



Identification de deux gènes NPR1 chez les VITACEAE, analyse de leur diversité de séquences et interactions avec les facteurs de transcription VvTGA

Karine Bergeault

► To cite this version:

Karine Bergeault. Identification de deux gènes NPR1 chez les VITACEAE, analyse de leur diversité de séquences et interactions avec les facteurs de transcription VvTGA. Sciences agricoles. Université de Haute Alsace - Mulhouse, 2010. Français. NNT : 2010MULH3259 . tel-00769928

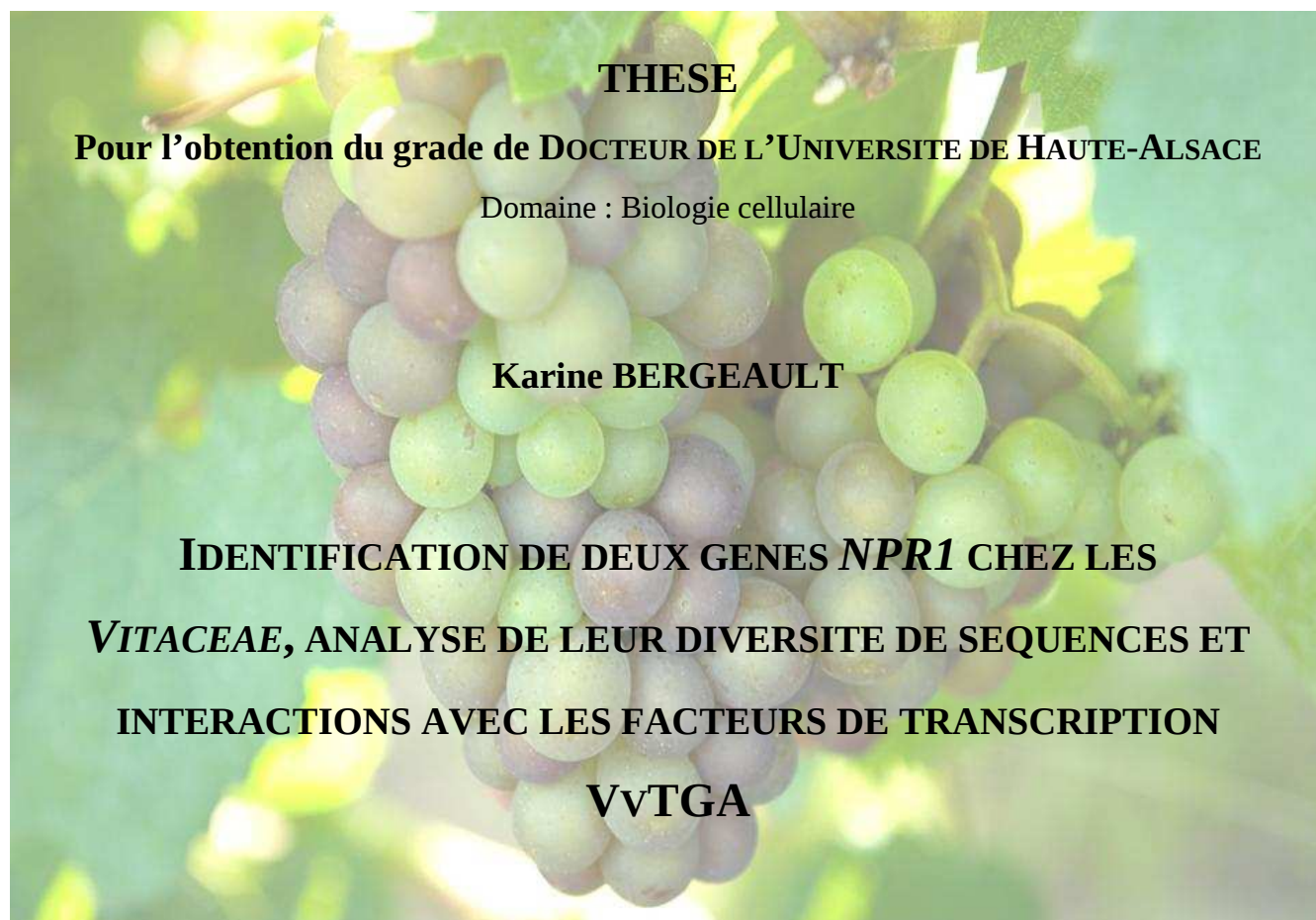
HAL Id: tel-00769928

<https://theses.hal.science/tel-00769928>

Submitted on 4 Jan 2013

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.



Soutenue publiquement le 26 novembre 2010 devant le jury composé de :

Frédérique PELSY	Chargée de recherches INRA - Colmar	Rapporteur
Patrice THIS	Directeur de recherches INRA - Montpellier	Rapporteur
Céline TARNUS	Professeur des Universités - Université de Haute-Alsace	Examineur
Didier MERDINOGLU	Directeur de recherches INRA - Colmar	Examineur
Christophe BERTSCH	Maître de conférences, HDR - Université de Haute-Alsace	Co-encadrant de thèse
Bernard WALTER	Professeur des Universités - Université de Haute-Alsace	Directeur de thèse



REMERCIEMENTS

Voici certainement les pages du manuscrit de thèse les plus difficiles à écrire. Comment exprimer avec exactitude toute la gratitude que l'on éprouve envers chaque personne ayant pris part de près ou de loin à ce projet ? La difficulté est d'en oublier le moins possible et de trouver les mots justes.

Je tiens à remercier, Bernard Walter, qui m'a accordé sa confiance en me proposant ce sujet de thèse.

Je remercie Christophe Bertsch pour m'avoir conseillée et soutenue dans mes moments de doutes et de découragements.

Je vous remercie tous les deux pour la confiance et la liberté que vous m'avez accordées tout au long de ces quatre années ainsi que pour les lectures du manuscrit.

Je remercie Frédérique Pelsy et Patrice This d'avoir accepté de prendre le temps de lire cette thèse et d'en être les rapporteurs. Je remercie Céline Tarnus et Didier Merdinoglu d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je remercie également Didier Merdinoglu pour sa collaboration pour l'article et ses idées d'expériences à la genèse de cette thèse.

Je remercie la Région Alsace pour avoir financé ce projet pendant ces trois premières années.

Je remercie Claude Le Drian pour son soutien.

Je remercie également Julie Chong pour ses compétences techniques et sa disponibilité.

Je profite de cette occasion pour remercier collectivement tous les membres du laboratoire qui ont contribué à ce travail et notamment tous ceux qui travaillent dans l'ombre et qui le font vivre. Merci plus particulièrement à Yann pour les réponses à mes questions techniques et pour la préparation des TP. Mes pensées vont également aux thésards et post doc actuels ou partis vers de nouveaux horizons, avec qui j'ai fait un petit bout de chemin et partagé de très bons moments. Merci aux personnes qui ont réussi à insuffler de la bonne humeur et de l'harmonie dans notre bureau : je pense ici à Gaëlle, Mélanie (lors de ses passages), Noémie et Montsé. Je ne peux oublier tous ces moments de détente partagés le midi et qui m'ont permis de décompresser et de bien rigoler ; ceci en grande partie grâce à Sylvain, David et Gaëlle. Merci à Hélène pour tous les lundis mélodieux qui m'ont permis de m'évader au son de la valse champêtre.

Je remercie également toutes les personnes que j'ai croisées à l'INRA de Colmar, particulièrement la bande des jeunes chercheurs du mercredi qui m'a apporté une aide ponctuelle. Merci également à Sabine, Pascale et Marie-Annick pour m'avoir fait découvrir les joies des inoculations de mildiou !

Mes remerciements vont également à Marc Lollier et Véronique Horellou qui m'ont permis de me confronter à l'enseignement à l'IUT de Colmar, en tant que vacataire. Un grand merci à Jean-Marie et Annie pour leur soutien et leur aide au moment des TP.

Je remercie également les membres du PEPS qui ont pris le relais au cours de mon ATER.

Une pensée nostalgique pour les étudiants qui ont pris ma place et auxquels je souhaite de s'épanouir.

Je souhaite enfin remercier les personnes qui me sont les plus chères, toutes les personnes de ma famille et de mon entourage qui m'ont soutenue tout au long de cette thèse.

Je remercie l'ensemble de mes amis dispersés aux quatre coins de la France, de la Touraine au Languedoc-Roussillon en passant par l'Alsace.

Je remercie également Georges Haas ainsi que Cédric et Karim pour leur aide précieuse et leur efficacité dans cette dernière ligne droite.

Je remercie Mimine et Séverine, mes amies d'enfance, pour leurs messages de soutien et de réconfort. Ce n'est pas toujours facile de vous voir mais c'est toujours un plaisir de vous retrouver.

Je remercie Laurent à qui je dois beaucoup, qui a été un soutien précieux pendant de nombreuses années et sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui.

Merci à celle qui était ma collègue et ma chef et qui est devenue aujourd'hui une amie précieuse. Elle m'a inlassablement écoutée, encouragée, soutenue et conseillée. Merci Vévaine.

Merci à mes grands-parents pour leur soutien, même si mon domaine d'étude reste un mystère pour eux. Pour répondre à la question qui les préoccupe le plus : ça y est j'ai enfin terminé mes études ! A mon grand-père, parti trop tôt, merci pour tous les bons moments partagés à tes côtés.

Merci à mon frérot et à Mimi qui sont toujours présents à mes côtés même si la distance nous sépare, je n'oublie pas ces petits rien qui font tout. Allez salut Poilu !

Merci à mes parents pour l'amour qu'ils me manifestent notamment par leur soutien constant et leurs encouragements à distance. Ils m'ont toujours laissé le choix et donné les moyens de réaliser mes rêves. Merci au final pour ce savant mélange de liberté et de présence.

Enfin, mention très spéciale pour Simon, mon ange voyageur qui a enduré de nombreuses baisses de moral et sans qui j'aurais eu beaucoup de difficultés à finir cet interminable manuscrit. Maintenant que la page se tourne, une nouvelle aventure nous attend et j'espère qu'elle sera longue et belle.

Vous avez su, chacun votre tour, trouver les bons mots pour m'encourager et surtout pour ne pas abandonner...

Merci à tous...

LISTE DES ABREVIATIONS

Aa :	Acide aminé
AD :	Domaine d'activation
Ade : (A)	Adénine
ADH1 :	Alcool déshydrogénase 1
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFLP :	Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés
ARD :	Domaine répété en ankyrine
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNt :	ARN totaux
as-1 :	Activating sequence 1
<i>A. thaliana</i> :	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Avr :	Protéine d'avirulence
BABA :	Acide β -aminobutyrique
BET :	Bromure d'éthidium
BLAST :	Outil de recherche d'alignements locaux
BOP :	Blade On Petiol
BTB/POZ :	Broad complex, Tramtrac and Bric-à-brac/ POx virus and Zinc Finger
BTH :	Benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-carbothiate de S-méthyl
bZIP :	Leucine zipper basique
CaMV :	Virus de la mosaïque du chou-fleur
CC :	Coiled-coil
cv :	Cultivar
Cys :	Cysteine
DB :	Domaine de liaison à l'ADN
DNase :	Désoxyribonucléase
dNTP :	Désoxyribonucléotide tri-phosphate
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA :	Acide éthylène diamine tétraacétique
EMSA :	Gel retard
EST :	Etiquette de séquence transcrite
ESTAP :	Pipeline d'analyse des EST
ET :	Ethylène
GAL4-AD :	Domaine d'activation du facteur de transcription GAL4
GFP :	Protéine verte fluorescente
GSH :	Glutathion réduit
GSNO :	S-nitroglutathion
GST-6 :	Glutathion S-transferase 6
GW :	Gewurztraminer
His : (H)	Histidine
HKA :	Hudson Kreitman Aguade
HR :	Réaction d'hypersensibilité
HRMA :	Analyse de fusion haute résolution
INA :	Acide 2,6-dichloroisonicotinique
I.N.R.A :	Institut National de la Recherche Agronomique
ISR :	Réponse systémique induite

JA :	Acide jasmonique
LAR :	Résistance acquise locale
LB :	Luria Bertani
Leu : (L)	Leucine
LOX1 :	Lipoxygenase 1
LRR :	Domaine riche en leucine
LS :	Linker scan
LZ-NBS-LRR :	Leucine-zipper – site de liaison nucléotique – domaine riche en leucine
MALDI-TOF :	Désorption-ionisation laser assistée par matrice - Spectromètre de masse à temps de vol
MAMP :	Profil moléculaire associé aux microbes
MeJA :	Méthyljasmonate
MeSA :	Méthylsalicylate
NBS :	Site de liaison nucléotidique
NH1 :	NPR1 homolog 1
NIM1 :	Non-inducible immunity 1
NLS :	Signal de localisation nucléaire
NPR1 :	Nonexpressor of pathogenesis-related 1
OBF :	Facteur de liaison à l'octopine
ocs :	Octopine synthase
OGA :	Oligogalacturonides
OGM :	Organisme Génétiquement Modifié
Oligo dT :	Oligo desoxyribothymidine
P35S :	Promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
PAMP :	Profil moléculaire associé aux agents pathogènes
pb :	Paire de bases
PCD :	Mort cellulaire programmée
PCR :	Amplification en chaîne par polymérase
PEG :	Polyéthylène glycol
Pfx :	Bactéries du genre <i>Pyrococcus</i> dont est extraite une ADN polymérase
PGIP :	Protéines inhibant la polygalacturonase.
PN :	Pinot noir
PR :	Associé à la pathogénécité
Psm :	<i>Pseudomonas syringae</i> pathovar <i>maculicola</i>
Pst :	<i>Pseudomonas syringae</i> pathovar <i>tomato</i> DC3000
pv :	Pathovar
PVP :	Polyvinylpyrrolidone
QTL :	Locus de trait quantitatif
R :	Protéine de résistance
RAPD :	Amplification aléatoire de fragments d'ADN polymorphe
RFLP :	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RGA :	Analogues de gènes de résistance
RLK :	Receptor like-kinase
RLP :	Receptor-like protein
ROS :	Espèces activées de l'oxygène
rpm :	Rotations par minute
Rpv1 :	Résistance à <i>Plasmopara viticola</i>
RT-PCR :	Transcription inverse - PCR
Run1 :	Résistance à <i>Erysiphe necator</i>
SA :	Acide salicylique

SAR :	Résistance systémique acquise
SD :	Dextrose synthétique
SDS :	Sodium dodecyl sulfate
SNO :	S-nitrosothiol
SNP :	Polymorphisme d'une seule paire de base
SSR :	Répétitions de séquences simples
STR :	Séquences répétées en tandem
T35S :	Termineur 35S du virus de la mosaïque du tabac
TA :	Domaine d'activation transcriptionnelle
TAE :	Tris acetate EDTA
Taq :	<i>Thermus aquaticus</i> dont est extraite une ADN polymérase
TILLING :	Identification des lésions induites localement dans le génome
TIR :	Récepteur Toll-Interleukine
Tm :	Température de fusion
TMV :	Virus de la mosaïque du tabac
Tris :	2-amino-2-(hydrométhyl)propane-1.3 diol
Trp : (W)	Tryptophane
TTSS :	Système de sécrétion de type trois
U :	Unité
UAS :	Séquence d'activation en amont
VNTR :	Nombre variable d'unités de répétition
X-Gal :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
YNB :	Yeast Nitrogen Base
YPD :	Yeast extract Peptone Dextrose

SOMMAIRE

Remerciements	3
Liste des abréviations	5
Sommaire	8
Avant-propos	11
INTRODUCTION GENERALE	12
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
1. Le génome des végétaux	16
1.1. Le génome des végétaux : une évolution constante	16
1.1.1. Les recombinaisons.....	16
1.1.2. Les duplications : une origine de la diversité ?	16
1.1.3. Les mutations	20
1.2. Concepts d'homologie / paralogie / orthologie	20
1.3. La structure des gènes	21
1.4. Polymorphisme de séquence et évolution	22
1.4.1. Théorie neutraliste de l'évolution moléculaire de Kimura	22
1.4.2. Signatures de sélection naturelle au niveau moléculaire.....	23
1.4.3. Méthodes de détection de la sélection naturelle à l'échelle moléculaire	23
1.4.4. Méthodes de détection de la diversité génétique.....	24
2. La vigne.....	29
2.1. Domestication et évolution.....	29
2.2. Importance économique et culturelle	29
2.3. Taxonomie.....	30
2.4. Modes de propagation de la vigne.....	31
2.4.1. La reproduction sexuée	31
2.4.2. La multiplication végétative.....	32
2.5. Génome de la vigne	33
2.6. La vigne et ses pathogènes	35
2.6.1. Les principaux pathogènes de la vigne	35
2.6.2. Les alternatives à la résistance naturelle	38
3. Interactions plantes / agents pathogènes : une guerre évolutive.....	41
3.1. Concepts généraux de phytopathologie.....	41
3.1.1. Introduction.....	41
3.1.2. Coévolution plantes / agents pathogènes : évolution du système immunitaire de la plante.....	42
3.2. Les signaux hormonaux impliqués dans la mise en place des mécanismes de défense.....	50
3.2.1. L'acide salicylique	50
3.2.2. L'acide jasmonique	51
3.2.3. L'éthylène	52
3.3. Les mécanismes de résistance de la plante.....	52
3.3.1. Les résistances locales	53
3.3.2. Les résistances systémiques	53
3.4. Les réponses de défense mises en place par la plante	55
3.4.1. Protéines PR.....	55
3.4.2. Phytoalexines	58
3.4.3. Le renforcement des parois	58

3.5. Les régulateurs génétiques de la SAR.....	59
3.5.1. NPR1 : régulateur clé de la voie de signalisation de l'acide salicylique.....	60
3.5.2. Les facteurs de transcription TGA.....	66
3.5.3. Interactions de NPR1 avec des facteurs de transcription.....	69
4. Objectifs et présentation du travail de thèse.....	72
CHAPITRE I : Choix des accessions dans la famille des <i>Vitaceae</i> et tests de résistance au mildiou.....	74
1. Introduction.....	75
2. Résultats.....	76
2.1. Choix des accessions.....	76
2.2. Tests d'inoculation mildiou.....	76
3. Conclusions.....	77
CHAPITRE II : Identification et faible niveau de polymorphisme des gènes <i>NPR1.1</i> et <i>NPR1.2</i> dans la famille des <i>Vitaceae</i>.....	78
1. Introduction.....	79
2. PUBLICATION : Low level of polymorphism in two putative <i>NPR1</i> homologs in the <i>Vitaceae</i> family.....	81
3. Conclusion.....	95
CHAPITRE III : Etude des régions promotrices et introniques de <i>VvNPR1.1</i> et <i>VvNPR1.2</i>.....	96
1. Introduction.....	97
2. Résultats.....	97
2.1. Recherche d'éléments régulateurs dans les promoteurs des gènes <i>VvNPR1.1</i> et <i>VvNPR1.2</i> par une approche <i>in silico</i>	97
2.2. Etude de la diversité génétique des régions introniques de <i>VvNPR1.1</i> et <i>VvNPR1.2</i>	98
3. Conclusion.....	99
CHAPITRE IV : Identification des gènes <i>VvTGA</i> chez la vigne et interactions avec <i>VvNPR1.1</i>.....	100
1. Introduction.....	101
2. Résultats.....	102
2.1. Identification de <i>VvTGA</i> chez la vigne.....	102
2.2. Recherche des interactions par la technique du double hybride de <i>VvNPR1.1</i> avec les <i>VvTGA</i> identifiés.....	103
2.2.1. Principe de la technique du double-hybride.....	103
2.2.2. Clonage des gènes <i>VvNPR1.1</i> et <i>VvTGA</i> dans les vecteurs pGBKT7 et pGADT7.....	104
2.2.3. Vérification de l'absence d'auto-activation de la transcription des constructions dans la levure.....	105
2.2.4. Tests d'interaction de <i>VvNPR1.1</i> avec <i>VvTGA1</i> et <i>VvTGA4</i>	106
3. Conclusions.....	106
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	109
1. Approche développée pour l'étude des gènes <i>NPR1</i> chez la vigne.....	110
2. Validation des accessions de vigne pour l'étude des gènes <i>NPR1</i>	110

3. Hypothèse évolutive.....	111
3.1. Organisation génomique	111
3.2. Diversité de séquence des gènes <i>VvNPR1.1</i> et <i>VvNPR1.2</i>	112
3.3. Co évolution entre les gènes <i>VvNPR</i> et les agents pathogènes ?.....	113
4. Interaction avec les facteurs de transcription TGA	114
5. Interaction de NPR1 avec d'autres facteurs de transcription.....	116
6. Caractérisation fonctionnelle de <i>VvNPR1.1</i> et <i>VvNPR1.2</i>	116
7. Contribution de l'étude pour la résistance face aux agents pathogènes chez la vigne.....	118
MATERIELS ET METHODES	120
1. Matériels biologiques.....	121
1.1. Matériel végétal.....	121
1.2. Souche de bactéries	121
1.3. Souche de levures.....	121
1.4. <i>Plasmopara viticola</i>	122
1.5. Vecteurs de clonage et d'expression	122
1.5.1. Vecteur de clonage : pCR2.1 (Invitrogen).....	122
1.5.2. Vecteurs double hybride : pGBKT7 et pGADT7 (Clontech)	122
1.6. Oligonucléotides.....	123
2. Méthodes.....	124
2.1. Extraction des acides nucléiques.....	124
2.1.1. Extraction de l'ADN génomique	124
2.1.2. Extraction d'ARN	124
2.2. Clonage de fragments d'ADN dans les vecteurs.....	124
2.2.1. PCR.....	124
2.2.2. RT-PCR.....	125
2.2.3. Digestion d'ADN par des enzymes de restriction.....	125
2.2.4. Analyse de fragments d'ADN en gel d'agarose.....	126
2.2.5. Purification de fragments d'ADN sur gel d'agarose.....	126
2.2.6. Quantification.....	126
2.2.7. Ligation.....	126
2.2.8. Culture des bactéries	127
2.2.9. Transformation de la souche bactérienne DH5 α	127
2.2.10. Extraction de plasmides par la technique de la lyse alcaline	128
2.2.11. Séquençage	128
2.2.12. Conservation des souches de bactéries et de levures	128
2.3. Technique du double hybride dans la levure.....	129
2.3.1. Culture des levures.....	129
2.3.2. Double hybride.....	129
2.3.3. Extraction d'ADN plasmidique des clones recombinants de levure.....	130
2.4. Evaluation de la résistance des plantes aux pathogènes.....	131
2.4.1. Récolte du matériel végétal et mise en place du dispositif	131
2.4.2. Inoculation de l'agent pathogène <i>Plasmopara viticola</i>	131
2.4.3. Observations : Notations OIV.....	131
3. Méthodes de bioinformatique	131
REFERENCES	133
ANNEXES	160

AVANT-PROPOS

Dans ce manuscrit, les noms des protéines sont écrits en majuscules et les noms des gènes en majuscules et en italiques. Dans la partie résultats, lorsque les gènes font référence à ceux trouvés au sein de la famille des *Vitaceae*, ils sont écrits *NPR1.1* et *NPR1.2*. En revanche, lorsqu'ils font référence aux gènes trouvés dans l'espèce *Vitis vinifera*, ils sont notés *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2*.

INTRODUCTION
GENERALE

Les plantes, malgré leur immobilité, ont développé divers mécanismes sophistiqués et efficaces pour reconnaître et combattre les agents pathogènes lors de leurs attaques. La résistance des plantes est définie comme la capacité des plantes à contenir l'effet préjudiciable d'un agent pathogène. Les plantes contiennent l'information génétique nécessaire pour résister à l'infection d'une multitude d'agents phytopathogènes et ravageurs tels que des virus, bactéries, insectes, nématodes, champignons et oomycètes. Les plantes ont élaboré au cours de l'évolution diverses stratégies performantes de défenses face à l'attaque d'un agent pathogène. Cette résistance peut s'opérer à différents niveaux en utilisant soit des systèmes de défenses constitutifs préexistants (cuticule, cire), soit des systèmes de défenses induits apparaissant après la perception de l'agression. Dans la plupart des cas, la première ligne de défense est suffisante pour repousser l'agent pathogène, mais parfois les barrières constitutives ne sont pas suffisantes et une autre ligne de résistance est requise. Ces réactions de défense secondaires incluent la production des composés antimicrobiens, la mort cellulaire programmée (réponse hypersensible, HR) et des modifications de la paroi cellulaire.

Les interactions plantes / agents pathogènes sont très complexes et impliquent une communication bidirectionnelle au niveau moléculaire. La plante coordonne la transcription de plusieurs milliers de gènes dont l'unique objectif est la résistance. Le succès de la plante dépend de l'intensité et de la rapidité de la perception des signaux des agents pathogènes et de leur transmission dans celle-ci pour produire une réponse efficace contre l'agent pathogène. Chez *Arabidopsis*, l'identification des gènes induisant une réponse à des agents pathogènes ou éliciteurs chimiques fait l'objet de nombreuses études. Elles indiquent que pas moins de 25% des gènes identifiés chez *Arabidopsis* ont un niveau transcriptionnel affecté suite à l'attaque d'un agent pathogène. Ainsi, une meilleure connaissance des mécanismes fondamentaux impliqués dans de telles réponses de défense aidera à la compréhension des interactions plantes / agents pathogènes et permettra une meilleure résistance des plantes.

La **synthèse bibliographique** présente l'état des connaissances sur le génome des végétaux et quelques méthodes de détection de la diversité génétique. La vigne et les interactions plantes / agents pathogènes seront ensuite exposées. Cette partie explique brièvement les différentes réponses aux maladies qui se produisent dans la plante lors de l'infection par un agent pathogène. Une dernière partie de ce chapitre donne les caractéristiques et le rôle du gène NPR1 (*nonexpressor of pathogenesis-related gene 1*) ainsi que ceux des facteurs de transcription, éléments essentiels dans l'activation des gènes de défense.

Le **chapitre 1** présente le choix des accessions de vigne pour la suite des expériences. Les **chapitres 2** et **3** présentent les résultats obtenus concernant l'identification de deux gènes *NPR1* dans la famille des *Vitaceae* (*VvNPR1.1* et *VvNPR1.2*) et leur niveau de polymorphisme dans les exons et les introns. Le **chapitre 4** expose les résultats sur l'identification de cinq facteurs de transcription TGA dans la famille des *Vitaceae* (*VvTGA 1* à *5*) ainsi que leur interaction avec *VvNPR1.1*. Les résultats obtenus sont discutés et de nouvelles perspectives sont avancées dans la partie **discussion générale et perspectives**. Dans la partie **références**, une liste de la littérature utilisée et citée dans cette thèse est fournie et enfin les cartes des plasmides utilisés pendant l'étude sont donnés en **annexes**.

***SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE***

1. Le génome des végétaux

1.1. Le génome des végétaux : une évolution constante

Le génome est un ensemble plutôt dynamique et flexible. Une stabilité totale signifierait un état statique qui s'opposerait à l'apparition de nouvelles formes de vie en réponse aux modifications extérieures. Les génomes des végétaux sont constamment soumis à de nombreux stress environnementaux et sont donc sujets à de constantes variations. Les gènes et les génomes actuels sont le résultat de l'accumulation d'événements qui se sont produits dans le passé. Les génomes sont le siège de grands remaniements chromosomiques qui peuvent être conservés au cours de l'évolution (Aguilera et Gomez-Gonzalez, 2008). Ils peuvent aussi être à l'origine de la mort cellulaire programmée mais également la cause de maladies génétiques notamment dans les populations humaines (Vialard *et al.*, 2004).

Plusieurs types d'événements moléculaires sont responsables de l'évolution et de la variabilité des génomes chez les plantes : les recombinaisons, les duplications de gènes et les mutations.

1.1.1. Les recombinaisons

La recombinaison génétique est un réarrangement du génome car de l'ADN est échangé soit entre chromosomes homologues soit entre chromosomes non homologues *via* des enjambements (*crossing-over*) au cours de la méiose. Ce brassage génétique conduit donc à l'apparition de nouvelles combinaisons de gènes qui seront ensuite soumises à la sélection naturelle. De récentes études se sont intéressées aux points chauds de recombinaison chez les plantes, avec notamment l'identification de taux de recombinaison 70 fois plus élevés dans des régions hautement recombino-gènes par rapport au reste du génome chez *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.*, 2007).

1.1.2. Les duplications : une origine de la diversité ?

Les événements de duplication de séquences d'ADN contribuent très largement aux processus évolutifs des génomes et nous pouvons les considérer comme le moteur essentiel de l'évolution (Ohno, 1970). D'après les premières données issues du séquençage des génomes de l'arabette, du riz, de la vigne et du peuplier, il semblerait que de nombreux gènes aient été dupliqués puis maintenus par la sélection naturelle au cours de l'évolution (Sterck *et al.*, 2007).

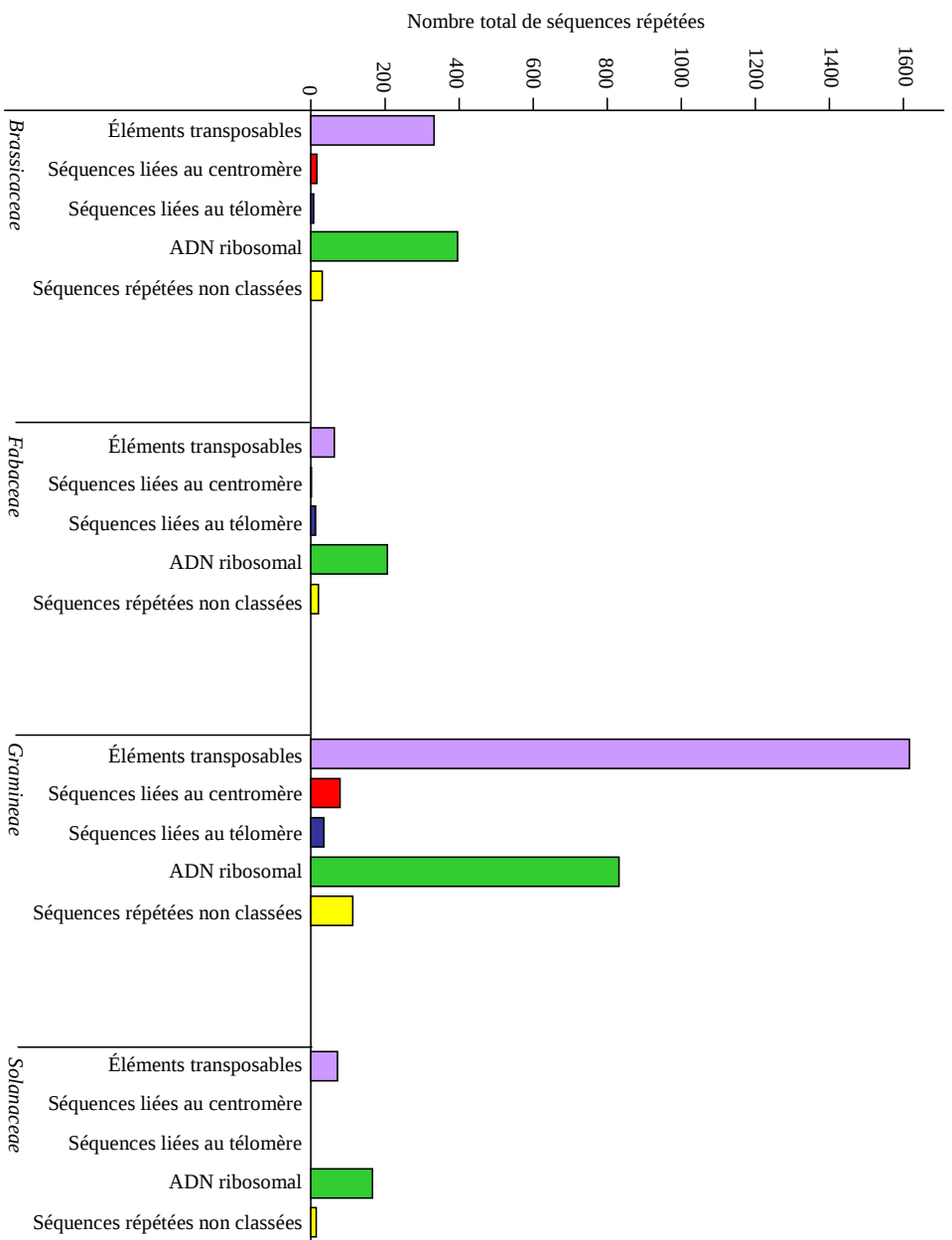


Figure SB.1 : Fréquences et type d'éléments répétés chez les plantes (d'après Ouyang et Buell, 2004)

Il existe différents types de duplication qui peuvent se produire au sein d'un génome. Les séquences dupliquées proviennent soit d'une partie de gène, d'un gène (duplication génique), d'un bloc de plusieurs gènes, d'un chromosome entier (aneuploïdisation) ou de l'ensemble du génome (polyploïdisation) (Sankoff, 2001).

Les copies dupliquées peuvent être situées côte à côte dans le génome (duplication en tandem) ou bien elles peuvent être dispersées au sein du génome. Environ 15% des gènes correspondent à des duplications en tandem pour les génomes végétaux séquencés (Jander et Barth, 2007). Par la combinaison des différents types de duplication, un nombre important de gènes peut être obtenu à partir d'un seul gène ancestral.

Les éléments transposables et rétrotransposables sont également très importants dans la dynamique du génome et dans la duplication des gènes (Bennetzen, 2000; Moffat, 2000; Bennetzen, 2002). Ces éléments sont très courants chez les graminées et représentent, par exemple, 70% du génome du maïs (Ouyang et Buell, 2004) (Figure SB.1). Pour l'évolution des gènes, les segments dupliqués constituent une source plus importante d'ADN que la duplication d'un gène entier car ils permettent la spécialisation ou l'apparition de nouvelles fonctions. Ces nouveaux gènes codent des protéines qui ne sont pas essentielles pour la viabilité des organismes mais peuvent être, par exemple, importantes pour l'adaptation des espèces à certaines niches écologiques (Duda et Palumbi, 1999). Chez les mammifères, un certain nombre de gènes dupliqués sont impliqués dans l'évolution récente du système immunitaire, de la détoxification et de la reproduction (Copley *et al.*, 2003).

Les processus de polyploïdie peuvent se produire chez tous les Eucaryotes et en particulier chez les végétaux (Wendel, 2000) mais sont plus particulièrement fréquentes chez les Angiospermes (Otto et Whitton, 2000; Blanc et Wolfe, 2004; Chapman *et al.*, 2006). La polyploïdie est un phénomène courant chez les plantes qui a certainement joué un rôle important dans la spéciation et l'évolution des espèces cultivées. Par exemple, *Arabidopsis* serait passé récemment par un état de tétraploïdie avec ensuite, une perte d'une partie des gènes dupliqués (Duarte *et al.*, 2006). Une collaboration franco-italienne a permis de séquencer le génome de la vigne. Les résultats révèlent que l'ancêtre des plantes dicotylédones a subi plusieurs événements de duplication de son génome après la divergence des plantes monocotylédones et dicotylédones (Jaillon *et al.*, 2007).

Chez les polyploïdes, il faut distinguer les autopolyploïdes, composés de multiples jeux de chromosomes provenant d'une même espèce (dysfonctionnement au cours des divisions cellulaires), des allopolyploïdes, qui comportent des jeux de chromosomes issus d'au moins deux espèces (Osborn *et al.*, 2003). Certaines familles importantes des végétaux, telles que les graminées (Poales) sont principalement constituées de plantes polyploïdes (Bennetzen, 2007). La polyploïdie est un facteur important dans la formation de nouvelles espèces à travers la spéciation (Dubcovsky et Dvorak, 2007). On notera qu'*A. thaliana*, dont le génome est considéré comme diploïde, est en fait un ancien polyploïde (Blanc *et al.*, 2003).

1.1.2.1. Devenir des gènes dupliqués

Une duplication engendre une copie surnuméraire d'un gène. Une des deux copies du gène, en l'absence de pression de sélection, est libre d'accumuler des mutations aléatoirement. Ainsi, plusieurs scénarios évolutifs peuvent être proposés.

1.1.2.1.1. La pseudogénisation

La duplication génère une redondance fonctionnelle et une des copies va progressivement être inactivée par l'accumulation de mutations tandis que l'autre copie prend en charge la fonction essentielle de la région considérée. Un pseudogène est alors formé. Il s'agit d'une copie de gène qui n'est plus exprimée ou dont la protéine n'est plus fonctionnelle (Mighell *et al.*, 2000; Balakirev et Ayala, 2003). Par la suite, ces pseudogènes peuvent être délétés du génome ou alors diverger de telle manière qu'aucune similarité de séquence avec la copie originelle ne peut être mise en évidence. Par contre, si les pseudogènes ont été formés récemment, ils pourront être identifiés grâce à leur similarité de séquence.

1.1.2.1.2. La conservation de la fonction

Dans ce cas, la copie dupliquée conserve la même fonction que le gène originel, de ce fait les séquences ont très peu divergé (Blanc et Wolfe, 2004). La présence de deux copies de gènes peut parfois être un avantage simplement parce que cette redondance permet d'augmenter les quantités de protéines ou d'ARN synthétisés. Ainsi, des quantités amoindries peuvent être observées suite à l'altération d'une copie dupliquée d'une famille de gènes chez certains mutants. Cette situation est due au fait que la ou les copies restantes ne peuvent pas compenser au niveau de la transcription ou de la traduction le déficit résultant de cette mutation. Un phénotype peut être associé à ce déficit de dosage génique (Osborn *et al.*, 2003).

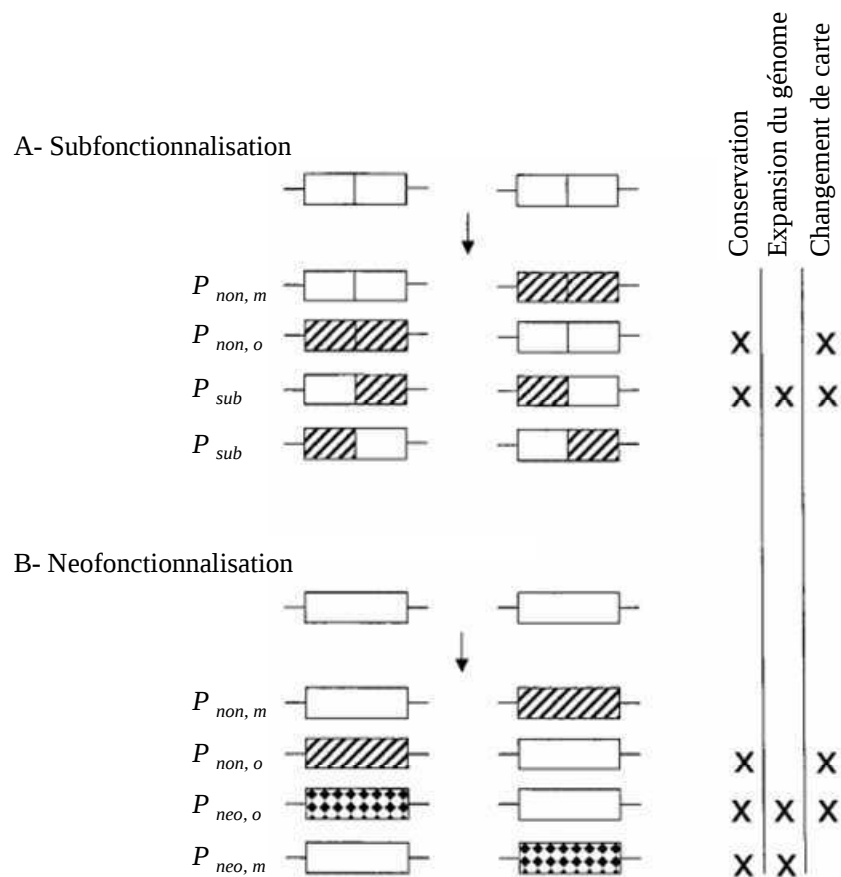


Figure SB.2 : Schéma des processus de subfonctionnalisation et de néofonctionnalisation (d'après Lynch *et al.*, 2001)

Dans les deux cas, le gène ancestral est à gauche et la nouvelle copie qui en résulte est à droite.

Pour le processus de subfonctionnalisation, le gène est divisé en deux sections, chacune indique une sous-fonction libre de mutations. Les lignes diagonales indiquent une perte de la fonction, les ronds indiquent une néofonctionnalisation (accompagné d'une perte de la fonction initiale).

Les probabilités d'un destin alternatif sont énumérés à gauche : non, nonfonctionnalisation ; sub, subfonctionnalisation ; neo, neofonctionnalisation ; et o, le locus initial et m, le locus nouvellement apparu.

Les conséquences génomiques des différents destins sont marquées à droite.

1.1.2.1.3. La subfonctionnalisation

Le processus de subfonctionnalisation est également appelé «partage de fonctions ancestrales». Bien qu'une quantité plus importante de produit des gènes puisse être avantageuse, deux gènes ayant la même fonction ne sont pas stables au sein d'un génome (Nowak *et al.*, 1997). Théoriquement, deux copies identiques peuvent être maintenues si la fonction correspondante diffère par certains points (Nowak *et al.*, 1997). Lors de la duplication d'un gène codant deux domaines fonctionnels, chaque copie va conserver un des deux domaines fonctionnels par accumulation de mutations dans la séquence codant l'autre domaine fonctionnel. Ainsi, la fonction ancestrale sera partagée entre les deux copies (Figure SB.2 A) (Lynch et Force, 2000; Lynch *et al.*, 2001). La subfonctionnalisation peut également correspondre à la division de l'expression génique après une duplication c'est-à-dire que les deux copies seront exprimées dans différentes conditions. Dans les deux cas, les deux gènes se complémentent fonctionnellement et seront conservés dans le génome. Force *et al.* (1999) ont étudié le rôle de ces événements dans la conservation des gènes dans le génome. Ils qualifient ce processus de « DDC » c'est-à-dire Duplication-Dégénération-Complémentation. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'évolution d'éléments *cis*-régulateurs présents dans les gènes dupliqués résulte de la combinaison de pression de sélection positive et d'évolution selon le modèle DDC (Papp *et al.*, 2003).

1.1.2.1.4. La néofonctionnalisation

Le processus le plus important sur le plan évolutif est la formation d'une nouvelle fonction après duplication. Les deux copies vont alors diverger et l'une des copies va conserver la fonction originelle alors que l'autre va acquérir une nouvelle fonction (Figure SB.2 B) (Nadeau et Sankoff, 1997).

1.1.2.2. L'émergence des familles multigéniques

Les duplications entraînent une redondance de l'information génétique et sont une composante principale de l'évolution des génomes et de l'apparition de familles multigéniques (Dayhoff, 1976). Sous la pression évolutive, la redondance initiale a tendance à diminuer au cours du temps, entraînant une modification du génome sur le plan structural et sur le plan fonctionnel (Wendel, 2000). Bien que des fonctions redondantes aient été observées au sein des familles multigéniques, de nombreuses études de mutants d'*A. thaliana* ont montré le rôle unique de certains membres.

L'acquisition progressive de différences, comme l'accumulation aléatoire des mutations dans leur séquence et la modification de leur structure ont pour conséquence leur évolution fonctionnelle. Leur évolution peut concerner la séquence codante, les parties non codantes ou les régions régulatrices du gène dupliqué (Lynch et Force, 2000; Lynch *et al.*, 2001).

1.1.3. Les mutations

La mutation est une erreur qui survient lors de la réplication du matériel génétique.

Les mutations sont dites ponctuelles lorsqu'il s'agit de la modification d'un nucléotide. Etant donné que la proportion de régions codant des protéines ne représente pas la majorité du génome, la plupart des mutations sont neutres car elles affectent des régions non codantes et ne produisent aucun changement aux caractères métaboliques ou phénotypiques. Certaines mutations ponctuelles se traduisent par la substitution d'un nucléotide par un autre. Lorsqu'une mutation apparaît dans la séquence codante d'un gène, elle va générer un nouvel allèle. Parfois, à cause de la redondance du code génétique, le nouveau codon code le même acide aminé que le codon original. La séquence protéique n'est donc pas modifiée (mutation synonyme ou silencieuse). Ce type de mutation représente environ un tiers des mutations ponctuelles. Dans certains cas, les mutations ponctuelles entraînent une modification de l'acide aminé codé (mutation faux-sens). Le changement d'un acide aminé peut avoir des répercussions en terme de fonction de la protéine. Le changement de nucléotide qui provoque le remplacement d'un codon spécifiant un acide aminé par un codon stop (mutation non-sens) résulte en la production d'une protéine tronquée. Certaines mutations sont décalantes car l'addition ou la suppression de nucléotides non multiple de trois provoque un changement dans le cadre de lecture (insertions ou délétions) (Clark, 2005).

Les mutations sont dites dynamiques lorsqu'elles correspondent à l'augmentation du nombre de certains triplets sur plusieurs générations (Richards, 2001; Pearson *et al.*, 2005). Ces mutations résultent d'un dérapage (slipped strand mispairing) dans certaines zones instables du génome.

1.2. Concepts d'homologie / paralogie / orthologie

Le séquençage du génome d'un organisme est la plupart du temps suivi par une phase d'annotation c'est-à-dire d'identification des ORFs présentes dans son génome. Cette identification repose principalement sur un critère de similarité de séquence. L'objectif est d'identifier dans différents génomes les gènes qui codent des protéines qui accomplissent les mêmes fonctions dans la cellule.

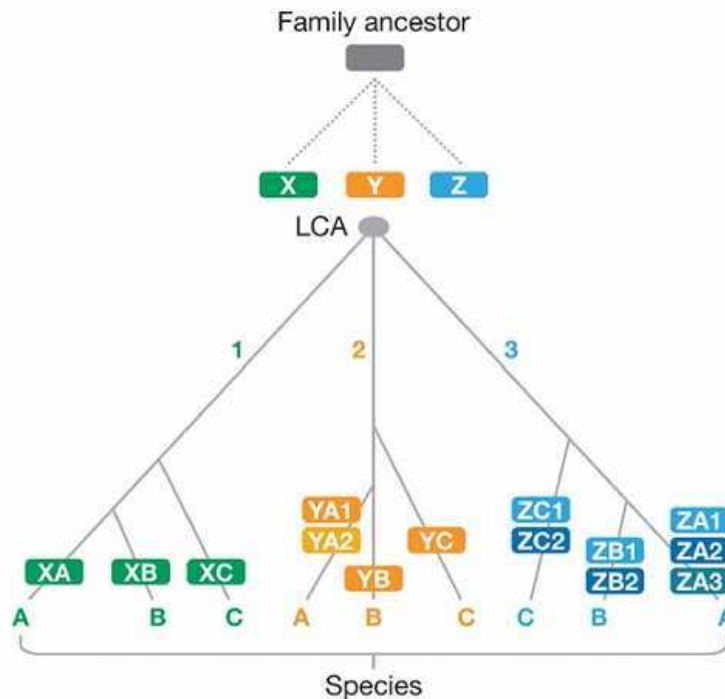


Figure SB.3 : Arbre phylogénétique hypothétique illustrant les relations orthologues et paralogues entre trois gènes ancestraux et leurs descendants dans trois espèces (d'après Koonin, 2005)

LCA (last common ancestor), dernier ancêtre commun pour les espèces comparées.

Cette figure montre un arbre phylogénétique hypothétique d'une famille de gènes qui se compose de trois branches, chacune illustrant un cas distinct de relation orthologues-paralogues.

Selon la figure, l'ancêtre commun de la famille entière a existé avant le dernier ancêtre commun de chacune des trois espèces comparées. Le LCA a généré trois gènes paralogues X, Y et Z qui sont devenus les ancêtres des trois branches de l'arbre. Ainsi, chaque gène de la branche 1 est un paralogue de chaque gène de la branche 2 et 3 et inversement. La branche 1 correspond à un cas simple par lequel l'évolution du dernier ancêtre commun n'a rien impliqué d'autre que la transmission verticale. Par conséquent, les gènes des différentes espèces XA, XB et XC sont orthologues entre eux. La branche 2 montre une duplication dans l'espèce A. Les gènes YA1 et YA2 sont des co-orthologues des gènes YB et YC. Dans la branche 3, la situation est compliquée par des duplications dans chacune des espèces. Ainsi, les gènes ZA1-3 sont collectivement co-orthologues de ZB1-2 et de ZC1-2.

Lorsque la séquence requête présente des éléments similaires avec les séquences des bases de données, elle est alors conservée. Lorsque deux protéines ont des séquences présentant une similarité élevée [identité globale supérieure à 30% environ ; (Doolittle, 1994)], il y a une probabilité relativement grande pour que ces deux protéines dérivent d'une protéine ancestrale commune et donc d'une même séquence ancestrale. Nous pouvons alors en déduire que ces deux séquences et les deux protéines qui en découlent sont homologues (Fitch, 1966).

Par ailleurs, les relations d'homologie entre gènes sont principalement de deux ordres : soit les gènes sont orthologues, soit ils sont paralogues (Figure SB.3).

Les gènes orthologues sont des gènes d'espèces différentes qui ont évolué par spéciation à partir d'un gène ancestral présent chez le dernier ancêtre commun desdites espèces (Fitch, 1970). Par exemple, les gènes de globines α de souris et de lapin sont orthologues.

Les gènes paralogues sont des gènes qui ont évolué à partir d'un gène ancestral et sont issus d'un événement de duplication (Fitch, 1970). Par exemple, les gènes de globines α et β d'une même espèce sont paralogues.

