plante, les stomates sont formés au niveau des jeunes feuilles à partir d'une lignée cellulaire spécialisée (Figure 41). Il y a d'abord une division asymétrique pour produire une grande cellule, qui se différenciera en une cellule épidermique, et une plus petite cellule appelée méristémoïde. Le méristémoïde peut se diviser plusieurs fois, pour produire les cellules subsidiaires du complexe stomatique, avant de se différencier en cellule-mère des cellules de garde. Cette différenciation se termine par une division symétrique pour produire les deux cellules de garde (Bergmann et Sack, 2007). Le complexe stomatique qui en résulte prend différentes formes selon les espèces. Chez les dicotylédones, quatre classes peuvent être distinguées selon le nombre de cellules subsidiaires (Willmer et Fricker, 1996) : les stomates diacytiques sont entourés par deux cellules subsidiaires, les stomates paracytiques par une ou plusieurs et les stomates anisocytiques, présents typiquement chez les brassicacées, en possèdent trois. Les stomates anomocytiques (trouvés entre autres chez la vigne) sont entourés par des cellules épidermiques et n'ont pas de cellules subsidiaires. Les stomates sont toujours séparés par au moins une cellule épidermique. Ils sont localisés généralement à la face inférieure des feuilles (hypostomatique). Pour certaines plantes (par exemple les graminées et les conifères), ils peuvent se situer sur les deux faces (amphistomatiques) et, plus rarement, uniquement sur la face supérieure (feuilles épistomatiques).

Chez *Arabidopsis*, on trouve en moyenne 194 stomates.mm⁻² à la face inférieure et 103 stomates.mm⁻² à la face supérieure des feuilles (Willmer et Fricker, 1996). Chez *Vicia fabae*, il y en a en moyenne 75 stomates.mm⁻² à la face inférieure et 65 stomates.mm⁻² à la face supérieure (Meidner et Mansfield, 1968). Chez la vigne, les stomates se situent uniquement sur la face inférieure, avec une fréquence variant de 80 à 200 stomates.mm⁻², selon le cépage (Düring, 1980).

1.1 Les cellules de garde

Les graminées et quelques autres familles de monocotylédones possèdent des cellules de garde en forme d'haltères (Figure 42 A) alors que pour les autres espèces, les cellules de garde sont réniformes, constituant un stomate elliptique [Figure 42 B,

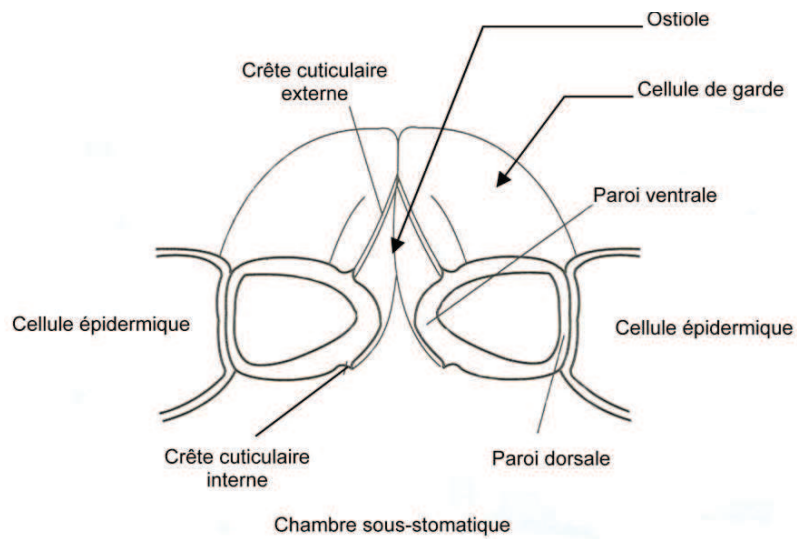


FIGURE 43 – Représentation schématique d'une coupe transversale de stomate et des cellules épidermiques voisines. D'après Willmer et Fricker (1996).

(Meidner et Mansfield, 1968)].

Les cellules de garde réniformes ont une taille variable selon les espèces [longueur entre 10 et 80 μm , largeur de quelques μm à 50 μm , (Willmer et Fricker, 1996)]. Leur morphologie et physiologie spécifiques permettent les mouvements d'ouverture et de fermeture par un changement de volume (Figure 43). Leur paroi ventrale, située à côté de l'ostiole, présente une épaisseur supérieure à celle de la paroi dorsale (Willmer et Fricker, 1996). Cette asymétrie pariétale conduit à une déformation particulière de ces cellules lors de l'entrée massive d'eau, ce qui permet l'ouverture des stomates (DeMichele et Sharpe, 1973).

Une paire de crêtes cuticulaires protège l'ostiole. Contrairement aux cellules épidermiques voisines, les cellules de garde contiennent des chloroplastes et sont riches en mitochondries, signe d'une importante activité métabolique de ces cellules (Willmer et Fricker, 1996). Leurs vacuoles changent de forme et de taille lors de mouvements stomatiques. Quand les stomates sont fermés, on trouve de nombreuses vacuoles de petite taille qui fusionnent entre elles pour former quelques vacuoles de grand volume lors de l'ouverture (Willmer et Fricker, 1996). Les cellules de garde "perdent" leurs plasmodesmes au cours de leur développement. En effet, les stomates immatures possèdent des connections avec les cellules adjacentes, mais ces plasmodesmes sont bouchés dans les cellules de gardes matures (Wille et Lucas, 1984; Willmer et Sexton, 1979).

1.2 Les mouvements stomatiques

L'ouverture et la fermeture stomatique sont finement régulées afin d'optimiser l'activité photosynthétique tout en limitant les pertes d'eau par transpiration (Roelfsema et Hedrich, 2005). Les mouvements des stomates sont provoqués par des changements de concentrations en osmolytes, responsables d'un influx ou d'un efflux d'eau qui modifie le volume et donc la forme des cellules de garde.

L'ouverture stomatique

L'ouverture des stomates résulte d'un influx d'eau dans les cellules de garde provoqué par une augmentation de la pression osmotique (Humble et Raschke, 1971). Différents stimuli induisent ce mécanisme, comme les auxines à faible concentration (Pemadasa, 1982), les cytokinines (Incoll et Whitelam, 1977), l'humidité élevée (Irving *et al.*, 1992), une concentration faible en CO_2 (Mansfield *et al.*, 1990) et la lumière (Willmer et Fricker, 1996). Les mécanismes d'ouverture des stomates induite par la lumière sont bien décrits et on peut distinguer la réponse des cellules de garde à la lumière bleue et à la lumière rouge.

La perception de la lumière bleue par des récepteurs membranaires des cellules de garde [phot1 et phot2, (Kinoshita *et al.*, 2001)] entraîne l'activation de la pompe H^+ -ATPase (Figure 44). Ce complexe protéique est activé par phosphorylation et par son interaction avec une protéine 14-3-3 (Kinoshita et Shimazaki, 1999, 2002). L'efflux massif de protons qui en résulte entraîne l'acidification de l'apoplasme et une hyperpolarisation de la membrane plasmique jusqu'à un potentiel membranaire

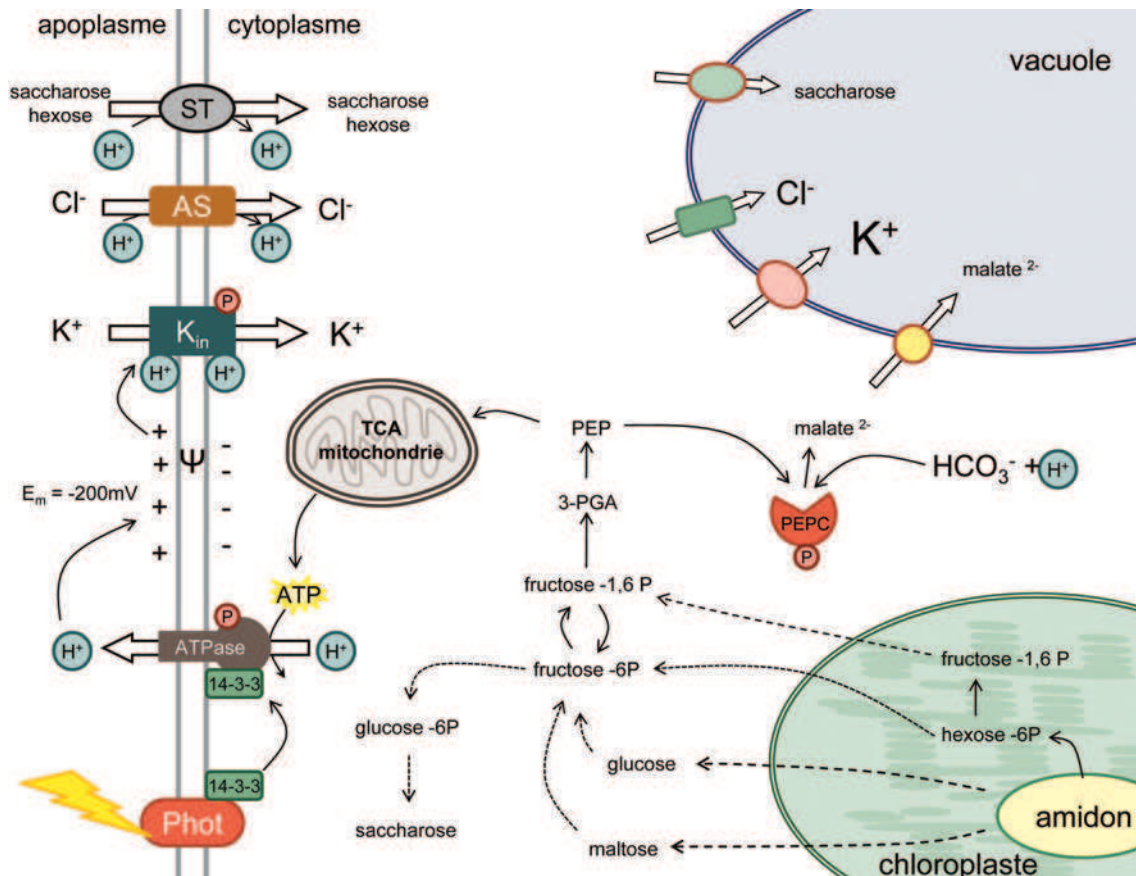


FIGURE 44 – Événements impliqués dans l'ouverture des stomates à la lumière. Après perception des longueurs d'ondes actives de la lumière par des cellules de garde, il y a stimulation de l' H^+ -ATPase. L'hyperpolarisation de la membrane plasmique résultante active des canaux K^+ à rectification entrante qui aboutit à une entrée massive d'ions K^+ dans le cytoplasme puis la vacuole. L'influx d'anions Cl^- et l'accumulation du malate²⁻ (issu de la dégradation de l'amidon) dans la vacuole qui compensent les charges positives du K^+ augmentent également la pression osmotique. Il y a alors une entrée massive d'eau, turgescence des cellules de garde et ouverture du stomate. Un import de saccharose dans le cytoplasme puis dans la vacuole participe également à la turgescence des cellules de garde. AS : transporteur (symport) d'anions, K_{in} : canaux K^+ à rectification entrante, PEPC : phosphoénolpyruvate carboxylase, Phot : récepteurs de la lumière, ST : transporteur de sucres, TCA : cycle de Krebs. Figure adaptée de Outlaw Jr. (2003).

de -200mV (Thiel *et al.*, 1992). Cette hyperpolarisation active les canaux K^+ à rectification entrante qui permettent l'entrée massive d'ions K^+ dans le cytoplasme suivant le gradient électrochimique (Grabov et Blatt, 1999; MacRobbie, 1998; Zeiger *et al.*, 1978). Le K^+ est ensuite transporté dans la vacuole contre son gradient de concentration (Shi et Zhu, 2002; Very et Sentenac, 2003; Willmer et Fricker, 1996).

L'accumulation de charges positives dans le cytoplasme est compensée, selon les espèces, par un influx d'anions Cl^- , probablement en symport avec H^+ (Outlaw Jr., 2003) et / ou par une accumulation du malate²⁻ issu de la dégradation de l'amidon. Dans les cellules de garde de nombreuses espèces, la régulation du métabolisme de l'amidon ne correspond pas à celle observée dans les cellules du mésophylle. En effet, dans les cellules de garde, l'amidon est accumulé dans les chloroplastes la nuit et dégradé le jour (Willmer et Fricker, 1996). La teneur en amidon d'une cellule de garde est donc inversement proportionnelle à l'ouverture stomatique (Outlaw et Manchester, 1979). Sa dégradation lors de l'ouverture stomatique permet à la fois la libération de l'énergie nécessaire aux transports actifs d'ions et la production du malate²⁻ (Asai *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2008; Vavasseur et Raghavendra, 2005). Le malate²⁻ est produit dans le cytosol puis transporté dans la vacuole (Outlaw Jr., 2003). L'accumulation des ions (K^+ , Cl^- , malate²⁻) dans la vacuole augmente la pression osmotique et abaisse le potentiel hydrique, entraînant une entrée d'eau. Il y a alors une augmentation de la turgescence des cellules de garde et ouverture du stomate (MacRobbie, 2006).

L'ouverture des stomates nécessite également de la lumière rouge dont le rôle reste discuté. D'une part, la lumière rouge pourrait avoir un rôle direct sur les cellules de garde *via* l'induction de la photosynthèse à leur niveau. D'autre part, elle pourrait avoir un rôle indirect *via* l'induction de la photosynthèse au niveau des cellules du mésophylle, entraînant une diminution de la concentration en CO_2 au niveau des chambres sous-stomatiques et une augmentation du saccharose dans l'apoplasme (Lawson, 2009; Shimazaki *et al.*, 2007). La cascade d'événements conduisant à l'ouverture stomatique en réponse à la lumière rouge est peu décrite mais elle semble indépendante d'un influx de potassium et de la dégradation de l'amidon (Vavasseur et Raghavendra, 2005), ce qui suggère qu'un autre composé osmotique participe à la turgescence des cellules de garde. Talbott et Zeiger (1993) ont montré l'accumulation du saccharose dans les cellules de garde lors de l'ouverture stomatique. Ce sucre peut être synthétisé par les cellules de garde à partir du glucose 1-phosphate résultant de leur activité photosynthétique et importé depuis l'apoplasme (Talbott et Zeiger, 1993).

Ainsi, l'ouverture stomatique à l'aube serait provoquée par l'influx d'ions K^+ en réponse à la lumière bleue. Au cours de la journée, le saccharose résultant de la photosynthèse deviendrait l'osmoticum prépondérant pour ce mécanisme (Shimazaki *et al.*, 2007; Talbott et Zeiger, 1996).

La fermeture des stomates

La fermeture des stomates est un processus beaucoup plus rapide que l'ouverture (Langer *et al.*, 2004). Elle est induite par différents stimuli comme l'obscurité, une

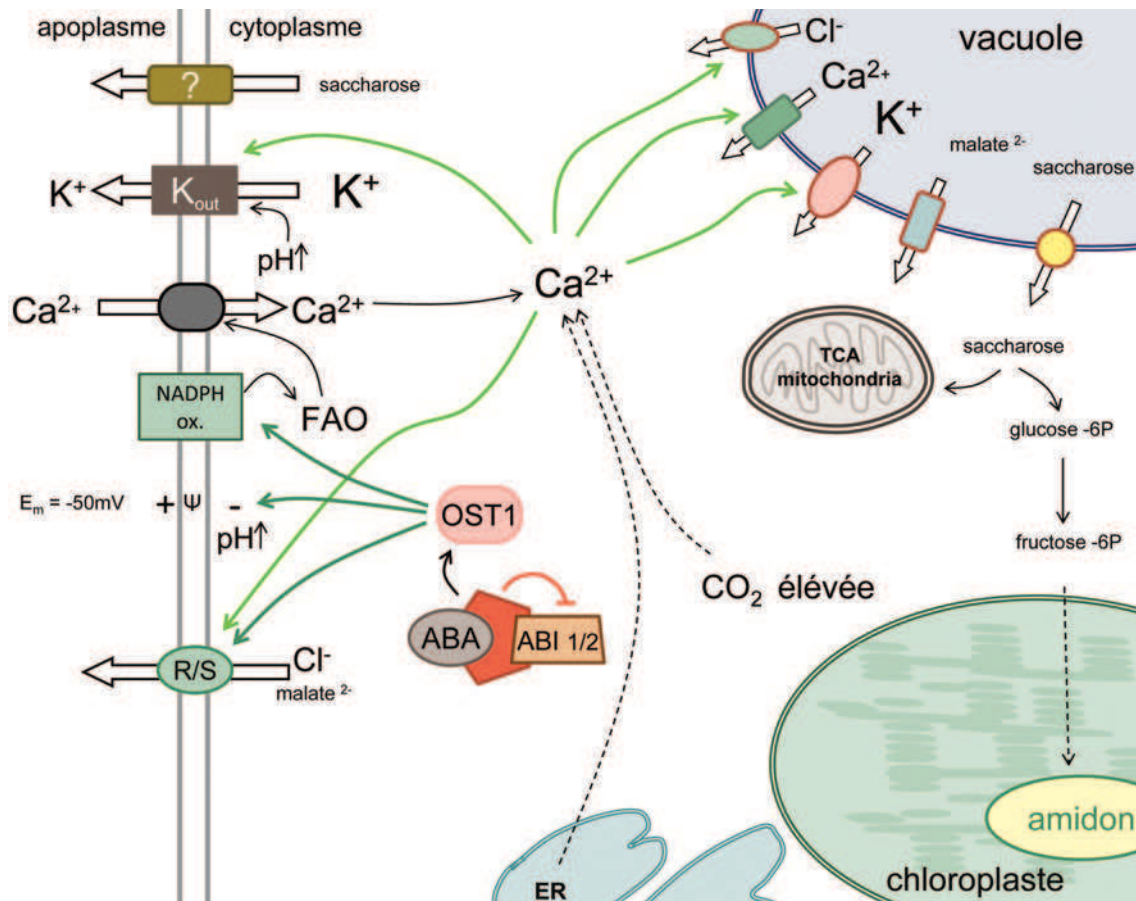


FIGURE 45 – Cascade d'événements conduisant à la fermeture des stomates induite par l'ABA. La perception de l'ABA par la cellule de garde induit une cascade d'événements dont l'activation de protéines kinases/phosphatases et une augmentation de la concentration en calcium libre cytosolique. Il y a arrêt de la stimulation de l' H^+ -ATPase, activation de canaux anioniques, inhibition des canaux K^+ à rectification entrante et activation des canaux K^+ à rectification sortante. Ces événements entraînent une diminution de la pression osmotique des cellules de garde induisant une sortie d'eau et la fermeture des stomates. ABI 1/2 : phosphatases de type 2C, ER : réticulum endoplasmique, FAO : formes actives d'oxygène, K_{out} : canaux K^+ à rectification sortante, NADPH ox. : NADPH oxidase, OST1 : protéine kinase SnRK2, R/S : canaux anioniques, TCA : cycle de Krebs. Figure adaptée de Outlaw Jr. (2003), (Park *et al.*, 2009) et Mori et Murata (2011).

concentration élevée en CO₂ (Mott, 1988), une faible humidité, un stress hydrique médié par l'acide abscissique (ABA), ou bien encore la présence de bactéries ou la reconnaissance d'un MAMP (Zhang *et al.*, 2008) (Figure 45).

Les mécanismes conduisant à la fermeture stomatique ont souvent été décrits en réponse à l'ABA. La perception de l'ABA au niveau des cellules de garde est longtemps restée obscure. Différentes hypothèses pour sa perception intra- ou extracellulaire ont été proposées [pour revue voir Hubbard *et al.* (2010); Mori et Murata (2011)]. Récemment, un récepteur spécifique de l'ABA (PYR1, Pyrabactin Resistance 1) a été décrit au niveau intracellulaire (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Dans le modèle proposé par Park *et al.* (2009), des phosphatases de type 2C (ABI1/2) inhibent la phosphorylation et donc l'activation d'une protéine kinase SnRK2 (OST1) (Vlad *et al.*, 2009). La liaison de l'ABA à son récepteur intracellulaire PYR1 inhibe ABI1/2 permettant ainsi l'activation de la protéine kinase OST1. Il y a alors phosphorylation de protéines en aval. OST1 stimule une NADPH oxydase, permettant ainsi la production des FAO (Sirichandra *et al.*, 2009) nécessaire à la fermeture stomatique induite par l'ABA (Kwak *et al.*, 2003). D'autres événements de la cascade de signalisation comme une production de NO et une augmentation de la concentration en Ca²⁺ semblent indépendants de la voie de signalisation d'OST1 (Hubbard *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2009). OST1 permet également l'arrêt de la stimulation de l'H⁺-ATPase et l'activation de canaux anioniques (Hubbard *et al.*, 2010) entraînant un efflux d'anions (malate²⁻ et Cl⁻). Ces événements conduisent à la dépolarisation de la membrane plasmique et donc l'inhibition des canaux K⁺ à rectification entrante. Des canaux K⁺ à rectification sortante sont activés et permettent la sortie des ions K⁺ de la cellule suivant le gradient de concentration (Outlaw Jr., 2003). La diminution de la pression osmotique vacuolaire entraîne un efflux d'eau, une perte de turgescence des cellules de garde et la fermeture des stomates (MacRobbie, 2006; Roelfsema *et al.*, 2004). Le devenir du saccharose lors de la fermeture stomatique reste obscur, il pourrait être exporté dans l'apoplasme ou métabolisé dans les cellules de garde (Vavasseur et Raghavendra, 2005).

1.3 Effet d'une infection sur le fonctionnement stomatique

Les stomates constituent des portes d'entrée et de sortie privilégiées pour de nombreux microorganismes qui les utilisent pour contourner la barrière cuticulaire et épidermique. Certains ont même développé des stratégies pour les manipuler, les déréguler à leur profit (Melotto *et al.*, 2008). Un dysfonctionnement stomatique induit lors d'une interaction plante / pathogène peut avoir des origines multiples.

Le pathogène peut modifier de façon indirecte le degré d'ouverture des stomates, par exemple en provoquant la mort des cellules épidermiques entourant les stomates (Prats *et al.*, 2006) ou en sécrétant des enzymes qui hydrolysent les parois des cellules de garde (Willmer et Fricker, 1996). Les stomates restent donc constamment ouverts. Des composés d'origine pathogène peuvent agir directement sur la signalisation ou les mécanismes d'ouverture / fermeture des stomates. La fusicoccine produite par le champignon *Fusicoccum amygdali* stimule l'H⁺-ATPase et bloque les stomates en

Tableau 10 – Composition des fluides apoplastiques. D'après Dietz (1997)

Composés	concentration [mM]	espèce	référence
métabolites			
acides aminés	3,1 ± 0,4	<i>Hordeum vulgare</i>	Lohaus <i>et al.</i> (1995)
	3,2 ± 0,8	<i>Spinacia oleracea</i>	
acide ascorbique	0,45	<i>Spinacia oleracea</i>	Takahama et Oniki (1992)
acide déhydroascorbique	0,07	<i>Spinacia oleracea</i>	Takahama et Oniki (1992)
fructose	1,0 ± 0,5	<i>Hordeum distichum</i>	Tetlow et Farrar (1993)
glucose	1,0 ± 0,4	<i>Hordeum distichum</i>	Tetlow et Farrar (1993)
	4,2 ± 2,3	<i>Hordeum vulgare</i>	Lohaus <i>et al.</i> (1995)
	0,5 ± 0,2	<i>Spinacia oleracea</i>	
	0,1 - 0,4	<i>Pisum sativum</i>	Aked et Hall (1993)
glutathion	6,5 μM	<i>Picea abies</i>	(Polle <i>et al.</i> , 1990)
malate	5,5 ± 1,4	<i>Hordeum vulgare</i>	Lohaus <i>et al.</i> (1995)
	0,6 ± 0,3	<i>Spinacia oleracea</i>	
saccharose	1,4 ± 0,4	<i>Hordeum distichum</i>	Tetlow et Farrar (1993)
Ions			
Chlorure	4 ± 1	<i>Spinacia oleracea</i>	Speer et Kaiser (1991)
	5 ± 2	<i>Pisum sativum</i>	
Magnésium	2 ± 1	<i>Spinacia oleracea</i>	Speer et Kaiser (1991)
Nitrate	8,9 ± 4,9	<i>Hordeum vulgare</i>	Lohaus <i>et al.</i> (1995)
	7,3 ± 4,0	<i>Spinacia oleracea</i>	
	6 ± 5	<i>Spinacia oleracea</i>	Speer et Kaiser (1991)
Phosphate	2,5 ± 0,4	<i>Hordeum vulgare</i>	Mimura <i>et al.</i> (1990)
Potassium	2,4 ± 11,8	<i>Pisum sativum</i>	Long et Widders (1990)
Sodium	1 ± 1	<i>Spinacia oleracea</i>	Speer et Kaiser (1991)
	2 ± 1	<i>Pisum sativum</i>	
Sulfate	0,4 à 1,6	<i>Spinacia oleracea</i>	Speer et Kaiser (1991)
		<i>Pisum sativum</i>	
Hormones			
Acide abscissique	20 - 100 nM	<i>Gossypium hirsutum</i>	Hartung <i>et al.</i> (1992)
Cytokinine	environ 10 nM	<i>Gossypium hirsutum</i>	Hartung <i>et al.</i> (1992)
Acide indole acétique	20 - 100 nM	<i>Gossypium hirsutum</i>	Hartung <i>et al.</i> (1992)

position ouverte (Oecking *et al.*, 1997; Piotrowski *et al.*, 1998). Un autre champignon, *Sclerotinia sclerotiorum*, produit, lors de l'infection de *V. faba*, de l'oxalate qui, *via* une accumulation de K^+ et de malate²⁻, maintient les stomates ouverts et contrecarre la fermeture induite par l'ABA (Guimarães et Stotz, 2004). La coronatine produite par la souche virulente *Pseudomonas syringae* DC3000 interfère avec la voie de signalisation de l'ABA et induit la réouverture des stomates (initialement fermés en réponse à la perception du MAMP flg22) et les maintient en position ouverte (Melotto *et al.*, 2006). Récemment, Gudesblat *et al.* (2009) ont décrit un facteur soluble de taille inférieure à 2 kDa produit par *Xanthomonas campestris* et capable d'interférer avec la fermeture stomatique induite par l'ABA ou par des PAMPs chez *Arabidopsis*.

Pour d'autres interactions, les origines de la dérégulation stomatique ne sont pas encore connues. L'infection des feuilles de pomme de terre par *Phytophthora infestans* entraîne une ouverture anormale dans les zones infectées avant nécrose. Les stomates restent ouverts de nuit mais se ferment en réponse à un stress hydrique (Farrell *et al.*, 1969). Un effet similaire a été observé lors de l'infection du concombre par *Pseudoperonospora cubensis* (Lindenthal *et al.*, 2005; Oerke *et al.*, 2006). Chez *Vitis vinifera*, une dérégulation stomatique au niveau des feuilles infectées par *Plasmopara viticola* a été observée (Allègre, 2007; Allègre *et al.*, 2007). A partir de trois jours post-inoculation (jpi), la transpiration nocturne est anormalement élevée et augmente au cours de l'infection. Les stomates dérégulés ne se ferment plus en réponse à un stress hydrique, ni à une absorption pétiolaire d'ABA. Les facteurs responsables de ces ouvertures anormales restent inconnus.

2 L'apoplasme

Les termes "apoplasme" et "symplasma" ont été définis pour distinguer les deux voies de transport dans la plante. Le transport symplastique est réalisé à l'intérieur des cellules, dans le continuum du cytoplasme généré par de nombreux plasmodesmes qui connectent les cellules. La voie apoplastique se fait à l'extérieur des cellules. L'apoplasme inclut les parois, les espaces intercellulaires et, pour certains auteurs, la sève brute. Il représente 5 à 10 % de la matière fraîche (Sattelmacher, 2001). Sa composition moléculaire et ses activités biochimiques sont déterminées par plusieurs facteurs comme les caractéristiques physico-chimiques des parois cellulaires, les caractéristiques de transport des membranes plasmiques des cellules voisines, l'importance des phénomènes d'exo- et d'endocytose et du transport de l'eau et de solutés dans le continuum xylème-apoplasme (Dietz, 1997). Ces paramètres sont eux-mêmes variables et dépendent des facteurs environnementaux (stress biotiques et abiotiques), mais aussi des cellules, tissus et/ou organes considérés. Ainsi, l'apoplasme ne doit donc pas être considéré comme un compartiment uniforme mais plutôt comme un ensemble de "micro-milieus" (Dietz, 1997) qui détermine l'environnement cellulaire (Grignon et Sentenac, 1991). L'apoplasme contient des molécules solubles et insolubles : des ions, des hormones, des acides aminés, des sucres et des protéines (Tableaux 10, 11) (Dietz, 1997). Il participe entre autres à la régula-

Tableau 11 – Protéines identifiées dans les fluides apoplastiques. D'après Dietz (1997)

Protéine	Fonction
Chitinase	hydrolyse des parois fongiques
Défensine	défense contre les pathogènes
Extensines	structure de la paroi, régulation de l'allongement cellulaire
Invertase	dégradation du saccharose
β 1-3,1-4-glucanase	hydrolyse des parois végétales
β 1-3-glucanase	dégradation des parois fongiques
Protéines riches en glycine	lignification
Hydrolases	dégradation de la paroi végétale pendant la croissance cellulaire
Protéines riches en hydroxyproline	défense contre les pathogènes
Protéines de transfert de lipides	défense contre les pathogènes
α -mannosidase	défense contre les pathogènes
Osmotine	rôle anti-fongique?
Péroxydase	cross-linking de la paroi, lignification
Phosphatase	hydrolyse des phosphates organiques
Protéines riches en proline	structure de la paroi
Protéase	dégradation des protéines (défense, senescence)
Superoxyde dismutase	stress oxydatif
Thionine	défense contre les pathogènes

tion de la croissance cellulaire (Sakurai, 1998). Il joue, en plus, un rôle structurel de “squelette” et d’adhésion entre les cellules et un rôle de protection vis-à-vis des stress abiotiques et biotiques. De plus, il constitue une voie de transport des ions, des sucres, des hormones et des gaz. Enfin, il permet l’homéostasie du pH et des concentrations ioniques et la régulation de la teneur en eau des cellules.

2.1 Composition

L’eau

L’apoplasme de la feuille peut contenir 5 à 20 % de l’eau totale, ce qui correspond à un volume de 53 à 200 $\mu\text{l.g}^{-1}$ de poids frais (Luwe et Heber, 1995; Winter *et al.*, 1994). Ce volume est relativement petit et de légères modifications de transport des ions ou des molécules à travers les membranes plasmiques peuvent provoquer de grandes variations de leur concentration apoplastique (Grignon et Sentenac, 1991). Les cellules peuvent ainsi réguler rapidement leur potentiel osmotique et donc leur turgescence (Netting, 2002), comme décrit ci-dessus pour les cellules de garde.

Les gaz

Les gaz (par exemple : CO_2 , N_2 , O_2 , vapeur d’eau) représentent 18 à 46 % du volume foliaire total (Dietz, 1997; Luwe et Heber, 1995). La composition apoplastique dépend surtout de l’atmosphère extérieure et de la diffusion à travers les stomates. Certains gaz comme l’ozone et le dioxyde de soufre sont toxiques pour la plante et induisent un stress abiotique. Ils doivent donc être détoxifiés rapidement dans l’apoplasme afin d’éviter des dommages pour les cellules (Dietz, 1997).

Les ions

La concentration en ions de l’apoplasme peut être importante et leur diffusion / transport à travers la membrane plasmique est le facteur déterminant pour la turgescence des cellules. Pour certains ions, par exemple H_2PO_4^- et NH_4^+ , leur concentration apoplastique est régulée de façon à être maintenue constante (Mimura *et al.*, 1990; Nielsen et Schjoerring, 1998). À l’inverse, les concentrations apoplastiques des feuilles en Na^{2+} et K^+ varient en fonction de la nutrition minérale (James *et al.*, 2006; Long et Widders, 1990; Mühlhling et Sattelmacher, 1997).

La composition ionique de l’apoplasme de la feuille est modulée par l’absorption sélective des ions au niveau des racines, leur transport par le xylème et l’importance d’échanges à travers les membranes (Sattelmacher, 2001). Afin d’éviter leur accumulation qui serait toxique, des ions sont soit absorbés rapidement par les cellules et internalisés dans la vacuole, soit réexportés vers le phloème, soit précipités sous forme de cristaux (comme, par exemple, l’oxalate de calcium) ou bien encore incorporés dans l’épiderme et les trichomes (Sattelmacher, 2001). Les concentrations ioniques apoplastiques foliaires sont difficiles à déterminer et, selon les auteurs, les valeurs obtenues sont très variables. Par exemple, pour le K^+ des valeurs entre 20

μM et 200 mM ont été trouvées (Grignon et Sentenac, 1991), ce qui résulte probablement des variations dans l'importance des flux de cet ion et des différentes techniques et plantes utilisées pour ces études (Mühling et Sattelmacher, 1997).

Les caractéristiques de la paroi permettent l'accumulation de cations et l'exclusion d'anions (Grignon et Sentenac, 1991). Même s'ils sont facilement libérés, une partie des cations bivalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) est retenue par des interactions électrostatiques ou piégée dans des liaisons entre molécules (Grignon et Sentenac, 1991; Mühling et Sattelmacher, 1995). L'apoplasme est considéré comme un lieu de stockage pour ces ions qui peuvent être libérés par une acidification du milieu (Grignon et Sentenac, 1991).

Les sucres

Une grande partie des sucres de l'apoplasme est immobilisée dans la paroi primaire puisqu'elle est composée de cellulose (un β -(1,4)-glycane), d'hémicelluloses (xyloglycanes, arabinoxylanes et mannanes), de pectines (arabinanes, homogalacturonanes et rhamnogalactanes) et de glycoprotéines (Burton *et al.*, 2010; Sattelmacher, 2001). L'apoplasme est aussi une voie importante de transport des sucres solubles pour beaucoup d'espèces. Il est d'ailleurs considéré par certains auteurs (Chikov et Bakirova, 2004) comme une zone "tampon" entre les tissus sources et puits permettant le stockage transitoire de ces molécules, même si la concentration en sucres solubles est plus faible que celle trouvée dans le symplasma ou la sève élaborée (Lohaus *et al.*, 1995). Les concentrations apoplastiques foliaires en saccharose, glucose et fructose sont variables selon les espèces. La concentration en sucres varie entre 2 mM chez *V. faba*, une plante qui utilise la voie apoplastique pour charger le phloème, et $0,3\text{ mM}$ chez *Ocimum basilicum*, une espèce qui utilise la voie symplastique (Kang *et al.*, 2007b).

La teneur en sucres solubles est fortement modifiée lors d'une infection par un pathogène. Aked et Hall (1993) ont observé une accumulation de glucose et de saccharose dans l'apoplasme de feuilles de *Pisum sativum* infectées par *Erysiphe pisi*. Dans les fluides apoplastiques de feuilles de *Hordeum distichum* infectées par *Puccinia hordei*, les teneurs en saccharose, glucose et fructose sont réduites (Tetlow et Farrar, 1993). Lors de l'infection de feuilles de tomate par *Cladosporium fulvum*, Joosten *et al.* (1990) ont observé une réduction de la teneur en saccharose et une accumulation de glucose et fructose dans l'apoplasme. Comme il a été décrit dans le Chapitre 1, l'invertase pariétale joue un rôle important dans de nombreuses interactions plante - pathogène et est responsable de la dégradation du saccharose et d'une accumulation de fructose et glucose dans l'apoplasme.

Les acides organiques

Des acides organiques, dont le malate, l'ascorbate, le citrate, le fumarate et l'oxalate, sont sécrétés dans l'apoplasme (Dietz, 1997; Meyer *et al.*, 2010). Leurs fonctions y sont diverses. Le citrate et le malate jouent un rôle dans le transport du fer entre les racines et les feuilles. (Lopez-Millan *et al.*, 2000). L'ascorbate a une fonction

dans les réactions aux stress abiotiques et biotiques. Lors de la production de FAO dans l'apoplasme en réponse à un pathogène ou l'exposition à l'ozone, l'ascorbate sert à protéger la cellule végétale contre les effets oxydatifs (Luwe et Heber, 1995; Pignocchi et Foyer, 2003).

Les protéines

Une partie importante du protéome de la plante est localisée dans l'apoplasme (Lee *et al.*, 2004). 17% du génome d'*A. thaliana* code pour des protéines possédant un peptide signal de sécrétion (Jamet *et al.*, 2006). Des études comparant des protéomes pariétaux de différents organes d'une même plante ont montré que 50% du protéome apoplastique semble spécifique d'un organe donné (Jamet *et al.*, 2006). Les protéines apoplastiques peuvent être divisées en deux groupes : les protéines insolubles, qui sont immobilisées dans la paroi par des liaisons covalentes ou qui possèdent des domaines membranaires, et les protéines solubles peu associées à la paroi.

Les protéines insolubles ont souvent une fonction structurelle. Parmi elles, on trouve des protéines riches en proline, glycine ou hydroxyproline avec un taux important de glycosylation, ce qui leur confère une structure rigide (Cassab, 1998). Des enzymes sont également présentes dans l'apoplasme (Tableau 11) (Lee *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1989). Elles jouent un rôle dans la synthèse, l'organisation et la réorganisation de la paroi (Jamet *et al.*, 2008). De plus, certains peptides apoplastiques et des protéines arabinogalactanes (composées de 90% de glucides) ont été décrits comme des molécules de signalisation régulant des processus cellulaires, comme la multiplication et la différenciation (Ellis *et al.*, 2010; Matsubayashi et Sakagami, 1996; Pearce *et al.*, 1991).

Les protéines apoplastiques jouent vraisemblablement un rôle important en situation de stress abiotique. En effet, différents stimuli, comme l'exposition à l'ozone, aux métaux lourds, au froid ou à un stress hydrique induisent des changements qualitatifs et quantitatifs des protéines (Guo et Song, 2009; Hiilovaara-Teijo *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004). Les protéines apoplastiques sont également des facteurs importants dans la défense contre les pathogènes. Comme cela a été décrit auparavant (Chapitre 1), des protéines comme des chitinases, glucanases et protéases, mais aussi des inhibiteurs d'enzymes pathogènes constituent un premier niveau de protection contre une infection (Hardham *et al.*, 2007; Lagaert *et al.*, 2009). Certaines de ces protéines sont décrites comme des protéines PR (entre autres les chitinases et β -(1,3)-glucanases) dont la production et la sécrétion dans le milieu extracellulaire sont induites par les blessures, l'attaque par des insectes et l'infection par des champignons ou des oomycètes (Gau *et al.*, 2004; Hiilovaara-Teijo *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004; Misas-Villamil et van der Hoorn, 2008; Mithöfer *et al.*, 2002). En outre, il est à noter que beaucoup de pathogènes sécrètent des effecteurs apoplastiques comme des inhibiteurs de glucanases et de protéases, des transglutaminases et des petites protéines riches en cystéine, les élicitines (Kamoun, 2006).

2.2 Caractéristiques physico-chimiques

Structure de la paroi

La composition et l'interconnection des constituants des parois déterminent la structure pariétale locale qui peut dépendre des conditions environnementales, de l'état de développement d'un tissu et de la fonction spécifique des cellules adjacentes (Burton *et al.*, 2010). La structure pariétale influence les échanges de molécules entre l'apoplasme et les cellules et détermine la mobilité des substances dans l'apoplasme (Gilliham *et al.*, 2011). Ainsi, l'organisation des pectines influence la taille des pores permettant la diffusion à travers la paroi. Généralement, on trouve des pores de 3 à 8 nm (Grignon et Sentenac, 1991) qui permettent la diffusion libre des petites molécules. Le seuil théorique de taille maximale pour la diffusion d'une protéine est d'environ 45 kDa. Cependant, des protéines apoplastiques de taille pouvant atteindre 300 kDa ont été isolées (Dietz, 1997).

pH

Le pH de l'apoplasme peut varier de 4 à 7, mais pour la plupart des plantes, il se situe entre 5 et 6,5 (Grignon et Sentenac, 1991). Le pH influence le transport membranaire et régule des activités enzymatiques dans l'apoplasme, permettant une réaction localisée aux changements des conditions cellulaires (Grignon et Sentenac, 1991). Certains facteurs peuvent modifier le pH apoplastique. Par exemple, la lumière provoque une légère acidification due à un efflux de protons des cellules photosynthétiques (Grignon et Sentenac, 1991; Mühling et Läuchli, 2000). Des stress biotiques et abiotiques peuvent aussi modifier le pH apoplastique. Par exemple, l'infection des feuilles d'orge par *Blumeria graminis* induit une forte alcalinisation (Felle *et al.*, 2008). Un stress hydrique induit l'augmentation du pH apoplastique chez certaines plantes (comme la tomate) (Jia et Davies, 2007), ce qui pourrait influencer la distribution de l'ABA entre les cellules et l'apoplasme pour induire la fermeture stomatique. En effet, l'ABA est un acide faible qui s'accumule préférentiellement dans les compartiments alcalins (Hartung *et al.*, 2002).

Il existe aussi des gradients spatiaux de pH. Par exemple, l'apoplasme autour des cellules de garde est plus alcalin qu'autour des cellules épidermiques et le pH de la sève brute est généralement plus acide que celui de l'apoplasme de la feuille (Chikov et Bakirova, 2004; Jia et Davies, 2007; Mühling et Läuchli, 2000). Jia et Davies (2007) ont montré que la sève brute est alcalinisée au cours de son transport entre la racine et la feuille et que le taux de transpiration a un rôle important sur le pH de l'apoplasme foliaire. Ainsi, la vitesse de transpiration influence le pH de la sève brute (le pH est plus acide si la transpiration est plus rapide) (Jia et Davies, 2007).

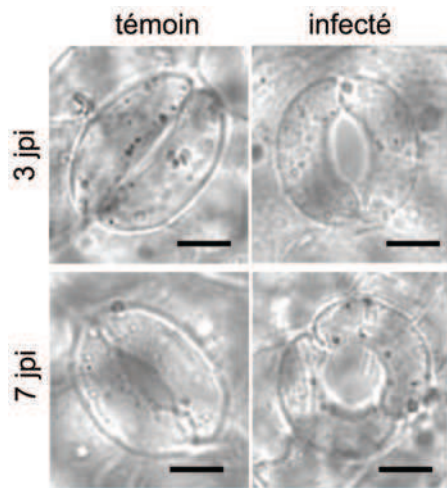


FIGURE 46 – Stomates de feuilles saines ou infectées par *P. viticola*, observées à l'obscurité. Photographies représentatives de stomates de feuilles saines ou infectées (3 et 7 jpi) observées au microscope après clarification au KOH. Les barres noires représentent 10 μm . Images adaptées de Allègre (2007)

2.3 Rôle dans la régulation des stomates

La composition de l'apoplasme foliaire n'est pas homogène et l'un des sous-milieux le mieux décrit est l'apoplasme des cellules de garde. Chez *Commelina communis*, De Silva *et al.* (1996) ont estimé, pour l'apoplasme des stomates ouverts, des concentrations similaires à l'apoplasme de la feuille pour le K^+ (50 mM), mais des concentrations beaucoup plus faibles en Ca^{2+} (0,05 mM en comparaison avec 4 mM). Ces concentrations changent lors des mouvements stomatiques. La fermeture stomatique induite par l'ABA ou l'obscurité provoque une diminution transitoire des teneurs en Ca^{2+} et H^+ , alors que les concentrations en K^+ et Cl^- augmentent (Felle *et al.*, 2000).

Les cellules de garde "matures" ne possédant pas de plasmodesmes (Wille et Lucas, 1984), les molécules externes intervenant dans l'ouverture / fermeture des stomates doivent passer par l'apoplasme. En effet, selon Mott (2009), la réponse des cellules de garde à la lumière et à la teneur en CO_2 serait complètement ou en grande partie contrôlée par le mésophylle, *via* des signaux émis dans l'apoplasme, bien que la nature de ces derniers reste méconnue. La composition ionique, le pH et l'état rédox de l'apoplasme pourraient aussi jouer un rôle important dans la régulation des mouvements stomatiques (Roelfsema et Hedrich, 2002). Chez *Vicia faba*, la concentration en saccharose de l'apoplasme des cellules de garde est corrélée à l'activité photosynthétique dans le mésophylle (Kang *et al.*, 2007a) et une accumulation du mannitol à ce niveau conduit à une réduction de la transpiration (Ewert *et al.*, 2000). Ce rôle des sucres dans la régulation des mouvements stomatiques a été montré pour les plantes qui chargent leur phloème par la voie apoplastique, mais peu de travaux ont été conduits sur les plantes qui utilisent la voie symplastique, comme la vigne. Seuls Kang *et al.* (2007b) ont montré que *Ocimum basilicum* accumulait beaucoup moins de sucres dans les fluides apoplastiques autour des cellules de garde et que, chez cette plante, les sucres n'auraient probablement pas d'effet sur l'ouverture stomatique.

Chez *Vitis vinifera*, une dérégulation stomatique au niveau des feuilles infectées par *Plasmopara viticola* a été observée (Allègre, 2007; Allègre *et al.*, 2007). Les stomates sont anormalement ouverts à l'obscurité (Figure 46) et ne se ferment plus en réponse à un stress hydrique ni à l'ABA appliqué par absorption pétiolaire. Cette dérégulation n'est pas irréversible car les stomates isolés des autres cellules foliaires (technique d'"épiderme isolé") se ferment de nouveau en réponse à l'ABA.

Différents arguments ont conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle un composé d'origine pathogène ou végétale pourrait être responsable de l'ouverture anormale des stomates (Allègre, 2007) et se situer dans l'apoplasme des feuilles infectées. Le premier objectif a été de mettre au point une méthode d'extraction des fluides apoplastiques de feuilles témoins et infectées par *P. viticola*, adapté à la vigne. L'effet de ces fluides sur les mouvements stomatiques a ensuite été testé en utilisant le modèle "épiderme isolé". Le deuxième objectif a été d'isoler le composé supposé responsable de la dérégulation stomatique afin de l'identifier.

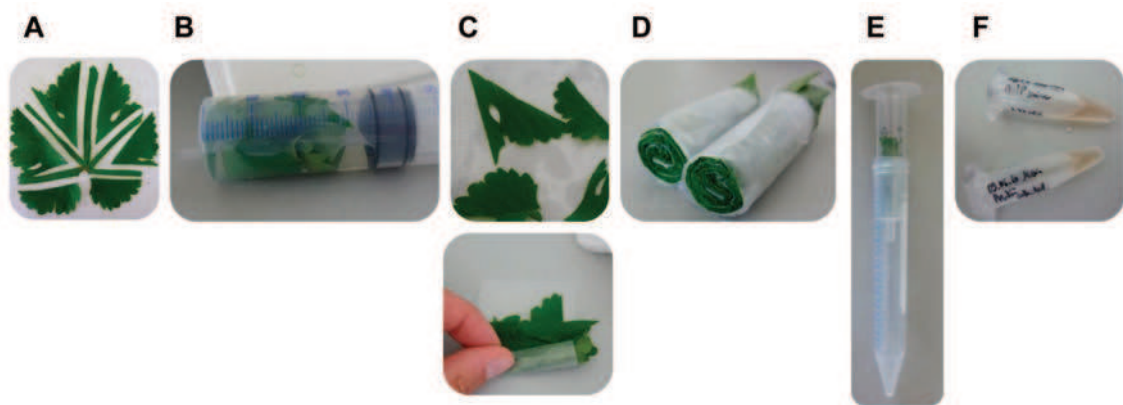


FIGURE 47 – **Représentation de la méthode d'isolement des fluides apoplastiques.** Après avoir été isolés des nervures principales (A), les fragments foliaires sont infiltrés avec le tampon d'infiltration (B), séchés puis enroulés dans du parafilm (C & D). Les rouleaux sont coupés en rondelles qui sont introduites dans une seringue de 5 ml, elle-même placée dans un tube à centrifuger (E). Après centrifugation, les fluides apoplastiques sont récupérés (F).