Généralement, les gènes orthologues conservent une fonction identique au cours de l'évolution et les fonctions sont conservées d'un organisme à l'autre, alors que les gènes paralogues développent des fonctions nouvelles, quoique liées à la fonction originelle (Koonin, 2005).

1.3. La structure des gènes

Les exons codent à la fois la séquence en acides aminés de la protéine et la région non traduite des ARNm. Ils sont minoritaires dans les gènes eucaryotes.

La majorité des gènes est composée d'introns qui coupent les exons. Les introns sont transcrits en même temps que les exons en ARN puis ils sont éliminés au cours de l'épissage. Les introns représentent approximativement 24% du génome humain (Venter *et al.*, 2001) et 30 ans après leur découverte, leur fonction et leur origine restent encore à élucider. Certains introns joueraient un rôle dans la régulation transcriptionnelle (Brooks *et al.*, 1994). Leur niveau de conservation inter-espèces varie selon les gènes, suggérant qu'il existe des pressions de sélection liées à des fonctions biologiques encore inconnues des introns (Majewski et Ott, 2002; Gaffney et Keightley, 2006). Avec le nombre croissant de génomes entièrement séquencés, de mieux en mieux annotés et disponibles dans les bases de données, la dynamique évolutive des introns pourra être explorée à une large échelle.

1.4. Polymorphisme de séquence et évolution

Analyser les profils polymorphiques de séquence et la divergence d'un gène donné entre différentes espèces permet de caractériser les forces évolutives qui agissent sur ce gène (Charlesworth et Wright, 2001). Deux forces évolutives peuvent s'exercer sur une population : la dérive génétique qui est aléatoire ou la sélection qui est orientée. Ces forces évolutives font varier les fréquences alléliques au sein de la population (Nielsen, 2005).

La dérive génétique est caractérisée par une fluctuation aléatoire de la fréquence des gènes au cours des générations. Les populations naturelles ont rarement des effectifs constants. La probabilité de dérive génétique est plus importante dans les périodes où les effectifs sont faibles. Si une population passe pendant plusieurs générations par un effectif très faible, il peut y avoir une perte par dérive génétique d'une grande part de sa diversité allélique.

La sélection naturelle engendre l'accumulation de génotypes ayant un fort pouvoir adaptatif (ou fitness). La sélection permet donc d'adapter une population à son milieu en augmentant ou en maintenant dans le patrimoine génétique de cette population la fréquence des allèles favorables.

La sélection naturelle influence de trois manières le devenir des mutations codantes : on parle de mutations avantageuses (ou adaptatives) si le nouvel allèle procure un avantage sélectif, de mutations délétères dans le cas inverse (éliminées par la sélection) ou de mutations neutres si le nouvel allèle ne procure ni avantage ni désavantage adaptatif (Nielsen, 2005).

1.4.1. Théorie neutraliste de l'évolution moléculaire de Kimura

Le modèle de Motoo Kimura, également appelé « théorie neutraliste de l'évolution moléculaire » ou bien « théorie de la mutation et de la dérive aléatoire » s'appuie principalement sur la génétique moléculaire et sur la variabilité génétique. Cette théorie suggère que la plus grande partie de la variabilité génétique (le polymorphisme intra-espèce et la divergence entre espèces) est neutre et que les polymorphismes sont éliminés ou fixés dans les populations sous l'influence des effets environnementaux de la dérive génétique. C'est-à-dire que la plupart des substitutions de nucléotides seraient neutres en dépit de la sélection et seraient maintenues dans les populations par un équilibre entre leur taux de production par mutation et leur élimination aléatoire (Kimura, 1983).

Lorsqu'il y a sélection, les observations du polymorphisme ne peuvent pas être expliquées par le modèle de l'évolution neutre.

Sélection naturelle	a- Neutre	b- Positive, adaptative, diversificatrice, Darwinienne	c- Balancée, équilibrante	d- Négative, purificatrice
Caractéristiques	Absence de sélection	Favorise les variants génétiques	Maintien le polymorphisme allélique dans une population	Diminue la fréquence ou élimine les variants génétiques

Tableau SB.1 : Effets de la sélection naturelle sur la généalogie des gènes et les fréquences alléliques
(d'après Bamshad et Wooding, 2003)

Chaque arbre (a-d) représente la généalogie complète d'une population de 12 individus haploïdes. Chaque ligne retrace la généalogie d'un individu, les lignes en couleur représentent tous les descendants qui ont hérité soit d'un allèle neutre (a), soit d'un allèle affecté par la sélection naturelle (b-d) à partir de leur ancêtre commun (coalescence de la généalogie).

(a) Fixation de l'allèle neutre (rouge).

(b) Fixation rapide d'un allèle (vert) après un événement de sélection positive (flèche).

(c) Ni fixation, ni extinction de deux allèles (bleu et marron).

(d) Fixation d'un allèle (rose). Chaque cercle représente l'élimination d'une mutation délétère.

1.4.2. Signatures de sélection naturelle au niveau moléculaire

Pour détecter la sélection naturelle, une approche directe consisterait à suivre expérimentalement une population au cours du temps. Cependant, cette approche nécessite des données très difficiles à obtenir sur de longues périodes. Une approche alternative « indirecte » consiste à détecter les signatures moléculaires de la sélection.

Lorsqu'une mutation avantageuse apparaît dans un génome, elle peut être fixée c'est-à-dire qu'elle remplace toute autre variation présente à ce locus. La région où la mutation est apparue se retrouve alors dépourvue des mutations neutres qui s'accumulent normalement aux sites silencieux de l'ADN. Ce phénomène est appelé balayage sélectif ou « selective sweep ».

La sélection positive, également appelée diversifiante ou adaptative entraîne l'augmentation de la fréquence d'un allèle avantageux.

La sélection négative ou purificatrice consiste en la contre sélection d'allèles délétères entraînant la diminution de leur fréquence jusqu'à leur élimination complète.

Mais la sélection naturelle ne fait pas toujours augmenter ou diminuer la fréquence d'un seul allèle à un locus. Quelquefois, elle tend à maintenir deux allèles ou plus à un locus dans une population. Ceci est connu sous le nom de sélection balancée ou sélection équilibrante.

Dans le cas de la sélection balancée, les allèles vont avoir tendance à être conservés pendant une plus grande période dans la population que pour des allèles neutres. Chez les plantes et les animaux, la sélection balancée semble impliquée dans le maintien de la diversité aux locus qui coordonnent la reconnaissance entre l'hôte et l'agent pathogène (Richman et Kohn, 1999). Le tableau SB.1 récapitule les sélections naturelles qui peuvent être observées et leurs effets sur la généalogie des gènes et les fréquences des allèles d'une population de 12 individus haploïdes (Bamshad et Wooding, 2003).

1.4.3. Méthodes de détection de la sélection naturelle à l'échelle moléculaire

L'approche indirecte consiste à repérer des signatures moléculaires de la sélection naturelle en comparant les données observées aux données théoriques attendues dans le cas d'absence de sélection (modèle neutraliste) : distribution des fréquences alléliques, diversité nucléotidique, taux de mutations synonymes et non synonymes (polymorphisme/divergence).

Différentes méthodes permettent de détecter des signatures moléculaires de la sélection naturelle à partir de la diversité nucléotidique observée.

Signal de signature de sélection observé	Types de données échantillonnées	Unilocus / multiloci	Contraintes / inconvénients	Type de sélection détectée	Exemples de statistiques utilisées pour les tests de neutralité	Ce que les tests comparent	Références
Augmentation du déséquilibre de liaison	Intra-population	Unilocus	Sensible à la structure en populations et sensible à l'hétérogénéité des taux de recombinaison	Sélections récentes de type directionnelle (ou purifiante) et sélection balancée	Test Z_{NS} , test LRH		Kelly, 1997; Sabeti <i>et al.</i> , 2002
Augmentation/Baisse de la différenciation génétique entre populations	Entre populations ou espèces	Multiloci	Sensible à l'histoire démographique des populations, notamment goulot d'étranglement	Sélection récente directionnelle et balancée	Indices de différenciation (F_{ST} , $Snn...$)		Lewontin et Krakauer, 1973; Beaumont et Nichols, 1996; Vitalis <i>et al.</i> , 2001; Beaumont et Balding, 2004; Hudson, 2000
Augmentation de la fréquence des allèles dérivés	Intra-population	Unilocus	Sensible à la structure en populations	Sélection ancienne directionnelle ou balancée et sélection purifiante	H de Fay et Wu	Le nombre de variants nucléotidiques dérivés observés à des fréquences faibles et élevées est comparé au nombre de variants à des fréquences intermédiaires	Fay et Wu, 2000
Baisse ou augmentation de la diversité génétique, notamment des allèles rares	Intra-population	Unilocus / Multiloci – Test d'hétérogénéité pour test HKA	Sensible à la structure en populations, au changement dans la taille des populations (expansion de population...), au taux de mutation et recombinaison, à l'échantillonnage	Sélection ancienne directionnelle (ou purifiante) et balancée	D de Tajima,	Comparaison du nombre de polymorphismes nucléotidiques avec le nombre moyen de différences nucléotidique par paire de séquences	Tajima, 1989
					D de Fu et Li	Le nombre de variants nucléotidiques dérivés présents une seule fois est comparé au nombre total de variants dérivés	Fu et Li, 1993
					F de Fu et Li	Le nombre de variants nucléotidiques dérivés présents une seule fois dans l'échantillon est comparé au nombre moyen de différences entre paires de séquences	Fu et Li, 1993
					Test Hudson-Kreitman-Aguade (HKA)	Compare le degré de polymorphisme intra- et interspécifique entre espèces et au moins deux loci	Hudson <i>et al.</i> , 1987
					F_S de Fu		Fu, 1997
Augmentation des taux de mutations non-synonymes par rapport aux taux de mutations synonymes	Entre espèces	Multiloci – Test d'hétérogénéité	Peu puissant	Sélection positive ancienne et récurrente	Test dN/dS , Ka/Ks	Compare les taux de substitutions non-synonymes et de substitutions synonymes dans les régions codantes	Li <i>et al.</i> , 1985 Nei and Gojobori, 1986
					Test McDonald-Kreitman (MK)	Compare les nombres de substitutions non-synonymes et de substitutions synonymes intra- et inter-espèces	McDonald et Kreitman, 1991

Tableau SB.2 : Tests de neutralité fréquemment utilisés (modifié d'après Bamshad et Wooding, 2003 ; Biswas et Akey, 2006 ; Sabeti *et al.*, 2006 ; Garrigan et Hedrick, 2003)

L'objectif de ce paragraphe n'est pas de détailler toutes ces méthodes pour lesquelles de bons articles de synthèse existent (Nielsen, 2001; Ford, 2002; Nordborg et Innan, 2002; Garrigan et Hedrick, 2003; Nielsen, 2005; Wright et Gaut, 2005; Biswas et Akey, 2006; Sabeti *et al.*, 2006). Le tableau SB.2 résume ces différentes méthodes. La quasi-totalité des tests statistiques utilisés ont été construits sous l'hypothèse que les populations étudiées sont conformes au modèle neutraliste (Kimura).

1.4.4. Méthodes de détection de la diversité génétique

1.4.4.1. Les marqueurs moléculaires

Depuis l'époque des chasseurs-cueilleurs et jusqu'au milieu du XIX^{ème} siècle s'est déroulé le processus de domestication de la quasi-totalité des plantes aujourd'hui cultivées. Cette longue période a permis l'évolution des espèces cultivées liée à des pressions de sélection environnementales et humaines créant ainsi une très grande diversité génétique. Puis, un phénomène d'érosion génétique est apparu en Europe après la seconde guerre mondiale. La diversité génétique a été fortement perturbée du fait de l'intensification des cultures et l'apparition de différentes maladies.

Le développement des technologies de biologie moléculaire ouvre de nouvelles possibilités pour les études de diversité génétique. Les marqueurs moléculaires permettent de caractériser un génome de manière fiable, spécifique et rapide. Ce paragraphe décrit les techniques moléculaires les plus couramment utilisées pour l'évaluation de la diversité génétique.

1.4.4.1.1. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

La méthode RAPD (Random amplified polymorphic DNA) est une technique fondée sur l'amplification de gènes à l'aide de la PCR. Les fragments d'ADN sont amplifiés au hasard dans le génome (Welsh et McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Plusieurs amorces courtes de séquences définies arbitrairement sont créées afin qu'elles puissent s'hybrider de façon aléatoire dans le génome. En outre, cette technique ne nécessite pas de connaître au préalable la séquence de l'ADN cible. Cette méthode a été employée pour beaucoup d'organismes et particulièrement pour les plantes (Sharma et Mohapatra, 1996). Une des limites de cette technique est qu'elle ne doit être utilisée sur des fragments d'ADN génomique dégradés afin d'être exploitables. Cette technique a par exemple été utilisée pour détecter le polymorphisme entre quatre clones de raisin de table du nord-ouest du Panama (Maia *et al.*, 2009).

La méthode de polymorphisme de longueur de fragments amplifiés [AFLP ; (Vos *et al.*, 1995)] est l'amplification sélective des fragments de restriction issus d'un échantillon d'ADN génomique. L'ADN génomique est digéré par deux enzymes, l'une coupant rarement, l'autre coupant fréquemment. Des adaptateurs sont ensuite ajoutés aux extrémités des sites de coupure pour que les amorces puissent se fixer sur les fragments. Afin d'augmenter la quantité d'ADN, une pré-amplification est effectuée sur tous les fragments (amorces sans nucléotides sélectifs). L'amplification sélective permet ensuite d'ajuster le nombre de fragments à observer. Sur gel d'acrylamide, plusieurs dizaines de fragments (généralement entre 500 pb et 100 pb) peuvent donc être visualisés en une seule PCR suivie d'un seul gel, sans nécessiter de connaissances préalables sur l'espèce. Cette technique est également utilisée pour identifier les différences génétiques entre les clones de vigne. Par exemple, 24 accessions de *Vitis vinifera* cv. Traminer ont été caractérisées en utilisant différents marqueurs moléculaires dont les AFLP (Imazio *et al.*, 2002).

1.4.4.1.2. Polymorphisme de répétition

Environ 30% de la partie non codante du génome humain sont constitués de séquences répétées. Le polymorphisme de répétition est créé par des séquences courtes (dites séquences noyau ou motif de base), non codantes, répétées de manière juxtaposée. Ces séquences montrent une très grande variabilité dans le nombre de répétitions dites en tandem de la séquence noyau et sont transmises de façon stable selon les lois mendéliennes. Selon la structure et le nombre de répétitions du motif de base formant le polymorphisme, on distingue les minisatellites et les microsatellites.

1.4.4.1.2.1. Minisatellites

La découverte des minisatellites par Alec Jeffreys en 1985 (Jeffreys *et al.*, 1985) a révolutionné l'utilisation de l'ADN en matière d'identification et de filiation. Le motif de base de ces marqueurs, également appelés VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (Nakamura *et al.*, 1987), compte entre 9 et 100 pb. Il est réitéré entre deux et quelques centaines de fois à chaque locus (Tautz, 1989; Tautz, 1993) générant ainsi des fragments de 500 pb à 20 kpb en taille. Les minisatellites se trouvent plus fréquemment dans les régions subtélomériques des chromosomes (Royle *et al.*, 1988; Amarger *et al.*, 1998) et leur variabilité semble liée à des recombinaisons méiotiques ("*crossing-over*") inégales et des conversions génétiques (Jeffreys *et al.*, 1998).

AATGCTGGAATTCTAATGC	AATGCTGGAATTCTAATGC
TTACGACCTTAAGATTACG	TTACGACCTTAAGATTACG
AATGCTGGACTTCTAATGC	AATGCTGGA-TTCTAATGC
TTACGACCTGAAGATTACG	TTACGACCT-AAGATTACG
a	b

Figure SB.4 : Polymorphismes ponctuels de séquence

a- Polymorphisme de séquence d'un seul nucléotide (SNP)

b- Polymorphisme d'insertion ou de délétion d'un nucléotide (indel)

1.4.4.1.2.2. Microsatellites

Les microsatellites ou SSR (répétitions de séquences simples) ou STR (séquences répétées en tandem) consistent en une séquence d'ADN longue de quelques nucléotides (2 à 6 pb) répétée plusieurs fois en tandem (deux à cinquante fois à chaque locus) (Litt et Luty, 1989; Tautz, 1989). Les microsatellites génèrent des allèles de petite taille (50 à 500 pb et sont, par conséquent, facilement amplifiables. Ils ont une distribution plutôt uniforme sur le génome avec la présence d'un locus tout les 6 à 10 kpb (Beckmann et Weber, 1992). Les microsatellites sont très variables ; sur un locus, ils montrent souvent des dizaines d'allèles différents l'un de l'autre dans le nombre de répétitions. Ils sont les marqueurs de choix pour les études sur la diversité et la cartographie des loci à effets quantitatifs (QTL).

Les marqueurs microsatellites sont devenus des outils de choix pour l'identification des variétés de vigne et leurs propriétés permettent des applications plus larges telles que la cartographie des génomes, les études phylogénétiques et d'évolution. De nombreux articles relatent l'utilisation des microsatellites pour l'étude de la diversité génétique chez la vigne (Sefc *et al.*, 2001; Hocquigny *et al.*, 2004; Pelsy *et al.*, 2010).

1.4.4.1.3. Polymorphisme ponctuel de séquence (SNP)

La forme la plus abondante de variation de séquence - les SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) - suscite beaucoup d'attention depuis quelques années de la part de la communauté scientifique. Les SNPs constituent la majorité du polymorphisme du génome (90% du polymorphisme du génome humain) (Brookes, 1999).

Ce sont des substitutions d'un seul nucléotide qui se produisent à des positions ponctuelles dans le génome (Figure SB.4a), générant des allèles différents (Brookes, 1999) mais qui ne changent pas la longueur globale de la séquence d'ADN.

Les petites insertions et délétions (indels), souvent comprises dans la dénomination SNP utilisée de manière très large, ne correspondent pas strictement à la définition ci-dessus (Figure SB.4b) puisqu'un tel événement peut induire un décalage du cadre de lecture de la séquence (frameshift). A l'origine, les SNPs sont issus de mutations survenues dans les cellules germinales et qui ont échappé au système de réparation de l'ADN. Ainsi, la mutation a pu être transmise à la descendance, à condition bien sûr qu'elle ne soit pas létale. On observe un SNP lors du changement d'une base en une autre : transition ou transversion. Les transitions correspondent au remplacement d'une purine par une autre purine ($G \leftrightarrow A$) ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine ($C \leftrightarrow T$).

Les transversions sont des changements de purine en pyrimidine ou inversement ($C \leftrightarrow A$, $C \leftrightarrow G$, $T \leftrightarrow A$, $T \leftrightarrow G$). Les polymorphismes les plus fréquents sont les transitions puisqu'elles n'impliquent pas le changement de noyau des bases azotées. Ainsi la taille et la structure globale du nucléotide ne sont pas modifiées et le système de réparation ne détecte pas le changement. De même, il semble que la prédominance de substitutions $C \leftrightarrow T$ ($G \leftrightarrow A$ sur le brin complémentaire) soit aussi liée aux réactions de désamination de méthylcytosines (Holliday et Grigg, 1993). Ainsi 2/3 des SNP impliquent une transition de C en T (Brookes, 1999). Selon l'endroit où ils apparaissent, ces polymorphismes peuvent avoir des effets différents sur le phénotype. La diversité nucléotidique dans les exons est très inférieure à celle qui est observée dans les régions non-codantes du génome. La plupart des SNPs sont localisés dans les régions non codantes et n'ont aucun impact direct sur le phénotype d'un individu. Les SNPs exoniques n'aboutissent à des changements non synonymes de codons que dans 50% des cas (Nickerson *et al.*, 1998). Les SNPs des régions codantes qui affectent la fonction ou la structure des protéines encodées peuvent avoir des répercussions importantes. Les SNPs des régions non-codantes peuvent aussi affecter la régulation des gènes ou présenter un déséquilibre de liaison avec une autre mutation. On trouve approximativement un SNP toutes les 1000 pb dans les régions non codantes du génome humain et un SNP toutes les 3000 pb dans les régions codantes (Brookes, 1999). La fréquence des SNPs semble plus importante chez les plantes. Par exemple, chez le maïs, on trouve un SNP toutes les 100 pb ou même 50 pb, selon la région considérée (Rafalski, 2002), chez le soja, 5 SNPs sont trouvés toutes les 1000 pb (Coryell *et al.*, 1999).

Comparés aux autres marqueurs moléculaires, les SNPs ont une répartition homogène dans le génome et sont généralement très nombreux. Les SNPs peuvent servir de marqueurs pour suivre l'évolution des espèces (Crow, 1995; Li *et al.*, 1996).

Il existe actuellement de nombreuses techniques visant à mettre en évidence la présence de SNP dans l'ADN. Chaque technique présente des avantages et des inconvénients, il est donc difficile d'en citer une comme étant idéale.

Le TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) est une méthode de génétique inverse, basée sur la capacité d'une endonucléase à détecter les mésappariements dans un double brin d'ADN et à couper à leur niveau. La séquence d'intérêt est amplifiée par PCR avec des amorces fluorescentes. Les mésappariements apparaissent lorsque deux brins d'ADN ne possèdent pas la même séquence, créant ainsi des hétéroduplexes lors de leur appariement.

Cela permet de détecter des points de mutation uniques induits par une mutagenèse chimique. Les mutations sont reconnues par une endonucléase qui va cliver l'ADN aux endroits de mutations et de cette manière générer des fragments fluorescents de tailles différentes (McCallum *et al.*, 2000). Cette technique peut être utilisée pour détecter du polymorphisme inconnu (EcoTilling) là où d'autres techniques ne sont pas suffisamment résolutive. L'EcoTilling est une méthode fondée sur la capacité du Tilling à détecter des mutations et est adaptée à la mise en évidence du polymorphisme du génome, dont principalement les SNP (Comai *et al.*, 2004). Un individu de référence est choisi et un pool d'individus différents (nommé écotype) est constitué. L'écotype est ensuite comparé à l'individu de référence.

1.4.4.2. Le séquençage direct

Le séquençage d'ADN permet de mesurer la diversité la plus fondamentale car tous les marqueurs sont dérivés du polymorphisme de l'ADN. Les technologies de séquençage ont été grandement améliorées ces dernières années, elles permettent de générer plusieurs gigabases par semaine, les produits PCR peuvent être séquencés directement et cibler toute région génomique d'intérêt. Les résultats sont très hautement reproductibles et informatifs.

2. La vigne

2.1. Domestication et évolution

Les premières traces de viticulture ont été découvertes dans l'actuelle Géorgie et datent de plus de 7000 ans (Rowley et Ribaut, 2003). On y a découvert des vases vinaires antiques et plus de soixante variétés de vigne (*Vitis vinifera*) sauvage dont les raisins auraient été vinifiés dès le milieu du second millénaire avant notre ère. La culture de la vigne se serait ensuite répandue vers les pays tempérés, du Moyen Orient jusqu'à l'Occident européen, en suivant le développement des grandes civilisations. Au Moyen-Age, le vignoble et les vins sont entrés dans une phase d'essor à l'instigation du christianisme. L'ancienne France monarchique a définitivement fixé l'entretien des vignobles comme culture traditionnelle (Jacquemont, 1993).

A partir de la deuxième moitié du XIX^e siècle, les introductions successives de différentes maladies comme l'oïdium, le mildiou et surtout le phylloxéra ont provoqué un véritable bouleversement des comportements et des pratiques viticoles en Europe. L'oïdium a été observé pour la première fois en 1847 en Angleterre, après l'importation de plants contaminés venant des Etats-Unis. Avec l'apparition du mildiou et du black-rot en 1878 et 1885, les traitements phytosanitaires se sont généralisés (Pouget, 1990). Le phylloxéra a été observé pour la première fois en France en 1868, à Nîmes et à Bordeaux. Le puceron qui en est responsable a été introduit en Europe par l'importation de variétés américaines infectées et a ensuite ravagé la quasi-totalité du vignoble français et européen en l'espace de 25 ans. La crise phylloxérique a nécessité la reconstitution de ces vignobles en généralisant le greffage des cépages traditionnels sur des porte-greffes américains résistants. Cette crise a entraîné une perte importante de la diversité génétique, puisque seuls les cépages les plus importants économiquement ont été replantés.

2.2. Importance économique et culturelle

La vigne est une production agricole traditionnelle qui occupe une place économique importante et serait même un fait de civilisation si l'on en croit Jean-Robert Pitte (Pitte, 2004). Ainsi, l'enjeu de la vigne dépasse sa dimension économique c'est une composante culturelle et sociale des sociétés occidentales. Elle correspond à un style de vie voire à une culture nationale et promet bon nombre d'emplois.

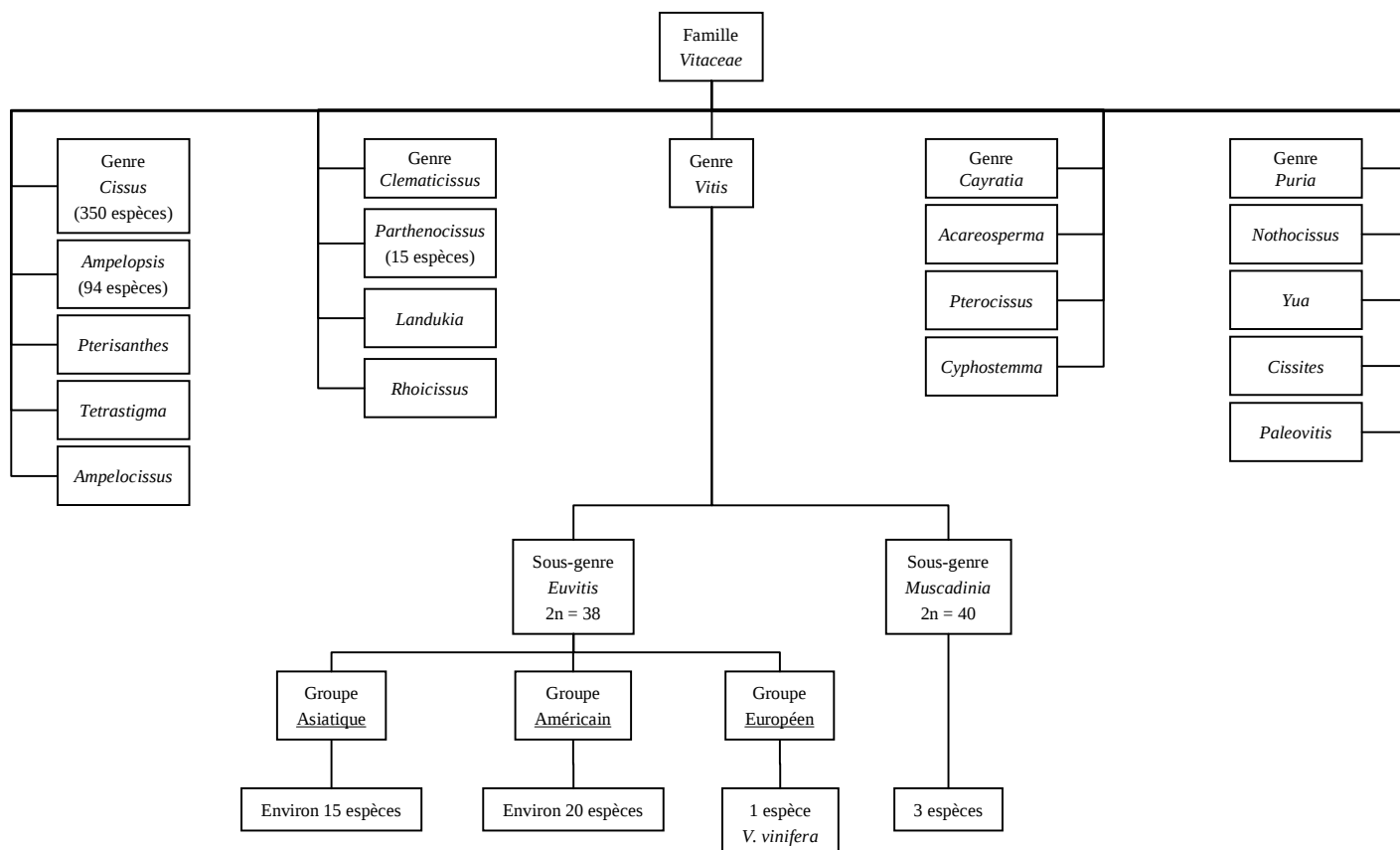


Figure SB.5 : Classification systématique des *Vitaceae* (d'après Galet, 1993)

Selon la classification, *Muscadinia* peut être considéré comme un sous-genre de *Vitis* ou comme un genre à part entière.

Le raisin n'est pas seulement utilisé comme fruit à la consommation directe mais est aussi à la base de produits à forte valeur ajoutée tels que le vin, l'huile, le vinaigre ou les cosmétiques (polyphénols).

Actuellement, la vigne représente seulement 3% des terres cultivées en France, mais environ 20% de la valeur des produits agricoles français. En 2006, l'hexagone se plaçait parmi les premiers producteurs avec 18,5% de la production mondiale de vin (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture). Les exportations représentaient 14,78 millions d'hectolitres, essentiellement en direction de nos voisins européens (Grande-Bretagne, Allemagne), mais aussi vers les Etats-Unis et plus récemment vers les marchés asiatiques. Les Français font également partie des plus grands consommateurs, avec une moyenne de 53,8 litres de vin par habitant et par an en 2006 même s'il y a une légère décroissance (-1,6% / 2005 ; source FAO).

La vigne est cultivée en France dans des régions aux conditions climatiques très différentes, climat semi-continental (Alsace, Champagne, Bourgogne), océanique (Bordelais, Vallée de la Loire) ou méditerranéen (Vallée du Rhône, Midi, Provence et Corse). Les vignes cultivées en France sont composées de 50 cépages principaux. Les 10 principales variétés de cuve représentent 75% de la production viticole française : Merlot, Grenache, Ugni blanc, Carignan, Syrah, Cabernet sauvignon, Chardonnay, Cabernet franc, Gamay, Pinot noir. Le territoire français produit près de 400 vins d'appellation contrôlée et 150 vins de pays. En Alsace, les vins les plus renommés sont le Riesling, le Muscat ottonel, le Gewurztraminer, le Pinot gris et le Pinot blanc.

2.3. Taxonomie

La vigne, plante angiosperme dicotylédone, est une liane de la famille des *Vitaceae*, anciennement famille des *Ampelideae* (Planchon, 1887). Cette famille, associée aux familles des *Rhamnaceae* et des *Leeceae*, forme l'ordre des *Rhamnales*. La famille des *Vitaceae* comprend 19 genres dont le genre *Vitis* (Galet, 1993; Galet, 2000) (Figure SB.5). Les *Vitaceae* sont, en général, des arbrisseaux à tiges sarmenteuses, grimpant comme des lianes, s'attachant à des supports variés grâce à des vrilles opposées aux feuilles. Le genre *Vitis* est divisé en 2 sous-genres, *Euvitis* et *Muscadinia* (Planchon, 1887).

Le sous-genre *Muscadinia* comprend trois espèces diploïdes ($2n = 40$ chromosomes), originaires du Mexique et des Etats-Unis. L'espèce *rotundifolia* est utilisée dans différents programmes de sélection pour sa résistance ou sa tolérance à de nombreux agents pathogènes de la vigne, comme le mildiou, l'oïdium et le phylloxéra.

Le sous-genre *Euvitis* regroupe les vignes dites « vraies » et comprend environ soixante espèces diploïdes ($2n = 38$ chromosomes) localisées en Asie orientale et en Amérique du Nord. Ce sous-genre est réparti en trois groupes selon leur origine et leur répartition géographique : asiatique, américaine et européenne (Huglin et Schneider, 1998).

La vigne asiatique comprend une quinzaine d'espèces qui sont résistantes aux maladies.

La vigne américaine est composée d'une vingtaine d'espèces qui présentent généralement une bonne résistance aux agents pathogènes, notamment au phylloxéra, mais n'ont que peu d'intérêt d'un point de vue oenologique. Elles sont de ce fait utilisées comme porte-greffes pour leur résistance aux maladies ou bien croisées avec *V. vinifera* pour produire des hybrides.

La vigne européenne n'est constituée que d'une seule espèce, *Vitis vinifera* Linné cultivée (*sativa*) et sauvage (*silvestris*) (Huglin et Schneider, 1998). Cette espèce regroupe l'ensemble des cépages cultivés dans les vignobles français. Le compartiment cultivé de l'espèce, *V. vinifera ssp. sativa*, comprend plus de 6000 variétés ou cépages, qui présentent des caractéristiques morphologiques ou ampélographiques très différentes (Alleweldt et Possingham, 1988). Ce nombre est en perpétuelle évolution du fait de la disparition de certains cépages et de la création de nouvelles variétés.

2.4. Modes de propagation de la vigne

2.4.1. La reproduction sexuée

La reproduction sexuée résulte de la fusion des gamètes issus de deux individus (allofécondation) ou du même individu (autofécondation). La reproduction sexuée peut créer de la diversité génétique et ainsi participer à l'adaptation et à l'évolution des espèces. En effet, deux mécanismes peuvent en être à l'origine : la mutation et la recombinaison génétique. La mutation provoque l'apparition de la majorité des formes alléliques présentes dans la population.

La recombinaison génétique implique deux mécanismes : le crossing-over (échange de matériel génétique entre deux chromosomes homologues) et la distribution aléatoire des chromosomes homologues de chaque paire dans les gamètes ($2^{\text{ème}}$ loi de Mendel).

Chez la vigne cultivée, les pépins issus de la reproduction sexuée représentent la première forme de conservation. Cette technique génère une descendance non identique au matériel de départ. La diversité ainsi créée peut être valorisée par la recherche de génotypes adaptés à de nouvelles conditions environnementales. Cependant, le milieu professionnel viticole cherche au contraire à multiplier à l'identique une plante qui présente des qualités d'intérêt agronomique, technologique et organoleptique.

2.4.2. La multiplication végétative

La technique de la multiplication végétative permet d'obtenir rapidement des plants conformes à la souche de départ, ce qui a probablement contribué au succès de la domestication de la vigne. De nombreuses techniques sont employées pour multiplier végétativement les espèces cultivées, par exemple le bouturage qui consiste à mettre en terre un fragment de plante dépourvu de racines. Le marcottage est un cas particulier de bouturage puisqu'un rameau de la plante est couché sous terre et reste lié à la plante mère jusqu'à la formation de racines. Certaines espèces, comme le fraisier (stolon) et le framboisier (drageon), se propagent par voie végétative à l'état naturel. C'est également l'unique moyen de propagation des variétés de vignes apyrènes (qui ne produisent pas de graines).

Lors de l'invasion du phylloxera, il a été nécessaire de greffer les variétés européennes sur des porte-greffes d'espèces américaines résistantes à ce parasite. Le phylloxéra étant toujours présent dans le vignoble européen, le greffage sur des porte-greffes résistants est devenu le seul procédé permettant la culture de la vigne.

Par opposition à la multiplication par voie sexuée, qui entraîne la ségrégation des caractères, la multiplication végétative garantit en théorie l'identité au matériel de départ. Les descendants, possédant théoriquement le même patrimoine génétique, présentent généralement les mêmes caractéristiques agronomiques que la plante dont ils sont issus. L'apparition de mutations somatiques et épigénétiques représente pratiquement les uniques sources de variation génétique chez les plantes à multiplication végétative (Bessis, 2007; Pelsy, 2010). Pour les espèces fortement hétérozygotes comme la vigne, la multiplication végétative est donc un moyen efficace pour l'homme de fixer rapidement les caractères jugés intéressants.

2.5. Génome de la vigne

La connaissance du génome de la vigne a pour objectif de favoriser le transfert des résultats des espèces modèles vers la vigne. En 2001, un consortium international, le « International Grape Genome Program » (IGGP) a été créé pour coordonner et organiser le séquençage du génome de la vigne. Ce consortium a permis de passer d'une situation où les ressources génomiques disponibles étaient quasiment inexistantes au démarrage du séquençage complet du génome de la vigne en 2005. Entre temps, de nombreuses séquences complètes ou partielles de gènes exprimés (EST, Expressed sequence tag) ont été déposées dans les bases de données internationales et des cartes physiques et génétiques ont été réalisées (Adam-Blondon *et al.*, 2004; Riaz *et al.*, 2004; Adam-Blondon *et al.*, 2005). Le génome de la vigne est le quatrième génome de plante à fleurs à être séquencé après l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*), le riz (*Oryza sativa*) et le peuplier (*Populus trichocarpa*), le second pour les espèces ligneuses et le premier pour les plantes à fruits charnus. Les premières données de séquençage du génome de la vigne ont été disponibles au milieu de l'année 2007.

Un premier projet de séquençage du génome de la vigne est réalisé par une stratégie de séquençage global à partir de lectures aléatoires (Whole Genome Shot-gun) visant à couvrir 12 équivalents du génome (URL : http://www.cns.fr/externe/Francais/corps_francais.html). Cependant, les variétés de vigne présentent de nombreuses variations génétiques avec un taux d'hétérozygotie d'environ 73% pour les pinots et de l'ordre de 60 à 85% selon les variétés étudiées (Hocquigny *et al.*, 2004; Pelsy *et al.*, 2010), ce qui peut rendre son séquençage particulièrement difficile à étudier. Afin de surmonter cette difficulté, le séquençage a été réalisé sur une lignée de vigne créée à l'INRA de Colmar. Cette accession appelée « PN40024 » a été obtenue par une série d'autofécondations successives à partir du Pinot noir (Bronner et Oliveira, 1991) et présente un taux d'homozygotie proche de 93%. Ce choix a permis l'obtention d'une séquence de très haute qualité d'environ 480 millions de paires de bases (Jaillon *et al.*, 2007). La taille effective du génome de la vigne est comparable à celle du riz (*Oryza sativa*, 430 Mb), de la luzerne (*Medicago truncatula*, 500Mb) ou du peuplier (*Populus trichocarpa*, 465 Mb), et quatre fois supérieure à celle d'*A. thaliana*. Le génome de la vigne contient 30434 gènes dont respectivement 12996, 11404 et 9731 sont orthologues à des gènes de Peuplier, d'Arabette et de riz. La séquence est composée à environ 41,4% d'éléments transposables ou répétés, 30434 gènes codant des protéines et 600 gènes d'ARNt (Jaillon *et al.*, 2007).

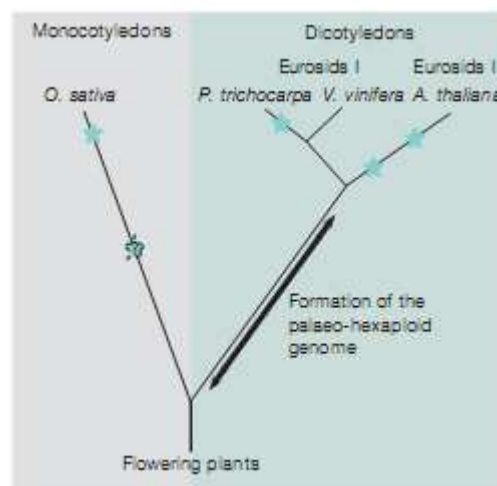


Figure SB.6 : Événements de polyploïdisation dans l'évolution des plantes (d'après Jaillon *et al.*, 2007)

Chaque étoile indique un événement de duplication totale de génome (tétraploïdisation) sur cette branche. Le point d'interrogation indique que des événements anciens sont visibles dans le génome du riz mais d'autres séquences de monocotylédones sont requises pour résoudre cette interrogation.

La formation du génome paléo-hexaploïde s'est produites après la divergence des monocotylédones.

Les gènes composent 46 % du génome parmi lesquelles 7 % d'exons et 37 % d'introns. Enfin, le séquençage du génome de la vigne indique qu'il pourrait exister environ 400 gènes codant des protéines de résistance chez la vigne (Jaillon *et al.*, 2007).

Parallèlement, un autre laboratoire italien s'est lancé dans le séquençage du génome complet du Pinot noir clone ENTAV 115 (Velasco *et al.*, 2007). Si les premières données ont été disponibles à la fin de l'année 2006, la taille des séquences assemblées (contigs) a rapidement cessé d'évoluer (URL : <http://genomics.research.iasma.it/iasma/>). Il semble en effet que le taux d'hétérozygotie du génome de cette variété ait considérablement ralenti l'assemblage des données. Ce projet vise à couvrir 6,5 équivalents du génome. Les auteurs estiment la taille du génome de *V. vinifera* à 504,6 Mb. Le nombre de gènes prédit est de 29585 avec environ deux millions de SNP. La longueur de l'ADN répété est estimée à 27,4 % de la taille du génome. Deux mille quatre gènes de facteurs de transcription ont été identifiés et représentent 6,7 % du génome. Les chromosomes homologues du pinot noir diffèrent en moyenne de 11,2 % de leur séquence d'ADN. Le génome de la vigne est dynamique, ceci est dû en partie à l'activité des éléments transposables.

Plusieurs scénarios concernant l'évolution du génome de la vigne se confrontent. Selon plusieurs auteurs, le génome d'*Arabidopsis* et du peuplier, ont probablement subi trois séries de duplication entière lors de l'évolution. La première duplication aurait eu lieu avant la divergence des monocotylédones et des dicotylédones alors que la seconde aurait eu lieu avant la divergence d'*Arabidopsis* et du peuplier. Les duplications les plus récentes dans le peuplier et *Arabidopsis* se sont produites après leur divergence.

La plupart des gènes se retrouvent dans deux autres régions paralogues, ce qui amène les auteurs à proposer que l'origine du génome de la vigne serait paléo-hexaploïde (Jaillon *et al.*, 2007). L'analyse comparée du génome de la vigne et de celui de l'arabette, du riz et du peuplier a révélé que l'organisation du génome de la vigne était la plus proche du génome ancestral des dicotylédones. Le génome de la vigne résulterait de l'association de trois génomes indépendants ancestraux différents (formation du génome paléo-hexaploïde ancestral). Selon l'hypothèse de Jaillon *et al.*, (2007), le génome paléo-hexaploïde serait apparu après la divergence entre les mono- et les dicotylédones et serait à l'origine par exemple des génomes d'*Arabidopsis*, de la vigne ou du peuplier. Le génome de la vigne n'aurait pas subi de nombreux réarrangements chromosomiques et en particulier, ne présente pas d'épisodes récents de duplication de son génome, contrairement à *Arabidopsis thaliana* et *Populus trichocarpa* (Figure SB.6).

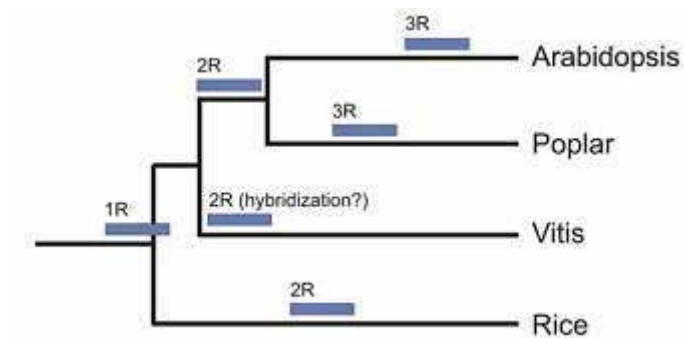


Figure SB.7 : Scénario de l'évolution du génome des Angiospermes (d'après Velasco *et al.*, 2007)

Scénario alternatif à celui proposé par Jaillon *et al.* (2007) pour expliquer l'évolution du génome des Angiospermes. Les analyses suggèrent qu'il y ait eu un événement à grande échelle de duplication, probablement un événement d'hybridation, dans la lignée *Vitis* avant la séparation des *Vitis* et des autres dicotylédones.

Les résultats obtenus par Jaillon *et al.*, (2007) sont en désaccord avec ceux obtenus par Velasco *et al.*, (2007). Le laboratoire italien présente un scénario alternatif à celui présenté par Jaillon *et al.*, (2007). Le génome du peuplier et d'*Arabidopsis* aurait subi trois duplications. La première duplication a été partagée par toutes les dicotylédones, la seconde aurait eu lieu avant la divergence entre *Arabidopsis* et le peuplier mais après la divergence entre les *Vitis* et les dicotylédones. Une troisième duplication, spécifique à *Arabidopsis* et au peuplier, se serait produite après leur divergence. Etant donné que beaucoup de régions du génome des *Vitis* apparaissent en triple, la duplication du génome partagée par toutes les dicotylédones pourrait avoir été suivie d'un événement d'hybridation dans les *Vitis* peu de temps après sa divergence de la lignée menant au peuplier et à *Arabidopsis* (Figure SB.7).

Ces projets de séquençage visent à permettre l'acquisition de connaissances sur la fonction des gènes chez la vigne en étudiant la génomique fonctionnelle de la vigne. Il est ainsi possible de mettre en évidence des gènes codant des protéines de défense ou bien des protéines avec d'autres fonctions.

2.6. La vigne et ses pathogènes

2.6.1. Les principaux pathogènes de la vigne

La vigne est sensible à de nombreuses maladies cryptogamiques telles que l'anthracnose (*Elsinoe ampelina*), le black rot (*Guignardia bidwelli*), l'excoriose (*Phomopsis viticola*), le mildiou (*Plasmopara viticola*), l'oïdium (*Erysiphe necator*), la pourriture grise (*Botrytis cinerea*) ou le rougeot (*Pseudopeziza tracheiphila*) qui s'attaquent à tous les organes verts de la plante mais aussi l'esca (*Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeacremonium aleophilum*, *Fomitiporia punctata* et rarement *Stereum hirsutum*) et l'eutypiose (*Eutypa lata*) qui touchent plus particulièrement le bois. Toutes ces maladies font peser une menace constante sur les vignobles et font l'objet de très nombreux traitements phytosanitaires (Dubos, 1999). Par exemple, selon sa virulence, le mildiou peut engendrer, en une seule contamination, des pertes allant jusqu'à 80% de la récolte potentielle. De même, les maladies du bois se sont considérablement étendues au cours des dernières années et menacent désormais sérieusement les vignobles.

La vigne est aussi sensible à des phytoplasmes responsables de maladies telles que la flavescence dorée transmise par une cicadelle. Cette maladie est en recrudescence dans les vignobles.

A

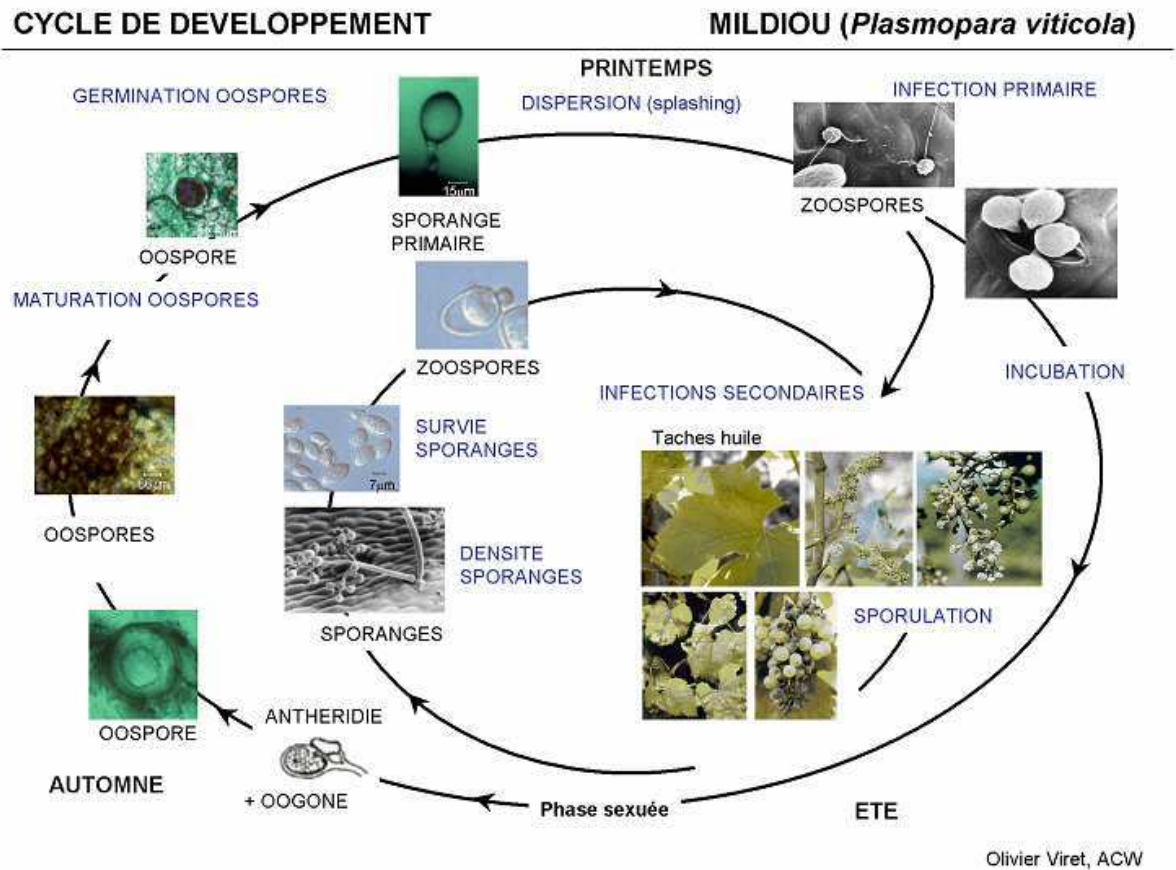


Figure SB.8 : Cycle de développement de *Plasmopara viticola* et symptômes du mildiou de la vigne

A : Cycle de développement de *P. viticola* (Olivier Viret).

B : Mildiou sur grappe au cours de la floraison

C : Feutrage de mildiou à la face inférieure d'une feuille de vigne.

Les photos B et C sont extraites du site <http://www.inra.fr/hyp3/index.html>

La vigne est également sensible à des virus comme le virus du court-noué ou de l'arabette qui sont transmis par des nématodes (*Xiphinema index*). Il n'existe pas de méthode de lutte directe contre ce virus, seul la prophylaxie peut être appliquée. D'autres ravageurs peuvent aussi engendrer d'importants dégâts tels que la pyrale ou l'eudémis (« Tordeuse de la grappe ») qui s'attaquent aux baies et génèrent ainsi des blessures qui sont autant de portes d'entrée pour *Botrytis*.

2.6.1.1. Le mildiou

Le mildiou de la vigne est une maladie causée par l'oomycète *Plasmopara viticola* (Berk. Et Curt.) Berl. et de Toni, qui appartient à la famille des *Peronosporaceae* (Figure SB.8). Il s'agit d'un parasite biotrophe obligatoire qui attaque tous les organes herbacés (rameaux, feuilles) ainsi que les organes de l'inflorescence ou de la jeune grappe, qui se dessèchent. *P. viticola* persiste pendant la saison hivernale sous forme d'oospores généralement conservées dans les feuilles mortes présentes sur le sol. Lorsque les conditions d'humidité et de température leur sont favorables, les oospores germent pour donner naissance à des sporanges qui contiennent les zoospores (forme asexuée).

Les précipitations printanières vont permettre aux zoospores de se disséminer. Les zoospores sont enkystées puis germent sur l'épiderme des feuilles de vigne et forment un tube germinatif qui pénètre dans les tissus végétaux par les stomates. Des structures spécialisées, des haustoria, se développent à partir du mycélium. Les haustoria se développent au sein des parenchymes et créent une interface d'échange par laquelle *P. viticola* prélève les nutriments nécessaires à son développement. Après cette phase de développement, il y a reproduction asexuée avec formation de sporangiophores (structures portant les sporanges) qui sortent de la plante principalement au niveau des stomates de la face inférieure des feuilles. Ces organes fructifères portent des sporanges qui vont se différencier en nouvelles zoospores capables de réaliser des contaminations secondaires (Dubos, 1999). À l'automne, la phase de reproduction sexuée conduit à la formation des oospores pour la conservation hivernale. *Plasmopara viticola* est un parasite obligatoire qui se développe essentiellement sur les feuilles et les inflorescences de vigne en engendrant un affaiblissement de la plante, une perte de rendement et de qualité des récoltes.

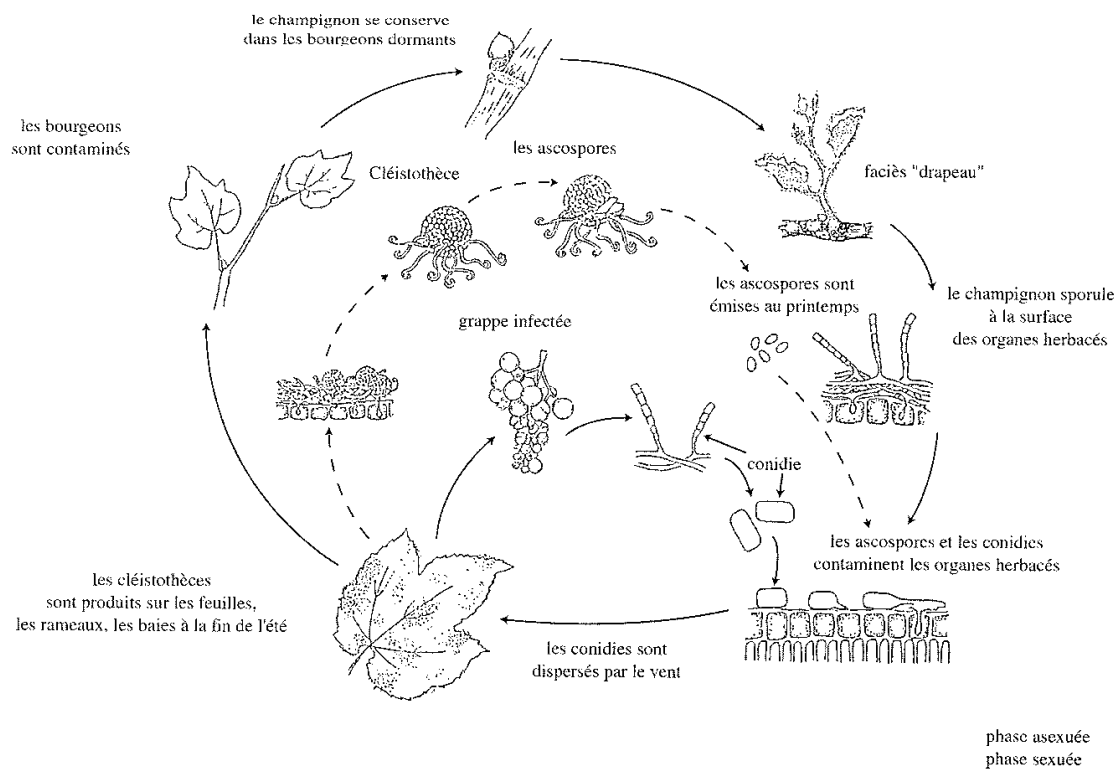


Figure SB.9 : Cycle de développement d'*Erysiphe necator*, l'agent de l'oïdium de la vigne (Dubos, 1999)

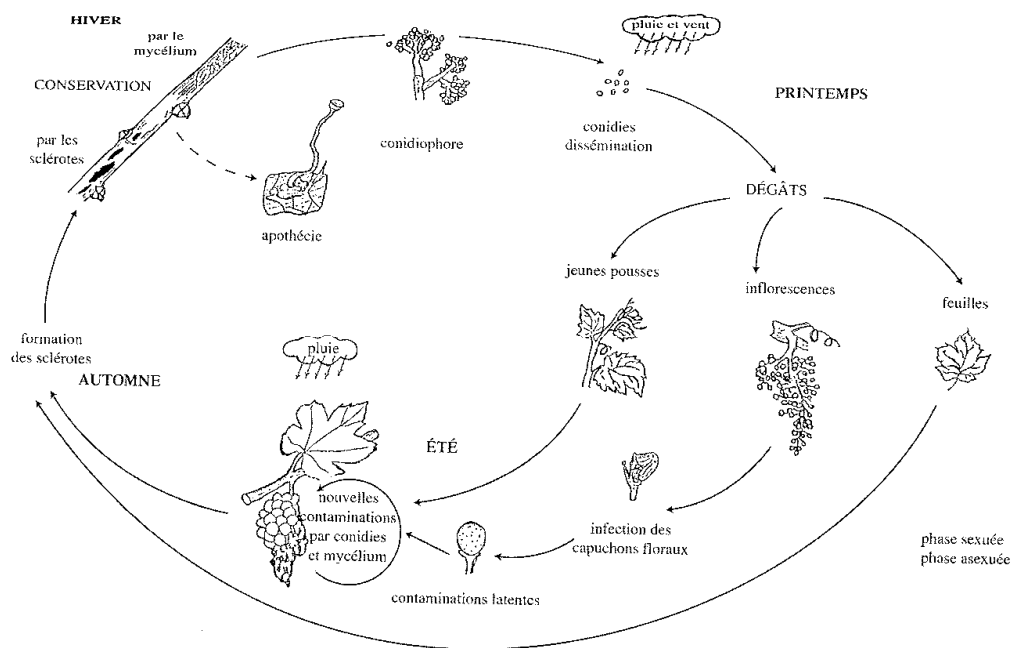


Figure SB.9 : Cycle de développement de *Botrytis cinerea*, l'agent pourriture grise (Dubos, 1999)

2.6.1.2. L'oïdium

L'oïdium est provoqué par le champignon ascomycète *Erysiphe necator* (forme parfaite ou sexuée) de la famille des *Erysiphaceae* (Figure SB.9). *E. necator* est un champignon biotrophe, un parasite épiphyte, qui ne se développe qu'en surface des cellules épidermiques. Il attaque tous les organes herbacés de la vigne, peut provoquer un affaiblissement de la plante et des diminutions importantes de la quantité et de la qualité des raisins. L'hiver le champignon peut se conserver sous sa forme mycélienne asexuée (*Oidium tuckeri*) présente dans les bourgeons dormants ou sous forme cléistothèces (forme sexuée) présents à la surface des feuilles. Au printemps, les infections primaires sont déclenchées par la libération des ascospores présentes à l'intérieur des cléistothèces ou par les conidies produites par les conidiophores à partir des mycéliums. Disséminées par le vent, ces ascospores et conidies arrivent au contact des organes herbacés de la vigne sur lesquels elles germent. Le mycélium émet alors des appressoriums qui perforent la cuticule. Des haustoria, par lesquels le champignon se nourrit, sont ensuite formés au contact des cellules épidermiques. Ensuite, les conidiophores, apparaissant notamment à la face supérieure des feuilles, libèrent de nouvelles conidies qui vont contribuer au développement de plusieurs cycles asexués. A l'automne, la phase de reproduction sexuée aboutit à la formation des cléistothèces, une des formes de conservation du champignon pendant l'hiver (Dubos, 1999).

2.6.1.3. La pourriture grise

La pourriture grise est causée par le champignon ascomycète *Botrytis cinerea* (forme asexuée) qui appartient à la famille des *Sclerotiniaceae* (Figure SB.10). L'hiver, il se conserve sous forme de sclérotés (amas condensés de mycélium de couleur brune). Lorsque les conditions sont favorables, les sclérotés donnent généralement naissance à des conidiophores qui portent des conidies ovoïdes. Le champignon peut également entrer dans sa phase de reproduction sexuée (*Botryotinia fuckeliana*) en formant des apothécies à la surface des sclérotés. Les conidies (ou les ascospores) peuvent ensuite contaminer de jeunes feuilles ou des inflorescences mais c'est surtout à la fin de l'été que *Botrytis cinerea* envahit les grappes de raisin mûr. A l'automne, le champignon forme de nouvelles sclérotés. Beaucoup d'incertitudes demeurent sur ce cycle biologique puisque l'observation de la forme sexuée reste exceptionnelle au vignoble et il semble qu'il n'existe pas de cycle épidémiologique (infections primaires puis secondaires).

Les dégâts de la pourriture grise, essentiellement occasionnés sur baies mûres, s'accompagnent de pertes de rendements mais surtout de graves altérations des qualités organoleptiques du raisin (oxydation des phénols, acidification, diminution du taux de glucose, modification des arômes...) (Dubos, 1999). Cependant, *Botrytis cinerea* est également l'agent responsable de la pourriture noble, à la base des vins liquoreux de Sauternes.

2.6.2. Les alternatives à la résistance naturelle

Il existe de nos jours, différentes méthodes de lutte pour pallier au manque de résistance naturelle des plantes.

2.6.2.1. La lutte chimique

Contre les trois maladies majeures de la vigne (mildiou, oïdium et *Botrytis*), la lutte est préventive et principalement assurée par l'application au vignoble de fongicides. Son efficacité n'est pas toujours vérifiée à long terme (apparition de résistances) (De Waard *et al.*, 1993). De plus, ces antifongiques ne sont pas toujours sans laisser de résidus dans les sols ou les eaux. Des résidus peuvent aussi se retrouver sur les raisins et le vin ce qui peut engendrer un arrêt de la fermentation lors de la fabrication des différents produits. Depuis quelques années, le mot d'ordre est à la lutte chimique raisonnée.

Elle vise à gérer l'apparition de résistance et met en jeu une alternance des produits. Cette lutte raisonnée fait aussi appel à un meilleur respect des délais d'emploi des produits, minimum trois semaines avant la récolte, afin d'éviter les résidus sur les raisins et dans le vin.

La lutte chimique reste le principal moyen de lutte des viticulteurs contre les maladies de la vigne. Toutefois, l'utilisation de pesticides présente de nombreux risques significatifs :

- sur la santé des viticulteurs et des travailleurs agricoles (la viticulture est le deuxième secteur le plus exposé en France à ce facteur de risque),
- sur la santé des consommateurs (bien que les résidus de pesticides détectés dans les raisins et dans les vins restent faibles),
- sur la qualité des eaux (les eaux souterraines ou superficielles dans lesquelles sont détectées de fortes quantités d'herbicides et de pesticides correspondent toutes à des bassins où la vigne est fortement représentée),
- l'apparition de souches pathogènes résistantes (Leroux *et al.*, 2002).

Les champignons peuvent développer des résistances aux fongicides dont les mécanismes peuvent être liés à la réduction de la perméabilité de leur membrane plasmique ou à la mise en place de processus de détoxification du produit actif. Aussi, l'évolution des pratiques voit se développer des méthodes de lutte chimique raisonnée et intégrée. Le recours à la lutte chimique raisonnée permet une certaine limitation des traitements phytosanitaires basée sur le choix de la date du premier traitement, des produits utilisés et de la cadence d'application. La lutte intégrée est une approche plus durable qui combine les moyens biologiques, agricoles, physiques et chimiques pour combattre les organismes nuisibles tout en minimisant les risques pour la santé et l'environnement. De plus, de nombreux efforts doivent être faits par les viticulteurs de manière à maîtriser et gérer les effluents issus de leur activité. Toutefois, d'autres méthodes complémentaires décrites ci-dessous peuvent être mises en œuvre pour lutter contre les agents pathogènes de la vigne.

2.6.2.2. Les méthodes alternatives

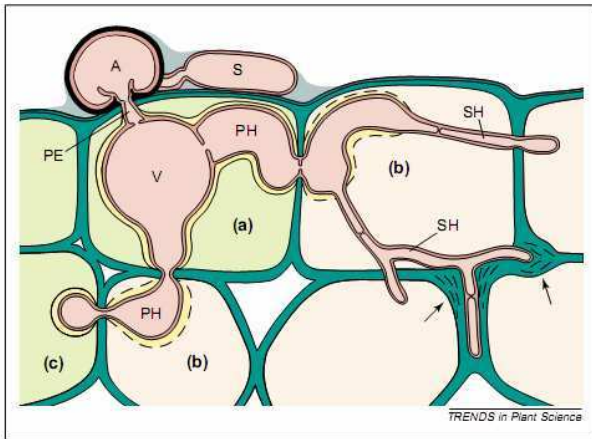
L'apparition de souches résistantes chez *Botrytis*, le mildiou et l'oïdium mais aussi une prise de conscience plus accrue de l'environnement ont fait naître, au cours des dernières décennies, le besoin de stratégies alternatives qui pourraient conduire à une réduction des traitements antifongiques très importants chaque année. Une possibilité de stratégie alternative vise à améliorer la résistance aux agents pathogènes de la vigne à l'aide de produits biologiques (éliciteurs), par voies génétiques (production d'hybrides ou de plantes transgéniques) ou encore en utilisant des microorganismes (lutte biologique).

Des variétés d'hybrides ont été créées par croisement entre des *V. vinifera* et des espèces de *Vitis* d'origine américaine résistantes aux maladies et sont utilisées aujourd'hui comme source de résistance. La création variétale s'appuie aujourd'hui largement sur ces variétés d'hybrides pour réaliser une sélection assistée par marqueurs. L'analyse de deux populations issues de croisement entre *Muscadinia rotundifolia* (résistante à *P. viticola*) et *V. vinifera* cv Syrah (sensible à *P. viticola*) a permis de mettre en évidence deux QTL de résistance, appelés *Rpv1* et *Rpv2* (Resistance à *Plasmopara viticola*) (Wiedemann-Merdinoglu *et al.*, 2006; Thiéry *et al.*, 2007).

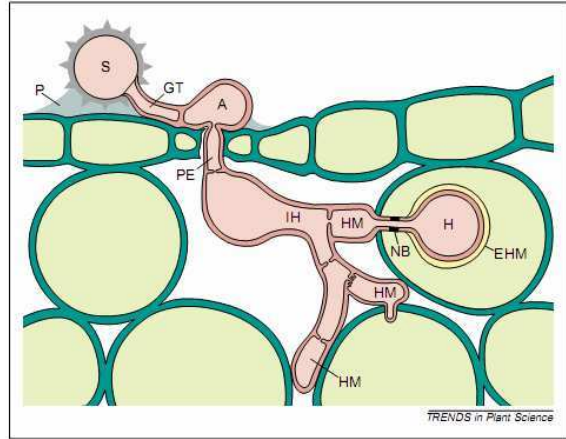
Chez la vigne, des traitements avec des microorganismes non pathogènes ou des molécules chimiques ont permis d'améliorer la résistance à plusieurs agents pathogènes. Certains microorganismes non pathogènes inhibent le développement des agents pathogènes. Par exemple, les champignons du genre *Trichoderma* peuvent coloniser des zones de la plante avant que *B. cinerea* ne puisse s'y développer (Elmer et Reglinski, 2006).

Des traitements de vignes par l'isolat *T. harzianum* (T39) augmentent leur résistance à *P. viticola* (Perazzolli *et al.*, 2008). L'application de molécules « élicitrices » et/ou « potentialisatrices » sur la vigne semble être également une bonne alternative à l'utilisation de produits phytosanitaires. Par exemple, la laminarine, un β -1,3 glucane extrait de l'algue brune *Laminaria digitata*, a montré des effets protecteurs sur feuilles détachées après une infection par *P. viticola* et *B. cinerea* (Aziz *et al.*, 2003). L'application d'acide β -aminobutyrique (BABA) ou de laminarines sulfatées potentialise des dépôts de callose et de lignine uniquement après une infection par *P. viticola* et provoque une diminution de la sporulation et du développement du mycélium (Hamiduzzaman *et al.*, 2005; Trouvelot *et al.*, 2008).

Une autre méthode de protection des plantes vis-à-vis des agresseurs consiste à modifier génétiquement les plantes en exprimant des gènes de défense issus d'autres organismes ou en sur-exprimant les gènes de défenses déjà existants (Shah *et al.*, 1997).



(1)



(2)

Figure SB.11 : Les différentes stratégies des agents pathogènes hémi-biotrophes et biotrophes (d'après Mendgen et Hahn, 2002)

(1) Infection hémi-biotrophe par *Colletotrichum lindemuthianum*. Une spore (S) s'attache à la surface de la cellule hôte pour former un tube court, qui se différencie en dôme, appelé appressorium (A). L'hyphe (PE) se développe sur la base de l'appressorium, transformant la pression interne en force mécanique pour percer la cuticule et la paroi cellulaire. La pénétration de l'hyphe dans la cellule épidermique forme une vésicule (V) et un hyphe primaire (PH) s'invagine. Il s'agit du stade biotrophe (a). Un ou deux jours après l'infection, les membranes cellulaires commencent à se détruire conduisant à la mort cellulaire (b). De nouvelles cellules hôtes sont colonisées par l'hyphe primaire et il s'en suit une phase de mort cellulaire répétée (c). Cette phase se termine dès que l'hyphe secondaire étroit (SH) se développe. Les parois végétales se détruisent à cause de la sécrétion par l'hyphe secondaire de nombreuses enzymes qui dégradent les parois cellulaires (flèche).

(2) Infection biotrophe par *Uromyces fabae*. Un tube (GT) apparaît de l'urediospore (S). Celui-ci est fixé à l'hôte par une adhérence (P). Un appressorium (A) se développe sur les pores stomatales. L'hyphe (PE) pénètre dans la chambre substomatale et s'allonge en hyphe d'infection (IH). Lorsque IH entre en contact avec la paroi cellulaire hôte, un haustoria mère (HM) est formé et l'haustoria (H) envahit la cellule hôte.

3. Interactions plantes / agents pathogènes : une guerre évolutive

3.1. Concepts généraux de phytopathologie

3.1.1. Introduction

Les plantes sont des organismes sessiles et, à la différence des animaux, il leur manque la capacité de fuir si nécessaire, de ce fait, elles subissent de nombreux stress environnementaux. Pendant leur vie, les plantes sont ainsi exposées à des conditions inhabituelles voire défavorables qui présentent un impact significatif sur leur physiologie et leur développement. Elles ont su développer malgré leur immobilité, divers mécanismes sophistiqués et efficaces pour reconnaître et combattre les microorganismes pathogènes (champignons, oomycètes, bactéries, nématodes, virus et ravageurs) lorsqu'elles sont attaquées. Une infection résulte de l'incapacité de la plante à reconnaître l'agent pathogène et dans ce cas, les stratégies peuvent être très différentes (Hammond-Kosack et Jones, 1997). Les agents pathogènes nécrotrophes ont un large spectre d'hôtes et tuent les cellules hôtes, grâce à une batterie d'enzymes de dégradation et de toxines, avant de métaboliser leur contenu (de Wit, 2007). Les agents pathogènes biotrophes envahissent les organismes vivants grâce aux haustoria, ce qui leur permet d'exploiter le métabolisme de leur hôte sans les tuer. Ils ont généralement une gamme d'hôtes plus étroite car l'infection nécessite une adaptation à l'hôte. Les agents pathogènes hémi-biotrophes agissent de façon similaire aux agents pathogènes biotrophes au début de l'infection mais leur invasion peut éventuellement conduire à la mort cellulaire de l'hôte (stratégie nécrotrophe) (de Wit, 2007) (Figure SB.11). Quand un agent pathogène envahit avec succès l'hôte et cause la maladie, l'agent pathogène est dit virulent, l'hôte est sensible et l'interaction est compatible (Glazebrook *et al.*, 1997). Dans le cas contraire, si l'hôte répond en activant des réponses de défense qui suppriment la colonisation par l'agent pathogène, alors celui-ci est dit avirulent, l'hôte est résistant et l'interaction est incompatible.

De nombreux travaux de recherche menés ces dernières années ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre les agents pathogènes et les plantes et de caractériser les gènes de résistance mis en jeu.

Chez la vigne, différentes réactions de défense ont été mises en évidence au cours de son interaction avec des pathogènes fongiques et bactériens (Jeandet *et al.*, 1995; Robert *et al.*, 2002; Bonomelli *et al.*, 2004).

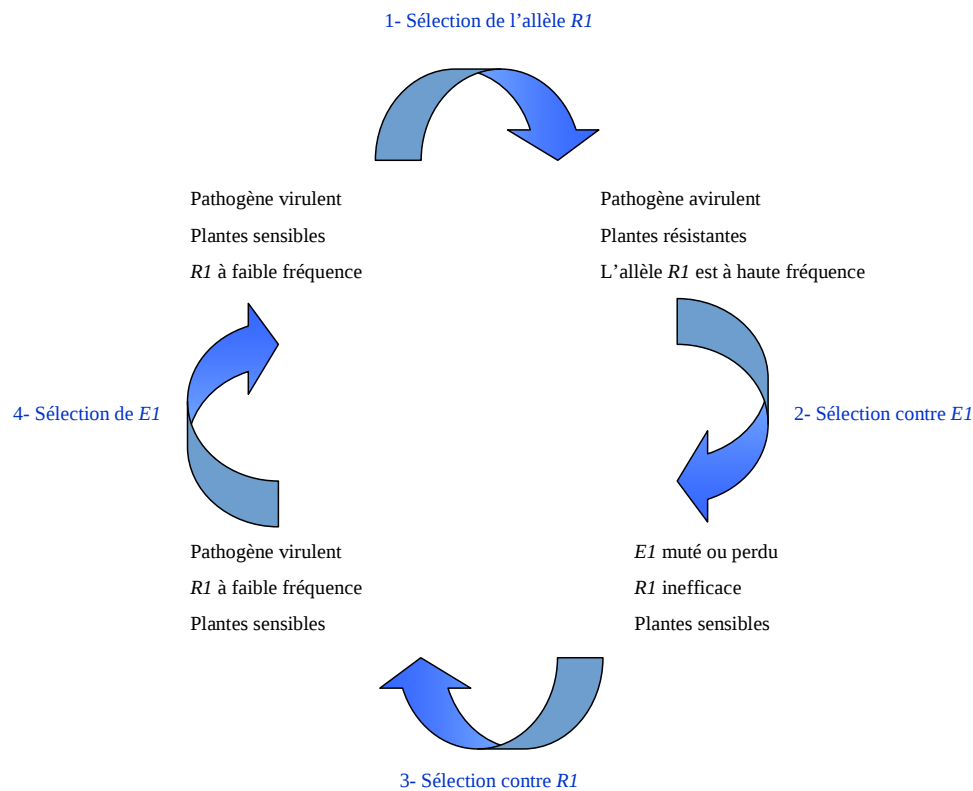


Figure SB.12 : Co-évolution d'un gène *R* de l'hôte et du gène *E* de l'agent pathogène correspondant (Jones et Dangl, 2006)

L'agent pathogène porte un gène d'avirulence (*E*) qui est reconnu par un allèle *R1* (1). Cette reconnaissance entraîne une augmentation de la fréquence de l'allèle *R1* dans la population. Les agents pathogènes pour lesquels *E* est muté sont ensuite sélectionnés car ils peuvent infecter les plantes portant l'allèle *R1* (2). L'efficacité de *R1* diminue et les plantes portant l'allèle *R1* ont un pouvoir adaptatif réduite (3). La fréquence de *R1* diminue. La population d'agents pathogènes possède toujours *E1*. En absence de *R1*, *E1* confère un meilleur pouvoir adaptatif et sa fréquence dans la population va augmenter (4). Ceci reconduit à une sélection de *R1*. Dans les populations de plantes et des agents pathogènes, ce cycle est permanent.

Ces réactions sont exprimées dans les différents organes de la vigne en réponses à des éliciteurs biotiques et abiotiques (Derckel *et al.*, 1996; Aziz *et al.*, 2003; Bonomelli *et al.*, 2004) et sont souvent mises en relation avec le caractère de tolérance ou de résistance de la vigne à de nombreux pathogènes (Reuveni, 1998; Derckel *et al.*, 1999).

3.1.2. Coévolution plantes / agents pathogènes : évolution du système immunitaire de la plante

Bien que les plantes soient soumises à un grand nombre de micro-organismes, le développement de la maladie reste l'exception. Une co-évolution entre les plantes et leurs bioagresseurs est d'après de nombreux biologistes, à l'origine de la plupart de la diversité naturelle observée sur Terre (Rausher, 2001). Ainsi, des pressions de sélection fortes sont attendues sur les gènes impliqués dans la résistance aux agents pathogènes chez les plantes. En effet, l'histoire évolutive de ces gènes est souvent modelée par la nécessité soit de reconnaître les agents pathogènes soit d'échapper à la reconnaissance, ce qui induit des profils d'évolution rapide. Les interactions plantes / microorganismes sont très complexes et impliquent une communication bilatérale au niveau moléculaire. Le succès dans la défense de la plante dépend de l'intensité et de la rapidité de perception de l'agent pathogène, de la communication cellulaire et de la capacité des cellules végétales à produire une réponse efficace contre l'agent pathogène. Ces mécanismes co-évolutifs ont fait l'objet de nombreuses revues (Chisholm *et al.*, 2006; Bent et Mackey, 2007).

La coévolution permanente entre les plantes et leurs agents pathogènes permet à chacun de trouver de nouvelles parades pour gagner du terrain face à l'adversaire (Figure SB.12). Cette co-évolution se fait en plusieurs étapes : (1) Tout d'abord, l'agent pathogène attaque et exploite la plante, (2) du fait de l'attaque de l'agent pathogène, le pouvoir adaptatif de la plante est réduit, (3) on observe alors la sélection d'un système de résistance qui peut se propager dans l'ensemble de la population de la plante, (4) qui s'accompagne d'une diminution du pouvoir adaptatif de l'agent pathogène dans les plantes qui ont acquis ce système de résistance (5) au final, la sélection d'un génotype d'agent pathogène capable de contourner la résistance va se répandre dans la population des agents pathogènes.

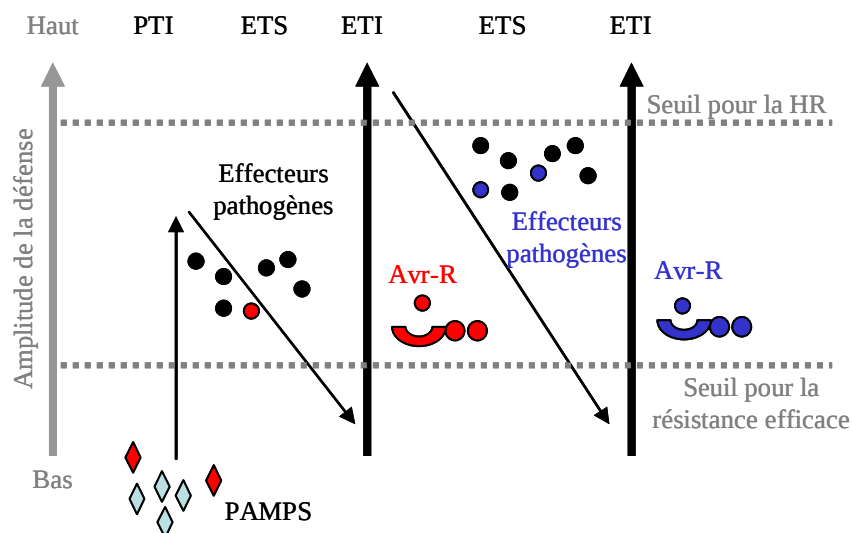


Figure SB.13 : Le modèle en zig zag : une vue évolutive de la reconnaissance (d'après Jones et Dangl, 2006)

En phase 1, la plante détecte les PAMPs / MAMPs pour activer la PTI (PAMP-triggered immunity) via les PRRs (Pattern Recognition Receptors), il y a un niveau de résistance basal.

En phase 2, la sélection favorise certains agents pathogènes qui produisent des effecteurs interférant avec la PTI ou permettent une meilleure nutrition ou dispersion (facteurs de virulence) conduisant à l'ETS (effector-triggered susceptibility), il y a développement de la maladie.

En phase 3, la sélection favorise les plantes qui possèdent une protéine NB-LRR reconnaissant un effecteur particulier (rouge) pour activer une version amplifiée de la PTI qui peut amener à une réaction d'hypersensibilité (HR). La résistance est spécifique.

En phase 4, les isolats des agents pathogènes qui ont perdu l'effecteur rouge (ou gagné d'autres effecteurs inactivant la HR) sont sélectionnés. La sélection favorise aussi les plantes qui acquièrent de nouvelles reconnaissances NB-LRR. Il y a à nouveau le développement de la maladie.

En phase 5, de nouvelles protéines de résistance pourront reconnaître les nouveaux effecteurs, entraînant alors à nouveau l'induction de l'ETI.

Une interprétation moléculaire de cette coévolution a été proposée, il s'agit du modèle en « zig-zag » (Jones et Dangl, 2006) (Figure SB.13). Ce modèle est en trois phases :

- Reconnaissance extracellulaire des motifs microbiens : les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) (Zipfel *et al.*, 2004), motifs caractéristiques des agents pathogènes ou MAMPs (Microbial-Associated Molecular Patterns), sont reconnus à la surface de la cellule végétale par des récepteurs extracellulaires PRRs (Pattern Recognition Receptors). Cette perception déclenche un premier type de réponse appelée PTI (PAMP-triggered immunity).

- Introduction d'effecteurs microbiens : la PTI suffit souvent à bloquer l'infection, mais les agents pathogènes ont développé des moyens d'y échapper ou de la supprimer, par exemple, en sécrétant des protéines effectrices qui altèrent la signalisation et provoquent la sensibilité de la plante (ETS, Effective-Triggered Susceptibility).

- Intervention des protéines R : il se développe alors un deuxième type de réponse baptisée ETI (Effector Triggered Immunity). L'ETI fait intervenir les protéines codées par les gènes de résistance R de la plante qui reconnaissent ces facteurs de virulence et bloquent la croissance du micro-organisme, après une prolifération limitée de ce dernier. Ceci induit donc une réponse d'hypersensibilité au site d'infection. Enfin certains isolats virulents de l'agent pathogène surmontent l'ETI en développant de nouveaux effecteurs. La reconnaissance de ces effecteurs par des protéines de résistance conduit souvent à la réponse d'hypersensibilité.

Dans ce système, il existe une véritable "interaction" entre l'agent pathogène et la plante hôte, illustrant l'existence de coévolutions à tous les niveaux de l'infection (Jones et Dangl, 2006).

3.1.2.1. Reconnaissance des microorganismes par la plante

3.1.2.1.1. Reconnaissance de motifs microbiens conservés

Les plantes reconnaissent des éléments structuraux à la surface des microorganismes. Ces composants sont souvent des molécules indispensables à la pathogénicité et à la survie du parasite (McGuinness *et al.*, 2003) et sont, de ce fait, conservés au cours de l'évolution. Ces éléments peuvent être de différentes natures : lipopolysaccharidique, lipidique, protéique, glycoprotéique ou glycolipidique (Nurnberger et Lipka, 2005) (Tableau SB.3).

Parmi les archétypes des MAMPs protéiques, on peut citer la flagelline, dont les extrémités N et C terminales sont très conservées chez les eubactéries. Cette protéine est reconnue par les plantes (Gomez-Gomez et Boller, 2002).

Eliciteurs	Microorganisme	Structure minimale pour l'activation des défenses	Réponse biologique	Références
Lipopolysaccharide (LPS)	Bactérie Gram négatif (<i>Xanthomonads, pseudomonas</i>)	Lipide A?	Burst oxydatif, production d'enzymes anti-microbienne chez le poivron et le tabac, potentialisation des réponses de défense contre les bactéries	Meyer <i>et al.</i> , 2001; Newman <i>et al.</i> , 2002; Zeidler <i>et al.</i> , 2004)
Flagelline	Bactéries Gram négatif (<i>Pseudomonas, Acidovorax</i>)	Flg22 (fragment N-terminal de la flagelline)	Induction des réponses de défense chez la tomate et Arabidopsis	Felix <i>et al.</i> , 1999; Gomez-Gomez <i>et al.</i> , 2002; Meziane <i>et al.</i> , 2005
Facteur d'élongation (EF-Tu)	Bactéries Gram négatif	Elf18 (Fragment N-acétylé terminal de EF-Tu)	Burst oxydatif et production d'éthylène chez Arabidopsis	Kunze <i>et al.</i> , 2004; Zipfel <i>et al.</i> , 2006
Harpine	Bactéries Gram négatif (<i>Erwinia, Pseudomonas</i>)	Hrp N et Z	Mort cellulaire et induction des réponses de défense chez différentes plantes	Wei <i>et al.</i> , 1992; He <i>et al.</i> , 1993; Lee <i>et al.</i> , 2001; Clarke <i>et al.</i> , 2005
Protéines de réponse au froid (Cold shock)	Bactéries Gram négatif et Gram positif	Motif RNP-1 (fragment N-terminal)	Burst oxydatif et production d'éthylène chez le tabac, la tomate et la pomme de terre	Felix et Boller, 2003
Protéines inductrices de nécrose	Bactéries (<i>Bacillus</i> spp.), champignons (<i>Fusarium</i> spp.) et oomycètes (<i>Phytophthora</i> spp. et <i>Pythium</i> spp.)	Nep1, Nip, PaNie213	Mort cellulaire et induction des réponses de défense chez différentes plantes	Bailey, 1995; Fellbrich <i>et al.</i> , 2002; Mattinen <i>et al.</i> , 2004; Pemberton et Salmond, 2004; Qutob <i>et al.</i> , 2002; Veit <i>et al.</i> , 2001
Transglutaminase	Oomycètes (<i>Phytophthora</i> spp.)	Motif Pep-13 (épitope de surface de la transglutaminase)	Induction des réponses de défense chez le persil et la pomme de terre	Nünberger <i>et al.</i> , 1994; Brunner <i>et al.</i> , 2002
Protéines de transfert lipidique	Oomycètes (<i>Phytophthora</i> spp. et <i>Pythium</i> spp.)	Elicitines (Cryptogéine, Capsicéine)	Mort cellulaire et induction des réponses de défense chez le tabac et SAR	Osman <i>et al.</i> , 2001; Garcia-Brugger <i>et al.</i> , 2006
Xylanase	Champignons (<i>Trichoderma</i> spp.)	Peptide TKLGE (épitope de surface de la xylanase)	Mort cellulaire et production d'éthylène chez le tabac et la tomate	Enkerli <i>et al.</i> , 1999; Ron et Avni, 2004
Invertase	Levures	Peptide N-Mannosylé (fragment de l'invertase)	Activation de la voie des phénylpropanoïdes et la production d'éthylène chez la tomate	Basse <i>et al.</i> , 1993
β-glucanes	Champignons (<i>Pyricularia oryzae</i>), Oomycètes (<i>Phytophthora</i> spp.), algues brunes	Tetraglucosyl glucitol, branched hepta-b-glucoside, Oligo β-glucosides linéaire	Induction des réponses de défense chez les légumes, le tabac et le riz	Klarzynski <i>et al.</i> , 2000; Fliegmann <i>et al.</i> , 2004; Yamaguchi <i>et al.</i> , 2000
Fucanes sulfatés	Algues brunes	Fucane	Induction des réponses de défense chez le tabac et résistance systémique face aux infections virales	Klarzynski <i>et al.</i> , 2003
Chitine	Champignons	Chitine (degré de polymérisation > 3)	Induction des réponses de défense chez la tomate, Arabidopsis, le riz, le blé et l'orge)	Baureithel <i>et al.</i> , 1994; Ito <i>et al.</i> , 1997; Ramonell <i>et al.</i> , 2002
Ergostérol	Champignons		Induction des flux d'ions chez la tomate	Granado <i>et al.</i> , 1995; Rossard <i>et al.</i> , 2006
Cérébrosides A, C	Champignons (<i>Magnaporthe</i> spp.)	Sphingolipides	Production de phytoalexines chez le riz	Koga <i>et al.</i> , 1998; Umemura <i>et al.</i> , 2004
Coronatine	Bactérie (<i>Pseudomonas</i>)		Induit la sénescence et la formation de divers métabolites secondaires	Tamogami <i>et al.</i> , 2000
Syringoline	Bactérie (<i>Pseudomonas</i>)		Activation des gènes de défense chez le riz	Waspi <i>et al.</i> , 2001
Pectinase	Champignon (<i>Botrytis, Mucor</i>)	BcPG1	Activation des défenses chez la vigne	Poinssot <i>et al.</i> , 2003
Protéines Avr	Champignon (<i>Cladosporium</i>)			Chisholm <i>et al.</i> , 2006

Tableau SB.3 : Molécules élicitrices des mécanismes de défense chez les plantes (modifié d'après Nürnberger et Lipka, 2005 et Jourdan *et al.*, 2008)

Chez *Arabidopsis*, le motif responsable de l'activité élicitrice est un peptide de 22 acides aminés, appelé flg22. Il suffit à la reconnaissance, active la PTI et permet par extension la transcription de 1100 gènes (Felix *et al.*, 1999; Zipfel *et al.*, 2004). D'autres protéines élicitrices ont été identifiées comme la protéine intracellulaire EF-Tu qui est un facteur d'élongation de traduction (Zipfel *et al.*, 2006) ou bien les protéines de réponse au froid (Cold Shock) (Felix et Boller, 2003). Il existe trois grands types de MAMPs de nature polysaccharidique (Shibuya et Minami, 2001) : les oligomères de β -glucane qui sont communs aux parois végétales et fongiques, les oligomères de chitine présents dans les parois des champignons et enfin les oligogalacturonides (OGA) polymères d'acides galacturoniques, des parois végétales. Ces derniers, capables de stimuler les mécanismes de défense de la plante ne peuvent pas être définis comme des MAMPs car ils ne proviennent pas du microorganisme et sont appelés éliciteurs endogènes ou DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) (Boller et Felix, 2009).

Chez la vigne, plusieurs MAMPs et éliciteurs ont été identifiés et sont capables de stimuler les mécanismes de défense. On note par exemple, les rhamnolipides (glycolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa*), l'ergostérol et l'endopolygalacturonase BcPG1 (issus du champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*) (Poinssot *et al.*, 2003; Laquittaine *et al.*, 2006; Varnier *et al.*, 2009), la laminarine (β -glucane extrait de l'algue brune *Laminaria digitata*), les oligogalacturonides et les cellodextrines (Aziz *et al.*, 2003; Aziz *et al.*, 2004; Aziz *et al.*, 2007).

3.1.2.1.2. Les effecteurs de virulence

Pour réussir à se multiplier, un agent pathogène doit échapper à la PTI ou la supprimer, grâce à des molécules effectrices qui peuvent avoir un rôle structural mais qui, le plus souvent, sont injectées dans la cellule de la plante (Grant *et al.*, 2006). Le rôle principal de ces effecteurs consiste donc à manipuler les voies de signalisation conduisant à la mise en place des défenses basales et à les inhiber. Les bactéries phytopathogènes utilisent un système de sécrétion de type III (TTSS, Type Three Secretion System) pour délivrer de 15 à 30 protéines d'avirulence (Truman *et al.*, 2006). D'autres effecteurs peuvent supprimer la reconnaissance de PAMPs ou activer la transcription de gènes de la plante. Certains miment des toxines de plante, comme la coronatine, produite par *Pseudomonas syringae*.

Cette phytotoxine ressemble à un dérivé de l'acide jasmonique (JA) qui avec l'acide salicylique (SA) et l'éthylène (ET), régule les réponses de défense de la plante. La coronatine pourrait mimer la production de JA pour inhiber la voie du SA nécessaire à la défense contre *P. syringae* (Cui *et al.*, 2005; Katsir *et al.*, 2008). D'autres effecteurs interfèrent avec la fortification des parois cellulaires par le dépôt de cellulose ou suppriment la réponse hypersensible. Chez les champignons biotrophes et les oomycètes, il n'y a pas de TTSS. Ces derniers délivrent cependant des effecteurs de virulence extra- ou intra-cellulaires (Kamoun, 2006). Ces effecteurs possèdent souvent le signal commun RXLR.

Concernant la recherche de molécules effectrices des agents pathogènes de la vigne, plusieurs gènes de *Plasmopara viticola* exprimés au cours de l'interaction compatible (*P. viticola* / *V. vinifera* cv Riesling) ont été mis en évidence (Polesani *et al.*, 2008). Cependant, aucun de ces effecteurs ne code un domaine RXLR-EER.

3.1.2.1.3. Les récepteurs des PAMPs / MAMPs

Plusieurs récepteurs des PAMPs ou MAMPs ont été identifiés chez les plantes. Par exemple, chez *Arabidopsis*, le récepteur de la flagelline, codé par le gène *FLS2* (*FLagellin Sensing 2*), reconnaît et lie flg22 à partir d'un domaine extra-cellulaire de type LRR (Leucine-Rich Repeats) (Chinchilla *et al.*, 2006). Des plantes déficientes en *FLS2* sont sensibles aux infections bactériennes. Toutefois, certaines flagellines sont moins actives que d'autres. Il y a ensuite activation d'une cascade de signalisation impliquant la voie des MAP kinases et des facteurs de transcription WRKY. Il existe plus de 200 kinases à LRR dans le génome d'*Arabidopsis* ainsi que 56 protéines membranaires qui possèdent uniquement un domaine extracellulaire LRR (Shiu et Bleecker, 2003; Jones et Dangl, 2006).

3.1.2.1.4. Les gènes de résistance R

Au cours de l'évolution, certaines plantes ont mis en place des moyens de détecter ces effecteurs, notamment les gènes de résistance *R*. De nombreux gènes *R* qui confèrent des résistances à des virus, des bactéries, des champignons, des nématodes et même des insectes (McDowell et Woffenden, 2003) ont été identifiés chez différentes espèces végétales (Jones, 2001). Lorsque l'effecteur est reconnu par une protéine *R*, l'ETI est activée.

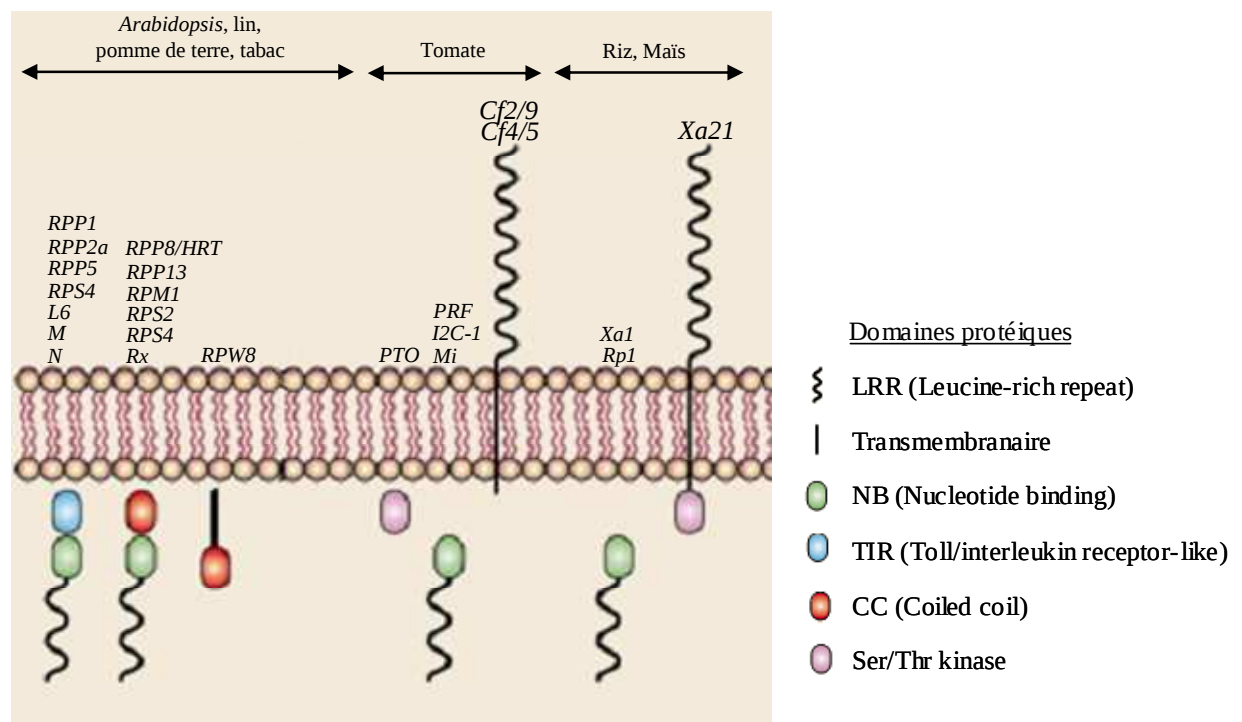


Figure SB.14 : Caractéristiques structurales des protéines codées par les gènes R chez les plantes (d'après Holub, 2001)

Cf-2-4-5-9 : Résistance à *Cladosporium fulvum* ; PTO : Résistance à *Pseudomonas syringae* pv. Tomato ; Mi : Résistance à *Meloidogyne incognita* ; Rp1 : Résistance à *Puccinia sorghi* ; Xa1 : Résistance à *Xanthomonas campestris* pv. *oryza* ; Xa21 : Résistance à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ; RPP1-2a-5-8-13 : Resistance à *Peronospora parasitica* ; RPS4 : Résistance à *Pseudomonas syringae* ; L6 et M : Résistance à *Melampsora lini* ; N : Résistance au Tobacco Mosaic Virus ; HRT : Résistance au turnip crinkle virus ; RPM1 : Résistance à *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* ; RPS2-4 : Résistance à *Pseudomonas syringae* ; Rx : Résistance au potato virus X ; RPW : Résistance à powdery mildew ; PRF : gene requis pour la fonction de PTO ; I2C-1 : Résistance à *Fusarium oxysporum*

La comparaison de la structure des protéines R révèle la présence de domaines protéiques conservés, impliqués dans la reconnaissance et la transduction de signaux (Hammond-Kosack et Parker, 2003). La plupart des protéines codées par les gènes *R* possèdent 2 domaines caractéristiques : un domaine LRR qui apparaît être impliqué de façon centrale dans la reconnaissance de l'agresseur (Jones, 2001) et un domaine NBS (Nucleotide Binding Site) plutôt impliqué dans la transduction du signal de perception (Dangl et Jones, 2001) (Figure SB.14). Les domaines LRR et NBS contiennent des motifs très conservés qui ont permis d'identifier et de classer les gènes *R* (Meyers *et al.*, 1999). Les gènes *R* ont été regroupés en trois classes différentes fondées sur les protéines qu'ils codent (Schornack *et al.*, 2006). D'autres domaines sont retrouvés chez les protéines R (Martin, 1999; Dangl et Jones, 2001; Martin *et al.*, 2003; McDowell et Woffenden, 2003). Le domaine TIR (Toll-Interleukin 1 Receptor) chez les animaux, se retrouve dans les protéines impliquées dans l'immunité innée ou qui participent à la transmission d'un signal permettant l'activation de la mort cellulaire programmée. Le domaine CC (Coiled-Coil) est connu pour permettre les interactions protéine-protéine. Enfin, les domaines transmembranaires qui constitueraient un système de surveillance externe vis-à-vis des agresseurs, à l'image du domaine LRR qui se retrouve à l'extérieur de la cellule. Le génome d'*Arabidopsis* contient environ 150 gènes *R* de type NBS-LRR et qui conféreraient une résistance à de nombreux agents pathogènes tels que des virus, bactéries, champignons, nématodes et des insectes (Eckardt et Innes, 2003; Meyers *et al.*, 2003).