Matériel et Méthodes

1 Matériel biologique

Pour la deuxième partie de ce travail, des feuilles de boutures herbacées de Marselan infectées ou non par *Plasmopara viticola* ont également été utilisées. Les conditions de culture des plantes, l'entretien de l'agent pathogène et la préparation des plantes inoculées ont déjà été décrits (cf. Chapitre 1).

2 Isolement des fluides apoplastiques

2.1 Méthodologie

Les fluides apoplastiques sont isolés à partir de feuilles de rang 2 et 3 des plantes témoins et infectées par *P. viticola* prélevées 6 jours post-inoculation à la fin de la nuit ou après 10 h de lumière selon les protocoles modifiés de Lohaus *et al.* (2001) et Lopez-Millan *et al.* (2000). Après avoir été séparés des nervures principales (Figure 47 A), les fragments foliaires sont rincés à l'eau ultra-pure puis placés dans une seringue de 50 ml contenant 25 ml de tampon d'infiltration (Mes-KOH 10 ou 100 mM pH 6,5 ; KCl 30 mM) et infiltrés par des mouvements de va et vient du piston (Figure 47 B). Les fragments sont ensuite essuyés et roulés avec du parafilm pour obtenir un rouleau d'environ 0,8 cm de diamètre (Figure 47 C&D). Le rouleau est coupé en rondelles de 1 cm d'épaisseur qui sont introduites dans des seringues de 5 ml (Figure 47 E). Les seringues sont placées dans des tubes de 15 ml et centrifugées à 1000 - 4000 *g* pendant 15-45 min à 18 °C (cf. résultats). Le pH des fluides est estimé avec du papier pH (Merck). Les fluides sont éventuellement conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation (Figure 47 F).

2.2 Marqueurs de contamination cytoplasmique

Extraction des protéines totales

4 g de feuilles sont broyées dans l'azote liquide et 20 ml de tampon d'extraction [Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; KCl 30 mM ; MgCl₂ 5 mM ; DTT 1 mM ; Triton X-100 0,1 % (v/v) ; PMSF 1 mM ; PVPP 2,5% (p/v)] sont ajoutés. Après une centrifugation à 24.000 *g*, 4°C, pendant 10 min, le surnageant est transféré dans un nouveau tube et utilisé comme extrait protéique.

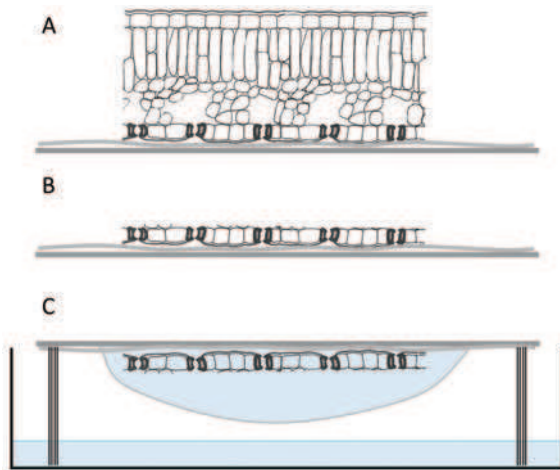


FIGURE 48 – Schéma de la préparation des disques épidermiques et de leur incubation en “goutte suspendue”. Des disques foliaires sont prélevés entre deux nervures et déposés, la face inférieure, sur une couche d’adhésif sur une lamelle (A). L’épiderme supérieur et le mésophylle sont enlevés par grattage (B). Le traitement est appliqué sur le disque et l’incubation se fait en ”goutte suspendue”(C).

Activités enzymatiques

Les activités de deux enzymes cytoplasmiques, la malate déshydrogénase (c-mdh) et l'hexose-phosphate isomérase (c-hpi), utilisées comme marqueurs de la contamination cytoplasmique, sont mesurées selon la méthode de Lopez-Millan *et al.* (2000) dans les extraits protéiques de feuilles entières et dans les fluides apoplastiques de feuilles témoins et infectées, puis comparées.

L'activité de la c-mdh est déterminée en utilisant l'oxalacétate comme substrat et en mesurant la diminution de la DO_{340nm} due à l'oxydation du NADH. Pour cela, 50 μl d'échantillon sont mélangés avec 450 μl de tampon d'activité (Tris 50 mM pH 9,5; NADH 0,1 mM; oxalacétate 0,4 mM) et la diminution de la DO_{340nm} est suivie pendant 15 min à 30 °C à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman DU-640, Beckman Coulter).

L'activité de la c-hpi est déterminée en utilisant le fructose 6-phosphate comme substrat qui est converti en glucose 6-phosphate qui est oxydé par la glucose 6-phosphate déshydrogénase. La réduction du $NADP^+$ est mesurée par l'augmentation de la DO_{340nm} . 50 μl d'échantillon sont mélangés avec 450 μl de tampon d'activité (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; $MgCl_2$ 5 mM; NaCl 1 mM; NAD^+ 0,4 mM; fructose 6-phosphate 1,4 mM; glucose 6-phosphate déshydrogénase 0,46 $u.ml^{-1}$) et l'augmentation de la DO_{340nm} est suivie pendant 15 min à 30 °C.

3 Modèle disques épidermiques

3.1 Préparation des disques épidermiques

Pour la préparation des disques épidermiques, les feuilles de rang 2 (plantes non inoculées) sont prélevées à l'obscurité. Des disques foliaires (diamètre de 4 mm) sont réalisés entre deux nervures. La face inférieure est déposée sur une fine couche d'adhésif siliconé (Telesis 5, Première Products) placée sur une lamelle de microscope (20 x 20 mm; Figure 48 A). L'épiderme supérieur et le mésophylle sont ensuite enlevés par grattage à l'aide d'une pince métallique (Figure 48 B) puis l'épiderme inférieur restant est rincé deux fois à l'eau ultra-pure avant d'être transféré dans du milieu d'équilibration [Mes-KOH 10 mM pH 6,5; Perfus (2002)] puis incubé 30 min à 24°C et à l'obscurité. Après cette phase d'équilibration, 15 μl de milieu d'incubation (cf. paragraphes suivants) sont déposés directement sur chaque disque épidermique. La lamelle est ensuite placée sur un support, épiderme vers le bas, pour permettre une incubation en "goutte suspendue" (Figure 48 C). L'ensemble est placé dans une boîte de Pétri contenant un film d'eau afin de limiter l'évaporation.

3.2 Induction de l'ouverture stomatique à l'obscurité

Après l'étape d'équilibration, les disques épidermiques sont incubés avec 15 μl de composés à tester [fluides apoplastiques, la fusicoccine 1 μM (0,02% méthanol (v/v),

concentration finale) ou l'orthovanadate de sodium 1 mM, cf. résultats] ou de tampon d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5; KCl 30 mM \pm 0,02% méthanol) comme témoin à l'obscurité pendant 3 h à 24°C avant mesure de l'ouverture stomatique.

3.3 Mouvements stomatiques à la lumière

Après l'étape d'équilibration, les disques épidermiques sont incubés 2h30 à la lumière [rayonnement photosynthétique actif (RPA) de 350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$] dans le tampon d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5; KCl 30 mM) pour induire l'ouverture des stomates puis les composés à tester [fluides apoplastiques ou ABA 50 μM (0,1% méthanol (v/v), concentration finale), cf. résultats] ou le tampon d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5; KCl 30 mM \pm solvants, témoins) sont ajoutés afin d'évaluer leur aptitude à induire la fermeture des stomates. Après 2h30 d'incubation à la lumière, le degré d'ouverture des stomates est mesuré.

3.4 Observation et mesure de l'ouverture stomatique

Afin de repérer les cellules de garde vivantes, le diacétate de fluorescéine (FDA) est ajouté extemporanément au milieu (20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, concentration finale en acétone de 0,4 %), puis les stomates sont observés en épifluorescence (microscope DMLB, Leica Microsystems) sous filtre bleu (filtre L5 : λ_{ex} 480 à 540 nm, $\lambda_{\text{ém}}$ 527 à 630 nm), au grossissement 400 et leur ouverture est mesurée à l'aide du logiciel NIS-Elements BR (Nikon Instruments). Seuls les stomates vivants et éloignés des cellules épidermiques vivantes sont pris en compte. Chaque expérience est réalisée sur quatre disques par traitement (issus de deux feuilles différentes) et 30 ouvertures stomatiques sont mesurées par disque. Les résultats correspondent à la moyenne des mesures obtenues pour trois expériences indépendantes.

4 Dosage des sucres solubles

Les teneurs en glucose, fructose, saccharose et tréhalose dans les fluides apoplastiques ont été déterminées comme déjà décrit dans le Chapitre 1.

5 Étude du composé actif

Pour toutes les expériences décrites dans ce paragraphe, les fluides apoplastiques sont au préalable ultracentrifugés à 100.000 g durant 45 min afin d'éliminer les composés insolubles. Les échantillons obtenus après les différents traitements détaillés ci-dessous sont testés sur les disques épidermiques afin d'étudier leur effet sur les mouvements stomatiques.

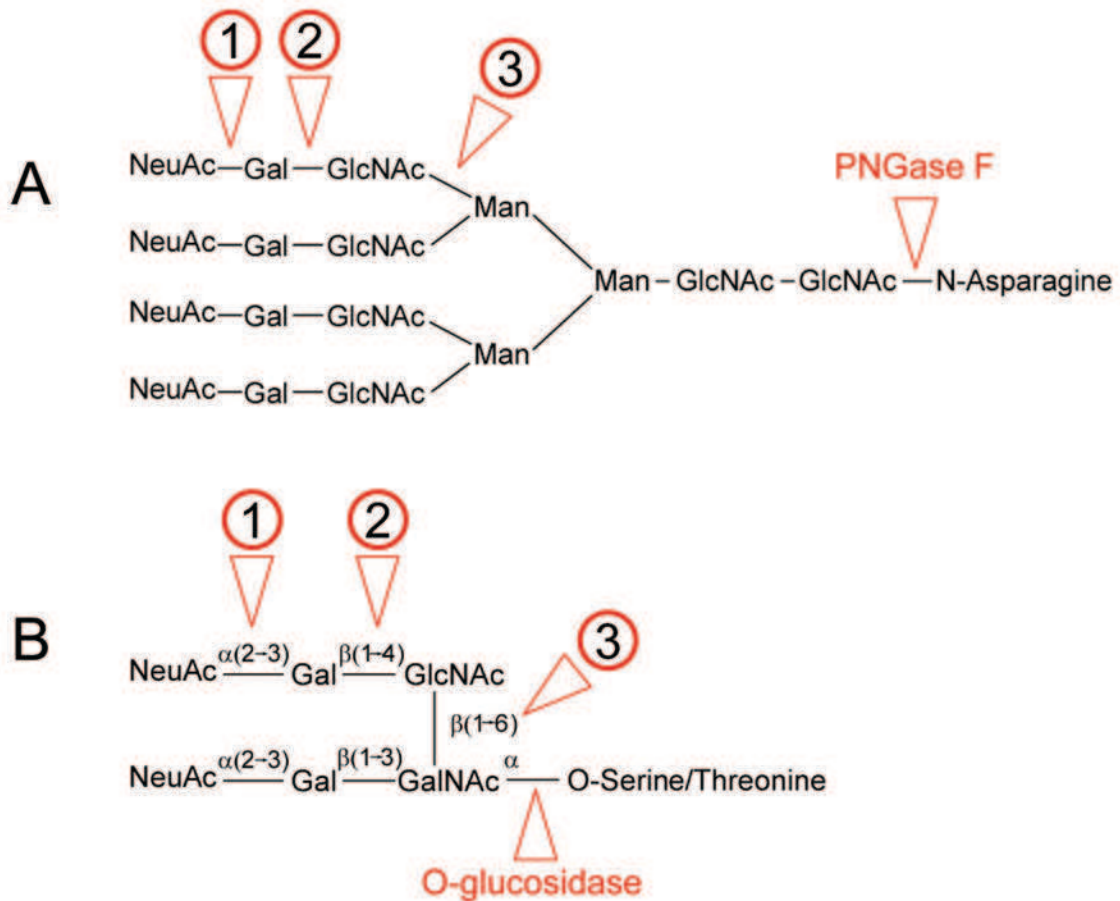


FIGURE 49 – **Déglycosylation enzymatique des protéines.** (A) Dégradation d'une N-glycosylation par la PNGase F, (B) clivage des O-glycosylations par la O-glucosidase. Les chiffres indiquent le clivage successif des groupes terminaux par l' α -(2→3,6,8,9)-neuraminidase (1), la β -(1,4)-galactosidase (2) et la β -N-acétylglucosaminidase (3). D'après le manuel du kit EDEGLY (Sigma Aldrich).

5.1 Estimation de la taille

Pour évaluer la taille du composé recherché, les fluides apoplastiques sont séparés par centrifugation (12.000 *g*, 25 min) à l'aide de filtres Amicon Ultra-0.5 (Millipore) dont les seuils de coupure sont respectivement de 50, 10 et 3 kDa. 4 fractions sont ainsi obtenues : >50 kDa, <50 kDa, <10 kDa et <3 kDa.

5.2 Traitement aux protéases

Afin de déterminer si le composé recherché est de nature protéique, un traitement à la pronase (7 u.ml⁻¹, mélange de protéases de *Streptomyces griseus*, Sigma Aldrich) est appliqué à 100 μ l de fluides apoplastiques. Après 3h d'incubation à 55 °C, les enzymes sont inactivées (95°, 10 min) et les échantillons sont lavés 5 fois avec du tampon d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5; KCl 30 mM) sur filtre Amicon Ultra-0.5 (50 kDa) pour éliminer les réactifs qui auraient une influence sur la viabilité cellulaire. Pour cette expérience, deux conditions témoins sont ajoutées : la première consiste à appliquer le traitement "pronase" sur un volume équivalent de tampon d'infiltration (témoin négatif) et la deuxième consiste à traiter les fluides avec un tampon sans pronase (témoin positif).

5.3 Traitements de déglycosylation des protéines

Les protéines contenues dans les fluides apoplastiques sont déglycosylées par un traitement chimique ou enzymatique. Pour la déglycosylation chimique, 100 μ l de fluides sont incubés avec 5 mM de métapériodate de sodium à 4 °C pendant la nuit (Bourque, 1999). La déglycosylation enzymatique est effectuée à l'aide du kit "Enzymatic Protein Deglycosylation" (EDEGLY, Sigma Aldrich) suivant les instructions du fournisseur. Les protéines contenues dans 100 μ l de fluides apoplastiques sont préalablement transférées dans de l'eau à l'aide de filtres Amicon Ultra-0.5 (50 kDa). Le kit contient cinq enzymes hydrolysant des liaisons de glycosylation différentes (Figure 49). Pour les expériences, la PNGase F, l'O-glucosidase, l' α -(2 \rightarrow 3,6,8,9)-Neuraminidase, la β -(1,4)-galactosidase et la β -N-Acétyleglucosaminidase sont utilisées seules ou en combinaison (cf. résultats). Pour chaque condition, le traitement d'un même volume de tampon d'infiltration est effectué (témoin négatif) ainsi qu'un traitement des fluides apoplastique avec un tampon sans enzymes (témoin positif). Les échantillons sont filtrés et lavés au moins 5 fois [du tampon d'infiltration ; filtre Amicon Ultra-0.5 (50 kDa)] avant d'être testés sur disques épidermiques.

5.4 Traitement de réduction des ponts disulfures

Pour permettre la réduction des ponts disulfures des protéines, les fluides (ou volume équivalent de tampon pour le témoin) sont incubés à 60°C en présence de 2% (m/v) de DTT durant 15 min (Bourque, 1999). Après cette phase d'incubation, de l'iodoacétamide (2,5% ; p/v) est ajouté puis les échantillons sont laissés à tempé-

rature ambiante durant 15 min avant d'être lavés 5 fois [tampon d'infiltration, filtre Amicon Ultra-0.5 (50 kDa)].

6 Séparation et visualisation des protéines

Les protéines contenues dans les fluides apoplastiques sont transférées dans l'eau ultra-pure par 5 lavages successifs [eau, filtre Amicon Ultra-0.5 (50 kDa)]. L'électrophorèse capillaire est réalisée à partir de 4 μ l d'échantillon à l'aide du bioanalyseur "Agilent 2100" (Agilent) en utilisant le kit "Agilent Protein 230" (Agilent) suivant les instructions du fournisseur.

7 Pré-purification du composé actif

7.1 Traitement au sulfate d'ammonium

Les protéines contenues dans les fluides apoplastiques sont précipitées au sulfate d'ammonium en deux étapes. Dans un premier temps, les fluides sont mis en présence de sulfate d'ammonium 50% (p/v) durant 2h à 4°C puis centrifugés (20000 *g*, 15 min). Le culot est repris dans 0,5 ml de tampon d'infiltration et le surnageant est à nouveau traité au sulfate d'ammonium 75% (p/v) puis centrifugé comme décrit ci-dessus. Le culot est resuspendu dans 0,5 ml de tampon d'infiltration. Les deux fractions obtenues sont lavées 5 fois [tampon d'infiltration, filtre Amicon Ultra-0.5ml (50 kDa)] afin d'éliminer le sulfate d'ammonium.

7.2 Séparation par la taille: chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion est effectuée à l'aide d'une colonne (40 ml, 14 cm x 20 mm) contenant du Sephacryl S-200 (GE Healthcare), branchée à une pompe péristaltique. La colonne est équilibrée avec du tampon d'infiltration. Après traitement au sulfate d'ammonium 75% comme décrit ci-dessus, suivi par une ultracentrifugation à 100 000 *g* pendant 45 min, 400 μ l de l'échantillon sont chargés sur la colonne et la séparation est effectuée à 4 °C avec une vitesse de 0,5 ml.min⁻¹ avec le tampon d'infiltration. Les premiers 5 ml d'élution sont considérés comme le volume mort de la colonne [déterminé au préalable par la migration du bleu dextran (Sigma Aldrich)]. Des fractions de 0,5 ml sont ensuite collectées pendant 20 min et stockées à -20 °C jusqu'au moment de leur utilisation.

8 Spectrométrie de masse

Afin d'identifier les protéines contenues dans les fluides apoplastiques et dans les fractions obtenues après la chromatographie d'exclusion, les échantillons ont été analysés par spectrométrie de masse. Les protéines sont transférées dans de l'eau

ultra-pure par 5 lavages successifs [eau, filtre Amicon Ultra-0.5 (50 kDa)] pour éliminer les composants du tampon d'infiltration et d'autres contaminants pouvant influencer l'analyse, puis lyophilisées. L'analyse des échantillons par nano-HPLC / orbi-trap MS et les analyses des données ont été effectuées à la Plateforme Protéomique de Toulouse en collaboration avec Michel Rossignol.

9 Analyses statistiques

Les données sont analysées en utilisant l'analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et un test de Fisher's "least significant difference" (LSD). Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp.).

Tableau 12 – pH des fluides apoplastiques obtenus en fonction du liquide (eau / tampon) infiltré.

liquide infiltré	pH des fluides récupérés
eau	<3
10 mM Mes, 30 mM KCl, pH 6,5	3,8
100 mM Mes, 30 mM KCl, pH 6,5	5,2 - 6,2

Résultats

1 Isolement des fluides apoplastiques

A notre connaissance, aucun protocole d'isolement des fluides apoplastiques des feuilles de vigne n'a été publié. Dans un premier temps, il a donc été nécessaire de mettre au point une méthode basée sur la technique d'infiltration / centrifugation (Lohaus *et al.*, 2001). Ainsi, l'infiltration d'une solution dans les tissus foliaires suivie par une étape de centrifugation permet d'extraire les fluides apoplastiques (AWF) des feuilles témoins et infectées. Dans un premier temps, différentes "solutions" ont été infiltrées afin d'obtenir des fluides ayant un pH adapté ($\text{pH} \sim 6$) à l'étude de leurs effets sur les mouvements stomatiques (Tableau 12). L'infiltration de l'eau ou du tampon d'incubation classiquement utilisé au laboratoire pour l'étude des mouvements stomatiques (Allègre, 2007) permet d'obtenir des AWF dont le pH est trop acide (inférieur à 4). En revanche, l'augmentation de la concentration du tampon Mes à 100 mM permet d'obtenir des fluides apoplastiques à un pH compris entre 5,2 et 6,2, en fonction des répétitions biologiques. Ce tampon semble donc plus adapté pour l'étude des mouvements stomatiques et a été retenu pour la suite des expériences. Le pH des fluides a été vérifié pour chaque lot isolé et même si de légères variations sont observées, elles ne semblent pas influencer sur les résultats des expériences subséquentes. De plus, il n'y a aucune corrélation entre ces variations du pH et les conditions de prélèvement des fluides (lumière / obscurité et feuilles témoins / infectées, données non présentées).

Avec ce protocole, il est possible d'infiltrer 100 μl de tampon pour 1 g de poids frais de feuilles. L'étape de centrifugation (4 000 g pendant 20 min) permet de récupérer seulement 15% du volume infiltré. Une étude préliminaire a montré que l'augmentation de la force centrifuge, dans le but de récupérer plus de fluides, n'est pas possible, puisque le montage pour récupérer les fluides ne résiste pas à une force supérieure à 4 000 g (données non présentées). C'est pourquoi le temps de centrifugation a été augmenté pour essayer de récupérer un volume maximal de fluides. A 30 et 45 min, le rendement est de 20 et 35 %, respectivement, sans différence entre les feuilles témoins et infectées. Comme un prolongement supplémentaire du temps de centrifugation au delà de 45 min ne permet pas d'augmenter significativement le volume récupéré, le temps de 45 min est gardé pour les expériences suivantes.

Avec ce protocole, il est possible d'obtenir environ 40 μl de fluides apoplastiques par g de poids frais de feuilles, donc environ 400 μl pour 6 plantes.

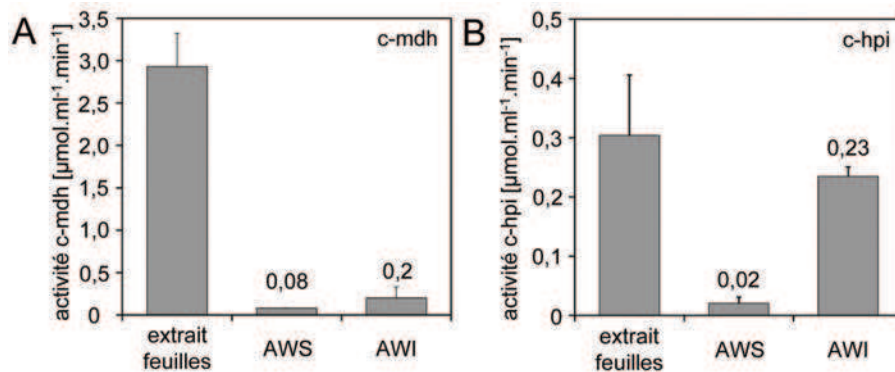


FIGURE 50 – **Activités enzymatiques utilisées comme marqueurs de la contamination cytoplasmique.** Les activités de la malate déshydrogénase (A) et de l'hexose-phosphate isomérase (B) ont été mesurées dans des extraits protéiques de feuilles entières et dans les fluides apoplastiques des feuilles témoins (AWS) et infectées (AWI). Les données représentent les moyennes de deux répétitions biologiques \pm écart-types.

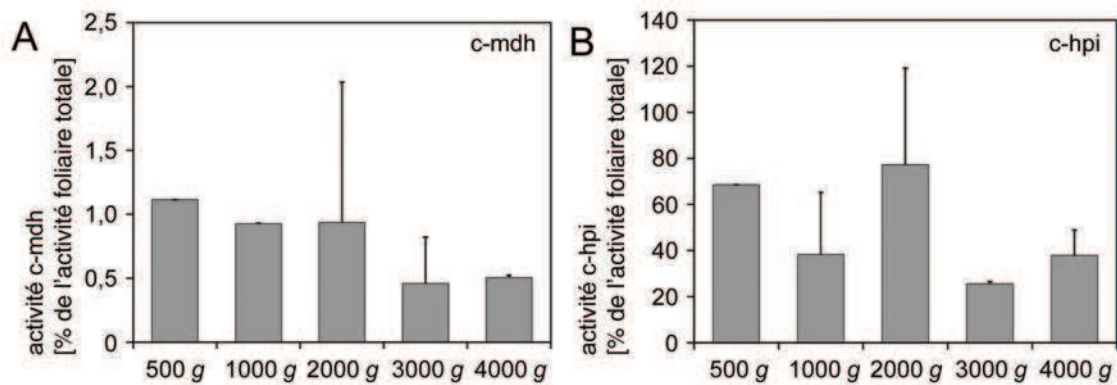


FIGURE 51 – **Influence de la force centrifuge sur le taux de contamination cytoplasmique des fluides apoplastiques de feuilles infectées.** Les activités de la malate déshydrogénase (A) et de l'hexose-phosphate isomérase (B) ont été mesurées dans les fluides apoplastiques des feuilles infectées pour différentes forces centrifuges utilisées lors de l'isolement des fluides. Ces activités ont été comparées aux activités enzymatiques mesurées dans les extraits protéiques de feuilles entières. Les données représentent les moyennes de deux répétitions biologiques \pm écart-types.

1.1 Les marqueurs de la contamination cytoplasmique

Afin d'isoler les AWF, des fragments foliaires sont coupés, infiltrés et centrifugés, ce qui entraîne des lésions des cellules végétales et/ou pathogènes et les molécules cytoplasmiques libérées contaminent le contenu des fluides apoplastiques. Afin de déterminer le pourcentage de contamination "cytoplasmique", les activités de deux enzymes, la malate déshydrogénase (c-mdh) et l'hexose-phosphate isomérase (c-hpi), ont été mesurées dans les fluides apoplastiques et comparées à celles trouvées dans des extraits protéiques de feuilles entières. Pour les deux enzymes, aucune différence entre l'activité mesurée dans les extraits de feuilles entières témoins et celle des feuilles infectées n'a été montrée (données non présentées).

L'activité de la c-mdh et de la c-hpi mesurée dans les fluides apoplastiques des feuilles témoins (AWS) correspond à 3 et à 6 %, respectivement, de l'activité totale (Figure 50). Lopez-Millan *et al.* (2000) proposent un seuil de 10 % au dessous duquel le taux de contamination est considéré comme acceptable. Nos résultats suggèrent donc que le protocole utilisé pour l'isolement des fluides apoplastiques est adéquat. L'activité de ces deux enzymes a également été mesurée dans les fluides apoplastiques des feuilles infectées (AWI). L'activité de la c-mdh correspond à 6% de l'activité totale (donc en dessous du seuil d'acceptabilité). En revanche, l'activité de la c-hpi dans les AWI est élevée puisqu'elle correspond à 77 % de l'activité mesurée dans l'extrait protéique de feuilles entières. Par conséquent, une contamination dans ces échantillons n'est pas à exclure.

Dans cette hypothèse et pour réduire le taux de cette contamination, l'effet de la force centrifuge appliquée lors de l'isolement des AWI a été étudié. Cette force (initialement de 4 000 *g*) a été réduite jusqu'à 500 *g* (Figure 51). Pour la c-mdh, les valeurs d'activité se trouvent toujours en-dessous du seuil, indépendamment de la force centrifuge (Figure 51 A), contrairement à l'hpi. La réduction de la force centrifuge n'a pas permis de réduire l'activité de la c-hpi dans les AWI, nettement supérieure au seuil de 10 %, et aucune corrélation n'a pu être établie entre la force centrifuge et les valeurs mesurées (Figure 51 B). Pour les manipulations suivantes, le protocole initial (4 000 *g*) a donc été conservé puisqu'il permet de récupérer un volume maximal de fluides apoplastiques (données non présentées).

Afin de déterminer si la contamination cytoplasmique peut être corrélée au développement du pathogène, les fluides apoplastiques ont été extraits des feuilles prélevées à différents jours post inoculation. Pour la c-mdh, l'activité mesurée dans les AWI reste faible en début d'infection (0,5 % par rapport à l'activité totale ; Figure 52 A). Elle augmente à partir de 5 jpi mais reste nettement en dessous du seuil de 10 %. Pour la c-hpi, dès le début d'infection, l'activité est plus élevée que celle de la c-mdh, mais reste d'environ 10 % (Figure 52 B). L'activité augmente fortement à partir de 5 jpi (jusqu'à 100 % à 6 jpi). D'après nos résultats, la contamination cytoplasmique semble bien être corrélée à l'infection. Dans le but de réduire cette contamination, nous pourrions envisager d'extraire les fluides apoplastiques des feuilles prélevées à 3 ou 4 jpi. Cependant, à ce stade, le pathogène s'est peu développé et la dérégulation stomatique est peu marquée. Or, dans notre hypothèse de travail, il est nécessaire d'extraire les AWI de tissus fortement colonisés, soit à

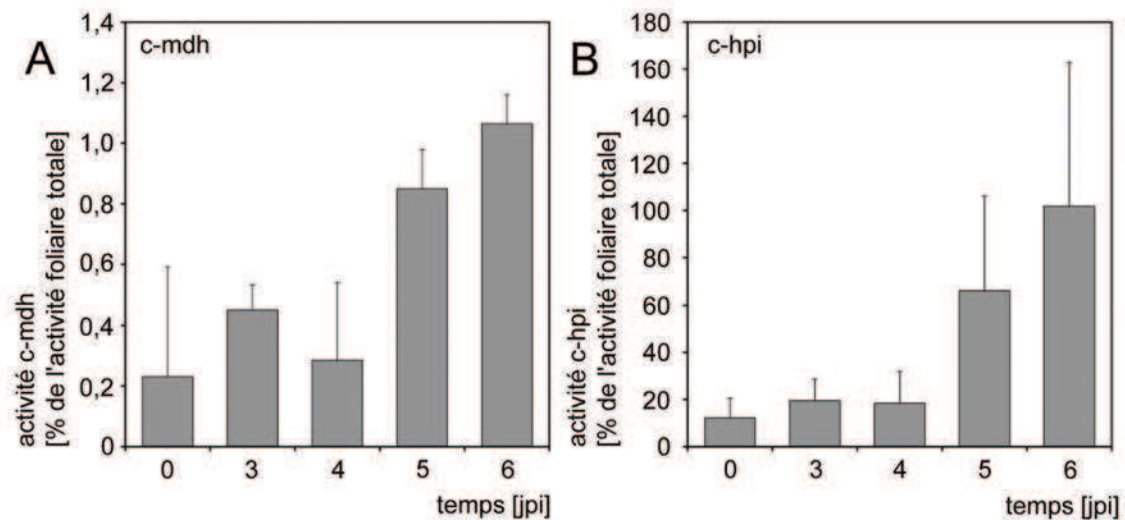


FIGURE 52 – Taux de contamination cytoplasmique des fluides apoplastiques en fonction du développement de *P. viticola* dans les feuilles de vigne. Les activités de la malate déshydrogénase (A) et de l'hexose-phosphate isomérase (B) ont été mesurées dans les fluides apoplastiques des feuilles infectées et comparées aux activités enzymatiques mesurées dans les extraits protéiques de feuilles entières. Les données représentent les moyennes de deux répétitions biologiques \pm écart-types.

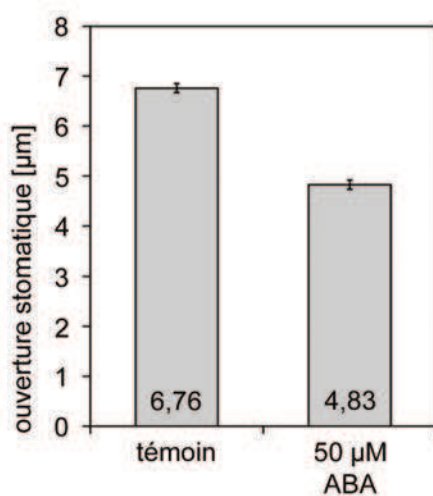


FIGURE 53 – Réduction de l'ouverture stomatique induite par l'ABA au niveau de disques épidermiques incubés en "goutte suspendue" à la lumière. Après induction de l'ouverture stomatique, des disques épidermiques ont été traités par 50 μM d'ABA ajoutés ou non (témoin) au milieu d'incubation (100 mM Mes-KOH ; pH 6,5 ; 30 mM KCl) à la lumière. Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour 200 stomates au total (2 répétitions biologiques).

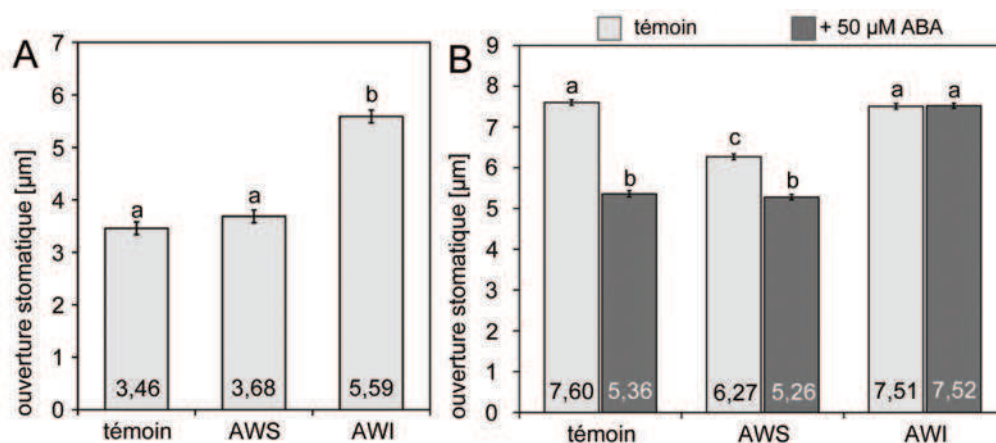


FIGURE 54 – Effet des fluides apoplastiques extraits des feuilles témoins (AWS) et infectées (AWI) sur les mouvements stomatiques à l'obscurité (A) et à la lumière (B). (A) Des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence des AWS et AWI. (B) Après l'induction de l'ouverture stomatique, des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence des AWS et AWI \pm ABA 50 μ M. Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour 500 stomates au total (3 répétitions biologiques indépendantes). Les lettres (a, b et c) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

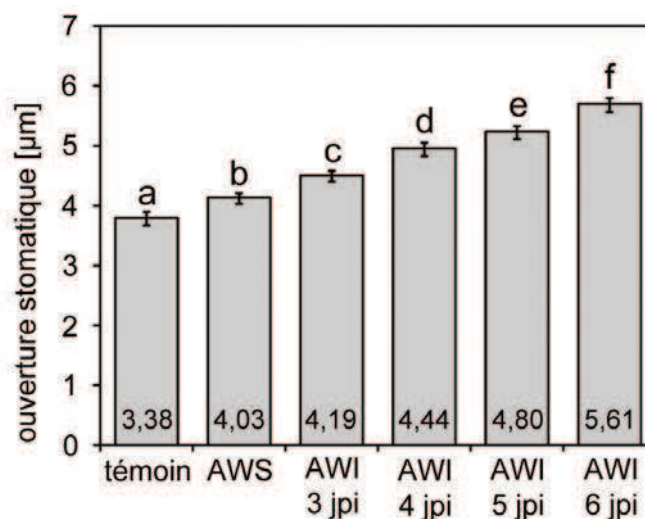


FIGURE 55 – Effet des fluides apoplastiques des feuilles infectées prélevées au cours de l'infection sur l'ouverture stomatique à l'obscurité. Des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence des fluides apoplastiques obtenus à différents jours post-inoculation (jpi). Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour au moins 300 stomates au total (3 répétitions biologiques). Les lettres (a, b, c, d, e et f) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

partir de 5 jpi.

Les résultats de ces analyses suggèrent que la méthode utilisée est adéquate pour isoler des fluides apoplastiques des feuilles témoins sans contamination cytoplasmique supérieure au seuil. Pour les fluides apoplastiques des feuilles infectées, les deux marqueurs donnent des résultats contradictoires. L'activité c-mdh semble indiquer que la contamination cytoplasmique est inférieure au seuil, alors que l'activité de la c-hpi indique une contamination nettement supérieure. Par manque de moyen de réduction de cette contamination, les expériences suivantes ont été effectuées selon le protocole établi.

2 Effet des fluides apoplastiques sur les mouvements stomatiques

2.1 Validation du système des disques épidermiques

Le modèle "épiderme isolé" utilisé jusqu'à présent au laboratoire pour étudier les mouvements stomatiques demande un volume minimal d'incubation de 2,5 ml (Al-lègre, 2007) et donc une quantité non négligeable de composés ou d'extraits à tester. Afin de réduire ce volume d'incubation et de permettre de tester des échantillons en petites quantités, un nouveau système a été développé. La surface de "l'épiderme isolé" est réduite de 1 x 0,5 cm à un disque de 4 mm de diamètre, ce qui permet de l'incuber dans une goutte de 10 à 15 μ l seulement. Afin de valider le modèle "disques épidermiques", un traitement à l'ABA (50 μ M) a été effectué. L'ABA induit une fermeture stomatique à la lumière d'environ 2 μ m par rapport au témoin, conformément à nos observations précédentes réalisées sur notre ancien modèle (Figure 53). Le modèle de "disques épidermiques" est donc validé et a été utilisé pour tester les effets des fluides apoplastiques sur les mouvements stomatiques.

2.2 Effet des fluides apoplastiques sur les mouvements stomatiques

Les fluides apoplastiques extraits de feuilles témoins et infectées ont été testés sur des disques épidermiques. À l'obscurité, les fluides apoplastiques de feuilles témoins (AWS) n'ont pas d'effet sur l'ouverture stomatique alors que ceux de feuilles infectées (AWI) induisent une ouverture de plus de 2 μ m par rapport au témoin (Figure 54 A). À la lumière, les AWS induisent une fermeture stomatique de 1,3 μ m par rapport au témoin, tandis que les AWI ne montrent aucun effet (Figure 54 B). L'acide abscissique réduit significativement l'ouverture stomatique pour les disques témoins et ceux traités aux AWS. Cependant, appliqué en présence des AWI, l'ABA n'induit plus de fermeture stomatique (Figure 54 B).

Les effets des AWI sur les mouvements stomatiques sont indépendants du moment de prélèvement des fluides. En effet, les AWI isolés à partir des feuilles prélevées

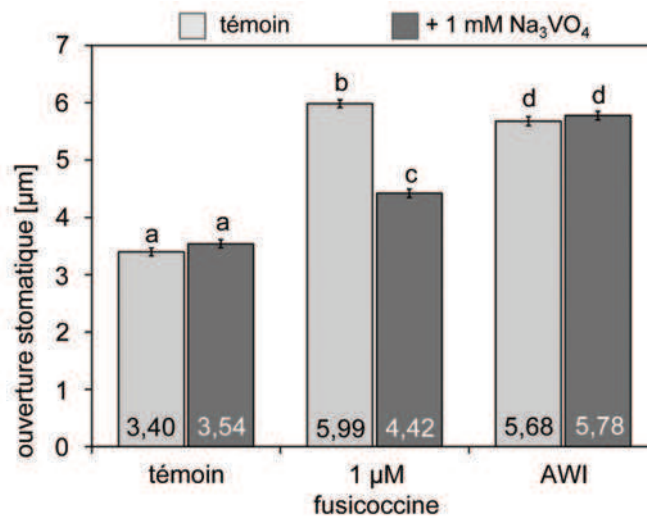


FIGURE 56 – Effet de l’orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) sur l’ouverture des stomates induite par la fusicoccine et par les fluides apoplastiques des feuilles infectées (AWI) à l’obscurité. Des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d’infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence de 1 μM fusicoccine / AWI \pm Na_3VO_4 1 mM. Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour 500 stomates au total (3 répétitions biologiques indépendantes). Les lettres (a, b, c et d) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

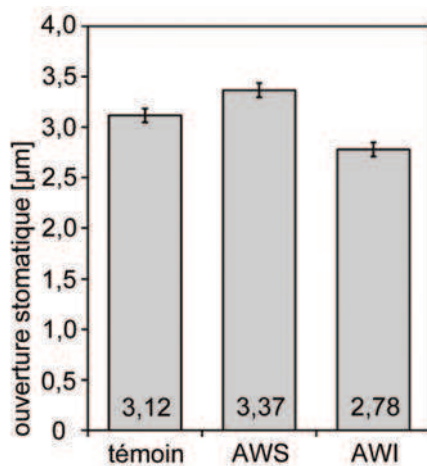


FIGURE 57 – Effet des fluides apoplastiques extraits des feuilles témoins (AWS) et infectées par *P. viticola* (AWI) sur les mouvements stomatiques d’*Arabidopsis thaliana* à l’obscurité. Des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d’infiltration (100 mM Mes-KOH ; pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence des AWS et AWI. Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour 300 stomates au total (2 répétitions biologiques indépendantes).

à l'obscurité, comme à la lumière, induisent une ouverture stomatique à l'obscurité et contrecarrent la fermeture induite par l'ABA, montrant les mêmes valeurs d'ouverture (données non présentées).

Les fluides apoplastiques des feuilles infectées semblent donc mimer la dérégulation du fonctionnement stomatique observée *in planta* : l'ouverture anormale à l'obscurité et une suppression de la fermeture induite par l'ABA. Les AWI contiennent donc probablement la ou les molécule(s) responsable(s) de cette dérégulation. Afin de faciliter la lecture de ce document, il sera question d'un seul composé actif dans ce qui suit, même si nous ne pouvons pas exclure qu'il s'agisse d'un mélange de composés. Pour la suite des expériences, les études ont été réalisées sur l'induction de l'ouverture stomatique à l'obscurité.

Afin de vérifier si l'effet des AWI sur les mouvements stomatiques peut être lié au développement du pathogène, les AWI ont été isolés à partir de feuilles prélevées à différents jpi. À 3 jpi, les AWI induisent une légère ouverture stomatique (0,81 μm par rapport au témoin). L'ouverture induite par les AWI augmente de manière régulière au cours de l'infection pour atteindre un maximum à 6 jpi (différence de 2,23 μm par rapport au témoin, Figure 55). Le composé actif semble donc s'accumuler dans les feuilles au cours de l'infection.

3 Le mode d'action

3.1 L'ATPase

L'effet des AWI sur l'ouverture stomatique ressemble à celui de la fusicoccine. La fusicoccine est une toxine d'origine fongique qui provoque la stimulation de l' H^+ -ATPase et bloque les stomates en position ouverte. L'implication de l' H^+ -ATPase peut être étudiée à l'aide de l'orthovanadate de sodium, connu pour l'inhiber. Afin d'étudier si l'ouverture stomatique observée à l'obscurité en présence des AWI implique une stimulation de l' H^+ -ATPase, des disques épidermiques ont été co-traités par les AWI et l'orthovanadate de sodium. La fusicoccine a été incluse comme témoin positif. Appliquée seule, cette toxine induit une ouverture stomatique de plus de 2,5 μm par rapport au témoin, mais qui est réduite en présence de l'orthovanadate de sodium. En revanche, ce composé n'affecte pas l'ouverture stomatique induite par les AWI (Figure 56). L'ouverture stomatique à l'obscurité induite par les AWI ne semble donc pas impliquer une dérégulation de l' H^+ -ATPase.

3.2 Activité des AWI de vigne sur Arabidopsis

L'utilisation de la plante modèle *A. thaliana* pourrait faciliter l'étude des effets du composé actif sur l'ouverture stomatique. En effet, de nombreux mutants sont disponibles pour des gènes codant pour des protéines impliquées dans les mécanismes d'ouverture / fermeture ou dans les voies de signalisation de fermeture des stomates. Nous avons donc testé les AWS et AWI sur disques épidermiques d'Arabidopsis. Dans nos conditions, les stomates d'Arabidopsis ont une ouverture réduite à l'obscurité

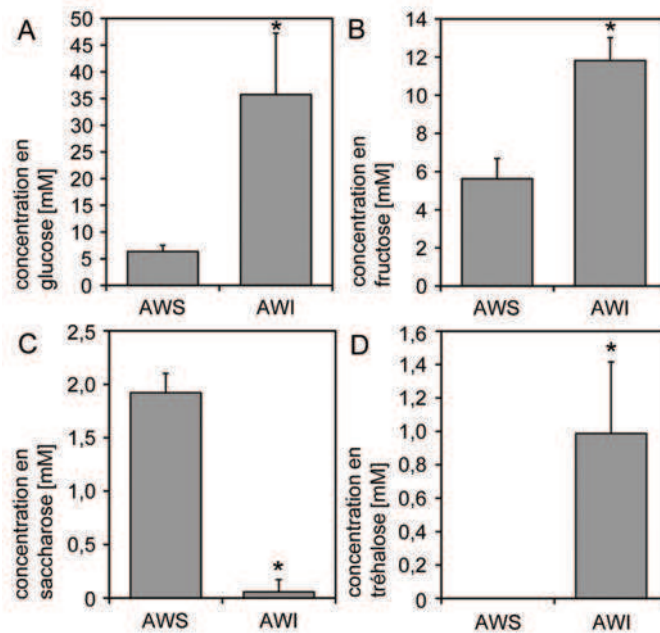


FIGURE 58 – Concentration en glucose (A), fructose (B), saccharose (C) et tréhalose (D) dans les fluides apoplastiques des feuilles témoins (AWS) et infectées (AWI). Ces valeurs ont été déterminées après analyse des fluides par HPAEC / PAD. Les données représentent la valeur moyenne (\pm écart-types) de trois répétitions biologiques.

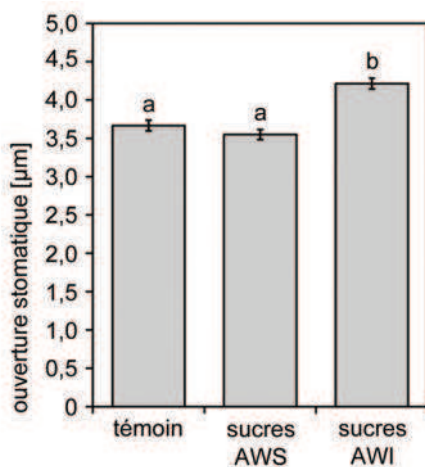


FIGURE 59 – Effet de solutions de sucres (glucose, fructose, \pm saccharose et tréhalose) aux concentrations trouvées dans les fluides apoplastiques des feuilles témoins (AWS) et infectées (AWI) sur les mouvements stomatiques à l'obscurité. Des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence de 2 mM saccharose, 5 mM glucose, 5 mM fructose (sucres AWS) ou 35 mM glucose, 10 mM fructose, 1 mM tréhalose (sucres AWI). Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour 500 stomates au total (3 répétitions biologiques indépendantes). Les lettres (a et b) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0.05$).

($3,12\mu\text{m}$) et ni les AWS ni les AWI n'induisent une ouverture stomatique (Figure 57). Par conséquent, cette plante modèle ne peut pas être utilisée pour l'étude du mode d'action des AWI.

4 Sucres solubles dans les fluides apoplastiques

L'infection des feuilles par un pathogène induit souvent des changements des concentrations en sucres dans les fluides apoplastiques. Cette modification de concentrations en molécules osmotiques pourrait également agir sur l'ouverture stomatique. Afin de vérifier si les concentrations en sucres sont altérées dans les AWI, les hexoses (glucose, fructose) et les disaccharides (saccharose, tréhalose) ont été dosés dans des fluides apoplastiques de feuilles témoins et infectées.