Chez la vigne, plusieurs recherches ont été menées pour identifier et isoler des gènes de résistance *R* ou des analogues de gènes de résistance (RGA). Une étude a été menée pour essayer d'identifier des marqueurs moléculaires permettant de distinguer les génotypes sensibles des génotypes résistants et il a été montré qu'une grande famille multigénique des gènes de résistance de type NBS-LRR est présente dans la vigne (Di Gaspero et Cipriani, 2003). Ainsi, 103 séquences codant des protéines NB-LRR à domaines CC ou TIR ont été mises en évidence. Des RGA à domaine récepteur kinase présentant des homologues avec les gènes *Pto* de la tomate ou *Xa21* du riz, ont été retrouvés dans différentes espèces de vigne (Di Gaspero et Cipriani, 2003; Mahanil *et al.*, 2007). Deux cartes physiques réalisées sur les génomes de *V. vinifera* cv. Pinot Noir et *V. vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon ont permis d'annoter et de positionner plusieurs gènes de résistance (Velasco *et al.*, 2007; Moroldo *et al.*, 2008).

Aucun de ces gènes ne semble correspondre à un QTL (Quantitative Trait Locus) connu de résistance chez la vigne contrairement à la pomme de terre où des éléments de signalisation des réponses de défense co-ségrègent avec des QTL mineurs de résistance à *Phytophthora infestans* (Pajerowska *et al.*, 2005; Moroldo *et al.*, 2008). D'autres cartes génétiques orientées vers la résistance aux maladies ont été construites chez la vigne (Di Gaspero *et al.*, 2007). Les cartes sont issues de croisements entre un *Vitis vinifera* et un *Vitis* hybride portant une résistance. Plusieurs clusters de RGA ont été identifiés dans des régions chromosomiques où des traits phénotypiques de résistance aux maladies fongiques, bactériennes ou aux nématodes et parasites, ont été précédemment cartographiés. Ces cartes permettent ainsi de localiser les régions génomiques de résistance à différents parasites et maladies de la vigne. Une étude sur les traits génétiques de la population F1 issue du croisement entre deux variétés cultivées de vigne, Régent (résistante à de multiples maladies fongiques) et Lemberger (sensible) a permis d'identifier un QTL pour la résistance au mildiou et à l'oïdium (Fischer *et al.*, 2004). Par ailleurs, il a été démontré que la résistance à l'oïdium est contrôlée par un gène dominant *Run1* (Resistance to *Erysiphe necator*) présent chez l'espèce sauvage *Muscadinia rotundifolia* et associé à un locus de résistance (Pauquet *et al.*, 2001; Donald *et al.*, 2002). Trois loci, *Rpv1*, *Rpv2* et *Rpv3* (résistance à *Plasmopara viticola*) ont été cartographiés chez la vigne pour avoir des effets majeurs sur la résistance au mildiou (Merdinoglu *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Bellin *et al.*, 2009). *Rpv1* est localisé dans un cluster de gènes candidats de type NBS-LRR et est génétiquement associé au locus *Run1* (Barker *et al.*, 2005). Après inoculation par *P. viticola*, *Rpv2* stoppe le développement de l'agent pathogène, ce qui inhibe toute possibilité de sporulation, alors que *Rpv1* ne fait que ralentir sa diffusion (Thiéry *et al.*, 2007). Il semble que plus d'un gène fonctionnel réside dans le locus *Rpv3*.

Ainsi la reconnaissance des PAMPs / MAMPs comme «non soi» par la plante constitue le premier niveau d'activation des défenses végétales. Ce mécanisme est caractérisé sous le terme PTI et correspond au système d'immunité basal (Jones et Dangl, 2006). Etant donné que ces motifs reconnus sont conservés, ils confèrent une protection à large spectre qui est fondamentale pour expliquer les mécanismes moléculaires de la résistance non hôte. Le deuxième niveau de défense des plantes contre les microorganismes est lié à la détection spécifique de certaines molécules microbiennes par des classes de protéines végétales dérivant des gènes *R*.

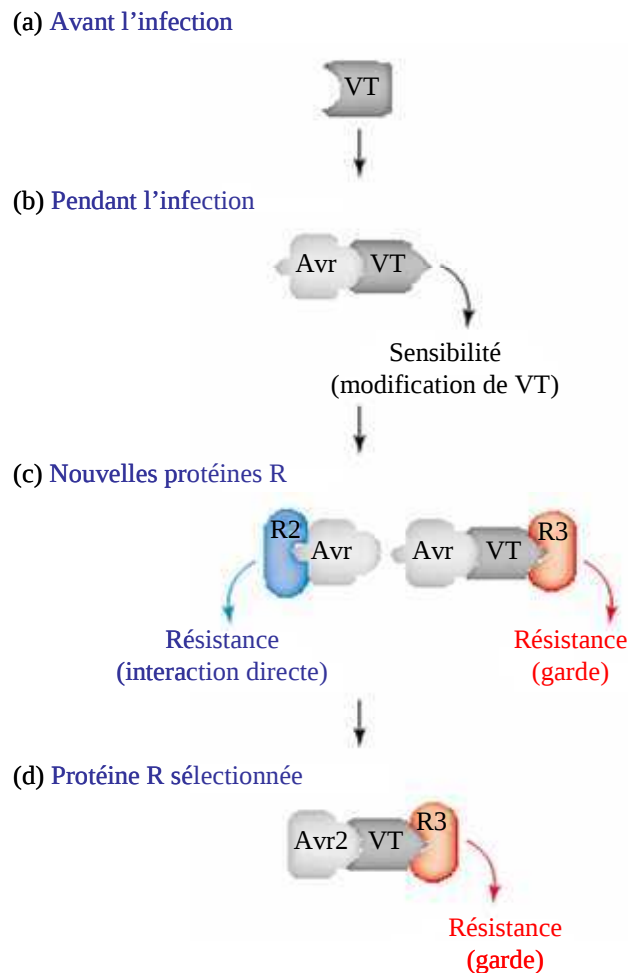


Figure SB.15 : Schéma illustrant le modèle de garde (d'après Van der Hoorn, 2002)

(a) Avant l'infection, des récepteurs de virulence (VT) existe dans la plante hôte.

(b) L'infection d'une plante sensible conduit à la liaison du facteur d'avirulence (Avr) et du récepteur de virulence, ayant pour résultat une modification du VT et conduit à la virulence (sensibilité de l'hôte).

(c) Dans une population de plantes résistante, différentes protéines R (par exemple R2 et R3) ont évolué pour reconnaître directement le facteur d'avirulence (R2, bleus) ou une modification du facteur d'avirulence induit par le récepteur (VT) (R3, rouges).

(d) Pendant la sélection des mutations dans le gène *Avr*, il apparaît un nouveau facteur d'avirulence (Avr2). R3 est maintenue comme une protéine R commune dans la population de plantes par la sélection balancée, tandis que R2 devient rare et même s'éteint. Ainsi, seules les protéines R de garde sont maintenues comme un résultat de cette sélection.

3.1.2.2. Reconnaissance spécifique « gène pour gène »

Le concept « gène pour gène » a été développé par Harold Flor à partir de l'étude génétique des interactions qui existent entre le lin et *Melampsora lini* (Flor, 1971). Ce concept permet d'expliquer la grande majorité des résistances monogéniques dominantes et a été confirmé au niveau moléculaire : les mécanismes de résistance sont induits si et seulement si la protéine codée chez la plante par un gène de résistance *R* "reconnaît" la protéine codée chez l'agent pathogène par un gène dominant dit "d'avirulence" (gène *Avr*) (Bent, 1996; Hammond-Kosack et Jones, 1997; Belkhadir *et al.*, 2004).

Si les récepteurs des PAMPs / MAMPs peuvent reconnaître directement leurs cibles, il n'en est pas de même pour les protéines *R*. Il existe 2 modes de reconnaissance entre les protéines *R* et *Avr* : une détection directe, on parle de modèle "éliciteur-récepteur" ou une détection indirecte dans laquelle la protéine *R* détecte les modifications qu'ont engendrées les effecteurs mais pas les effecteurs eux-mêmes. Dans ce dernier cas, on parle de modèle "de garde" (Figure SB.15) (Van der Hoorn *et al.*, 2002; McDowell et Woffenden, 2003).

Ainsi, plutôt que de développer des récepteurs contre tous les effecteurs possibles, les plantes ont généré des mécanismes de surveillance des cibles cellulaires les plus fréquentes des effecteurs microbiens, de façon à déclencher l'ETI. L'interaction physique directe entre les 2 partenaires n'a pu être démontrée que dans un nombre extrêmement limité de cas et beaucoup reste à élucider en matière de reconnaissance directe ou indirecte des champignons et des oomycètes.

3.1.2.3. Polymorphisme des gènes de résistance : « course aux armements » vs « guerre des tranchées »

Généralement, deux principaux types de sélection naturelle sont mis en évidence lorsque l'on étudie la diversité des plantes : la sélection balancée décrite précédemment qui permet le maintien sélectif à long terme de plusieurs allèles et la sélection positive où il y a fixation d'une mutation favorable (Wright et Gaut, 2005).

Dans les populations d'une même plante, on observe des polymorphismes dans certains gènes de résistance (Tiffin et Moeller, 2006). Le tableau SB.4 illustre différents chemins évolutifs suivis par les gènes de résistance *R*. Chez *A. thaliana*, les analyses moléculaires montrent que la sélection balancée est la force qui prédomine pour maintenir à la fois les allèles de résistance et de sensibilité avec un niveau élevé de polymorphisme silencieux et / ou un excès de substitutions non-synonymes (Bakker *et al.*, 2006).

Hôte	Pathogène	Locus R de résistance	Type de sélection	Références
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> (bactérie)	<i>RPM1</i>	Sélection balancée	Stahl <i>et al.</i> , 1999 Caicedo <i>et al.</i> , 1999; Mauricio <i>et al.</i> , 2003 Tian <i>et al.</i> , 2002
		<i>RPS2</i>		
		<i>RPS5</i>		
Tomate	<i>Peronospora parasitica</i> (oomycète)	<i>RPP13</i>	Sélection balancée	Rose <i>et al.</i> , 2004
	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Pto</i>	Sélection balancée et purificatrice	Rose <i>et al.</i> , 2005
	<i>Cladosporium fulvum</i> (champignon)	<i>Cf-2</i>	Sélection balancée à l'extrémité 5' et diversifiante à l'extrémité 3'	Caicedo et Schaal, 2004
Lin	<i>Melampsora lini</i> (champignon)	L	Sélection diversifiante	Dodds <i>et al.</i> , 2006

Tableau SB.4 : Traces de sélection détectées sur les gènes *R* chez les plantes (D'après Tiffin et Moeller, 2006)

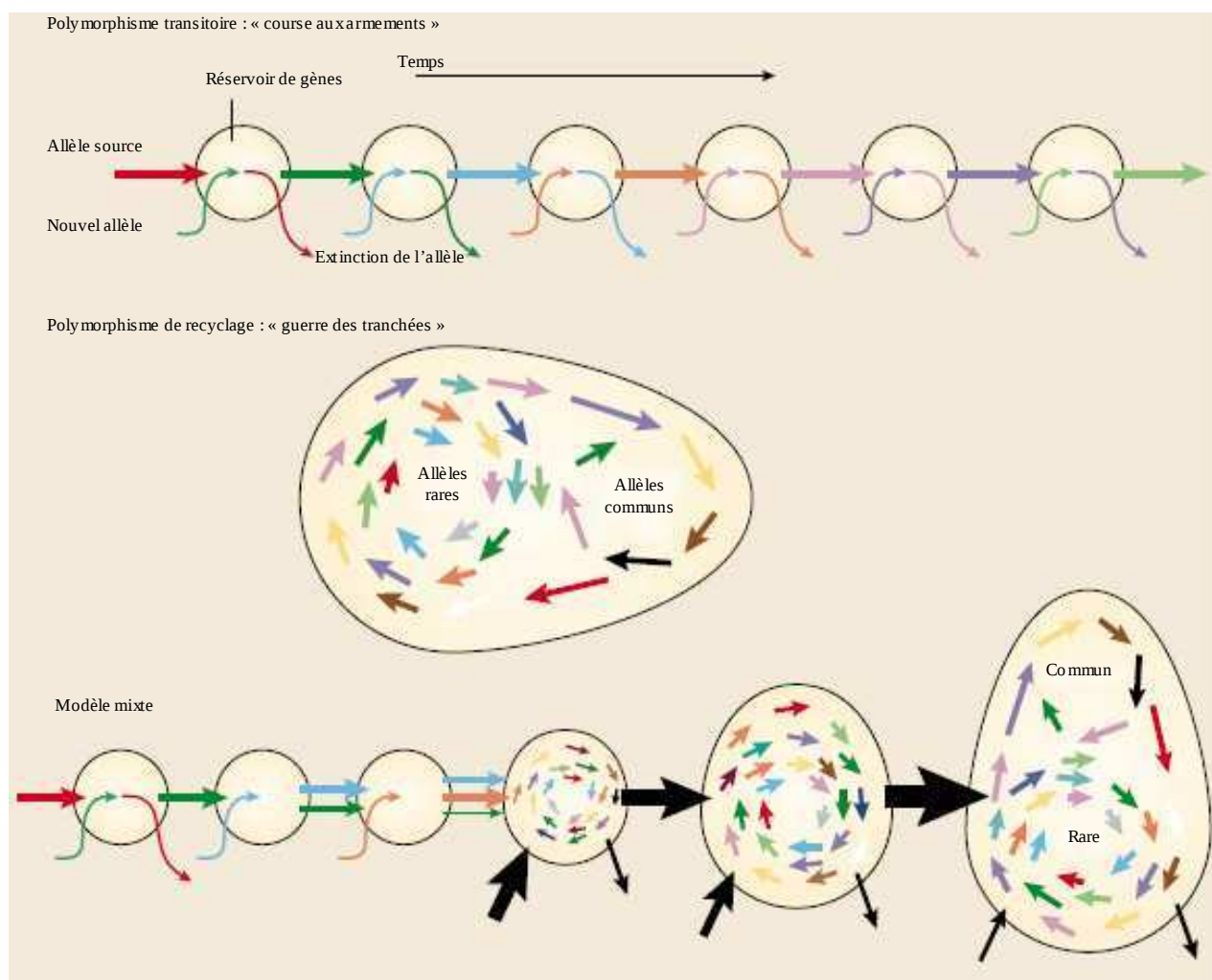


Figure SB.16 : Evolution des gènes de résistance *R* (d'après Holub, 2001)

- a- Polymorphisme transitoire ou « course aux armements » : suite à l'émergence de nouveaux pathogènes, les anciens allèles *R* sont remplacés à chaque cycle par un nouvel allèle.
- b- Polymorphisme de recyclage ou « guerre des tranchées » : beaucoup d'allèles sont maintenus dans la population par sélection balancée.
- c- Modèle mixte : la population progresse de cycles transitoires vers le maintien des variations alléliques qui s'accumulent dans la population de l'hôte.

Certains auteurs ont attribué le maintien des polymorphismes observés par de la sélection dépendante de la fréquence de l'allèle d'avirulence. Dans ce cas, la fréquence de l'allèle de résistance dépendrait de la fréquence de l'allèle d'avirulence et donc de la fréquence de certains génotypes d'agent pathogène et *vice versa* (Ellis *et al.*, 1999; Stahl *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2003). Chez la tomate, la résistance à *P. syringae* est sous le contrôle du gène *R* de résistance *Pto*. Les analyses de polymorphisme chez plusieurs espèces de *Lycopersicon* montrent que *Pto* n'évolue pas de la même façon que les autres locus non résistants analysés chez ces mêmes espèces. Le niveau de substitutions non-synonymes est beaucoup plus élevé pour *Pto* que pour les autres gènes analysés mais ce polymorphisme s'il est balancé n'est pas patent et l'évolution de *Pto* semble être influencée à la fois par de la sélection purificatrice et de la sélection balancée (Rose *et al.*, 2007). D'après l'auteur on observe une périodisation. D'une part, des pressions de sélection fortes de l'agent pathogène s'exercent sur *Pto* et d'autre part, on note des périodes de relâchement de la contrainte sur ce gène. Ceci serait dû au fait que les agents pathogènes ne possèdent pas les gènes *Avr* adéquats, ce qui favorise l'accumulation des substitutions neutres ou délétères.

A chaque fois que la sélection est relâchée, de nouveaux allèles peuvent être créés et l'infection par des agents pathogènes exprimant des protéines *Avr* fonctionnelles favorise les individus avec des protéines *Pto* fonctionnelles. Chez le lin, des études ont montré que le locus *L* (codant pour des protéines de type TIR-NBS-LRR qui interagissent avec les protéines *Avr* de différentes souches de *Melampsora lini*) et que le locus *Avr* correspondant étaient tous les deux sous pression de sélection diversificatrice (Luck *et al.*, 2000; Dodds *et al.*, 2006).

Des analyses d'évolution moléculaire ont permis de caractériser les processus évolutifs mis en jeu dans les gènes *R* impliqués dans la résistance des plantes aux agents pathogènes. Trois scénarios évolutifs sont décrits : le polymorphisme transitoire, le polymorphisme de recyclage et le modèle mixte (Holub, 2001) (Figure SB.16).

Le modèle de « polymorphisme transitoire » ou « course aux armements » conduit à l'extinction des anciens allèles *R* qui sont remplacés à chaque cycle par un nouvel allèle qui a divergé d'un allèle existant par une mutation, une recombinaison, ou bien provient d'une autre population (Holub, 2001).

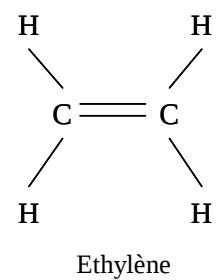
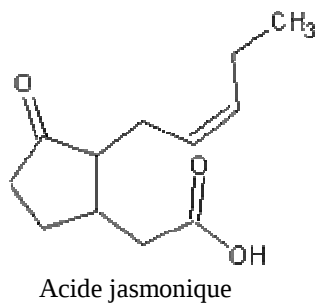
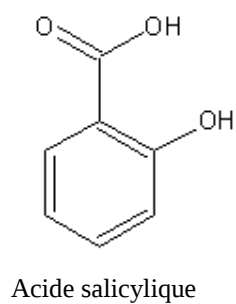


Figure SB.17 : Structure des trois principales phytohormones impliquées dans les réponses de défense chez les plantes

Le modèle de « polymorphisme de recyclage » ou « guerre des tranchées » suppose que beaucoup d'allèles sont maintenus dans une même population par du polymorphisme balancé. Les allèles sont fréquents lorsqu'ils permettent une résistance efficace mais lorsque de nouvelles formes virulentes émergent et contournent la résistance, la fréquence des allèles *R* rares va augmenter et la fréquence des autres va diminuer (Holub, 2001). Cependant, ce modèle ne permet pas d'expliquer l'apparition de nouveaux allèles de résistance.

Les deux modèles ne sont pas exclusifs et un modèle mixte est alors proposé et correspond à une synthèse des deux modèles précédents. Si les gènes *R* ne sont pas éliminés, leur fréquence diminue pour qu'ils réapparaissent à un moment plus opportun. La population progresse du cycle transitoire vers un maintien des variations alléliques qui s'accumulent dans la population de l'hôte (Holub, 2001).

Il est donc difficile de formuler des modèles généraux d'évolution des gènes *R* et l'adoption de l'un ou l'autre modèle peut être guidée par l'histoire évolutive propre à chaque pathosystème.

3.2. Les signaux hormonaux impliqués dans la mise en place des mécanismes de défense

L'activation des résistances systémiques est obtenue par l'intervention de trois phytohormones régulatrices de croissance des plantes : l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) (Figure SB.17) (Ton *et al.*, 2002; Beckers et Spoel, 2006). Les voies de transduction dépendante de l'acide salicylique sont requises pour la résistance aux agents pathogènes biotrophes (Glazebrook, 2005). Les voies de transduction de l'acide jasmonique et de l'éthylène sont généralement requises pour la résistance aux pathogènes nécrotrophes.

3.2.1. L'acide salicylique

De nombreuses études, fondées sur l'utilisation de plantes transgéniques de tabac NahG (dégradent le SA), ont démontré que le SA est un signal intracellulaire important impliqué dans les résistances locale (LAR) ou systémique (SAR), ainsi que dans l'expression des protéines PR (Ryals *et al.*, 1996). Un lien entre la SAR et la teneur endogène en acide salicylique a été mis en exergue (Yalpani *et al.*, 1994). Des feuilles de tabacs résistants infectées par le TMV montrent une teneur multipliée par vingt contrairement à celles des tabacs sensibles (Malamy *et al.*, 1990).

Cependant, bien que la concentration de SA augmente fortement dans les tissus systémiques, le SA ne semble pas être le messager de la SAR et les mécanismes d'action de cette molécule restent mal connus. En effet, des plants de tabac mutant produisant une enzyme bactérienne de dégradation de l'acide salicylique NahG sont incapables de déclencher la SAR en réponse à des attaques de différents agents pathogènes (Gaffney *et al.*, 1993; Vernooij *et al.*, 1994). Des greffes entre greffon de type sauvage et porte-greffe NahG ont permis de mettre en lumière le fait que l'infection des feuilles du porte greffe par le VMT engendrait une résistance systémique acquise au niveau des feuilles du greffon de type sauvage (Vernooij *et al.*, 1994). Au cours de ces dernières années, plusieurs protéines se liant à l'acide salicylique ont été identifiées et seraient des candidates pour être les messagers diffusibles de la SAR.

Tout d'abord, le méthyl salicylate (MeSA) a longtemps été pressenti comme le messager volatile impliqué dans une communication inter plantes par voie aérienne ou encore après transport via le phloème (Shulaev *et al.*, 1997). Cependant, on s'est aperçu que des mutants déficients dans la production de MeSA sont toujours capables de mettre en place la SAR (Attaran *et al.*, 2009). Une autre molécule pourrait être un bon candidat pour le signal de la SAR, il s'agit de l'acide azélaïque. Il serait capable de stimuler les réponses de défense locales et systémique et de permettre l'accumulation de SA dans les plantes (Jung *et al.*, 2009).

Les analogues fonctionnels du SA comme le benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-carbothiate de S-méthyl (BTH) et l'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA) sont également connus pour déclencher l'induction des gènes *PR* et sont efficaces contre le même spectre d'agents pathogènes (Uknes *et al.*, 1992; Lawton *et al.*, 1996; Ryals *et al.*, 1996).

3.2.2. L'acide jasmonique

L'acide jasmonique est une molécule produite à partir d'un acide gras, l'acide linoléique par action des lipoxygénases (LOX). Le JA et son dérivé, le méthyljasmonate (MeJA) sont impliqués dans l'induction des protéines de défense (défensines, osmotines, thionines, inhibiteurs de protéases) (Farmer et Ryan, 1992; Xu *et al.*, 1994; Penninckx *et al.*, 1996; Creelman et Mullet, 1997; Wasternack et Parthier, 1997). Le méthyljasmonate est capable d'induire la production d'éthylène dans les fruits de tomate (O'Donnell *et al.*, 1996). Des mutants *d'Arabidopsis* incapables d'accumuler du jasmonate développent une sensibilité importante à *Pythium mastaphorum* (Vijayan *et al.*, 1998).

3.2.3. L'éthylène

L'éthylène est une phytohormone impliquée dans les processus de croissance et de développement des plantes (germination, sénescence, abscission des fleurs et des feuilles, maturation des fruits). Cette molécule est rapidement produite et accumulée de façon transitoire suite à une blessure, à l'induction par de l'acide jasmonique et à de multiples stress biotiques ou abiotiques et permet la transduction du signal menant à l'activation des défenses des cellules végétales (Broekaert *et al.*, 2006). Des plantes mutantes, incapables de produire l'éthylène ou de le percevoir deviennent soit plus résistantes, soit plus sensibles à l'attaque de différents pathogènes en comparaison des plantes sauvages (Hoffman *et al.*, 1999). Suite à l'application d'un éliciteur fongique, la voie de l'éthylène serait impliquée dans la stimulation de protéines de défense (Martinez *et al.*, 2001).

L'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène semblent réguler les réponses de défense de la plante de manière différente. En effet, les voies dépendants de SA ou de JA / ET semblent interagir de façon complexe sous forme d'un antagonisme mutuel ou d'interactions synergiques (Feys et Parker, 2000; Glazebrook, 2001).

L'implication de ces molécules dans la signalisation intercellulaire diffère suivant l'espèce végétale et la nature de l'éliciteur.

3.3. Les mécanismes de résistance de la plante

Les plantes présentent des réponses de défense à court et long termes lorsqu'elles sont attaquées par des agents pathogènes. Pour combattre les agents pathogènes, les plantes ont développé des mécanismes de défense passifs et actifs (Hammerschmidt, 1999). Ils sont constitutifs ou induits, physiques ou chimiques (Lamb *et al.*, 1989; Lamb, 1994).

Certaines plantes produisent des substances (cires, lignine ...) qui peuvent constituer des barrières passives physiques à la pénétration de l'agent pathogène. Des composés antimicrobiens préformés, comprenant les métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, les saponines et les tannins (Osborn, 2003) et les peptides cationiques (Broekaert *et al.*, 1995) servent de défenses chimiques constitutives.

Les mécanismes préexistants ne protègent pas toujours suffisamment les plantes contre les attaques des agents pathogènes. Les plantes ont donc développé des systèmes de défense actifs. La résistance la plus efficace est la résistance non-hôte. Elle se manifeste lorsqu'un agent pathogène entre au contact d'une plante sur laquelle il est inoffensif.

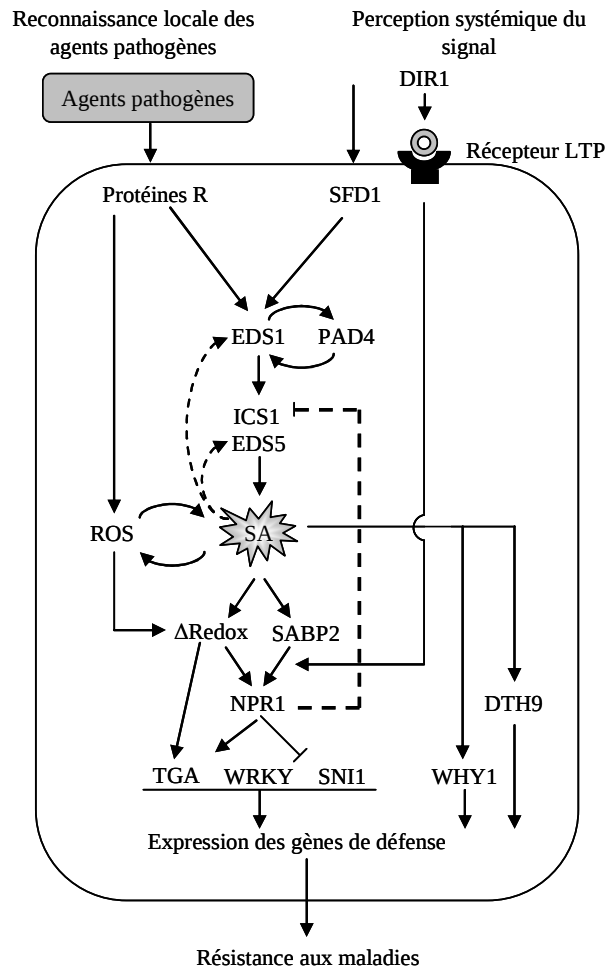


Figure SB.18 : Les différents types de résistance (d'après Durrant et Dong, 2004)

R : resistance ; **ROS** : reactive oxygen species ; **SABP2** : salicylic acid-binding protein 2 ; **TGA** : TGA-element binding proteins ; **WRKY** : transcription factors containing a highly conserved WRKY domain(s) ; **WHY1** : whirly transcription factor1 ; **DIR1** : defective induced resistance 1 ; **SFD1** : suppressor of fatty-acid-desaturase deficiency 1 ; **EDS1** : enhanced disease susceptibility 1 ; **PAD4** : phytoalexin deficient 4 ; **ICS1** : isochorismate synthase 1 ; **EDS5** : enhanced disease susceptibility 5 ; **NPR1** : nonexpressor of PR genes ; **SNI** : suppressor of npr1-1 inducible 1 ; **DTH9** : detachment 9 ; **PR** : pathogenesis-related genes.



Figure SB.19 : Une réponse hypersensible classique du tabac (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) à l'infection par le TMV (Tobacco mosaic virus) (d'après Lam *et al.*, 2001)

Les feuilles sont inoculées soit avec de l'eau (gauche) ou avec le TMV (droite). Dans ce cas, la plante est capable de restreindre la croissance du virus au niveau de la zone HR.

La plante est donc complètement protégée de l'infection (Heath, 2000). Un critère important dans la définition de la résistance non-hôte est que tous les individus d'une même espèce de plante doivent être résistants à tous les isolats d'une espèce pathogène.

Les plantes montrent d'autres types de résistances induites (Figure SB.18) (Bent, 1996).

3.3.1. Les résistances locales

3.3.1.1. La réaction d'hypersensibilité

Dans la plupart des cas d'interactions incompatibles, le premier type de réponse des plantes est la réaction d'hypersensibilité (HR) (Figure SB.19) (Lamb et Dixon, 1997; Heath, 2000; Lam *et al.*, 2001; Bonas et Lahaye, 2002). La mise en place de la réaction d'hypersensibilité favorise la résistance de la plante. La réponse hypersensible aboutit à la production d'espèces activées de l'oxygène (ROS), d'oxyde nitrique (NO) (Delledonne *et al.*, 1998) et à la formation d'une réponse de défense localisée autour du site d'infection. Elle conduit le plus souvent à la mort cellulaire programmée localisée (PCD) (Heath, 2000) au niveau du site de l'infection, ce qui permet le confinement des micro-organismes biotrophes et héli-biotrophes (Heath, 2000; Belkhadir *et al.*, 2004). La HR peut cependant favoriser la propagation des agents pathogènes nécrotrophes qui peuvent profiter de la mort des cellules pour se nourrir (Govrin et Levine, 2000).

3.3.1.2. La résistance locale acquise

La zone étroite entourant la zone HR reçoit des signaux provenant de la zone d'infection primaire qui déclenchent de fortes réponses de défense qui contribuent à induire une résistance pour circonscrire l'agent pathogène. Il s'agit de la zone de résistance locale acquise (LAR) (Dorey *et al.*, 1997). La LAR est régulée par un signal de plante libéré par les cellules en état de HR et diffusant à faible distance. La HR est donc nécessaire pour le déclenchement de la LAR.

3.3.2. Les résistances systémiques

En plus des résistances locales, une interaction avec un agent pathogène ou un agent chimique qui le mime peut également conduire à une résistance systémique. Les résistances systémiques s'expriment dans tous les organes et fournissent à la plante une protection contre de nouvelles agressions (Hammerschmidt, 1999) par un large spectre d'agents pathogènes. Cette condition physiologique est également appelée potentialisation.

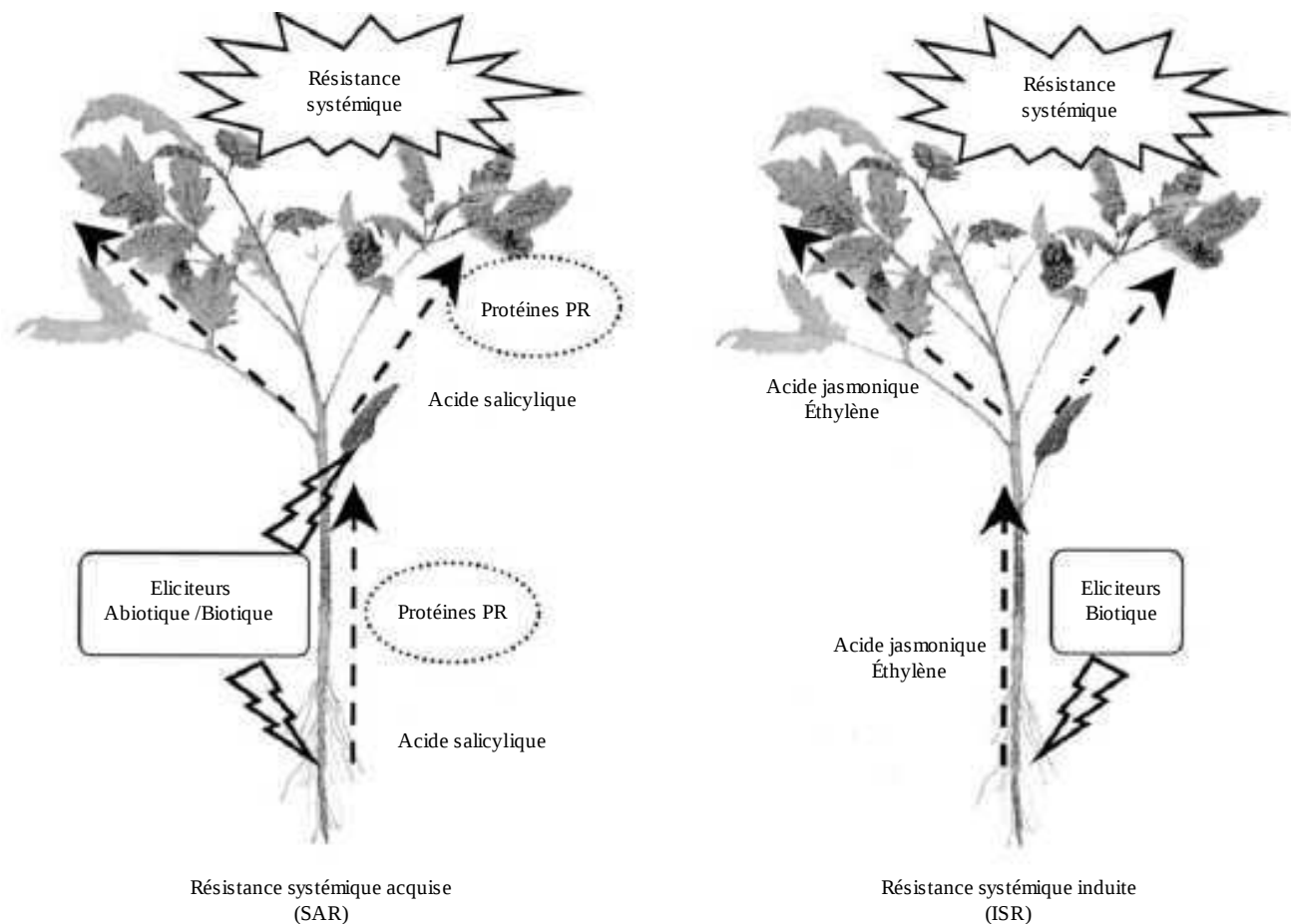


Figure SB.20 : Les deux formes de résistance induite caractérisée chez les plantes (Vallad et Goodman, 2004)

La résistance systémique acquise (SAR) est induite par l'exposition des racines ou des feuilles aux éliciteurs biotiques et abiotiques. Cette résistance est dépendante de l'acide salicylique et associée à l'accumulation de protéines PR. Il semblerait, cependant que l'acide salicylique ne soit pas le messenger diffusible de la SAR.

La résistance systémique induite (ISR) est induite par l'exposition de racines à des éliciteurs biotiques. Cette résistance est dépendante de l'acide jasmonique et de l'éthylène.

Le mécanisme de potentialisation permettant d'amplifier les réactions de défense suite à une infection secondaire serait donc d'un grand intérêt pour réduire les dépenses énergétiques de la plante (Pieterse *et al.*, 2002; Conrath *et al.*, 2006). Il existe deux types de résistances systémiques dont la mise en place dépend du microorganisme ou de la molécule initialement détectée (Figure SB.20) : la résistance systémique acquise (SAR) et la résistance systémique induite (ISR).

3.3.2.1. La résistance systémique acquise

Quand une plante est attaquée par un agent pathogène causant une réaction d'hypersensibilité, il est souvent observé que les parties non infectées et éloignées de la plante deviennent résistantes à un large spectre d'agents pathogènes. Ce phénomène est appelé la résistance systémique acquise. Une des premières modifications dans le métabolisme de la plante après induction de la SAR est une accumulation locale et systémique d'acide salicylique endogène (Malamy *et al.*, 1990; Metraux *et al.*, 1990). L'application de SA déclenche la production des protéines *PR* et conduit à une augmentation du niveau de résistance (Uknes *et al.*, 1992). Certaines de ces protéines (chitinase, glucanase...) ont montré des propriétés antimicrobiennes (Mauch *et al.*, 1988), ainsi, elles sont généralement utilisées comme des marqueurs de la SAR.

3.3.2.2. La résistance systémique induite

La résistance systémique induite (ISR) est développée en réponse à la colonisation des racines par des bactéries non pathogènes vivant dans la rhizosphère (Vanpeer *et al.*, 1991; Pieterse *et al.*, 2002). L'ISR a été démontrée dans différentes espèces végétales et confère une résistance contre un large spectre d'agents pathogènes (van Loon *et al.*, 1998; Ton *et al.*, 2002). Cette résistance s'avère dépendante du génotype végétal, de l'agent pathogène, mais aussi de la rhizobactérie. En effet, la souche *Pseudomonas fluorescens* WCS_{374r} induit une ISR chez le radis mais pas chez *Arabidopsis* contre *Fusarium oxysporum*. A l'inverse, *P. putida* WCS_{358r} induit une ISR chez *Arabidopsis* contre le même champignon mais pas chez le radis (Leeman *et al.*, 1995; VanWees *et al.*, 1997). D'autres souches de type *P. fluorescens*, *P. putida* et *Bacillus pumilus* ont montré une capacité à induire une ISR chez de nombreuses plantes contre divers pathogènes (*Ceratocystis fagacearum*, *Fusarium oxysporum*) (Benhamou *et al.*, 1996; Benhamou *et al.*, 1996; Mpiga *et al.*, 1997; Ramamoorthy *et al.*, 2001).

Famille	Membre type	Propriétés
PR-1	PR-1a (Tabac)	Inconnue
PR-2	PR-2 (Tabac)	β -1,3-glucanase
PR-3	PR-P, PR-Q (Tabac)	Chitinase de type I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	PR-R (Tabac)	Chitinase de type I, II
PR-5	PR-S (Tabac)	Thaumatine-like
PR-6	Inhibitor I (Tomate)	Inhibiteur de protéases
PR-7	P ₆₉ (Tomate)	Endoprotéase
PR-8	Chitinase (Concombre)	Chitinase de type III
PR-9	Péroxydase formant la lignine (Tabac)	Péroxydase
PR-10	« PR1 » (Persil)	Ribonucléase-like
PR-11	Chitinase classe V (Tabac)	Chitinase de type I
PR-12	Rs-AFP3 (Radis)	Défensine
PR-13	THI2.1 (<i>Arabidopsis</i>)	Thionine
PR-14	LTP4 (Orge)	Protéine de transfert des lipides
PR-15	OxOa (Orge)	Oxalate-oxydase
PR-16	Ox-OLP (Orge)	Oxalate-oxydase-like
PR-17	PRp27 (Tabac)	Inconnue

Tableau SB.5 : Classification des protéines PR (d'après Van Loon et Van Strien, 1999)

Il est bien établi que l'ISR fait appel à l'expression des mécanismes de défense des plantes. Elle est activée par des lipopolysaccharides et des flagelles de souches non pathogènes de *Pseudomonas* impliquant des mécanismes dépendant à la fois des voies du JA et de l'éthylène, mais indépendant de la voie de SA et de l'expression des protéines PR (Pieterse *et al.*, 1998). L'existence de la voie SA-indépendante a été démontrée pour la première fois dans *Arabidopsis thaliana* en utilisant la souche de *P. fluorescens* WCS_{417r} comme agent induisant l'ISR et *P. syringae* pv *tomato* DC3000 comme agent pathogène secondaire (Pieterse *et al.*, 1996).

Néanmoins, d'autres travaux montrent que l'ISR pourrait être parfois dépendante de la voie de SA (Meyers *et al.*, 1999; Meyers *et al.*, 2003), indépendante des trois molécules signal (Ryu *et al.*, 2003) ou encore indépendante des voies du SA, du JA, du gène *NPR1* (Non-expressor of *PR* genes) tout en restant dépendante de l'éthylène (Ryu *et al.*, 2004). Dans les situations où les plantes ne sont pas en état de résistance systémique (SAR ou ISR), leur état de résistance basale contre des pathogènes spécifiques serait régulé par l'action concertée des trois molécules signal (Pieterse *et al.*, 2002). De plus, il est également intéressant de noter que la mutation *npr1* bloque la mise en place de l'ISR. Ce qui suggère que l'ISR a besoin d'un gène *NPR1* fonctionnel (Cao *et al.*, 1994; Pieterse *et al.*, 1998).

L'activation simultanée des voies de résistances systémiques (SAR et ISR) conduit à une augmentation des niveaux de protection contre les agents pathogènes, suggérant que les réponses de défense activées à travers les différentes voies sont additives (van Wees *et al.*, 2000).

3.4. Les réponses de défense mises en place par la plante

3.4.1. Protéines PR

Du point de vue moléculaire, une des caractéristiques de la SAR est l'accumulation de protéines appelées protéines PR (pathogenesis-related) (Ward *et al.*, 1991; Uknes *et al.*, 1992). Les protéines PR sont structurellement différentes et possèdent diverses fonctions à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule végétale (Van Loon et Van Strien, 1999). Dix sept familles d'ARNm codant des protéines de la SAR ont été identifiées et sont fondées sur leurs structures et leurs activités biologiques (Tableau SB.5) (van Loon *et al.*, 2006). Certaines protéines PR possèdent des propriétés antimicrobiennes, par exemple, des chitinases (PR-3, 4, 8, 11), des β -1,3-glucanases (PR-2) et des peptides cationiques (Van Loon et Van Strien, 1999).

Protéines PR	Cultivar	Organe étudié	Pathogènes	Références bibliographiques
Accumulation de β -1,3- glucanases	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	feuilles	<i>B. cinerea</i>	Renault <i>et al.</i> , 1996
Induction de l'expression des gènes de chitinases	<i>V. vinifera</i> cv. Pinot noir <i>V. rupestris</i>	feuilles cellules	<i>P. viticola</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Busam <i>et al.</i> , 1997
Stimulation des activités β -1,3- glucanases et peroxydases	<i>V. vinifera</i> cv. Cabemet sauvignon	feuilles	<i>P. viticola</i>	Reuveni, 1998
Accumulation de chitinases et de β -1,3- glucanases	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	feuilles	<i>B. cinerea</i>	Derckel <i>et al.</i> , 1999
Accumulation de chitinases, de β -1,3- glucanases et de thaumatin-like	<i>V. vinifera</i> cv. Cabemet sauvignon, Sémillon	feuilles baies	<i>E. necator</i> , <i>P. viticola</i>	Jacobs <i>et al.</i> , 1999
Accumulation de PR-10	<i>V. vinifera</i> cv. Ugni blanc	feuilles	<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	Robert <i>et al.</i> , 2001
Induction de l'expression de gènes de chitinases	<i>V. vinifera</i> cv. Ugni blanc, Chardonnay	feuilles baies	<i>B. cinerea</i> , <i>E. necator</i> , <i>P. viticola</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	Robert <i>et al.</i> , 2002
Induction de l'expression de gènes de chitinase	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay <i>V. vinifera</i> cv Pinot noir	feuilles baies	<i>B. cinerea</i>	Bézier <i>et al.</i> , 2002
Induction de l'expression de gènes de chitinases, de β -1,3- glucanases et d'inhibiteur de protéase	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	feuilles	<i>B. cinerea</i>	Bézier, 2003
Induction de l'expression des gènes de chitinase, de β -1,3- glucanases, de thaumatin-like (PR-5), de PR-10	<i>V. vinifera</i> cv. Gloire <i>V. vinifera</i> cv Riesling	feuilles	<i>P. viticola</i> , <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Kortekamp, 2006

Tableau SB.6 : Exemples non exhaustifs de l'accumulation de protéines PR chez *Vitis* lors de son interaction avec différents pathogènes

On dénombre aussi des osmotines et thaumatine-like (PR-5), des inhibiteurs de protéases (PR-6), des peroxidases (PR-9), des défensines (PR-12) ou des protéines de transfert de lipides (PR-14) mais il reste encore des protéines PR pour lesquelles aucune fonction n'a encore été identifiée (Eulgem, 2005).

Les protéines PR commencent à s'accumuler dans les tissus locaux et systémiques peu après l'infection d'un agent pathogène et les niveaux peuvent augmenter pendant plusieurs heures ou jours (Ward *et al.*, 1991; Uknes *et al.*, 1992; Van Loon et Van Strien, 1999). En raison de l'expression caractéristique de ces gènes pendant la SAR, ils sont couramment utilisés comme marqueurs moléculaires de ce phénomène de résistance. Par exemple, chez *Arabidopsis*, les gènes *PR-1*, *PR-2* et *PR-5* sont identifiés comme des gènes marqueurs de la SAR (Uknes *et al.*, 1992; Durrant et Dong, 2004). De plus, il est important de noter que le type de protéine et le niveau d'expression des gènes *PR* varient selon les espèces ; ainsi les gènes marqueurs doivent être déterminés sur une base individuelle d'interaction plante - agent pathogène. C'est l'expression multiple des gènes *PR* qui peut expliquer la résistance à large spectre observée lors de la SAR.

Les mutants pour lesquels l'expression des gènes *PR* est abolie comme *npr1* (*non-expressor of PR genes1*) (Cao *et al.*, 1994), montrent une sensibilité accrue aux maladies alors que les mutants qui expriment constitutivement les gènes *PR* comme *acd2* (*accelerated cell death2*) (Dietrich *et al.*, 1994), montrent une résistance augmentée aux maladies.

En plus des gènes *PR*, il existe d'autres gènes qui sont régulés en amont ou en aval de la SAR (Maleck *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2004; Pylatuik et Fobert, 2005). Le SA stimule l'expression de *PR-1*, *PR-2* et *PR-5*, alors que le JA et l'ET activent l'expression de *PR-3*, *PR-4* et de la défensine *PDF1.2* chez *Arabidopsis*.

Depuis ces dix dernières années, plusieurs travaux relatent l'accumulation de protéines PR chez la vigne. Plusieurs protéines PR ont été identifiées notamment dans les feuilles, mais également dans d'autres organes comme les baies ou les racines. La majorité de ces protéines PR correspondent aux chitinases (classe I, III et IV), β -1,3 glucanases (PR-2), peroxydases (PR-9), «thaumatin-like» ou osmotines (PR-5), «ribonuclease-like» (PR-10), une LTP (PR-14), un inhibiteur de protéase (PR-6) et une PR-1 (Tableau SB.6).

L'étude concernant les chitinases de vigne a débuté par la mesure de leur activité dans les feuilles (Derckel *et al.*, 1996; Derckel *et al.*, 1999) et a permis de mettre en évidence plusieurs isoformes de chitinases acides et basiques, dont certaines sont constitutives et trois autres sont induites par *B. cinerea*. Une forte induction de chitinases (classes I, III et IV) dans les feuilles de vigne infectées par *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, *Botrytis cinerea* ou *P. syringae* a été relevé (Busam *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 1999; Robert *et al.*, 2001; Bezier *et al.*, 2002).

Des β -1,3 glucanases de vigne ont également été identifiées dans des feuilles infectées par *B. cinerea* (Renault *et al.*, 1996). Des approches moléculaires ont permis d'identifier différents gènes codant pour la β -1,3 glucanase dans les feuilles et / ou dans les baies de vigne suite à l'infection par *E. necator* ou par *B. cinerea* (Jacobs *et al.*, 1999; Bezier *et al.*, 2002).

Des protéines de la famille des osmotines ou des thaumatine-like (PR-1, PR-5) ont également été identifiées chez la vigne et leur puissante activité anti-fongique a été démontrée *in vitro* (Tattersall *et al.*, 1997; Salzman *et al.*, 1998; Monteiro *et al.*, 2003). Ces protéines agissant en synergie sont capables de bloquer la croissance de *B. cinerea* et de *Phomopsis viticola* (agent de l'excoriose de la vigne) ainsi que de leur mycélium. Elles sont également capables d'inhiber la germination de leur spores (Monteiro *et al.*, 2003).

Des protéines de la famille des protéines de transfert de lipides (LTP ; PR-14) et des PR-10 ont été également identifiées comme étant sécrétées dans le milieu extracellulaire au cours de l'embryogenèse somatique de cellules de Vigne (Coutos-Thevenot *et al.*, 1992; Maillot *et al.*, 2009). Leur expression peut être fortement induite par des éliciteurs fongiques tels que l'ergostérol et le JA (Gomès *et al.*, 2003). Une protéine de la classe des PR-10 s'accumule suite à une infection par *P. syringae* (Robert *et al.*, 2001).

D'autres protéines de défense, comme les Polygalacturonase-Inhibiting Proteins (PGIP) ont également été caractérisées chez la vigne (Poinssot *et al.*, 2003; Joubert *et al.*, 2006). L'expression du gène *PGIP* est observée chez les feuilles ou les cultures cellulaires de vigne en réponse à *P. viticola* (Kortekamp, 2006) et à *B. cinerea* (Bezier *et al.*, 2002). L'insertion et la surexpression de *VvPGIP1* dans les plants de tabac sont même associées à une résistance vis à-vis de *B. cinerea* (Joubert *et al.*, 2006).