La concentration en hexoses est plus importante dans les AWI que dans les AWS, elle est 6 fois et 2 fois plus élevée pour le glucose et le fructose, respectivement (Figure 58 A&B). La concentration en saccharose est fortement réduite dans les AWI (de $1,92 \pm 0,05$ dans les AWS à $0,05 \pm 0,1$ mM ; Figure 58 C), alors que le tréhalose n'a été détecté que dans les AWI ($0,98 \pm 0,4$ mM ; Figure 58 D).

Afin de vérifier l'effet de ces sucres sur les mouvements stomatiques, des solutions ont été réalisées sur la base des concentrations trouvées dans les AWS et AWI puis testées sur disques épidermiques. Seule la solution correspondant à la composition des AWI induit une ouverture stomatique de $0,54 \mu\text{m}$ par rapport au témoin (Figure 59). Cependant, cette ouverture est nettement plus faible que celle induite par les fluides eux-mêmes. L'effet des AWI sur l'ouverture stomatique ne semble donc pas être due aux changements des teneurs en sucres dans ces fluides.

5 Caractéristiques du composé actif

5.1 Stabilité du composé actif

Plusieurs tests ont été réalisés afin d'étudier la stabilité du composé actif. Les AWI ont été chauffés à 95°C pendant 30 min. Les fluides, après traitement, induisent toujours une ouverture de $2 \mu\text{m}$ par rapport au témoin (Figure 60), ce traitement n'a donc aucun effet significatif sur l'ouverture stomatique induit par les AWI à l'obscurité. De plus, les AWI ne perdent pas leur activité lors d'une étape de lyophilisation (Figure 60). Enfin, l'incubation de ces AWI à température ambiante pendant une semaine n'a également pas d'effet sur l'activité (données non présentées). Le composé actif semble donc assez stable et il est possible de lyophiliser ou chauffer les AWF pour la préparation d'échantillons ou l'inactivation des enzymes dans les traitements suivants, sans perdre l'activité du composé.

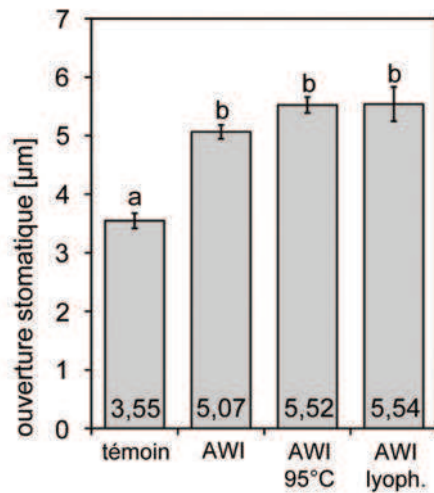


FIGURE 60 – Effet d’une incubation à 95°C ou d’une lyophilisation sur l’activité des fluides apoplastiques des feuilles infectées (AWI) sur l’ouverture stomatique. Des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d’infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence des AWI, AWI chauffés à 95°C pendant 30 min (95°C) et AWI lyophilisés et résolubilisés dans de l’eau (lyoph.). Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour au moins 300 stomates au total (3 répétitions biologiques indépendantes). Les lettres (a et b) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

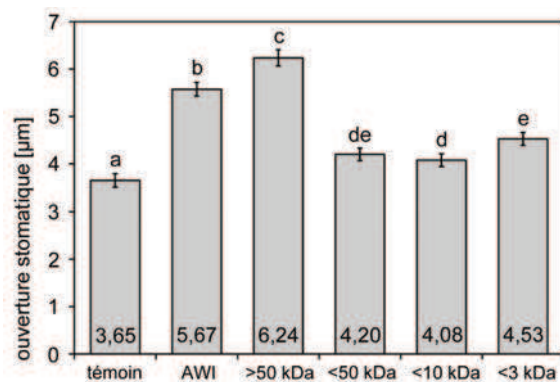


FIGURE 61 – Estimation de la taille du composé actif dans les fluides apoplastiques des feuilles infectées (AWI). Des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d’infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence des AWI et des échantillons obtenus par filtration des AWI à l’aide des filtres à centrifugation avec un seuil de coupure à 50, 10 et 3 kDa. Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour au moins 150 stomates au total (2 répétitions biologiques indépendantes). Les lettres (a, b, c, d et e) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

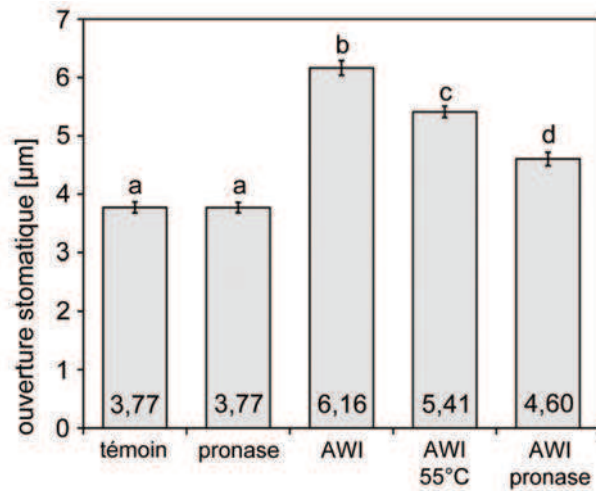


FIGURE 62 – Effet d'un traitement pronase sur l'activité des fluides apoplastiques des feuilles infectées (AWI) sur les mouvements stomatiques. Des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence des AWI, des AWI traités à 55°C pendant 3h et des AWI traités à la pronase à 55°C pendant 3h. Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour au moins 300 stomates au total (3 répétitions biologiques indépendantes). Les lettres (a, b, c et d) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

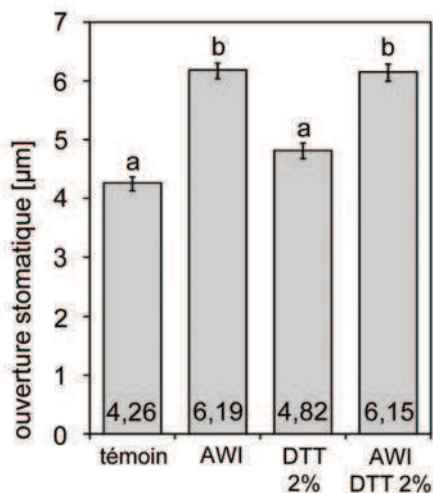


FIGURE 63 – Effet d'un traitement au DTT 2% sur l'activité des fluides apoplastiques des feuilles infectées (AWI) sur les mouvements stomatiques. Des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence des AWI, du tampon additionné de DTT 2% et des AWI traités au DTT 2%. Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour au moins 300 stomates au total (3 répétitions biologiques indépendantes). Les lettres (a et b) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

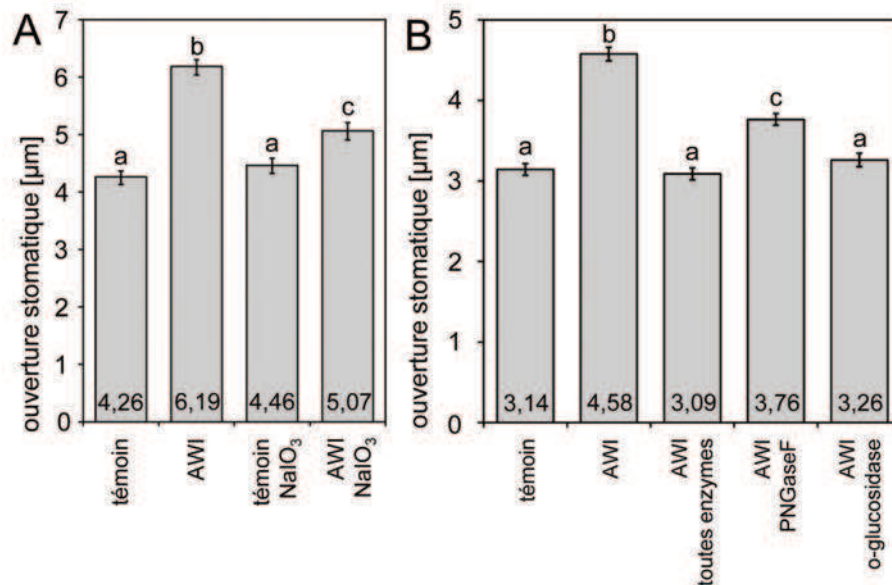


FIGURE 64 – Effet de la déglycosylation chimique (A) et enzymatique (B) sur l'activité des fluides apoplastiques des feuilles infectées (AWI) sur les mouvements stomatiques. (A) Des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence des AWI, du tampon additionné d'iodate de sodium (NaIO₃ 2 mM) ou des AWI traités au NaIO₃. (B) Des disques épidermiques ont été traités dans le milieu d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence des AWI et des AWI traités par un mélange d'enzymes (PNGase F, O-glucosidase, α -(2-3,6,8,9)-neuraminidase, β -(1,4)-galactosidase et β -N-acétylglucosaminidase), par la PNGase F ou l'O-glucosidase. Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour au moins 500 stomates au total (3 répétitions biologiques indépendantes). Les lettres (a, b et c) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

5.2 Taille du composé actif

Pour estimer la taille du composé actif, des étapes de filtration à l'aide de filtres à centrifugation ont été effectuées. Les filtres avec un seuil de coupure de 50 kDa, 10 kDa et 3 kDa ont été utilisés successivement. D'après nos résultats, seule la fraction supérieure à 50 kDa induit une ouverture stomatique ($2,5 \mu\text{m}$ par rapport au témoin) similaire à celle provoquée par les AWI (Figure 61), suggérant que le composé actif a une taille supérieure à ce seuil.

5.3 Traitement protéasique

Afin de déterminer si le composé induisant l'ouverture stomatique est de nature protéique, les AWI ont été traités à la pronase (mélange de protéases) à 55°C pendant 3h. Pour observer l'effet spécifique du traitement enzymatique, les fluides ont été également incubés à 55°C pendant 3h en absence de pronase. Ce traitement témoin semble légèrement réduire l'activité des AWI sur l'ouverture stomatique (moins $0,75 \mu\text{m}$; Figure 62). Cependant, le traitement pronase réduit l'ouverture induite par les AWI de manière beaucoup plus marquée. Ce traitement diminue l'activité de 65 % par rapport aux AWI non-traités. La pronase seule n'a aucun effet sur l'ouverture stomatique. Ces résultats suggèrent que le composé actif est de nature protéique.

5.4 Traitement permettant la réduction des pont sulfures

Les protéines possèdent souvent des ponts sulfures qui les rendent stables et peuvent influencer sur leur activité. Afin de déterminer si des ponts sulfures sont essentiels pour l'activité de la protéine sur les stomates, ils ont été réduits par un traitement au DTT. Les AWI traités ou non au DTT induisent une ouverture stomatique à l'obscurité de $1,9 \mu\text{m}$ (Figure 63). Le DTT seul n'a aucun effet. Aucun effet de ce traitement n'est donc observé.

5.5 Déglycosylation

Afin d'étudier le rôle des glycosylations dans l'activité du composé recherché sur les mouvements stomatiques, des traitements de déglycosylations chimique et enzymatique ont été effectués. La déglycolysation chimique consiste en un traitement à l'iodate de sodium qui réduit de manière significative l'ouverture induite par les AWI à l'obscurité de $1 \mu\text{m}$ alors que l'iodate de sodium seul n'a pas d'effet sur l'ouverture stomatique (Figure 64 A).

Pour la déglycosylation enzymatique, différentes enzymes (PNGase F, O-glucosidase, α -(2-3,6,8,9)-neuraminidase, β -(1,4)-galactosidase et β -N-acétylglucosaminidase) ont été appliquées seules ou en mélange. Le mélange d'enzymes supprime l'activité des AWI sur l'induction d'ouverture stomatique (Figure 64 B). Les mêmes traitements effectués sur les AWS ou un volume de tampon équivalent ne montrent pas d'effet sur l'ouverture stomatique (données non présentées). Les enzymes α -(2-3,6,8,9)-neuraminidase, β -(1,4)-galactosidase et β -N-acétylglucosaminidase appli-

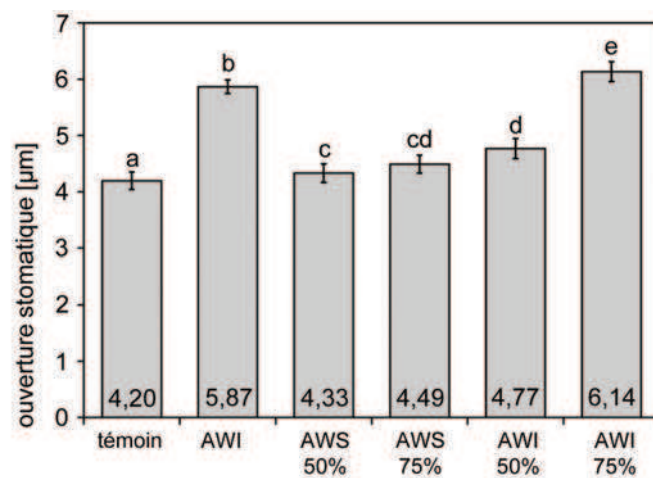


FIGURE 65 – Effet des échantillons obtenus après traitement des fluides apoplastiques des feuilles témoins (AWS) et infectées (AWI) par le sulfate d'ammonium à 50% et 75% sur les mouvements stomatique à l'obscurité. Des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence des AWI et des AWS et AWI traités au sulfate d'ammonium 50% et 75%. Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour au moins 300 stomates au total (3 répétitions biologiques indépendantes). Les lettres (a, b, c, d et e) indiquent les valeurs pour lesquelles il y a une différence statistiquement significative ($P < 0,05$).

quées seules n'ont pas d'effet sur l'activité du composé recherché (données non présentées), alors que la PNGase F et l'O-glucosidase réduisent l'ouverture stomatique induite par les AWI. L'O-glucosidase supprime complètement l'activité, alors que les AWI traités à la PNGase F montrent une activité résiduelle et induisent une ouverture de $0,6 \mu\text{m}$.

Ces résultats indiquent que les glycosylations sont essentielles pour l'activité de la protéine recherchée et les O-glycosylations pourraient jouer un rôle plus important que les N-glycosylations.

6 Purification du composé actif

6.1 Précipitation au sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium a été utilisé pour précipiter les protéines contenues dans les fluides apoplastiques. Des concentrations croissantes de ce sel ont été utilisées afin d'identifier la concentration nécessaire pour précipiter le composé actif. À 25 %, aucun culot n'est visible. À 50 %, des protéines sont précipitées dans les AWS et AWI, mais ces échantillons n'ont pas d'effet sur l'ouverture stomatique à l'obscurité (Figure 65). L'échantillon obtenu après précipitation des AWI au sulfate d'ammonium 75 % induit une ouverture statistiquement significative de $2 \mu\text{m}$ par rapport au témoin (Figure 65), alors que celui obtenu à partir des AWS n'a pas d'effet sur les mouvements stomatiques. A 100 % de sel, aucun culot n'est visible.

Une précipitation à 50 % de sulfate d'ammonium a donc été effectuée pour les manipulations suivantes afin d'éliminer une partie des protéines présentes dans les AWI, suivie par une précipitation à 75 % pour enrichir l'échantillon en protéine active.

6.2 Analyse des profils protéiques des AWF

Une électrophorèse capillaire réalisée à l'aide du bioanalyseur "Agilent 2100" a permis d'établir des profils protéiques des AWI et AWS. La comparaison des profils obtenus montre des différences de composition protéique entre ces deux échantillons. D'après nos résultats, plusieurs pics protéiques semblent majoritaires dans les AWI, par exemple à 29,5 kDa, 33,4 kDa, 41,5 kDa et 67,6 kDa (Figure 66).

6.3 Spectrométrie de masse 1

Afin d'étudier la composition protéique des fluides apoplastiques, une première analyse par spectrométrie de masse a été effectuée sur les AWS et AWI après précipitation au sulfate d'ammonium 75 %. Une nano-HPLC suivie par une spectrométrie de masse des peptides tryptinés a permis de comparer les protéines contenues dans les AWS et AWI. 2801 peptides ont été identifiés dans les AWS et 1899 dans les AWI, 1538 peptides sont communs aux deux modalités. La comparaison des séquences de

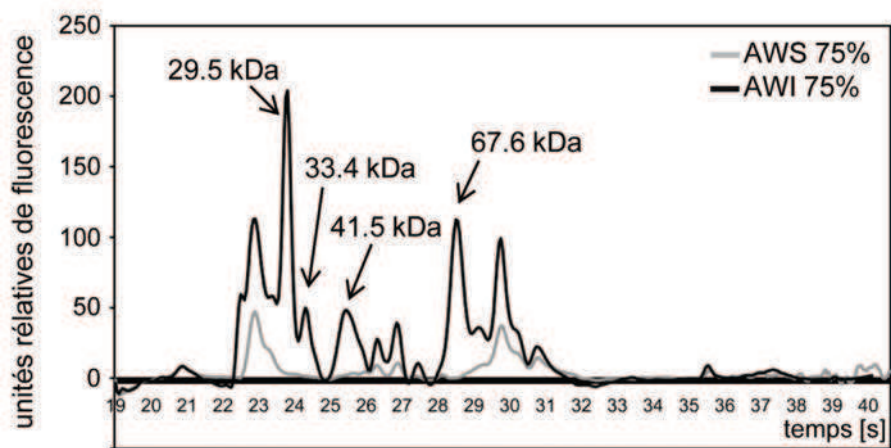


FIGURE 66 – Profils protéiques obtenus après la séparation en électrophorèse capillaire des fluides apoplastiques des feuilles témoins (AWS) et infectées (AWI) précipités au sulfate d’ammonium 75 %. Données représentatives pour trois répétitions biologiques.

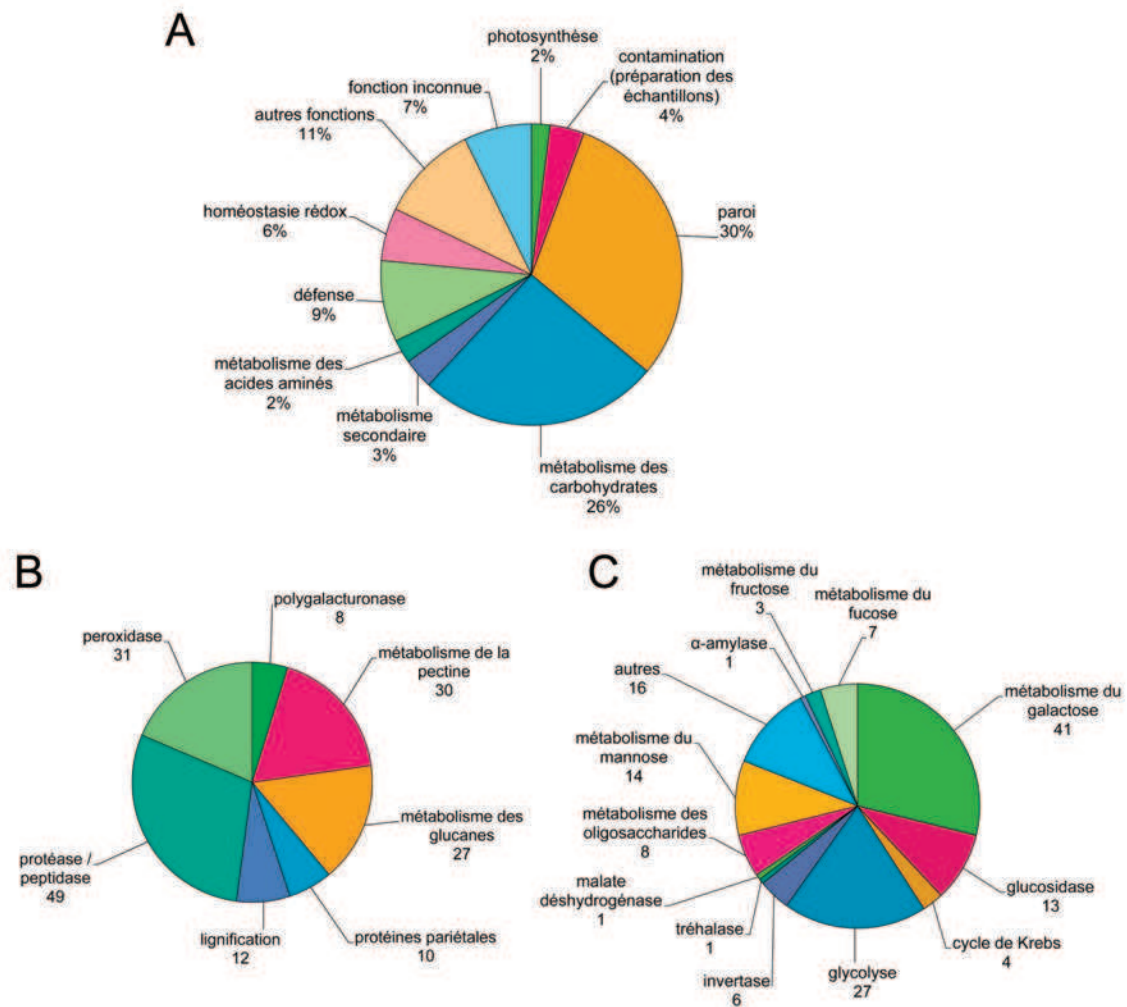


FIGURE 67 – Groupes fonctionnels des protéines identifiées uniquement dans les fluides apoplastiques des feuilles témoins (AWS). (A) Les 549 protéines identifiées dans les AWS. (B) Les sous-groupes de la catégorie “paroi”. (C) Les sous-groupes de la catégorie “métabolisme des carbohydrates”. Les chiffres indiquent le pourcentage (A) et le nombre (B & C) de protéines trouvées pour chaque catégorie.

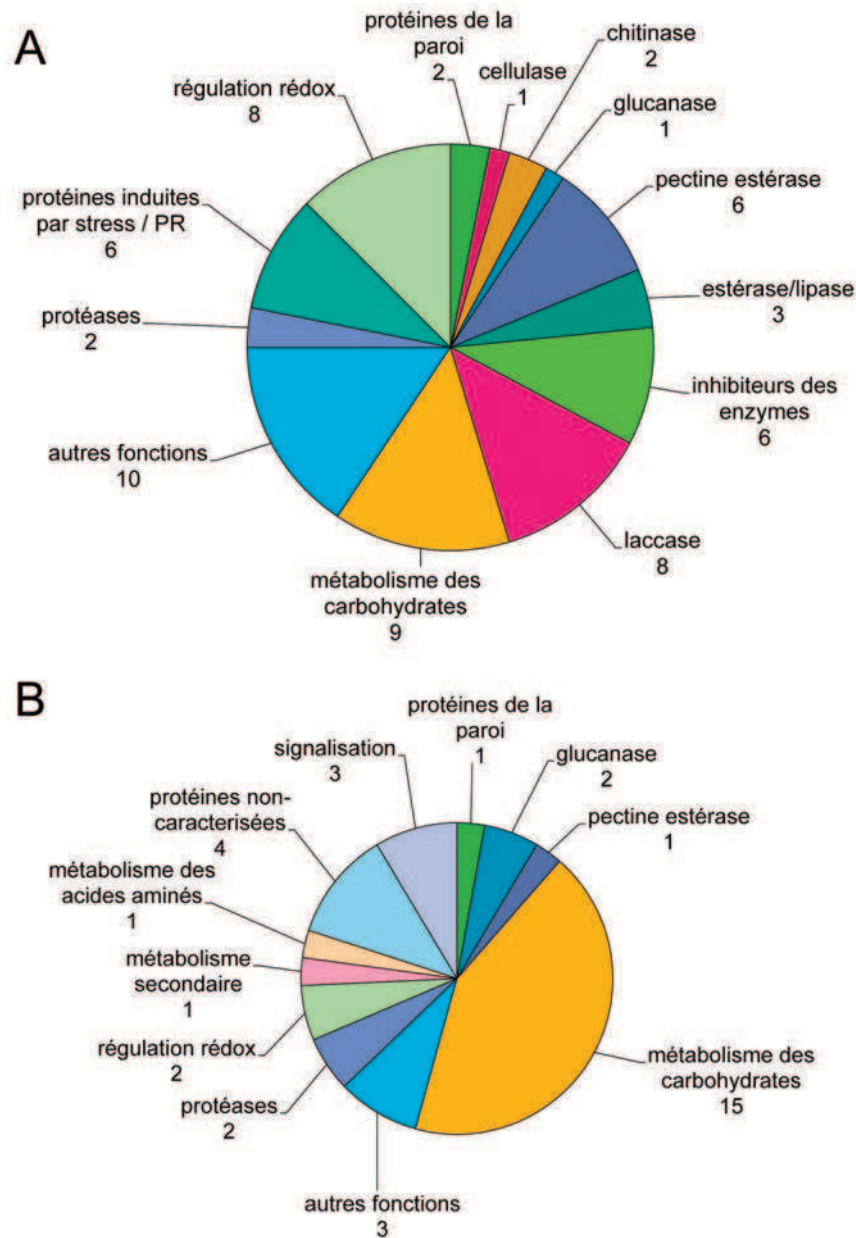


FIGURE 68 – Groupes fonctionnels des protéines identifiées seulement dans les fluides apoplastiques des feuilles infectées (AWI). (A) Protéines identifiées dans la base de données de *Vitis vinifera*, (B) Protéines identifiées dans la base de données des oomycètes. Les chiffres indiquent le nombre de protéines trouvées pour chaque catégorie.

ces peptides avec celles des bases de données a permis d'identifier les protéines correspondantes et leur comparaison par BLAST avec des banques de données a permis de les classer dans des groupes fonctionnels.

549 protéines ont été identifiées dans les AWS (Figure 67 A). L'analyse des groupes fonctionnels montre qu'il y a une contamination des échantillons (4 %) inhérente aux traitements, comprenant la kératine et la trypsine. Une autre source de contamination est la contamination cytoplasmique, qui se manifeste par la présence de protéines impliquées dans la photosynthèse (2 %) et d'enzymes cytoplasmiques dans les autres groupes fonctionnels. D'après les annotations, nous pouvons estimer que les protéines cytoplasmiques constituent $\tilde{15}$ % des protéines contenues dans les fluides apoplastiques. La majorité des protéines identifiées dans les AWS se trouve dans les groupes fonctionnels nommés "paroi" (30 %) et "métabolisme des carbohydrates" (26 %). Le groupe fonctionnel "paroi" contient, entre autres, des protéines de la synthèse et dégradation de la paroi, des protéases et des protéines pariétales. Parmi les protéines impliquées dans le métabolisme des carbohydrates se trouvent des enzymes de la voie métabolique des sucres comme le fucose, le mannose et le galactose, qui sont importants pour la synthèse de la paroi. De plus, on observe des isoformes extracellulaires des enzymes du métabolisme primaire, comme l'invertase, la tréhalase et l' α -amylase.

En comparant les AWS et les AWI, 100 protéines ont été identifiées uniquement dans les AWI, 67 dans la base de données de la vigne (Annexe 1 & 2, Figure 68 A) et 33 dans celles des oomycètes (Annexe 3, Figure 68 B). Le groupe de "protéines végétales" comporte des glucanases, des inhibiteurs des enzymes, des laccases et autres protéines impliquées dans le métabolisme des carbohydrates et la réponse à l'infection. Dans la base de données des oomycètes, aucune séquence n'a été identifiée pour *P. viticola*. Les séquences identifiées sont pour la plupart de *Phytophthora infestans*, un des oomycètes séquencés. On y trouve des protéines de protection contre le stress rédox, ainsi que des protéases et des enzymes de dégradation de la paroi végétale, et un grand nombre de protéines (15) participant au métabolisme des carbohydrates.

Ces résultats donnent une première image de la composition protéique des fluides apoplastiques de feuilles témoins et ses modifications lors de l'infection. Ils ne permettent cependant pas l'identification d'une protéine candidate responsable de la dérégulation stomatique. Afin de réduire le nombre de candidats potentiels, une séparation des protéines par chromatographie d'exclusion a été effectuée avant la comparaison par spectrométrie de masse des fractions avec et sans activité sur l'ouverture stomatique.

6.4 Chromatographie d'exclusion

Une chromatographie d'exclusion a été effectuée afin de séparer les protéines dans les AWI dans le but de purifier la protéine active. Une colonne Sephacryl-200 a été utilisée et 20 fractions de 500 μ l ont été collectées. Une analyse préliminaire a montré que seules les 10 premières fractions contiennent des protéines. Ces échantillons ont donc été analysés sur le modèle des disques épidermiques. Deux échantillons

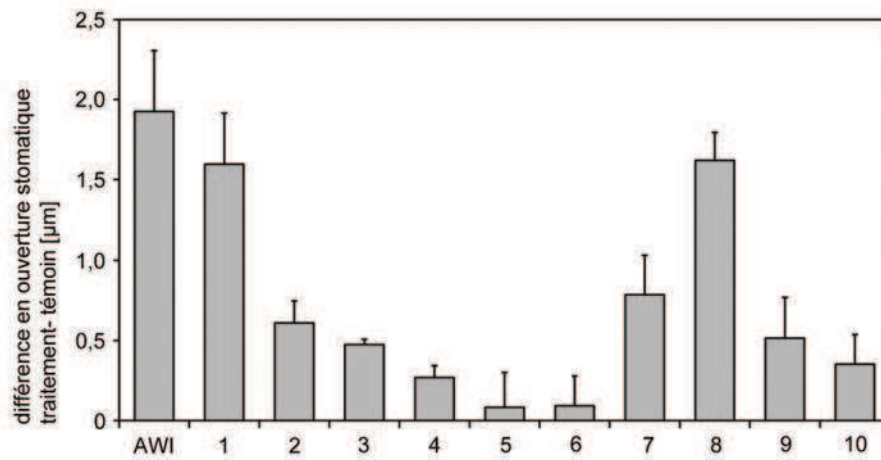


FIGURE 69 – Effet des AWI et des fractions obtenues après séparation des fluides apoplastiques des feuilles infectées par chromatographie d'exclusion sur les mouvements stomatiques. Des disques épidermiques ont été incubés dans le milieu d'infiltration (Mes-KOH 100 mM pH 6,5 ; 30 mM KCl) seul (témoin) ou en présence des AWI et des fractions (1 - 10) obtenues après la séparation des AWI par chromatographie d'exclusion. Les valeurs représentent l'ouverture stomatique induite par le traitement soustraite de celle du témoin. Les données représentent la valeur moyenne (\pm ES) mesurée pour au moins 300 stomates au total (3 répétitions biologiques).

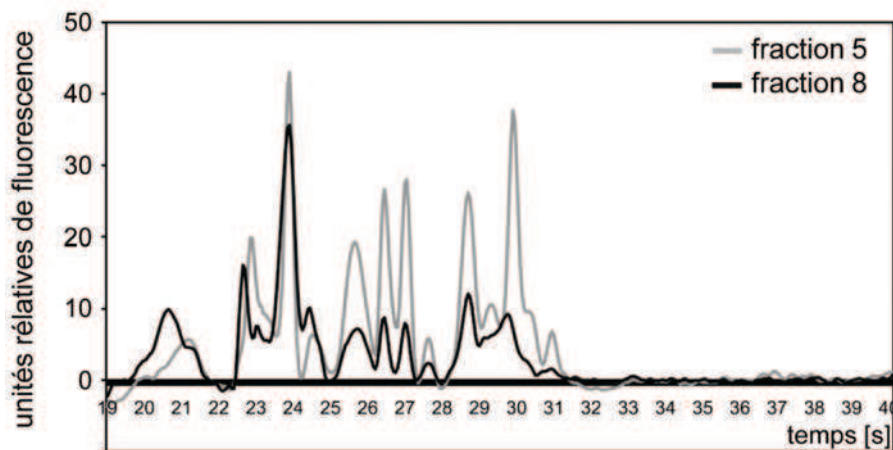


FIGURE 70 – Profils protéiques obtenus après la séparation en électrophorèse capillaire des échantillons actif (8) et inactif (5) obtenus après séparation des fluides apoplastiques des feuilles infectées (AWI) par chromatographie d'exclusion. Données représentatives pour trois répétitions biologiques.

provoquent l'induction d'une ouverture importante des stomates à l'obscurité, les fractions 1 et 8 (plus 1,6 μm par rapport au témoin, Figure 69). Deux autres échantillons peuvent être considérés comme inactifs, les fractions 5 et 6. Les fractions obtenues après séparation des AWS n'induisent pas de mouvements stomatiques à l'obscurité (données non présentées).

L'échantillon 1 correspond à la première fraction après le volume mort, il devrait donc contenir des molécules non retenues par la colonne. Les analyses suivantes se sont donc focalisées sur l'échantillon 8 qui devrait être "plus propre" et que nous avons choisi de comparer avec la fraction 5 inactive.

Les profils d'électrophorèse capillaire des fractions active (8) et inactive (5) ont été comparés, mais aucune protéine spécifique ne peut être identifiée (Figure 70). La différence de composition protéique entre ces deux échantillons ne semble donc pas être visible dans les analyses d'électrophorèse capillaire.

6.5 Spectrométrie de masse 2

La comparaison des fractions active et inactive par spectrométrie de masse a permis d'identifier 9 protéines uniquement présentes dans la fraction active (Tableau 13) et trouvées dans la base de données de la vigne. Aucune protéine n'a été identifiée dans celles des oomycètes. Parmi les protéines identifiées se trouvent des protéines impliquées dans les réactions de défense contre des pathogènes, comme une chitinase, une thaumatin-like protéine (PR5) et deux glucosidases (une glucanase et une xylosidase). De plus, des enzymes impliquées dans des voies métaboliques différentes ont été identifiées, comme une réticuline oxidase (biosynthèse des alcaloïdes), une α -mannosidase et une méthylthioadénoside/S-adénosylhomocystéine nucléosidase, et deux protéines possédant potentiellement une fonction dans la signalisation, une auxin-binding protéine et une arabinogalactan-protéine. D'après l'analyse de leur séquence par le logiciel WoLFPSORT, les deux glucosidases auraient une localisation membranaire et la thaumatin-like protéine semble localisée dans le chloroplaste, mais pour les autres protéines, différentes localisations sont possibles (Tableau 13). Ainsi, sur les 9 protéines identifiées, 6 peuvent avoir une localisation apoplastique.

Tableau 13 – Protéines identifiées uniquement dans la fraction active obtenue après séparation des protéines des AWI par chromatographie d'exclusion.

accession uniprot	kDa	pI	résultat BLAST	organisme	localisation possible (WoLFPSORT)
A5AHE5	103,24	6,50	β -1,4-xylosidase	<i>Ricinus communis</i>	protéine de la membrane plasmique
E0CUM5	21,36	9,76	Class III chitinase	<i>Vitis vinifera</i>	chloroplastique / extracellulaire / vacuolaire
D7SUB9	35,51	4,49	Mta/sah nucléosidase	<i>Ricinus communis</i>	chloroplastique / extracellulaire / cytoplasmique
A5AHH3	106,20	6,27	α -mannosidase	<i>Solanum lycopersicum</i>	cytoplasmique / extracellulaire
D7SLI1	56,77	5,93	Glucan endo-1,3- β -glucosidase, putative	<i>Ricinus communis</i>	protéine de la membrane plasmique
A5B2B6	25,05	8,13	Thaumatococin-like protéine	<i>Vitis vinifera</i>	chloroplastique
D7SV46	19,44	7,66	Phytocyanin-like arabinogalactan-protéine	<i>Gossypium hirsutum</i>	cytoplasmique / extracellulaire
A5AU00	59,50	9,06	Réticuline oxydase	<i>Lactuca sativa</i>	chloroplastique / vacuolaire
A5B0R6	37,85	6,09	Auxin-binding protéine ABP19a	<i>Prunus persica</i>	chloroplastique / cytoplasmique

Discussion

La dérégulation des stomates de feuilles de vigne infectées par *Plasmopara viticola* est probablement due à un composé d'origine végétale ou pathogène produit lors de l'interaction (probablement pour faciliter la sporulation du pathogène) et localisé dans les fluides apoplastiques (Allègre *et al.*, 2007).

Plusieurs méthodes d'extraction de ces fluides ont été décrites (Kang *et al.*, 2007a; Lohaus *et al.*, 2001). Parmi celles testées pour la vigne, la technique d'infiltration-centrifugation semble la plus adaptée à notre étude. Sur le modèle disques épidermiques, seuls les fluides apoplastiques extraits des feuilles infectées ont induit une ouverture stomatique à l'obscurité et ont supprimé l'effet de l'ABA à la lumière.

Nous ne pouvons toutefois pas exclure une contamination cytoplasmique de ces fluides. En effet, lors des différentes étapes du protocole d'isolement, les cellules végétales ou pathogènes peuvent être lésées et libérer des molécules d'origine cytoplasmique et / ou vacuolaire. Parmi les différents marqueurs de la contamination cytoplasmique décrits dans la littérature (Lohaus *et al.*, 2001; Luwe et Heber, 1995; Yamada *et al.*, 2009), nous avons choisi de mesurer les activités de la c-mdh et de la c-hpi dans les fluides apoplastiques et de les comparer à celles obtenues dans des extraits protéiques de feuilles entières. D'après nos résultats, le taux de contamination est plus élevé dans les AWI que dans les AWS et il est corrélé au développement du pathogène. Des observations similaires ont été faites par Aked et Hall (1993) sur l'interaction *Pisum sativum* - *Erysiphe pisi*. Selon ces auteurs, ces contaminations proviendraient des zones occupées par les haustoria (Aked et Hall, 1993). Dans nos échantillons, les contaminations pourraient être d'origine végétale ou provenir des zones des haustoria et des hyphes de *P. viticola* lésés lors de l'extraction des fluides. Pour répondre à cette question, il serait nécessaire d'utiliser des marqueurs plus spécifiques de la plante et du pathogène. Le taux de contamination dans les AWI estimé par l'activité c-mdh est en dessous du seuil jugé comme étant acceptable (soit 10 % de l'activité enzymatique totale)(Lopez-Millan *et al.*, 2000), contrairement à celui estimé par l'activité c-hpi où il est très nettement supérieur. Malheureusement, il nous est difficile de déterminer quel marqueur est le plus fiable. D'ailleurs, certains auteurs (Lopez-Millan *et al.*, 2000) s'interrogent sur la pertinence d'utiliser de tels marqueurs.

Les sucres peuvent moduler l'ouverture stomatique (Ewert *et al.*, 2000) et, par ailleurs, une dérégulation du métabolisme des sucres a été observée dans les feuilles infectées par *P. viticola* (cf. chapitre 1). Une de nos hypothèses a été que des modifications qualitatives et / ou quantitatives des sucres apoplastiques pouvaient avoir un effet sur l'ouverture stomatique. C'est pourquoi nous avons dosé les sucres so-

lubles dans les AWS et AWI. Pour les plantes qui chargent le phloème *via* la voie apoplastique, des concentrations en sucres atteignent des valeurs de l'ordre du mM au niveau de l'apoplasme foliaire (Aked et Hall, 1993; Lohaus *et al.*, 2001). D'après Kang *et al.* (2007b), on pouvait s'attendre à des concentrations plus faibles (de l'ordre de 100 μ M pour le saccharose et les hexoses) pour la vigne, qui utilise la voie symplastique. Cependant, nous avons obtenu des concentrations plus élevées pour les AWS et AWI (de l'ordre de 10 mM). Nous ne pouvons toutefois pas exclure que ces valeurs soient surestimées du fait de contaminations cytoplasmiques.

L'absence de saccharose et la plus forte teneur en hexoses des fluides de feuilles infectées (en comparaison avec les AWS) pourraient être corrélées à l'augmentation de l'activité d'une invertase pariétale ainsi qu'à la transition source-puits mise en évidence au cours de l'infection (cf. chapitre I). Une modification des concentrations en sucres dans des fluides apoplastiques de feuilles infectées a déjà été décrite. Pour l'interaction *Pisum sativum* - *Erysiphe pisi*, les concentrations en glucose et en saccharose augmentent au cours de l'infection (Aked et Hall, 1993) alors que dans l'interaction *Hordeum vulgare* - *Puccinia hordei* une diminution en glucose, fructose et saccharose a été observée (Tetlow et Farrar, 1993). Cependant, nous avons pu montrer que les modifications des teneurs en sucres solubles dans les AWI ne pouvaient pas expliquer la dérégulation stomatique observée.

Des analyses complémentaires ont montré que le composé actif serait une protéine glycosylée stable avec une taille probablement supérieure à 50 kDa. La glycosylation est une modification post-traductionnelle courante des protéines sécrétées (Lis et Sharon, 1993; Peter-Katalinč, 2005). Elle contribue à la diversité structurale des protéines. La longueur, la séquence, le nombre et la structure des chaînes d'oses peuvent varier. Ainsi, une protéine peut exister sous plusieurs formes glycosylées (Lis et Sharon, 1993). On distingue la N-glycosylation et la O-glycosylation.

La N-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique où un sucre, souvent la N-acétylglucosamine, est lié à un acide aminé (asparagine) dans la séquence Asn-Xaa-Ser/Thr (Varki *et al.*, 2009). La N-glycosylation peut ensuite être modifiée lors du passage de la protéine dans l'appareil de golgi par des glycosidases et glycosyltransférases. Chez les végétaux, deux types de N-glycosylation peuvent être distingués : des oligosaccharides N-liés composés uniquement de mannose et des glycanes plus complexe (Suzuki et Funakoshi, 2006).

La O-glycosylation se fait dans l'appareil de golgi. Une séquence signal pour ce type de modification n'est pas connue à ce jour (Peter-Katalinč, 2005). Un sucre (le plus souvent la N-acétylgalactosamine) est lié à un acide aminé (tyrosine, sérine, hydroxyproline ou hydroxylysine), puis des monosaccharides (fucose, galactose, N-acétylglucosamine, et acide sialique) lui sont ajoutés (Peter-Katalinč, 2005).

Les glycosylations jouent des rôles divers dans la cellule. Leurs fonctions ont surtout été décrites pour le modèle animal mais restent globalement moins connues chez les plantes (Song *et al.*, 2011). Chez les animaux, la glycosylation régule des activités enzymatiques et hormonales et participe également aux interactions cellulaires

et moléculaires (lectines, anticorps et toxines) (Lis et Sharon, 1993).

La glycosylation d'une protéine affecte sa conformation (influence le repliement de la protéine), sa localisation et sa stabilité (stabilité thermique, protection contre la protéolyse) (Lis et Sharon, 1993). Ceci pourrait expliquer pourquoi, dans notre étude, une incubation à 95 °C n'a pas modifié l'activité de la protéine recherchée sur l'ouverture stomatique et pourquoi le traitement protéase n'a pas été efficace à 100 %. Ainsi, la glycosylation aurait une fonction protectrice pour l'activité de la protéine recherchée.

La glycosylation influence les interactions entre protéines et une altération de la glycosylation peut affecter l'interaction avec un récepteur, comme cela a été montré dans le modèle animal (Lis et Sharon, 1993). Dans cette hypothèse, il est possible que la glycosylation de la protéine soit responsable de sa perception par un récepteur au niveau des cellules de garde et donc sous-tende son effet sur les mouvements stomatiques.

La glycosylation est impliquée dans des interactions plante - pathogène. Chez les végétaux, les réactions en réponse à un stress biotique affectent souvent l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la glycosylation (glycosidases et glycosyltransférases) (Pattison et Amtmann, 2009). Le rôle de cette modification post-traductionnelle dans les réactions de défense reste mal connu (Song *et al.*, 2011). Chez les oomycètes, des protéines glycosylées sont secrétées lors de l'interaction avec leur plante hôte. *Phytophthora infestans* produit une transglutaminase extracellulaire glycosylée de 42 kDa qui est reconnue en tant qu'éliciteur de défenses par plusieurs plantes (Fabritius et Judelson, 2003). Une protéine glycosylée nommée CBEL (Cellulose-Binding, Elicitor, Lectin-like) de *Phytophthora parasitica*, qui joue un rôle clé dans l'organisation de la paroi du pathogène est également reconnue comme éliciteur (Gaulin *et al.*, 2002).

Différentes origines sont donc possibles pour la protéine glycosylée que nous recherchons : (i) la protéine glycosylée active est sécrétée par la plante ou le pathogène au cours de l'infection. (ii) la protéine est présente dans les feuilles témoins et sa glycosylation est modifiée au cours de l'infection. (iii) la protéine est sécrétée par le pathogène et sa glycosylation est modifiée au cours de l'infection.

Une première analyse en spectrométrie de masse a permis d'identifier des protéines contenues dans les AWS et AWI. Les méthodes utilisées pour la préparation des échantillons ne permettent pas de comparaison quantitative des protéines contenues. Nous allons donc nous limiter à une description qualitative des protéines identifiées. Dans les AWS, nous avons identifié des protéines cytoplasmiques (~15 %), ce qui confirme les résultats obtenus précédemment à l'aide des marqueurs cytoplasmiques. La plupart des autres protéines annotées ont un rôle cohérent avec une localisation extracellulaire. On trouve des protéines du métabolisme des pectines et des glycanes, ainsi que des enzymes impliquées dans le métabolisme du galactose, fucose et mannose, qui jouent donc un rôle dans la synthèse et la dégradation des oligo- et polysaccharides pariétaux (Seifert, 2004). Une α -amylase a été identifiée dans les

AWS. Plusieurs études ont déjà indiqué la localisation d'isoformes de cette enzyme dans le milieu extracellulaire (Chen *et al.*, 2004; Doyle *et al.*, 2007). La tréhalase a également été décrite comme étant localisée sur la face externe de la membrane plasmique (Frison *et al.*, 2007). De plus, on trouve des invertases pariétales. Enfin, les AWS contiennent également des protéines associées aux mécanismes de défense constitutive ou basale, comme des chitinases, des protéases et des inhibiteurs d'enzymes hydrolytiques (Nürnberg *et al.*, 2004). De plus, quelques récepteurs kinases ont été identifiés.

L'infection par *P. viticola* induit des altérations dans la composition protéique des fluides apoplastiques, comme cela a déjà été montré pour d'autres interactions plantes - pathogènes (Gau *et al.*, 2004; Hiilovaara-Teijo *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004; Misas-Villamil et van der Hoorn, 2008; Mithöfer *et al.*, 2002).

Une partie des protéines spécifiquement identifiées dans les AWI sont des protéines de la vigne. Parmi elles se trouvent des inhibiteurs des protéases, des polygalacturonases, ainsi que des protéines PR. Ces résultats reflètent l'induction des réactions de défense de la plante en réponse à l'infection par *P. viticola*.

Des laccases ont été trouvées dans les AWI, ce qui peut être corrélé aux résultats de l'analyse transcriptomique des feuilles infectées montrant l'expression de plusieurs gènes codant pour des isoformes extracellulaires. (cf. Chapitre 1). Les laccases sont des protéines glycosylées ayant une activité de phénol oxydase et interviennent dans différents processus physiologiques.

Deux isoformes d'invertases pariétales ont été spécifiquement trouvées dans les AWI et pourraient être liées à la diminution de la teneur en saccharose et l'accumulation du glucose et fructose dans les fluides apoplastiques des feuilles infectées.

Peu de protéines d'origine pathogène ont pu être identifiées dans les AWI. Nous ne pouvons définir si elles sont spécifiques de *P. viticola* car la séquence génomique de ce pathogène n'est pas disponible à ce jour et les recherches dans les bases de données des séquences d'oomycètes disponibles ne permettent pas d'obtenir cette information. Quelques enzymes dégradant la paroi ont été trouvées parmi les protéines identifiées. De plus, on trouve des protéines (comme une catalase et une superoxyde dismutase) qui pourraient servir à protéger le pathogène contre les FAO produites par l'hôte. Une grande partie des protéines sont impliquées dans le métabolisme des sucres, entre autres des enzymes de la glycolyse qui sont typiquement cytoplasmiques. Il y a donc une contamination cytoplasmique d'origine pathogène dans les AWI.

Afin de séparer les protéines contenues dans les AWI, une chromatographie d'exclusion a été effectuée, puis le modèle disque épidermique a permis d'identifier une fraction active. Une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier neuf protéines qui semblent être spécifiques de la fraction active. Parmi elles, quatre sont des PR protéines : une chitinase, deux β -glucosidases et une thaumatin-like protéine puis il y a aussi une mannosidase, une réticuline oxydase, une met/sadh nucléosidase, une auxin-binding protéine et une arabinogalactan-protéine. Les chitinases

catalysent la dégradation de la liaison β -1,4 de la chitine et font partie de la réponse générale aux stress biotiques (Kasprzewska, 2003). Les protéines thaumatin-like (PR 5) ont été décrites pour leur activité anti-microbienne (Gorjanovic *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que leur production lors du développement des baies semble diminuer l'infection par *Erysiphe necator* (Tattersall *et al.*, 1997). Les glucosidases, représentées par plus de 100 familles chez les plantes, clivent la liaison entre des sucres et d'autres molécules (Opassiri *et al.*, 2007). Elles interviennent dans différents processus cellulaires et sont également impliquées dans les réponses à des stress biotiques / abiotiques. En effet, elles peuvent "activer", par déglycosylation, des phytohormones et des phytoanticipines et peuvent dégrader les parois des cellules des pathogènes (1,3- β -glucanase, PR2) (Joosten et De Wit, 1989; Ketudat Cairns et Esen, 2010; Morant *et al.*, 2008).

Les mannosidases sont impliquées dans la biosynthèse et le "turnover" des N-glycosylations des protéines. Elles existent sous plusieurs isoformes, localisées dans le réticulum endoplasmique, les vacuoles et l'apoplasme, où elles clivent les liaisons dans les N-glycanes (Ghosh *et al.*, 2011; Hossain *et al.*, 2010).

La réticuline oxydase, ou "berberine bridge enzyme" est une enzyme clé de la voie de biosynthèse des alcaloïdes benzylisoquinolines, qui ont une fonction dans les défenses contre des herbivores et des pathogènes (Liscombe et Facchini, 2008).

La met/sadh nucléosidase est impliquée dans le turnover de la méthionine chez les bactéries et les plantes (Parveen et Cornell, 2011).

L'auxin-binding protéine 19a présente des homologues avec des protéines germin-like (Ohmiya *et al.*, 1998). Ces protéines sont induites par les stress biotiques et abiotiques et pourraient jouer un rôle dans la défense contre des pathogènes, notamment chez la vigne (Godfrey *et al.*, 2007).

Les arabinogalactan-protéines constituent une grande famille de protéines extracellulaires avec une grande hétérogénéité à cause de la variabilité de leur séquence protéique et des résidus glycanes. Elles ont différentes fonctions dans la régulation du développement et de la croissance (Ellis *et al.*, 2010) et semblent être impliquées dans les interactions plantes-microbes (Seifert et Roberts, 2007).

Nous étions partis sur l'hypothèse d'un composé présent au niveau de l'apoplasme et avons montré qu'il s'agissait d'une protéine glycosylée de taille supérieure à 50 kDa. Malheureusement, il reste difficile de conclure sur l'identité de celle-ci.

L'analyse par spectrométrie de masse de la fraction active des AWI a permis d'identifier neuf protéines candidates. Si l'on considère que celle que l'on recherche est localisée dans l'apoplasme des feuilles infectées, trois d'entre elles - cytoplasmiques - sont à exclure (la thaumatin-like protéine, la réticuline oxydase et l'auxin binding protéine 19a). Parmi les six protéines restantes, certaines sont connues pour être glycosylées, ce qui serait cohérent avec les résultats obtenus avec le traitement de dé-glycosylation. D'après la littérature, ces 6 protéines ne sont pas connues pour jouer un rôle dans la régulation des mouvements stomatiques. Leur fonction connue serait donc indépendante de leur effet sur les stomates. D'après leur séquence en

acides aminés, leur taille est inférieure à 50 kDa, ce qui suggère que la glycosylation représente une partie importante de la taille de la protéine active.

Cependant, on ne peut pas exclure que la protéine recherchée ne soit aucune des six listées ci-dessus et soit en quantité trop faible dans les fluides apoplastiques pour pouvoir être détectée en spectrométrie de masse (M. Rossignol, communication personnelle).

Enfin, il se peut que la protéine recherchée soit spécifique de *P. viticola*. Comme il n'existe pas de base de données disponible pour les séquences de cet oomycète, elle n'a donc pu être identifiée par les analyses de données de spectrométrie de masse.

Perspectives

Les résultats obtenus suggèrent qu'une protéine glycosylée localisée dans les fluides apoplastiques serait responsable de la dérégulation stomatique observée lors de l'infection des feuilles par *P. viticola*. Cependant, les analyses par spectrométrie de masse ne nous ont pas permis de l'identifier. Des expériences supplémentaires seront donc nécessaires pour l'identifier et valider son rôle dans l'infection.

Dans l'hypothèse où la protéine recherchée n'a pas été détectée parce qu'elle était en trop faible concentration, il sera nécessaire de refaire des analyses en partant d'une plus grande quantité de fluides. Le fait qu'elle soit glycosylée pourrait faciliter sa purification. En effet, l'utilisation de colonnes "lectines" permettrait l'enrichissement des échantillons en protéines glycosylées.

La pré-purification a permis de réduire fortement la liste des protéines candidates. Cependant, une amélioration de la technique de séparation par chromatographie d'exclusion devra être apportée. En effet, pour l'identification par spectrométrie de masse, il serait nécessaire d'obtenir des fractions plus pures. Dans ce cas, nous nous attendons à avoir un grand nombre d'échantillons qu'il faudra au préalable tester sur les stomates. La méthode utilisée actuellement pour tester l'effet de molécules sur les mouvements stomatiques (disques épidermiques) est lourde puisqu'elle nécessite, notamment, de nombreuses et longues observations au microscope à fluorescence. C'est pourquoi, en parallèle, il serait nécessaire de développer un autre modèle d'étude plus adéquat et / ou d'automatiser l'analyse d'image en utilisant un modèle informatique permettant de déterminer l'ouverture stomatique.

À l'heure actuelle, il n'y a pas de base de données spécifiques de *Plasmopara viticola*. Cependant, un projet de recherche ("Downy mildew genomics" coordonné par F. Delmotte à l'INRA de Bordeaux) est actuellement en cours pour en créer une. Il sera indispensable pour la poursuite de ce travail d'utiliser cet outil pour s'assurer de l'origine (végétale / pathogène) de la protéine responsable du dysfonctionnement stomatique.

Dans l'hypothèse où ces analyses permettraient l'identification de la protéine, la glycosylation rendrait l'étude fonctionnelle difficile. En effet, même s'il est possible de produire la protéine dans un système hétérologue pour valider son activité sur les stomates, il sera difficile de reconstruire la modification post-traductionnelle.

Afin d'étudier le rôle de la glycosylation pour l'activité de la protéine recherchée, il sera intéressant de savoir si la partie glucidique seule induit l'ouverture stomatique. Pour cela, il faudrait isoler la partie glycosylée de la protéine (déglycosylation enzymatique), la purifier puis la tester sur le modèle disques épidermiques. Dans cette hypothèse, il serait possible également d'étudier les modifications de glycosylation lors de l'infection par des méthodes de spectrométrie de masse permettant la distinction entre les différentes formes glycosylées d'une protéine (Morelle et Michalski, 2007; Toll *et al.*, 2006).

Enfin, il serait intéressant de caractériser puis étudier le mode d'action de cette

protéine. D'après nos résultats préliminaires, les AWI n'agissent pas sur l'H⁺-ATPase, mais une validation avec la protéine purifiée serait nécessaire. De plus, des analyses d'électrophysiologie (par exemple de mesure des flux de K⁺) pourraient aider à comprendre sur quels événements la protéine active agit et, éventuellement, à quel niveau. Malheureusement, il ne sera pas possible d'utiliser des mutants d'*Arabidopsis* dans la mesure où les AWI n'ont eu aucun effet sur l'ouverture stomatique (à l'obscurité) de cette plante modèle.

Au vu de l'ensemble des résultats que nous avons obtenus au cours de cette thèse et de travaux précédents (Allègre, 2007), nous supposons que le composé actif dérégule le fonctionnement stomatique pour faciliter la sporulation du pathogène. Ce rôle pourrait être confirmé en utilisant des hybrides tolérants au mildiou, notamment ceux pour lesquels un développement de *P. viticola* est observé mais avec une sporulation limitée ou absente (S. Wiedemann-Merdinoglu, communication personnelle). Dans un premier temps, on pourrait tester les AWI "d'origine Marselan" sur des disques épidermiques de ces plantes afin de déterminer si le fonctionnement stomatique est dérégulé de la même manière. À l'inverse, il serait possible d'étudier les effets des AWI obtenus à partir de ces espèces sur les disques épidermiques de Marselan. Ceci permettrait d'étudier si l'infection induit la production de la protéine active dans ces feuilles ou pas.

Conclusion

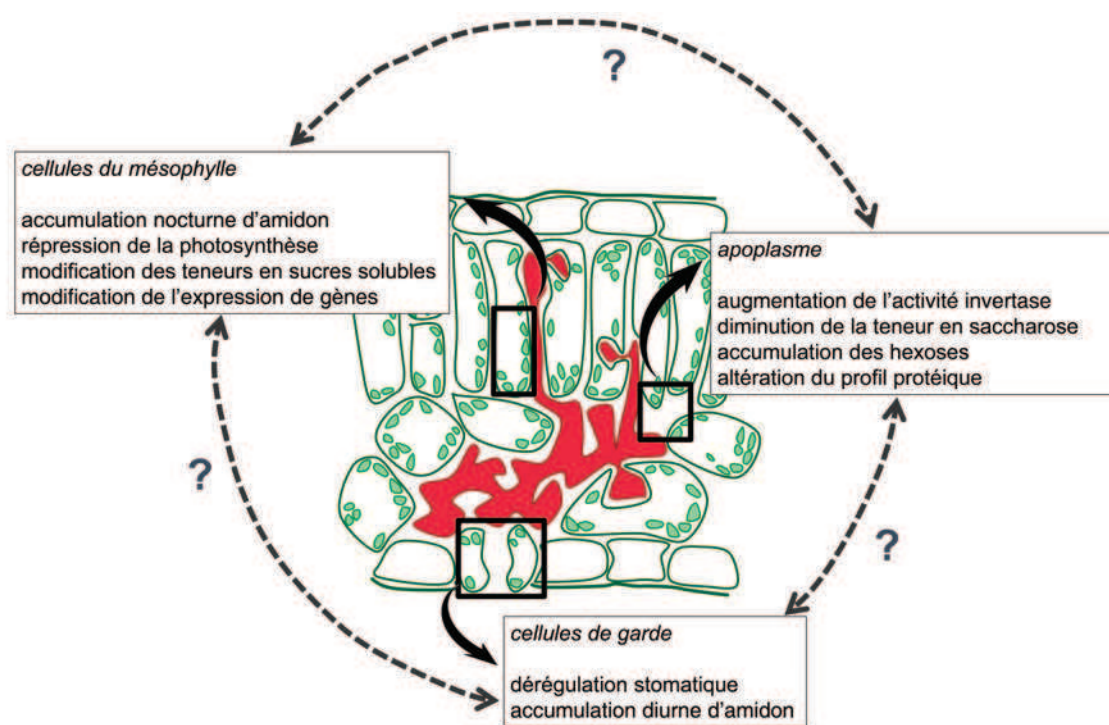


FIGURE 71 – Représentation schématique des effets de l'infection de *P. viticola* sur les feuilles de vigne.

Conclusion

L'infection par *Plasmopara viticola* entraîne des modifications importantes au niveau du fonctionnement de la feuille de vigne. D'une part, au niveau du métabolisme de l'amidon : les feuilles infectées l'accumulent au niveau des taches d'huile. D'autre part, au niveau des stomates : l'infection induit une dérégulation de leurs mouvements. Ils restent anormalement ouverts de nuit et ne se ferment plus en réponse à un stress hydrique ou à un traitement à l'ABA. Les deux parties de cette thèse avaient pour objectif i) d'expliquer l'origine et le mécanisme de l'accumulation d'amidon et ii) d'isoler et identifier le facteur responsable de la dérégulation stomatique.

L'altération du métabolisme de l'amidon au niveau des feuilles infectées a d'abord été étudiée à l'aide d'une analyse transcriptomique afin d'identifier les gènes codant pour des enzymes impliquées dans ce métabolisme, puis les activités des enzymes correspondantes ont été déterminées. Ces approches, complétées par des dosages de l'amidon et des sucres solubles ainsi que la mesure de l'activité photosynthétique, ont permis de corrélérer différents événements avec l'infection. D'après nos résultats, l'accumulation de l'amidon dans les taches d'huile pourrait résulter d'une augmentation de sa synthèse par l'augmentation de l'activité AGPase, combinée à une diminution de sa dégradation par modification de la voie de sa dégradation. Simultanément, une diminution de la photosynthèse et une augmentation de l'activité invertase marquent une transition source-puits au niveau des régions foliaires infectées.

La deuxième partie de la thèse a porté sur le facteur responsable de la dérégulation stomatique. L'hypothèse de départ était celle d'une molécule soluble d'origine végétale ou pathogène sécrétée dans l'apoplasme au cours de l'infection et capable d'induire l'ouverture stomatique. La mise au point d'une méthode d'isolement de ces fluides a permis d'étudier leur effet sur l'ouverture stomatique. Les fluides des feuilles infectées miment la dérégulation observée sur plante entière. Le composé actif serait une protéine assez stable, de taille >50 kDa et modifiée post-traductionnellement par une glycosylation essentielle à son activité sur l'ouverture stomatique. Après fractionnement des fluides des feuilles infectées et analyse par spectrométrie de masse, neuf protéines candidates de la vigne ont été identifiées. Des expérimentations supplémentaires seront nécessaires pour purifier et identifier la protéine recherchée.

Les effets de l'infection décrits dans les deux chapitres de cette thèse se placent à différents niveaux de la feuille : au niveau des cellules du mésophylle, de l'apoplasme et des cellules de garde (Figure 71). Bien qu'ils aient été étudiés de manière indépendante lors de ces travaux, il est possible qu'ils soient liés. En effet, les cellules de garde sont connectées avec les cellules du mésophylle par le continuum de l'apoplasme.

De plus, la dérégulation de l'ouverture stomatique dans les feuilles infectées s'accompagne d'une accumulation de l'amidon au niveau des chloroplastes des cellules de garde. Il serait intéressant d'étudier si ces événements sont liés aux modifications du métabolisme de l'amidon observées au niveau de la feuille entière. Cependant,

les connaissances sur la régulation du métabolisme de l'amidon dans les cellules de garde et son influence sur des mouvements stomatiques sont limitées à ce jour.

Ce travail a permis de montrer les modifications profondes que *P. viticola* induit chez la vigne. Existe-t-il un lien entre elles et si oui, lequel ? Ont-elles une fonction essentielle au développement du pathogène ? Nos résultats ont permis de formuler des hypothèses qui pourraient permettre d'initier de nouveaux travaux visant à mieux comprendre la complexité de l'interaction entre la vigne et *P. viticola*.

Bibliographie

- Abbal, P., Pradal, M., Muniz, L., Sauvage, F. X., Chatelet, P., Ueda, T., Tesniere, C., 2008. Molecular characterization and expression analysis of the Rab GTPase family in *Vitis vinifera* reveal the specific expression of a VvRabA protein. *J. Exp. Bot.* 59, 2403–2416.
- Afoufa-Bastien, D., Medici, A., Jeauffre, J., Coutos-Thevenot, P., Lemoine, R., Atanasova, R., Laloi, M., 2010. The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and microarray expression profiling. *BMC Plant Biol.* 10, 245.
- Aked, J., Hall, J. L., 1993. Effect of powdery mildew infection on concentrations of apoplastic sugars in pea leaves. *New Phytol.* 123, 283–288.
- Allègre, M., 2007. Étude du rôle des stomates dans l'interaction vigne-*Plasmopara viticola*, agent du mildiou. Thèse de doctorat à l'université de Bourgogne.
- Allègre, M., Daire, X., Héloir, M. C., Trouvelot, S., Mercier, L., Adrian, M., Pugin, A., 2007. Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *New Phytol.* 173, 832–840.
- Alonso-Villaverde, V., Voinesco, F., Viret, O., Spring, J. L., Gindro, K., 2011. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 265–274.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., Orntoft, T. F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250.
- Asai, N., Nakajima, N., Tamaoki, M., Kamada, H., Kondo, N., 2000. Role of malate synthesis mediated by phosphoenolpyruvate carboxylase in guard cells in the regulation of stomatal movement. *Plant Cell Physiol.* 41, 10–15.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bezier, A., Lambert, B., Joubert, J. M., Pugin, A., 2003. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 1118–1128.
- Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuicq, L., Jeandet, P., Couderchet, M., Vernet, G., 2006. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology* 96, 1188–1194.
- Ball, S. G., Morell, M. K., 2003. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 207–233.
- Barker, L., Kuhn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., Hellmann, H., Schulze, W., Ward, J. M., Frommer, W. B., 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12, 1153–1164.

- Bas, A., Forsberg, G., Hammarstrom, S., Hammarstrom, M. L., 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, β -actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 59, 566–573.
- Baumert, A., Mock, H. P., Schmidt, J., Herbers, K., Sonnewald, U., Strack, D., 2001. Patterns of phenylpropanoids in non-inoculated and potato virus Y-inoculated leaves of transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase. *Phytochemistry* 56, 535–541.
- Beck, E., Ziegler, P., 1989. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 40, 95–117.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., Dangl, J. L., Aug 2004. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 391–399.
- Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A. F., Cipriani, G., Morgante, M., Testolin, R., Di Gaspero, G., 2009. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theor. Appl. Genet.* 120, 163–176.
- Benhamou, N., 1999. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Sci.* 1, 233–240.
- Benhamou, N., Grenier, J., Chrispeels, M. J., 1991. Accumulation of β -Fructosidase in the Cell Walls of Tomato Roots following Infection by a Fungal Wilt Pathogen. *Plant Physiol.* 97, 739–750.
- Bent, A. F., Mackey, D., 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 399–436.
- Berger, S., Sinha, A. K., Roitsch, T., 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* 58, 4019–4026.
- Bergmann, D. C., Sack, F. D., 2007. Stomatal development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 163–181.
- Biemelt, S., Sonnewald, U., 2006. Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *J. Plant Physiol.* 163, 307–318.
- Birch, P. R., Rehmany, A. P., Pritchard, L., Kamoun, S., Beynon, J. L., 2006. Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends Microbiol.* 14, 8–11.
- Block, A., Li, G., Fu, Z. Q., Alfano, J. R., 2008. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 396–403.
- Borchert, S., Große, H., Heldt, H., 1989. Specific transport of inorganic phosphate, glucose 6-phosphate, dihydroxyacetone phosphate and 3-phosphoglycerate into amyloplasts from pea roots. *FEBS letters* 253, 183–186.

- Borovsky, D., Smith, E. E., Whelan, W. J., 1975. Purification and properties of potato 1,4- α -D-glucan:1,4- α -D-glucan 6- α -(1,4- α -glucano)-transferase. Evidence against a dual catalytic function in amylose-branching enzyme. *Eur. J. Biochem.* 59, 615–625.
- Boso, S., Kassemeyer, H. H., 2008. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. *Vitis* 47, 39–49.
- Bourque, S., 1999. Effets comparés des elicites et caractérisation de leur site de fixation chez le tabac. Thèse de doctorat à l'université de Bourgogne.
- Brem, S., Rast, D., Ruffner, H., 1986. Partitioning of photosynthate in leaves of *Vitis vinifera* infected with *Uncinula necator* or *Plasmopara viticola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29, 285–291.
- Brodmann, A., Schuller, A., Ludwig-Müller, J., Aeschbacher, R. A., Wiemken, A., Boller, T., Winkler, A., 2002. Induction of trehalase in Arabidopsis plants infected with the trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 693–700.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J. J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D., Nurnberger, T., 2002. Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from Phytophthora transglutaminases. *EMBO J.* 21, 6681–6688.
- Burton, R. A., Gidley, M. J., Fincher, G. B., 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat. Chem. Biol.* 6, 724–732.
- Burton, R. A., Jenner, H., Carrangis, L., Fahy, B., Fincher, G. B., Hylton, C., Laurie, D. A., Parker, M., Waite, D., van Wegen, S., Verhoeven, T., Denyer, K., 2002. Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant J.* 31, 97–112.
- Caspar, T., Lin, T. P., Kakefuda, G., Benbow, L., Preiss, J., Somerville, C., 1991. Mutants of Arabidopsis with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiol.* 95, 1181–1188.
- Cassab, G. I., 1998. Plant Cell Wall Proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 281–309.
- Chandran, D., Inada, N., Hather, G., Kleindt, C. K., Wildermuth, M. C., Jan 2010. Laser microdissection of Arabidopsis cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 460–465.
- Chen, M. H., Huang, L. F., Li, H. M., Chen, Y. R., Yu, S. M., 2004. Signal peptide-dependent targeting of a rice α -amylase and cargo proteins to plastids and extracellular compartments of plant cells. *Plant Physiol.* 135, 1367–1377.
- Cheng, W. H., Taliencio, E. W., Chourey, P. S., 1999. Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*Incw1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10512–10517.

- Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S. C., Smith, S. M., Smith, A. M., 2004. A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant J.* 37, 853–863.
- Chikov, V., Bakirova, G., 2004. Role of the Apoplast in the Control of Assimilate Transport, Photosynthesis, and Plant Productivity. *Russ. J. Plant Physiol.* 51, 466–478.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J. D., Felix, G., Boller, T., Jul 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448, 497–500.
- Chou, H. M., Bundock, N., Rolfe, S. A., Scholes, J. D., 2000. Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol. Plant Pathol.* 1, 99–113.
- Commuri, P. D., Keeling, P. L., 2001. Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties. *Plant J.* 25, 475–486.
- Covington, M. F., Maloof, J. N., Straume, M., Kay, S. A., Harmer, S. L., 2008. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol.* 9, R130.
- Crevillén, P., Ballicora, M. A., Merida, A., Preiss, J., Romero, J. M., 2003. The different large subunit isoforms of *Arabidopsis thaliana* ADP-glucose pyrophosphorylase confer distinct kinetic and regulatory properties to the heterotetrameric enzyme. *J. Biol. Chem.* 278, 28508–28515.
- Crevillén, P., Ventriglia, T., Pinto, F., Orea, A., Merida, A., Romero, J. M., 2005. Differential pattern of expression and sugar regulation of *Arabidopsis thaliana* ADP-glucose pyrophosphorylase-encoding genes. *J. Biol. Chem.* 280, 8143–8149.
- Critchley, J. H., Zeeman, S. C., Takaha, T., Smith, A. M., Smith, S. M., 2001. A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 26, 89–100.
- Cséfalvay, L., Di Gaspero, G., Matouš, K., Bellin, D., Ruperti, B., Olejníčková, J., 2009. Pre-symptomatic detection of *Plasmopara viticola* infection in grapevine leaves using chlorophyll fluorescence imaging. *Eur. J. Plant Pathol.* 125, 291–302.
- Dai, G., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., Boubals, D., 1995. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia*. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 46, 177–188.
- Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., Levine, A., Granot, D., 1999. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* 11, 1253–1266.
- Dancer, J., Hatzfeld, W.-D., Stitt, M., 1990. Cytosolic cycles regulate the turnover of sucrose in heterotrophic cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Planta* 182, 223–231.

- Dauvillee, D., Mestre, V., Colleoni, C., Slomianny, M., Mouille, G., Delrue, B., d'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J., Ball, S., 2000. The debranching enzyme complex missing in glycogen accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* displays an isoamylase-type specificity. *Plant Sci.* 157, 145–156.
- De Silva, D. L., Honour, S., Mansfield, T. A., 1996. Estimations of apoplastic concentrations of K^+ and Ca^+ in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytol.* 134, 463–469.
- Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszeski, J. M., Van Den Koornhuysse, N., Maddelein, M. L., Fournet, B., Ball, S., 1992. Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *J. Bacteriol.* 174, 3612–3620.
- Delvalle, D., Dumez, S., Wattebled, F., Roldan, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Merida, A., D'Hulst, C., 2005. Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J.* 43, 398–412.
- DeMichele, D. W., Sharpe, P. J., 1973. An analysis of the mechanics of guard cell motion. *J. Theor. Biol.* 41, 77–96.
- Denyer, K., Dunlap, F., Thorbjørnsen, T., Keeling, P., Smith, A. M., 1996. The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial. *Plant Physiol.* 112, 779–785.
- Dietz, K. J., 1997. Functions and Responses of the leaf apoplast under stress. *Progress in Botany* 58, 221–254.
- Dodds, P. N., Rathjen, J. P., 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548.
- Doehlert, D., Knutson, C., 1991. Two classes of starch debranching enzymes from developing maize kernels. *J. Plant. Physiol.* 138, 566–572.
- Doehlert, D. C., Huber, S. C., 1983. Regulation of Spinach Leaf Sucrose Phosphate Synthase by Glucose-6-Phosphate, Inorganic Phosphate, and pH. *Plant Physiol.* 73, 989–994.
- Doehlert, D. C., Huber, S. C., 1984. Phosphate inhibition of spinach leaf sucrose phosphate synthase as affected by glucose-6-phosphate and phosphoglucoisomerase. *Plant Physiol.* 76, 250–253.
- Doyle, E. A., Lane, A. M., Sides, J. M., Mudgett, M. B., Monroe, J. D., 2007. An α -amylase (At4g25000) in *Arabidopsis* leaves is secreted and induced by biotic and abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 30, 388–398.
- Díez-Navajas, A. M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Greif, C., Merdinoglu, D., 2008. Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. *Phytopathology* 98, 776–780.

- Düring, H., 1980. Stomatafrequenz bei Blättern von Vitis-Arten und -Sorten. *Vitis* 19, 91–98.
- Eastmond, P. J., van Dijken, A. J., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A. F., Dickinson, H. G., Jones, J. D., Smeekens, S. C., Graham, I. A., 2002. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation. *Plant J.* 29, 225–235.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D. E., Roitsch, T., 1997. Glucose and Stress Independently Regulate Source and Sink Metabolism and Defense Mechanisms via Signal Transduction Pathways Involving Protein Phosphorylation. *Plant Cell* 9, 1825–1841.
- Eimert, K., Wang, S., Lue, W.-L. and Chen, J., 1995. Monogenic Recessive Mutations Causing both Late Floral Initiation and Excess Starch Accumulation in Arabidopsis. *Plant Cell* 7, 1703–1712.
- Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C. J., Bacic, A., 2010. Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiol.* 153, 403–419.
- Ewert, M. S., Outlaw JR, W. H., Zhang, S., Aghoram, K., Riddle, K. A., 2000. Accumulation of an apoplastic solute in the guard-cell wall is sufficient to exert a significant effect on transpiration in *Vicia faba* leaflets. *Plant Cell Environ.* 23, 195–203.
- Exposito-Rodriguez, M., Borges, A. A., Borges-Perez, A., Perez, J. A., 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol.* 8, 131.
- Fabritius, A. L., Judelson, H. S., 2003. A mating-induced protein of *Phytophthora infestans* is a member of a family of elicitors with divergent structures and stage-specific patterns of expression. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 926–935.
- Farias-Rodriguez, R., Mellor, R., Arias, C., Pena-Cabriales, J., 1998. The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiol. Plant.* 102, 353–359.
- Farrell, G., Preece, T., Wren, M., 1969. Effects of infection by *Phytophthora injestans* (Mont.) de Bary on the stomata of potato leaves. *Ann. of App. Biol.* 63, 265–275.
- Felle, H. H., Hanstein, S., Steinmeyer, R., Hedrich, R., 2000. Dynamics of ionic activities in the apoplast of the sub-stomatal cavity of intact *Vicia faba* leaves during stomatal closure evoked by ABA and darkness. *Plant J.* 24, 297–304.
- Felle, H. H., Herrmann, A., Schäfer, P., Hückelhoven, R., Kogel, K. H., 2008. Interactive signal transfer between host and pathogen during successful infection of barley leaves by *Blumeria graminis* and *Bipolaris sorokiniana*. *J. Plant Physiol.* 165, 52–59.
- Fernandez, O., Bethencourt, L., Quero, A., Sangwan, R. S., Clement, C., 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *Trends Plant Sci.* 15, 409–417.
- Fettke, J., Hejazi, M., Smirnova, J., Hochel, E., Stage, M., Steup, M., 2009. Eukaryotic starch degradation: integration of plastidial and cytosolic pathways. *J. Exp. Bot.* 60, 2907–2922.

- Fincher, G., 1989. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 40, 305–346.
- Fischer, B. M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, K. J., Topfer, R., Zyprian, E. M., 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 108, 501–515.
- Flor, H. H., 1947. Inheritance of reaction to rust in flax. *J. Agr. Res.* 74, 1–62.
- Fluck, M., Dapp, C., Schmutz, S., Wit, E., Hoppeler, H., 2005. Transcriptional profiling of tissue plasticity: role of shifts in gene expression and technical limitations. *J. Appl. Physiol.* 99, 397–413.
- Fondy, B. R., Geiger, D. R., Servaites, J. C., 1989. Photosynthesis, Carbohydrate Metabolism, and Export in *Beta vulgaris* L. and *Phaseolus vulgaris* L. during Square and Sinusoidal Light Regimes. *Plant Physiol.* 89, 396–402.
- Fosu-Nyarko, J., Jones, M. G., Wang, Z., 2010. Application of laser microdissection to study plant-fungal pathogen interactions. *Methods Mol. Biol.* 638, 153–163.
- Fotopoulos, V., 2005. Plant invertases: structure, function and regulation of a diverse enzyme family. *J. Biol. Res.* 4, 127–137.
- Fotopoulos, V., Gilbert, M. J., Pittman, J. K., Marvier, A. C., Buchanan, A. J., Sauer, N., Hall, J. L., Williams, L. E., 2003. The monosaccharide transporter gene, *AtSTP4*, and the cell-wall invertase, *Atbetafruct1*, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 132, 821–829.
- Freeman, B. C., Chen, C., Beattie, G. A., 2010. Identification of the trehalose biosynthetic loci of *Pseudomonas syringae* and their contribution to fitness in the phyllosphere. *Environ. Microbiol.* 12, 1486–1497.
- Frison, M., Parrou, J. L., Guillaumot, D., Masquelier, D., Francois, J., Chaumont, F., Baktoko, H., 2007. The *Arabidopsis thaliana* trehalase is a plasma membrane-bound enzyme with extracellular activity. *FEBS Lett.* 581, 4010–4016.
- Fritzius, T., Aeschbacher, R., Wiemken, A., Wingler, A., 2001. Induction of *ApL3* expression by trehalose complements the starch-deficient *Arabidopsis* mutant *adg2-1* lacking *ApL1*, the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 126, 883–889.
- Fu, Y., Ballicora, M. A., Leykam, J. F., Preiss, J., 1998. Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* 273, 25045–25052.
- Fung, R. W., Gonzalo, M., Fekete, C., Kovacs, L. G., He, Y., Marsh, E., McIntyre, L. M., Schachtman, D. P., Qiu, W., 2008. Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiol.* 146, 236–249.
- Galet, P., 1977. Pourriture grise. Les maladies et parasites de la vigne. Imprimerie du Paysan du midi: Montpellier, 313–360.

- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A., 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 711–724.
- Gau, A., Koutb, M., Piotrowski, M., Kloppstech, K., 2004. Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo. *Eur. J. of Plant Pathol.* 89, 703–7111.
- Gaulin, E., Jauneau, A., Villalba, F., Rickauer, M., Esquerre-Tugaye, M. T., Bottin, A., 2002. The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *J. Cell. Sci.* 115, 4565–4575.
- Gauthier, A., Lamotte, O., Rebutier, D., Bouteau, F., Pugin, A., Wendehenne, D., 2007. Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signal Behav.* 2, 86–95.
- Geigenberger, P., Kolbe, A., Tiessen, A., 2005. Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *J. Exp. Bot.* 56, 1469–1479.
- Genty, B., Briantais, J., Baker, N., 1989. The relationships between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87–92.
- Ghosh, S., Meli, V. S., Kumar, A., Thakur, A., Chakraborty, N., Chakraborty, S., Datta, A., 2011. The N-glycan processing enzymes α -mannosidase and β -D-N-acetylhexosaminidase are involved in ripening-associated softening in the non-climacteric fruits of capsicum. *J. Exp. Bot.* 62, 571–582.
- Gibon, Y., Bläsing, O. E., Palacios-Rojas, N., Pankovic, D., Hendriks, J. H., Fisahn, J., Höhne, M., Günther, M., Stitt, M., 2004. Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant J.* 39, 847–862.
- Gibon, Y., Pyl, E. T., Sulpice, R., Lunn, J. E., Höhne, M., Günther, M., Stitt, M., 2009. Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant Cell Environ.* 32, 859–874.
- Gilliham, M., Dayod, M., Hocking, B. J., Xu, B., Conn, S. J., Kaiser, B. N., Leigh, R. A., Tyerman, S. D., 2011. Calcium delivery and storage in plant leaves: exploring the link with water flow. *J. Exp. Bot.* 62, 2233–2250.
- Gindro, K., Pezet, R., Viret, O., 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Phys. Biochem.* 41, 846–8537.

- Gobbin, D., Bleyer, G., Keil, S., Kassemeyer, H., Gessler, C., 2007. Evidence for sporangial dispersal leading to a single infection event and a sudden high incidence of grapevine downy mildew. *Plant Pathol.* 56, 843–847.
- Goddijn, O., Smeekens, S., 1998. Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant J.* 14, 143–146.
- 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? *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 1112–1125.
- Gorjanovic, S., Beljanski, M., Gavrovic-Jankulovic, M., Gojgic-Cvijovic, G., Pavlovic, M., Bejosano, F., 1995. Antimicrobial Activity of Malting Barley Grain Thaumatin-Like Protein Isoforms, S and R. *J. Inst. Brew.* 113, 206–212.
- Grabov, A., Blatt, M. R., 1999. A steep dependence of inward-rectifying potassium channels on cytosolic free calcium concentration increase evoked by hyperpolarization in guard cells. *Plant Physiol.* 119, 277–288.
- Graf, A., Schlereth, A., Stitt, M., Smith, A. M., 2010. Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 9458–9463.
- Graf, A., Smith, A. M., 2011. Starch and the clock: the dark side of plant productivity. *Trends Plant Sci.* 16, 169–175.
- Granot, D., 2008. Putting plant hexokinases in their proper place. *Phytochemistry* 69, 2649–2654.
- Greiner, S., Krausgrill, S., Rausch, T., 1998. Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor. Proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. *Plant Physiol.* 116, 733–742.
- Grierson, C., Du, J. S., de Torres Zabala, M., Beggs, K., Smith, C., Holdsworth, M., Bevan, M., 1994. Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J.* 5, 815–826.
- Grignon, C., Sentenac, H., 1991. pH and Ionic Conditions in the Apoplast. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42, 03–28.
- Grigston, J. C., Osuna, D., Scheible, W. R., Liu, C., Stitt, M., Jones, A. M., 2008. D-Glucose sensing by a plasma membrane regulator of G signaling protein, AtRGS1. *FEBS Lett.* 582, 3577–3584.
- Gudesblat, G. E., Torres, P. S., Vojnov, A. A., 2009. *Xanthomonas campestris* overcomes Arabidopsis stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol.* 149, 1017–1027.
- Guenin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., Gutierrez, L., 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J. Exp. Bot.* 60, 487–493.

- Guimarães, R. L., Stotz, H. U., 2004. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* de-regulates guard cells during infection. *Plant Physiol.* 136, 3703–3711.
- Guo, Y., Song, Y., 2009. Differential proteomic analysis of apoplastic proteins during initial phase of salt stress in rice. *Plant Signal Behav.* 4, 121–122.
- Göhre, V., Robatzek, S., 2008. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 189–215.
- Hannah, L. C., James, M., 2008. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 160–165.
- Hanson, J., Smeekens, S., 2009. Sugar perception and signaling—an update. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 562–567.
- Hardham, A. R., Jones, D. A., Takemoto, D., 2007. Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 342–348.
- Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J. A., Kay, S. A., 2000. Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* 290, 2110–2113.
- Hartung, W., Sauter, A., Hose, E., 2002. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J. Exp. Bot.* 53, 27–32.
- Hartung, W., Weiler, E., Rading, J., 1992. Auxin and cytokinins in the apoplasmic solution of dehydrated cotton leaves. *J. Plant Physiol.* 140, 324–327.
- Hayes, M. A., Feechan, A., Dry, I. B., 2010. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiol.* 153, 211–221.
- Heath, M. C., 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44, 321–334.
- Hein, I., Gilroy, E. M., Armstrong, M. R., Birch, P. R., 2009. The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions. *Mol. Plant Pathol.* 10, 547–562.
- Hejazi, M., Fettke, J., Haebel, S., Edner, C., Paris, O., Frohberg, C., Steup, M., Ritte, G., 2008. Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization. *Plant J.* 55, 323–334.
- Hendriks, J. H., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., Geigenberger, P., 2003. ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. *Plant Physiol.* 133, 838–849.
- Hendrix, D. L., Grange, R. I., 1991. Carbon partitioning and export from mature cotton leaves. *Plant Physiol.* 95, 228–233.
- Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H. P., Hajirezaei, M., Sonnewald, U., 2000. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol. Plant Pathol.* 1, 51–59.

- Hetherington, A. M., Woodward, F. I., 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424, 901–908.
- Hiilovaara-Teijo, M., Hannukkala, A., Griffith, M., Yu, X. M., Pihakaski-Maunsbach, K., 1999. Snow-mold-induced apoplastic proteins in winter rye leaves lack antifreeze activity. *Plant Physiol.* 121, 665–674.
- Horst, R. J., Engelsdorf, T., Sonnewald, U., Voll, L. M., 2008. Infection of maize leaves with *Ustilago maydis* prevents establishment of C4 photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 165, 19–28.
- Hossain, M. A., Nakano, R., Nakamura, K., Hossain, M. T., Kimura, Y., 2010. Molecular characterization of plant acidic α -mannosidase, a member of glycosylhydrolase family 38, involved in the turnover of N-glycans during tomato fruit ripening. *J. Biochem.* 148, 603–616.
- Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Jacobsen, E., Ponstein, A. S., Visser, R. G. F., Vos-Scheperkeuter, G. H., Bijmolt, E. W., de Vries, J. N., Witholt, B., Feenstra, W. J., 1987. Isolation of an amylose-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet* 75, 217–221.
- Hsiao, C.-C., Fu, R.-H., Sung, H.-Y., 2002. A novel bound form of plant invertase in rice suspension cells. *Bot. Bull. Acad. Sin* 43, 115–122.
- Hubbard, K. E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E. D., Schroeder, J. I., 2010. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev.* 24, 1695–1708.
- Huber, J. L., Huber, S. C., 1992a. Site-specific serine phosphorylation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. *Biochem. J.* 283 (Pt 3), 877–882.
- Huber, S. C., Huber, J. L., 1992b. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiol.* 99, 1275–1278.
- Humble, G. D., Raschke, K., 1971. Stomatal Opening Quantitatively Related to Potassium Transport: Evidence from Electron Probe Analysis. *Plant Physiol.* 48, 447–453.
- Husain, S. E., Thomas, B. J., Kingston-Smith, A. H., Foyer, C. H., 2001. Invertase protein, but not activity, is present throughout development of *Lycopersicon esculentum* and *L. pimpinellifolium* fruit. *New Phytol.* 150, 73–81.
- Hylton, C., Smith, A. M., 1992. The *rb* Mutation of Peas Causes Structural and Regulatory Changes in ADP Glucose Pyrophosphorylase from Developing Embryos. *Plant Physiol.* 99, 1626–1634.
- Incoll, L., Whitelam, G., 1977. The Effect of Kinetin on Stomata of the Grass *Antheophora pubescens* Nees. *Planta* 137, 243–245.
- Irving, H. R., Gehring, C. A., Parish, R. W., 1992. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1790–1794.

- Isidorov, V., Lech, P., Zólciak, A., Rusak, M., Szczepaniak, L., 2008. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of metabolites from the needles and roots of pine seedlings at early stages of pathogenic fungi *Armillaria ostoyae* attack. *Trees* 6, 531–542.
- Jaillon, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pè, M. E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A. F., Weissenbach, J., Quétier, F., Wincker, P., 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449, 463–467.
- James, J. J., Alder, N. N., Muhling, K. H., Lauchli, A. E., Shackel, K. A., Donovan, L. A., Richards, J. H., 2006. High apoplastic solute concentrations in leaves alter water relations of the halophytic shrub, *Sarcobatus vermiculatus*. *J. Exp. Bot.* 57, 139–147.
- Jamet, E., Albenne, C., Boudart, G., Irshad, M., Canut, H., Pont-Lezica, R., 2008. Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics* 8, 893–908.
- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., Pont-Lezica, R. F., 2006. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci.* 11, 33–39.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A., Bessis, R., Derbord, S., Sbaghi, M., Adrian, M., 2002. Phytoalexins from Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2731–2741.
- Jia, W., Davies, W. J., 2007. Modification of leaf apoplastic pH in relation to stomatal sensitivity to root-sourced abscisic acid signals. *Plant Physiol.* 143, 68–77.
- Jobic, C., Boisson, A. M., Gout, E., Rascle, C., Fèvre, M., Cotton, P., Bligny, R., 2007. Metabolic processes and carbon nutrient exchanges between host and pathogen sustain the disease development during sunflower infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Planta* 226, 251–265.
- Joosten, M., Hendrickx, L., De Wit, P., 1990. Carbohydrate composition of apoplastic fluids isolated from tomato leaves inoculated with virulent or avirulent races of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Neth. J. Pl. Path.* 96, 103–112.
- Joosten, M. H., De Wit, P. J., 1989. Identification of Several Pathogenesis-Related Proteins in Tomato Leaves Inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3-beta-Glucanases and Chitinases. *Plant Physiol.* 89, 945–951.
- Judelson, H. S., Tani, S., Narayan, R. D., 2009. Metabolic adaptation of *Phytophthora infestans* during growth on leaves, tubers and artificial media. *Mol. Plant Pathol.* 10, 843–855.

- Jürges, G., Kassemeyer, H. H., Dürrenberger, M., Düggelin, M., Nick, P., 2009. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biol. (Stuttg)* 11, 886–898.
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A., Flügge, U. I., 1998. Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* 10, 105–117.
- Kamoun, S., 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 41–60.
- Kamoun, S., Hraber, P., Sobral, B., Nuss, D., Govers, F., 1999. Initial assessment of gene diversity for the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* based on expressed sequences. *Fungal Genet. Biol.* 28, 94–106.
- Kang, Y., Outlaw, W. H., Andersen, P. C., Fiore, G. B., 2007a. Guard-cell apoplastic sucrose concentration—a link between leaf photosynthesis and stomatal aperture size in the apoplastic phloem loader *Vicia faba* L. *Plant Cell Environ.* 30, 551–558.
- Kang, Y., Outlaw, W. H., Fiore, G. B., Riddle, K. A., 2007b. Guard cell apoplastic photosynthate accumulation corresponds to a phloem-loading mechanism. *J. Exp. Bot.* 58, 4061–4070.
- Kasprzewska, A., 2003. Plant chitinases—regulation and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8, 809–824.
- Kassemeyer, H.-K., Berkelmann-Löhnertz, B., 2009. Fungi of Grapes. In: H. König et al (eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1, 61–87.
- Kennelly, M. M., Gadoury, D. M., Wilcox, W. F., Magarey, P. A., Seem, R. C., 2005. Seasonal development of ontogenic resistance to downy mildew in grape berries and rachises. *Phytopathology* 95, 1445–1452.
- Ketudat Cairns, J. R., Esen, A., 2010. β -Glucosidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3389–3405.
- Kiefer, B., Riemann, M., Büche, C., Kassemeyer, H. H., Nick, P., 2002. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta* 215, 387–393.
- Kim, J. S., Sagaram, U. S., Burns, J. K., Li, J. L., Wang, N., 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99, 50–57.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., Shimazaki, K., 2001. Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414, 656–660.
- Kinoshita, T., Shimazaki, K., 1999. Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J.* 18, 5548–5558.

- Kinoshita, T., Shimazaki, K., 2002. Biochemical evidence for the requirement of 14-3-3 protein binding in activation of the guard-cell plasma membrane H⁺-ATPase by blue light. *Plant Cell Physiol.* 43, 1359–1365.
- Kitajima, M., Butler, W. L., 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim. Biophys. Acta* 376, 105–115.
- Kleczkowski, L. A., Volland, P., Luthi, E., Olsen, O. A., Preiss, J., 1993. Insensitivity of barley endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation. *Plant Physiol.* 101, 179–186.
- Klink, V. P., Matthews, B. F., Feb 2008. The use of laser capture microdissection to study the infection of *Glycine max* (soybean) by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Plant Signal Behav.* 3, 105–107.
- Kocal, N., Sonnewald, U., Sonnewald, S., 2008. Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Physiol.* 148, 1523–1536.
- Koch, K., 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 235–246.
- Kolbe, A., Oliver, S. N., Fernie, A. R., Stitt, M., van Dongen, J. T., Geigenberger, P., 2006. Combined transcript and metabolite profiling of Arabidopsis leaves reveals fundamental effects of the thiol-disulfide status on plant metabolism. *Plant Physiol.* 141, 412–422.
- Kolbe, A., Tiessen, A., Schlupepmann, H., Paul, M., Ulrich, S., Geigenberger, P., 2005. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11118–11123.
- Kortekamp, A., 2006. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 58–67.
- Kortekamp, A., Zyprian, E., 2003. Characterization of Plasmopara-resistance in grapevine using in vitro plants. *J. Plant Physiol.* 160, 1393–1400.
- Kotting, O., Kossmann, J., Zeeman, S. C., Lloyd, J. R., 2010. Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 321–329.
- Krapp, A., Hofmann, B., Schafer, C., Stitt, M., 1993. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the ‘sink regulation’ of photosynthesis? *Plant J.* 3, 817–828.
- Kruger, N., Bulpin, P., ap Rees, T., 1983. The extent of starch degradation in the light in pea leaves. *Planta* 157, 271–273.
- Kurz, M., Burch, A. Y., Seip, B., Lindow, S. E., Gross, H., 2010. Genome-driven investigation of compatible solute biosynthesis pathways of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and their contribution to water stress tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5452–5462.

- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z. M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., Bloom, R. E., Bodde, S., Jones, J. D., Schroeder, J. I., 2003. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO J.* 22, 2623–2633.
- Kötting, O., Pusch, K., Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M., Ritte, G., 2005. Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in Arabidopsis leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiol.* 137, 242–252.
- La Cognata, U., Willmitzer, L., Muller-Rober, B., 1995. Molecular cloning and characterization of novel isoforms of potato ADP-glucose pyrophosphorylase. *Mol. Gen. Genet.* 246, 538–548.
- Lagaert, S., Belien, T., Volckaert, G., 2009. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 1064–1073.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., Wendehenne, D., 2004. Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* 135, 516–529.
- Langcake, P., Lovell, P. A., 1980. Light and electron microscopical studies of the infection of *Vitis* spp. by *Plasmopara viticola*, the downy mildew pathogen. *Vitis* 19, 321–337.
- Langer, K., Levchenko, V., Fromm, J., Geiger, D., Steinmeyer, R., Lautner, S., Ache, P., Hedrich, R., 2004. The poplar K⁺ channel KPT1 is associated with K⁺ uptake during stomatal opening and bud development. *Plant J.* 37, 828–838.
- Lawson, T., 2009. Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytol.* 181, 13–34.
- Le Henaff, G., Heitz, T., Mestre, P., Mutterer, J., Walter, B., Chong, J., 2009. Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. *BMC Plant Biol.* 9, 54.
- Lebrun-Garcia, A., Bourque, S., Binet, M. N., Ouaked, F., Wendehenne, D., Chiltz, A., Schaffner, A., Pugin, A., 1999. Involvement of plasma membrane proteins in plant defense responses. Analysis of the cryptogein signal transduction in tobacco. *Biochimie* 81, 663–668.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., Pugin, A., 1998. Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J.* 15, 773–781.
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R., Pugin, A., 2005. Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* 38, 527–538.
- 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. *Plant Cell* 14, 2627–2641.