Pathogènes	Cultivar	Organe étudié	Réponses induites	Références bibliographiques
<i>B. cinerea</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Pinot noir, Chardonnay et Gamay	Feuilles	Accumulation de phytoalexines (resvératrol)	Jeandet <i>et al.</i> , 1992
<i>B. cinerea</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Pinot noir, Chardonnay et Gamay	Baies	Accumulation de phytoalexines (resvératrol)	Jeandet <i>et al.</i> , 1995
<i>B. cinerea</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	Feuilles	Induction de l'expression du gène STS Accumulation de phytoalexines (resvératrol)	Bézier, 2003
<i>B. cinerea</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Aledo	Baies	Accumulation de phytoalexines (resvératrol)	Monteiro <i>et al.</i> , 2003
<i>P. viticola</i> <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Gloire <i>V. vinifera</i> cv. Riesling	Feuilles	Induction de l'expression des gènes PAL, CHS, CHI et STS Accumulation de composés phénoliques	Kortekamp, 2006

Tableau SB.7 : Exemples d'induction de phytoalexines chez *Vitis*

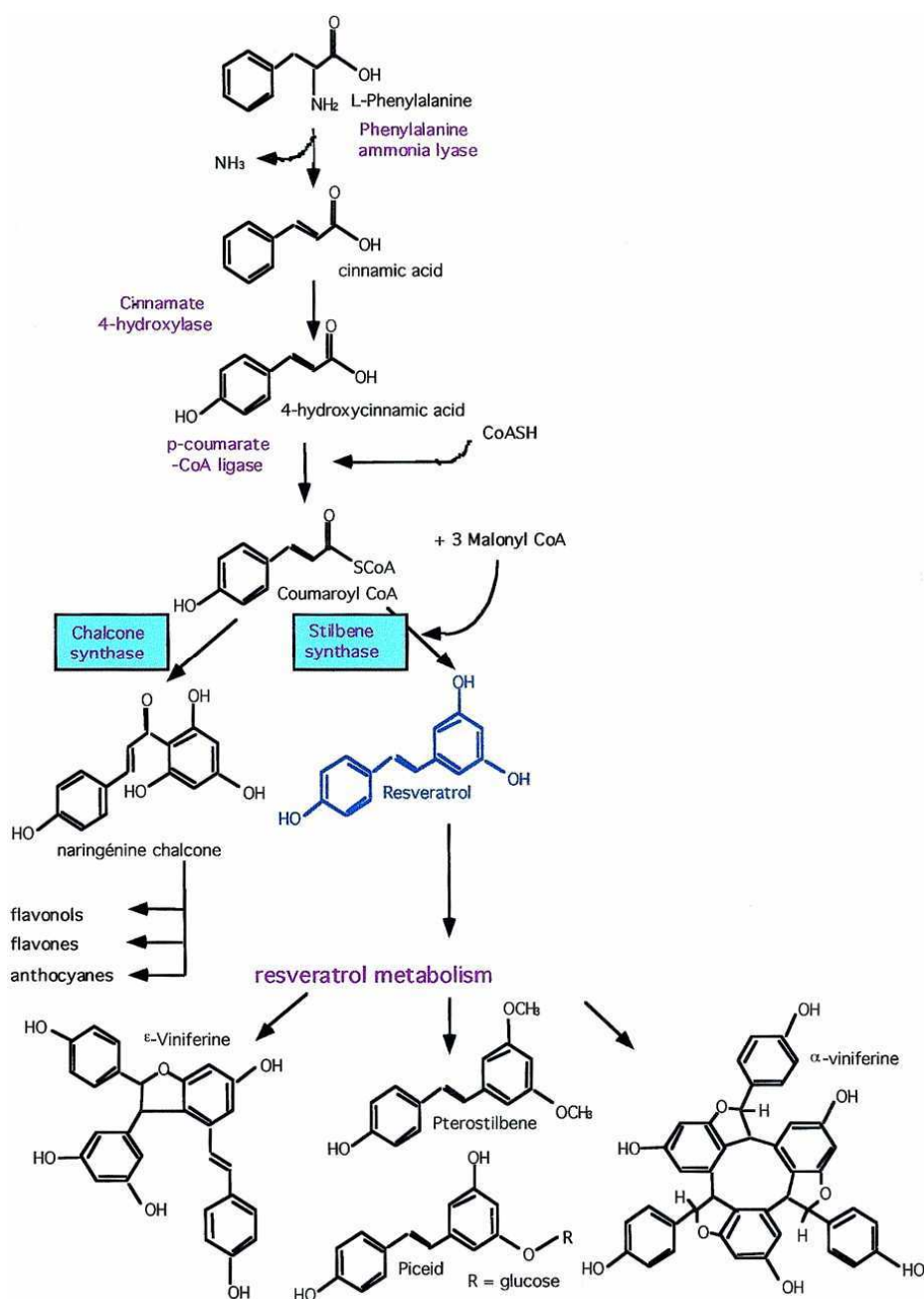


Figure SB.21 : Biosynthèse du trans-resvératrol et de ses dérivés (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001)

3.4.2. Phytoalexines

Les phytoalexines sont des petites molécules possédant des activités antimicrobiennes. Elles sont synthétisées en réponse à un éliciteur biotique ou abiotique et s'accumulent rapidement autour des sites de nécrose (Kuc, 1995). Elles ont été mises en évidence chez les Angiospermes (mono et dicotylédones) et chez les Gymnospermes (Harborne, 1999). Les métabolites secondaires des phytoalexines peuvent être issus de la voie de l'acétyl CoA pour les sesquiterpènes (Essenberg *et al.*, 1990) ou provenir de celle de l'acétyl CoA combinée à celle des shikimates pour les stilbènes, les coumarines ou les flavonoïdes.

L'accumulation des phytoalexines est l'une des principales réactions de défense caractérisée chez la vigne lors de son interaction avec différents pathogènes (Tableau SB.7). Les phytoalexines de la vigne appartiennent principalement à la famille des stilbènes. Les formes les plus abondantes sont le resvératrol et ses dérivés, le ptérostilbène (resvératrol méthylé), les viniférines (polymères de resvératrol) et les picéides (resvératrol glycosylé) (Figure SB.21). La production de phytoalexines est liée à l'activation de la voie des phénylpropanoïdes, dont les enzymes clefs sont la phénylalanine ammonia lyase (PAL) et la stilbène synthase (STS). Le séquençage du génome de la vigne a mis en évidence une quarantaine de gènes codant des STS (Jaillon *et al.*, 2007). Leur expression est stimulée en réponse à une attaque par différents microorganismes, *Botrytis cinerea*, *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola* (Jeandet *et al.*, 2002).

L'importance du resvératrol dans la défense des plantes a été démontrée *in planta* par l'insertion et la surexpression du gène de la STS. En effet, une vigne transgénique exprimant fortement le gène de la STS présente une tolérance vis-à-vis de *B. cinerea* (Coutos-Thevenot *et al.*, 2001).

3.4.3. Le renforcement des parois

Les différents agents pathogènes des plantes possèdent une batterie d'enzymes (pectinase, cellulase, xylanase, polygalacturonase) permettant de percer la première barrière de défense que constitue la paroi pecto-cellulosique. L'une des réponses les plus courantes chez les plantes suite à une infection est la formation de nouveaux composants qui viennent renforcer la paroi par formation de papilles et dépôts de macromolécules. Les papilles peuvent être constituées de callose ou de lignine mais aussi de subérine, des protéines pariétales, de silice ou/et de calcium et de composés antimicrobiens ou même d'enzymes hydrolysantes (Lepoivre, 2003). La formation de dépôts constitue une barrière à la progression des hyphes mycéliens au sein des espaces inter-cellulaires.

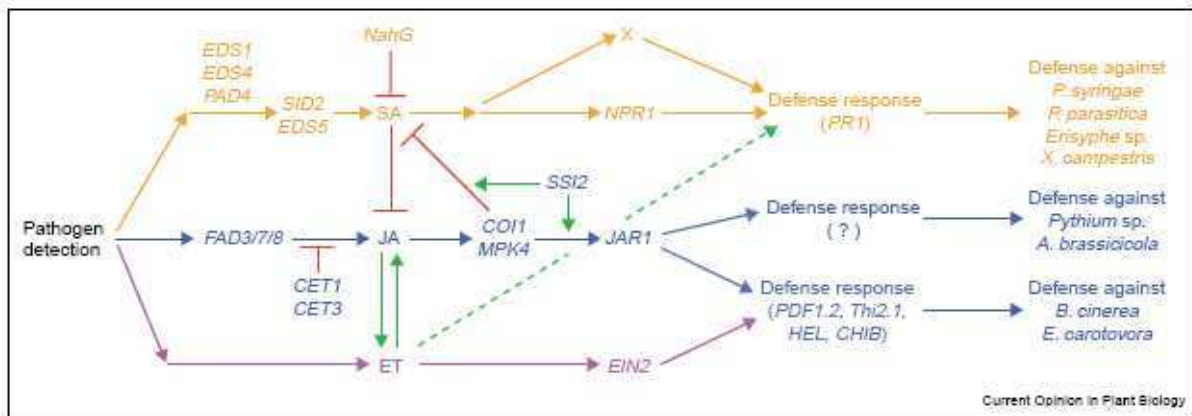


Figure SB.22 : Schéma général des voies de transduction SA, JA et ET impliquées dans la résistance contre des agents pathogènes chez *Arabidopsis thaliana* (Kunkel, 2002)

Les interactions régulées positivement parmi ces voies de signalisation sont indiquées avec des flèches vertes tandis que les interactions antagonistes sont indiquées avec des lignes rouges. L'hypothèse que SSi2 module des rétrocontrôles entre les voies de signalisation JA et SA est indiquée par les courtes flèches vertes. Les flèches discontinues vertes indiquent les interactions positives potentielles entre les voies SA et ET.

EDS : enhanced disease susceptibility ; **PAD4** : phytoalexin deficient4 ; **SID2** : SA induction deficient2 ; **NahG** : salicylate hydroxylase ; **SA** : salicylic acid

FAD : fatty acid desaturase ; **CET** : constitutive expressor of thionin ; **JA** : jasmonic acid ; **COI1** : coronatine insensitive1 ; **MPK4** : mitogen-activated protein kinase4 ; **SSi2** : suppressor of SA insensitivity2 ; **JAR1** : jasmonic acid resistant1

ET : ethylene ; **EIN2** : ethylene insensitive2 ; **PDF1.2** : plant defensin1 ; **Thi2.1** : thionin2.1 ; **HEL** : hevein-like protein ; **CHIB** : chitinaseB

La lignine permet la lignification des papilles et protège ainsi d'une infection ultérieure. Parmi les protéines pariétales, on peut citer les protéines riches en hydroxyproline (HRGP), les protéines riches en glycine (GRP) et les protéines riches en proline (PRP). L'accumulation de protéines HRGP chez le millet est corrélée à la résistance à l'agent du mildiou, *Sclerospora graminicola* (Shailasree *et al.*, 2004).

Parmi les réactions impliquées dans le renforcement de la paroi, la formation de callose a été observée chez la vigne dans la résistance à *Plasmopara viticola*. Cependant, une forte accumulation de callose au niveau des stomates des feuilles chez un cépage résistant à *P. viticola* a été observée (Gindro *et al.*, 2003) et aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre l'accumulation de callose et les différents niveaux de résistance de la vigne à *P. viticola* (Kortekamp *et al.*, 1997).

3.5. Les régulateurs génétiques de la SAR

Au cours des dernières années, *Arabidopsis* est devenu une plante modèle très importante pour permettre l'étude des systèmes de défense pouvant contrôler l'attaque des agents pathogènes. Les avancées dans la compréhension des mécanismes de signalisation des réponses de défenses sont dues à la disponibilité de plusieurs mutants affectés dans différentes voies de défense.

Les études utilisant ces mutants ont conduit à un aperçu des différentes voies de signalisation et de leur interaction qui contrôlent divers agents pathogènes (Figure SB.22) (Kunkel et Brooks, 2002).

Les gènes impliqués dans la régulation de la SAR ont été identifiés au cours de criblages visant à identifier différentes classes de mutants affectés dans différentes réponses de défense. Certains d'entre eux sont affectés de manière spécifique dans leur capacité à exprimer des gènes *PR*, d'autres montrent une résistance aux maladies amoindrie après le traitement avec des analogues de SA (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Shah *et al.*, 1997). En particulier, le mutant *npr1* a été mis en évidence. Ce mutant n'exprime pas les gènes *PR-1*, *PR-2* et *PR-5* en réponse à un traitement avec SA, INA ou BTH (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995). De plus, le mutant *npr1* est incapable de mettre en place la SAR en réponse à une application exogène de SA ou une première infection par un microorganisme avirulent.

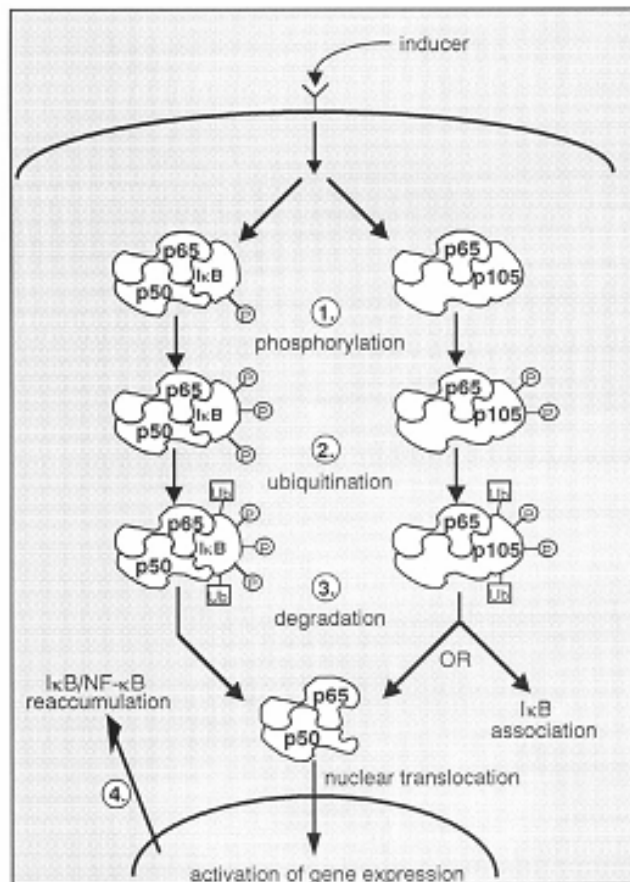


Figure SB.23 : Schéma général de l'activation de NFκB (d'après Baldwin, 1996)

Après exposition d'une cellule à l'inducteur, IκB devient phosphorylé (étape 1) par une kinase. Il est important de noter que IκB présente un niveau basal de phosphorylation. IκB est ensuite ubiquitiné (étape 2) puis dégradé par le protéasome (étape 3). Dans le cas de p105, la dégradation est partielle (produisant p50). Soit NFκB s'associe avec IκB, inhibant ainsi sa translocation dans le noyau, soit il est transloqué dans le noyau où il active une série de gènes (étape 4).

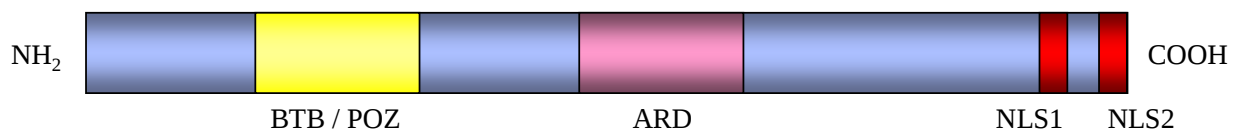


Figure SB.24 : Schéma de la structure de NPR1 chez Arabidopsis

BTB / POZ : Broad complex Tramtrac Bric-à-brac/POx virus and Zinc Finger

ARD : Ankyrin-Repeat Domain

NLS : Signaux de localisation nucléaire

3.5.1. NPR1 : régulateur clé de la voie de signalisation de l'acide salicylique

3.5.1.1. Caractéristiques des protéines NPR1 chez *Arabidopsis thaliana*

Le gène *NPR1* (*Nonexpressor of pathogenesis-related 1* gene), également appelé non-inducible immunity 1 [NIM1 ; (Delaney *et al.*, 1995)] et salicylic acid-insensitive [SAI1 ; (Shah *et al.*, 1997)], code pour une protéine clé dans la signalisation des réponses de défense dépendantes du SA (Dong, 2004). Structurellement, la protéine NPR1 est de 66 KDa (593 acides aminés chez *Arabidopsis*) (Cao *et al.*, 1997). NPR1 montre des similarités de séquence avec la protéine de mammifère IκB (qui joue un rôle dans la résistance aux maladies) et contient plusieurs lysines et sérines en N-terminal qui sont potentiellement impliquées dans des événements d'ubiquitination et de phosphorylation (Ryals *et al.*, 1997). Chez les mammifères, la protéine IκB interagit avec le facteur de transcription NFκB, inhibant sa translocation dans le noyau (Baldwin, 1996) (Figure SB.23). Le gène *NPR1* code une protéine contenant deux zones riches en acides aminés basiques typiques des signaux de localisation nucléaire (NLS) dans la partie C-terminale, un domaine ARD (Ankyrin-Repeat Domain) localisé dans la région centrale de la protéine, et un domaine BTB / POZ (Broad complex Tramtrac Bric-à-brac/POx virus and Zinc Finger) en N-terminal (Cao *et al.*, 1997; Aravind et Koonin, 1999; Sedgwick et Smerdon, 1999; Becerra *et al.*, 2004; Rochon *et al.*, 2006) (Figure SB.24).

Les mutants ont montré que les domaines ARD et BTB/POZ sont impliqués dans les interactions protéine-protéine (Bardwell et Treisman, 1994; Cao *et al.*, 1997). Plusieurs mutants *npr1* présentent des polymorphismes au niveau des acides aminés conservés du domaine ARD, ce qui suggère un rôle important de ce motif pour la fonction de NPR1 dans la résistance aux maladies. De plus, des expériences de mutagenèse dirigée au niveau des NLS ont montré que seule la zone en amont (NLS1) est responsable de la localisation nucléaire d'AtNPR1 (Kinkema *et al.*, 2000). NPR1 ne contient pas de domaine de liaison à l'ADN connu, suggérant qu'il ne doit pas fonctionner comme un facteur de transcription séquence-spécifique.

3.5.1.2. Les mutants *npr1*

Les mutants *npr1-2* et *npr1-3* ont été isolés dans un crible différent visant à identifier des gènes impliqués dans la résistance basale contre une souche virulente de *P. syringae* (Glazebrook *et al.*, 1996). Le mutant *npr1-2* s'est également révélé être défectueux dans la mise en place de la SAR contre *H. parasitica* après un prétraitement par l'INA (Cao *et al.*, 1997).

Le mutant *npr1-5*, plus connu sous le nom de *SA insensitive1 (sai1)*, a été identifié dans un crible génétique différent visant à identifier des gènes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes *PR-1*, *PR-2* et *PR-5*, induit par SA ou ses analogues (Shah *et al.*, 1997). Les mutants *nim1* (*non-inducible immunity1*) sont alléliques à *npr1* et ont été identifiés lors de cribles pour une résistance induite par l'INA amoindrie vis-à-vis de *H. parasitica* (Delaney *et al.*, 1995). Le phénotype du mutant *npr1* ne peut pas être restauré par un traitement avec SA, indiquant que *NPR1* fonctionne en aval de ce métabolite dans la voie de signalisation de la SAR (Ryals *et al.*, 1997).

Les mutants *npr1* d'*Arabidopsis thaliana*, contrairement aux plantes sauvages, sont aussi plus sensibles aux souches virulentes de *P. syringae* (Cao *et al.*, 1994), *H. parasitica* (McDowell *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005) (Delaney *et al.*, 1995) et *E. cichoracearum* (Xiao *et al.*, 2005).

Les mutants *npr1* sont également impliqués dans la résistance systémique induite (Pieterse *et al.*, 1998) et dans celle générée par l'acide β -aminobutyrique (BABA) (Jakab *et al.*, 2001; Cohen, 2002). *NPR1* ne semble pas être requis pour la résistance en aval de tous les gènes *R* testés (Rairdan et Delaney, 2002). Ces résultats indiquent que *NPR1* est impliqué comme un régulateur positif de la SAR, de l'ISR, de la résistance induite par BABA, des défenses basales, du priming et de la résistance race spécifique conférée par certains gènes *R*. Mis à part son rôle dans la SAR, *NPR1* semble être impliqué dans d'autres phénomènes de résistance.

Les mutants *npr1* n'expriment pas les gènes *PR-1*, *PR-2* et *PR-5* en réponse à un traitement avec SA, INA ou BTH (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995). Cependant, un niveau bas d'expression des gènes *PR* est observé après stimulation par des agents pathogènes ou dans certains mutants en combinaison avec *npr1* (Glazebrook *et al.*, 1996; Dong, 2001; Liu *et al.*, 2005), indiquant la présence de voies de résistance SA-dépendantes et *NPR1*-indépendantes.

3.5.1.3. Surexpression de NPR1 chez *Arabidopsis* et des plantes d'intérêt agronomique – Impact sur la résistance aux agents pathogènes

Le séquençage du génome d'*Arabidopsis* a conduit à l'identification de cinq paralogues du gène *NPR1* (Kaul *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005). Ils ont été appelés *NPR2* (At4g26120 ; est le membre le plus proche avec 61,3 % d'identité), *NPR3* (At5g45110 ; 34,5 % d'identité), *NPR4* (At4g19660 ; 36 % d'identité), *blade-on-petiole 1* (*BOP1*) (At3g57130 ; 21,4 % d'identité) et *blade-on-petiole 2* (*BOP2*) (At2g41370 ; 19,9 % d'identité) (Hepworth *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). Ces cinq gènes *NPR1*-like possèdent tous les domaines BTB/POZ et ARD. *NPR1*, *NPR3* et *NPR4* jouent un rôle lors des réponses de défense (Cao *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). *BOP1* et *BOP2* sont impliqués dans la morphogenèse des plantes ou dans la modulation de l'activité méristématique (Ha *et al.*, 2004; Hepworth *et al.*, 2005). Parmi tous les gènes *NPR1*-like, *NPR1* a été très bien caractérisé et des études récentes ont été rapportées sur *NPR4* (Liu *et al.*, 2005). Tout comme *NPR1*, *NPR4* est localisé dans le noyau et interagit avec les mêmes facteurs de transcription TGA. Les niveaux de transcrits de *NPR4* augmentent rapidement après un traitement avec SA mais diminuent rapidement après un traitement avec du méthyljasmonate (MeJA) (Liu *et al.*, 2005). La résistance aux maladies et l'expression des gènes *PR* ne sont pas autant affectées dans le mutant *npr4* que dans le mutant *npr1*, suggérant que le rôle de *NPR4* n'est pas aussi prépondérant que celui de *NPR1*.

Le gène *NPR1* a également été identifié et caractérisé chez la tomate (Ekengren *et al.*, 2003), le colza (Potlakayala *et al.*, 2007), la papaye (Zhu *et al.*, 2003), la pomme (Malnoy *et al.*, 2007), la banane (Endah *et al.*, 2008), la moutarde (Meur *et al.*, 2006), le coton (Zhang *et al.*, 2008), la pomme de terre (Pajerowska *et al.*, 2005), le tabac (Liu *et al.*, 2002; Weigel *et al.*, 2005) et le riz (Chern *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2007). Dans le riz, cinq gènes homologues de *NPR1* (*OsNPR1 homolog 1* - *NH1* - DQ450948 ; *OsNPR2* - *NH2* - DQ450950 ; *OsNPR3* - DQ450952 ; *OsNPR4* - DQ450954 et *OsNPR5* - DQ450956) ont été identifiés par comparaison de séquences (Yuan *et al.*, 2007). De ces cinq gènes *NPR1* de riz, seul *OsNPR1* a été bien étudié (Chern *et al.*, 2001; Chern *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2007).

Tout comme *NPR1* d'*Arabidopsis*, *OsNPR1* du riz possède des résidus cystéines conservés aux positions C82 et C216 qui sont essentiels pour la monomérisation redox-dépendante. De plus, l'expression de *OsNPR1* est induite non seulement après le traitement du riz par les agents pathogènes *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* et *Magnaporthe grisea*, mais aussi après traitement par le benzothiadiazole (BTH), le méthyl-jasmonate (MeJA) et l'éthylène (ET) (Yuan *et al.*, 2007).

Les plants de riz transgéniques exprimant un gène *NPR1* d'*Arabidopsis* montrent des lésions mimant la mort cellulaire (Fitzgerald *et al.*, 2004). L'ensemble de ces résultats suggère que *NPR1* doit être bien conservé à travers le règne végétal (Liu *et al.*, 2002; Ekengren *et al.*, 2003; Chern *et al.*, 2005).

La surexpression de *NPR1* dans *Arabidopsis* a conduit à l'augmentation de la résistance contre *P. syringae* et *H. parasitica* (Cao *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2001) et *E. cichoracearum* (Friedrich *et al.*, 2001). La plupart des lignées transgéniques n'ont pas présenté d'expression constitutive des gènes *PR* (Cao *et al.*, 1998). Au contraire, l'augmentation de la résistance dans ces lignées est corrélée à une expression plus forte des gènes *PR* mais uniquement après infection (Cao *et al.*, 1998). En outre, une corrélation directe existe dans les lignées de surexprimeurs entre les niveaux de protéine *NPR1* et la résistance aux maladies. Friedrich *et al.* (2001) ont démontré que l'augmentation de la résistance, après induction au BTH, était corrélée avec la rapidité plutôt que les hauts niveaux d'expression des gènes *PR*. A de faibles concentrations de BTH, les plantes transgéniques surexprimant *NPR1* sont capables d'augmenter une réponse de défense contre *H. parasitica* contrairement aux plantes sauvages (Friedrich *et al.*, 2001). L'expression de *NPR1* dans un hôte hétérologue comme la tomate a abouti à une résistance durable contre les souches virulentes de *P. syringae* et *F. oxysporum*, à une résistance modérée à *Xanthomonas campestris*, *Ralstonia solanacearum* et *Stemphylium solani*, mais à aucune augmentation de résistance vis-à-vis de *Phytophthora infestans*, du virus de la mosaïque du concombre (CMV) et du virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (TYLCV) (Lin *et al.*, 2004). Les niveaux de résistance à *P. syringae* et *F. oxysporum* sont comparables, mais pas aussi élevés, que ceux conférés par les gènes *R*. Dans la plupart des cas, l'augmentation de la résistance aux maladies est corrélée avec les niveaux accrus de *NPR1*. Cependant dans quelques cas, les niveaux de *NPR1* ne sont pas corrélés avec l'augmentation de la résistance aux maladies conduisant les auteurs à proposer que la résistance doit avoir besoin d'un niveau seuil d'expression de *NPR1* dans les plants de tomates transgéniques (Lin *et al.*, 2004).

De plus, il n'y avait aucune corrélation entre les niveaux d'expression de gènes *PR* et les niveaux de *NPR1* ou la résistance aux maladies chez la tomate (Lin *et al.*, 2004).

La surexpression d'*AtNPR1* (Chern *et al.*, 2001) et de *NPR1 HOMOLOG 1 (NH1)* isolé chez le riz (Chern *et al.*, 2005) conduit à l'augmentation dans le riz de la résistance contre l'agent pathogène *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, suggérant que la fonction de *NPR1* est conservée entre les mono- et dicotylédones.

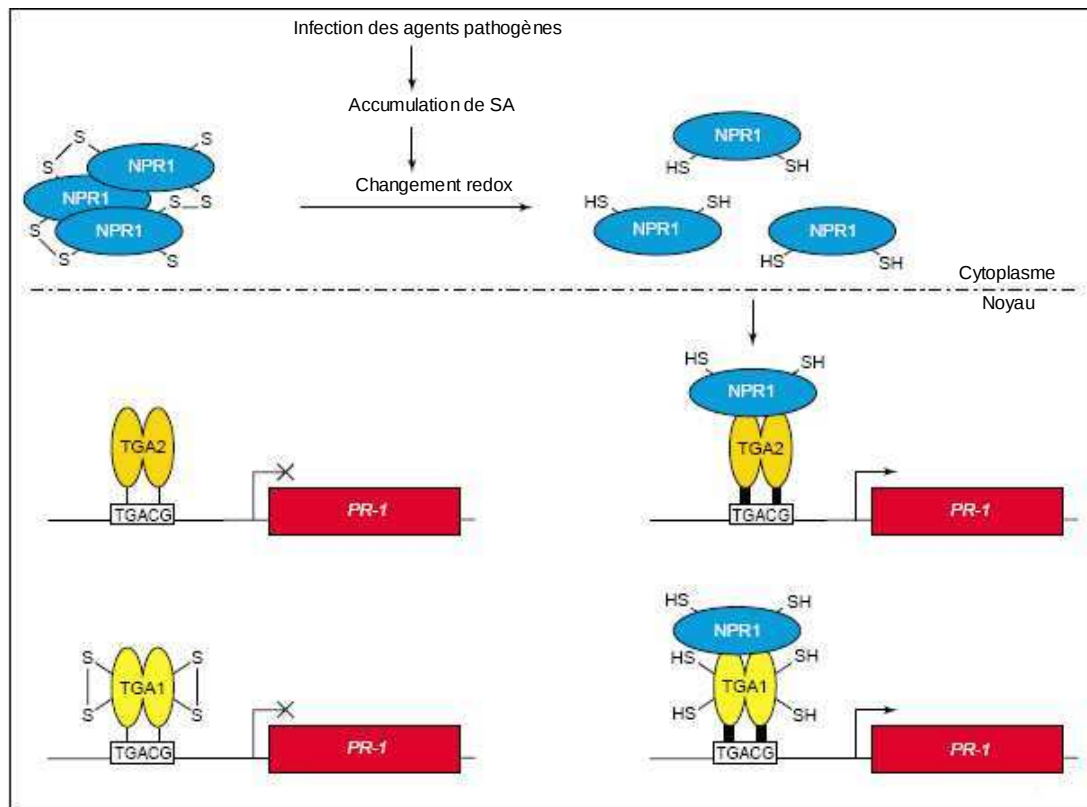


Figure SB.25 : Mode d'action simplifié de l'activation des gènes de défense par *NPR1* (Pieterse et Van Loon, 2004)

En condition non induite, les protéines NPR1 sont dans le cytoplasme sous forme d'oligomères maintenus par des ponts disulfure.

Après infection par un pathogène, l'acide salicylique s'accumule conduisant à un changement redox. Ceci provoque la rupture des ponts disulfure. La protéine NPR1 devient monomérique et peut se transloquer dans le noyau. Les protéines monomères NPR1 se lient aux facteurs de transcription TGA présents dans le noyau, il en résulte un complexe NPR1-TGA. Ce complexe reconnaît et se lie aux séquences TGACG trouvées dans les régions promotrices des gènes *PR-1*, conduisant à l'activation des gènes *PR* et par conséquent aux réponses de défense (droite). Cependant, en l'absence de protéines NPR1 monomériques dans le noyau, les facteurs de transcription sont incapables d'induire les gènes *PR* et les mécanismes de résistance (gauche).

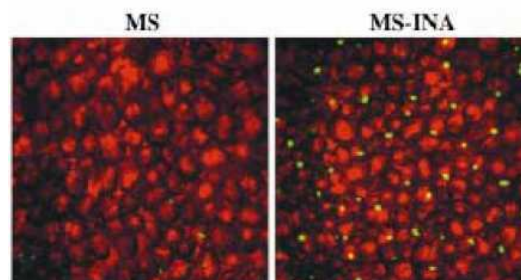


Figure SB.26 : Localisation nucléaire de NPR1 fusionné avec de la GFP en réponse à une induction par INA (Kinkema *et al.*, 2000)

Chez le riz, il a été observé que la résistance à *X. oryzae* conférée par NPR1 n'était pas aussi efficace que la résistance conférée par les gènes *R*. Cependant, une réduction importante de la multiplication de l'agent pathogène a été observée dans la nervure centrale des feuilles, ce qui a limité la propagation bactérienne et a augmenté la survie des plantes de riz. Dans la tomate, un niveau seuil d'expression est requis pour la résistance contre *X. oryzae*. La surexpression de NH1 dans le riz a également conduit au développement spontané de lésions nécrotiques et à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène (Fitzgerald *et al.*, 2004). Aucun de ces phénomènes n'a été rapporté dans les dicotylédones surexprimant NPR1 (Fitzgerald *et al.*, 2004). Contrairement aux plantes sauvages qui contiennent des hauts niveaux de SA en conditions non induites, les plantes transgéniques surexprimant NH1 présentent des bas niveaux de SA, suggérant que NPR1 doit être impliqué dans la régulation du métabolisme de SA (Cao *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2004; Chern *et al.*, 2005).

3.5.1.4. Mode d'action de NPR1

Quelques années après l'isolement du premier gène *NPR1* dans *Arabidopsis*, le mode d'action de ce gène dans les réponses de défense restait inconnu du fait de l'incapacité de la protéine NPR1 à se lier directement à l'ADN (Dong, 2004). Zhou *et al.* (2004) ont alors spéculé que le gène *NPR1* pouvait agir comme un facteur de transcription grâce à ses domaines d'interaction protéine-protéine. En raison de la découverte des facteurs de transcription avec une séquence TGA (Zhou *et al.*, 2000), une voie de signalisation relayée par NPR1 a été proposée (Figure SB.25). Dans les cellules saines, *NPR1* est exprimé constitutivement à de très faibles concentrations (Dong, 2004). La plupart des protéines NPR1 sont inactives et sont regroupées en oligomères dans le cytoplasme (Figure SB.26) (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003). Après activation par un agent pathogène et l'accumulation de molécules signal (SA, JA et ET) ainsi que des espèces activées de l'oxygène (ROS), le statut redox du cytoplasme évolue en une forme plus réduite (Noctor *et al.*, 2002). Dans le cytoplasme, des ponts disulfures maintiennent les polymères NPR1 ensemble, et un environnement oxydant est essentiel pour maintenir les ponts disulfures intacts. Lorsque l'environnement du cytoplasme se réduit, les ponts disulfures se dissocient conduisant à la formation de monomères de NPR1 (Mou *et al.*, 2003). Un changement dans le cytoplasme de l'association glutathion réduit / oxydé (GSH/GSSG) contribue également à la dissociation des polymères dans le cytoplasme (Mou *et al.*, 2003). Le mécanisme exact reste peu clair, notamment comment GSH provoque la réduction.

Cependant, les études menées par Mou *et al.*, (2003) démontrent que lors de l'induction des réponses de défenses par SA ou un agent pathogène, il y a une diminution de la concentration de GSH qui entraîne un changement du ratio GSH/GSSG. Ceci est suffisant pour réduire les protéines NPR1.

NPR1 monomérique est ensuite transloqué dans le noyau. Cette translocation est facilitée par la présence de signaux de localisation nucléaire (NLS) (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003). Dans le noyau, NPR1 monomérique reconnaît et se lie aux facteurs de transcription TGA pour l'induction de divers gènes *PR* (Zhou *et al.*, 2000).

De plus, dix résidus cystéines conservés ont été identifiés dans la séquence *NPR1* (Mou *et al.*, 2003). Les résidus présents aux positions C82 et C216 de la séquence jouent un rôle central dans l'oligomérisation de *NPR1*. Des mutations de ces résidus dans *NPR1* conduit à la monomérisation constitutive de la protéine suivie par sa translocation dans le noyau et par l'activation constitutive de l'expression du gène *PR-1*.

3.5.1.5. NPR1 est impliqué dans des voies de signalisation indépendantes du SA

Il est actuellement couramment accepté que la protéine NPR1 joue un rôle central dans beaucoup de réponses de défense systémiques conférant un niveau de résistance accru face à une large gamme d'agents pathogènes et d'herbivores (Cao *et al.*, 1994; Johansson *et al.*, 2006; Rayapuram et Baldwin, 2007; Yuan *et al.*, 2007). Il est également évident que le SA est une molécule signal clef requise pour l'activation du gène *NPR1* (Rochon *et al.*, 2006; Loake et Grant, 2007). Cependant, certaines études ont dévoilé l'existence d'une voie JA/ET-*NPR1* dépendante (Pieterse *et al.*, 1998; van Wees *et al.*, 2000; Berrocal-Lobo et Molina, 2004) où ET agit en aval de JA. JA et ET induisent également certains sous-ensembles de gènes *PR*, tels que *PR-3*, *PR-4*, *PR-12 (PDF1.2)* (Penninckx *et al.*, 1998), qui codent pour des protéines à activités antifongiques (van Loon *et al.*, 2006).

Chez *Arabidopsis*, la résistance à *Fusarium oxysporum* et à *Verticillium longisporum* est dépendante de JA, ET, SA et de *NPR1* (Berrocal-Lobo et Molina, 2004; Johansson *et al.*, 2006).

3.5.1.6. Etat des connaissances de NPR1 chez la vigne

Parallèlement à mon travail, une thèse portant sur la caractérisation fonctionnelle de gènes de signalisation intervenant dans les réponses de défense aux agents pathogènes chez la vigne a été réalisée par Gaëlle Le Henanff (Le Hénanff, 2009). L'analyse des banques d'EST et des données issues du séquençage du génome de la vigne indique que deux gènes chez la vigne (*VvNPR1.1* et *VvNPR1.2*) montrent de fortes similarités de séquence avec *AtNPR1*.

Ces travaux de thèse ont montré que l'expression constitutive de *VvNPR1.1* et de *VvNPR1.2* est augmentée dans des feuilles de *V. vinifera* cv. Chardonnay après traitement par du BTH. Les protéines *VvNPR1* fusionnées à la GFP sont principalement localisées dans le noyau. De plus, la surexpression de *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* en système hétérologue (feuilles de *Nicotiana benthamiana*) stimule l'expression de deux gènes SA-dépendants, PR1 et PR2. L'expression transitoire d'*AtNPR1* et de *VvNPR1.1* dans des feuilles de vignes montre une induction sensiblement augmentée de *VvPR-1* en réponse à *P. viticola*. D'autre part, la transformation stable de mutants *npr1.2* d'*Arabidopsis* par *VvNPR1.1* améliore la résistance à *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* et restaure l'expression d'*AtPR-1* contrôlée par le SA. Contrairement à *VvNPR1.1*, *VvNPR1.2* semble incapable de stimuler la résistance à *Psm* ou l'expression d'*AtPR-1* après un traitement au SA. Ces résultats suggèrent que *VvNPR1.1* soit probablement l'orthologue d'*AtNPR1* et que *VvNPR1.2* pourrait avoir une ou des fonctions différentes de *VvNPR1.1* et *AtNPR1*.

3.5.2. Les facteurs de transcription TGA

Les facteurs TGA ont tout d'abord été identifiés grâce à leur capacité à se lier à l'élément *activating sequence 1* (*as-1*) du promoteur 35S du Virus de la Mosaïque du Chou-fleur (CaMV) (Katagiri *et al.*, 1989). Les facteurs TGA sont composés de deux motifs TGACG espacés de huit nucléotides. C'est de ces motifs que le nom des facteurs TGA dérive. Des études ont également montré que les facteurs TGA sont capables de se lier à un élément analogue trouvé dans le promoteur de l'*octopine synthase* (*ocs*) du plasmide Tumeur-inducing (Ti) d'*Agrobacterium tumefaciens* (Fromm *et al.*, 1989). Par conséquent, certains facteurs TGA ont d'abord été nommés Octopine Binding Factors (OBF) (Zhang *et al.*, 1993) mais seront cependant nommés comme des facteurs TGA dans cette thèse.

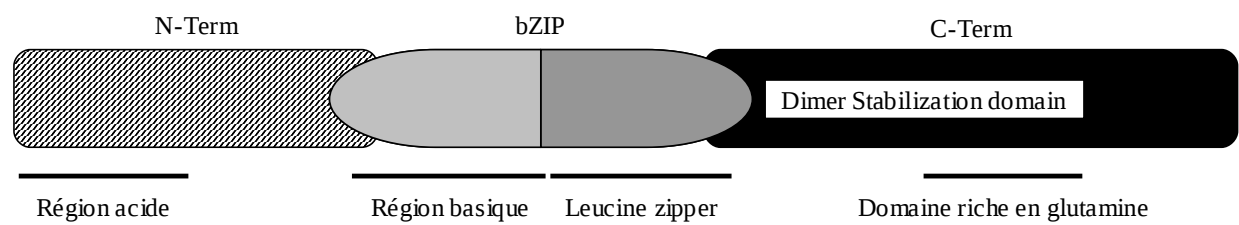


Figure SB.27 : Schéma de la structure du facteur de transcription TGA1a (d'après Pascuzzi *et al.*, 1998 et Katagiri, 1992)

Domaine N-term : acides aminés 1-86

Région bZIP : acides aminés 87-142

Domaine C-Term : 143-373

3.5.2.1. L'élément *as-1*

L'élément *as-1* a été décrit comme étant un élément important dans la régulation du gène codant une *glutathion S-transferase 6 (GST-6)* que *PR-1* (Lebel *et al.*, 1998; Strompen *et al.*, 1998). Il est également sur-représenté dans les promoteurs des gènes différentiellement exprimés après un stress abiotique ou une infection par un agent pathogène (Mahalingam *et al.*, 2003).

L'élément *as-1* semble être impliqué dans la réponse à un certain nombre de phytohormones tels que SA (Qin *et al.*, 1994), MeJa et l'auxine (Liu et Lam, 1994; Xiang *et al.*, 1996) ou au stress oxydatif (Garreton *et al.*, 2002). La séquence *as-1* a été isolée pour la première fois à partir d'une banque d'ADNc de tabac et a été appelée TGA1a (Katagiri *et al.*, 1989).

L'analyse de séquences du facteur de transcription TGA1a bZIP révèle qu'il est composé d'une région basique de liaison à l'ADN, d'une région leucine zipper importante pour la formation de dimères, d'un domaine N-terminal acide pour l'activation, d'un domaine riche en glutamine pour l'activation transcriptionnelle potentielle et enfin d'une région de stabilisation des dimères dans sa partie C-terminale (Figure SB.27) (Katagiri *et al.*, 1992; Neuhaus *et al.*, 1994; Pascuzzi *et al.*, 1998).

3.5.2.2. La structure des facteurs TGA

Les séquences des premiers facteurs TGA isolés dans le tabac ont permis d'identifier un domaine bZIP (Basic Leucine Zipper) (Katagiri *et al.*, 1989; Jakoby *et al.*, 2002). Le motif bZIP est composé d'environ 16 acides aminés basiques, d'un espace de neuf acides aminés suivi par une répétition de sept leucines ou de n'importe quel acide aminé hydrophobe (Jakoby *et al.*, 2002). Ces structures sont localisées sur l'hélice α contiguë et permettent l'interaction entre les protéines *via* les côtés hydrophobes des hélices.

Les facteurs de transcription contenant un motif bZIP ont été identifiés chez les plantes et les mammifères (Riechmann *et al.*, 2000). Chez les plantes, ils participent à la défense contre les agents pathogènes (Kim et Delaney, 2002) et au développement floral (Wigge *et al.*, 2005). Chez *Arabidopsis thaliana*, plus de 80 membres ont été identifiés. Ces gènes ont été classés en dix groupes basés sur les similarités de séquences des régions basiques et la présence de motifs conservés complémentaires. Parmi les facteurs de transcription à motif bZIP, les facteurs TGA constituent un groupe (Jakoby *et al.*, 2002).

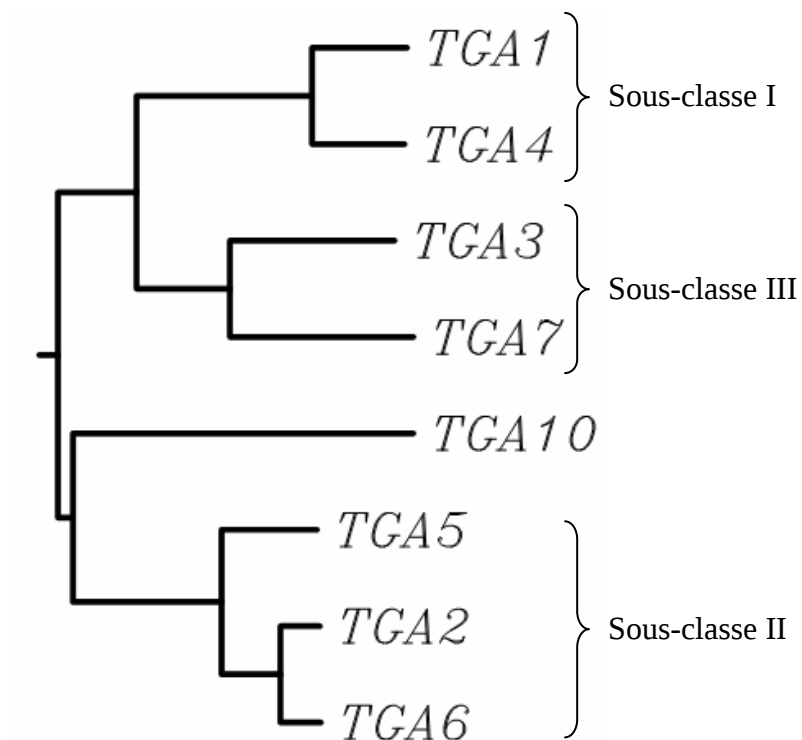


Figure SB.28 : Dendrogramme des facteurs TGA d'*Arabidopsis* (d'après Xiang *et al.*, 1997)

Sept membres de la famille des TGA sont répartis en trois sous-classes fondées sur les similarités de séquence en acides aminés

3.5.2.3. La famille des facteurs de transcription TGA

La famille des facteurs de transcription TGA d'*Arabidopsis* est composée d'une petite famille multigénique comprenant dix membres (Ryals *et al.*, 1997; Dong, 2001). Sept de ces membres ont été groupés, selon leur similarité de séquence en acides aminés, en trois sous-classes (Figure SB.28) (Xiang *et al.*, 1997) : classe I (TGA1 et TGA4), classe II (TGA2, TGA5 et TGA6), et la classe III (TGA3) (Jakoby *et al.*, 2002). Les différentes sous-classes possèdent peu ou pas de similarité au niveau de l'extrémité N-terminale (avant le bZIP) entre elles, alors qu'un haut degré de similarité est trouvé à l'extrémité C-terminale. De plus, les membres appartenant à la même sous-classe possèdent des spécificités similaires de liaison à l'ADN, d'expression, de propriétés transactivationnelles et d'interactions protéine-protéine (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000; Niggeweg *et al.*, 2000; Niggeweg *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Schiermeyer *et al.*, 2003).

3.5.2.4. Analyse fonctionnelle des facteurs TGA

La détermination de la fonction des facteurs TGA pendant la SAR est une tâche complexe. Peu d'études ont publié des données significatives sur la surexpression d'un membre de la famille TGA. Kim et Delaney (2002) ont constaté qu'en surexprimant TGA5, les plantes d'*Arabidopsis* montraient une augmentation de la résistance à une souche virulente de l'oomycète *Peronospora parasitica* alors que dans un même temps, les niveaux d'expression des gènes *PR* décroissent. Cette même étude a montré que la surexpression d'un autre membre de la famille des TGA (TGA2), n'a aucun effet sur la résistance aux maladies ou sur l'expression des gènes *PR*.

Il est difficile d'obtenir des plantes contenant des mutations dans un seul facteur TGA et il apparaît que pour étudier la fonction des TGA en utilisant cette approche, on ne peut pas cibler un seul membre de cette famille, mais inclure tous les gènes qui sont regroupés dans une même sous-classe (voir paragraphe 3.6.1.1.3). L'exemple le plus probant est l'étude réalisée sur le triple mutant *tga2,tga5,tga6* (Zhang *et al.*, 2003). Cette étude fournit la preuve évidente du rôle des facteurs TGA dans la SAR. Le triple mutant possède des ressemblances avec le mutant *npr1*. Lors d'une application exogène de SA ou d'INA, l'expression des gènes *PR* n'augmente pas dans ce triple mutant. De plus, ce mutant est incapable de mettre en place la SAR contre *Hyaloperonospora parasitica* et la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae*. Ces phénotypes n'ont pas été observés dans les simples mutants *tga6* ou *tga2, tga5*.

La surexpression de TGA2 ou TGA 5 seul est capable de restaurer le phénotype du triple mutant. Ceci fournit la preuve que la fonction des membres de la sous-classe II est redondante et également impliquée.

Des plantes mutantes dominantes-négatives des facteurs TGA ont été fréquemment utilisées pour l'étude de leur fonction *in planta*. En utilisant la surexpression de variants nuls de la protéine choisie, ce type de mutants devrait compléter la fonction de la protéine du type sauvage. A priori, on s'attend à ce que la plante transgénique présente le même phénotype que celui de la plante sauvage pour la protéine choisie. L'expression des formes dominantes-négatives du gène *AtTGA2* aboutit à des plantes dont la résistance basale contre *P. syringae* pv. *maculicola* est défectueuse (Fan et Dong, 2002). Cependant, la surexpression de ce même mutant dans le tabac montre une augmentation de la SAR contre *P. syringae* pv. *tabaci* ou après application de SA (Pontier *et al.*, 2001). La contradiction des résultats suggère que les facteurs TGA doivent fonctionner à la fois comme des régulateurs négatifs et positifs de l'expression des gènes dépendant de l'acide salicylique (Shah, 2003).

En effet, une étude du promoteur du gène *PR-1* a montré qu'il possède deux éléments cis, *linker scan7* (*LS7*) et *LS5* (Lebel *et al.*, 1998). Ces éléments agissent respectivement comme des régulateurs positifs et négatifs de l'expression de *PR-1* en réponse aux traitements par INA ou SA. TGA 2 est capable de se lier avec ces deux éléments et de façon intéressante NPR1 augmente cette liaison *in vitro* (Despres *et al.*, 2000). Ceci montre la difficulté de définir la fonction des facteurs TGA par rapport au mécanisme d'expression du gène *PR-1*.