- Lee, M., Choi, Y., Burla, B., Kim, Y. Y., Jeon, B., Maeshima, M., Yoo, J. Y., Martinoia, E., Lee, Y., 2008. The ABC transporter AtABC14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nat. Cell Biol.* 10, 1217–1223.
- Lee, S. J., Saravanan, R. S., Damasceno, C. M., Yamane, H., Kim, B. D., Rose, J. K., 2004. Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 979–988.
- Leroch, M., Kirchberger, S., Haferkamp, I., Wahl, M., Neuhaus, H. E., Tjaden, J., 2005. Identification and characterization of a novel plastidic adenine nucleotide uniporter from *Solanum tuberosum*. *J. Biol. Chem.* 280, 17992–18000.
- Levi, C., Gibbs, M., 1976. Starch degradation in isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 57, 933–935.
- Li, Z. C., McClure, J. W., Hagerman, A. E., 1989. Soluble and Bound Apoplastic Activity for Peroxidase, β -d-Glucosidase, Malate Dehydrogenase, and Nonspecific Arylesterase, in Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Oat (*Avena sativa* L.) Primary Leaves. *Plant Physiol.* 90, 185–190.
- Lin, T.-P., Spilatro, S., Preiss, J., 1988. Subcellular Localization and Characterization of Amylases in Arabidopsis Leaf. *Plant Physiol.* 86, 251–259.
- Lindenthal, M., Steiner, U., Dehne, H. W., Oerke, E. C., 2005. Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. *Phytopathology* 95, 233–240.
- Lis, H., Sharon, N., 1993. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.* 218, 1–27.
- Liscombe, D. K., Facchini, P. J., 2008. Evolutionary and cellular webs in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 173–180.
- Liu, J. J., Sturrock, R., Ekramoddoullah, A. K., 2010. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep.* 29, 419–436.
- Lloyd, J. R., Kossmann, J., Ritte, G., 2005. Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci.* 10, 130–137.
- Lohaus, G., Pennewiss, K., Sattelmacher, B., Hussmann, M., Muehling, H., 2001. Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiol. Plant.* 111, 457–465.
- Lohaus, G., Winter, H., Riens, B., Heldt, H., 1995. Further studies of the phloem process in leaves of barley and spinach. The comparison of metabolite concentrations in the apoplastic compartment with those in the cytosolic compartment and in the sieve tubes. *Bot. Acta* 108, 270–275.
- Long, J. M., Widders, I. E., 1990. Quantification of Apoplastic Potassium Content by Elution Analysis of Leaf Lamina Tissue from Pea (*Pisum sativum* L. cv *Argenteum*). *Plant Physiol.* 94, 1040–1047.

- Lopez-Millan, A. F., Morales, F., Abadia, A., Abadia, J., 2000. Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiol.* 124, 873–884.
- Lu, Y., Gehan, J. P., Sharkey, T. D., 2005. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol.* 138, 2280–2291.
- Lu, Y., Sharkey, T. D., 2004. The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta* 218, 466–473.
- Lu, Y., Sharkey, T. D., 2006. The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant Cell Environ.* 29, 353–366.
- Lu, Y., Steichen, J. M., Yao, J., Sharkey, T. D., 2006. The role of cytosolic α -glucan phosphorylase in maltose metabolism and the comparison of amylomaltase in *Arabidopsis* and *Escherichia coli*. *Plant Physiol.* 142, 878–889.
- Lund, S. T., Peng, F. Y., Nayar, T., Reid, K. E., Schlosser, J., 2008. Gene expression analyses in individual grape (*Vitis vinifera* L.) berries during ripening initiation reveal that pigmentation intensity is a valid indicator of developmental staging within the cluster. *Plant Mol. Biol.* 68, 301–315.
- Lunn, J. E., Feil, R., Hendriks, J. H., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Scheible, W. R., Carillo, P., Hajirezaei, M. R., Stitt, M., 2006. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 397, 139–148.
- Lunn, J. E., MacRae, E., 2003. New complexities in the synthesis of sucrose. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 208–214.
- Luwe, M., Heber, U., 1995. Ozone detoxification in the apoplast and symplast of spinach, broad bean and beech leaves at ambient and elevated concentrations of ozone in air. *Planta* 197, 448–455.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., Grill, E., 2009. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324, 1064–1068.
- MacRobbie, E. A., 1998. Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 353, 1475–1488.
- MacRobbie, E. A. C., 2006. Control of Volume and Turgor in Stomatal Guard Cells. *J. Membrane Biology* 210, 131–142.
- Mansfield, T., Hetherington, A., Atkinson, C., 1990. Some current aspects of stomatal physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* 41, 55–75.
- Marchive, C., Mzid, R., Deluc, L., Barrieu, F., Pirrello, J., Gauthier, A., Corio-Costet, M. F., Regad, F., Cailleteau, B., Hamdi, S., Lauvergeat, V., 2007. Isolation and characterization of a *Vitis vinifera* transcription factor, VvWRKY1, and its effect on responses to fungal pathogens in transgenic tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 58, 1999–2010.

- Marguerit, E., Boury, C., Manicki, A., Donnart, M., Butterlin, G., Némorin, A., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Ollat, N., Decroocq, S., 2009. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 118, 1261–1278.
- Marshall, O. J., 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20, 2471–2472.
- Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., 1996. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 7623–7627.
- Meidner, H., Mansfield, T., 1968. *Physiology of stomata*. McGrawHill, London.
- Melotto, M., Underwood, W., He, S. Y., 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 101–122.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., He, S. Y., 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969–980.
- Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Coste, P., Dumas, V., Haetty, A., Butterlin, G., Greif, C., 2003. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta Hort.* 603, 451–456.
- Merzendorfer, H., Zimoch, L., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393–4412.
- Meyer, S., De Angeli, A., Fernie, A. R., Martinoia, E., 2010. Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates. *Trends Plant Sci.* 15, 40–47.
- Mikkelsen, R., Baunsgaard, L., Blennow, A., 2004. Functional characterization of α -glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem. J.* 377, 525–532.
- Mikkelsen, R., Blennow, A., 2005. Functional domain organization of the potato α -glucan, water dikinase (GWD): evidence for separate site catalysis as revealed by limited proteolysis and deletion mutants. *Biochem. J.* 385, 355–361.
- Mikkelsen, R., Mutenda, K. E., Mant, A., Schurmann, P., Blennow, A., 2005. Alpha-glucan, water dikinase (GWD): a plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1785–1790.
- Mimura, T., Dietz, K., Kaiser, W., Schramm, M., Kaiser, G., Heber, U., 1990. Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. *Planta* 180, 139–146.
- Misas-Villamil, J., van der Hoorn, R., 2008. Enzyme–inhibitor interactions at the plant–pathogen interface. *Curr. Op. Plant Biol.* 11, 380–388.
- Mithöfer, A., Müller, B., Wanner, G., Eichacker, L. A., 2002. Identification of defence-related cell wall proteins in *Phytophthora sojae*-infected soybean roots by ESI-MS/MS. *Mol. Plant Pathol.* 3, 163–166.

- Miyazawa, Y., Sakai, A., Miyagishima, S., Takano, H., Kawano, S., Kuroiwa, T., 1999. Auxin and cytokinin have opposite effects on amyloplast development and the expression of starch synthesis genes in cultured bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol.* 121, 461–469.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W. H., Liu, Y. X., Hwang, I., Jones, T., Sheen, J., 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300, 332–336.
- Morant, A. V., Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, S. M., Sánchez-Pérez, R., Müller, B. L., Bak, S., 2008. beta-Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* 69, 1795–1813.
- Morell, M. K., Bloom, M., Knowles, V., Preiss, J., 1987. Subunit Structure of Spinach Leaf ADPglucose Pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 85, 182–187.
- Morelle, W., Michalski, J. C., 2007. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 2, 1585–1602.
- Morgan, W., Kamoun, S., 2007. RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 332–338.
- Mori, I. C., Murata, Y., 2011. ABA signaling in stomatal guard cells: lessons from *Commelina* and *Vicia*. *J Plant Res.*
- Moriondo, M., Orlandini, S., Giuntoli, A., Bindi, M., 2005. The Effect of Downy and Powdery Mildew on Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Leaf Gas Exchange. *J. Phytopathology* 153, 350–357.
- Mott, K. A., 1988. Do Stomata Respond to CO₂ Concentrations Other than Intercellular? *Plant Physiol.* 86, 200–203.
- Mott, K. A., 2009. Opinion: Stomatal Responses to Light and CO₂ Depend on the Mesophyll. *Plant Cell Environ.* 32, 1479–1486.
- Mzid, R., Marchive, C., Blancard, D., Deluc, L., Barrieu, F., Corio-Costet, M. F., Drira, N., Hamdi, S., Lauvergeat, V., 2007. Overexpression of VvWRKY2 in tobacco enhances broad resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Physiol. Plant.* 131, 434–447.
- Mühling, K., Sattelmacher, B., 1995. Apoplastic ion concentrations of intact leaves of field bean *V. faba* as influenced by ammonium and nitrate nutrition. *J. Plant Physiol.* 146, 81–86.
- Mühling, K., Sattelmacher, B., 1997. Determination of apoplastic K⁺ in intact leaves by ratio imaging of PBFI fluorescence. *J. Exp. Bot.* 313, 1609–1614.
- Mühling, K. H., Läuchli, A., 2000. Light-induced pH and K⁺ changes in the apoplast of intact leaves. *Planta* 212, 9–15.
- Müller, J., Boller, T., Wiemken, A., 1998. Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* L. Merr.) roots. *J Plant Physiol.* 153, 255–257.

- Müller-Röber, B., Nast, G., Willmitzer, L., 1995. Isolation and expression analysis of cDNA clones encoding a small and a large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase from sugar beet. *Plant Mol. Biol.* 27, 191–197.
- Nakamura, Y., 2002. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol.* 43, 718–725.
- Nakata, P. A., Okita, T. W., 1995. Differential Regulation of ADP-Glucose Pyrophosphorylase in the Sink and Source Tissues of Potato. *Plant Physiol.* 108, 361–368.
- Nehls, U., 2008. Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. *J. Exp. Bot.* 59, 1097–1108.
- Nelson, O. E., Rines, H. W., 1962. The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9, 297–300.
- Netting, A. G., 2002. pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions. II. Modifications in modes of metabolism induced by variation in the tension on the water column and by stress. *J. Exp. Bot.* 53, 151–173.
- Neuhaus, E., Stitt, M., 1990. Control analysis of photosynthate partitioning Impact of reduced activity of ADP-glucose pyrophosphorylase or plastid phosphoglucomutase on the fluxes to starch and sucrose in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 182, 445–454.
- Neuhaus, H. E., Häusler, R. E., Sonnwald, U., 2005. No need to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves. *Trends Plant Sci.* 10, 154–156.
- Nielsen, K. H., Schjoerring, J. K., 1998. Regulation of apoplastic NH_4^+ concentration in leaves of oilseed rape. *Plant Physiol.* 118, 1361–1368.
- Nielsen, T. H., Krapp, A., Röper-Schwarz, U., Stitt, M., 1998. The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by nitrogen and phosphate. *Plant Cell Environ.* 21, 443–455.
- Niittyla, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A. M., Zeeman, S. C., 2004. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* 303, 87–89.
- Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L., 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198, 249–266.
- Nürnberger, T., Kemmerling, B., Nov 2006. Receptor protein kinases–pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci.* 11, 519–522.
- Oecking, C., Piotrowski, M., Hagemeyer, J., Hagemann, K., 1997. Topology and target interaction of the fusicoccin-binding 14-3-3 homologs of *Commelina communis*. *Plant J.* 12, 441–453.

- Oerke, E. C., Steiner, U., Dehne, H. W., Lindenthal, M., 2006. Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *J. Exp. Bot.* 57, 2121–2132.
- Ohmiya, A., Tanaka, Y., Kadowaki, K., Hayashi, T., 1998. Cloning of genes encoding auxin-binding proteins (ABP19/20) from peach: significant peptide sequence similarity with germin-like proteins. *Plant Cell Physiol.* 39, 492–499.
- Okita, T. W., Nakata, P. A., Anderson, J. M., Sowokinos, J., Morell, M., Preiss, J., 1990. The Subunit Structure of Potato Tuber ADPglucose Pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 93, 785–790.
- Olsen, K. M., Hehn, A., Jugde, H., Slimestad, R., Larbat, R., Bourgaud, F., Lillo, C., 2010. Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biol.* 10, 21.
- Opassiri, R., Pomthong, B., Akiyama, T., Nakphaichit, M., Onkoksoong, T., Ketudat Cairns, M., Ketudat Cairns, J. R., 2007. A stress-induced rice (*Oryza sativa* L.) β -glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain. *Biochem. J.* 408, 241–249.
- Outlaw, W. H., Manchester, J., 1979. Guard Cell Starch Concentration Quantitatively Related to Stomatal Aperture. *Plant Physiol.* 64, 79–82.
- Outlaw Jr., W. H., 2003. Integration of Cellular and Physiological Functions of Guard Cells. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22, 503–529.
- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. F., Alfred, S. E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N. J., Desveaux, D., Rodriguez, P. L., McCourt, P., Zhu, J. K., Schroeder, J. I., Volkman, B. F., Cutler, S. R., 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068–1071.
- Parveen, N., Cornell, K. A., 2011. Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism. *Mol. Microbiol.* 79, 7–20.
- Pattison, R. J., Amtmann, A., 2009. N-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants. *Trends Plant Sci.* 14, 92–99.
- Paul, M., 2007. Trehalose 6-phosphate. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 303–309.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurreea, D., Zhang, Y., 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 417–441.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C. A., 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253, 895–897.
- Pellny, T. K., Ghannoum, O., Conroy, J. P., Schlupepmann, H., Smeekens, S., Andralojc, J., Krause, K. P., Goddijn, O., Paul, M. J., 2004. Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnol. J.* 2, 71–82.

- Pemadasa, M., 1982. Differential abaxial and adaxial stomatal responses to indole-3-acetic acid in *Commelina communis* L. *New Phytol.* 90, 209–219.
- Peressotti, E., Wiedemann-Merdinoglu, S., Delmotte, F., Bellin, D., Di Gaspero, G., Testolin, R., Merdinoglu, D., Mestre, P., 2010. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biol.* 10, 147.
- Perfus, L., 2002. Identification et régulation de transporteurs membranaires d'*Arabidopsis thaliana* impliqués dans la réponse aux stress métallique et hydrique. Thèse de doctorat de l'Université de la Méditerranée-Aix-Marseille II.
- Peter-Katalinč, J., 2005. Methods in Enzymology: O-Glycosylation of Proteins. *Meth. Enzymol.* 405, 139–171.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Richter, H., 2004. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* 43, 145–148.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515.
- Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S. C., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308–316.
- Pignocchi, C., Foyer, C. H., 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 379–389.
- Piotrowski, M., Morsomme, P., Boutry, M., Oecking, C., 1998. Complementation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H⁺-ATPase by a plant H⁺-ATPase generates a highly abundant fusicoccin binding site. *J. Biol. Chem.* 273, 30018–30023.
- Poinssot, B., Vandelle, E., Bentejac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thevenot, P., Pugin, A., 2003. The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 553–564.
- Polesani, M., Bortesi, L., Ferrarini, A., Zamboni, A., Fasoli, M., Zadra, C., Lovato, A., Pezzotti, M., Delledonne, M., Polverari, A., 2010. General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC Genomics* 11, 117.
- Polesani, M., Desario, F., Ferrarini, A., Zamboni, A., Pezzotti, M., Kortekamp, A., Polverari, A., 2008. cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* 9, 142.
- Polle, A., Chakrabarti, K., Schurmann, W., Renneberg, H., 1990. Composition and Properties of Hydrogen Peroxide Decomposing Systems in Extracellular and Total Extracts from Needles of Norway Spruce (*Picea abies* L., Karst.). *Plant Physiol.* 94, 312–319.

- Porebski, S., Grant Bailey, L., Baum, B., 1997. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15, 8–15.
- Postel, S., Kemmerling, B., 2009. Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 1025–1031.
- Prats, E., Gay, A. P., Mur, L. A., Thomas, B. J., Carver, T. L., 2006. Stomatal lock-open, a consequence of epidermal cell death, follows transient suppression of stomatal opening in barley attacked by *Blumeria graminis*. *J. Exp. Bot.* 57, 2211–2226.
- Preiss, J., 1988. Biosynthesis of starch and its regulation. In: *The Biochemistry of Plants* (Preiss, J. ed.), Academic Press, San Diego 14, 181–254.
- Prieto, S., de la Cruz, B. J., Scheffler, I. E., 2000. Glucose-regulated turnover of mRNA and the influence of poly(A) tail length on half-life. *J. Biol. Chem.* 275, 14155–14166.
- Ramon, M., Rolland, F., 2007. Plant development: introducing trehalose metabolism. *Trends Plant Sci.* 12, 185–188.
- Ramon, M., Rolland, F., Sheen, J., 2008. Sugar Sensing and Signaling. *The Arabidopsis Book* 1, e0117.
- Ramon, M., Rolland, F., Thevelein, J. M., Van Dijck, P., Leyman, B., 2007. ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on Arabidopsis growth and starch breakdown. *Plant Mol. Biol.* 63, 195–206.
- Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., Lund, S. T., 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* 6, 27.
- Renard-Merlier, D., Randoux, B., Nowak, E., Farcy, F., Durand, R., Reignault, P., Apr 2007. Iodine 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry* 68, 1156–1164.
- Rennie, E. A., Turgeon, R., 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14162–14167.
- Ribeiro, D. M., Desikan, R., Bright, J., Confraria, A., Harrison, J., Hancock, J. T., Barros, R. S., Neill, S. J., Wilson, I. D., 2009. Differential requirement for NO during ABA-induced stomatal closure in turgid and wilted leaves. *Plant Cell Environ.* 32, 46–57.
- Ritte, G., Scharf, A., Eckermann, N., Haebel, S., Steup, M., 2004. Phosphorylation of transitory starch is increased during degradation. *Plant Physiol.* 135, 2068–2077.
- Rodriguez, M., Taleisnik, E., Lenardon, S., Lascano, R., 2010. Are Sunflower chlorotic mottle virus infection symptoms modulated by early increases in leaf sugar concentration? *J. Plant Physiol.* 167, 1137–1144.
- Roelfsema, M., Hedrich, R., 2002. Studying guard cells in the intact plant: modulation of stomatal movement by apoplastic factors. *New Phytol.* 153, 425–431.

- Roelfsema, M. R., Hedrich, R., 2005. In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytol.* 167, 665–691.
- Roelfsema, M. R., Levchenko, V., Hedrich, R., 2004. ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant J.* 37, 578–588.
- Roitsch, T., 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 198–206.
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., Sinha, A. K., 2003. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.* 54, 513–524.
- Roitsch, T., González, M. C., 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9, 606–613.
- Roldan, I., Wattedled, F., Mercedes Lucas, M., Delvalle, D., Planchot, V., Jimenez, S., Perez, R., Ball, S., D'Hulst, C., Merida, A., 2007. The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J.* 49, 492–504.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J., 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 675–709.
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C., Bevan, M. W., 2001. Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J.* 26, 421–433.
- Ruffner, H., Adler, S., Rast, D., 1990. Soluble and wall associated forms of invertase in *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* 29, 2083–2086.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J., Moorman, A. F., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37, e45.
- Ruiz, E., Ruffner, H., 2002. Immunodetection of Botrytis-specific Invertase in Infected Grapes. *J. Phytopathology* 150, 76–85.
- Rumbolz, J., Wirtz, S., Kassemeyer, H., Guggenheim, R., Schäfer, E., Büche, C., 2002. Sporulation of *Plasmopara viticola*: Differentiation and Light Regulation. *Plant Biol.* 4, 413–422.
- Sakurai, N., 1998. Dynamic Function and Regulation of Apoplast in the Plant Body. *J. Plant Res.* 111, 133–148.
- Satoh-Nagasawa, N., Nagasawa, N., Malcomber, S., Sakai, H., Jackson, D., 2006. A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. *Nature* 441, 227–230.
- Sattelmacher, B., 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol.* 149, 167–192.

- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M., Wisman, E., 2001. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 113–123.
- Scharte, J., Schön, H., Weis, E., 2005. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Cell Environ.* 28, 1421–1435.
- Scheible, W. R., Gonzalez-Fontes, A., Lauerer, M., Muller-Rober, B., Caboche, M., Stitt, M., 1997. Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. *Plant Cell* 9, 783–798.
- Scheidig, A., Frohlich, A., Schulze, S., Lloyd, J. R., Kossmann, J., 2002. Downregulation of a chloroplast-targeted β -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J.* 30, 581–591.
- Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S., Paul, M., 2003. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6849–6854.
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M., Smeekens, S., 2004. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol.* 135, 879–890.
- Schmidlin, L., Poutaraud, A., Claudel, P., Mestre, P., Prado, E., Santos-Rosa, M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Karst, F., Merdinoglu, D., Hugueney, P., 2008. A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiol.* 148, 1630–1639.
- Scholes, J. D., Lee, P. J., Horton, P., Lewis, D. H., 1994. Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytol.* 126, 213–222.
- Schouten, J., de Kam, R. J., Fetter, K., Hoge, J. H., 2000. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* SKP1 homologues in yeast inactivates the Mig1 repressor by destabilising the F-box protein Grr1. *Mol. Gen. Genet.* 263, 309–319.
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W., 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10, 51–62.
- Seifert, G. J., 2004. Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 277–284.
- Seifert, G. J., Roberts, K., 2007. The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 137–161.
- Shi, H., Zhu, J. K., 2002. Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 50, 543–550.

- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S. M., Kinoshita, T., 2007. Light regulation of stomatal movement. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 219–247.
- Simon-Plas, F., Elmayan, T., Blein, J. P., 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* 31, 137–147.
- Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H. C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., Valot, B., Zivy, M., Leung, J., Merlot, S., Kwak, J. M., 2009. Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett.* 583, 2982–2986.
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J., Rolland, F., 2010. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 274–279.
- Smith, A. M., 2001. The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules* 2, 335–341.
- Smith, A. M., Stitt, M., 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ.* 30, 1126–1149.
- Smith, A. M., Zeeman, S. C., 2006. Quantification of starch in plant tissues. *Nat. Protoc.* 1, 1342–1345.
- Smith, S. M., Fulton, D. C., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, S. C., Smith, A. M., 2004. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol.* 136, 2687–2699.
- Sokolov, L. N., Dejardin, A., Kleczkowski, L. A., 1998. Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochem. J.* 336, 681–687.
- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A., Perata, P., 2006. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 140, 637–646.
- Song, W., Henquet, M. G., Mentink, R. A., van Dijk, A. J., Cordewener, J. H., Bosch, D., America, A. H., van der Krol, A. R., 2011. N-glycoproteomics in plants: Perspectives and challenges. *J Proteomics.*
- Soulard, A., Cohen, A., Hall, M. N., 2009. TOR signaling in invertebrates. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 825–836.
- Speer, M., Kaiser, W. M., 1991. Ion Relations of Symplastic and Apoplastic Space in Leaves from *Spinacia oleracea* L. and *Pisum sativum* L. under Salinity. *Plant Physiol.* 97, 990–997.
- Steup, M., 1981. Purification of chloroplast α -1,4-glucan phosphorylase from spinach leaves by chromatography on Sepharose-bound starch. *Biochim. Biophys. Acta* 659, 123–131.
- Stitt, M., Heldt, H. W., 1981. Physiological Rates of Starch Breakdown in Isolated Intact Spinach Chloroplasts. *Plant Physiol.* 68, 755–761.

- Stitt, M., Rees, T. A., 1980. Carbohydrate breakdown by chloroplasts of *Pisum sativum*. *Biochim. Biophys. Acta* 627, 131–143.
- Storr, T., Hall, J. L., 1992. The effect of infection by *Erysiphe pisi* DC on acid and alkaline invertase activities and aspects of starch biochemistry in leaves of *Pisum sativum* L. *New Phytol.* 121, 535–543.
- Sturm, A., Chrispeels, M. J., 1990. cDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell* 2, 1107–1119.
- Suarez, R., Wong, A., Ramirez, M., Barraza, A., Orozco, M. d. e. l. C., Cevallos, M. A., Lara, M., Hernandez, G., Iturriaga, G., 2008. Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 958–966.
- Sugden, C., Crawford, R. M., Halford, N. G., Hardie, D. G., 1999. Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J.* 19, 433–439.
- Suzuki, T., Funakoshi, Y., 2006. Free N-linked oligosaccharide chains: formation and degradation. *Glycoconj. J.* 23, 291–302.
- Swarbrick, P. J., Schulze-Lefert, P., Scholes, J. D., 2006. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant Cell Environ.* 29, 1061–1076.
- Szydlowski, N., Ragel, P., Raynaud, S., Lucas, M. M., Roldan, I., Montero, M., Munoz, F. J., Ovecka, M., Bahaji, A., Planchot, V., Pozueta-Romero, J., D'Hulst, C., Merida, A., 2009. Starch granule initiation in Arabidopsis requires the presence of either class IV or class III starch synthases. *Plant Cell* 21, 2443–2457.
- Takahama, U., Oniki, T., 1992. Regulation of Peroxidase-Dependent Oxidation of Phenolics in the Apoplast of Spinach Leaves by Ascorbate. *Plant Cell Physiol.* 33, 379–387.
- Talbott, L. D., Zeiger, E., 1993. Sugar and Organic Acid Accumulation in Guard Cells of *Vicia faba* in Response to Red and Blue Light. *Plant Physiol.* 102, 1163–1169.
- Talbott, L. D., Zeiger, E., 1996. Central Roles for Potassium and Sucrose in Guard-Cell Osmoregulation. *Plant Physiol.* 111, 1051–1057.
- Tang, X., Rolfe, S. A., Scholes, J. D., 1996. The effect of *Albugo Candida* (white blister rust) on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 19, 967–975.
- Tattersall, D. B., van Heeswijck, R., Høj, P. B., 1997. Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiol.* 114, 759–769.
- Tetlow, I., 2004. Understanding storage starch biosynthesis in plants: a means to quality improvement. *Can. J. Bot.* 84, 1167–1185.

- Tetlow, I. J., Davies, E. J., Vardy, K. A., Bowsher, C. G., Burrell, M. M., Emes, M. J., 2003. Subcellular localization of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform. *J. Exp. Bot.* 54, 715–725.
- Tetlow, I. J., Farrar, J. F., 1993. Apoplastic Sugar Concentration and pH in Barley Leaves Infected with Brown Rust. *Journal of Experimental Botany* 44, 929–936.
- Tetlow, I. J., Morell, M. K., Emes, M. J., 2004a. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J. Exp. Bot.* 55, 2131–2145.
- Tetlow, I. J., Wait, R., Lu, Z., Akkasaeng, R., Bowsher, C. G., Esposito, S., Kosar-Hashemi, B., Morell, M. K., Emes, M. J., 2004b. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *Plant Cell* 16, 694–708.
- Thiel, G., MacRobbie, E. A., Blatt, M. R., 1992. Membrane transport in stomatal guard cells: the importance of voltage control. *J. Membr. Biol.* 126, 1–18.
- Thines, M., Kamoun, S., 2010. Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 427–433.
- Thorbjørnsen, T., Volland, P., Kleczkowski, L. A., Olsen, O. A., 1996. A single gene encodes two different transcripts for the ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit from barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. J.* 313, 149–154.
- Thordal-Christensen, H., 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 351–357.
- Tiessen, A., Hendriks, J. H., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farré, E. M., Geigenberger, P., 2002. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* 14, 2191–2213.
- Tiessen, A., Prescha, K., Branscheid, A., Palacios, N., McKibbin, R., Halford, N. G., Geigenberger, P., 2003. Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J.* 35, 490–500.
- Toll, H., Berger, P., Hofmann, A., Hildebrandt, A., Oberacher, H., Lenhof, H. P., Huber, C. G., 2006. Glycosylation patterns of human chorionic gonadotropin revealed by liquid chromatography-mass spectrometry and bioinformatics. *Electrophoresis* 27, 2734–2746.
- Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distante, V., Pazzagli, M., Bustin, S. A., Orlando, C., 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal. Biochem.* 309, 293–300.
- Trouvelot, S., Varnier, A. L., Allègre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J. M., Pugin, A., Daire, X., 2008. A β -1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of

- defense responses, including HR-like cell death. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 232–243.
- Tsai, C. Y., 1974. The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochem. Genet.* 11, 83–96.
- Turgeon, R., 2010. The role of phloem loading reconsidered. *Plant Physiol.* 152, 1817–1823.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., Chu, G., 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5116–5121.
- van Kooten, O., Snel, J., 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. In: Snel, J., van Kooten, O. (Eds.), *Photosynthetic Research.* 25, 147–150.
- van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 1–12.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Stanley, P., Bertozzi, C., Hart, G., Etzler, M., 2009. *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (NY).
- Vavasseur, A., Raghavendra, A. S., 2005. Guard cell metabolism and CO₂ sensing. *New Phytol.* 165, 665–682.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D. A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., Fitzgerald, L. M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, T., Facci, M., Mitchell, J. T., Perazzolli, M., Eldredge, G., Gatto, P., Oyzerski, R., Moretto, M., Gutin, N., Stefanini, M., Chen, Y., Segala, C., Davenport, C., Dematte, L., Mraz, A., Battilana, J., Stormo, K., Costa, F., Tao, Q., Si-Ammour, A., Harkins, T., Lackey, A., Perbost, C., Taillon, B., Stella, A., Solovyev, V., Fawcett, J. A., Sterck, L., Vandepoele, K., Grando, S. M., Toppo, S., Moser, C., Lanchbury, J., Bogden, R., Skolnick, M., Sgaramella, V., Bhatnagar, S. K., Fontana, P., Gutin, A., Van de Peer, Y., Salamini, F., Viola, R., 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* 2, e1326.
- Very, A. A., Sentenac, H., 2003. Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 575–603.
- Villand, P., Olsen, O. A., Kilian, A., Kleczkowski, L. A., 1992. ADP-Glucose Pyrophosphorylase Large Subunit cDNA from Barley Endosperm. *Plant Physiol.* 100, 1617–1618.
- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P. L., Lauriere, C., Merlot, S., 2009. Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 3170–3184.

- Voegele, R. T., Struck, C., Hahn, M., Mendgen, K., 2001. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 8133–8138.
- Voegele, R. T., Wirsal, S., Möll, U., Lechner, M., Mendgen, K., 2006. Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. Mol. Plant Microbe Interact. 19, 625–634.
- Walters, D. R., McRoberts, N., 2006. Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? Trends Plant Sci. 11, 581–586.
- Wang, X., Liu, W., Chen, X., Tang, C., Dong, Y., Ma, J., Huang, X., Wei, G., Han, Q., Huang, L., Kang, Z., 2010. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. BMC Plant Biol. 10, 9.
- Weiner, H., Stitt, M., Heldt, H., 1987. Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline phosphatase in leaves. Biochim. Biophys. Acta 893, 13–21.
- Weise, S. E., van Wijk, K. J., Sharkey, T. D., 2011. The role of transitory starch in C3, CAM, and C4 metabolism and opportunities for engineering leaf starch accumulation. J. Exp. Bot. 62, 3109–3118.
- Wellburn, A., Lichtenthaler, H., 1984. Formulae and program to determine carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. In: C. Sybesma, ed, Advances in photosynthesis research Vol 2., 9–12.
- Welter, I., Göktürk-Baydar, N., Akkurt, M., Maul, F., Eibach, R., Töpfer, R., Zyprian, E., 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Mol. Breed. 20, 359–374.
- Weltmeier, F., Rahmani, F., Ehlert, A., Dietrich, K., Schutze, K., Wang, X., Chaban, C., Hanson, J., Teige, M., Harter, K., Vicente-Carbajosa, J., Smeekens, S., Droge-Laser, W., 2009. Expression patterns within the Arabidopsis C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. Plant Mol. Biol. 69, 107–119.
- Wille, A. C., Lucas, W. J., 1984. Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. Planta 160, 129–142.
- Willmer, C., Fricker, M., 1996. Stomata. Second edition. Chapman, Hall, London, UK.
- Willmer, C., Sexton, R., 1979. Stomata and Plasmodesmata. Protoplasma 100, 113–124.
- Wind, J., Smeekens, S., Hanson, J., 2010. Sucrose: metabolite and signaling molecule. Phytochemistry 71, 1610–1614.
- Wingler, A., Fritzius, T., Wiemken, A., Boller, T., Aeschbacher, R. A., 2000. Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, ApL3, and starch synthesis in Arabidopsis. Plant Physiol. 124, 105–114.

- Winter, H., Huber, S. C., Brown, C. S., 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 253–289.
- Winter, H., Robinson, D., Heldt, H., 1994. Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta* 193, 530–535.
- Wong, M. L., Medrano, J. F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39, 75–85.
- Wright, D., Baldwin, B., Shephard, M., Scholes, J., 1995. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. I. Alterations in carbohydrate metabolism. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47, 237–253.
- Xiao, W., Sheen, J., Jang, J. C., 2000. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol. Biol.* 44, 451–461.
- Xue, J. L., Salem, T. Z., Turney, C. M., Cheng, X. W., 2010. Strategy of the use of 28S rRNA as a housekeeping gene in real-time quantitative PCR analysis of gene transcription in insect cells infected by viruses. *J. Virol. Methods* 163, 210–215.
- Yamada, K., Norikoshi, R., Suzuki, K., Imanishi, H., Ichimura, K., 2009. Determination of subcellular concentrations of soluble carbohydrates in rose petals during opening by nonaqueous fractionation method combined with infiltration-centrifugation method. *Planta* 230, 1115–1127.
- Yu, T. S., Kofler, H., Hausler, R. E., Hille, D., Flugge, U. I., Zeeman, S. C., Smith, A. M., Kossmann, J., Lloyd, J., Ritte, G., Steup, M., Lue, W. L., Chen, J., Weber, A., 2001. The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell* 13, 1907–1918.
- Yu, T. S., Lue, W. L., Wang, S. M., Chen, J., 2000. Mutation of *Arabidopsis* plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. *Plant Physiol.* 123, 319–326.
- Yu, T. S., Zeeman, S. C., Thorneycroft, D., Fulton, D. C., Dunstan, H., Lue, W. L., Hegemann, B., Tung, S. Y., Umemoto, T., Chapple, A., Tsai, D. L., Wang, S. M., Smith, A. M., Chen, J., Smith, S. M., 2005. α -Amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves. *J. Biol. Chem.* 280, 9773–9779.
- Zeeman, S., Rees, T., 1999. Changes in carbohydrate metabolism and assimilate partitioning in starch-excess mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 22, 1445–1453.
- Zeeman, S., Smith, S., Smith, A., 2004. The breakdown of starch in leaves. *New Phytol.* 163, 247–261.
- Zeeman, S. C., Smith, S. M., Smith, A. M., 2007. The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem. J.* 401, 13–28.

- Zeeman, S. C., Tiessen, A., Pilling, E., Kato, K. L., Donald, A. M., Smith, A. M., 2002. Starch synthesis in *Arabidopsis*. Granule synthesis, composition, and structure. *Plant Physiol.* 129, 516–529.
- Zeiger, E., Bloom, A., Hepler, P., 1978. Ion transport in stomatal guard cells: a chemiosmotic hypothesis. *What's New in Plant Physiol.* 9, 29–32.
- Zhang, W., He, S. Y., Assmann, S. M., 2008. The plant innate immunity response in stomatal guard cells invokes G-protein-dependent ion channel regulation. *Plant J.* 56, 984–996.
- Zhao, J., Davis, L. C., Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23, 283–333.
- Zhao, L., Sack, F. D., Jul 1999. Ultrastructure of stomatal development in *Arabidopsis* (Brassicaceae) leaves. *Am. J. Bot.* 86, 929–939.

Annexe

Tableau 1 – Protéines de *V. vinifera* identifiés par spectrométrie de masse dans les fluides apoplastiques des feuilles infectées par *P. viticola* (AWI). Les peptides trouvés uniquement dans les AWI en comparaison avec le témoin ont été comparés à la base de données UNIPROT de la vigne.

Accession	PAI	fraction	description	homologie BLAST	species
UNIPROT moyen					
A5AKC7	0,48976	AWI2	Putative uncharacterized protein	Putative laccase	<i>Rosa hybrid cultivar</i>
A5AMS5	0,31433	AWI1,AWI2	Putative uncharacterized protein	GDSL esterase/lipase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A5AS02	0,18387	AWI1,AWI2	Putative uncharacterized protein	Class IV chitinase	<i>Vitis vinifera</i>
A5AWM9	0,5469	AWI2	Putative uncharacterized protein	Chitinase, putative	<i>Ricinus communis</i>
A5B0R6	0,26623	AWI2	Putative uncharacterized protein	Germin-like protein 6	<i>Vitis vinifera</i>
A5B142	0,63071	AWI1,AWI2	Putative uncharacterized protein	Putative laccase	<i>Rosa hybrid cultivar</i>
A5B197	0,12103	AWI2	Putative uncharacterized protein	Ascorbate oxidase	<i>Solanum lycopersicum</i>
A5B632	0,32932	AWI1,AWI2	Putative uncharacterized protein	Kunitz-type trypsin inhibitor	<i>Populus nigra</i>
A5B8K4	0,2738	AWI1	Isocitrate dehydrogenase [NADP]		
A5B8K9	0,26807	AWI1	Pectinesterase		
A5B949	0,11417	AWI2	Putative uncharacterized protein	Germin-like protein 6	<i>Vitis vinifera</i>
A5B9P8	0,27448	AWI1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		
A5BCQ0	0,72625	AWI1,AWI2	Putative uncharacterized protein	Kunitz-type trypsin inhibitor	<i>Populus nigra</i>
A5BDU8	0,25232	AWI1,AWI2	Dihydrolipoyl dehydrogenase		
A5BFN1	0,74124	AWI1,AWI2	Pectinesterase		
A5BJB7	0,15539	AWI1,AWI2	Putative uncharacterized protein	Putative laccase	<i>Rosa hybrid cultivar</i>
A5BUK6	0,14762	AWI1,AWI2	Putative uncharacterized protein	Phosphoglucosyltransferase, putative	<i>Ricinus communis</i>
A5BUP7	0,31758	AWI1	Putative uncharacterized protein	GDSL esterase/lipase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A5BX54	0,2162	AWI1	Isocitrate dehydrogenase [NADP]		
A5C009	0,76387	AWI1,AWI2	Putative uncharacterized protein	Putative laccase	<i>Rosa hybrid cultivar</i>
A5C850	1,059	AWI1,AWI2	Putative uncharacterized protein	Kunitz-type trypsin inhibitor	<i>Populus nigra</i>
A5C9F2	0,15595	AWI1,AWI2	Putative uncharacterized protein	Osmotin-like protein	<i>Vitis vinifera</i>
A5CAL1	0,72925	AWI1	Putative uncharacterized protein	Glycerate dehydrogenase, putative	<i>Ricinus communis</i>
A5JPK7	0,7672	AWI1,AWI2	Monodehydroascorbate reductase		
A7PW81	0,33871	AWI1	Polygalacturonase inhibitor		
C5MQQ6	0,33724	AWI1	Polygalacturonase-inhibiting protein		
D7SGY4	0,49249	AWI1,AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_0.assembly12x	Hydrolase, putative	<i>Ricinus communis</i>
D7SGY6	0,51896	AWI1	Whole genome shotgun sequence, scaffold_0.assembly12x	Hydrolase, putative	<i>Ricinus communis</i>
D7SKQ2	0,1851	AWI1	Whole genome shotgun sequence, scaffold_4.assembly12x	Glutathione S-transferase omega	<i>Jatropha curcas</i>
D7SLF2	0,67111	AWI1,AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_4.assembly12x	Disease resistance response protein	<i>Ricinus communis</i>
D7SLF4	1,2233	AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_4.assembly12x	Disease resistance response protein	<i>Ricinus communis</i>
D7SPP4	0,095459	AWI1	Whole genome shotgun sequence, scaffold_23.assembly12x	Isopentenyl diphosphate isomerase 2	<i>Nicotiana tabacum</i>

Tableau 2 – suite: Protéines de *V. vinifera* identifiées par spectrométrie de masse dans les fluides apoplastiques des feuilles infectées par *P. viticola* (AWI). Les peptides trouvés uniquement dans les AWI en comparaison avec le témoin ont été comparés à la base de données UNIPROT de la vigne.

accession UNIPROT	PAI moyen	fraction	description	homologie BLAST	species
D7SRK5	0,30895	AWI1,AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_75.assembly12x	Putative laccase	<i>Rosa hybrid cultivar</i>
D7SV80	0,15019	AWI1,AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_8.assembly12x	Aspartic proteinase nepenthésin-2, putative	<i>Ricinus communis</i>
D7SW06	0,11751	AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_31.assembly12x	Ascorbate oxidase	<i>Solanum lycopersicum</i>
D7SW08	0,1173	AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_31.assembly12x	Ascorbate oxidase	<i>Solanum lycopersicum</i>
D7SW11	0,111	AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_31.assembly12x	Ascorbate oxidase	<i>Solanum lycopersicum</i>
D7SW16	0,045045	AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_31.assembly12x	Ascorbate oxidase	<i>Solanum lycopersicum</i>
D7T1A2	0,61425	AWI1,AWI2	Pectinesterase		
D7T1A5	0,93651	AWI1,AWI2	Pectinesterase		
D7T1T9	0,14946	AWI1,AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_22.assembly12x	Phosphoglucosmuttase, putative	<i>Ricinus communis</i>
D7T5Q6	0,38323	AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_510.assembly12x	Aspartic proteinase nepenthésin-2, putative	<i>Ricinus communis</i>
D7T7Z7	0,31555	AWI1	Whole genome shotgun sequence, scaffold_90.assembly12x	GDSL esterase/lipase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
D7T828	0,27408	AWI1,AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_90.assembly12x	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, putative	<i>Ricinus communis</i>
D7T9I3	0,39969	AWI1,AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_11.assembly12x	Serine carboxypeptidase-like 35	<i>Arabidopsis thaliana</i>
D7TC84	0,29281	AWI2	Pectinesterase		
D7TFP5	0,87305	AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_111.assembly12x	Putative laccase	<i>Rosa hybrid cultivar</i>
D7TFP6	0,35828	AWI1,AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_111.assembly12x	Putative laccase	<i>Rosa hybrid cultivar</i>
D7TFQ1	0,36048	AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_111.assembly12x	Putative laccase	<i>Rosa hybrid cultivar</i>
D7TI37	0,35177	AWI1	Whole genome shotgun sequence, scaffold_7.assembly12x	Polygalacturonase inhibitor	<i>Vitis vinifera</i>
D7TML8	0,40623	AWI1	Whole genome shotgun sequence, scaffold_19.assembly12x	Xylem sap protein 10 kDa	<i>Solanum lycopersicum</i>
D7TVM1	0,037688	AWI1	Whole genome shotgun sequence, scaffold_25.assembly12x	Heat shock protein, putative	<i>Ricinus communis</i>
D7TVR9	0,27113	AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_25.assembly12x	Acidic cellulase	<i>Citrus sinensis</i>
D7TW84	0,2781	AWI1,AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_25.assembly12x	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	<i>Vitis vinifera</i>
D7TWL6	0,082195	AWI1	Whole genome shotgun sequence, scaffold_66.assembly12x	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	<i>Vitis vinifera</i>
D7U015	0,15455	AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_2.assembly12x	Cell wall apoplastic invertase	<i>Vitis vinifera</i>
D7U2S0	0,27393	AWI1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		
D7U7G6	0,45082	AWI1,AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_48.assembly12x	Phosphatase DCR2, putative	<i>Ricinus communis</i>
D7U7V9	0,62554	AWI1	Pectinesterase		
D7UAH4	0,11502	AWI1,AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_15.assembly12x	Fasciclin-like arabinogalactan protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
D7UC08	0,060414	AWI1	Whole genome shotgun sequence, scaffold_180.assembly12x	Serine-threonine protein kinase, putative	<i>Ricinus communis</i>
E0CQ39	0,099827	AWI1,AWI2	Glucose-6-phosphate isomerase		
E0CS95	0,18343	AWI1,AWI2	Whole genome shotgun sequence, scaffold_14.assembly12x	Epidermis-specific secreted glycoprotein	<i>Ricinus communis</i>
E0CV73	0,035113	AWI1	Whole genome shotgun sequence, scaffold_98.assembly12x	Luminal-binding protein 5	<i>Nicotiana tabacum</i>
P86014	2,0795	AWI1,AWI2	Peroxidase 1		
Q3L7K5	0,15513	AWI2	Cell wall apoplastic invertase		

Tableau 3 – Protéines d'origine oomycète identifiées par spectrométrie de masse dans les fluides apoplastiques des feuilles infectées par *P. viticola* (AWI). Les peptides trouvés uniquement dans les AWI en comparaison avec le témoin ont été comparés à la base de données UNIPROT d'oomycètes.

accession UNIPROT	espèce	PAI moyen	DS PAI	Nombre de séquences	description
D0MTV6	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 1,2581	0,20795	4	Inositol-3-phosphate synthase, putative
D0N7U0	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 1,2024	0,073935	4	Superoxyde dismutase
D0NEJ7	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,83792		3	Ubiquitin, putative
D0NNQ8	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,80144	0,097149	2	1,3-beta-glucanoyltransferase, putative
D0P4Y1	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,7574	0	4	Triosephosphate isomerase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, putative
D0NSZ3	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,70928		1	Putative uncharacterized protein
A7XJF1	<i>Phytophthora lagoariana</i>	0,62194	0,090988	3	Triosephosphate isomerase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Q8H706	<i>Phytophthora infestans</i>	0,61241	0,096231	5	Transaldolase
D0P034	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,52601		1	Isocitrate dehydrogenase [NADP]
A7XHY6	<i>Phytophthora nicotianae</i>	0,48105	0,061846	4	Triosephosphate isomerase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
D0MQP3	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,46496		4	Cathepsin B, cysteine protease family C01A, putative
D0MXT2	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,46464	0,024337	5	Endo-1,3(4)-beta-glucanase, putative
D0NME3	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,45875	0,14972	4	Malate dehydrogenase
D0MXI7	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,43351	0,16134	2	Berberine-like protein
A7XGF7	<i>Phytophthora kernoviae</i>	0,41975		1	Enolase
D0MVH5	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,40921	0,019955	6	Glycoside hydrolase, putative
D0NAM5	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,36868	0,040107	2	Cystathionine gamma-lyase
D0NCD0	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,36857	0,10425	2	Nucleoside diphosphate kinase
D0MU98	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,34987	0,029106	8	Glucose-6-phosphate isomerase
D0MX78	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,2886		2	Fructose-bisphosphate aldolase
D0NEK2	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,28598		1	Adenosylhomocysteinase
D0P1E6	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,24892	0,039113	1	Calcineurin-like phosphoesterase, putative
D0NWM6	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,23236	0,046943	2	Glycoside hydrolase, putative
D0NNU8	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,20487		1	Enolase
D0NG88	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,17214	0,040573	2	Putative uncharacterized protein
D0MZ63	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,17128		1	Cysteine protease family C01A, putative
D0NUG5	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,14461	0,087648	1	Calcineurin-like phosphoesterase
D0N7D7	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,13444		1	Catalase-peroxidase, putative
D0N755	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,13061	0,036943	3	Isocitrate dehydrogenase [NADP]
D0P2U5	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,12917	0,06089	1	Calcineurin-like phosphoesterase
D0P4K9	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,12389		1	Putative uncharacterized protein
Q8S315	<i>Phytophthora infestans</i>	0,10549	0,021313	2	Putative exo-1,3-beta-glucanase
D0N8P1	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,10451		1	Putative uncharacterized protein
D0NDC9	<i>Phytophthora infestans</i>	T30-4 0,09863	0	1	Pectinesterase, putative
A7XIY6	<i>Phytophthora polonica</i>	0,059884		1	Enolase

Liste des présentations et publications

Publications

M. Gamm, M.C. Héloir, J. Kelloniemi, B. Poinssot, D. Wendehenne, M. Adrian. 2011. **Identification and validation of reference genes for gene expression normalization in grapevine.** *Molecular Genetics and Genomics*, **285**(4): 273-85

M. Gamm, M.C. Héloir, R. Bligny, N. Vaillant-Gaveau, S. Trouvelot, G. Alcaraz, P. Frettinger, C. Clément, A. Pugin, D. Wendehenne, M. Adrian. 2011. **Changes in carbohydrate metabolism in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves.** *Molecular Plant Microbe Interactions*. DOI: 10.1094/MPMI-02-11-0040

M. Adrian, S. Trouvelot, M. Gamm, B. Poinssot, M.C. Héloir, X. Daire. 2012. **Activation of grapevine defense mechanisms : theoretical and applied approaches.** In *Plant Defence: Biological control, Progress in Biological Control 12*, JM Merillon and KG Ramawat(eds.)

Présentations

Forum Jeunes Chercheurs, Dijon, France (2009)

M. Gamm, M.C. Héloir, M. Adrian.

Étude de la dérégulation du métabolisme d'amidon dans les feuilles de vigne infectées par *Plasmopara viticola* (Oral Presentation).

Journées des doctorants SPE, Rennes, France (2009)

M. Gamm, M.C. Héloir, M. Adrian.

Étude de l'influence de *Plasmopara viticola* sur le métabolisme de sucres dans les feuilles de vigne (Orale)

Journées des doctorants SPE, Sophia-Antipolis, France (2010)

M. Gamm, M.C. Héloir, G. Alcaraz, N. Vaillant-Gaveau, C. Clément, D. Wendehenne, M. Adrian.

The "oil spot" of *P. viticola*-infected grapevine leaves: a site of source-sink transition in carbon metabolism? (Poster)

Forum Jeunes Chercheurs, Besançon, France (2010)

M. Gamm, M.C. Héloir, G. Alcaraz, N. Vaillant-Gaveau, C. Clément, D. Wendehenne, M. Adrian.

The "oil spot" of *P. viticola*-infected grapevine leaves: a site of source-sink transition in carbon metabolism? (Poster)

6th International Workshop on Grapevine Downy & Powdery Mildew, Bordeaux, France (2010)

M. Gamm, M.C. Héloir, G. Alcaraz, N. Vaillant-Gaveau, C. Clément, D. Wendehenne, M. Adrian.

The "oil spot" of *P. viticola*-infected grapevine leaves: a site of source-sink transition in carbon metabolism? (Poster)

M. Gamm, M.C. Héloir, J. Kelloniemi, C. Dubreuil, B. Poinssot, D. Wendehenne, M. Adrian.

Evaluation of reference genes for gene expression normalization in *V. Vinifera* (Poster)

COST meeting: Plant Proteomics in Europe, Dijon, France (2011)

M. Gamm, M.C. Héloir, D. Wendehenne, M. Adrian.

An apoplastic factor induces stomatal deregulation in *Vitis vinifera* leaves infected by *Plasmopara viticola*. (Poster)

Journées des doctorants SPE, Dijon, France (2011)

M. Gamm, M.C. Héloir, D. Wendehenne, M. Adrian

An apoplastic protein induces stomatal deregulation in *Vitis vinifera* leaves infected by *Plasmopara viticola*. (Orale)

Forum Jeunes Chercheurs, Dijon, France (2011)

M. Gamm, M.C. Héloir, D. Wendehenne, M. Adrian.

Un composé apoplastique est responsable de la dérégulation stomatique dans les feuilles de vigne infectées par *Plasmopara viticola*. (Orale)

Second IGZ / PME Meeting, Berlin, Allemagne (2011)

M. Gamm, M.C. Héloir, D. Wendehenne, M. Adrian

An apoplastic factor induces stomatal deregulation in *Vitis vinifera* leaves infected by *Plasmopara viticola*. (Orale)

British Mycological Society Annual Main Scientific Meeting, Exeter, Angleterre (2011)

M. Gamm, M.C. Héloir, D. Wendehenne, M. Adrian.

An apoplastic factor induces stomatal deregulation in *Vitis vinifera* leaves infected by *Plasmopara viticola*. (Poster)

Identification of reference genes suitable for qRT-PCR in grapevine and application for the study of the expression of genes involved in pterostilbene synthesis

Magdalena Gamm · Marie-Claire Héloir ·
Jani Kelloniemi · Benoît Poinssot ·
David Wendehenne · Marielle Adrian

Received: 13 September 2010 / Accepted: 7 February 2011 / Published online: 22 February 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract The recent publication of the grapevine genome sequence facilitates the use of qRT-PCR to study gene expression changes. For this approach, reference genes are commonly used to normalize data and their stability of expression should be systematically validated. Among grapevine defenses is the production of the antimicrobial stilbenic phytoalexins, notably the highly fungitoxic pterostilbene, which plays a crucial role in grapevine interaction with *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea*. As a resveratrol *O*-methyltransferase (*ROMT*) gene involved in pterostilbene synthesis was recently identified, we investigated the accumulation of the corresponding transcripts to those of two other stilbene biosynthesis related genes phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) and stilbene synthase (*STS*) in response to pathogen infection. Using three computer-based statistical methods and C_t values or LRE method generated values as input data, we have first identified two reference genes (*VATP16* and *60SRP*) suitable for normalization of qPCR expression data obtained in grapevine leaves and berries infected by *P. viticola* and *B. cinerea*, respectively. Next, we have highlighted that the expression of *ROMT* is induced in *P. viticola*-infected leaves and also in *B. cinerea*-infected berries, confirming the involvement of pterostilbene in grapevine defenses.

Keywords Grapevine · Reference gene · Resveratrol *O*-methyltransferase · *Plasmopara viticola* · *Botrytis cinerea*

Introduction

As for other plant models already sequenced, the recent publication of the genomic sequence of *V. vinifera* cv. Pinot Noir (Jaillon et al. 2007; Velasco et al. 2007) facilitates the use of transcriptomic methods for grapevine. Among them, quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) is largely used to study changes in gene expression by providing a quantification of their transcript levels. This method requires the use of reference genes having a supposed stable expression to normalize the expression data of the studied genes. However, several works have reported the variation of supposedly stable reference gene expression making them inappropriate as reference genes for different organisms. As (i) a part of our studies dealing with grapevine/pathogen interactions uses qRT-PCR and (ii) information about the stability of reference genes in infected grapevine samples is lacking, it was necessary to identify reference genes suitable for our conditions. The obtained results will also be helpful for further works aiming at following changes in gene expression in grapevine. In addition, the objective of our studies is to better understand grapevine defense mechanisms and to precisely determine if their activation can limit infection by pathogens. Among defenses, the antimicrobial compounds, phytoalexins, play a crucial role in grapevine interactions with *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea*, responsible for downy mildew and gray mold, respectively. Among these compounds, pterostilbene has retained attention because of its high antifungal activity, although its biosynthesis has been poorly described. Recently, Schmidlin et al. (2008) have identified

Communicated by S. Hohmann.

M. Gamm · M.-C. Héloir · J. Kelloniemi · B. Poinssot ·
D. Wendehenne · M. Adrian (✉)
Unité Mixte de Recherche INRA 1088/CNRS 5184,
Université de Bourgogne Plante-Microbe-Environnement,
17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France
e-mail: marielle.adrian@u-bourgogne.fr

a gene encoding a resveratrol *O*-methyltransferase (*ROMT*) involved in pterostilbene synthesis and have reported its expression in *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon leaves infected by downy mildew. These findings encouraged us to use qRT-PCR to follow the expression of *ROMT* and two other genes involved in the stilbene biosynthesis pathway [phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) and stilbene synthase (*STS*)], in our pathosystems (*V. vinifera* cv. Marselan leaves infected by *P. viticola* and berries infected by *B. cinerea*). This work will contribute to obtain a better knowledge of the importance of pterostilbene production in the grapevine phytoalexin response.

qRT-PCR studies require one or more reference genes as internal controls for the standardization of raw expression data to control experimental errors which are introduced during sample preparation or quantification [e.g. inhibitory factors in the sample, RNA integrity, and enzyme or primer performance (Bustin 2002; Fleige et al. 2006; Fluck et al. 2005)]. Several reference genes are commonly used, such as actin (Fung et al. 2008; Ruan and Lai 2007), ubiquitin (Lund et al. 2008; Olsen et al. 2010), elongation factor (Abbal et al. 2008; Olsen et al. 2010). The ribosomal units (18S or 28S rRNA) (Bas et al. 2004; Wang et al. 2010; Xue et al. 2010) are also frequently used. Such genes are typically involved in basic cellular functions and should be expressed at a constant level in all samples (Thellin et al. 1999). Nonetheless, several studies have reported the variation of supposedly stable reference gene expression (Bas et al. 2004; Guenin et al. 2009; Tricarico et al. 2002). As the interpretation of qRT-PCR results is highly dependent on the normalization (Bas et al. 2004; Dheda et al. 2005; Guenin et al. 2009), it is evident that the stability of reference gene expression has to be validated for the experimental conditions used, in given species and organs/tissues, to avoid errors in data analysis. In the particular case of grapevine, Reid et al. (2006) assessed the expression stability of a set of candidate reference genes in developing *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon berries including elongation factor 1- α (*EF1- α*) and actin (*ACT1*) genes. Both of them, together with the 18S rRNA, have often been used as internal control genes to study grapevine gene expression (Abbal et al. 2008; Fung et al. 2008; Gao et al. 2010; Hren et al. 2009; Polesani et al. 2008; Terrier et al. 2005) although the stability of their expression has not been checked in conditions different from those of Reid et al. (2006). In particular, no validation of reference genes has been reported for grapevine samples in the context of plant–pathogen interaction until now. Typically, in order to identify appropriate reference genes, the expression stability of several candidate genes is estimated in a range of different samples. For this purpose, computer-based statistical approaches have been developed, among them the programs BestKeeper (Pfaffl et al. 2004), Normfinder

(Andersen et al. 2004), and geNorm (Vandesompele et al. 2002). The identification of reliable reference genes by using these tools has been reported both in animal (Bower and Johnson 2009; Cappelli et al. 2008; Li et al. 2009; Robinson et al. 2007) and plant tissues (Hu et al. 2009; Lee et al. 2010; Remans et al. 2008; Tong et al. 2009). All these methods rely on the relative C_t values as input data. In the widely used exponential model of PCR amplification, C_t values are generated from the amplification profile after the determination of a fluorescence threshold. However, Rutledge and Stewart (2008a, b, 2010) have reported drawbacks of the exponential model of the PCR reactions—and therefore the C_t values—and recommended the “Linear Regression of Efficiency” (LRE) method for a more accurate determination of PCR efficiency.

One major problem in wine growing is the susceptibility of most grown grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars to pathogenic microorganisms such as oomycetes and fungi responsible for serious diseases. Numerous protective treatments are thus required to ensure fruit quality and quantity. Among the most destructive pathogens are *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea*. The obligate biotrophic oomycete *P. viticola* infects and alters the green parts of the plant: leaves, flowers, and young berries. *B. cinerea* is a necrotrophic fungus with a wide host range and it causes gray mold on flowers and ripening berries. Our objective is to study grapevine defense reactions in order to validate a strategy of protection based on their activation. Such a strategy would contribute to reduce the use of pesticides in the vineyard. Among the grapevine defenses activated upon fungal infection is the production and accumulation of the antimicrobial compounds phytoalexins (Jeandet et al. 2002). The best-described grapevine phytoalexin is resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene), which is synthesized from phenylalanine via the phenylpropanoid pathway including phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) and stilbene synthase (*STS*) (Ferrer et al. 2008). The other phytoalexins are resveratrol derivatives: the polymers viniferins, the glycosylated derivatives such as piceid, and the dimethylated derivative pterostilbene or 3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-*trans*-stilbene (Jeandet et al. 2002). Both resveratrol and pterostilbene have antifungal properties against *P. viticola* and *B. cinerea* (Adrian et al. 1997; Jeandet et al. 2002), but the dimethylated compound has a higher activity (Adrian et al. 1997; Pezet and Pont 1990) and therefore certainly plays a crucial protective role against these pathogens. The precise biosynthesis pathway of pterostilbene in grapevine has long remained unknown, but recently, Schmidlin et al. (2008) used a candidate gene approach to identify a resveratrol *O*-methyltransferase (*ROMT*) responsible for resveratrol methylation. They have shown that *ROMT* was expressed in Cabernet Sauvignon leaves infected by *Plasmopara viticola*. In order to further understand the role of

pterostilbene in grapevine/pathogen interactions, the expression of this newly identified gene was analyzed in another *V. vinifera* cultivar and interaction (grapevine/*B. cinerea*) and compared with those of *PAL* and *STS* genes.

This study was therefore performed in order to select reference genes suitable for differential gene expression analysis in grapevine leaves infected by *P. viticola* and berries infected by *B. cinerea*. Using several available methods, two genes, *VATP16* and *60SRP*, were selected and next used in combination or alone to follow the expression of *PAL*, *STS*, and *ROMT* genes in infected grapevine leaves and berries. These three genes were induced in response to infection, with *STS* showing the highest activation factors. Our results indicate that *ROMT* is induced in *P. viticola*-infected Marselan leaves, as previously described in Cabernet Sauvignon (Schmidlin et al. 2008) and also in berries upon *B. cinerea* infection.

Materials and methods

Biological material

V. vinifera L. cv. Marselan (Cabernet Sauvignon × Grenache Noir) leaves and berries were used in this study and were infected by *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea*, respectively.

For the experiments on leaves, herbaceous cuttings were grown in individual pots (10 × 7 × 7 cm) containing a mixture of peat/sand/perlite (5:1:1, vol/vol/vol) in a greenhouse at 24 and 18°C (day and night, respectively) with a 16 h light/8 h dark photoperiod and a relative humidity (RH) of 70% until six leaves had developed.

P. viticola was maintained on cv. Marselan plants as previously described (Allègre et al. 2009). For inoculation, the lower side of leaves was sprayed with a suspension of 10⁴ sporangia ml⁻¹ in water, incubated overnight at a relative humidity of 100%, and placed in the conditions described above. Samples were collected prior to inoculation (control) and at 1, 3, 5, and 7 days post-inoculation (dpi), at 8 am and 4 pm (10 samples in total). Each sample was composed of the 3rd and 4th (from the shoot base) leaves of six plants that were frozen immediately in liquid nitrogen. Three independent biological repetitions were performed.

Berries were harvested in September 2009 in a vineyard of Bordeaux appellation (France). Healthy berries from the top of the bunches were chosen, washed and kept at 20°C and 75 μE s⁻¹ m⁻¹ under 100% RH for 3 h prior to inoculation. The equator region of the berries was inoculated with either a suspension of *B. cinerea* conidia (5.10⁵ conidia ml⁻¹) in potato dextrose broth 1:4 (w:v) in water (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands) or potato broth alone (control). The berries were placed under the same culture conditions with a 12 h day/12 h night photoperiod. From

both control and infected berries, one sample was collected at 0, 16, and 24 h post-inoculation (hpi), and two samples at 48 hpi (10 samples in total). Each sample was composed of 25 peel disks (one peel per berry, 25 berries per condition) harvested with an 8 mm cork borer.

RNA Extraction

For each berry/leaf sample, total RNA was extracted following the protocol described by Reid et al. (2006). After determination of the concentration and purity by spectrophotometry, DNA contaminations were removed with the “DNase 1-Kit” (Sigma–Aldrich, St Louis, USA) according to the manufacturer’s instructions.

Four μg of leaf total RNA was used to synthesize the first-strand cDNA using the “SuperScript III Reverse Transcriptase” Kit (Invitrogen, Carlsberg, USA) with a 1:1 mixture of Oligo-dT and random hexamer primers following the kit’s technical notice.

Ten micrograms of berry RNA was transcribed to total cDNA using the Invitrogen Superscript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsberg, USA) and an Oligo-dT primer, according to the manufacturer’s protocol.

Primer design and validation

Microarray data of control and *P. viticola*-infected (7 dpi) leaf samples from three independent biological repetitions (unpublished data) were used to select candidate reference genes. Nine candidates were chosen on the basis of an expression level above the background (fluorescence intensity > 1000) and a stable expression indicated by a ratio of 1.0 for treated versus control samples (activation factor ~ 1). Attention was paid to select genes coming from different functional groups in order to reduce the probability of co-regulation (Table 1).

Primer pairs were designed using the software PerlPrimer (Marshall 2004) and the sequence data of *V. vinifera* cv. Pinot noir [Jaillon et al. 2007; data source was the Genoscope Grape Genome Browser (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis>)] (Table 2). Primer pairs of three reference genes typically used for grapevine studies were included: *ACT1*, *EF1-α*, and 18S rRNA.

For the transcriptional analysis of genes implicated in the stilbene metabolism, primer pairs were used for phenylalanine ammonia lyase (*PAL*, XM_002281763.1, 5′-GGGATTTCACTGTTGCATATACTC-3′, 5′-CATAGAATAGAAAGCGCGAGG-3′), stilbene synthase (*STS*, XM_002265296.1 5′-AAAGAACTCGAAGCAACGAGG-3′, 5′-TGGCCCTCTCCCCCTTAA-3′), and resveratrol *O*-methyltransferase (*ROMT*, XM_002281445.1, 5′-TGCCTCTAGGCTCCTTCTAA-3′, 5′-TTTGAAACCAAGCACTAGAGA-3′) as described earlier (Schmidlin et al. 2008).

Table 1 Description of the candidate reference genes used for qRT-PCR

Gene name	Gene annotation	Suggested function	NCBI identifier
<i>ADH2</i>	Alcohol dehydrogenase 2	Anaerobic metabolism	XM_002281263.1
<i>39SRP</i>	39S ribosomal protein L41-A	Component of the mitochondrial ribosome large subunit (39S)	XM_002285709.1
<i>UBE2</i>	Ubiquitin carrier protein E2	Protein degradation	XM_002275879.1
<i>VATP16</i>	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	Transport	XM_002269086.1
<i>60SRP</i>	60S ribosomal protein L18	Component of the large 60S ribosomal subunit	XM_002270599.1
<i>VPS54</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein 54	Protein binding, retrograde transport	XM_002272141.1
<i>UQCC</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex chaperone (CBP3 homolog)	Unknown	XM_002264785.1
<i>SMD3</i>	Small nuclear ribonucleoprotein Smd3	Pre-mRNA splicing	AM435088.2
<i>EPI</i>	not annotated (expressed protein)	Unknown	XM_002278976.1
18S rRNA	18S ribosomal RNA	Small ribosomal subunit	GQ849399
<i>ACT1</i>	Actin 1	Cytoskeletal structural protein	XM_002265440.1
<i>EF1-α</i>	EF1- α elongation factor	Translation	XM_002284888.1

All primers were examined for their target specificity by end-point PCR, using 20 ng of leaf cDNA as template and following this thermal cycling profile: 95°C for 15 min; 45 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 30 s, 72°C for 30 s. The products were visualized by agarose gel electrophoresis and sequenced by the Sanger method (Genoscreen, France).

qRT-PCR

The qRT-PCR experiments were carried out with the ‘‘Absolute™ QPCR SYBR© Green ROX Mix’’ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), with a final primer concentration of 500 nM and 5 ng of total cDNA, in a Light-Cycler480 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) using the following thermal cycling profile: 95°C for 15 min; 45 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 30 s, 72°C for 30 s. Each real-time assay was tested in a dissociation protocol to ensure that each amplicon was a single product. Amplification efficiency and the regression coefficient R^2 for each sample were calculated from the fluorescence raw data with the LinRegPCR program (Ruijter et al. 2009). Samples were treated in technical triplicates and the mean values of C_t and efficiency were used for the further analysis. For the LRE method, the mean values of the raw fluorescence data of the three technical repeats were filled into the Java applet prototype developed for LRE analysis (Rutledge and Stevart 2008b).

Statistical analyses

Two sets of data were generated: one for berries (control and *B. cinerea*-infected) and one for leaves (control and

P. viticola-infected). Analysis of the expression data were performed by freely available Visual Basic Applications for Microsoft Excel, namely geNorm (Vandesompele et al. 2002), Normfinder (Andersen et al. 2004) and BestKeeper (Pfaffl et al. 2004) according to the conditions and restrictions described by the authors.

Raw C_t values were transformed into relative quantities required as data input for geNorm and Normfinder using the formula $Q = E^{-\Delta C_t}$ with E being the amplification efficiency of the gene and ΔC_t being the difference of C_t values between the sample and the first time-point of the corresponding infection time-course. Values representing transcript quantity were transformed into relative quantities using the ratio between the sample and the first time point of the corresponding infection time-course.

Results

Primer design and validation

Nine candidate reference genes were selected on the basis of their microarray expression profiles obtained in a comparative study of control and *P. viticola*-infected grapevine leaves (unpublished data) after they fulfilled three criteria: an expression ratio of 1.0 between control and infected leaves (supposing an equal expression in both samples), a relative fluorescence above the background (>1000 relative units) to ensure the expression of the gene, and the belonging to different functional groups in order to reduce the probability of a co-regulation. Additionally, three genes typically used as internal control genes in grapevine studies

Table 2 Selected candidate reference gene primers and their parameters derived from qRT-PCR analysis

Gene symbol	Primer sequences 5'–3'	Amplicon size (bp)	Mean $E \pm SD^a$	Mean $E_{\max} (\%) \pm SD^b$	T_m (°C)
<i>ADH2</i>	GACCATGTTCTTCCTGTATTAC GTAGACCAAGACCTGTAGAG	292	1.90 ± 0.064	102.5 ± 3.1	83.47
<i>39SRP</i>	GACTGACTTCAAGCTTAAACC GATATAACAGGGAATACAGCAC	281	1.92 ± 0.030	102.9 ± 4.2	81.93
<i>UBE2</i>	CATCCTTCAGGACAAGTGGT GAGCTTTACAGATATACGAAACCG	299	1.8 ± 0.096	102.1 ± 7.0	81.07
<i>VATP16</i>	CTTCTCCTGTATGGGAGCTG CCATAACAACCTGGTACAATCGAC	112	1.93 ± 0.069	103.7 ± 4.1	85.23
<i>60SRP</i>	ATCTACCTCAAGCTCCTAGTC CAATCTTGTCCTCCTTTCCT	165	1.9 ± 0.107	105.2 ± 4.6	82.39
<i>VPS54</i>	ATTTGTTGGATGGTGTAGAG TAATGAAAGGGAGAAAGACGA	263	1.9 ± 0.063	108.4 ± 11.1	81.11
<i>UQCC</i>	CAAAGTATGAGGGTATCCGA GTATTGCCCAAATTC AACACC	250	1.89 ± 0.056	105.8 ± 8.1	80.30
<i>SMD3</i>	GCTCTGTTGTTGAAGATGGG GGAAGCAGTTTGTAGCATCAG	156	1.92 ± 0.097	106.7 ± 5.5	82.51
<i>EPI</i>	ACATGGGTTCTGGTATAATGG ATAAAGATTGCCTCTCAGGT	173	1.96 ± 0.071	108.4 ± 5.3	81.21
18S rRNA	GCCCTATCAACTTTCGATGG TGGATGTGGTAGCCGTTTCT	109	1.91 ± 0.074	100.2 ± 3.7	82.62
<i>ACT1</i>	CCACCTTGATCTTCATGCTGC CACCTCCCCATGCTATCCTTCGTC	295	1.91 ± 0.114	103.5 ± 4.2	83.67
<i>EF1-α</i>	AACCAAAAATATCCGGGAGTAAAAGA GAACTGGGTGCTTGATAGGC	150	1.94 ± 0.058	102.7 ± 2.9	82.70

^a Mean amplification efficiency values determined with LinRegPCR

^b E_{\max} values determined with LRE

were included (Table 1): *EF1- α* (Reid et al. 2006), *ACT1*, and 18S rRNA (Polesani et al. 2008).

Primer pairs for qRT-PCR were designed and subsequently evaluated on grapevine cv. Marselan cDNA. For 11 of the 12 primer pairs tested, a single amplicon was observed after electrophoretic separation that was sequenced to confirm the primer specificity. The primer pair for *EF1- α* had to be excluded from the study as it produced two amplicons in our conditions, even if only one peak was visible in the melting curve analysis (data not shown). Melting curve analysis of the 11 remaining amplicons confirmed that the primers amplified a single product. The primer pair amplification efficiency was estimated using the absolute fluorescence increase (Ruijter et al. 2009). For all couples, the efficiency was above 1.8 (Table 2) and no signal was detected in no-template controls. Except for 18S rRNA, which showed a strong abundance, all genes displayed a moderate expression in both the berry and leaf data sets (Fig. 1). The mean cycle threshold (C_t) values lay between about 13 for the 18S rRNA and 24

for *VPS54* in berry samples (Fig. 1a) and between about 8 for the 18S rRNA and 27 for *ADH2* in leaf samples (Fig. 1b).

The gene expression data obtained with the validated primer pairs were analyzed independently for both the berry and the leaf data sets with three software programs, geNorm, BestKeeper, and Normfinder to obtain the expression stability of the candidate reference genes.

geNorm statistical analysis

geNorm (Vandesompele et al. 2002) provides a ranking of the analyzed genes according to their expression stability that is based on the assumption that two ideal reference genes should not vary in comparison with each other in the different test conditions. It calculates the average pairwise variation of a given candidate reference gene with all other genes of the set and assigns a measure of its expression stability (M) to each gene. Stepwise exclusion of genes with the highest M values (indicating the least stable

Fig. 1 qRT-PCR expression values for candidate reference genes in grapevine samples. Expression data for **a** *B. cinerea*-infected berries and **b** *P. viticola*-infected leaves are displayed as cycle threshold values for each gene in the totality of the samples of a data set. The boxes indicate the 25th and 75th percentiles and the line within the box represent the median. Minimum and maximum values are represented by whiskers

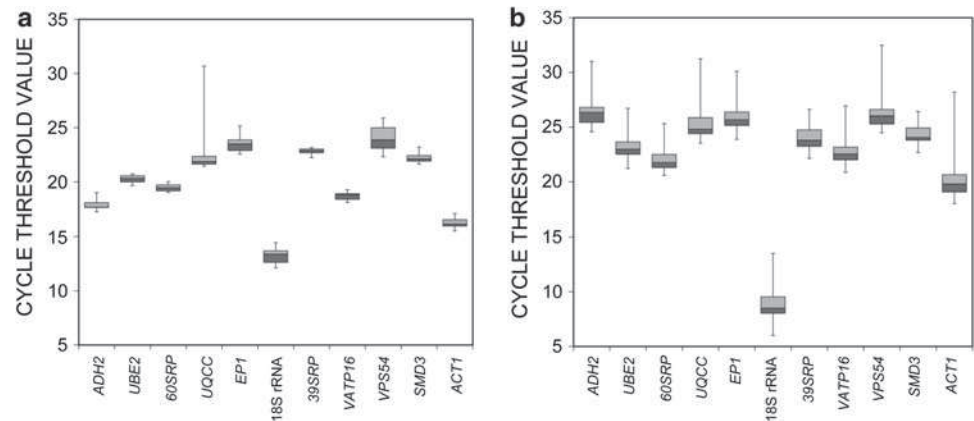


Table 3 Candidate reference gene ranking according to their expression stability as calculated by the geNorm program

Ranking	Berries		Leaves	
	Gene name	<i>M</i> value	Gene name	<i>M</i> value
1 & 2	<i>ADH2</i> & <i>VATP16</i>	0.355	<i>60SRP</i> & <i>UQCC</i>	0.911
3	<i>EPI</i>	0.481	<i>VATP16</i>	5.510
4	<i>60SRP</i>	4.560	<i>SMD3</i>	6.697
5	<i>SMD3</i>	5.738	<i>VPS54</i>	8.639
6	<i>UBE2</i>	5.843	<i>EPI</i>	10.412
7	<i>UQCC</i>	7.580	<i>ADH2</i>	11.256
8	<i>39SRP</i>	8.734	<i>UBE2</i>	12.054
9	<i>ACT1</i>	9.732	<i>39SRP</i>	12.643
10	<i>VPS54</i>	11.474	<i>ACT1</i>	13.401
11	18S rRNA	13.690	18S rRNA	14.832

For each gene the *M* value was calculated by geNorm as the average expression stability in *B. cinerea*-infected berries and *P. viticola*-infected leaves, respectively

expression) before recalculation finally reveals the two most stable candidate genes. These are assumed to be expressed at a constant level in all the tested samples, under the precondition that they are not co-regulated in the studied conditions. This program thus provides a ranking of candidate reference genes according to the stability measure *M*, from the least to the most stable. For the berry data set, the outcome was as follows: 18S rRNA > *VPS54* > *ACT1* > *39SRP* > *UQCC* > *UBE2* > *SMD3* > *60SRP* > *EPI* > *ADH2* and *VATP16* (Table 3) and for the leaf data set: 18S rRNA > *ACT1* > *39SRP* > *UBE2* > *ADH2* > *EPI* > *VPS54* > *SMD3* > *VATP16* > *60SRP* and *UQCC* (Table 3).

Most of the genes evaluated, except the top-ranking candidates, showed an *M* value higher than the limit of <1.5 suggested by the authors of geNorm, indicating a rather high variability of expression. Nevertheless, it was possible to identify genes with a low variability that matched the preconditions: *EPI*, *VATP16*, and *ADH2* for the berry samples and *60SRP*, and *UQCC* for leaf samples (Table 3).

BestKeeper statistical analysis

The stability of candidate reference gene expression was also analyzed by BestKeeper (Pfaffl et al. 2004). This approach performs a statistical analysis of the C_t values, determining a set of presumably stable candidate reference genes with a standard deviation <1. These genes are then used to calculate a ‘‘BestKeeper index’’. The ranking of the candidate reference genes is based on their pair-wise correlation with this index value which is indicated by the Pearson correlation coefficient (*r*). As the maximal number of genes analyzed by this program is 10, the 18S rRNA, one of the worst ranking candidates in the previous analyses, was excluded from the studied data sets.

For the berry data set, *39SRP*, *VPS54*, *SMD3*, and *EPI* were included into the BestKeeper index calculation (Table 4). The comparison of the candidate genes with this value resulted in a ranking as follows, from the least stable to the most stable: *VPS54* > *UQCC* > *SMD3* > *EPI* > *39SRP* > *ADH2* > *UBE2* > *60SRP* > *ACT1* > *VATP16* (Table 4). While *VPS54* and *UQCC* showed a low correlation with the BestKeeper index, the Pearson coefficients for *60SRP*, *ACT1*, and *VATP16* were relatively high. A BestKeeper index from leaf data was calculated with all the genes except *UQCC*, *VPS54*, and *ACT1* and the ranking was as follows: *UBE2* > *EPI* > *39SRP* > *ADH2* > *SMD3* > *ACT1* > *VPS54* > *UQCC* > *60SRP* > *VATP16* (Table 4). *UBE2* showed the lowest and *UQCC*, *60SRP*, and *VATP16* the highest correlation coefficients.

Normfinder expression stability analysis

Normfinder calculates a ‘‘stability value’’ for the candidate reference genes, where a low value represents stable expression (Andersen et al. 2004). This model-based approach produces a ranking of the genes by the comparison of their estimated intra- and intergroup variations. For this analysis, in both the berry and the leaf data sets, two groups were defined, corresponding to control and infected

samples, respectively. Such repartition allows the analysis of the effect of pathogen infection on the candidate reference gene expression.

The first calculation, based on both inter- and intragroup variations, resulted in the following order of candidate reference gene stability in berries, from the least stable to the most stable: *UQCC* > 18S rRNA > *VPS54* > *EPI* > *ADH2* > *SMD3* > *ACT1* > *UBE2* > *39SRP* > *60SRP* > *VATP16* (Table 5). When selecting a reference gene from a set of

candidates with Normfinder, an important precondition is that all genes in the set are unaffected by the treatment (Andersen et al. 2004). Therefore, the worst-ranked genes, whose expression evidently varied between or within the control and infected groups (*UQCC*, 18S rRNA, *VPS54*, and *EPI*) were excluded from the panel and the analysis was repeated with the remaining candidate genes. The second calculation produced a slightly different order of candidate reference genes: *ADH2* > *ACT1* > *39SRP* > *UBE2* > *SMD3* > *60SRP* > *VATP16*, with *60SRP* and *VATP16* as the most stable genes (Table 5). For candidate reference gene expression in leaves, the Normfinder calculation produced the following ranking: 18S rRNA > *ACT1* > *UBE2* > *39SRP* > *EPI* > *VPS54* > *ADH2* > *SMD3* > *UQCC* > *60SRP* > *VATP16* with *60SRP* and *VATP16* as the most stable genes (Table 6). The intra-group variation reached 1.025 in the control leaves for *ACT1* and 0.795 for the 18S rRNA in infected leaves (Table 6).

Final ranking of reference gene candidates

As described earlier (Expósito-Rodríguez et al. 2008), values from 1 (most stable) to 11 (least stable) were attributed to the candidate genes according to their relative position in the ranking produced by each of the three programs. The sums of these values were then used to list these genes according to their stability. For berries the following order of candidate reference genes was obtained, from the least to the most appropriate: 18S rRNA > *VPS54* > *UQCC* > *39SRP* > *EPI* > *ACT1* > *SMD3* > *ADH2* > *UBE2* > *60SRP* > *VATP16* with *60SRP* and *VATP16* as the most stable genes (Table 7). The same approach used with leaf data generated

Table 4 BestKeeper software statistical analysis of C_t values for candidate reference genes

Ranking	Berries			Leaves		
	Gene name	SD	<i>r</i>	Gene name	SD	<i>r</i>
1	<i>VATP16</i>	2.112	0.989	<i>VATP16</i>	0.817	0.960
2	<i>ACT1</i>	1.536	0.987	<i>60SRP</i>	0.736	0.953
3	<i>60SRP</i>	1.134	0.986	<i>UQCC</i>	1.026	0.950
4	<i>UBE2</i>	2.174	0.984	<i>VPS54</i>	1.056	0.922
5	<i>ADH2</i>	2.223	0.973	<i>ACT1</i>	1.162	0.910
6	<i>39SRP</i>	0.607	0.943	<i>SMD3</i>	0.699	0.871
7	<i>EPI</i>	0.913	0.922	<i>ADH2</i>	0.972	0.862
8	<i>SMD3</i>	0.366	0.920	<i>39SRP</i>	0.886	0.785
9	<i>UQCC</i>	2.211	0.354	<i>EPI</i>	0.999	0.779
10	<i>VPS54</i>	0.785	0.296	<i>UBE2</i>	0.846	0.633

Candidate reference genes expressed in berries infected with *B. cinerea* and leaves inoculated with *P. viticola* are ranked according to their pair-wise correlation with the BestKeeper-index expressed by the Pearson coefficient *r*. This index is calculated with the data of genes showing a standard deviation (SD) of their C_t values < 1, values of the excluded genes are presented in italics

Table 5 Normfinder statistical analysis of candidate reference gene expression in grapevine berries infected with *B. cinerea*

	First analysis				Second analysis		
	Gene name	Intergroup variation	Intragroup variation		Stability value	Gene name	Stability value
			Control	Infected			
1	<i>VATP16</i>	0.007	0.001	0.074	0.109	<i>VATP16</i>	0.050
2	<i>60SRP</i>	0.069	0.001	0.026	0.134	<i>60SRP</i>	0.087
3	<i>39SRP</i>	0.112	0.002	0.002	0.143	<i>SMD3</i>	0.094
4	<i>UBE2</i>	0.082	0.010	0.023	0.161	<i>UBE2</i>	0.106
5	<i>ACT1</i>	0.104	0.004	0.020	0.170	<i>39SRP</i>	0.150
6	<i>SMD3</i>	0.035	0.144	0.011	0.171	<i>ACT1</i>	0.161
7	<i>ADH2</i>	0.105	0.124	0.031	0.246	<i>ADH2</i>	0.193
8	<i>EPI</i>	0.340	0.143	0.000	<i>0.408</i>		
89	<i>VPS54</i>	0.579	0.517	0.147	<i>0.628</i>		
10	18S rRNA	0.129	9.836	2.171	<i>1.054</i>		
11	<i>UQCC</i>	0.951	0.005	8.808	<i>1.260</i>		

Ranking of reference gene candidates was based on the statistical analysis of the inter- and intra-group variations of their relative expression in control and infected samples given by Normfinder. A second analysis was performed with the program after exclusion of the values considered as outliers in the first analysis (stability value > 0.3, presented in italics)

Table 6 Normfinder statistical analysis of candidate reference gene expression in *P. viticola*-infected grapevine leaves

First analysis					
Gene name	Intergroup variation	Intragroup variation		Stability value	
		Control	Infected		
		1	<i>VATP16</i>		
2	<i>60SRP</i>	0.022	0.081	0.020	0.058
3	<i>UQCC</i>	0.126	0.243	0.070	0.102
4	<i>SMD3</i>	0.004	0.275	0.127	0.117
5	<i>ADH2</i>	0.074	0.184	0.284	0.124
6	<i>VPS54</i>	0.054	0.328	0.220	0.138
7	<i>EP1</i>	0.010	0.120	0.573	0.139
8	<i>39SRP</i>	0.043	0.428	0.283	0.157
9	<i>UBE2</i>	0.173	0.423	0.620	0.186
10	<i>ACT1</i>	0.053	1.025	0.145	0.191
11	18S rRNA	0.120	0.456	0.795	0.202

Ranking of reference gene candidates was based on the statistical analysis of the inter- and intra-group variations of their relative expression in control and infected samples given by Normfinder

the following order of genes: 18S rRNA > *UBE2* > *39SRP* > *ACT1* > *EP1* > *ADH2* > *VPS54* > *SMD3* > *UQCC* > *60SRP* > *VATP16* with *60SRP*, and *VATP16* as the best candidates (Table 7).

Stability of the candidate reference genes assessed with LRE data

The amplification profiles of the candidate reference genes were also analyzed by the LRE method. E_{\max} values for all primer couples were above 100% (Table 2), and the variances were similar to those obtained by LinRegPCR (data not shown). The expression data obtained were filled into Genorm and Normfinder to allow comparison with the results derived from the traditionally calculated C_t values (Table 8). For Genorm, the amplitude of M values obtained for the different candidate genes was lower than previously observed. *39SRP*, *VPS54* and *60SRP* showed an acceptable M value for berry samples and *UBE2*, *VATP16* and *ADH2* for leaf samples. For Normfinder, generally higher stability values were obtained compared with the analysis based on the C_t values (Table 8). *60SRP* and *VATP16* were the best ranked for berry and leaf samples, respectively. The final ranking of the candidate genes was determined according to their relative position in the ranking produced by Genorm and Normfinder as described earlier. *60SRP* was the top-ranked for berry samples and *VATP16* for leaf samples (Table 8).

Table 7 Final ranking of the candidate reference genes

	BestKeeper	Normfinder	GeNorm	Conclusion
Berries				
1	<i>VATP16</i>	<i>VATP16</i>	<i>ADH2</i> & <i>VATP16</i>	<i>VATP16</i>
2	<i>ACT1</i>	<i>60SRP</i>	<i>EP1</i>	<i>60SRP</i>
3	<i>60SRP</i>	<i>SMD3</i>	<i>60SRP</i>	<i>UBE2</i>
4	<i>UBE2</i>	<i>UBE2</i>	<i>SMD3</i>	<i>ADH2</i>
5	<i>ADH2</i>	<i>39SRP</i>	<i>UBE2</i>	<i>SMD3</i>
6	<i>39SRP</i>	<i>ACT1</i>	<i>UQCC</i>	<i>ACT1</i>
7	<i>EP1</i>	<i>ADH2</i>	<i>39SRP</i>	<i>EP1</i>
8	<i>SMD3</i>	<i>EP1</i>	<i>ACT1</i>	<i>39SRP</i>
9	<i>UQCC</i>	<i>VPS54</i>	<i>VPS54</i>	<i>UQCC</i>
10	<i>VPS54</i>	18S rRNA	18S rRNA	<i>VPS54</i>
11		<i>UQCC</i>		18S rRNA
Leaves				
1	<i>VATP16</i>	<i>VATP16</i>	<i>60SRP</i> & <i>UQCC</i>	<i>VATP16</i>
2	<i>60SRP</i>	<i>60SRP</i>	<i>VATP16</i>	<i>60SRP</i>
3	<i>UQCC</i>	<i>UQCC</i>	<i>SMD3</i>	<i>UQCC</i>
4	<i>VPS54</i>	<i>SMD3</i>	<i>VPS54</i>	<i>SMD3</i>
5	<i>ACT1</i>	<i>ADH2</i>	<i>EP1</i>	<i>VPS54</i>
6	<i>SMD3</i>	<i>VPS54</i>	<i>ADH2</i>	<i>ADH2</i>
7	<i>ADH2</i>	<i>EP1</i>	<i>UBE2</i>	<i>EP1</i>
8	<i>39SRP</i>	<i>39SRP</i>	<i>39SRP</i>	<i>ACT1</i>
9	<i>EP1</i>	<i>UBE2</i>	<i>ACT1</i>	<i>39SRP</i>
10	<i>UBE2</i>	<i>ACT1</i>	18S rRNA	<i>UBE2</i>
11		18S rRNA		18S rRNA

The expression data of candidate reference genes in *V. vinifera* berries and leaves infected with *B. cinerea* and *P. viticola*, respectively, was analyzed by the programs BestKeeper, Normfinder and geNorm. The program-specific results were combined to produce a conclusive ranking from the most (1) to the least (11) stable candidate reference gene. The Normfinder data of a first analysis was retained for those genes that were excluded as outliers prior to the second analysis

Expression of genes involved in pterostilbene biosynthesis

The expression of *PAL*, *STS*, and *ROMT* genes, encoding enzymes involved in pterostilbene synthesis, was analyzed in *B. cinerea*-infected berries and *P. viticola*-infected leaves. Based on the data described earlier, the expression of genes was normalized using *VATP16* and *60SRP* in combination (Fig. 2). For comparison purpose, they were normalized using *60SRP* alone for berry samples and *VATP16* alone for leaf samples according to the results obtained with the data of LRE analysis (data not shown). The results were similar in both conditions of normalization. In *B. cinerea*-infected berries, the expression of *STS* and *ROMT* were induced from 16 and 48 hpi, respectively, whereas *PAL* was induced at 24 h only. (Fig. 2a–c). In *P. viticola*-infected leaves, the expression of *PAL*, *STS*, and *ROMT* was induced from 1 dpi, with a strong increase from 5 dpi for

Table 8 Genorm and Normfinder statistical analysis of candidate reference gene expression in *P. viticola*-infected grapevine leaves and berries using values derived from LRE analysis as input data

GeNorm		Normfinder		Final ranking	
Gene symbol	<i>M</i> value	Gene symbol	Stability value		
Berries					
1	<i>39SRP</i> & <i>VPS54</i>	1.329	<i>60SRP</i>	0.353	<i>60SRP</i>
2	<i>60SRP</i>	1.660	<i>EPI</i>	0.416	<i>VPS54</i>
3	<i>VATP16</i>	2.164	<i>UQCC</i>	0.464	<i>39SRP</i>
4	<i>UQCC</i>	2.440	<i>VATP16</i>	0.525	<i>VATP16</i>
5	<i>EPI</i>	2.644	<i>VPS54</i>	0.573	<i>EPI</i>
6	<i>ADH2</i>	2.754	<i>39SRP</i>	0.583	<i>UQCC</i>
7	<i>SMD3</i>	2.836	<i>SMD3</i>	0.722	<i>ADH2</i>
8	<i>ACT1</i>	3.257	<i>ADH2</i>	0.773	<i>SMD3</i>
9	<i>UBE2</i>	3.629	<i>ACT1</i>	1.060	<i>ACT1</i>
10	18S rRNA	3.975	<i>UBE2</i>	1.493	<i>UBE2</i>
11			18S rRNA	1.721	18S rRNA
Leaves					
1	<i>UBE2</i> & <i>VATP16</i>	1.599	<i>VATP16</i>	0.211	<i>VATP16</i>
2	<i>ADH2</i>	1.679	<i>SMD3</i>	0.274	<i>ADH2</i>
3	<i>SMD3</i>	1.816	<i>ADH2</i>	0.363	<i>SMD3</i>
4	<i>39SRP</i>	1.934	<i>39SRP</i>	0.365	<i>UBE2</i>
5	<i>ACT1</i>	2.180	<i>UBE2</i>	0.367	<i>39SRP</i>
6	<i>EPI</i>	2.529	<i>ACT1</i>	0.651	<i>ACT1</i>
7	<i>UQCC</i>	2.868	<i>VPS54</i>	0.682	<i>EPI</i>
8	<i>VPS54</i>	3.141	<i>EPI</i>	0.703	<i>VPS54</i>
9	<i>60SRP</i>	3.382	<i>60SRP</i>	0.717	<i>UQCC</i>
10	18S rRNA	3.793	<i>UQCC</i>	0.821	<i>60SRP</i>
11			18S rRNA	1.012	18S rRNA

For each gene the *M* value was calculated by geNorm as the average expression stability in *B. cinerea*-infected berries and *P. viticola*-infected leaves, respectively. Ranking of reference gene candidates was based on the statistical analysis of the inter- and intra-group variations of their relative expression in control and infected samples given by Normfinder

PAL and from 3 dpi for *STS* and *ROMT* (Fig. 3a–c); the activation factors were particularly high for *STS*. The levels of gene expression were higher in leaf samples than in the berry samples.

Discussion

The three programs geNorm, BestKeeper, and Normfinder were used to identify reference genes suitable for differential gene expression analysis in grapevine/pathogen interactions. Normfinder analysis allowed us to study the effect of infection on the candidate gene expression. In berries, *UQCC* showed a high intra-group variation in the infected

samples, together with a high inter-group variation, suggesting an effect of the *B. cinerea* infection. However, 18S rRNA showed the highest intra-group variation in the control samples, but the corresponding inter-group variation was rather low, indicating that the low ranking of this candidate did not result from infection. Furthermore, infection seemed to have little effect on the expression of the other candidate genes. For leaves, both the inter- and intra-group variations were lower than that in berry samples, indicating that the development of the oomycete did not affect the candidate gene expression.