3.5.3. Interactions de NPR1 avec des facteurs de transcription

3.5.3.1. Facteurs de transcription TGA et NPR1

La famille des facteurs de transcription TGA / OBF basic leucine zipper (bZIP) interagit avec NPR1 pour réguler les réponses de défense (Zhou *et al.*, 2000). Cette interaction physique a été identifiée à plusieurs reprises en système double hybride dans la levure (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Les facteurs TGA sont capables de reconnaître et de se lier à l'élément *as-1* (activation sequence-1) localisé dans la région promotrice de divers gènes sensibles aux stress (Zhang *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2003). La capacité des facteurs TGA à reconnaître et à se lier aux éléments cis-acting qui sont localisés au niveau du promoteur des gènes de défense, dépend uniquement de leur liaison à la forme monomérique de *NPR1* dans le noyau (Figure SB.25) (Despres *et al.*, 2000; Rochon *et al.*, 2006).

La capacité d'interagir avec NPR1 a été démontrée pour les membres des trois premières classes des facteurs TGA (Xiang *et al.*, 1997; Despres *et al.*, 2003; Kesarwani *et al.*, 2007). NPR1 interagit avec les facteurs TGA2, TGA3, TGA5, TGA6 et TGA7 d'*Arabidopsis* dans la levure alors que TGA1, TGA4 et PERIANTHIA n'interagissent pas ou que très faiblement (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Hepworth *et al.*, 2005). Le gène PERIANTHIA, chez *A. thaliana*, code un facteur TGA qui a été identifié dans un mutant montrant une penta symétrie dans les fleurs au lieu d'une tétrasymétrie dans le type sauvage (Chuang *et al.*, 1999). TGA1 et TGA4 interagissent avec NPR1 uniquement après stimulation par le SA alors que les autres TGAs cités précédemment peuvent interagir avec NPR1 en conditions non induites. De plus, dans *Oriza sativa*, le TGA2.1 natif a un rôle négatif dans la réponse basale de défense face aux bactéries pathogènes puisque le mutant rTGA2.1 présente une meilleure tolérance aux agents pathogènes (Fitzgerald *et al.*, 2005). L'activité des protéines TGA est également affectée par des changements de l'état redox de la cellule.

Des études d'électromobilité (EMSA ; Gel retard ou Electro mobility shift assays) ont montré que les protéines TGA2 et TGA1, traitées avec du dithiothreitol (DTT, agent réducteur), se lient fortement à la séquence d'activation 1 (*as-1*) et que cette liaison est augmentée par des protéines NPR1 réduites (Despres *et al.*, 2003; Pieterse et Van Loon, 2004). Récemment, il a été montré que le domaine BTB/POZ d'AtNPR1 se lie avec le domaine de répression de TGA2 pour réprimer sa fonction (Boyle *et al.*, 2009). Despres *et al.* (2003) ont montré que la réduction des résidus cystéines dans TGA1 et TGA4 est requise pour l'interaction avec NPR1. De plus, l'interaction de TGA2 avec NPR1 requiert le centre du domaine BTB/POZ de NPR1 (résidus 80 à 91), ainsi que l'oxydation des résidus cystéines cys-521 et cys-529 (Rochon *et al.*, 2006). Il a également été montré que TGA2 et TGA3 se lient au promoteur du gène *PR-1* uniquement en présence de SA et pour un gène *NPR1* fonctionnel (Johnson *et al.*, 2003). Tous ces résultats indiquent que NPR1 et SA sont importants tant pour la liaison à l'ADN que pour la transactivation des facteurs TGA.

3.5.3.2. Les facteurs de transcription WRKY et NPR1

Bien que l'interaction entre NPR1 et les facteurs de transcription TGA soit bien établie, les domaines de liaison aux TGA sont sous représentés dans les promoteurs des gènes de défense (Chen *et al.*, 2002). Les facteurs TGA ne sont donc pas les seuls facteurs de transcription agissant en aval de *NPR1* pour l'activation des gènes *PR*.

Il y a approximativement 74 à 100 gènes chez *Arabidopsis* codant des protéines possédant un ou deux domaines WRKY conservés de 60 acides aminés (Eulgem *et al.*, 2000) et leur grand nombre suggère une certaine redondance fonctionnelle (Zhang et Wang, 2005; Eulgem et Somssich, 2007). Plusieurs types de facteurs de transcription sont exprimés tels que les facteurs WRKY lorsque les plantes sont exposées à des stress biotiques ou abiotiques ou au cours des différentes étapes de leur développement (Maleck *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002). Les protéines WRKY peuvent se fixer sur des éléments *cis*, appelés W-box contenant le motif central (T)(T)TGAC(C)/T et présents notamment dans un très grand nombre de promoteurs de gènes impliqués dans les réponses de défense (Eulgem *et al.*, 2000). Cette famille de régulateurs de transcription régule aussi bien en amont qu'en aval les activités de NPR1 (Yu *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006). AtNPR1 contrôle directement l'expression de certains facteurs WRKY. WRKY70 serait impliqué dans les interactions entre les voies de signalisation (Wang *et al.*, 2006). WRKY 70 et WRKY 58 sont connus pour agir comme des régulateurs pour prévenir l'accumulation excessive de SA (Wang *et al.*, 2006).

D'autres facteurs WRKY sont indépendants d'AtNPR1 et agissent dans d'autres voies de signalisation. On peut citer les facteurs WRKY22 et WRKY29 qui sont activés en réponse à la détection de la flagelline (Asai *et al.*, 2002) ou bien WRKY33 qui contrôle la résistance aux agents pathogènes nécrotrophes en activant les gènes de la voie JA et en réprimant les gènes de la voie SA (Zheng *et al.*, 2006).

L'analyse informatique du promoteur du gène *NPR1* d'*Arabidopsis* a révélé l'existence de trois W-box, ce qui suggère que l'expression de NPR1 est elle-même sous la dépendance de certains facteurs WRKY (Yu *et al.*, 2001). Ces trois boîtes sont essentielles pour l'expression basale des gènes *NPR1* et *PR-1* (Yu *et al.*, 2001).

Diverses molécules signal comme SA, JA et ET peuvent induire l'expression d'une large variété de protéines PR. L'expression de quelques protéines PR est régulée par le gène *NPR1* à travers son interaction avec les facteurs de transcription TGA ou WRKY (Zhou *et al.*, 2000) (Grant et Loake, 2000; Kesarwani *et al.*, 2007).

Chez *Arabidopsis*, la résistance à *F. oxysporum* (Berrocal-Lobo et Molina, 2004) et à *V. longisporum* est dépendante de JA, ET, SA et d'une protéine NPR1 cytosolique (Berrocal-Lobo et Molina, 2004; Johansson *et al.*, 2006). Les molécules pathogènes induisent l'expression de *PR-1*, *PR-2* et *PR-4*. Chez le pommier, la surexpression de *MpNPR1* induit l'expression de *PR-2*, *PR-5* et *PR-8* (Malnoy *et al.*, 2007). Chez *O. sativa*, l'homologue de *NPR1*, *NH1*, régule fortement le gène *PR-1* après traitement avec du BTH ou MeJA (Yuan *et al.*, 2007).

4. Objectifs et présentation du travail de thèse

Il a été clairement démontré que les plantes sont capables de développer une résistance locale ou systémique après une première infection par un agent pathogène ou bien après traitement avec des activateurs chimiques. Ainsi, des pressions de sélection fortes sur des gènes impliqués dans les mécanismes de résistance aux agents pathogènes sont à l'origine de la co-évolution entre les plantes et leurs bioagresseurs. Des avancées significatives ont été réalisées sur les connaissances des gènes et sur les voies de signalisation impliquées dans la régulation des réponses de défenses.

Beaucoup de travaux sur la résistance se sont concentrés sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et quelques membres de la famille des *Cucurbitaceae* et des *Solanaceae* (Sticher *et al.*, 1997). Des gènes tels que *NPR1* ont été mis en valeur dans l'amélioration de la résistance par l'intermédiaire d'approches de génie génétique et de nombreux facteurs de transcriptions tels que les TGA ont été trouvés pour interagir avec *NPR1* (Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000).

La vigne est sensible à de nombreuses maladies qui font peser une menace constante sur les vignobles et qui font l'objet de très nombreux traitements phytosanitaires (Dubos, 1999). Au cours des dernières décennies, des stratégies de lutte alternative apparaissent, visant non pas à s'attaquer à l'agent pathogène lui-même mais à aider la plante à se défendre contre l'agresseur (Benhamou et Nicole, 1999). Peu de travaux ont été réalisés sur les gènes de défense chez la vigne mais une connaissance détaillée des mécanismes de résistances et de la fonction des gènes impliqués dans ces mécanismes permettra une amélioration de la résistance de la vigne face aux maladies. Au début de mes travaux de thèse, seul un gène *VvNPR1* avait été identifié et nous avons émis l'hypothèse que d'autres gènes homologues existaient dans la vigne. Les objectifs de ce travail de thèse ont donc été d'identifier et de caractériser le gène *NPR1* chez la vigne puis de tester son interaction avec les facteurs de transcription TGA identifiés. Quatre étapes ont été posées pour réaliser ce projet :

- 1- Choisir différentes accessions dans la famille des *Vitaceae* montrant une résistance différente à un stress biotique.

Les vignes sont soumises à des stress biotiques auxquels répond une grande variété de comportement caractérisée par les mécanismes de résistance. Afin de savoir si ces derniers sont générés par *NPR1* (dans la famille des *Vitaceae*) les accessions choisies doivent présenter différents profils de résistance au cours d'interactions avec un agent pathogène virulent.

Or, nous savons que la vigne connaît des degrés divers de sensibilité au mildiou en fonction des variétés (Galet, 1977). Ainsi, cet agent pathogène a été privilégié dans le cadre de cette étude préliminaire puisque l'équipe Génétique et Amélioration de la Vigne de l'INRA de Colmar bénéficie d'un système performant de notation semi-quantitative OIV 452 pour les tests biologiques au mildiou.

2- Identifier grâce au séquençage complet du génome de la vigne les potentiels orthologues du gène *NPR1* d'*Arabidopsis* puis étudier leur diversité génétique dans les accessions précédemment sélectionnées.

3- Etudier les séquences promotrices des gènes *NPR1* identifiés ainsi que la diversité génétique des introns dans cinq accessions de *Vitis vinifera*.

4- Etudier l'interaction des protéines VvNPR identifiées avec les facteurs de transcription VvTGA identifiés chez la vigne par la technique du double hybride dans la levure.

A plus long terme, les objectifs de cette thèse sont, d'une part, de mieux connaître les voies de signalisation aboutissant aux mécanismes de défense chez la vigne et d'autre part, d'envisager la surexpression de ces éléments de signalisation et en particulier le gène *NPR1* afin de stimuler les réponses de défense chez la vigne. En effet, les plantes surexprimant le gène *NPR1* chez *Arabidopsis thaliana* sont plus résistantes à certains agents pathogènes et ne montrent pas de défaut de croissance (Cao *et al.*, 1998).

CHAPITRE I :
Choix des accessions dans la famille des
Vitaceae et tests de résistance au mildiou

1. Introduction

Les vignes sont attaquées par un grand nombre d'insectes et de maladies dont les plus communes sont la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), l'oïdium (*Erysiphe necator*) et le mildiou (*Plasmopara viticola*). Toutes ces maladies font peser une menace constante sur les vignobles et font l'objet de très nombreux traitements phytosanitaires (Dubos, 1999). Plus particulièrement, l'agent pathogène responsable de la maladie du mildiou est un oomycète de la famille des *Peronosporaceae*, *Plasmopara viticola* (Berk. Et Curt.) Berl. et de Toni. Il s'agit d'un parasite biotrophe obligatoire qui attaque tous les organes herbacés (rameaux, feuilles) ainsi que les organes de l'inflorescence ou de la jeune grappe, qui se dessèchent. *P. viticola* persiste pendant la saison hivernale sous forme d'oospores généralement conservées dans les feuilles mortes présentes sur le sol. Lorsque les conditions d'humidité et de température leur sont favorables, les oospores germent pour donner naissance à des sporanges qui contiennent les zoospores (forme asexuée). Les précipitations printanières vont permettre aux zoospores de se disséminer. Les zoospores sont enkystées puis germent sur l'épiderme des feuilles de vigne et forment un tube germinatif qui pénètre dans les tissus végétaux par les stomates. Des structures spécialisées, des haustoria, se développent à partir du mycélium. Les haustoria se développent au sein des parenchymes et créent une interface d'échange par laquelle *P. viticola* prélève les nutriments nécessaires à son développement. Après cette phase de développement, il y a reproduction asexuée avec formation de sporangiophores (structures portant les sporanges) qui sortent de la plante principalement au niveau des stomates de la face inférieure des feuilles. Ces organes fructifères vont se différencier en nouvelles zoospores capables de réaliser des contaminations secondaires (Dubos, 1999). A l'automne, la phase de reproduction sexuée conduit à la formation des oospores pour la conservation hivernale. *Plasmopara viticola* engendrant un affaiblissement de la plante, une perte de rendement et de qualité des récoltes.

Chez la vigne, il existe des différences entre les variétés en terme de sensibilité au mildiou (Galet, 1977). Le but de ce travail était dans un premier temps d'évaluer des différences de résistance à *Plasmopara viticola* et de mettre ces résultats en relation avec la diversité du gène *NPR1* dans la famille des *Vitaceae*. Il est alors nécessaire de disposer de tests fiables de dépistage de la maladie pour évaluer les niveaux de résistance des géotypes préalablement choisis.

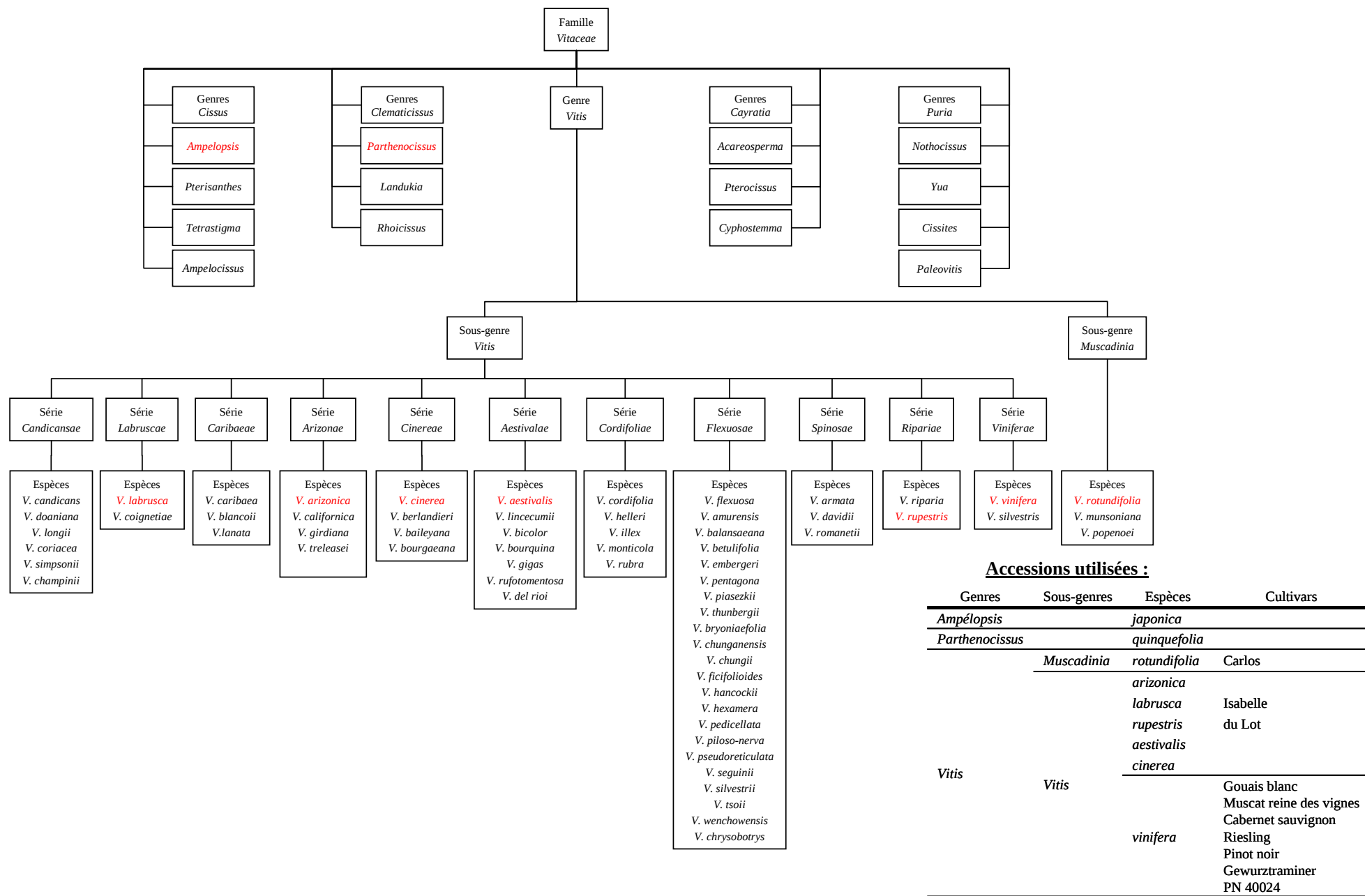


Figure I.1 : Diagramme représentant les différentes accessions utilisées dans la classification systématique des *Vitaceae* (d'après Galet, 1993)

2. Résultats

2.1. Choix des accessions

Pour nos travaux, les accessions utilisées doivent répondre à plusieurs critères : être représentatives de l'ensemble de la famille des *Vitaceae* et présenter des sensibilités différentes au mildiou. Il est donc nécessaire de comparer des variétés sensibles au mildiou avec des variétés peu sensibles, voir résistantes. Quinze accessions ont été choisies selon leur disponibilité dans la collection ampélographique de l'INRA de Colmar ainsi qu'avec l'aide de la classification des *Vitaceae* (Galet, 1993) (Figure I.1).

2.2. Tests d'inoculation mildiou

Afin d'aborder la caractérisation génétique de ces accessions, une différence de sensibilité au mildiou doit être validée. Pour cela, nous avons utilisé un test biologique en conditions contrôlées qui permet d'évaluer de façon reproductible et quantitative la résistance à *Plasmopara viticola*. Les variétés de *V. vinifera* sont toutes plus ou moins sensibles au mildiou (Galet, 1977). Le Muscat, le Pinot noir et le Cabernet sauvignon sont généralement connus pour être sensibles au mildiou. Plusieurs sources de résistance au mildiou ont été décrites dans les espèces de *Vitis* d'origines américaine et asiatique (Staudt et Kassemeyer, 1995), probablement due à une co-évolution entre les *Vitis* et *P. viticola*. *V. cinerea*, *V. riparia* et *V. rotundifolia* sont connus pour être hautement résistants, *V. aestivalis*, *V. arizonica* et *V. rupestris* du Lot présentent un degré de résistance élevé au mildiou, de même que *V. riparia* gloire de Montpellier et les muscadines qui résistent bien.

A l'aide de ce test, les accessions choisies, représentatives de la famille des *Vitaceae*, ont été évaluées pour la résistance au mildiou. Une grande diversité de comportement a été observée montrant que les différentes accessions possèdent des mécanismes de résistance au mildiou allant jusqu'à la résistance totale (Figure I.2).

Dans notre étude, deux groupes se distinguent, le premier est composé de *Parthenocissus quinquefolia*, *Muscadinia rotundifolia*, *Vitis cinerea*, *Ampelopsis japonica*, *Vitis riparia* gloire de Montpellier et *Vitis rupestris* du Lot (bien que ce dernier semble plus sensible qu'habituellement) et le second regroupe toutes les autres accessions. Le premier présente un haut niveau de résistance tandis que les accessions du second sont beaucoup moins résistantes. Nous retrouvons des niveaux de résistance équivalents pour les accessions déjà étudiées.

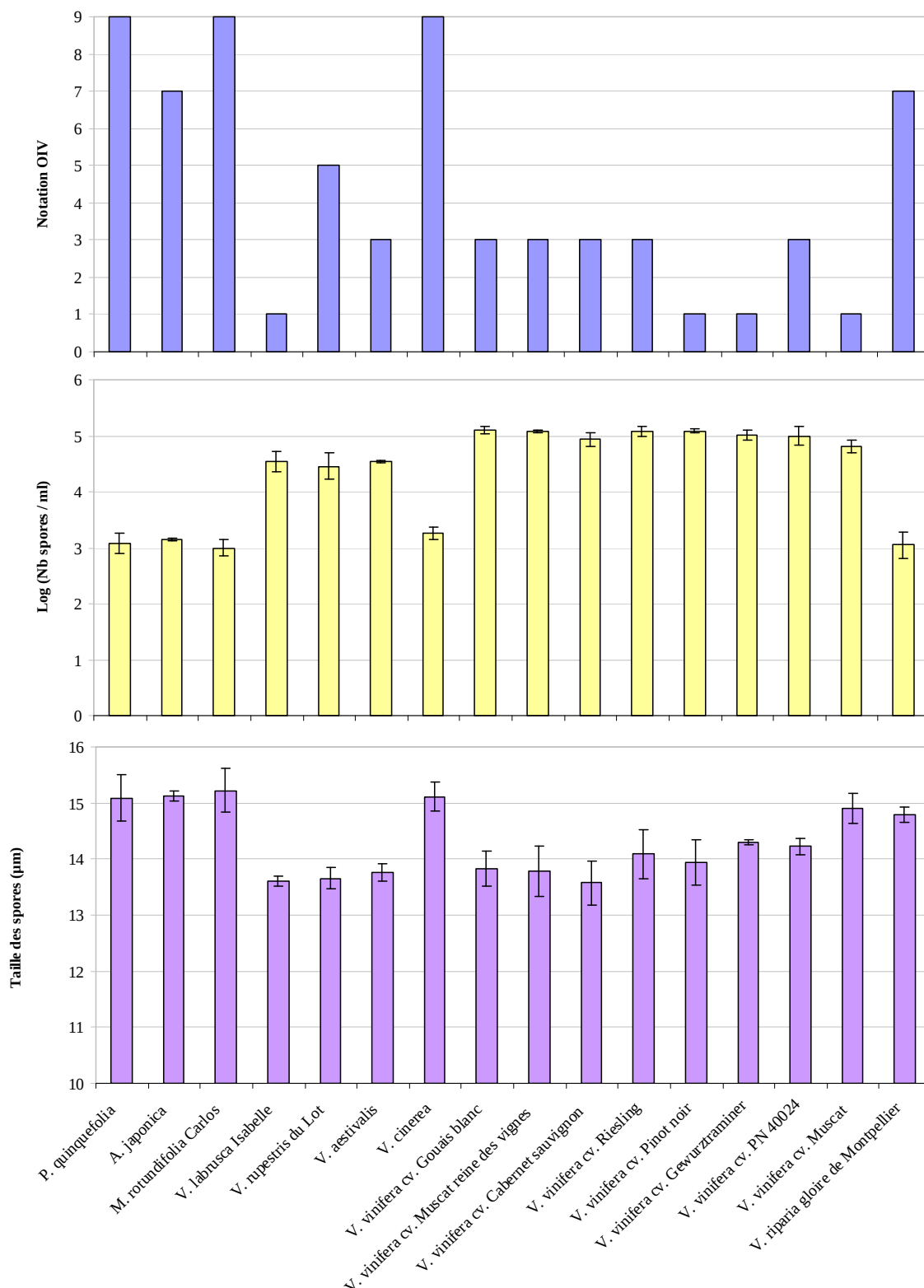


Figure I.2 : Analyse de la résistance au mildiou des quinze accessions dans la famille des Vitaceae

Les disques foliaires des quinze accessions sont infectés par une suspension de sporanges ($3.10^4/\text{ml}$) de *Plasmopara viticola*. L'évaluation quantitative de la résistance au mildiou est réalisée 7 jours après inoculation. L'échelle de notation semi quantitative OIV 452 a été utilisée. *Vitis vinifera* cv. Muscat et *V. riparia* Gloire de Montpellier constituent les témoins internes de l'expérience.

Il existe une corrélation entre la note OIV 452 et le nombre de spores / ml. En effet, pour le groupe des accessions les plus résistantes, le nombre de spores est significativement plus faible, alors que les spores sont plus nombreuses pour les accessions les moins résistantes. De plus, il semble que globalement les spores sont de taille plus importante dans les accessions résistantes que dans les accessions les plus sensibles. Cette observation n'est cependant pas vérifiée pour les contrôles internes de l'expérience, à savoir, *V. vinifera* cv. Muscat et *V. riparia* gloire de Montpellier.

3. Conclusions

Des accessions de différentes sensibilités au mildiou ont donc été identifiées, nous avons alors entrepris l'étude du déterminisme génétique des vignes à travers celle du gène *NPR1*.

CHAPITRE II :
Identification et faible niveau de
polymorphisme des gènes NPR1.1 et
NPR1.2 dans la famille des Vitaceae

1. Introduction

La résistance systémique acquise (SAR) est une réponse de résistance induite qui est établie après l'exposition de la plante à un agent pathogène nécrotrophe et qui conduit à l'accumulation de l'acide salicylique (SA) et à l'induction d'un sous-groupe de gènes *PR* (pathogenesis-related) (Ryals *et al.*, 1996; Durrant et Dong, 2004). La SAR confère une résistance à large spectre et une résistance durable contre différents agents pathogènes de plante (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Durrant et Dong, 2004). Elle peut être induite en pulvérisant l'acide salicylique ou ses analogues fonctionnels l'INA ou le BTH (Ryals *et al.*, 1996).

Des analyses génétiques ont identifié plusieurs régulateurs impliqués dans la voie de transduction de la SAR (Durrant et Dong, 2004). Un de ces régulateurs, le gène *NPR1* (Non expressor of Pathogenesis-Related 1) a été bien étudié chez *Arabidopsis thaliana*. Il est connu pour être un régulateur positif de la SAR (Cao *et al.*, 1994; Dong, 2004). Des plantes mutantes *npr1* sont incapables de mettre en place la SAR contre des souches virulentes des agents pathogènes *P. syringae* ou *P. parasitica* (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995). Ces plantes sont également incapables de mettre en place la résistance systémique induite (ISR) contre *P. syringae* (Pieterse *et al.*, 1998). Ces mutants sont également affectés dans la résistance basale contre des pathogènes biotrophes tels que *P. syringae*, *P. parasitica* et *E. cichoracearum*. Ainsi, en plus de la SAR, *NPR1* est également requis pour l'ISR, la résistance basale et pour la signalisation de gènes *R*.

Les plantes mutantes *npr1* n'expriment pas les gènes *PR* induits par l'acide salicylique, en particulier les marqueurs de la SAR, *PR-1*, *PR-2* et *PR-5*, après traitement avec le SA ou ses analogues (Cao *et al.*, 1994; Glazebrook *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2005). Les plantes accumulent d'importantes quantités de SA après l'attaque d'un agent pathogène (Delaney *et al.*, 1995) et sont sensibles au SA exogène (Cao *et al.*, 1997).

Le gène *NPR1* est exprimé de manière constitutive et ses niveaux d'expression sont encore plus élevés après traitement avec du SA ou l'infection d'un agent pathogène (Cao *et al.*, 1997; Ryals *et al.*, 1997). Il code une protéine contenant un site de localisation nucléaire (NLS) et deux domaines d'interaction protéine-protéine, le domaine ARD (ankyrin repeat domain) et le domaine BTB/POZ (Broad Complex, Tramtrack and Bric-a-brac/Pox virus and Zinc finger) (Cao *et al.*, 1997; Sedgwick et Smerdon, 1999). La plupart des mutations dans le domaine ARD suggèrent une fonction importante de ce motif.

NPR1 est présent à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Despres *et al.*, 2000). En conditions non induites, la protéine NPR1 cytoplasmique est sous la forme d'oligomère liée par des ponts disulfure entre les résidus cystéines conservés (Mou *et al.*, 2003). Après induction de la SAR, des changements redox dans la cellule conduisent à la réduction des cystéines principales entraînant la monomérisation de NPR1 et sa translocation dans le noyau (Mou *et al.*, 2003). La localisation nucléaire de NPR1, arbitrée par le site NLS en C-terminal, est nécessaire pour l'activation des gènes *PR* (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003).

L'analyse de banques d'EST puis des données issues du séquençage du génome de la vigne nous a permis d'identifier deux gènes, *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* chez la vigne, montrant de fortes similarités de séquence avec le gène *AtNPR1*. L'étude bioinformatique montre une conservation de la structure intron / exon : 4 exons et 3 introns. *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* codent des protéines de 584 et 587 acides aminés, respectivement, et présentent une grande conservation des motifs structuraux des protéines NPR1 connues : BTB/POZ et ARD, motifs connus pour être impliqués dans les interactions protéine-protéine, plusieurs signaux de localisation nucléaire (NLS) ainsi que neuf des dix cystéines conservées décrites par Mou *et al.* (2003). La construction d'un arbre phylogénétique regroupant les protéines NPR1 de différentes espèces montre une première différence entre les deux protéines de vigne. En effet, alors que *VvNPR1.1* est regroupé avec les protéines NPR1 d'*Arabidopsis*, du riz, du tabac et de la tomate, *VvNPR1.2* forme un groupe distinct avec *AtNPR3* et *AtNPR4*, décrits comme étant des régulateurs négatifs des réponses de défense (Zhang *et al.*, 2006). Afin de déterminer la fonction de *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2*, plusieurs approches ont été mises en œuvre. Tout d'abord, parallèlement à mon travail de thèse, le profil d'expression de *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* a été évalué après traitement par du BTH au cours d'interactions compatibles et incompatibles et des expériences de surexpression transitoire de ces gènes ont également été menées par Gaëlle Le Henanff (Le Hénanff, 2009). D'autre part, une étude de la diversité génétique dans les accessions de vigne précédemment sélectionnées (cf chapitre I) a été entreprise afin d'examiner les pressions de sélection qui agissent sur les gènes *NPR1.1* et *NPR1.2* dans la famille des *Vitaceae*. Ces derniers travaux ont fait l'objet d'une publication parue dans la revue *Biology Direct* et présentée ci-après.

2. PUBLICATION : Low level of polymorphism in two putative *NPR1* homologs in the *Vitaceae* family

Karine Bergeault, Christophe Bertsch, Didier Merdinoglu, Bernard Walter
Biology Direct, 2010, 5 : 9



RESEARCH

Open Access

Low level of polymorphism in two putative *NPR1* homologs in the *Vitaceae* family

Karine Bergeault^{1*}, Christophe Bertsch¹, Didier Merdinoglu², Bernard Walter¹

Abstract

Background: Grapevine is subjected to numerous pests and diseases resulting in the use of phytochemicals in large quantities. The will to decrease the use of phytochemicals leads to attempts to find alternative strategies, implying knowledge of defence mechanisms. Numerous studies have led to the identification of signalling pathways and regulatory elements involved in defence in various plant species. Nonexpressor of Pathogenesis Related 1 (NPR1) is an important regulatory component of systemic acquired resistance (SAR) in *Arabidopsis thaliana*.

Results: Two putative homologs of *NPR1* gene were found in the two sequenced grapevine genomes available in the Genoscope database for line 40024 and in the IASMA database for Pinot noir ENTAV 115. We named these two *NPR1* genes of *Vitis vinifera*: VvNPR1.1 and VvNPR1.2. A PCR-based strategy with primers designed on exons was used to successfully amplify *NPR1* gene fragments from different *Vitaceae* accessions. Sequence analyses show that *NPR1.1* and *NPR1.2* are highly conserved among the different accessions not only *V. vinifera* cultivars but also other species. We report nucleotide polymorphisms in *NPR1.1* and *NPR1.2* from fifteen accessions belonging to the *Vitaceae* family. The ratio of nonsynonymous to synonymous nucleotide substitutions determines the evolutionary pressures acting on the *Vitaceae NPR1* genes. These genes appear to be experiencing purifying selection. In some of the species we have analysed one of the two alleles of *NPR1.1* contains a premature stop codon. The deduced amino acid sequences share structural features with known NPR1-like proteins: ankyrin repeats, BTB/POZ domains, nuclear localization signature and cysteines. Phylogenetic analyses of deduced amino acid sequences show that VvNPR1.1 belongs to a first group of NPR1 proteins known as positive regulators of SAR and VvNPR1.2 belongs to a second group of NPR1 proteins whose principal members are AtNPR3 and AtNPR4 defined as negative regulators of SAR.

Conclusion: Our study shows that *NPR1.1* and *NPR1.2* are highly conserved among different accessions in the *Vitaceae* family. VvNPR1.1 and VvNPR1.2 are phylogenetically closer to the group of positive or negative SAR regulators respectively.

Reviewers: This article was reviewed by Fyodor Kondrashov, Purificación López-García and George V. Shpakovski.

Background

The *Vitaceae* family consists of approximately 700 species classified in 14 genera. *Ampelopsis* and *Parthenocissus* are two genera related to each other. The genus *Vitis* has been divided into two distinct sections called *Euvitis* and *Muscadinia* [1]. These two sections can be differentiated not only on morphological and anatomical appearance but also on chromosome number. *Muscadinia* have $2n = 40$ chromosomes while *Euvitis* have only

$2n = 38$ [2]. *Vitis vinifera*, as well as several other species and hybrids of *Vitis*, are well known economically for grapes, wine and raisins productions. Grape and their derivatives have an increasing worldwide market [3]. Vineyard is constantly subjected to numerous stresses due to climatic conditions, farming techniques, mineral deficiency or pathogens. Vineyards are threatened by numerous viruses, bacteria and fungi. This situation leads wine growers to use chemicals in large quantities.

The stimulation of grapevine's own defences could be an alternative strategy to phytochemicals. Numerous

* Correspondence: karine.bergeault@uha.fr

¹Laboratoire Vigne, Biotechnologies & Environnement, Université de Haute Alsace, 33 rue de Herrlisheim, 68000 Colmar, France



studies have led to the identification of several plant genes involved in defence mechanisms and especially in signal transduction pathways [4]. *Nonexpressor of PR 1* (*NPR1*) gene of *Arabidopsis thaliana* is an important regulatory component of systemic acquired resistance (SAR) [5-7]. SAR is a plant immune response that is triggered after local infection with pathogens [8-10]. The onset of SAR requires the accumulation of salicylic acid (SA) and the coordinated expression of pathogenesis-related (PR) genes [7]. Besides SA-mediated SAR, other pathways are involved in plant defence systems, namely ISR (induced systemic resistance) and jasmonic acid (JA)-mediated pathways. The SAR and ISR pathways are independent but have an overlapping requirement for *NPR1* [11]. When SA and JA are applied together to leaves, the presence of SA inhibits JA synthesis and signalling. This inhibition is alleviated in the *npr1* mutant, indicating that *NPR1* is part of the cross-talk control between signalling pathways [12]. *NPR1* is a positive regulator of the plant defence response and its mechanism of action is well characterized.

The *NPR1* protein localizes both to the cytoplasm and the nucleus [13]. Upon pathogen attack, accumulation of SA causes a decrease in cellular reduction potential, leading to the conversion of *NPR1* from inactive oligomers into active monomers that enter the nucleus and interact differentially with TGA proteins which are basic-region leucine zipper (bZIP) transcription factors. This interaction stimulates the DNA binding activity of TGA factors to SA-responsive elements in the promoter of pathogenesis-related genes [8,14,15]. The *Arabidopsis thaliana* genome contains six *NPR1*-related genes [16] (called *AtNPR1* to *AtNPR6*), whose deduced proteins all share the Broad Complex, Tramtrack and Bric a brac/Pox virus and Zinc finger (BTB/POZ) domain and the Ankyrin Repeat Domain (ARD). According to Mou et al. (2003) [15], *AtNPR1* and *NPR1*-like proteins from four plant species contain ten conserved cysteines. Cys 82 and Cys 216 are essential for keeping *NPR1* in the cytoplasm [15]. *NPR1* genes have been found in genomes of various species such as rice [17,18], Indian mustard [19], apple [20] and cotton [21]. Overexpression of *AtNPR1* in *Arabidopsis thaliana*, rice, tomato and wheat enhances fungal and bacterial resistance [17,20,22-27] through elevated expression of *PR* genes [22,25].

In plants, molecular diversity was first studied based on the existence of mutational events. Detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) allows the analysis of sequence differences between alleles. Nucleotide diversity reflects the combined history of selection, migration, recombination and mating systems experienced by species. Nucleotide diversity is one source of phenotypic variation [28]. SNPs have been characterized

in crop plant genomes such as maize, sugarbeet, barley, soybean, wheat, rice and grapevine [29]. As the grapevine is propagated vegetatively, its genome has a higher probability to accumulate large deletions, insertions, inversions or other events which may differentiate the two pairs of chromosomes.

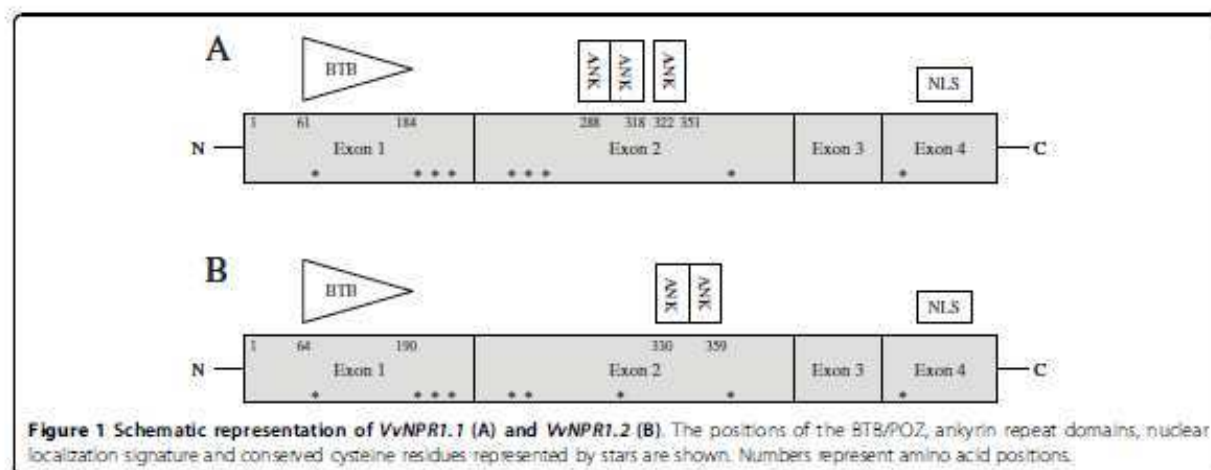
In the present study, a PCR-based strategy with primers designed on exons was used to successfully amplify *NPR1* exons. A phylogenetic tree was used to analyse the relationship of *NPR1* proteins from *Arabidopsis thaliana* and homologs from various plant species. Analysis of sequence mutations was done to study the polymorphism of *NPR1* in fifteen accessions of the *Vitaceae* family. To examine the evolutionary pressures acting on the *NPR1.1* and *NPR1.2*, the ratio of nonsynonymous (replacement) to synonymous (silent substitution) nucleotides was determined.

Results and discussion

Putative homologs of *AtNPR1* in grapevine: *VvNPR1.1* and *VvNPR1.2*

We named *VvNPR1.1* and *VvNPR1.2* two putative homologs of the *AtNPR1* gene from the grapevine genome sequences published by the French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome (line 40024) and by the Istituto Agrario Di San Michele All'Adige (*Vitis vinifera* Pinot noir ENTAV 115). Line 40024 [30] is highly homozygous and Pinot noir ENTAV 115 [31] is heterozygous. No additional member of the *NPR1* gene family was found in NCBI and ESTAP databases after blast and key words research. The intron-exon structure in *NPR1.1* and *NPR1.2* from the *Vitaceae* accessions was the same as in *AtNPR1*: four exons and three introns, except for *Ampelopsis japonica* where intron 3 is missing. The complete cDNA is 1,755 bp for *VvNPR1.1* and 1,764 bp for *VvNPR1.2*. The deduced proteins have 584 and 587 amino acids, respectively and they share structural features with known *NPR1* proteins which are highly conserved across many species: ankyrin repeats in the middle of the protein (ARD), the N-terminal BTB/POZ domains, the C-terminal nuclear localization signature (NLS) [32] and nine among ten conserved cysteines described by Mou et al. (2003) [15] (Figure 1). This suggests that *VvNPR1* may interact with other proteins, as previously described in *Arabidopsis thaliana* [13,33-36].

The amino acids 61-184 of *VvNPR1.1* and 64-190 of *VvNPR1.2* show similarity to the BTB/POZ motif. The amino acids 259-318 and 322-351 of *VvNPR1.1* and amino acids 296-326 and 330-359 of *VvNPR1.2* reveal respectively three and two highly conserved ankyrin repeats (Figure 1). The deduced amino acid sequences of *VvNPR1.1* and *VvNPR1.2* show 43% identity. *VvNPR1.1* and *VvNPR1.2*, respectively, show 52% and 37% identity with *AtNPR1*. Three phylogenetic groups



have been described in the AtNPR1 protein family by Hepworth *et al.* (2005) [37] (Figure 2). These authors stated that branching pattern suggests that members in each group may have similar functions. VvNPR1.1 is close to AtNPR1 and AtNPR2 in the first group. VvNPR1.2 is with AtNPR3 and AtNPR4 in the second group. AtNPR5 and AtNPR6 present high homology with Blade-on-petiole 1 and 2 of *A. thaliana* (BOP1 and BOP2) which involved in some aspects of morphogenesis and leaf/flower development [37]. A putative *Blade-on-petiole* gene which we named *Vitis vinifera* BOP (VvBOP) was identified in the Genoscope database. VvBOP is closely related to AtNPR5 and AtNPR6 and can be involved in morphogenesis and leaf/flower development, like AtNPR5 and AtNPR6 (Figure 2) [6,16,19,20,23,30,38-40].

Purifying selection for Vitaceae NPR1.1 and Vitaceae NPR1.2

Sequence data for fifteen accessions belonging to the Vitaceae family (Figure 3) were obtained from NPR1 fragments amplified using PCR primers. Identification of polymorphic sites was based on two alleles sequenced. Figures 4 and 5 show the distribution of SNPs along the four exons of NPR1.1 and NPR1.2 respectively, in *Ampelopsis japonica*, *Muscadinia rotundifolia*, *Parthenocissus quinquefolia* and five American *Vitis* species and in six *V. vinifera* cultivars (Gouais blanc, Muscat reine des vignes, Cabernet Sauvignon, Riesling, Pinot noir, Gewürztraminer). The SNPs are not evenly distributed. NPR1.1 exon 3 and the four NPR1.2 exons have a low SNP rate (4% to 5.4% SNPs per exon), in comparison with NPR1.1 exons 1, 2 and 4 (7.2% to 8.4% SNPs per exon). Globally, NPR1.1 is more polymorphic than NPR1.2. In the six *V. vinifera* cultivars, SNP rate is lower than 2.5% (0.1% in VvNPR1.1 exon 2 to 2.5% in VvNPR1.2 exon 3) and 4.2% in VvNPR1.2 exon 4. In the six *V. vinifera*

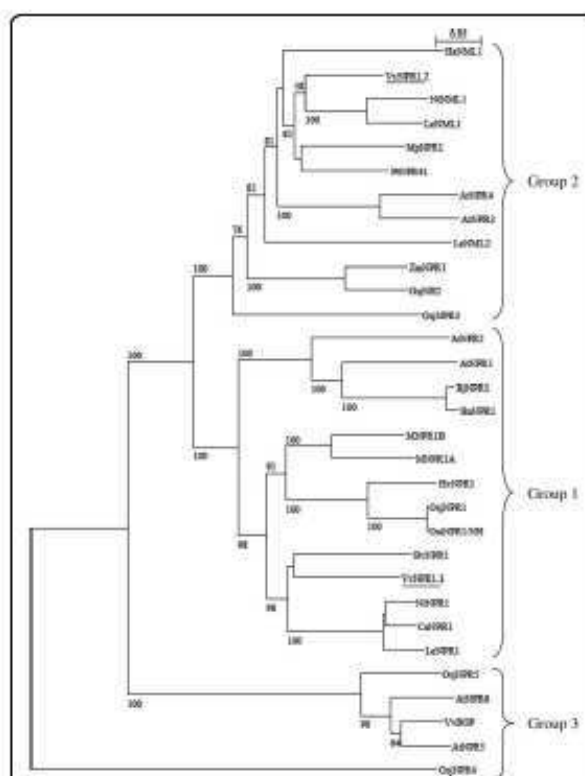


Figure 2 Comparison of VvNPR1.1, VvNPR1.2 and putative Blade-on-petiole (VvBOP) with NPR proteins from *Arabidopsis thaliana* and other plant species. Deduced sequences of VvNPR1.1 and VvNPR1.2 were compared to sequences of proteins annotated as being homologs of AtNPR1 from different plant species. Accession numbers used in the alignments are listed in table 1. All sequences annotated as NPR1 or closely related to VvNPR1 genes after blast were recovered in the NCBI database. The numbers beside the branches represent bootstrap values based on 5,000 replicates. The scale at the top indicates genetic distance proportional to the number of substitutions per site.

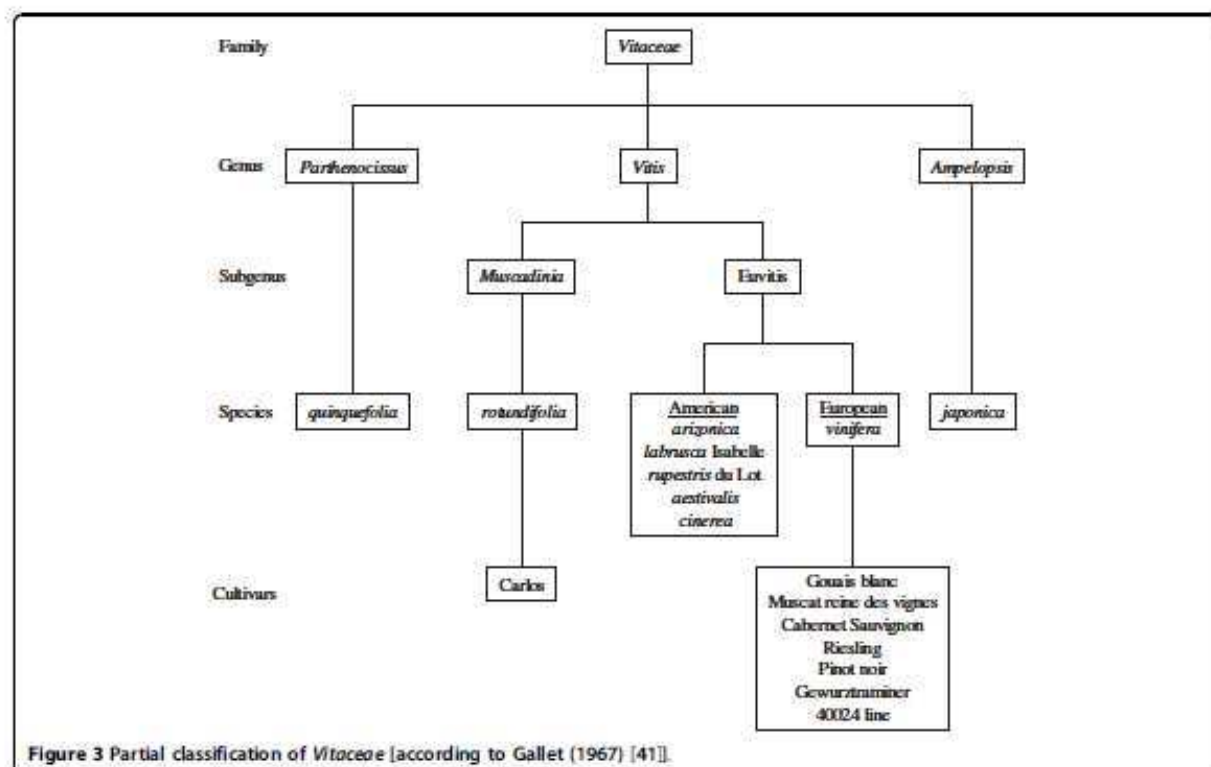


Figure 3 Partial classification of Vitaceae [according to Gallet (1967) [41]].

cultivars, SNP rate in introns (about 2%, data not shown) was not significantly different from SNP rate in exons [41].

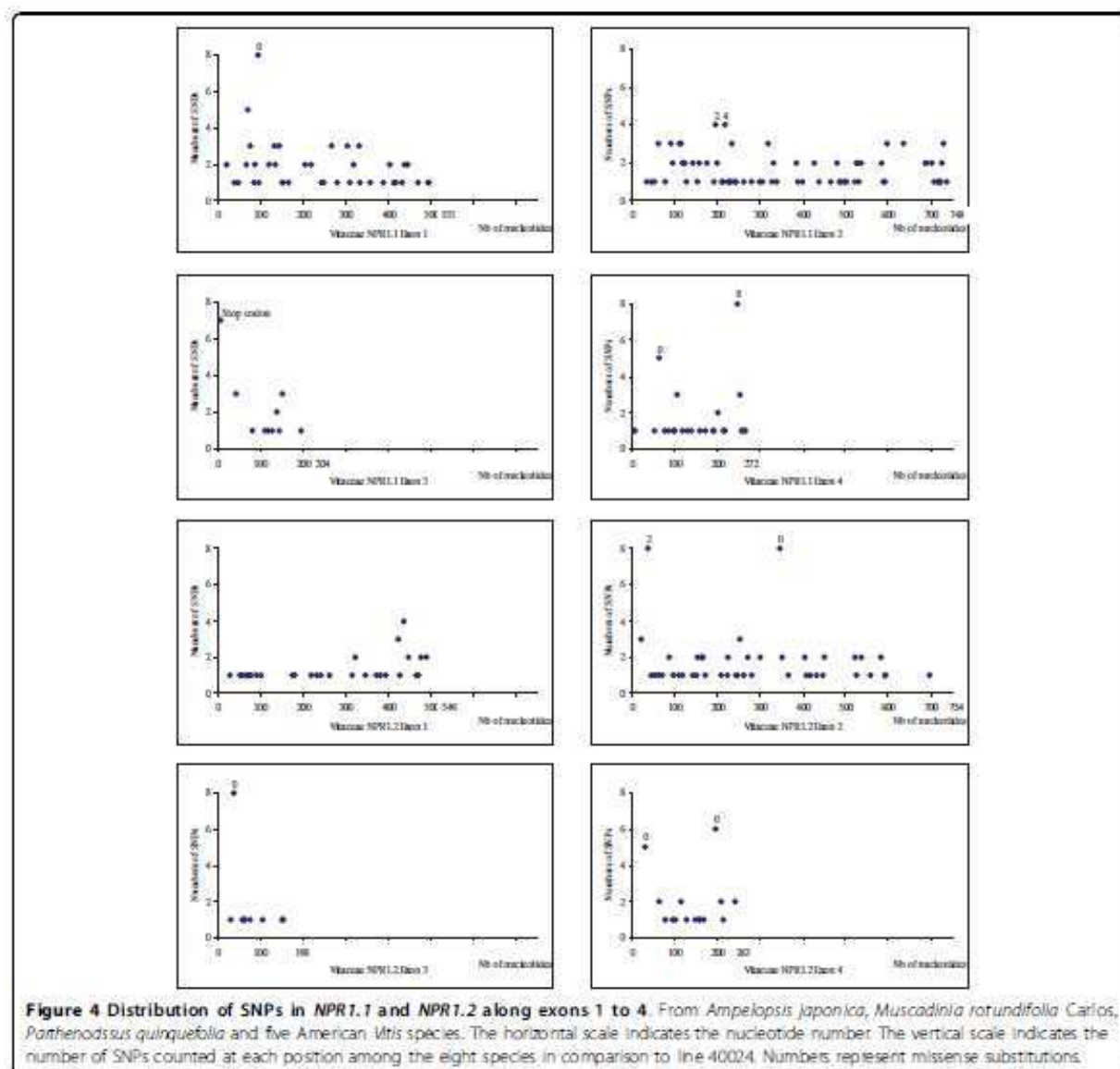
NPR1.1

Polymorphisms in exon 1 and exon 4 of *NPR1.1* were identified by silent substitutions at positions 23, 31, 515 and a missense substitution at position 576. A threonine codon present in all the other accessions changed in an asparagine codon in line 40024. Missense substitutions in the BTB/POZ domain cause protein modifications (Figure 1). It is likely that substitutions have important consequences for the function of the BTB/POZ domain and perhaps its regulation. In fact, the BTB/POZ domain is an evolutionarily conserved protein-protein interaction motif [42]. A mutation in this region results in the loss of NPR1 function and affects protein-protein interaction [6,7]. A heterozygous zone, observed in *Ampelopsis japonica*, *Muscadinia rotundifolia*, *Parthenocissus quinquefolia*, *V. cinerea*, *V. aestivalis*, *V. rupestris*, *V. arizonica* and *V. vinifera* Cabernet Sauvignon, at the beginning of *NPR1.1* exon 3, shows a nucleotide substitution in a glycine codon (GGA) which introduces a premature stop codon (TGA) in the central part of the protein. These results suggest that one of the two *NPR1.1* alleles generates a truncated protein (427 aa) derived from translation of only exon 1 and 2. As a

result, the truncated protein does not retain one of the conserved cysteines, but contains all of the protein-protein interaction domains. The truncated protein VvNPR1.1 should be functional because it possesses the interaction domain and nine of ten conserved cysteines. The missing cysteine is not essential for the nuclear localization [15]. Nonsense substitutions that generate a premature translational termination signal should reduce the steady-state accumulation of the corresponding mRNA [43]. No readthrough mechanism have been described until now in plants and nonsense substitutions are not enough to stop the translation since the second allele can be entirely expressed. Alleles rendered non-functional due to mutations causing frame shifts and/or premature stop codons were observed for five defence response loci (EDS5, ESP, ETR1, EDS1 and PAD4) in *A. thaliana* [44]. There is no evidence for non-functional *AtNPR1* alleles but it could be different for VvNPR1.1. The ankyrin repeat domain of *AtNPR1* are necessary and sufficient for the interaction with members of the TGA family of transcription factors, although high-affinity interactions also require the N-terminal one third of NPR1 [13,35,36].

NPR1.2

A deletion of 3 amino acids (amino acids 17 to 19) and a supplementary pattern of 6 amino acids were found in



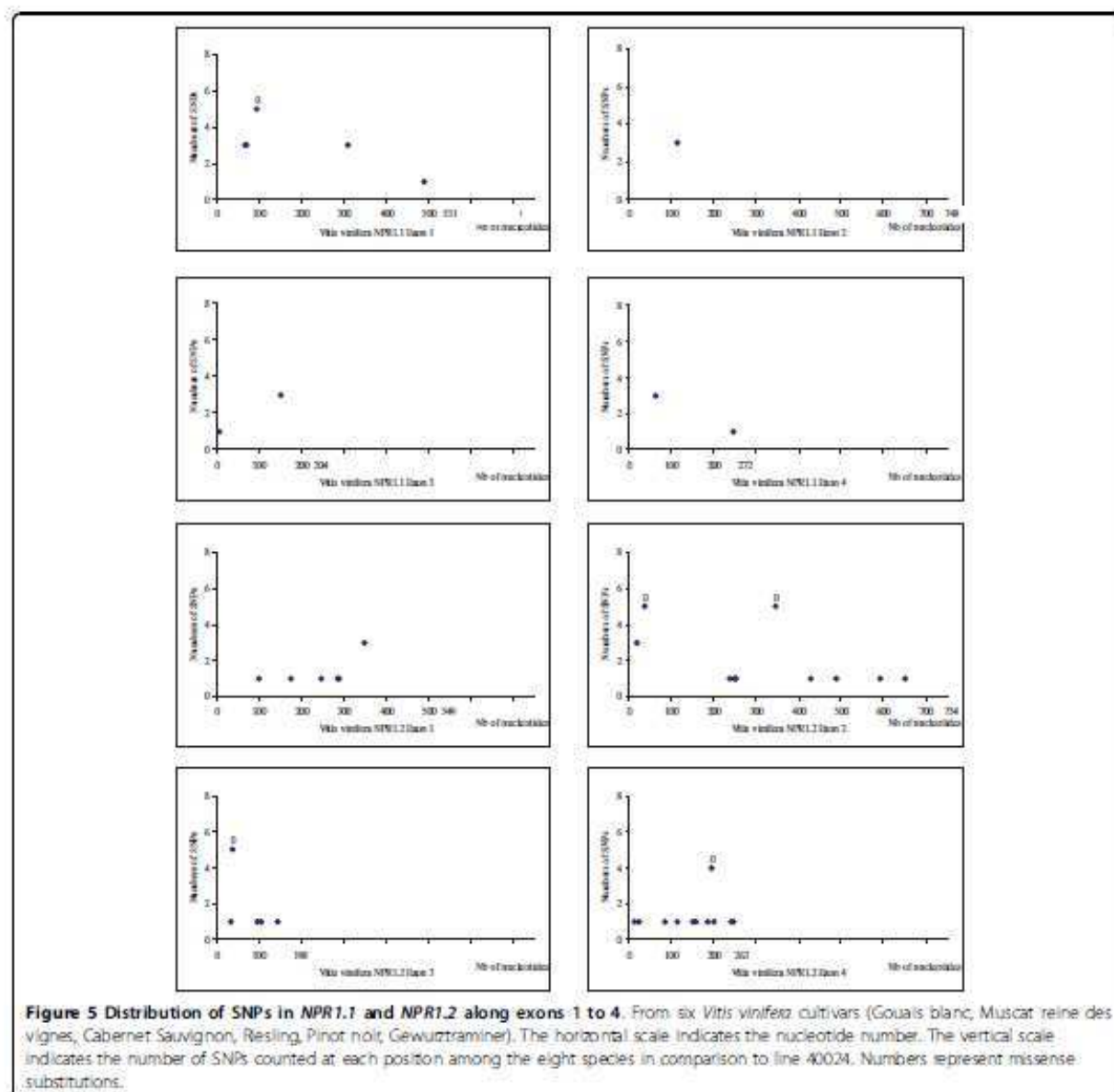
exon 4 of *Ampelopsis japonica* *NPR1.2*. This supplementary pattern is not a preserved protein pattern according to web-based SMART program.

Polymorphisms in exons 2, 3 and 4 of *NPR1.2* were identified by silent substitutions at positions 298, 446 and 565 and a change at position 195 from a leucine codon into a valine in *Ampelopsis japonica* and *Parthenocissus quinquefolia*.

According to Bakker et al. (2008) [44], there are three distinguished evolutionary scenarios for selection: (1) long-term balancing selection, where a gene may have highly diverged alleles at intermediate frequencies and a high level of silent polymorphism, (2) positive selection of a favorable allele, which can generate a locus with

few, relatively young alleles with extended haplotypes and (3) purifying selection or functional constraint, which leads to low levels of nonsynonymous polymorphism and a commensurately low rate of divergence between species.

From our results, the ratio of nonsynonymous to synonymous nucleotide substitutions (K_a/K_s) relating influence of selection is smaller than 1 in both genes (0.84 in *NPR1.1* and 0.44 in *NPR1.2*). These results suggest a purifying selection against substitutions that would result in amino acid replacements. In *NPR1.2*, the ratio is also lower than 1 for the four exons taken independently (0.34 to 0.68). The comparison of selected clones from fifteen accessions belonging to the *Vitaceae*



family revealed a high homology for the two genes. The polymorphism data in *NPR1.1* and *NPR1.2* indicate purifying selection and sequence conservation. Generally, the defence response genes tend to maintain lower levels of diversity. The majority of defence response genes appear to be experiencing purifying selection [44]. In general, defence response genes do not appear to be under balancing selection but strong evidence of balancing selection was detected at *AtNPR1* [44,45]. Our results show that *NPR1.1* and *NPR1.2* are highly conserved under strong purifying selection and do not vary much from accession to accession, indicating that mutations probably have deleterious consequences. Purifying

selection results in the reduction of genetic variation through the elimination of maladjusted alleles and consequently of the mutations that caused the maladjustment. These contradictory results may be related to the fact that *A. thaliana* multiplies by sexual reproduction while grapevine by vegetative propagation.

Functional hypothesis: two types of regulations by *NPR1*-like genes?

The complete sequence of putative homologs of the *AtNPR1* gene family is known in various species (Table 1). According to the phylogenetic tree (Figure 2), three groups of NPR genes can be distinguished. *VvNPR1.1* is

in the same group as NPR1 from sugar beet, tobacco, sweet pepper and tomato as also AtNPR1 and AtNPR2 from *Arabidopsis* and rice OsNPR1/NH1. From the ten cysteines described as conserved in AtNPR1 and NPR1-like proteins, only eight are conserved in all the *Vitaceae* accessions we have analyzed, but the two cysteines essential for oligomer formation are present [15] (Figure 6). Sequence similarities, conservation of functional sites and cysteines suggest that VvNPR1.1 could have functions similar to that of AtNPR1 as a positive regulator of SAR. Nevertheless, functions of a limited number of NPR1 homologs have been studied. The expression of *BjNPR1*, *MNPR1A* and *MNPR1B* is induced by SA or MeJA treatment. *BjNPR1*-GFP fusion protein is localized to the nucleus following SA treatment. *MNPR1A* and *MNPR1B* increase PR gene expression [38]. Overexpression of *BnNPR1* from canola and *OsNPR1/NH1* in rice complement the *npr1* mutations and enhance resistance [23,46,47]. The NPR1 proteins in the first group could be activated during potential redox modifications induced by SA or various pathogenic conditions and show a similar regulation across different species.

VvNPR1.2 is grouped with NtNML1 and LeNML1 as also AtNPR3 and AtNPR4 which have been described as negative regulators of SAR (Figure 2) [34]. Only five of the ten cysteine residues are conserved in the proteins from the group 2. Cysteine 216 which is essential for oligomerization in AtNPR1 is absent from all the NPR1 in group 2. The absence of cysteine residue 216 (Figure 7) suggests that VvNPR1.2 should be differently regulated, as observed for AtNPR3 and AtNPR4. AtNPR3 and AtNPR4 perform overlapping functions and that loss of the function in *npr3 npr4* double mutant leads to much higher *PR-1* expression and enhanced resistance [34]. It is plausible that AtNPR3 and AtNPR4 negatively regulate *PR-1* expression and pathogen resistance [34]. Inactivating both AtNPR3 and AtNPR4 leads to activation of TGA and expression of *PR* genes [34]. AtNPR3 and AtNPR4 would be negative regulators of plant defence responses [34]. A contradictory result has been reported with *MpNPR1-1* which is induced by the SAR and its overexpression increases the resistance of apple to pathogens, suggesting that *MpNPR1* may act as a positive regulator despite the absence of cysteine 216 [20]. Therefore, phylogenetic analysis is not sufficient to predict a positive or negative control of defence responses for VvNPR1.2.

Conclusions

Homologs of the *Arabidopsis* *NPR1* gene have now been isolated from numerous other plant species. Our study with Genoscope annotations provides the existence of a possible *NPR1* gene family in *Vitaceae*. VvNPR1.1 and VvNPR1.2 genes have four exons and three introns. The



Figure 6 Multiple alignment (dustal W) of VvNPR1.1 with AtNPR1, AtNPR2 and other NPR1 homologs. Vertical rectangles and stars represent conserved cysteine residues. The 8TB/POZ domain is underlined. Dashes indicate gaps introduced to maximize alignments.

deduced amino acid sequences show 52% and 37% identity to AtNPR1, and all three functional domains identified in *A. thaliana* NPR1 are conserved in the *Vitaceae* NPR1. The polymorphism on these two genes is in favour of purifying selection. Two *Vitis vinifera* NPR1-like proteins are separated in two of the three groups described by Hepworth et al. (2005) [37]. We have shown that the VvNPR1.1 is related to a first NPR1 group of positive regulators of SAR and VvNPR1.2 is related to a second NPR1 group whose principal members would be negative regulators of SAR, AtNPR3 and AtNPR4.

Methods

Plant material and DNA extraction

Ampelopsis japonica, *Muscadinia rotundifolia* cv. Carlos, *Parthenocissus quinquefolia*, five American *Vitis* species (*arizonica*, *labrusca* Isabelle, *rupestris* du Lot, *aestivalis*

Table 1 Proteins from the NPR1 family in different plants species

Taxon	GenBank Accession Numbers	References
Dicots		
<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtNPR1)	AT1G64280	Cao et al., 1997 [6]
<i>Arabidopsis thaliana</i> NPR2 (AtNPR2)	NM_118745	Liu et al., 2005 [16]
<i>Arabidopsis thaliana</i> NPR3 (AtNPR3)	NM_123879	
<i>Arabidopsis thaliana</i> NPR4 (AtNPR4)	NM_118086	
<i>Arabidopsis thaliana</i> NPR5 (AtNPR5)	NM_129700	
<i>Arabidopsis thaliana</i> NPR6 (AtNPR6)	NM_115572	
<i>Beta vulgaris</i> (BvNPR1)	AY640381	Meur et al., 2006 [19]
<i>Brassica juncea</i> (BjNPR1)	AY667498	
<i>Brassica napus</i> (BnNPR1)	AF527176	
<i>Capsicum annuum</i> (CaNPR1)	ABG38308	
<i>Helianthus annuus</i> NIM1-like protein 1 (HaNML1)	AY640383	
<i>Hordeum vulgare</i> (HvNPR1)	AM050559	
<i>Lycopersicon esculentum</i> (LeNPR1)	AY640378	
<i>Lycopersicon esculentum</i> NIM1-like protein 1 (LeNML1)	AY640379	
<i>Lycopersicon esculentum</i> NIM1-like protein 2 (LeNML2)	AY640380	
<i>Malus × domestica</i> cultivar (MpNPR1)	EU624123	Mainoy et al., 2007 [20]
<i>Musa acuminata</i> (MnNPR1A)	DQ925843	Endah et al., 2008 [38]
<i>Musa acuminata</i> (MnNPR1B)	EF137717	Zwicker et al., 2007 [39]
<i>Nicotiana tabacum</i> (NtNPR1)	DQ837218	Jaillon et al., 2007 [30]
<i>Nicotiana tabacum</i> NIM1-like protein 1 (NtNML1)	AY640382	Jaillon et al., 2007 [30]
		Jaillon et al., 2007 [30]
<i>Populus trichocarpa</i> (PtNPR1)	DQ481233	
<i>Vitis vinifera</i> NPR1.1 (VvNPR1.1)	CA065332	
<i>Vitis vinifera</i> NPR1.2 (VvNPR1.2)	CAN67078	
<i>Vitis vinifera</i> BOP (VvBOP)	CA023333	
Monocots		
<i>Oryza sativa</i> indica (OsNPR1/NH1)		Chen et al., 2005 [23]
<i>Oryza sativa</i> japonica (OsNPR1)		Ohyanagi et al., 2006 [40]
<i>Oryza sativa</i> japonica (OsNH2)		
<i>Oryza sativa</i> japonica (OsNPR3)		
<i>Oryza sativa</i> japonica (OsNPR4)		
<i>Oryza sativa</i> japonica (OsNPR5)		
<i>Zea mays</i> (ZmNPR1)		

and *cinerea*), six *Vitis vinifera* cultivars (Gouais blanc, Muscat reine des vignes, Cabernet Sauvignon clone 169, Riesling clone 49, Pinot noir clone 162, Gewurztraminer clone 46) and *V. vinifera* inbred line 40024 [48] [derived from Pinot noir, and bred close to full homozygosity (estimated at about 93%) by successive selfings [30] were used. The reference sequence used for SNP analysis was from line 40024 [48]. Classification of the various accessions used in this study is schematized in figure 3.

40024 genomic DNA was extracted using DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's recommendations and the other DNAs were a generous gift from Dr F. Pelsy (INRA, Colmar, France).

Amplification of DNA

PCR primers to amplify exons using the published genome sequence http://www.cns.fr/externe/English/corps_anglais.html [30] were designed (Table 2). Genomic DNA was amplified by PCR using the following conditions: 10 ng of DNA template, 1 × PCR Buffer (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂, 200 μM each dNTP (Invitrogen), 0.2 μM each primer, 1.25 Unit Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and milli-Q® water to a final volume of 25 μl. PCR reactions were performed using a 5 min initial denaturation/activation step, followed by 35 or 40 cycles at 94°C for 45 s, T_m for 1 min, and 72°C for 1 min per Kb, with a final extension step of 10 min at 72°C. PCR products were assessed by electrophoresis in 1.5% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining.

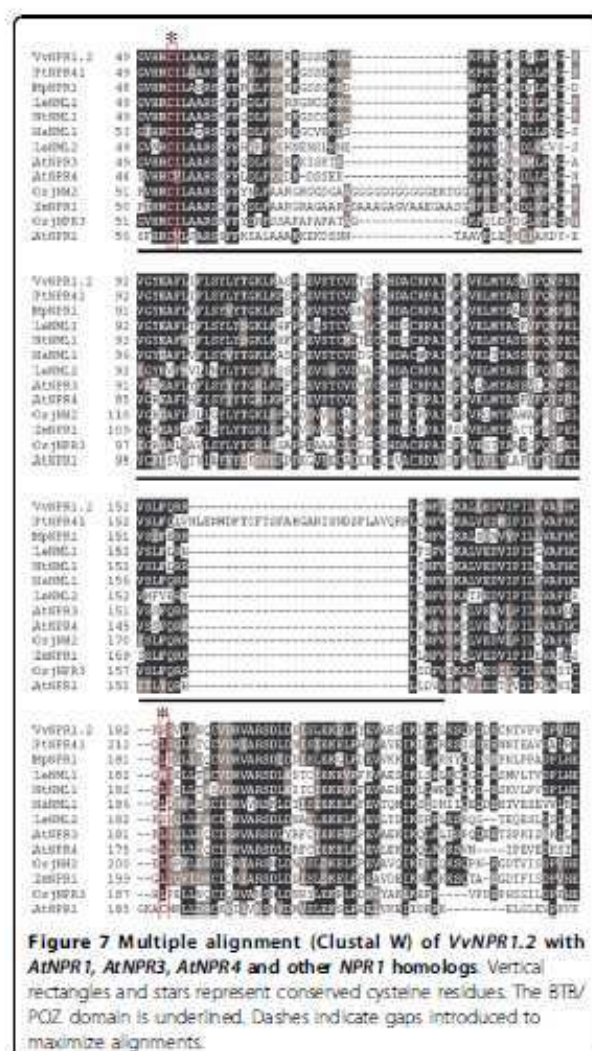


Figure 7 Multiple alignment (Clustal W) of VvNPR1.2 with AtNPR1, AtNPR3, AtNPR4 and other NPR1 homologs. Vertical rectangles and stars represent conserved cysteine residues. The BTB/POZ domain is underlined. Dashes indicate gaps introduced to maximize alignments.

Cloning gene-specific PCR fragments

When polymorphism appeared after the first sequencing reaction, the PCR products were ligated into the pCR2.1 vector (Original TA Cloning Kit, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Ligation mixtures were incubated overnight at 14°C to obtain the maximum number of transformants. Ligation products were transformed into competent *E. coli* bacteria cells (InaF⁺) using a 90 second heat-shock at 42°C. The bacterial cells were spread onto LB agar plates containing ampicillin (100 µg/ml) (Sigma) and X-Gal (40 µg/ml) (Euromedex).

Plasmid minipreps were performed by the alkaline lysis method [49]. The PCR fragments in the vectors were sequenced by Genoscreen (Lille, France) using M13 and M13 rev primers.

Polymorphism detection methods

A PCR-based strategy with primers designed on exons amplifying successfully *NPR1* gene fragments was used. The sequencing reaction can produce one (homozygote) or two (heterozygote) peaks depending on the genotype for each nucleotide. DNA sequences and the complete protein sequences of members of the *NPR1* gene family were aligned using Vector NTI and Bioedit software. Phylogenetic trees were produced using the ClustalW web site <http://align.genome.jp/> and the Phylo_win program using the neighbour-joining method [50]. The *NPR1* sequences (Table 1) from other species, available in the NCBI GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, were included in the sequence analysis for comparison. The Web-based SMART program was used to predict the BTB/POZ domains and to confirm the localization of ankyrin repeats for each protein. Percentage of SNP corresponds to the ratio of number of modified nucleotides to total number of nucleotides for each exon. To examine the evolutionary pressures acting on the *NPR1.1* and *NPR1.2* genes, the ratio of nonsynonymous (replacement) substitutions to synonymous (silent) nucleotide substitutions was determined [51-53]. Generally, values larger than 1 indicate sequence diversification. Instead, values smaller than or equal to 1 are indicative, respectively, of sequence conservation or random mutagenesis.

Additional bioinformatics databases

The ESTAP software from Expressed Sequence Tag (EST) projects <http://staff.vbi.vt.edu/estap/> was also used to identify *NPR1* sequences. Phylogenetic trees were produced using the ClustalW Web site <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>. Predicted amino acid sequences were generated using the DNA sequence translate tools EXPASY <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>.

Reviewers' reports

Reviewer 1: Fyodor Kondrashov, Centre for Genomic Regulation, Barcelona, Spain

This manuscript suffers from conceptual flaws that renders it incomprehensible and misleading: the difference between mutations, polymorphisms and substitutions is obscured to a degree that I believe in the current form makes the analysis almost meaningless.

The authors determine the sequence of a duplicated orthologs of a *NPR1* gene found in *Arabidopsis* in several different species and strains of the *Vitaceae* family. The differences between the obtained sequences the authors interchangeably call "polymorphisms", "substitutions", "modifications" and "mutations". I can only assume that the authors have sequenced several individuals from each species or strain, since the title refers to polymorphisms.

Table 2 Sequence of primer derived from line 40024 (Genoscope Vitis Genome Browser) to amplify the exons of *VvNPR1.1* and *VvNPR1.2*

Gene	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')	Amplified size (bp)
<i>VvNPR1.1</i>	ATGGACTACAGAGCTGCTC	CTGATAAAGGCCCAACAT	531
	AGACGCCCTGATGGACATTC	CTCTATTTCTTGAGGTACAACAG	748
	TGGACTAGCAAACTTCTATTC	CAGTTTGGACAGTCTCTTAGCC	204
	TGGACCTGGGAAACGCTTTT	TTACTTCTGCAAGAGAGTCTA	272
<i>VvNPR1.2</i>	ATGGCCAATTCAGCTGAGC	CTGAAAAAGTGAGACAGCTCTGGTA	549
	CGGCGTCTTACCAACT	CTCTATTTCTCAGGTACAG	754
	TGGCATTGACAGATTATCTCC	CTGTTTCACAAGGGCATTCCTTGAACG	198
	TGGAGATGGGTGACGC	TCATAATTTCTAGCCTTGAC	263

However, I did not find a statement of how many individuals were sequenced for each species/strain, or whether or not substitutions were included in the analysis. The authors state that "The NPR1 sequences (Table 1) from other species, [...], were included in the sequence analysis for comparison." What kind of comparison? Is the data really a mix of polymorphisms and substitutions? Such constant confusion between mutational, polymorphism and macro-evolutionary levels provides a huge barrier to comprehension of the results.

Another example: that authors claim that "[Ka/Ks] values smaller than or equal to 1 are indicative, respectively, of sequence conservation or random mutagenesis." Actually, Ka/Ks of any value can be achieved by random mutagenesis! Unfortunately, there are other, equally frustrating, examples. Before the authors can make a clear distinction between mutations (instantaneous products of mutagenesis), polymorphisms (segregating alleles in a population) and substitutions (sequence differences between homologs in different species or strains) and make it clear to the reader what kind of data they are using the manuscript will remain fatally flawed.

In addition, once the authors can distinguish between these three concepts the data analysis can be expanded to include a combination of phylogenetic and population genetic analyses, broadening the overall ability of the authors to infer the kinds of selection acting in these genes.

A minor issue that arises from the same misconception. The authors spend some time discussing the possible functional implications of different nonsynonymous and nonsense "mutations". All of these functional implications are a mute point if these are deleterious segregating polymorphisms. The functional implications are justified if the authors mean substitutions.

Author's response: *The manuscript was improved in response to these observations in particular to make it more comprehensible.*

Pages 11 and 12, words "mutations" and "polymorphism" were used by Bakker et al. (2008).

In the last paragraph before "Functional hypothesis [...]", the term "mutations" was used because it is a general conclusion.

We have sequenced a pool of three individuals for each species. Each PCR products was sequenced once. When polymorphism appeared after the first sequencing reaction, the PCR products were ligated into a vector and sequenced six times to generate the two polymorphic alleles, separately. We estimated that this pool is sufficient to represent the whole species studied because grapevine is multiplied by vegetative propagation. Moreover, our reference 40024 line was also sequenced according to the same procedure, compared to the sequence available on the Genoscope database and no difference was observed. If an allele was identical to our reference but the other one was different, we took account to the polymorphic allele to consider a maximum diversity.

The sentence "The NPR1 sequences (Table 1) from other species [...], were included in the sequence analysis for comparison." refers to Figure 2. The aim of this study was to place our two genes in a set of gene described as NPR1. We used the raw sequence of 40024 line available on the Genoscope database to make our comparison without introducing polymorphisms or substitutions.

We have reduced the functional hypothesis part.

Second review of Bergeault et al. "Low level of polymorphism in two putative orthologs of NPR1 genes in the Viraceae family".

While significantly improved from the last version, I still think that the manuscript suffers from conceptual inconsistencies. Also, now that the results are clearer to me I do not find them interesting or revealing.

The content: The authors show that two paralogs that have a 43% identity are under negative selection by comparing the density of nonsynonymous and nonsynonymous polymorphisms. This is hardly surprising and I am not sure why the authors think that such a result should be published. Any theory of gene duplications will confirm that nothing but negative selection is expected for such distant paralogs.

The approach: On the other hand, the authors have the right approach to study the functional impact of the functional impact of the origin of gene duplication, which is one of the least understood part of gene duplication evolution. If the paralogs were 99% identical than the results would have shown that the origin of a new function occurred quickly, or that the gene duplication itself was adaptive. Many studies of such sort should be undertaken, but this analysis does not mean very much with distant paralogs.

The language: Another unfortunate aspect of this manuscript is that it is littered with terminological inconsistencies. For example the authors say "To examine the evolutionary pressures acting on the *NPR1.1* and *NPR1.2*, the ratio of nonsynonymous (replacement) to synonymous (silent substitution) nucleotides was determined." Clearly, the word "nucleotides" should be either "substitutions" or "polymorphisms". Another such misconception is the claim that $K_n/K_s < 1$ can signify a recent selective sweep. I disagree: the only other thing it can signify besides negative selection is different mutation rates of synonymous and nonsynonymous sites. Even more unfortunately, is that the authors really mean Pn/Ps (for polymorphisms, not substitutions) throughout the manuscript and use "substitutions" (which are fixed differences) instead of "polymorphisms" (which are still segregating in the population). Also, instead of using "accessions" some other term, for example "strain" should be used: one cannot extract DNA from an accession.

Author's response: *The manuscript was improved in response to these observations in particular to "recent selective sweep" where we are agreeing with Dr Kondrashov. This sentence was suppressed.*

The "accession" is frequently used in wine-growing. This term indicates a grape variety, a variety or a clone.

Reviewer 2: Purificación López-García, Université Paris-Sud, Paris, France

Review of the article "Low level of polymorphism in two putative orthologs of *NPR1* genes in the Vitaceae family by Bergeault et al., submitted to Biology Direct. Bergeault et al. identify two homologues of *Arabidopsis NPR1* genes, known to be involved in general systemic resistance against pathogens or herbivores, in the genome of the grapevine *Vitis vinifera*. They subsequently design specific primers and amplify the corresponding genes from various grapevine cultivars. The analysis of those genes show a low level of polymorphism and, based on a ratio of synonymous versus non-synonymous substitutions lower than 1, the authors conclude that these genes are under purifying selection. Overall, the work is clear and appears well conducted. However, I

think that the structure and writing of the manuscript may be improved. A few suggestions follow.

In particular, there are many figures, some of which could be eliminated without loss of essential information. This is the case of figure 6 showing the stop codon region in *NPR1.1*. As an additional suggestion, figure 1 and 4 could be merged together in a composite figure showing as an inset the *NPR1.1* BTB/POZ domain region with the polymorphisms identified. I also believe that figure 8, showing the different cultivars analyzed, should appear as figure 1 at the beginning of the results section, since these are the cultivars subsequent work is about. Otherwise, placing it at the end of the manuscript with only a brief mention in the Methods section would make it dispensable.

The long discussion about the potential functions of *NPR1* genes in *V. vinifera* is rather speculative in the absence of actual functional data and could be significantly shortened.

Bergeault et al. observed that "in six *V. vinifera* cultivars SNP rate to introns was not significantly different to exons". Why? Could this suggest that the low SNP observed is not (at least totally) due to purifying selection but to other kind of constraint acting on that particular genomic region?

Minor comments:

- First paragraph of Background. Some references should be added. Readers may be not familiar with *V. vinifera* and their general genomic characteristics.

- Page 12, last line before "Functional hypothesis...". Sexual instead of sexuel.

- Page 15, "high homology values". This expression is incorrect. Homology is an all-or-nothing quality. Either two genes are homologous (derive from a common ancestor) or they are not. "High similarity or identity values" would be more appropriate.

Author's response: *The manuscript was improved in response to these very useful comments. In answer to the question concerning the SNP rate to introns, it is not significantly different to exons and this for the 3 introns which compose each gene. We suppose indeed that it is due to purifying selection since it is observed in 3 introns in six *V. vinifera*.*

For the incorrect expression in the minor comments, this sentence was suppressed.

Reviewer 3: George V. Shpakovski Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

This is my second review of this manuscript (my previous comments were addressed by the authors in their new manuscript submission). The authors report the results of an experimental (PCR-based) and computational study of

NPR1 [Nonexpressor of Pathogenesis Related 1]-like genes' polymorphism in different species of the *Vitaceae* family. Grapevine is subjected to numerous stresses (both environmental and pathogenic), and new knowledge on its defence mechanisms (*NPR1* gene is one of the main component of systemic acquired resistance [SAR] in plants) certainly will be beneficial both for scientific community and for human society in general. The main finding of the manuscript is the fact that family of *NPR* genes in *Vitis vinifera* and probably in all other plants consists of at least 3 separate branches. These 3 subfamilies of *NPR* genes in plants exemplified in *Arabidopsis thaliana* by *AtNPR1*, *AtNPR3* and *AtNPR5* (*BOP*) genes, respectively. Analysis of nucleotide polymorphisms in two *NPR1*-like genes from fifteen accessions belonging to the *Vitaceae* family indicate that the genes are under purifying selection, but the *AtNPR1* ortholog (*VvNRP1.1*) is more polymorphic. A tentative hypothesis of authors about two types (positive and negative) of regulation by different subfamilies of *NPR1*-genes although is interesting, but certainly needs some further experimental support. The revised version of the manuscript takes the suggestions that I previously made into account. The changes in the revised manuscript and the new title help to clarify the aim of the manuscript considerably. In my opinion, it would be better to re-name *Vitis* genes described by the authors on *VvNRP1*, *VvNRP3* and *VvNRP5* instead of *VvNRP1.1*, *VvNRP1.2* and *VvBOP* at it is in the text. The manuscript might need some additional editing and proofreading.

Author's response: We are grateful to Dr Shpakovski for his comments and notice very judicious. Indeed, the hypothesis about their functions is essentially based on a work on literature. But, we think that it was interesting to discuss the two types of SAR regulation. Moreover, we indicate in the manuscript "Therefore, phylogenetic analysis is not sufficient to predict a positive or negative control of defence responses for *VvNRP1.2*."

With regard to re-name *Vitis* genes, another classification would make confusion. For example, where are *VvNRP2* and *VvNRP4*? Moreover, we have at present no data concerning *VvNRP1.2* which would act as a negative regulator of SAR and it would be premature to re-name it, *VvNRP3*.

Abbreviations

NPR1: non-expressor of PR 1; SA: salicylic acid; JA: jasmonic acid; PR: pathogenesis-related; SAR: systemic acquired resistance; ISR: induced systemic resistance; BTB/POZ: broad complex, tramtrack and bica a brach/pox virus and zinc finger; ARD: ankyrin repeat domain; NLS: nuclear localization signal.

Acknowledgements

This research was supported by the "Université de Haute-Alsace" and by a doctoral fellowship from the "Région Alsace" to KB. We are grateful to Frédérique Pelsy (INRA, Colmar, France) for providing the DNA of *Amelops japonica*, *Muscadinia rotundifolia*, *Panthenocissus quinquefolia*, American *Vitis*

species (*japonica*, *labrusca* Isabelle, *rupestris* du Lot, *aestivalis* and *cinerea*), *Vitis vinifera* cultivars (Gouais blanc, Muscat reine des vignes, Cabernet Sauvignon, Riesling, Pinot noir), and to Valérie Hofstetter (Department of Ecology, University of Lausanne, Switzerland) for comments and suggestions which helped to improve the quality of this manuscript. Special thanks to Laetitia Chertain (John Innes Centre, Norwich, United Kingdom) for helpful English corrections.

Author details

¹Laboratoire Vigne, Biotechnologies & Environnement, Université de Haute-Alsace, 33 rue de Herrlisheim, 68000 Colmar, France. ²Laboratoire de Génétique et Amélioration de la Vigne, INRA et Université de Strasbourg (UMRI 131), 28 rue de Herrlisheim, 68000 Colmar, France.

Authors' contributions

KB carried out all the experiments, alignment and comparison of the sequences, phylogenetic analyses and drafted the manuscript. CB and BW initiated and conceived the study, have done general supervision and coordination and corrected the manuscript. DM participated in the design of the study and helped to organize the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 2 April 2009

Accepted: 5 February 2010 Published: 5 February 2010

References

1. Aleweldt G, Possingham JV: Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 1988, **75**(5):669-673.
2. Galet P: Précis de viticulture. Imprimerie Déhan, Montpellier, France 1993.
3. Organisation internationale de la vigne et du vin: Statistiques vitivinicoles mondiales. http://news.reseau-concept.net/vimages/oliv/client/Commentaire_Statistiques_2005_FR.pdf.
4. Kuske BN, Brooks DM: Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 2002, **5**(4):325-331.
5. Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X: Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 1994, **6**(11):1583-1592.
6. Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X: The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 1997, **88**(1):57-63.
7. Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD: Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 1996, **8**(10):1809-1819.
8. Dong X: *NPR1*, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* 2004, **7**(5):547-552.
9. Friedlich L, Lawton K, Büess W, Masner P, Specker N, Gut Rella M, Meier B, Dindler S, Staub T, Uknes S, Métraux JP, Kessmann H, Ryals JA: A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J* 1996, **10**(1):61-70.
10. Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP: Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 1997, **35**(1):235-270.
11. van Wees SC, de Swart EA, van Pelt JA, van Loon LC, Pieterse CM: Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**(15):8711-8716.
12. Spoel SH, Koomneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CM: *NPR1* modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 2003, **15**(3):760-770.
13. Despres C, DeLong C, Glaze S, Liu E, Folbert PR: The *Arabidopsis* *NPR1* / *NM1* protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 2000, **12**(2):279-290.
14. Despres C, Chubek C, Rochon A, Clark R, Bédune T, Desveaux D, Folbert PR: The *Arabidopsis* *NPR1* disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* 2003, **15**(9):2181-2191.
15. Mou Z, Fan W, Dong X: Inducers of plant systemic acquired resistance regulate *NPR1* function through redox changes. *Cell* 2003, **113**(7):935-944.

16. Lu G, Holub EB, Alonso JM, Ecker JR, Fobert PR: An Arabidopsis NPR1-like gene, *NPR1*, is required for disease resistance. *Plant J* 2005, **41**(2):304-318.
17. Chen M-S, Fitzgerald HA, Yadav RC, Carles PE, Dong X, Ronald PC: Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in Arabidopsis. *Plant J* 2001, **27**(2):101-113.
18. Chen M, Carles PE, Fitzgerald HA, Ronald PC: Rice NRR, a negative regulator of disease resistance, interacts with Arabidopsis NPR1 and rice NRI1. *Plant J* 2005, **43**(5):623-635.
19. Meur G, Budatha M, Dutta Gupta A, Prakash S, Kirti PB: Differential induction of NPR1 during defense responses in *Brassica juncea*. *Physiol Mol Plant Pathol* 2006, **68**(4-6):128-137.
20. Malinoy M, Jin Q, Borejsza-Wysokia EE, He SY, Aldwinckle HS: Overexpression of the apple *MpNPR1* gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Mol Plant Microbe Interact* 2007, **20**(12):1568-1580.
21. Zhang Y, Wang X, Cheng C, Gao Q, Liu J, Guo X: Molecular cloning and characterization of *GhNPR1*, a gene implicated in pathogen responses from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BioSci Rep* 2008, **28**(1):7-14.
22. Cai H, Li X, Dong X: Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**(11):6531-6536.
23. Chen M, Fitzgerald HA, Carles PE, Navarre DA, Ronald PC: Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol Plant Microbe Interact* 2005, **18**(6):511-520.
24. Fitzgerald HA, Chen M-S, Navarre R, Ronald PC: Overexpression of *AtNPR1* in rice leads to a BTH- and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. *Mol Plant Microbe Interact* 2004, **17**(2):140-151.
25. Friedrich L, Lawton K, Dietrich R, Willis M, Cade R, Ryals J: NIM1 overexpression in Arabidopsis potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Mol Plant Microbe Interact* 2001, **14**(9):1114-1124.
26. Lin WC, Lu CF, Wu JW, Cheng ML, Lin YM, Yang NS, Black L, Green SK, Wang JF, Cheng CP: Transgenic tomato plants expressing the Arabidopsis NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Res* 2004, **13**(6):567-581.
27. Mekander R, Essig JS, Schapugh MA, Trick HN, Shah J: Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of Arabidopsis NPR1. *Mol Plant Microbe Interact* 2006, **19**(2):123-129.
28. Budder ES, Thomsberry JM: Plant molecular diversity and applications to genomics. *Curr Opin Plant Biol* 2002, **5**(2):107-111.
29. Troggio M, Malacarne G, Coppola G, Segala C, Cartwright DA, Pindo M, Stefanini M, Mank R, Moroldo M, Morgante M, Grandi MS, Velasco R: A dense single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contigs. *Genetics* 2007, **176**(4):2637-2650.
30. Jallouf Q, Aury JM, Noel B, Pollard A, Claret C, Casagrande A, Choise N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, et al: The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 2007, **449**(7161):463-467.
31. Velasco R, Zharikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J, et al: A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* 2007, **2**(12):e1326.
32. Le Henaff G, Heitz T, Mestre P, Mutterer J, Walter B, Chong J: Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of Pathogenesis-Related gene expression. *BMC Plant Biology* 2009, **9**(1):54.
33. Kim HS, Delaney TP: Over-expression of TGA5, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in Arabidopsis thaliana to *Peroxispora parasitica*. *Plant J* 2002, **32**(2):151-163.
34. Zhang Y, Cheng YT, Qu N, Zhao Q, Bi D, Li X: Negative regulation of defense responses in Arabidopsis by two NPR1 paralogs. *Plant J* 2006, **48**(5):647-656.
35. Zhang Y, Fan W, Kinkema M, Li X, Dong X: Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**(11):6523-6528.
36. Zhou JM, Trifa Y, Sika H, Pontier D, Laim E, Shah J, Klessig DF: NPR1 differentially interacts with members of the TGA/GBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol Plant Microbe Interact* 2000, **13**(2):191-202.
37. Hepworth SR, Zhang Y, McKim S, Li X, Hauglin GW: BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in Arabidopsis. *Plant Cell* 2005, **17**(5):1434-1448.
38. Endah R, Beyene G, Kiggundu A, Berg van den N, Schlöter U, Kureit K, Chikwamba R: Elicitor and Fusarium-induced expression of NPR1-like genes in banana. *Plant Physiol Biochem* 2008, **46**(11):1007-1014.
39. Zwicker S, Mast S, Stos V, Pflüger AJ, Pflüger UM: Tobacco NIMIN2 proteins control PR gene induction through transient repression early in systemic acquired resistance. *Mol Plant Pathol* 2007, **8**(4):385-400.
40. Ohyanagi H, Tanaka T, Sakai H, Shigemoto Y, Yamaguchi K, Habara T, Fujii Y, Antonio BA, Nagamura Y, Imanishi T, Ito K, Itoh T, Gajbani T, Sasaki T: The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. japonica genome information. *Nucl Acids Res* 2006, **34**(suppl_1):D741-744.
41. Geler P: Recherches sur les méthodes d'identification et de classification des Vitaceae des zones tempérées. PhD dissertation University of Montpellier, France 1967.
42. Birdwell VI, Treisman R: The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev* 1994, **8**(14):1664-1677.
43. Kadowaki T, Kadowaki H, Taylor SE: A nonsense mutation causing decreased levels of insulin receptor mRNA: detection by a simplified technique for direct sequencing of genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87**(2):658-662.
44. Bakker TG, Taw MB, Toomajian C, Keilman ME, Bergelson J: Low levels of polymorphism in genes that control the activation of defense response in Arabidopsis thaliana. *Genetics* 2008, **203**:2032-2043.
45. Caldwell KS, Michelmore RW: Arabidopsis thaliana genes encoding defense signaling and recognition proteins exhibit contrasting evolutionary dynamics. *Genetics* 2009, **181**(2):671-684.
46. Potlajkaya SD, DeLong C, Sharpe A, Fobert PR: Conservation of NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 function between Arabidopsis thaliana and Brassica napus. *Physiol Mol Plant Pathol* 2007, **71**(4-6):174-183.
47. Yuan Y, Zhong S, Li Q, Zhu Z, Lou Y, Wang L, Wang J, Wang M, Li Q, Yang D, He Z: Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NRI1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnol J* 2007, **5**(2):313-324.
48. Bronner A, Oliveira J: Creation et étude de lignées chez le Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.). *J Int Sci Vigne Vin* 1991, **25**:133-148.
49. Sambrook J, Russell D: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory 2001.
50. Galtier N, Gouy M, Gautier C: SEAVIEW and PHYLO-WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 1996, **12**(6):543-548.
51. Nei M, Gajbani T: Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 1986, **3**(5):418-426.
52. Kimura M: Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. *Nature* 1977, **267**(5608):275-276.
53. Miyata T, Yasunaga T: Molecular evolution of mRNA: A method for estimating evolutionary rates of synonymous and amino acid substitutions from homologous nucleotide sequences and its application. *J Mol Evol* 1980, **16**:23-36.

doi:10.1186/1745-6150-5-9

Cite this article as: Bergeault et al.: Low level of polymorphism in two putative NPR1 homologs in the Vitaceae family. *Biology Direct* 2010 **5**:9.

3. Conclusion

L'analyse de la diversité de séquence des deux gènes *NPR1.1* et *NPR1.2* indique la possibilité d'une famille multigénique NPR chez les *Vitaceae*. *NPR1.1* et *NPR1.2* montrent de fortes similarités de séquence (52% et 37% d'identité avec *AtNPR1*, respectivement), la même structure introns/exons et possèdent les trois domaines fonctionnels identifiés chez *AtNPR1*. Le polymorphisme de ces deux gènes montre qu'ils sont sujets à une sélection purificatrice c'est-à-dire que la sélection agirait principalement par l'élimination des mutations désavantageuses. La majorité des mutations observées sont sélectivement neutres.

Cependant, une zone hétérozygote est observée dans *Ampelopsis japonica*, *Muscadinia rotundifolia*, *Parthenocissus quinquefolia*, *V. cinerea*, *V. aestivalis*, *V. rupestris*, *V. arizonica* et *V. vinifera* Cabernet Sauvignon. Elle génère un codon stop prématuré (TGA) dans la partie centrale de la protéine NPR1.1. Ces résultats suggèrent qu'un des deux allèles produit une protéine tronquée de 427 acides aminés qui résulte de la traduction des exons 1 et 2 uniquement. La protéine tronquée présente tous les domaines d'interaction protéine-protéine et toutes les cystéines sauf une et doit par conséquent être fonctionnelle. La cystéine manquante n'est pas essentielle pour la localisation nucléaire de la protéine (Mou *et al.*, 2003). Le domaine ARD d'*AtNPR1* est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec les membres de la famille des facteurs de transcription TGA bien que les interactions de haute affinité demandent également la partie N-terminale de la protéine (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000).

De plus, le fait que VvNPR1.1 soit regroupé avec la protéine *AtNPR1* et VvNPR1.2 avec *AtNPR3* et *AtNPR4* décrits comme étant des régulateurs négatifs des réponses de défense (Zhang *et al.*, 2006), suggère que ces deux gènes soient peut être régulés différemment.

Nous avons donc choisi d'étudier plus précisément les régions promotrices des gènes *NPR* identifiés chez la vigne ainsi que la diversité génétique de leurs introns dans cinq accessions de *Vitis vinifera*.

CHAPITRE III :
Etude des régions promotrices et
introniques de VvNPR1.1 et VvNPR1.2

1. Introduction

Le gène *NPR1* chez *Arabidopsis* apparaît comme ayant un rôle central de régulateur dans la défense des plantes (Cao *et al.*, 1994; Dong, 2004).

Afin de mieux comprendre l'implication de ce gène dans la réponse au stress, nous avons initié, tout d'abord, l'étude de la région promotrice de chaque *VvNPR* par une approche *in silico* à partir des données issues du séquençage du génome de la vigne (Génoscope). Puis, nous avons étudié la diversité de séquences dans les introns de cinq *Vitis vinifera*.

2. Résultats

2.1. Recherche d'éléments régulateurs dans les promoteurs des gènes

VvNPR1.1 et *VvNPR1.2* par une approche *in silico*

Les motifs conservés impliqués dans la régulation du promoteur ont été recherchés en confrontant les séquences (2000 pb en amont du codon start ATG) de *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* issues des données du Génoscope à la banque de données PLACE [Plant cis-acting regulatory DNA elements, (Higo *et al.*, 1999)] qui répertorie les éléments agissant *in cis* détectés chez des plantes vasculaires (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>).

La plupart des boîtes régulatrices, leur séquence et leur rôle potentiel sont regroupés en annexe 1. L'analyse de cette région promotrice révèle la présence de plusieurs boîtes TATA ainsi que des motifs correspondant à des initiateurs de la transcription. Les boîtes régulatrices suggèrent des régulations des *VvNPR* en réponse (1) à des stress environnementaux (lumière, déshydratation, étiolement et froid), (2) aux conditions physiologiques de la plante (régulation négative par les sucres, hormones), (3) aux stress biotiques ou aux éliciteurs (nombreuses boîtes W). La liaison de protéines WRKY sur les boîtes W confère au gène la capacité de répondre aux pathogènes.

Une boîte « ASF1MOTIFCAMV » (TGACG) est présente uniquement dans le promoteur du gène *VvNPR1.2*. Les motifs TGACG sont trouvés dans les promoteurs des gènes qui sont différentiellement exprimés pendant l'infection par un agent pathogène (Mahalingam *et al.*, 2003) et sont impliqués dans l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes suite à une induction par l'acide salicylique et / ou l'auxine. De plus, les facteurs TGA sont capables de reconnaître et de se lier à l'élément *as-1*. Cependant, Yu *et al.*, (2001) ne relatent pas la présence de l'élément *as-1* dans le promoteur du gène *AtNPR1* mais la présence de nombreuses boîtes W, notamment de motif TTGAC.