Studies using a combination of geNorm, BestKeeper, and Normfinder often describe minor to substantial discrepancies in the results of the three programs. These are typically explained by the differences in the mathematical models associated with each approach (Reid et al. 2006; Schmidt and Delaney 2010). In this study, the results obtained by the three methods did not show excessive discrepancies and were compared to produce a final ranking of the candidate genes. This allowed an identification of the best candidates based on more than one program. Some differences in the order of the gene rankings obtained with the three models were observed between the two data sets from different organs. For berry samples, *UBE2* was placed in the top or middle of the ranking, while this gene was low-ranked for leaf samples. An inverse observation could be made for the candidate *UQCC*, which is one of the least stable in berries, but near the top of the rankings for leaves. These variations are probably the result of expression regulation differences caused by the different organ types. Despite these discrepancies, similarities between the different analyses were observed. Some of the candidate genes were repeatedly ranked low in the sample sets, namely the 18S rRNA, which was not adequate to be used as a reference gene in the tested conditions. These results are in accordance with previous studies describing that ribosomal subunits can be inappropriate internal controls for gene expression analysis (Tricarico et al. 2002; Wong and Medrano 2005). These results also confirm that the identification of stable reference genes has to be systematically done for any study of gene expression using qRT-PCR in grapevine as in other plant species. On the other hand, *VATP16* and *60SRP* genes were the top-ranked reference genes for almost every analysis and in the final ranking, indicating that they are suitable for the normalization of qRT-PCR expression data obtained in grapevine/*P. viticola* and *B. cinerea* interactions. As the use of at least two reference genes is generally recommended (Vandesompele et al. 2002) to normalize gene expression, the combination of *VATP16* and *60SRP* appeared suitable for qRT-PCR studies in our experimental conditions.

All these results were obtained using the traditionally calculated C_t values and associated methods. For current

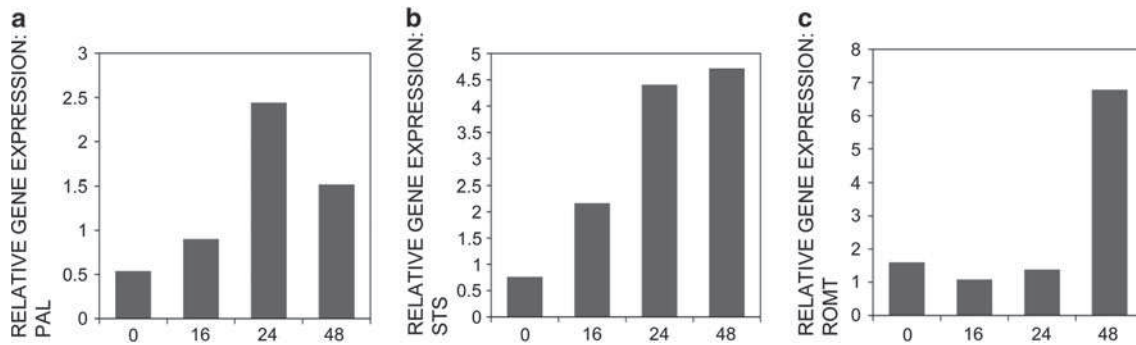


Fig. 2 Relative expression of genes coding for enzymes involved in pterostilbene biosynthesis in *B. cinerea*-infected grapevine berries. **a** phenylalanine ammonia-lyase, *PAL*, **b** stilbene synthase, *STS*, and **c** resveratrol *O*-methyltransferase, *ROMT*, gene expression analyzed

by qRT-PCR. Samples were collected from 0 to 48 h post-inoculation. Expression levels were normalized with respect to *VATP16* and *60SRP* expression and related to the corresponding control. *Graphs* correspond to one representative experiment

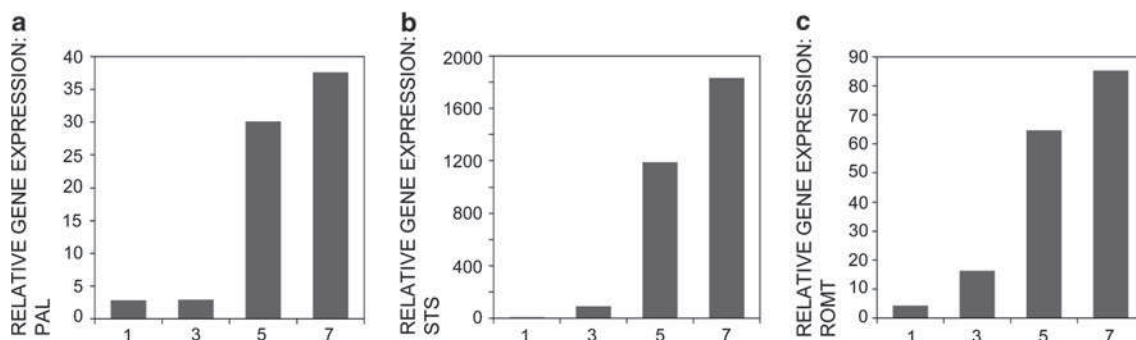


Fig. 3 Relative expression of genes coding for enzymes involved in pterostilbene biosynthesis in *P. viticola*-infected grapevine leaves. **a** phenylalanine ammonia-lyase, *PAL*, **b** stilbene synthase, *STS*, and **c** resveratrol *O*-methyltransferase, *ROMT*, gene expression analyzed

by qRT-PCR. Samples were collected from 1 to 7 days post-inoculation. Expression levels were normalized with respect to *VATP16* and *60SRP* expression and related to the corresponding control. *Graphs* correspond to one representative experiment

qRT-PCR methods, DNA quantification is calculated from fluorescence threshold and amplification efficiency. These methods consider that the exponential phase of the PCR amplification profile indicates a constant efficiency of amplification and use the slope of this region to estimate this efficiency. However, Rutledge and Stewart (2008a) have reported innate limitations and the inaccuracy of this model and proposed the LRE analysis (Rutledge and Stewart 2008b, 2010). LRE analysis is based on the observation that the log-linear phase of the PCR amplification profile does not result from a constant efficiency but, on the contrary, from an exponential loss in amplification rate (Rutledge and Stewart 2008a) leading to underestimations with usual methods. LRE analysis first determines the maximal amplification efficiency (E_{max}) and the rate of loss in amplification efficiency by applying linear regression analysis to the fluorescence readings within the central region of an amplification profile and next calculates the DNA quantity by conversion of fluorescence readings (Rutledge and Stewart 2008b, 2010). Rutledge and Stewart (2008a, b, 2010) have reported that the LRE method was more accurate than usual

methods to follow changes in gene expression and also recommended absolute DNA quantification using bacteriophage lambda genomic DNA as a universal quantitative standard. In our study, this method was simply used to produce expression data other than C_t in order to assess the stability of the candidate reference genes by their relative expression in infected versus control samples. A prototypic Java program that enables the implementation of the LRE-based methodology is available and could be used with our RT-PCR raw data to allow comparison with usual methods. As Bestkeeper directly uses C_t values, it was not suitable for this comparison. Normfinder and Genorm, however, were filled with data obtained with the LRE method. In these conditions, *60SRP* and *VATP16* were the most stable of the studied reference gene in berry and leaf samples, respectively (Table 8). Regarding the expression stability values obtained with this analysis, the use of a single gene instead of several in combination seems better for normalization.

60SRP and *VATP16* in combination, and *VATP16* or *60SRP* alone were therefore used as reference genes to

study the expression of genes encoding enzymes involved in pterostilbene biosynthesis in *P. viticola*-infected leaves and *B. cinerea*-infected berries. Similar results were obtained in both cases. As previously reported by Schmidlin et al. (2008), we confirmed that *ROMT* expression is induced in *P. viticola* infected grapevine leaves, but in the Marselan variety. In addition, our results indicate that it is also induced in berries in response to *B. cinerea* infection. These data are consistent with previous studies reporting the occurrence of pterostilbene in *B. cinerea*-infected grapevine berries, even if it is generally detected in small amounts, largely well below those of resveratrol (Adrian et al. 2000). Many studies on grapevine/*B. cinerea* interaction did not systematically detect pterostilbene, whereas resveratrol and derivatives were accumulated (Adrian et al. 2000). It would be interesting to determine whether pterostilbene was present under the limit of detection or if there is a post-translational regulation of its production. Our results indicate that *ROMT* is expressed in different grapevine organs (leaves and berries) and in response to infection by a biotrophic (*P. viticola*) and a necrotrophic (*B. cinerea*) pathogen. In berries, the level of stilbene accumulation in response to infection or other stresses such as UV-irradiation is highly dependent on the berry state of development and declines from veraison to maturity. In our experiments mature berries were used, which certainly explains why the levels of gene expression were lower than in leaves. Stilbene production has been described as a grapevine response to various abiotic stresses such as UV light or aluminum chloride and also to biotic stresses such as pathogen infection. Expression of a stilbene synthase gene in tobacco and other plants often leads to an increased resistance against necrotrophic or biotrophic pathogens (Jeandet et al. 2002), indicating that stilbene production is potentially a large spectrum defense strategy.

This study was first conducted to assess the expression stability of candidate reference genes in two different grapevine organs (leaves and berries) infected by a biotrophic and a necrotrophic pathogen (*P. viticola* and *B. cinerea*, respectively). Using three computer-based statistical methods and C_t values or LRE method generated values as input data, we have identified two genes, *VATP16* and *6OSRP*, as suitable reference genes to normalize gene expression data obtained in grapevine/*P. viticola* and *B. cinerea* interactions. The usually used 18S RNA was highly unstable and had to be rejected, confirming the importance to systematically verify the stability of candidate reference genes for any study of gene expression using qRT-PCR in grapevine as in other plant species. For a second calculation with data obtained from LRE analysis, we observed a stable expression of *6OSRP* and *VATP16* in berry and leaf samples, respectively. Second, we have followed the expression of three genes involved in stilbene

production in both interactions, especially the recently identified *ROMT* gene involved in the pterostilbene synthesis. For the first time, we highlight that the expression of the *ROMT* gene encoding an enzyme involved in pterostilbene synthesis is regulated not only in leaves but also in berries during grapevine/*P. viticola* and *B. cinerea* interactions. Further studies will be needed to determine the function of *ROMT* gene in the global grapevine phytoalexin defense response to pathogens. In particular, it would be interesting to determine if compounds known to activate grapevine defenses (elicitors) induce the expression of *ROMT* gene and whether this activation is essential to induce grapevine resistance against pathogenic fungi. Such information would contribute to the development of a strategy of protection of the vineyard based on the use of elicitors in order to reduce the use of pesticides.

Acknowledgments This work was funded by the Conseil Régional de Bourgogne, Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne, Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne, Comité National des Interprofessions des Vins à Appellation d'Origine and the ANR Génoplante Safegrape Project (O8-GENO-148G). The authors thank Olivier Lamotte (UMR Plante Microbe Environnement, INRA Dijon, France), Patrick Frettinger (Laboratory of plant-pathogen fungi functional genomics, Bayer CropScience, Lyon, France), and Dominique Garmyn (UMR Microbiologie des Sols et de l'Environnement, Dijon, France) for helpful discussions and Jean Roudet and Marc Fermaud (UMR Santé végétale, INRA-ENITA Bordeaux, France) for assistance with berry experiments. Many thanks also to Alberto Ferrarini (University of Verona, Italy), Grégoire Aubert, and Myriam Sanchez (UMR LEG, INRA Dijon, France) for technical support.

References

- Abbal P, Pradal M, Muniz L, Sauvage FX, Chatelet P, Ueda T, Tesniere C (2008) Molecular characterization and expression analysis of the Rab GTPase family in *Vitis vinifera* reveal the specific expression of a VvRabA protein. *J Exp Bot* 59:2403–2416
- Adrian M, Jeandet P, Veneau J, Weston LA, Bessis R (1997) Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *J Chem Ecol* 23:1689–1702
- Adrian M, Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Tesson L, Bessis R (2000) Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *J Agric Food Chem* 48:6103–6105
- Allègre M, Héloir MC, Trouvelot S, Daire X, Pugin A, Wendehenne D, Adrian M (2009) Are grapevine stomata involved in the elicitor-induced protection against downy mildew? *Mol Plant Microbe Interact* 22:977–986
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64:5245–5250
- Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML (2004) Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 59:566–573

- Bower NI, Johnston IA (2009) Selection of reference genes for expression studies with fish myogenic cell cultures. *BMC Mol Biol* 10:80
- Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29:23–39
- Cappelli K, Felicetti M, Capomaccio S, Spinsanti G, Silvestrelli M, Supplizi AV (2008) Exercise induced stress in horses: selection of the most stable reference genes for quantitative RT-PCR normalization. *BMC Mol Biol* 9:49
- Dhedea K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GA, Zumla A (2005) The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 344:141–143
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Perez A, Perez JA (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol* 8:131
- Ferrer JL, Austin MB, Stewart C Jr, Noel JP (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropenoids. *Plant Physiol Biochem* 46:356–370
- Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaff MW (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 28:1601–1613
- Fluck M, Dapp C, Schmutz S, Wit E, Hoppeler H (2005) Transcriptional profiling of tissue plasticity: role of shifts in gene expression and technical limitations. *J Appl Physiol* 99:397–413
- Fung RW, Gonzalo M, Fekete C, Kovacs LG, He Y, Marsh E, McIntyre LM, Schachtman DP, Qiu W (2008) Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiol* 146:236–249
- Gao F, Shu X, Ali MB, Howard S, Li N, Winterhagen P, Qiu W, Gassmann W (2010) A functional EDS1 ortholog is differentially regulated in powdery mildew resistant and susceptible grapevines and complements an Arabidopsis eds1 mutant. *Planta* 231:1037–1047
- Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L (2009) Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot* 60:487–493
- Hren M, Nikolić P, Rotter A, Blejec A, Terrier N, Ravnikar M, Dermastia M, Gruden K (2009) 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics* 10:460
- Hu R, Fan C, Li H, Zhang Q, Fu YF (2009) Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Mol Biol* 10:93
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Huguency P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrini S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pè ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quétier F, Wincker P (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463–467
- Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M (2002) Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agric Food Chem* 50:2731–2741
- Lee JM, Roche JR, Donaghy DJ, Thrush A, Sathish P (2010) Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies of gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *BMC Mol Biol* 11:8
- Li YL, Ye F, Hu Y, Lu WG, Xie X (2009) Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 394:110–116
- Lund ST, Peng FY, Nayar T, Reid KE, Schlosser J (2008) Gene expression analyses in individual grape (*Vitis vinifera* L.) berries during ripening initiation reveal that pigmentation intensity is a valid indicator of developmental staging within the cluster. *Plant Mol Biol* 68:301–315
- Marshall OJ (2004) PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20:2471–2472
- Olsen KM, Hehn A, Jugde H, Slimestad R, Larbat R, Bourgaud F, Lillo C (2010) Identification and characterisation of CYP75A31, a new Flavonoid 3'-5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biol* 10:21
- Pezet R, Pont V (1990) Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea* Pers. *J Phytopathol* 129:29–30
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26:509–515
- Polesani M, Desario F, Ferrarini A, Zamboni A, Pezzotti M, Kortekamp A, Polverari A (2008) cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* 9:142
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol* 6:27
- Remans T, Smeets K, Opdenakker K, Mathijssen D, Vangronsveld J, Cuypers A (2008) Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* 227:1343–1349
- Robinson TL, Sutherland IA, Sutherland J (2007) Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. *Vet Immunol Immunopathol* 115:160–165
- Ruan W, Lai M (2007) Actin, a reliable marker of internal control? *Clin Chim Acta* 385:1–5
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37:e45
- Rutledge RG, Stewart D (2008a) Critical evaluation of methods used to determine amplification efficiency refutes the exponential character of real-time PCR. *BMC Mol Biol* 9:96
- Rutledge RG, Stewart D (2008b) A kinetic-based sigmoidal model for the polymerase chain reaction and its application to high-capacity absolute quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnol* 8:47
- Rutledge RG, Stewart D (2010) Assessing the performance capabilities of LRE-based assays for absolute quantitative real-time PCR. *Plos One* 5:e9731
- Schmidlin L, Poutaraud A, Claudel P, Mestre P, Prado E, Santos-Rosa M, Wiedemann-Merdinoglu S, Karst F, Merdinoglu D, Huguency P (2008) A stress-inducible resveratrol O-Methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilben in grapevine. *Plant Physiol* 148:1630–1639
- Schmidt GW, Delaney SK (2010) Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Mol Genet Genomics* 283:233–241

- Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barrieu F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Leon C, Renaudin JP, Dedaldechamp F, Romieu C, Delrot S, Hamdi S (2005) Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* 222:832–847
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75:291–295
- Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J, Zhang Z (2009) Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 10:71
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C (2002) Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 309:293–300
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:1–12
- Velasco R, Zharkikh A, Troglio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C, Dematte L, Mraz A, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, Perbost C, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, Sterck L, Vandepoele K, Grando SM, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar SK, Fontana P, Gutin A, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* 2:e1326
- Wang X, Liu W, Chen X, Tang C, Dong Y, Ma J, Huang X, Wei G, Han Q, Huang L, Kang Z (2010) Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. *BMC Plant Biol* 10:9
- Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39:75–85
- Xue JL, Salem TZ, Turney CM, Cheng XW (2010) Strategy of the use of 28S rRNA as a housekeeping gene in real-time quantitative PCR analysis of gene transcription in insect cells infected by viruses. *J Virol Methods* 163:210–215

Changes in Carbohydrate Metabolism in *Plasmopara viticola*-Infected Grapevine Leaves

Magdalena Gamm,¹ Marie-Claire Héloir,¹ Richard Bligny,² Nathalie Vaillant-Gaveau,³ Sophie Trouvelot,¹ Gérard Alcaraz,⁴ Patrick Frettinger,¹ Christophe Clément,³ Alain Pugin,¹ David Wendehenne,¹ and Marielle Adrian¹

¹UMR INRA1088 / CNRS 5184 / Université de Bourgogne Plante Microbe Environnement, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France; ²Laboratoire de Physiologie cellulaire végétale, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France; ³Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, URVVC–UPRES EA 2069, Bâtiment 18, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France; ⁴UPSP Proxiss–AGROSUP DIJON, 26 Bd Dr Petitjean, BP 87999, 21079 Dijon Cedex, France

Submitted 21 February 2011. Accepted 12 May 2011.

The oomycete *Plasmopara viticola* is responsible for downy mildew, a severe grapevine disease. In infected grapevine leaves, we have observed an abnormal starch accumulation at the end of the dark period, suggesting modifications in starch metabolism. Therefore, several complementary approaches, including transcriptomic analyses, measurements of enzyme activities, and sugar quantification, were performed in order to investigate and to understand the effects of *P. viticola* infection on leaf starch and—to a larger extent—carbohydrate metabolism. Our results indicate that starch accumulation is associated with an increase in ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) activity and modifications in the starch degradation pathway, especially an increased α -amylase activity. Together with these alterations in starch metabolism, we have observed an accumulation of hexoses, an increase in invertase activity, and a reduction of photosynthesis, indicating a source-to-sink transition in infected leaf tissue. Additionally, we have measured an accumulation of the disaccharide trehalose correlated to an increased trehalase gene expression and enzyme activity. Altogether, these results highlight a dramatic alteration of carbohydrate metabolism correlated with later stages of *P. viticola* development in leaves.

Plasmopara viticola is the causal agent for grapevine downy mildew, a severe disease which affects harvest quality and quantity. This disease remains problematic because its control requires frequent fungicide applications in wet weather. *P. viticola* is an obligate biotrophic oomycete which needs living tissue for nutrient uptake, growth, and reproduction. It uses stomata to penetrate into leaves, develops an intercellular mycelium with haustoria for nutrient uptake from mesophyll cells, and subsequently reaches other stomata for sporulation. The disease is characterized by the occurrence of typical “oil-spot symptoms” on the upper side of the leaf. In infected leaves, we have observed an abnormal starch accumulation at the end of the dark period, suggesting modifications in the

carbohydrate metabolism.

Recently, the effects of pathogen infection on plant primary metabolism have aroused new interest (Berger et al. 2007). Plants need photoassimilates to fuel the activation of defense reactions and to mediate physiological adaptations (Bolton 2009) whereas pathogens attempt to manipulate the plant to use carbohydrates for their development. Both compete for sugars, resulting in modifications of photoassimilate production and partitioning within host tissues (Abood and Lösel 2003; Hall and Williams 2000; Scholes et al. 1994).

Plants produce carbohydrates in photosynthetic source organs and export them toward sugar-importing sink organs. During the day, a part of the sugars is retained in leaf chloroplasts and metabolized in transitory starch, which is degraded during the dark period to support leaf metabolism and sucrose export. Starch, the major form of plant carbon storage, is mainly composed of branched amylopectin and also the nonbranched amylose. Both molecules are polymers of α -1,4- and α -1,6-linked glucose units. Starch synthesis involves ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) (EC 2.7.7.27), starch synthases (EC 2.4.1.21), and branching enzymes (EC 2.4.1.25 3.2.1.33) (Zeeman et al. 2007). The knowledge of starch breakdown mechanisms in plastids remains incomplete. It is proposed that phosphorylation by glucan, water dikinase (EC 2.7.9.4), and phosphoglucan water dikinase (PWD) (EC 2.7.9.4) is required to allow the subsequent degradation by β -amylases (EC 3.2.1.2) (Lloyd et al. 2005; Scheidig et al. 2002; Smith et al. 2005). The role of α -amylases (EC 3.2.1.1) in leaf starch degradation remains uncertain (Llyod et al. 2005).

Plant sugar concentrations alter in response to diurnal changes and biotic and abiotic stresses (Rolland et al. 2006). In addition to their role as resources for respiration, metabolic intermediates, and storage components, sugars are signaling molecules and can impact gene expression and enzyme activity, especially those related to carbohydrate metabolism and photosynthesis (Koch 2004; Rolland et al. 2002; Smeekens 2000). For example, glucose or sucrose repress the expression of genes encoding the small subunit of ribulose biphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39, Rubisco), the chlorophyll a/b binding protein, and α -amylase (Gibson 2005; Krapp et al. 1993), whereas both induce the expression of the gene encoding extracellular invertase (EC 3.2.1.26) (Roitsch 1999; Sheen et al. 1999). In *Arabidopsis*, trehalose activates the transcription of AGPase genes (Wingler et al. 2000).

Corresponding author: M. Adrian; Telephone: +33 (0)3 80 69 37 21; Fax: +33 (0)3 80 69 32 26; E-mail: marielle.adrian@u-bourgogne.fr

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that three supplementary tables and two supplementary figures are published online.

Sugars also regulate enzyme activities. For example, extracellular invertase activity is induced by glucose and sucrose in *Chenopodium rubrum* (Roitsch et al. 1995) and by sucrose in tomato (Godt and Roitsch 1997; Sinha et al. 2002).

Invertases are key enzymes for carbohydrate allocation because they catalyze the irreversible cleavage of sucrose, the major form of translocated sugars in plants, into glucose and fructose. Plants contain several isoforms of invertases that differ by their subcellular localization, pH optimum, and isoelectric point (Godt and Roitsch 1997). Soluble intracellular invertases (vacuolar acidic and cytoplasmic alkaline) can be distinguished from acidic apoplastic or cell-wall invertases. The cell-wall invertase activity is an important determinant of local sink strength (Sturm 1999). Invertases are not plant specific and are also present in bacteria and fungi such as *Aspergillus* spp. or *Uromyces fabae* (Voegelé et al. 2006). An increase in invertase activity is a common feature of plant–pathogen interactions (Fotopoulos et al. 2003; Roitsch et al. 2003; Sutton et al. 2007; Voegelé et al. 2006). In compatible plant–biotrophic microorganism interactions, it is associated with a reduction in the rate of net photosynthesis (Chou et al. 2000; Tang et al. 1996) and an accumulation of hexose sugars at the site of infection, resulting in a local shift of source to sink (Scholes et al. 1994). In grapevine leaves infected by powdery and downy mildew, Brem and associates (1986) have described an increase of acid invertase activity and, more recently, Hayes and associates (2010) have reported changes in the expression of apoplastic invertase and hexose transporter genes.

Whereas grapevine–*P. viticola* interaction has already been described in a context of genetic or induced resistance (Dai 1995; Díez-Navajas et al. 2008; Trouvelot et al. 2008), to our knowledge, neither a deregulation of starch metabolism nor a general view of the effect of the infection on carbohydrate metabolism was reported until now. Therefore, in this study, several complementary approaches, including transcriptomic analyses, measurements of enzyme activities, and sugar quantification, were used in order to understand the mechanisms responsible for starch abnormal accumulation and to investigate the effect of *P. viticola* infection on the leaf carbohydrate metabolism.

RESULTS

P. viticola development induces abnormal starch accumulation.

P. viticola development was monitored by analysis of the ratio of pathogen/leaf DNA content (coefficient of infection) and visualized by microscopy after aniline blue staining (Fig. 1). At 1 day postinoculation (dpi), zoospores have reached stomata, encysted, and initiated germination. The oomycete DNA was detectable from 3 dpi, when hyphae have developed and formed haustoria in mesophyll cells. The coefficient of infection increased significantly from 5 dpi concomitantly to extensive leaf colonization and to the occurrence of the “oil-spot” symptoms. It reached a maximum when symptoms were spread over most of the leaf surface and the oomycete was ready to initiate sporangiothores (7 dpi).

Lugol staining was used to visualize starch in control and *P. viticola*-infected leaves when the coefficient of infection reached the maximum (7 dpi). At the end of the dark period, control leaves showed no starch (Fig. 2A) whereas, in infected leaves, starch was co-localized with the oil-spot symptoms (Fig. 2B). During the light period, starch was evenly distributed in control leaves whereas it seemed preferentially localized in oil spots of infected leaves (data not shown).

Ultrathin cuts of control and inoculated (6 dpi) leaves,

collected at the end of the dark period, were observed using transmission electron microscopy. In the spongy parenchyma cells of control leaves, some chloroplasts seemed to contain only small starch amounts, as indicated by the presence of few and relatively small granules (Fig. 2C). In infected leaves, however, chloroplasts contained voluminous starch granules but the integrity of such chloroplasts seemed unaltered (Fig. 2D).

The starch content was determined in leaf extracts by the measure of glucose units released after enzymatic digestion. For leaf extracts sampled during the light period, glucose at approximately 13 mg/g fresh weight (FW) was detected and no significant differences between control and *P. viticola*-inoculated plants were observed (ratio of approximately 1) (Fig. 3). For samples collected at the end of the dark period, glucose at approximately 0.8 mg/g FW was measured in control plants. It was not significantly different from the values obtained in infected plants at 1 to 5 dpi. At 7 dpi, however, the release of glucose was more than sixfold higher in extracts of infected leaves, indicating a higher starch concentration (Fig. 3).

Modifications of carbohydrate metabolism- and photosynthesis-related gene expression revealed by microarray profiles.

A microarray analysis of control and *P. viticola*-infected grapevine leaves (7 dpi, end of the dark period) revealed that 3,100 of the nearly 30,000 genes studied were affected by infection. Among the regulated genes, 5.4% were annotated as related to carbohydrate metabolism, including genes involved in starch and soluble sugar metabolism, and 0.6% was connected to photosynthesis (Supplementary Fig. S1, Supplementary Table S1). Gene expression of AGPase, soluble starch synthase, PWD, β -amylase, sucrose phosphate synthase, trehalose phosphate synthase (TPS), Rubisco large subunit, chlorophyll synthases, and chlorophyll a/b binding proteins were repressed, while genes encoding α -amylase, invertase, trehalase, and chlorophyllase showed induced expression (Table 1).

Alteration of starch metabolism.

Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis was performed to validate the variations observed in the microarray profile for a set of genes encoding key enzymes of starch metabolism and to analyze these variations throughout the infection time course. Genes encoding AGPase and soluble starch synthase were both repressed at the end of the infection. The AGPase gene expression was repressed at 7 dpi during both the dark and light periods (Fig. 4A), whereas that of soluble starch synthase was repressed from 5 dpi (Fig. 4B). Whereas the β -amylase gene expression varied slightly over the course of infection and was repressed at 7 dpi during the light period (Fig. 4C), that of α -amylase was clearly induced from 5 dpi, with a maximal activation at 7 dpi at light (Fig. 4D).

AGPase and β - and α -amylase activities were measured in control and infected leaves (7 dpi). The AGPase activity was more than sixfold higher in infected than in control leaves for both sampling periods (Fig. 5A). In control plants, the β -amylase activity was more than three times higher in the dark than during the light period. In infected plants, this activity was similar in the dark and light periods and corresponded to the low value measured for control samples of the light period (Fig. 5B). α -Amylase activity was more than threefold higher in infected than in control leaves for both sampling periods (Fig. 5C).

Alteration of soluble sugar.

To verify whether infection leads to a global deregulation of the sugar metabolism, ^{13}C -spectroscopy was used to draw up and compare the profiles of soluble metabolites in control and *P. viticola*-infected leaves (6 dpi, end of the dark period). ^{13}C -nuclear magnetic resonance (NMR) spectra showed that fructose and glucose seemed more abundant and sucrose less present in infected compared with control leaves (Supplementary Fig. S2). Malic acid was the most abundant, Krebs intermediate, and tartaric acid appeared particularly abundant in both control and infected leaves.

Next, high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) was used to quantify glucose, fructose, and sucrose in samples over the course of infection. At the end of the dark period, glucose, fructose, and sucrose at approximately 9, 6, and 13 mg/g dry weight (DW), respectively, were detected in control leaves. No significant difference could be observed between control and infected leaves before 7 dpi (Fig. 6A). At 7 dpi, however, glucose and fructose concentrations increased significantly in infected leaves, while the sucrose level remained similar to that of control plants (Fig. 6A). For control leaves collected during the light period, the sugar concentrations varied for glucose, fructose, and sucrose at approximately 11, 8.5, and 30 mg/g DW, respectively. The concentrations were quite similar in infected leaves until 7 dpi, whereas sucrose concentration showed a 1.8-fold decrease in infected leaves compared with control leaves (Fig. 6B).

To further investigate the origin of the variations of the sugar content, the expression of genes encoding sucrose phosphate synthase and cell wall invertase, two enzymes implicated in the synthesis and degradation of sucrose, respectively, were followed using qRT-PCR analysis. The gene encoding sucrose phosphate synthase was repressed at 5 dpi at the end of the dark period and at 7 dpi during both the light and dark periods (Fig. 4E). However, that encoding cell wall invertase was clearly induced from 5 dpi during both periods (Fig. 4F). These data fit well with those obtained in the microarray analysis (Table 1).

Finally, invertase activity was assessed in the insoluble fraction of leaf extracts (Fig. 7). At pH 4.5, optimum for cell wall invertases (Avigad 1982), no difference in activity could be measured between control and infected leaves. At pH 7.5, however, a strong increase of invertase activity was observed in infected leaves from 5 dpi, independently of the sampling period. The invertase activities were also assessed in the soluble fraction of the leaf extracts but no significant difference was shown, whatever the pH conditions (data not shown).

Trehalose accumulation.

HPAEC-PAD also allowed trehalose analysis. It was only present in trace amounts in control leaves. In infected leaves, its concentration increased from 5 dpi to reach 2.41 ± 1.1 mg/g DW and 5.16 ± 4.07 mg/g DW at 7 dpi in samples collected in the dark and light periods, respectively.

The microarray analysis showed that the expression of the gene encoding TPS was repressed in infected leaves (Table 1), whereas that encoding trehalose 6-phosphate phosphatase was not differentially regulated (data not shown). The trehalase gene expression was induced from 5 dpi (Table 1; Fig. 8A). Trehalase activity was more than 10 times higher in infected leaves (7 dpi) for both sampling periods (Fig. 8B).

Decrease in the photosynthetic efficiency and in chlorophyll levels.

In infected leaves, Fv/Fm, the maximum efficiency of

photosystem II (PSII), was reduced from 5 dpi in the infected area (Fig. 9A). Fv/Fm, the effective PSII quantum yield (Φ_{PSII}), and photochemical and nonphotochemical quenching (q_{P} and q_{N}) were determined in the oil spots and adjacent areas of infected leaves (7 dpi) compared with control leaves (Fig. 9B). The Fv/Fm was reduced to 0.63 ± 0.06 in the oil spots, compared with 0.76 ± 0.02 in control leaves. It was accompanied by a decrease of Φ_{PSII} from 0.34 ± 0.03 to 0.19 ± 0.04 and of q_{P} from 0.63 ± 0.03 to 0.54 ± 0.08 . Meanwhile, the q_{N} value increased from 0.77 ± 0.04 to 0.84 ± 0.03 . The measured parameters showed no significant difference between noninfected control leaves and green regions showing no symptoms (adjacent to oil spots) in infected leaves (Fig. 9B).

In addition, the chlorophyll content was determined in control and infected leaves at 7 dpi. In control leaves, the total chlorophyll concentration was 24.8 ± 1.8 mg/g FW, and it was reduced to 17.3 ± 0.8 mg/g FW in infected leaves, mainly due to a decrease of the chlorophyll a level (Fig. 9C).

DISCUSSION

In leaves, starch accumulates during the day and is degraded during the dark period. This dynamic is regulated, so that starch catabolism is almost complete at the end of the night. Plants are able to adjust this finely tuned pattern in response to changes in environmental conditions. In *P. viticola*-infected grapevine leaves, we observed an abnormally high starch accumulation at the end of the dark period, suggesting major modifications in starch metabolism regulation. Depending on the pathosystems, a decrease (Horst et al. 2008; Judelson et al. 2009; Storr and Hall 1992) or an increase (Ji et al. 2009; Kim et al. 2009; Rodríguez et al. 2010) of the starch content was observed in some plant-birotrophic pathogen interactions.

A microarray analysis revealed that the expression of several genes related to the carbohydrate metabolism was modified in infected leaves. The expression of genes encoding starch-degrading enzymes (i.e., a grapevine isoform of a phosphoglucan water, dikinase, and β -amylase) were repressed. PWD plays an essential role in starch degradation because the phosphorylation of semicrystalline starch particles is required for the subsequent degradation by other enzymes (Kötting et al. 2005; Ritte et al. 2002, 2004; Smith and Stitt 2007). β -Amylase is an exo-acting enzyme that degrades the α -1,4-glycosidic bonds from the nonreducing end of the starch molecules, releasing maltose. It plays a major role in the degradation of leaf starch in potato leaves (Scheidig et al. 2002) and probably in other species (Lloyd et al. 2005). These microarray results suggest that starch catabolism is affected in *P. viticola*-infected leaves.

Surprisingly, we have observed a high induction of the expression of a gene encoding α -amylase, an endo-acting enzyme that degrades 1,4-glycosidic bonds to release malto-oligosaccharides. This enzyme is mostly described in the context of sink tissues, as potato tubers or cereal endosperm, but conflicting reports exist about its function in foliar tissues (Lloyd et al. 2005). The rice isoform AMY1 was shown to have a significant function in leaf starch degradation (Asatsuma et al. 2005). It seems to play no essential role in *Arabidopsis* (Yu et al. 2005), except in leaves during senescence or infection with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, where the gene encoding α -amylase A1 is induced (Doyle et al. 2007). Up to now, to our knowledge, no data on the function and the importance of the amylase isoforms in grapevine leaf starch metabolism were available. In our study, qRT-PCR confirmed that the expression of the β -amylase gene was repressed in infected leaves, whereas it was clearly

induced for the α -amylase gene. Concerning enzyme activities, the β -amylase activity was reduced in infected leaves at the end of the dark period whereas it remained unchanged for the light period. The activity of α -amylase was induced in infected leaves for both sampling periods. These results suggest that, in *Plasmopara viticola*-infected leaves, α -amylase replaces β -amylase for starch degradation. The observed starch accumulation might result from a lower efficiency of α -amylase to degrade starch.

We have also studied enzymes involved in starch synthesis, including the key enzyme AGPase. The microarray analysis, confirmed by qRT-PCR, revealed that the expression of the gene encoding the large subunit 1 of AGPase was repressed in infected leaves. However, it was not correlated to a reduction but an increase of the enzyme activity. In *Arabidopsis*, changes in the transcription of this gene do not systematically lead to a change in protein abundance or enzyme activity because a strong post-translational regulation is important to control starch metabolism (Gibon et al. 2004; Lu et al. 2005; Smith et al. 2004). Therefore, in *P. viticola*-infected leaves, starch accumulation could result from the increase of AGPase activity and alteration of starch degradation.

At 7 dpi, both glucose and fructose levels were higher in infected than in control leaves at the end of the dark period. Microorganisms can induce changes in soluble sugar concentrations (Horst et al. 2008; Ji et al. 2009; Jobic et al. 2007; Rodriguez et al. 2010). For example, an increase in soluble sugars was observed in *Arabidopsis*, wheat, or tobacco infected by *Albugo candida*, *Puccinia graminis*, or *Phytophthora nicotianae*, respectively (Chou et al. 2000; Scharte et al. 2005; Tang et al. 1996; Wright et al. 1995). In plant–pathogen interactions, sugars play several roles: energy source to fuel the activation of defense reactions, regulators of gene expression (sugar signaling), and nutrients. They can induce pathogenesis-related (PR) proteins (Roitsch 1999) and sink-specific genes (such as invertase) and repress source-specific genes, such as the chlorophyll subunit a/b binding protein and Rubisco (Rolland et al. 2002). In our case, because sugars accumulate just before sporulation, a role in plant defense seems uncertain but they certainly serve as nutrients for the pathogen.

Sucrose is the main form of sugar transported in plants and invertase catalyzes its cleavage into glucose and fructose. At 7 dpi, infected leaves showed a low level of sucrose, but only during the light period. However, we have shown an increase in invertase activity in the insoluble fraction after 3 dpi, independently of the sampling period. Therefore, one could expect a lower sucrose level at the end of the dark period and a higher level of glucose and fructose during the light period compared with the obtained results. Such discrepancies might reflect distinct day and night carbohydrate metabolism of *Plasmopara viticola*. **(Query #1)** It is consistent with developmental events such as sporulation, which preferentially occurs in the dark. An increase in cell-wall invertase activity seems to be a common feature in plants infected by viruses (Herbers et al. 2000), bacteria (Sturm and Chrispeels 1990), necrotrophic fungi (Benhamou et al. 1991), and biotrophic fungi (Chou et al. 2000; Fotopoulos et al. 2003; Hall and Williams 2000; Roitsch et al. 2003; Scholes et al. 1994; Sutton et al. 2007; Voegelé et al. 2006). In grapevine, Hayes and associates (2010) have reported the induction of a cell-wall invertase gene expression in downy and powdery mildew-infected leaves. Because host and pathogen possess invertases, it is difficult to establish which one is activated during the interaction. Few works stated the plant or pathogen origin of invertases during interactions. An immunological approach was used to show the involvement of a fungal invertase in

sunflower–*Sclerotinia sclerotiorum* and grapevine–*Botrytis cinerea* interactions (Jobic et al. 2007; Ruiz and Ruffner 2002). In the *Vicia faba*–*U. fabae* interaction, Voegelé and associates (2006) have observed an increase of both plant and pathogen invertase gene expression. In our pathosystem, because *P. viticola* is an obligate intra-tissular biotrophic pathogen, we cannot state whether the invertase activity determinant for the carbohydrate changes observed is of plant or pathogen origin. The increase in the invertase activity might be linked to the starch accumulation observed. Indeed, Fernie and associates (2001) have reported a correlation between an increase in invertase activity and starch synthesis in potato discs treated by palatinose.

The invertase detected in the insoluble fraction had an alkaline optimum pH, whereas major plant invertases activated during a compatible interaction with biotrophic fungi are extracellular acid enzymes (Roitsch et al. 2003). To our knowledge, only one study has reported an alkaline cell-wall invertase in rice cell suspensions but not in a context of plant–pathogen interaction (Hsiao et al. 2002). Thus, further experiments would be required in order to characterize the alkaline invertase found in *P. viticola*-infected grapevine leaves.

An increasing level of the disaccharide trehalose was observed in *P. viticola*-infected leaves. Brem and associates (1986) have reported a depletion of sucrose and a diversion of glucose to trehalose in *P. viticola*-infected leaves but it was after the beginning of sporulation. In most plants, trehalose is found only in trace amounts (Goddjin et al. 1997; Paul et al. 2008); however, there is growing interest in its metabolic pathway because it has effects on growth, development, metabolism, and stress resistance and it may play an important regulatory role in carbohydrate metabolism or signaling (Goddjin and Smeekens 1998; Paul 2007). In *Arabidopsis*, it activates *ApL3* gene expression, AGPase activity, and starch accumulation (Fritzius et al. 2001; Kolbe et al. 2005; Ramon et al. 2007; Wingler et al. 2000). In soybean, it affects sucrose synthase and invertase activities (Müller et al. 1998). The trehalose precursor, trehalose 6-phosphate (T6P), also regulates starch biosynthesis via post-translational redox modification of AGPase (Kolbe et al. 2005; Lunn et al. 2006; Schlupepmann et al. 2003); therefore, the increase in trehalose concentration—or T6P—during leaf infection might be involved in the starch accumulation observed. Few studies have reported a trehalose accumulation in plant organs infected by pathogens (Fernandez et al. 2010). In *Arabidopsis*, trehalose activates the expression of genes encoding a defense-related transcription factor and a PR protein (Schlupepmann et al. 2004). In wheat, it confers a protection against the necrotrophic agent *Blumeria graminis*, associated with papilla deposition, H₂O₂ production, and an increase in phenylalanine ammonia lyase and peroxidase activities (Reignault et al. 2001; Renard-Merlier et al. 2007). It could also act as a virulence factor in some interactions such as *Arabidopsis thaliana*–*Plasmodiophora brassicae* (Brodmann et al. 2002). In this case, a trehalase activity was also detected and supposed to be produced by the plant to counteract trehalose accumulation. In our pathosystem, it is unclear whether trehalose is produced by the plant or by the oomycete. Its accumulation was correlated to increasing trehalase gene expression and enzyme activity. The accumulated trehalose might be degraded by the plant as a regulation process or by the pathogen for nutrition.

Starch and sugar metabolic pathways are known to be regulated by the circadian rhythm (Graf et al. 2010; Lu et al. 2005; Smith and Stitt 2007; Smith et al. 2004; Zeeman et al. 2007); therefore, we have studied the gene expression and

enzyme activities in both darkness and light. In our conditions, the day and night regulation of gene expression was visible in control samples and was maintained in infected leaves. However, it is not visible on the graphs because data of infected leaves were related to the corresponding values of control leaves. For enzymatic activities, only β -amylase showed a circadian regulation in control leaves. As previously described, the diurnal regulation of gene expression does not always directly impact the protein level, underlining the importance of post-translational regulation (Lu et al. 2005; Smith et al. 2004).

We have observed a repression of the expression of genes encoding chlorophyll synthase, chlorophyll a/b binding protein, and Rubisco and an induction of chlorophyllase gene expression in infected leaves. This was associated with a decrease of the leaf chlorophyll content. Moreover, measurement of chlorophyll fluorescence indicated a reduction of the Fv/Fm associated with an increase in the q_N values in the oil spots, whereas both parameters were similar in control leaves and the green area surrounding oil spots. Moriondo and associates (2005) also described a similar Fv/Fm in uninfected leaves and the green area of downy mildew-infected leaves. However, they did not determine it in oil spots. Several studies have shown that rates of photosynthesis are reduced near areas infected with pathogens (Berger et al. 2007; Chou et al. 2000; Scharte et al. 2005; Swarbrick et al. 2006; Zou et al. 2005) and can be associated with a loss of chlorophyll, as observed in leaves infected by rusts and downy and powdery mildew (Ahmad et al. 1983; Scholes et al. 1994; Wright et al. 1995). In oat leaves infected with crown rust, Scholes and Rolfe (1996) also observed reduced photosynthesis efficiency in infected area and an increase of q_N values that they associated with a high demand for ATP. In stress situations, increases in q_N values are often accompanied by photoinactivation of PSII reaction centers leading to a dissipation of excitation energy as heat rather than as photochemistry (Melis 1999). In our conditions, the repression of genes encoding the Rubisco large subunit and chlorophyll a/b binding protein may also explain the reduction of the photosynthetic efficiency. A lower rate in photosynthesis is associated with an increase in invertase activity, a hexose accumulation, and a downregulation of photosynthetic gene expression. These events reflect a source to sink transition in carbohydrate production and partitioning within host tissues as described before for compatible interactions (Abood and Lösel 2003; Chou et al. 2000; Hall and Williams 2000; Scholes et al. 1994; Swarbrick et al. 2006; Tang et al. 1996).

In conclusion, in *Plasmopara viticola*-infected leaves, we have described, for the first time, an abnormal starch accumulation associated with an increase of starch synthesis (increase in AGPase activity) and modifications in the starch-degradation pathway (increase in α -amylase activity and decrease in β -amylase activity). These events occur together with a source-to-sink transition marked by an increase in hexose levels and invertase activity and a reduction of photosynthetic capacity. Altogether, these results highlight a dramatic alteration of carbohydrate metabolism. All these modifications occurred at the end of infection when the leaves were highly colonized and may be associated with the presporulation stage. The originality of this study remains in the identification of key events from gene expression toward the sugar dynamic.

MATERIALS AND METHODS

Biological material.

Grapevine (*Vitis vinifera* L. 'Marselan') herbaceous cuttings

were grown as previously described (Allègre et al. 2007) in a greenhouse at 25 ± 4 and $18 \pm 7^\circ\text{C}$ (day and night, respectively).

The *P. viticola* strain was maintained on Marselan plants and inoculation was performed as previously described (Allègre et al. 2009). Briefly, the lower side of leaves was sprayed with a suspension of 10^4 sporangia/ml in distilled water, incubated overnight at a relative humidity of 100%, and placed in the conditions described above. For mock inoculation used as a control, the leaf lower surface was sprayed with water and the plants placed in the conditions described above.

For all experiments, the third and fourth (from the shoot base) leaves of control and inoculated plants were harvested at the end of the dark period or after 10 h of light. For mRNA, DNA, soluble sugar, total protein and starch extractions, and aniline blue staining, leaves were collected at 1, 3, 5, and 7 dpi and immediately frozen in liquid nitrogen. For the other experiments, samples were collected at 6 or 7 dpi. Six plants were used per treatment and time point and three biological repetitions were performed.

Visualization of pathogen development.

Leaf discs (7 mm) from infected and control plants were harvested at 1, 3, 5, and 7 dpi and *P. viticola* was visualized using blue aniline staining as previously described (Trouvelot et al. 2008).

Transmission electron microscopy.

Samples were prepared and examined as previously described (Trouvelot et al. 2008). For each leaf, sections were cut in three different zones along the leaf fragment. At least 60 sections were observed per zone.

Leaf starch staining by lugol.

Leaves were clarified in absolute ethanol (10 min at 90°C), rinsed in water, incubated for 10 min in diluted lugol solution (1:16 [vol/vol]) (Sigma-Aldrich, St Louis), rinsed twice, and photographed immediately.

Starch extraction and quantification.

Starch was extracted and quantified from 500 mg of leaves according to Smith and Zeeman (2006).

NMR spectrometry.

Perchloric acid extracts were prepared using 5 g of leaves according to the method described by Aubert and associates (1996) and NMR spectrometry was performed as described by Jobic and associates (2007).

HPAEC-PAD analysis of soluble sugars.

Samples were ground in liquid nitrogen and lyophilized. The powder (50 mg) was treated by 1 ml of 80% ethanol (30 min, 80°C) in an ultrasonic bath. After centrifugation (10 min, $15,000 \times g$), 10 μl of supernatant was injected on an ICS 3000 Dionex instrument (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, U.S.A.). The sugar contents were determined by HPAEC-PAD using a guard and analytical column CarboPac PA100 (Dionex P/N043055), according to Dionex instructions (Dionex Application Note 122 [2004]).

Total protein extraction and enzyme activities.

Proteins were extracted as described by Dancer and associates (1990). The protein concentration of the extracts was estimated according to the method of Bradford (1976). Invertase activities of soluble and insoluble fractions were assayed as described by Dancer and associates (1990). Trehalase activity of the soluble fraction was quantified

according to Brodmann and associates (2002).

Chloroplast protein extraction.

Chloroplast proteins were extracted from enriched chloroplast fractions according to a protocol modified from Elias and Givan (1978) and Triboush and associates (1998). Leaves (10 g) were ground with sand, added by 100 ml of extraction buffer (50 mM HEPES-KOH [pH 8.0], 330 mM sorbitol, 5 mM ascorbic acid, 5 mM cysteine, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, and 2.5% [wt/vol] polyvinyl-pyrrolidone), filtered through two layers of cloth (mesh size 35 μ m), and centrifuged (200 \times g, 20 min, 4°C). The supernatant was transferred to a new tube and centrifuged (6,000 \times g, 25 min, 4°C). The pellet was washed with 1 vol of washing buffer (50 mM HEPES-KOH [pH 8.0], 330 mM sorbitol, 2 mM EDTA, and 1 mM PMSF), resuspended in 1 vol of protein buffer (10 mM HEPES-KOH [pH 8.0], 5 mM MgCl₂, and 1 mM PMSF), incubated on ice for 10 min, and centrifuged (10,000 \times g, 25 min, 4°C). Proteins of the supernatant were concentrated using Microcon spin columns (cut-off 30 kDa; Millipore, Bedford, MA, U.S.A. [Query #2]). The protein concentration of the samples was estimated according to the method of Bradford (1976).

Ceralpha and Betamyl-3 kits (Megazyme, Wicklow, Ireland) were used to determine α - and β -amylase activities in chloroplast protein extracts diluted in the kit's extraction buffer (1:10 [vol/vol]). The release of *p*-nitrophenol from the specific substrates was quantified according to the manufacturer's instructions. The AGPase activity in the pyrophosphorolysis direction was assessed as previously described (Tiessen et al. 2002).

RNA extraction.

Total RNA was extracted from 500 mg of ground leaves as described by Reid and associates (2006). DNA contaminations were removed with the DNase 1-Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of RNA extracts were determined by spectrophotometry. For microarray analysis, the quality was verified using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.).

Total RNA (4 μ g) was used to synthesize the first-strand cDNA using the SuperScript III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) with a 1:1 mixture of Oligo-dT and random hexamer primers following the kit's technical notice.

Microarray analysis.

The microarray analysis was performed at the University of Verona (Italy) on a NimbleGen *V. vinifera* chip (Roche NimbleGen, Madison, WI, U.S.A.). This array was based on the 12X grapevine genome assembly produced by the French-Italian consortium. In all, 29,582 transcripts were analyzed with four probes per transcript (one replicate per probe). RNA samples for hybridization were extracted from control or infected leaves (7 dpi, end of the dark period), as described above, including three independent biological replicates. cDNA labeled with Cyanine 3 (Cy3) was produced from total RNA (1 μ g) and hybridized as indicated in the NimbleGen array user guide. The array was scanned using the Axon GenePix 4400A Microarray scanner (Molecular Devices, Menlo Park, CA, U.S.A. [Query #2]) and images were analyzed using the NimbleScan software (Roche NimbleGen). Fluorescence data were extracted using the robust multi-array algorithm with quantile normalization (Supplementary Table S2).

Student's *t* test and statistical analysis of microarrays

method (two-class unpaired test) (Tusher et al. 2001) were used to identify differentially expressed genes (fold change < 0.5 [repressed] or > 2 [induced]; *P* < 0.05; false discovery rate < 5%).

Primer design and validation.

Primer pairs were designed (Supplementary Table S3) using PerlPrimer software (Marshall 2004) and the sequence data of *V. vinifera* 'Pinot noir' (Jaillon et al. 2007) provided by the Genoscope Grape Genome Browser. All primers were examined for their target specificity by end-point PCR and the products sequenced by the Sanger method (Genoscreen, Lille, France [Query #2]).

qRT-PCR.

The ABsolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific, Sugarland, TX, U.S.A. [Query #2]) was used with a final primer concentration of 500 nM and 5 ng of total cDNA. The thermal cycling profile was: 95°C for 15 min and 45 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s (LightCycler480; Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Each real-time assay was tested in a dissociation protocol to ensure that the amplicon was a single product. Amplification efficiency for each sample was calculated from the fluorescence raw data with the LinRegPCR program (Ruijter et al. 2009).

Samples were treated in technical triplicates and the mean values of cycle threshold (Ct) and efficiency were used for further analysis. *VATP16* and *60SRP (L18e)* were used as internal control genes (Gamm et al. 2011). Fold change in RNA expression was estimated using Ct by the $\Delta\Delta$ Ct method (Livak and Schmittgen 2001).

Pathogen quantification.

Pathogen quantification was performed as described before (Silvar et al. 2005; Valsesia et al. 2005). DNA was extracted from control and infected leaves and *P. viticola* sporangia according to Porebski and associates (1997). DNA (100 ng) was used in a qRT-PCR mix with the ABsolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific), applying a final primer concentration of 500 nM. Pathogen and plant DNA contents were quantified using a *P. viticola* actin primer and a *V. vinifera HT5* primer pair (Hayes et al. 2010; Schmidlin et al. 2008), respectively. The thermal cycling profile using a LightCycler480 (Roche Applied Science) was as described above.

Chlorophyll analysis.

The leaf chlorophyll a fluorescence was quantified on attached leaves using an IMAGING-PAM Chlorophyll Fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany). Measurements were performed on the central parts of the leaf adaxial side after preconditioning in the dark. From these measurements, several fluorescence parameters were calculated according to Schreiber and associates (1986) and Genty and associates (1989): Φ_{PSII} and Fv/Fm. Φ_{PSII} represents the number of electrons transported by a PSII reaction center per mole of quanta absorbed by PSII and Fv/Fm is the ratio of variable to maximal fluorescence. In addition, both q_P and q_N were calculated according to van Kooten and Snel (1990). On each image, the values of the selected fluorescence parameters were averaged. Images of Φ_{PSII} were displayed with the help of a false color code ranging from 0.000 (black) to 1.000 (pink).

For chlorophyll quantification, 3 g of leaves was ground in a mortar with sand and calcium carbonate and extracted with 20 ml of 95% methanol. The sample was filtered and analyzed by spectrometry at 645 and 663 nm (Hitachi U-2001

spectrophotometer, Hitachi Scientific Instruments, Mountain View, CA, U.S.A. [Query #2]), and the levels of chlorophylls were determined according to Wellburn and Lichtenthaler (1984).

Statistical analysis.

Data obtained for pathogen, carbohydrate, and chlorophyll quantification; enzyme activities; and chlorophyll fluorescence measurement were analyzed by one-way analysis of variance and means were compared using Fisher's least significant difference test to detect significant differences ($P < 0.05$) between treatments. All analyses were performed with the statistical program STATGRAPHICS (release 5.1; Manugistic, Inc., Rockville, MD, U.S.A.).

ACKNOWLEDGMENTS

This work received the financial support of the Conseil Régional de Bourgogne, Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB), and Bureau Interprofessionnel des Vins de Champagne (CIVC). We thank O. Fernandez (University of Reims, France), N. Sicard (IUT Dijon, France), A. Ferrarini (University of Verona, Italy), G. Aubert, and M. Sanchez (INRA Dijon, France) for technical support.

LITERATURE CITED

- Aboud, J. K., and Losel, D. M. 2003. Changes in carbohydrate composition of cucumber leaves during the development of powdery mildew infection. *Plant Pathol.* 52:256-265.
- Ahmad, I., Farrar, J. F., and Whitbread, R. 1983. Photosynthesis and chloroplast functioning in leaves of barley infected with brown rust. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 23:411-419.
- Allègre, M., Daire, X., Héloir, M. C., Trouvelot, S., Mercier, L., Adrian, M., and Pugin, A. 2007. Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *New Phytol.* 173:832-840.
- Allègre, M., Héloir, M. C., Trouvelot, S., Daire, X., Pugin, A., Wendehenne, D., and Adrian, M. 2009. Are grapevine stomata involved in the elicitor-induced protection against downy mildew? *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:977-986.
- Asatsuma, S., Sawada, C., Itoh, K., Okito, M., Kitajima, A., and Mitsui, T. 2005. Involvement of α -amylase I-1 in starch degradation in rice chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 46:858-869.
- Aubert, S., Gout, E., Bligny, R., Marty-Mazars, D., Barrieu, F., Alabouvette, J., Marty, F., and Douce, R. 1996. Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: Control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *J. Cell Biol.* 133:1251-1263.
- Avigad, G. 1982. Sucrose and disaccharides. Pages 217-347 in: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, 13A. F. A. Lowus and D. Tanner, eds. Springer Verlag, Berlin.
- Benhamou, N., Grenier, J., and Chrispeels, M. J. 1991. Accumulation of beta-fructosidase in the cell walls of tomato roots following infection by a fungal wilt pathogen. *Plant Physiol.* 97:739-750.
- Berger, S., Sinha, A. K., and Roitsch, T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: Plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* 58:4019-4026.
- Bolton, M. D. 2009. Primary metabolism and plant defense: Fuel for the fire. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:487-497.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brem, S., Rast, D. M., and Ruffner, H. P. 1986. Partitioning of photosynthate in leaves of *Vitis vinifera* infected with *Uncinula necator* or *Plasmopara viticola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29:285-291.
- Brodmann, D., Schuller, A., Ludwig-Müller, J., Aeschbacher, R. A., Wiemken, A., Boller, T., and Wingler, A. 2002. Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with the trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:693-700.
- Chou, H. M., Bundock, N., Rolfe, S. A., and Scholes, J. D. 2000. Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol. Plant Pathol.* 1:99-113.
- Dai, G. H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., and Boubals, D. 1995. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46:177-188.
- Dancer, J., Hatzfeld, W. D., and Stitt, M. 1990. Cytosolic cycles regulate the turnover of sucrose in heterotrophic cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Planta* 182:223-231.
- Diez-Navajas, A. M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Greif, C., and Merdinoglu, D. 2008. Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. *Phytopathology* 98:776-780.
- Doyle, E. A., Lane, A. M., Sides, J. M., and Mudgett, M. B. 2007. An α -amylase (At4g25000) in *Arabidopsis* leaves is secreted and induced by biotic and abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 30:388-398.
- Elias, B. A., and Givan, C. V. 1978. Density gradient and differential centrifugation methods for chloroplast purification and enzyme localization in leaf tissue. *Planta* 142:317-320.
- Fernandez, O., Béthencourt, L., Quero, A., Sangwan, R. S., and Clément, C. 2010. Trehalose and plant stress responses: Friend or foe? *Trends Plant Sci.* 15:409-417.
- Fernie, A. R., Roessner, U., and Geigenberger, P. 2001. The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. *Plant Physiol.* 125:1967-1977.
- Fotopoulos, V., Gilbert, M. J., Pittman, J. K., Marvier, A. C., Buchanon, A. J., Sauer, N., Hall, J. L., and Williams, L. E. 2003. The monosaccharide transporter gene, *AtSTP4*, and the cell-wall invertase, *Atbetafruct1*, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 132:821-829.
- Fritzuis, T., Aeschbacher, R., Wiemken, A., and Wingler, A. 2001. Induction of *ApL3* expression by trehalose complements the starch-deficient *Arabidopsis* mutant *adg2-1* lacking *ApL1*, the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 124:105-114.
- Gamm, M., Héloir, M. C., Kelloniemi, J., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Adrian, M. 2011. Identification of reference genes suitable for qRT-PCR in grapevine and application for the study of the expression of genes involved in pterostilbene synthesis. *Mol. Genet. Genomics* 285:273-285.
- Genty, B., Briantais, J. M., and Baker, N. R. 1989. The relationships between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990:87-92.
- Gibon, Y., Blaessing, O. E., Hannemann, J., Carillo, P., Höhne, M., Hendriks, J. H. M., Palacios, N., Cross, J., Selbig, J., and Stitt, M. 2004. A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: Comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* 16:3304-3325.
- Gibson, S. I. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:93-102.
- Goddijn, O. J., and Smeekens, S. 1998. Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant J.* 14:143-146.
- Goddijn, O. J., Verwoerd, T. C., Voogd, E., Krutwagen, R. W., De Graaf, P. T., van Dun, K., Poels, J., Ponstein, A. S., Damm, B., and Pen, J. 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol.* 113:181-190.
- Godt, D. E., and Roitsch, T. 1997. Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiol.* 115:273-282.
- Graf, A., Schlereth, A., Stitt, M., and Smith, A. M. 2010. Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:9458-9463.
- Hall, J. L., and Williams, L. E. 2000. Assimilate transport and partitioning in fungal biotrophic interactions. *Aust. J. Plant Physiol.* 27:549-560.
- Hayes, M. A., Feechan, A., and Dry, I. B. 2010. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (*VvHT5*) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiol.* 153:211-221.
- Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H. P., Hajirezaei, M., and Sonnewald, U. 2000. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of *Potato virus Y* with tobacco. *Mol. Plant Pathol.* 1:51-59.
- Horst, R. J., Engelsdorf, T., Sonnewald, U., and Voll, L. M. 2008. Infection of maize leaves with *Ustilago maydis* prevents establishment of C4 photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 165:19-28.
- Hsiao, C. C., Fu, R. H., and Sung, H. Y. 2002. A novel bound form of plant invertase in rice suspension cells. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43:115-122.
- Jaillon, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisey, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Huguency, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E.,

- Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrini, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lechary, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pè, M. E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A. F., Weissenbach, J., Quétier, F., and Wincker, P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463-467.
- Ji, X., Gai, Y., Zheng, C., and Mu, Z. 2009. Comparative proteomic analysis provides new insights into mulberry dwarf responses in mulberry (*Morus alba* L.). *Proteomics* 9:5328-5339.
- Jobic, C., Boisson, A. M., Gout, E., Rasclé, C., Fèvre, M., Cotton, P., and Bligny, R. 2007. Metabolic processes and carbon nutrient exchanges between host and pathogen sustain the disease development during sunflower infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Planta* 226:251-265.
- Judelson, H. S., Tani, S., and Narayan, R. D. 2009. Metabolic adaptation of *Phytophthora infestans* during growth on leaves, tubers and artificial media. *Mol. Plant Pathol.* 10:843-855.
- Kim, J. S., Sagaram, U. S., Burns, J. K., Li, J. L., and Wang, N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection: Microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99:50-57.
- Koch, K. 2004. Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:235-246.
- Kolbe, A., Tiessen, A., Schluepmann, H., Paul, M., Ulrich, S., and Geigenberger, P. 2005. Trehalose-6-phosphate regulates starch synthesis via post-translational redox-activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:11118-11123.
- Kötting, O., Pusch, K., Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M., and Ritte, G. 2005. Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 137:242-252.
- Krapp, A., Hofmann, B., Schafer, C., and Stitt, M. 1993. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: A mechanism for the sink regulation of photosynthesis. *Plant J.* 3:817-828.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402-408.
- Lloyd, J. R., Kossmann, J., and Ritte, G. 2005. Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci.* 10:130-137.
- Lu, Y., Gehan, J. P., and Sharkey, T. 2005. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol.* 138:2280-2291.
- Lunn, J. E., Feil, R. J., Hendriks, J., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Scheible, W. R., Carillo, R., Hajirezaei, M. R., and Stitt, M. 2006. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 397:139-148.
- Marshall, O. J. 2004. PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20:2471-2472.
- Melis, A. 1999. Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: What modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci.* 4:130-135.
- Moriando, M., Orlandini, S., Giuntoli, A., and Bindi, M. 2005. The effect of downy mildew and powdery mildew on grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf gas exchange. *J. Phytopathol.* 153:350-357.
- Müller, J., Boller, T., and Wiemken, A. 1998. Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* L. Merr.) roots. *J. Plant Physiol.* 153:255-257.
- Paul, M. J. 2007. Trehalose 6-phosphate. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:303-309.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhureea, D., and Zhang, Y. 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:417-441.
- Porebski, S., Grant Bailey, L., and Baum, B. R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:8-15.
- Ramon, M., Rolland, F., Thevelein, J. M., Van Dijck, P., and Leyman, B. 2007. ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Mol. Biol.* 63:195-206.
- Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., and Lund, S. T. 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* 6:e27.
- Reignault, P., Cogan, A., Muchembled, J., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Durand, R., and Sancholle, M. 2001. Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytol.* 149:519-529.
- Renard-Merlier, D., Randoux, B., Nowak, E., Farcy, F., Durand, R., and Reignault, P. 2007. Iodur 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry* 68:1156-1164.
- Ritte, G., Lloyd, J. R., Eckermann, N., Rottmann, A., Kossmann, J., and Steup, M. 2002. The starch-related protein R1 is an α -glucan, water dikinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:7166-7171.
- Ritte, G., Scharf, A., Eckermann, N., Haebel, S., and Steup, M. 2004. Phosphorylation of transitory starch is increased during degradation. *Plant Physiol.* 135:2068-2077.
- Rodríguez, M., Taleisnik, E., Lenardon, S., and Lascano, R. 2010. Are Sunflower chlorotic mottle virus infection symptoms modulated by early increases in leaf sugar concentration? *J. Plant Physiol.* 167:1137-1144.
- Roitsch, T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:198-206.
- Roitsch, T., Bittner, M., and Godt, D. E. 1995. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol.* 108:285-294.
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., and Sinha, A. K. 2003. Extracellular invertase: Key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.* 54:513-524.
- Rolland, F., Moore, B., and Sheen, J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14:185-205.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:675-709.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J., and Moorman, A. F. 2009. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37:45.
- Ruiz, E., and Ruffner, H. P. 2002. Immunodetection of *Botrytis*-specific invertase in infected grapes. *J. Phytopathol.* 150:76-85.
- Scharte, J., Schön, H., and Weis, E. 2005. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Cell Environ.* 28:1421-1435.
- Scheidig, A., Fröhlich, A., Schulze, S., Lloyd, J. R., and Kossmann, J. 2002. Downregulation of a chloroplast-targeted beta-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J.* 30:581-591.
- Schluepmann, H., Pellny, T. I., van Dijken, A., Smeekens, S., and Paul, M. 2003. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:6849-6854.
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M., and Smeekens, S. 2004. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol.* 135:879-890.
- Schmidlin, L., Poutaraud, A., Claudel, P., Mestre, P., Prado, E., Santos-Rosa, M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Karst, F., Merdinoglu, D., and Huguency, P. 2008. A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiol.* 148:1630-1639.
- Scholes, J. D., and Rolfe, S. A. 1996. Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199:573-582.
- Scholes, J. D., Lee, P. J., Horton, P., and Lewis, D. H. 1994. Invertase: Understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytol.* 126:213-222.
- Schreiber, U., Schliwa, U., and Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10:51-62.
- Sheen, J., Zhou, L., and Jang, J. C. 1999. Sugars as signaling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:410-418.
- Silvar, C., Díaz, J., and Merino, F. 2005. Real-time polymerase chain reaction quantification of *Phytophthora capsici* in different pepper genotypes. *Phytopathology* 95:1423-1429.
- Sinha, A. K., Römer, U., Köckenberger, W., Hofmann, M., Elling, L., and Roitsch, T. 2002. Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiol.* 128:1480-1489.
- Smeekens, S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:49-81.
- Smith, A. M., and Stitt, M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ.* 30:1126-1149.
- Smith, A. M., and Zeeman, S. C. 2006. Quantification of starch in plant

- tissues. Nat. Protocol 1:1342-1345.
- Smith, S. M., Fulton, D. C., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, S. C., and Smith, A. 2004. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. Plant Physiol. 136:2687-2699.
- Smith, A. M., Zeeman, S. C., and Smith, S. M. 2005. Starch degradation. Annu. Rev. Plant Biol. 56:73-97.
- Storr, T., and Hall, J. L. 1992. The effect of infection by *Erysiphe pisi* DC on acid and alkaline invertase activities and aspects of starch biochemistry in leaves of *Pisum sativum* L. New Phytol. 121:535-543.
- Sturm, A. 1999. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. Plant Physiol. 121:1-8.
- Sturm, A., and Chrispeels, M. J. 1990. cDNA cloning of carrot extracellular beta-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. Plant Cell 2:1107-1119.
- Sutton, P. N., Gilbert, M. J., Williams, L. E., and Hall, J. L. 2007. Powdery mildew infection of wheat leaves changes host solute transport and invertase activity. Physiol. Plant. 129:787-795.
- Swarbrick, P. J., Schulze-Lefert, P., and Scholes, J. D. 2006. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. Plant Cell Environ. 29:1061-1076.
- Tang, X., Rolfe, S. A., and Scholes, J. D. 1996. The effect of *Albugo candida* (white blister rust) on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of leaves of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ. 19:967-975.
- Tiessen, A., Hendriks, J. H. M., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farré, E. M., and Geigenberger, P. 2002. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. Plant Cell 14:2191-2213.
- Triboush, S. O., Danilenko, N. G., and Davydenko, O. G. 1998. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. Plant Mol. Biol. Rep. 16:183-189.
- Trouvelot, S., Varnier, A., Allègre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J., Pugin, A., and Daire, X. 2008. A beta-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. Mol. Plant-Microbe Interact. 21:232-243.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:5116-5121.
- Valsesia, G., Gobbin, D., Patocchi, A., Vecchione, A., Pertot, I., and Gessler, C. 2005. Development of a high-throughput method for quantification of *Plasmopara viticola* DNA in grapevine leaves by means of quantitative real-time polymerase chain reaction. Phytopathology 95:672-678.
- van Kooten, O., and Snel, J. F. H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. Photosynth. Res. 25:147-150.
- Voegelé, R. T., Wirsal, S., Moll, U., Lechner, M., and Mendgen, K. 2006. Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. Mol. Plant-Microbe Interact. 19:625-634.
- Wellburn, A. R., and Lichtenthaler, H. 1984. Formulae and program to determine carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. Pages 9-12 in: Advances in Photosynthesis Research, Vol. 2. C. Sybesma, ed. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- Wingler, A., Fritzius, T., Wiemken, A., Boller, T., and Aeschbacher, R. A. 2000. Trehalose induces the ADP-Glucose Pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 124:105-114.
- Wright, D. P., Baldwin, B. C., Shephard, M. C., and Scholes, J. D. 1995. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. I. Alterations in carbohydrate metabolism. Physiol. Mol. Plant Pathol. 47:237-253.
- Yu, T. S., Zeeman, S. C., Thorneycroft, D., Fulton, D. C., Dunstan, H., Lu, W. L., Hegemann, B., Tung, S. H., Umemoto, T., Chapple, A., Tsai, D. L., Wang, S. M., Smith, A. M., Chen, J., and Smith, S. M. 2005. Alpha-amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves. J. Biol. Chem. 280:9773-9779.
- Zeeman, S. C., Smith, S. M., and Smith, A. M. 2007. The diurnal metabolism of leaf starch. Biochem. J. 401:13-28.
- Zou, J., Rodriguez-Zas, S., Aldea, M., Li, M., Zhu, J., Gonzales, D. O., Vodkin, L. O., DeLucia, E., and Clough, S. J. 2005. Expression

profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:1161-1174.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCES

- Genoscope Grape Genome browser:
www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis
- Genoscope Vitis vinifera webpage: www.cns.fr/spip/Vitis-vinifera-e.html
- NimbleGen website :
www.nimblegen.com/products/exp/custom.html#vitus
- NimbleGen user guide:
www.nimblegen.com/products/lit/expression_userguide_v5p0.pdf

MPMI 02-11-0040.TP1 Gamm, galley 1

Table 1. Transcriptional changes for genes involved in carbohydrate metabolism and photosynthesis associated to *Plasmopara viticola* infection

NCBI reference sequence	Annotation	Ratio of gene expression	P value
XM_002277244.1	PSI type II chlorophyll a/b-binding protein	0.20	0.045
XM_002285596.1	α,α -Trehalose-phosphate synthase	0.23	0.015
XM_002271362.1	Sucrose-phosphate synthase	0.25	0.017
AM424156.2	Phosphoglucan, water dikinase	0.25	0.050
XM_002267433.1	Ribulose-1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, chloroplastic	0.31	0.027
XM_002281033.1	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase (large subunit 1) (AGPase)	0.32	0.032
XM_002277336.1	Soluble starch synthase	0.32	0.032
XM_002263235.1	Chlorophyll synthase, chloroplastic	0.46	0.027
XM_002265662.1	β -Amylase	0.47	0.027
XM_002263662.1	Trehalase	2.89	0.019
XM_002279752.1	β -Bructofuranosidase (invertase)	3.02	0.039
XM_002271938.1	Chlorophyllase-1	9.98	0.009
XM_002282148.1	α -Amylase	13.53	0.044

^a NCBI = National Center for Biotechnology Information.

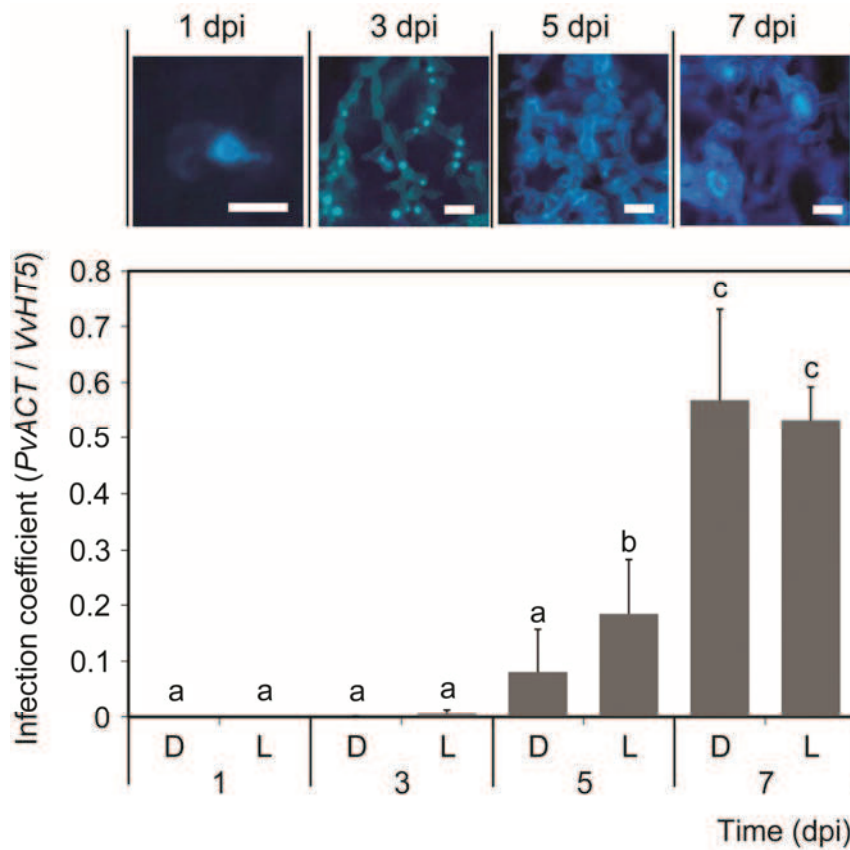


Fig. 1. Monitoring of *Plasmopara viticola* development in *Vitis vinifera* 'Marselan' leaves by UV epifluorescence after aniline blue staining and DNA quantification at different times postinoculation. Images present the different stages of development. Infection coefficient representing the ratio between pathogen DNA (*PvACT*) and host DNA (*VvHT5*) quantified by real-time polymerase chain reaction. Leaf samples were collected during the light period (L) and at the end of the dark period (D) over a time course of infection (1 to 7 days postinoculation [dpi]). At 1 dpi, zoospores have reached stomata, encysted, and initiated germination. At 3 dpi, developing hyphae have formed haustoria in contact with the host mesophyll cells. At 5 dpi, the pathogen has highly colonized the host tissues and, at 7 dpi, it is present in the substomatal cavities to prepare sporulation. Scale bars correspond to 10 μ m. Images are representative of three biological replicates. Data correspond to the average of four independent biological replicates \pm standard deviation. Means with different letters (a, b, c) are significantly different ($P < 0.05$).

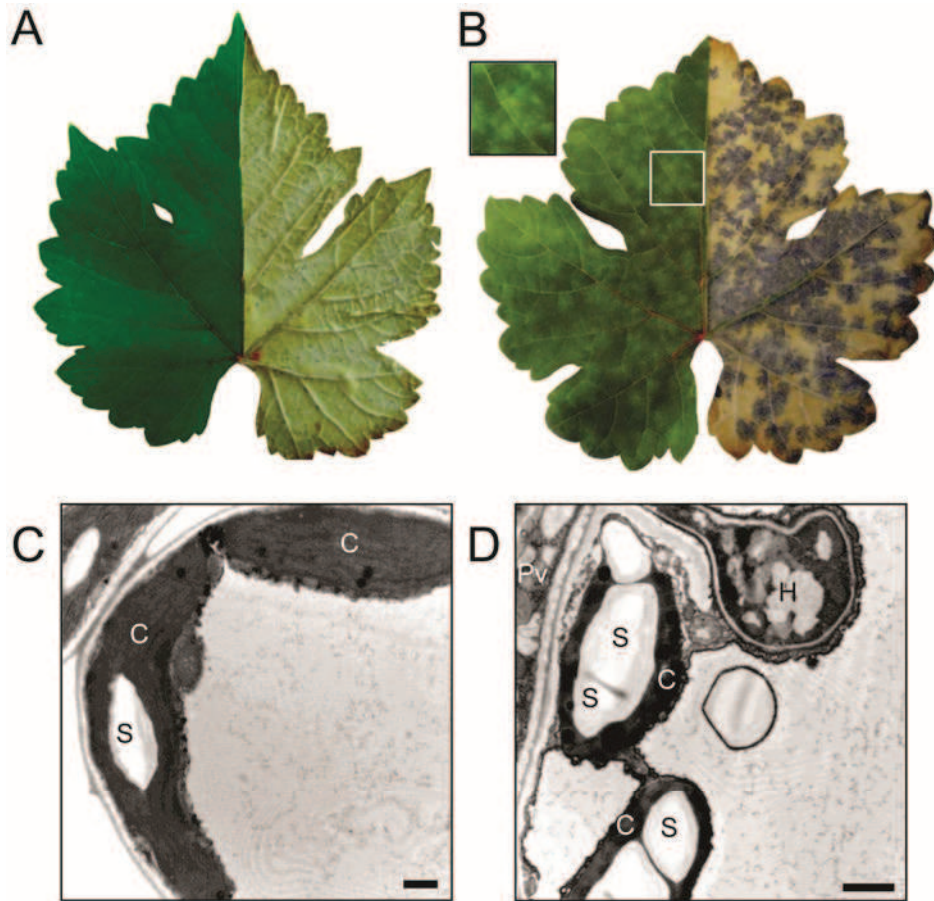


Fig. 2. Starch visualization in control and *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves at the end of the dark period. **A** and **B**, Left part of each image corresponds to a photograph of **A**, control and **B**, *P. viticola*-infected leaves at 7 days postinoculation (dpi). Right part corresponds to the same leaves after clarification and lugol staining. The inset image shows a detail of “oil-spot” symptoms. **C** and **D**, Transmission electron micrographs of spongy parenchyma cells of **C**, control and **D**, infected leaves at 7 dpi. H: haustorium, Pv: *P. viticola* hyphae, C: chloroplast, S: starch granule. Scale bar corresponds to 1 μ m.

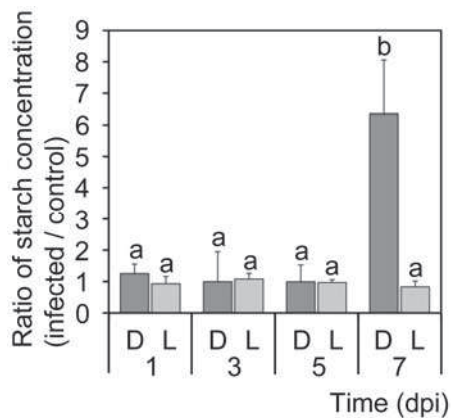


Fig. 3. Ratio of the starch content of *Plasmopara viticola*-infected versus control grapevine leaves over a time course of infection (1 to 7 days postinoculation [dpi]) in samples collected at the end of the dark period (D) or during the light period (L). Values correspond to the measurement of glucose released after enzymatic degradation of starch. Data correspond to the average of three independent biological replicates \pm standard deviation. Means with different letters (a, b) are significantly different ($P < 0.05$).

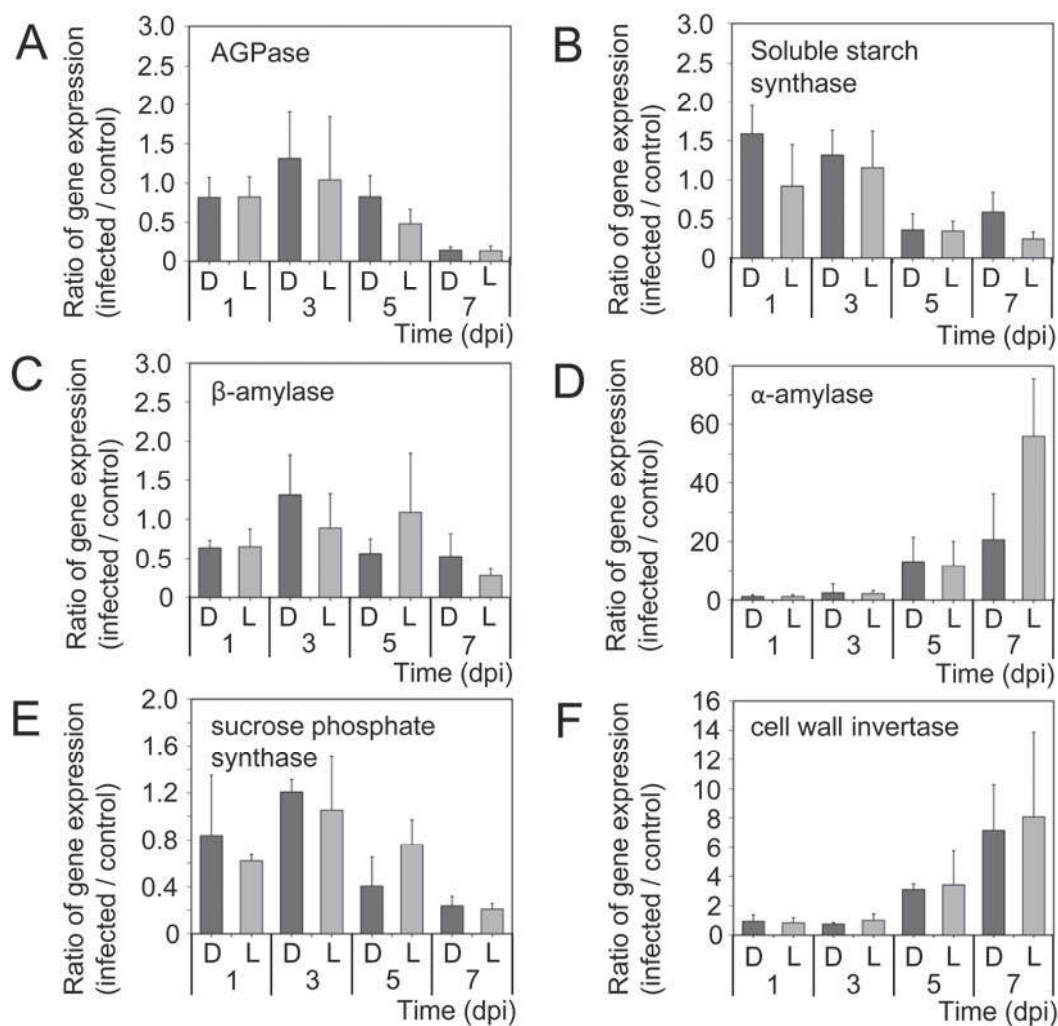


Fig. 4. Relative expression of genes encoding **A**, ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase); **B**, soluble starch synthase; **C**, β -amylase; **D**, α -amylase; **E**, sucrose phosphate synthase; and **F**, cell wall invertase analyzed by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction. Leaf samples were collected during the light period (L) and at the end of the dark period (D) during a time course of grapevine leaf infection by *Plasmopara viticola* (1 to 7 days postinoculation [dpi]). Expression levels obtained for infected leaves were normalized with respect to *VATP16* and *60SRP* expression and related to the corresponding values of control leaves. Data correspond to the average of three independent biological replicates \pm standard deviation.

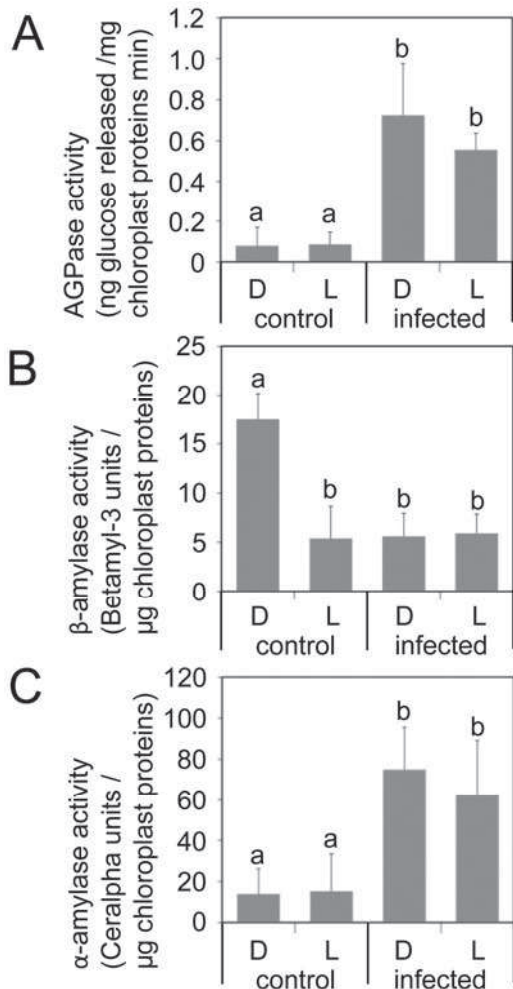


Fig. 5. Activity of **A**, ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase); **B**, β-amylase; and **C**, α-amylase in control and *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves (7 days postinoculation [dpi]). Leaves were collected during the light period (L) and at the end of the dark period (D). Data correspond to the average of three biological replicates ± standard deviation. Means with different letters (a, b) are significantly different ($P < 0.05$).

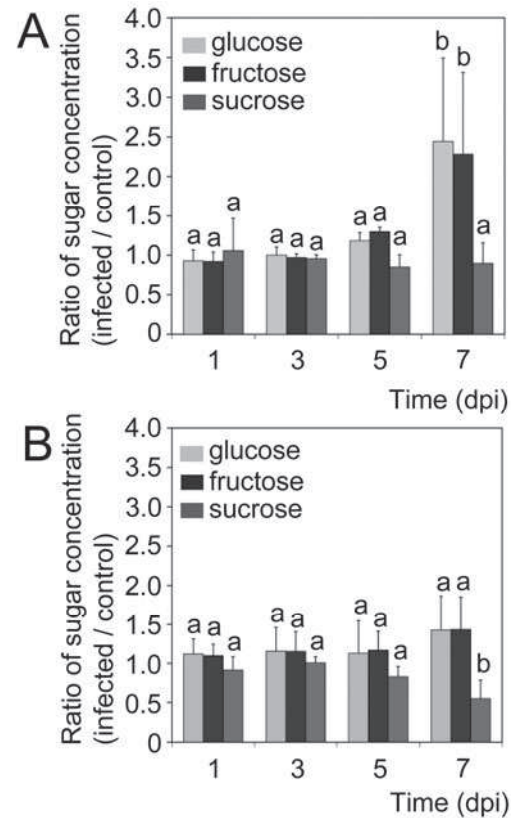


Fig. 6. Ratios of glucose, fructose, and sucrose concentrations of *Plasmopara viticola*-infected versus control grapevine leaves. Samples were collected from 1 to 7 days postinoculation (dpi) **A**, at the end of the dark period or **B**, during the light period and analyzed by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Data correspond to the average of three independent biological repeats ± standard deviation. Means with different letters (a, b) are significantly different ($P < 0.05$).

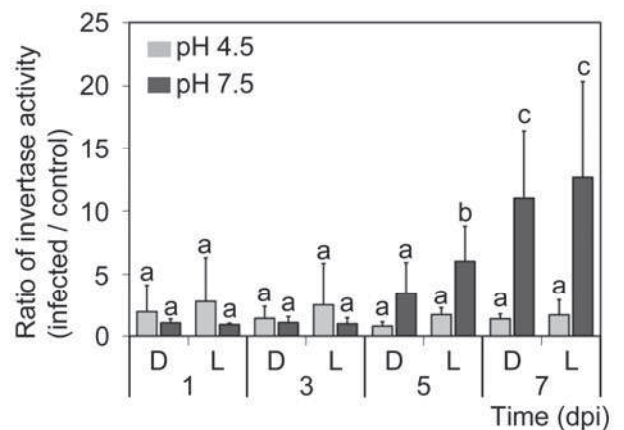


Fig. 7. Invertase activity measured at pH 4.5 and 7.5. Ratios of enzyme activity in the insoluble fraction of leaf extracts from control versus *Plasmopara viticola*-infected grapevine samples collected at the end of the dark period (D) and during the light period (L). Data correspond to the average of three independent biological replicates ± standard deviation. Means with different letters (a, b, c) are significantly different ($P < 0.05$).

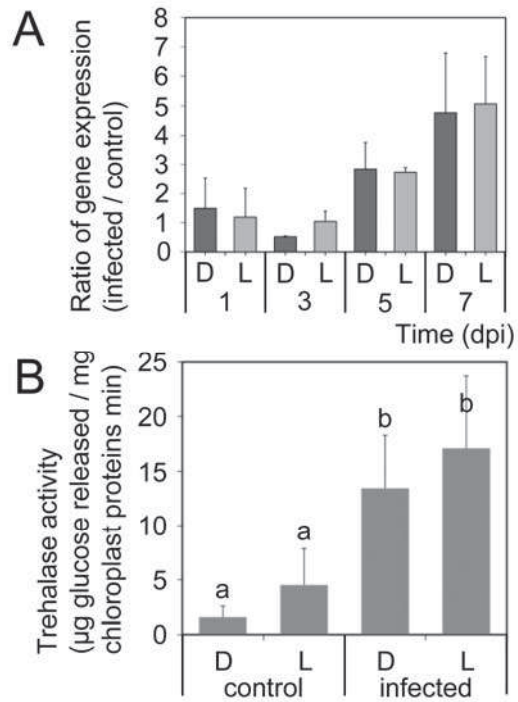


Fig. 8. A, Trehalase gene expression and **B,** enzyme activity. **A,** Expression levels obtained for infected leaves were normalized with respect to *VATP16* and *60SRP* expression and related to the corresponding values of control leaves. Samples were collected during the light period (L) or at the end of the dark period (D) during a time course of grapevine leaf infection by *Plasmopara viticola* (1 to 7 days postinoculation [dpi]). Data correspond to the average of three independent biological replicates \pm standard deviation. **B,** Quantification of the trehalase activity was performed in control and *P. viticola*-infected grapevine leaves at 7 dpi. Bars represent the average of three biological replicates \pm standard deviation. Means with different letters (a, b) are significantly different ($P < 0.05$).

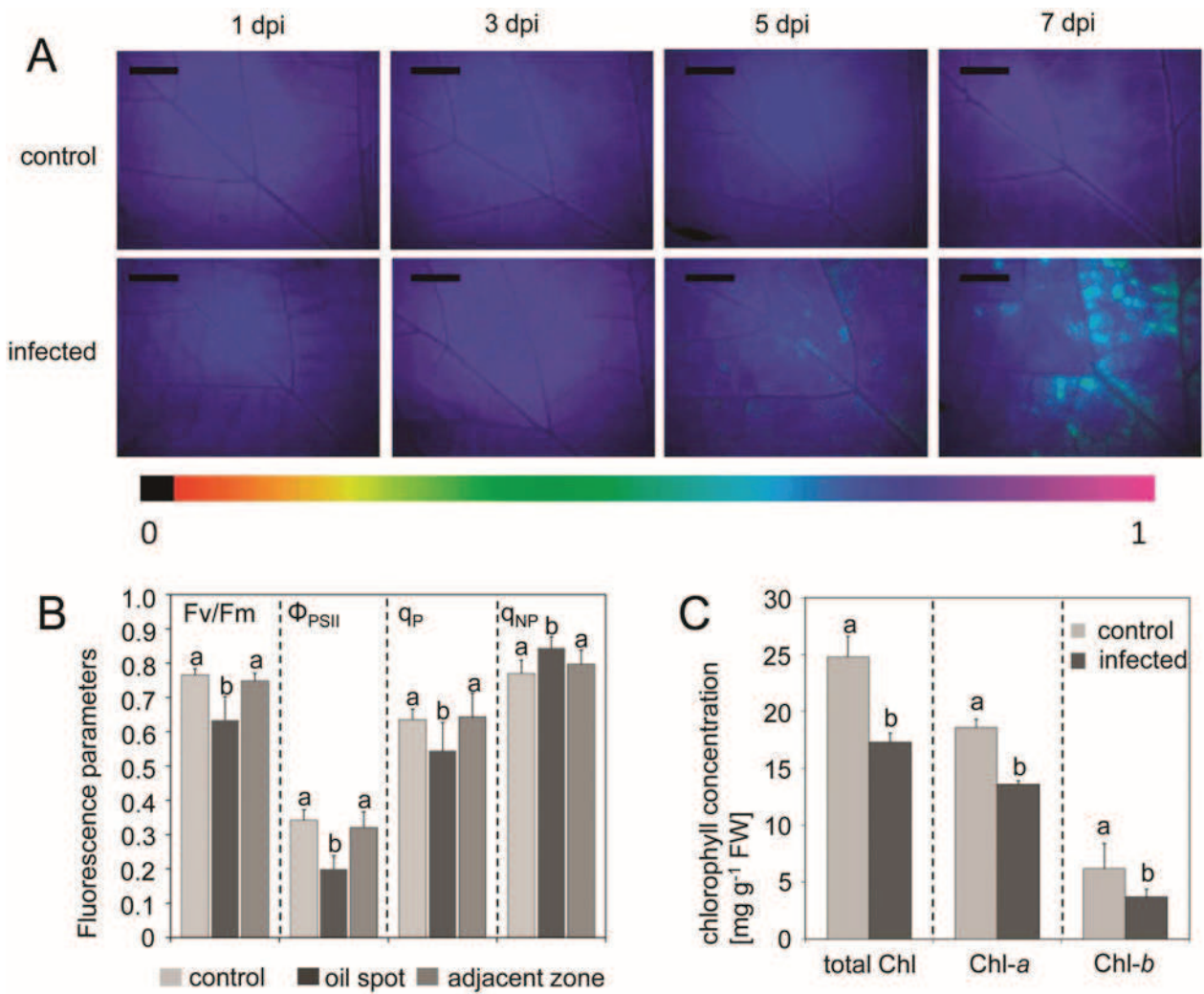


Fig. 9. Photosynthetic parameters in control and *Plasmopara viticola*-infected leaves. **A**, Imaging of the maximum efficiency of PSII (Fv/Fm); **B**, values for Fv/Fm, effective PSII quantum yield (Φ_{PSII}), and photochemical (q_P) and nonphotochemical (q_N) quenching parameters; and **C**, chlorophyll concentrations in control and *P. viticola*-infected leaves (7 days postinoculation [dpi]). **A**, Representative false-color images of control and *P. viticola*-infected leaves during the course of infection (1 to 7 dpi). Scale represents 0.5 cm. **B**, Measurements were performed in infected (oil spots and adjacent area without symptoms) and control leaves. Data correspond to the average of 35 measurements \pm standard deviation. Means with different letters (a, b) are significantly different ($P < 0.05$). **C**, Data correspond to the average of three biological replicates \pm standard deviation. Means with different letters (a, b) are significantly different ($P < 0.05$).