Ces mêmes motifs, définissant la famille de facteurs de transcription WRKY (Maleck *et al.*, 2000) sont présents en quantité importante dans les promoteurs des deux gènes et sont relativement proches de TGACG qui définit lui la famille TGA bZIP (Despres *et al.*, 2000). Les promoteurs des gènes *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* présentent moins de 10% d'identité entre eux et avec *AtNPR1*.

L'analyse informatique des séquences promotrices correspondant à *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* indique la présence de séquences régulatrices putatives présentant plusieurs éléments de réponse aux éliciteurs et aux messagers secondaires produits lors d'une infection. Ces caractéristiques suggèrent que ces séquences doivent être fonctionnelles mais il est cependant nécessaire de rester prudent. La fonctionnalité ne pourra être validée qu'après des analyses plus poussées des promoteurs. En effet, la présence de certains éléments de petite taille ne peut être due qu'au fruit du hasard.

2.2. Etude de la diversité génétique des régions introniques de *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2*

Comme nous l'avons vu précédemment, les gènes *NPR1.1* et *NPR1.2* étudiés dans la famille des *Vitaceae* montrent de fortes similarités de séquence avec *AtNPR1* et présentent notamment la même structure intron/exon, c'est pour cela que nous avons étudié les régions introniques de ces deux gènes.

Tout d'abord, les deux premiers introns de chaque gène de vigne montre de 21 à 30% d'identité avec les introns d'*AtNPR1* alors que le troisième intron n'en présente que 12 à 15%. Dans certains cas, un intron peut contenir un gène, on parle alors de gène « niché » mais ce n'est pas le cas pour les deux gènes étudiés *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2*.

Une recherche d'éléments transposables dans la séquence des gènes *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* a été effectuée par une approche *in silico*. Le logiciel de recherche d'éléments transposables (RepBase: <http://www.girinst.org/censor/index.php>) nous a permis de mettre en évidence la présence de quelques éléments *cis*-régulateurs potentiels. Il s'agit d'éléments essentiellement non LTR (Long Terminal Repeats) et d'éléments à ADN. Il est à noter que tous les éléments transposables identifiés dans la séquence PN 40024 disponible sur le site du Génoscope sont présents dans les séquences des cinq *Vitis vinifera* étudiés.

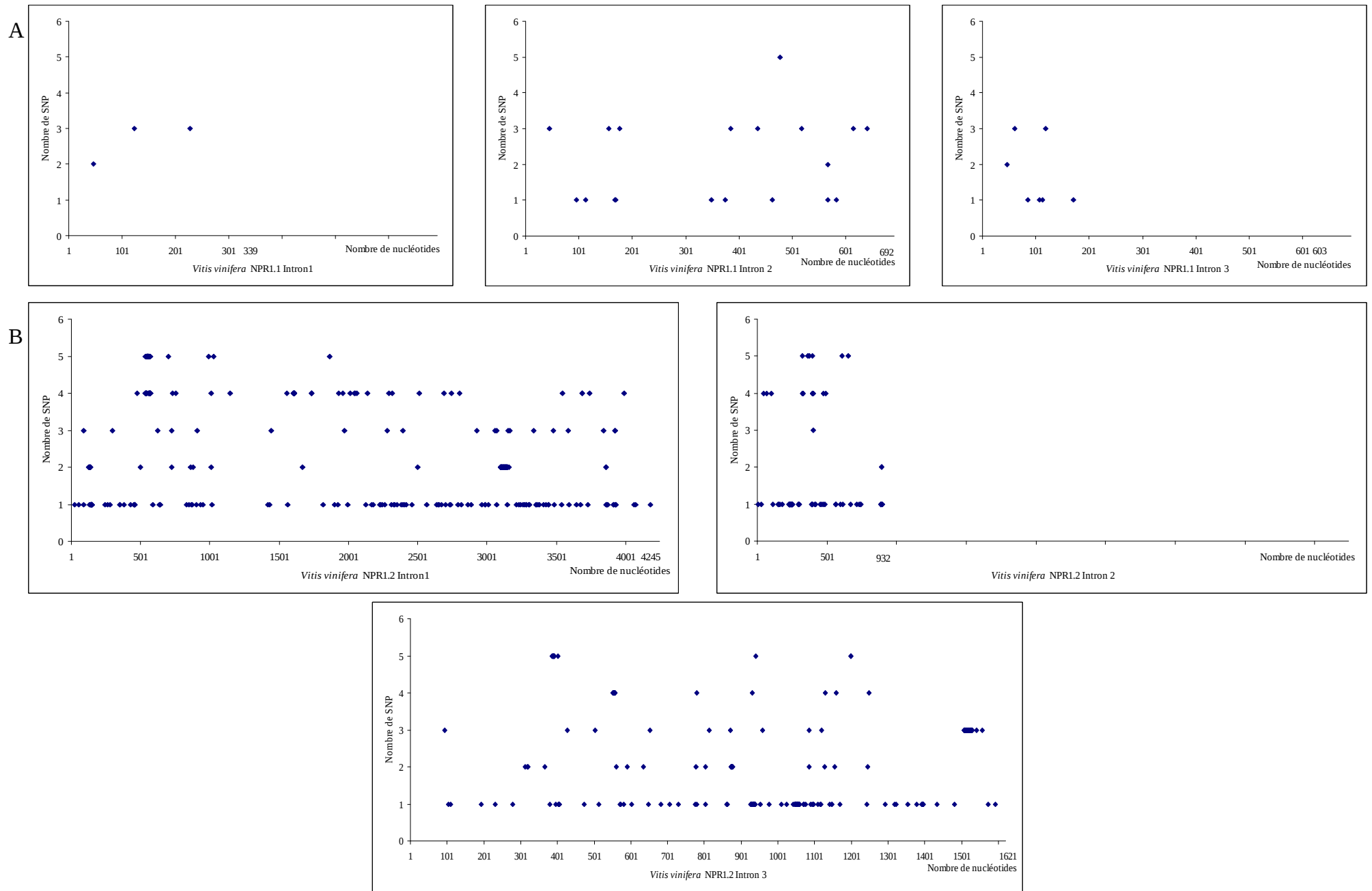


Figure III.1 : Distribution des SNPs dans *VvNPR1.1* (A) et *VvNPR1.2* (B) pour les introns 1 à 3. Cinq *Vitis vinifera* ont été étudiés : Gouais blanc, Muscat reine des vignes, Cabernet Sauvignon, Riesling et Pinot noir. L'axe des ordonnées indique le nombre de SNP compté à chaque position dans les cinq accessions en comparaison à la lignée PN40024.

Nous avons étudié plus précisément les trois introns de *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* pour cinq *Vitis vinifera* (Gouais blanc, Muscat reine des vignes, Cabernet Sauvignon, Riesling et Pinot noir). Les séquences ont été obtenues en utilisant des fragments amplifiés par PCR. L'identification des sites polymorphes a été basée sur le séquençage des deux allèles. Suite à ce séquençage, des SNP ont été mis en évidence au terme d'un processus d'alignement et de vérification visuelle des séquences obtenues. La figure III.1 montre la distribution des SNP pour les trois introns de *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2*. La diversité nucléotidique π est calculée à l'aide du programme DnaSP 5.10 (Rozas et Rozas, 1999) et est comprise entre 0.00067 et 0.011. Les deux gènes sont donc soumis à de fortes pressions de sélection naturelle et plus particulièrement le gène *VvNPR1.1*. Les introns 1 et 3 de *VvNPR1.2* montrent des polymorphismes d'insertion et de délétion pour certains *Vitis vinifera*. Cependant, ils n'engendrent pas d'accroissement considérable de la taille des introns et les séquences sont trop petites (maximum 20 pb) pour être fonctionnelles. Les insertions et délétions permettent d'équilibrer la taille globale de l'intron. De plus, nous avons obtenu quelques SNP pour la lignée « PN 40024 » mais le taux d'homozygote pour les deux gènes est supérieur aux 93% estimés par Jaillon *et al.*, (2007).

3. Conclusion

La recherche d'éléments de régulation dans les promoteurs des deux gènes nous indique que les deux promoteurs doivent être fonctionnels, bien qu'ils soient en terme de similarité relativement éloignés de celui du gène *NPR1* d'*Arabidopsis*.

De plus l'analyse des régions introniques montre que les gènes de *Vitis vinifera* sont soumis à de fortes pressions de sélection, en particulier *VvNPR1.1*. Ces résultats viennent confirmer ceux déjà obtenus dans le chapitre II. Nous pouvons donc en conclure que la sélection tend à augmenter la fréquence des allèles favorables et à diminuer celle des allèles délétères. Cette pression de sélection agit également dans des zones qui n'ont a priori aucune fonction. Depuis quelques années maintenant, plusieurs scientifiques s'interrogent sur le rôle des introns et ils suggèrent que les pressions de sélection exercées soient liées à des fonctions biologiques encore inconnues (Majewski et Ott, 2002; Gaffney et Keightley, 2006).

CHAPITRE IV :
Identification des gènes VvTGA chez la
vigne et interactions avec VvNPR1.1

1. Introduction

La découverte de *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* chez la vigne et la possibilité d'une redondance fonctionnelle entre certains de ces membres nous a conduit à rechercher chez la vigne, par une stratégie gène-candidat, des homologues des facteurs de transcription TGA connus pour interagir avec les gènes *NPR1*. En effet, plusieurs études ont démontré des interactions physiques entre *NPR1* et différents membres de la famille des facteurs de transcription TGA en utilisant le système du double-hybride dans la levure ou bien *in vitro* (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). La famille des facteurs de transcription TGA comprend dix membres chez *Arabidopsis thaliana* (Jakoby *et al.*, 2002) qui sont répartis en six sous-classes sur la base de leurs homologues de séquences. *In vitro*, l'interaction de *NPR1* augmente la liaison des facteurs TGA aux éléments régulateurs des promoteurs (Despres *et al.*, 2000; Despres *et al.*, 2003). L'interaction entre *AtNPR1* et les facteurs de transcription TGA2, 3, 5, 6 et 7 a été identifiée à plusieurs reprises lors des expériences de double hybride (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Kim et Delaney, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Dans la plante, *NPR1* et l'acide salicylique sont requis pour l'activation de gènes rapporteurs dépendant de TGA2 (Fan et Dong, 2002). Des études de chromatine immunoprécipitation (ChIP) démontrent la liaison de TGA2 et TGA3 au promoteur de *PR-1* ainsi que la présence obligatoire de *NPR1* et de SA (Johnson *et al.*, 2003). Pour deux facteurs TGA d'*Arabidopsis*, TGA2 et 5, l'interaction avec *NPR1* a été confirmée *in vitro* (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000). En utilisant une technique de complémentation de protéine (PCA) *in vivo*, il a été démontré que *NPR1* et TGA2 interagissent *in planta* (Subramaniam *et al.*, 2001; Fan et Dong, 2002). L'interaction entre ces deux protéines est stimulée par le SA et a été localisée dans le noyau (Subramaniam *et al.*, 2001).

De plus, en utilisant le système du double hybride, trois facteurs de transcription TGA1, TGA4 n'interagissent pas ou très faiblement avec *AtNPR1* (Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Hepworth *et al.*, 2005). TGA1 n'interagit pas avec *NPR1* par double hybride ou *in vitro* mais il interagit avec *NPR1* dans des feuilles d'*Arabidopsis* après traitement avec le SA (Despres *et al.*, 2003). L'interaction de *NPR1* avec TGA1 et TGA4 est uniquement observée après un traitement avec SA alors que les autres TGA interagissent avec *NPR1* en l'absence de traitement. Il a été montré que l'interaction de *NPR1* avec TGA1 et TGA4 est régulée par le statut redox de deux cystéines conservées et localisées dans la région C-terminale de ces facteurs (Despres *et al.*, 2003).

AtTGA1	PDKIQRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLSRLKLIQLEQLDRARQQGFYVGNIGDITNSLGFSETMN-----PGIAA
AtTGA2	DQKTLRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLSRLKLTQLEQLQARARQQGVFISS--TGDAQHSTGG-----NGALA
AtTGA3	NDKMKRRLAQNREAARKSRLRKKAHVQQLSRLKLSQLEQLVRARQQGLCVRNSSDTSYLGPAAGNMN-----SGIAA
AtTGA4	PDKIQRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLSRLKLIHLEQLDRARQQGFYVGNIGDITNSLGFSETMN-----SGIVA
AtTGA5	DQKTLRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLSRLKLTQLEQLQARARQQGVFISS--SGDAQHSTAG-----DGAMA
AtTGA6	DQKTLRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLSRLKLTQLEQLQARARQQGVFISS--SGDAQHSTGG-----NGALA
AtTGA7	HDKMKRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLSRLKLSQLEQLQARARQQGVFISS--GHLGPSGSIN-----TGIAS
AtTGA10	DPKTLRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLSRLKLTQLEQLQARARQQGVFISS--SGDAQHSTGG-----NGALA
VvTGA1	TDKTLRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLSRLKLTQLEQLQARARQQGVFISS--SGDAQHSTGG-----NGALA
VvTGA2	DQKTLRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLSRLKLTQLEQLQARARQQGVFISS--SGDAQHSTGG-----NGALA
VvTGA3	YVQTLRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLSRLKLTQLEQLQARARQQGVFISS--SGDAQHSTGG-----NGALA
VvTGA4	VDKVRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLSRLKLTQLEQLQARARQQGVFISS--SGDAQHSTGG-----NGALA
VvTGA5	DQKTLRRLAQNREAARKSRLRKKAYVQQLSRLKLTQLEQLQARARQQGVFISS--SGDAQHSTGG-----NGALA

AtTGA1	FEMEYGHVVEEQNRQICELRTVLHGHIINDIELRSLVENAMKHYFELFRMKSSAAKADVFVMSGMWRTSAERFFLWIGGF
AtTGA2	FDAEHSRWLEEKQNMNELRSALNAHAGDSELRIVDGVMAHYEELFRMKSSAAKADVFVMSGMWRTSAERFFLWIGGF
AtTGA3	FEMEYTHWLEEQRNRVSEIRTAQAHIQDIELKMLVDSCLNHYANLFRMKADAADVFVMSGMWRTSAERFFLWIGGF
AtTGA4	FEMEYGHVVEEQNRQICELRTVLHGHIINDIELRSLVENAMKHYFELFRMKSSAAKADVFVMSGMWRTSAERFFLWIGGF
AtTGA5	FDVEYRRNWMPYQELNRQNMNELRSALNAHAGDSELRIVDGVMAHYEELFRMKSSAAKADVFVMSGMWRTSAERFFLWIGGF
AtTGA6	FDAEHSRWLEEKQNMNELRSALNAHAGDSELRIVDGVMAHYEELFRMKSSAAKADVFVMSGMWRTSAERFFLWIGGF
AtTGA7	FEMEYSHWLQEQSRVSELRTALQSHISDIELKMLVESCLNHYANLFRMKSSAAKADVFVMSGMWRTSAERFFLWIGGF
AtTGA10	FDMEYARWLEEQRLLNELRVATQEHLENELRMFVDTCLAHYDHLINLKAMVAKTDVFLHISGAWKTPAERCFWLWIGGF
VvTGA1	FEMEYGHVVEEQNRQICELRTVLHGHIINDIELRSLVENAMKHYFELFRMKSSAAKADVFVMSGMWRTSAERFFLWIGGF
VvTGA2	FDVEYARWLEEQRINELRSVNSHASDAELRVVDNIMAHYDDIFRLKGVAADVFVMSGMWRTSAERCFWLWIGGF
VvTGA3	FDMYARWLDEHQRLINDLRSAVNSHVGNELRILVDGVMAHYDEIFRLKSMGAKSDVFHMSGMWRTSAERCFWLWIGGF
VvTGA4	FEMEYGHVVEEQNRQICELRTALHAHISDVDELRLIVETAMNHYFNLFRMKSSAAKADVFVMSGMWRTSAERFFLWIGGF
VvTGA5	FDVEYARWLEEQRINELRSVNSHASDAELRVVDNIMAHYDDIFRLKGVAADVFVMSGMWRTSAERCFWLWIGGF

AtTGA1	RPSDLLKVLPHFDVLTQQLLDVGNLQKSSQQAEDALTQGMKQLQHTLADCVAAAGQ-----LGEGSYIPQVNSAM
AtTGA2	RSSELLKLLANQLEPMTERQMLGINNLQQTSSQQAEDALSQGMESLQQLADTLSSGTL--GSS-SSGNVASYMGQMAMAM
AtTGA3	RPSELLNVVMPYVEPLTDQQLLEVRLNQLQSSQQAEDALSQGLDKLQQLGVESIAIQIK-----VVESVNHGAPMASAM
AtTGA4	RPSELLKVLPHFDVLTQQLLDVGNLQKSSQQAEDALTQGMKQLQHTLADCVAAAGQ-----LGEGSYIPQMTCAM
AtTGA5	RSSELLKLLANQLEPMTERQMLGINNLQQTSSQQAEDALSQGMESLQQLADTLSSGTL--GSS-SSGNVASYMGQMAMAM
AtTGA6	RSSELLKLLANQLEPMTERQMLGINNLQQTSSQQAEDALSQGMESLQQLADTLSSGTL--GSS-SSGNVASYMGQMAMAM
AtTGA7	RPSELLNVVMPYVEPLTDQQLLEVRLNQLQSSQQAEDALSQGLDKLQQLGVESIAIQIK-----VVESVNHGAPMASAM
AtTGA10	RPSEIIKIVNVNIEPLTEQQIVGIGLQKQSTQEAEEALSQGLEALNQLSDSIVSDSLPPASAPLPPHLSNFMHMSLAL
VvTGA1	RPSELLNVVMPYVEPLTDQQLLEVRLNQLQSSQQAEDALSQGLDKLQQLGVESIAIQIK-----VVESVNHGAPMASAM
VvTGA2	RSSELLKLLANQLEPMTERQMLGINNLQQTSSQQAEDALSQGMESLQQLADTLSSGTL--GSS-SSGNVASYMGQMAMAM
VvTGA3	RSSELLKLLANQLEPMTERQMLGINNLQQTSSQQAEDALSQGMESLQQLADTLSSGTL--GSS-SSGNVASYMGQMAMAM
VvTGA4	RPSELLKVLVPLDPLTDQQLLDVGNLQKSSQQAEDALTQGMKQLQHTLADCVAAAGQ-----LGEGSYIPQLATAL
VvTGA5	RSSELLKLLANQLEPMTERQMLGINNLQQTSSQQAEDALSQGMESLQQLADTLSSGTL--GSS-SSGNVASYMGQMAMAM

AtTGA1	DRLEALVSFVNQADHLRHETLQQMYRILTTRQAARGLLALGEYFQRLRALSSSWATRHREPT
AtTGA2	GKLGTLLEGFIRQADNLRQLTQQLMIRVLTTRQSAARALLAIHDYFSRLRALSSSLWARPPE--
AtTGA3	ENLQALESFVNQADHLRHETLQQMYRILTTRQAARGLLALGEYFQRLRALSSSWATRHREPT
AtTGA4	ERLEALVSFVNQADHLRHETLQQMYRILTTRQAARGLLALGEYFQRLRALSSSWATRHREPT
AtTGA5	GKLGTLLEGFIRQADNLRQLTQQLMIRVLTTRQSAARALLAIHDYFSRLRALSSSLWARPPE--
AtTGA6	GKLGTLLEGFIRQADNLRQLTQQLMIRVLTTRQSAARALLAIHDYFSRLRALSSSLWARPPE--
AtTGA7	ENLQALESFVNQADHLRHETLQQMYRILTTRQAARGLLALGEYFQRLRALSSSWATRHREPT
AtTGA10	NKLSALESFVNQADHLRHETLQQMYRILTTRQAARGLLALGEYFQRLRALSSSWATRHREPT
VvTGA1	EKLDALESFVNQADHLRHETLQQMYRILTTRQAARGLLALGEYFQRLRALSSSWATRHREPT
VvTGA2	GKLGTLLEGFIRQADNLRQLTQQLMIRVLTTRQSAARALLAIHDYFSRLRALSSSLWARPPE--
VvTGA3	GKLGTLLEGFIRQADNLRQLTQQLMIRVLTTRQSAARALLAIHDYFSRLRALSSSLWARPPE--
VvTGA4	EKLDALESFVNQADHLRHETLQQMYRILTTRQAARGLLALGEYFQRLRALSSSWATRHREPT
VvTGA5	GKLGTLLEGFIRQADNLRQLTQQLMIRVLTTRQSAARALLAIHDYFSRLRALSSSLWARPPE--

Figure IV.1 : Alignement des séquences AtTGA et VvTGA

Les lignes pleines et en pointillées indiquent les domaines basique et leucine zipper, respectivement. L'encadré vert indique les cystéines à la position 260 pour AtTGA1. L'encadré rouge indique le résidu à la position 266 pour AtTGA1. Les encadrés gris représentent les leucines conservées en C-terminal. Les traits indiquent les espaces introduits pour faciliter l'alignement.

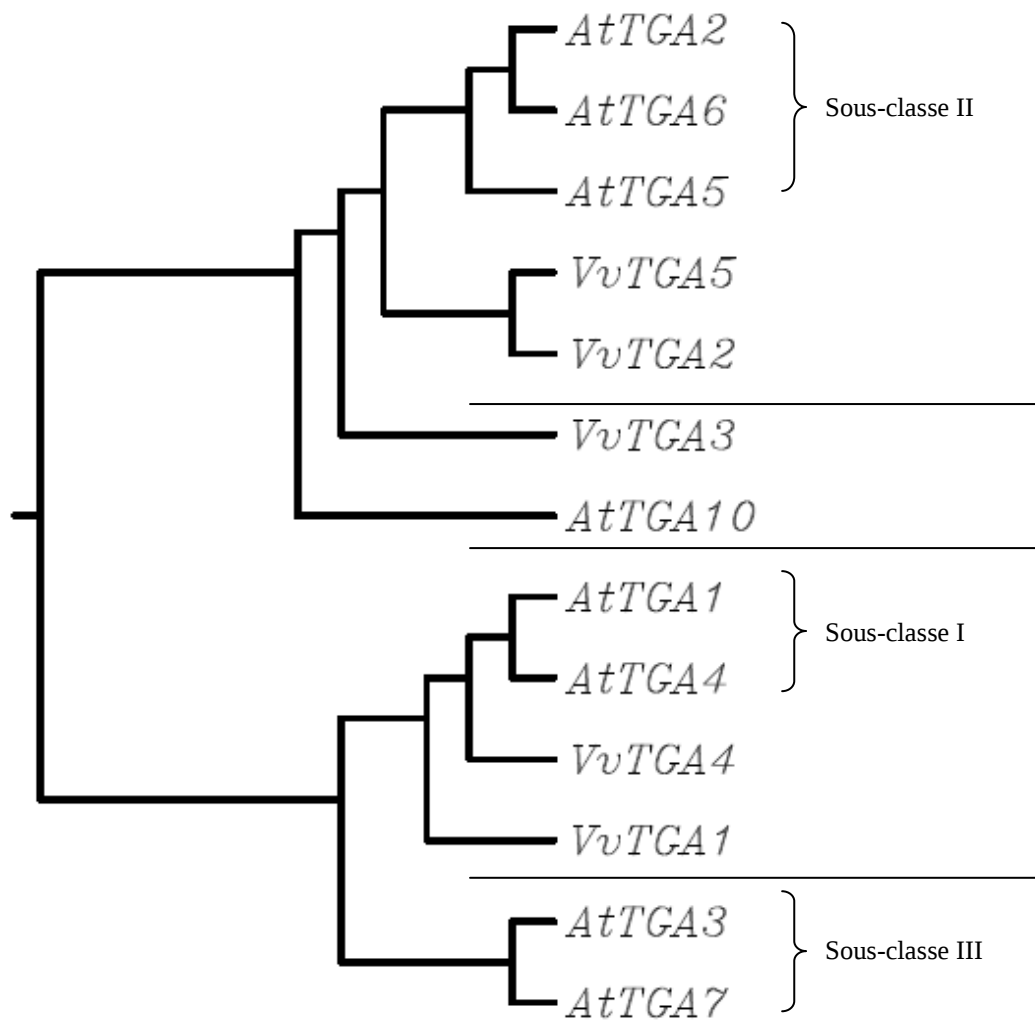


Figure IV.2 : Dendrogramme des facteurs de transcription TGA d'*Arabidopsis* et *Vitis vinifera*

Les membres de la famille TGA d'*Arabidopsis* sont divisés en trois groupes basés sur les similarités de séquence en acides aminés. Nous retrouvons les TGA de *Vitis vinifera* regroupés dans les mêmes groupes que ceux d'*Arabidopsis*.

Enfin, la mutation simultanée de *TGA2*, *TGA5* et *TGA6* engendre la perte de l'expression de *PR-1* induite par le SA et une défaillance dans la mise en place de la SAR (Zhang *et al.*, 2003). Ces mutations compromettant la résistance des plantes abolissent les interactions avec les facteurs TGA dans la levure (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000) ou dans la plante (Subramaniam *et al.*, 2001), ce qui suggère que l'interaction avec ces facteurs de transcription est importante pour la fonction biologique de NPR1.

2. Résultats

2.1. Identification de VvTGA chez la vigne

Grâce à l'analyse des données issues du séquençage du génome de la vigne (Genoscope) nous avons identifié cinq gènes chez la vigne qui ont montré de fortes similarités de séquence avec les facteurs de transcription TGA d'*Arabidopsis*. Les séquences VvTGA présentent toutes les fonctions biologiques des facteurs de transcription TGA décrit chez *Arabidopsis* : la région basique de liaison à l'ADN, la région leucine zipper importante pour la formation des dimères et la région riche en leucine conservées dans l'extrémité C-terminale (Figure IV.1).

La construction d'un arbre phylogénétique regroupant les protéines TGA d'*Arabidopsis thaliana* et de *Vitis vinifera* montre une répartition conservée des différents groupes observés. En effet, VvTGA1 et VvTGA4 sont réunis dans le même groupe que les protéines AtTGA1 et AtTGA4, appartenant à la sous-classe I (Figure IV.2). VvTGA5, VvTGA2 et VvTGA3 forment un groupe distinct avec AtTGA2, AtTGA5 et AtTGA6 appartenant à la sous-classe II bien que VvTGA3 soit phylogénétiquement plus éloigné.

Nous avons voulu observer les interactions entre les deux VvNPR1 et les différents VvTGA. Cependant, n'ayant pas réussi à introduire les plasmides correspondant aux séquences des VvTGA2, VvTGA3, VvTGA5 et VvNPR1.2 ; seules les interactions entre VvNPR1.1 et VvTGA1 ou VvTGA4 ont pu être étudiées. Ces deux VvTGA sont phylogénétiquement plus proches de AtTGA1 et AtTGA4, connus pour être les seuls membres qui n'interagissent pas avec AtNPR1 en système double hybride (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Même si AtTGA1 et AtTGA4 possèdent tous les éléments requis pour l'interaction avec AtNPR1, deux résidus conservés diffèrent des autres TGA. Il s'agit des cystéines 260 et 266 pour AtTGA1 (Figure IV.2). Ces cystéines sont également présentes dans VvTGA1 et VvTGA4.

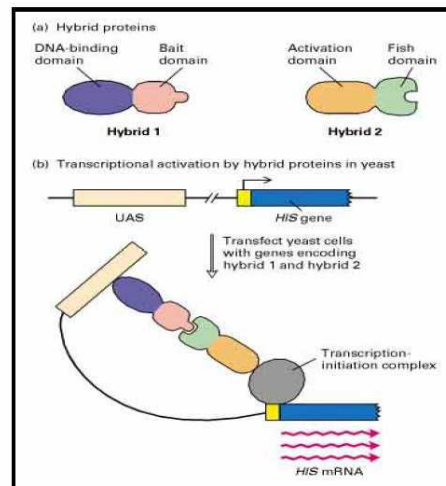


Figure IV.3 : Double hybride pour la détection de l'interaction entre protéines (Fields et Sternglanz, 1994)

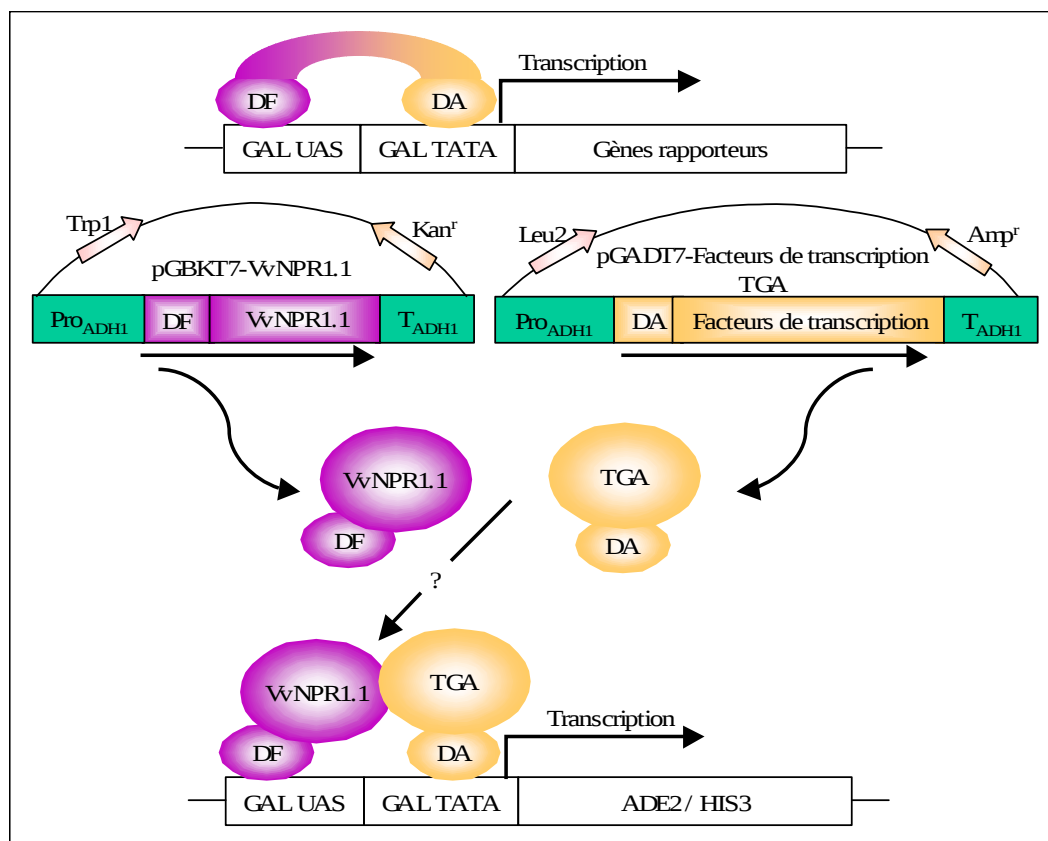


Figure IV.4 : Principe du système double-hybride dans la levure

L'interaction entre deux protéines est mise en évidence par l'activation de la transcription de gènes rapporteurs en aval du promoteur GAL4 grâce au rapprochement du domaine d'activation (DA) et du domaine de fixation à l'ADN (DF) du facteur de transcription GAL4, chaque domaine étant fusionné aux protéines d'intérêt.

GAL UAS (upstream activating sequence) : séquence du promoteur sur laquelle le DF se fixe

GAL TATA : séquence du promoteur contenant la TATA box et sur laquelle le DA se fixe

T_{ADH1} : Termineur de la transcription du gène ADH1

Pro_{ADH1} : Promoteur du gène de l'alcool déshydrogénase-1 (ADH1)

Des études par mutagénèse dirigée montrent que les cystéines 260 et 266 sont cruciales pour les propriétés régulatrices d'AtTGA1 (Despres *et al.*, 2003). La cystéine 260 régulerait les propriétés de liaison de la protéine de telle façon que AtTGA1 et AtTGA4 soient incapables d'interagir avec AtNPR1 dans la levure. Les cystéines possèdent la capacité de former des ponts disulfure réversibles. Ces derniers ont été décrits pour réguler plusieurs procédés cellulaires chez les mammifères. Une mutation de cette cystéine altère la protéine, ce qui apporte la preuve que l'oxydoréduction de ce résidu est importante pour la régulation de ces TGA (Despres *et al.*, 2003).

2.2. Recherche des interactions par la technique du double hybride de VvNPR1.1 avec les VvTGA identifiés

2.2.1. Principe de la technique du double-hybride

La technique du double-hybride dans la levure permet de détecter des interactions spécifiques entre deux protéines *in vivo* (Fields et Song, 1989). Ce procédé est basé sur la capacité du domaine de fixation à l'ADN (DF) et du domaine d'activation de la transcription (DA) du facteur de transcription GAL4 à fonctionner de manière indépendante. Dans le système double-hybride, ces deux domaines sont séparés et chacun est fusionné à une protéine d'intérêt (X et Y). C'est l'éventuelle interaction entre ces protéines X et Y qui permettra de reconstituer un facteur de transcription intact et fonctionnel, initiant ainsi la transcription des gènes rapporteurs HIS3 et ADE2 et se traduisant par la synthèse de l'histidine et de l'adénine, respectivement (Figure IV.3 ; (Fields et Sternglanz, 1994). Ces protéines de fusion sont fortement exprimées sous le contrôle du promoteur constitutif ADH1 et du terminateur ADH1. En plus des protéines-fusion, les plasmides contiennent des gènes de résistance permettant la sélection des clones transformés dans *E. coli* et des gènes de sélection nutritionnel (tels que TRP1 et LEU2 permettant la sélection des levures recombinantes sur un milieu déficient en tryptophane ou en leucine).

Dans ce travail, la séquence codant la protéine VvNPR1.1 a été fusionnée à la séquence DF, alors que les séquences codant les facteurs de transcription VvTGA ont été clonées en fusion avec le domaine DA (Figure IV.4).

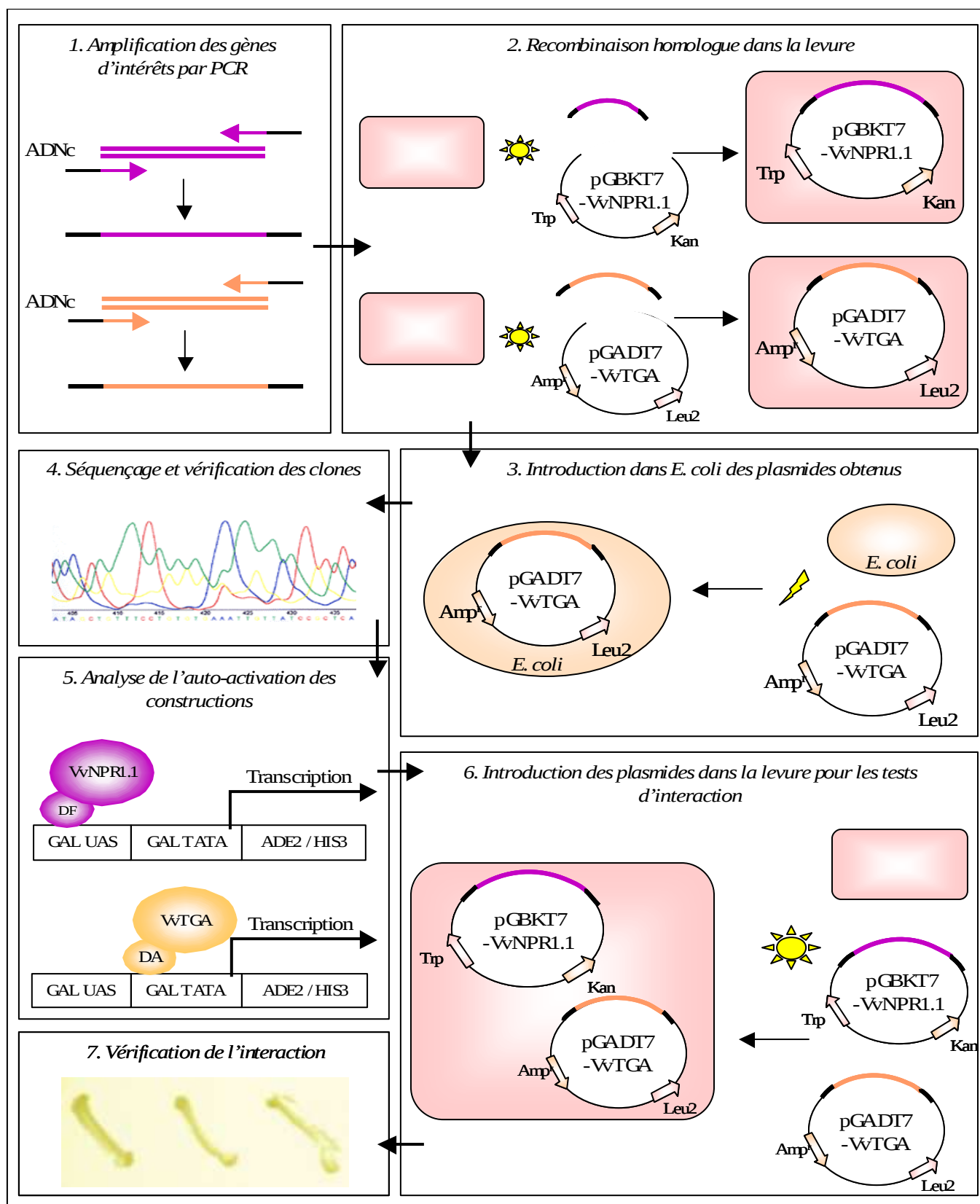


Figure IV.5 : Les différentes étapes de la technique du double-hybride pour tester les interactions entre VvNPR1.1 et les deux TGA.

Les différentes étapes permettant de rechercher les interactions VvNPR1.1 et VvTGA par la technique du double-hybride sont schématisées sur la figure IV.5. Elles consistent à :

- amplifier les gènes d'intérêts par PCR
- introduire dans la levure le plasmide et le produit de PCR de façon à réaliser la recombinaison homologue
- amplifier les clones obtenus dans *E.coli*
- vérifier les clones obtenus par séquençage
- vérifier l'absence d'auto-activation de la transcription des gènes rapporteurs avec VvNPR1.1 et les deux VvTGA
- introduire dans la levure par choc thermique les plasmides nécessaires aux tests d'interaction : pGBKT7-VvNPR1.1 et pGADT7-VvTGA et sélectionner les clones candidats exprimant les deux protéines en cultivant les levures doublement transformées sur milieux sélectifs
- tester l'interaction entre les protéines en étalant les clones ainsi obtenus sur le milieu d'interaction.

2.2.2. Clonage des gènes VvNPR1.1 et VvTGA dans les vecteurs pGBKT7 et pGADT7

2.2.2.1. Recombinaison homologue

La recombinaison homologue est un processus biologique important puisqu'il est le principal mécanisme de réparation de l'ADN : la cassure double-brin. La recombinaison homologue implique l'appariement et l'échange de matériel génétique entre deux molécules d'ADN homologues. Ces protéines, les recombinases, sont présentes dans toutes les espèces, il s'agit de la protéine RecA chez la bactérie *Escherichia coli* et de Rad 51 chez les eucaryotes. La protéine eucaryote Rad 51, a été découverte par analyses génétiques de mutants de *Saccharomyces cerevisiae* déficients en recombinaison homologue et en réparation des cassures double-brin de l'ADN (Bianco *et al.*, 1998). La recombinase effectue plusieurs tâches : elle déroule et étire l'ADN pour permettre l'appariement des trois brins, elle facilite la recherche d'homologie et induit l'échange de brins de manière directionnelle et irréversible (Figure IV.6).

Nous avons utilisé les propriétés de recombinaison homologue chez la levure pour cloner les gènes d'intérêts dans les plasmides pGBKT7 et pGADT7.

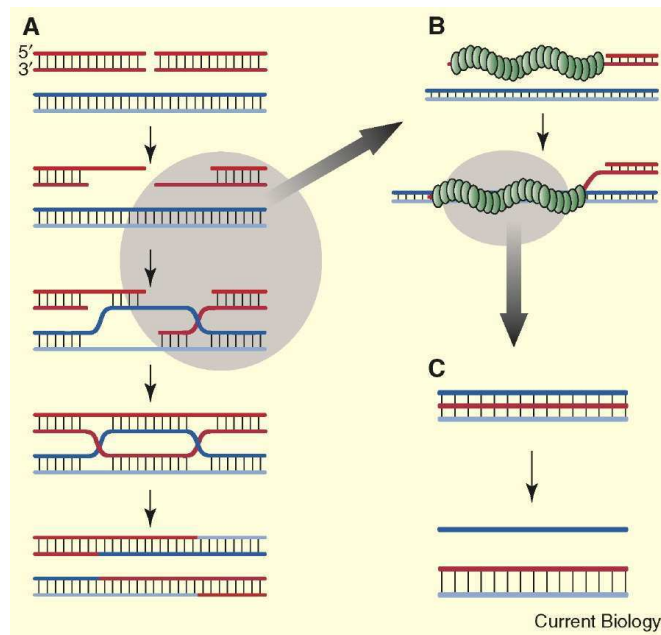


Figure IV.6 : Mécanisme de la recombinaison homologue (d'après Wyman *et al.*, 2004)

(A) Schéma modélisant la réparation de la cassure double-brin d'ADN par recombinaison homologue, illustrée au niveau de l'ADN. Les molécules duplex de l'ADN sont indiquées par des échelles dont les barreaux représentent les paires de bases. Des extrémités 3' simple-brin sont générées sur lesquelles les recombinaisons forment des filaments hélicoïdaux. L'ellipse grise représente la partie du processus qui est montrée plus en détail dans la partie B.

(B) Un filament nucléoprotéique formé sur l'ADN monocaténaire peut reconnaître la séquence homologue sur l'ADN bicaténaire intact résultant en l'appariement de ces deux molécules d'ADN.

(C) L'échange de brins a lieu dans le contexte du filament.

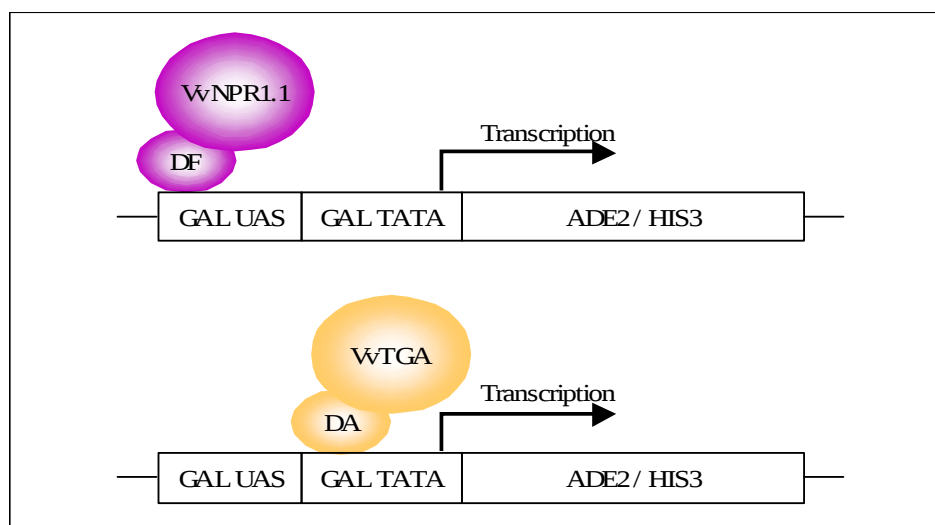


Figure IV.7 : Principe de l'autoactivation de la transcription des gènes rapporteurs dans la levure

2.2.2.2. Construction des souches de levures et des plasmides pour le double hybride

Les constructions ont été obtenues après une réaction de PCR permettant de générer un bord homologue au plasmide utilisé. Chaque couple d'amorces comprend un oligonucléotide externe possédant une queue homologue au plasmide qui ne s'hybride pas à la matrice (gène d'intérêt) et une partie homologue à la matrice qui s'hybride à la matrice. Le principe est fondé sur la recombinaison homologue entre deux ADN exogènes co-transformés dans la levure.

2.2.3. Vérification de l'absence d'auto-activation de la transcription des constructions dans la levure

Avant d'entreprendre les tests d'interaction de VvNPR1.1 avec les deux VvTGA, plusieurs contrôles doivent être conduits et il est nécessaire de s'assurer que les protéines correspondantes n'activent pas seules la transcription des gènes rapporteurs HIS3 et ADE2 (Figure IV.7). Pour vérifier l'absence d'auto-activation, les plasmides sont transformés dans la souche de levure AH109 et les transformants sont étalés sur milieu sélectif SD dépourvu d'histidine (His) ou d'histidine et d'adénine (Ade). Une croissance des levures indiquerait une auto-activation de la transcription des gènes rapporteurs.

Comme le montre le tableau IV.1, les levures transformées avec les plasmides pGADT7-VvTGA1 et pGADT7-VvTGA4, ne poussent ni sur le milieu sans His/Leu, ni sur le milieu sans Ade/His/Leu. Aucune de ces constructions n'active la transcription des gènes rapporteurs. A l'inverse, les levures transformées avec le plasmide pGBKT7-VvNPR1.1 poussent sur le milieu dépourvu en His/Trp, mais non sur le milieu sans Ade/His/Trp. Le milieu sélectif sans adénine et sans histidine pourra donc être utilisé pour les tests d'interaction de VvNPR1.1 avec les VvTGA. Ce test montre qu'il existe une faible autoactivation de la transcription des gènes rapporteurs avec la construction VvNPR1.1, qui n'est cependant pas suffisante pour permettre une croissance des levures sur un milieu dépourvu des deux acides aminés.

		VvNPR1.1		VvTGA1		VvTGA4	
-Trp	+		/		/		/
-Leu	/		+		+		
-Trp/Leu	-		-		-		
-His/Trp	+		/		/		/
-Ade/His/Trp	-		/		/		/
-His/Leu	/		-		-		
-Ade/His/Leu	/		-		-		

Tableau IV.1 : Analyse de l'autoactivation de la transcription des gènes rapporteurs des constructions pGBKT7-VvNPR1.1, pGADT7-VvTGA1 et pGADT7-VvTGA4

-Trp : Milieu dépourvu de tryptophane qui permet de sélectionner les levures transformées avec le plasmide pGBKT7 qui porte le marqueur nutritionnel TRP1.

-Leu : Milieu dépourvu de leucine qui permet de sélectionner les levures transformées avec le plasmide pGADT7 qui porte le marqueur nutritionnel LEU2.

-Trp/Leu : Milieu dépourvu de tryptophane et de leucine qui constitue le témoin négatif car le marqueur nutritionnel TRP ou LEU est porté par le plasmide (pGBKT7 ou pGADT7) qui n'a pas été introduit dans les levures.

-His/Trp : Milieu dépourvu d'histidine et de tryptophane.

-Ade/His/Trp : Milieu dépourvu d'adénine, d'histidine et de tryptophane.

-His/Leu : Milieu dépourvu d'histidine et de leucine.

-Ade/His/Leu : Milieu dépourvu d'adénine, d'histidine et de leucine.

Analyse de la croissance des levures sur milieu sélectif après 3-4 jours à 28°C.

+ : Croissance des levures

- : Absence de croissance des levures

2.2.4. Tests d'interaction de VvNPR1.1 avec VvTGA1 et VvTGA4

Les transformants avec les deux plasmides d'intérêt ont été sélectionnés sur un milieu dépourvu en tryptophane et leucine, puis repiqués directement sur un milieu dépourvu en Ade/His/Trp/Leu, en raison de l'auto-activation de la transcription du gène rapporteur *HIS3* par le plasmide pGBKT7-VvNPR1.1. Une interaction bien étudiée, mais non publiée à ce jour, dans l'équipe de Virologie-vection de l'INRA de Colmar nous a servi de contrôle positif.

Comme le montre le tableau IV.2, les levures doublement transformées avec le plasmide contenant la séquence VvNPR1.1 et le plasmide contenant l'un des deux VvTGA ne poussent pas ou très légèrement (VvTGA1) sur un milieu dépourvu d'Ade/His/Trp/Leu. Les interactions entre VvNPR1.1 et le VvTGA1 ou VvNPR1.1 et le VvTGA4 ne sont donc pas confirmées.

3. Conclusions

Aucune interaction avec VvNPR1.1 n'a donc été révélée. Cette absence peut s'expliquer par le fait que les deux VvTGA sont phylogénétiquement proches de AtTGA1 et AtTGA4, qui n'interagissent pas, ou que très faiblement, avec AtNPR1 (Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Hepworth *et al.*, 2005). De plus, l'interaction de AtNPR1 avec AtTGA1 et AtTGA4 est uniquement observée après un stimulus avec SA alors que les autres TGA interagissent avec AtNPR1 en conditions non induites.

Ces premiers résultats sont corrélés avec l'étude fonctionnelle menée par Gaëlle Le Henanff (Doctorat septembre 2009) qui a démontré que VvNPR1.1 est capable de restaurer l'expression SA-dépendante d'AtPR-1 chez le mutant *npr1.2* ainsi que de compléter les phénotypes du mutant *npr1*. D'après ses conclusions, l'expression SA-dépendante de la protéine AtPR-1 et la tolérance aux fortes concentrations en SA semblent être des fonctions conservées entre *Arabidopsis* et la vigne.

L'ensemble de ces résultats suggère que VvNPR1.1 pourrait être l'orthologue d'AtNPR1.

Des expériences complémentaires en double hybride devront être menées avec les trois autres VvTGA identifiés dans la vigne ainsi qu'avec VvNPR1.2. Plus particulièrement, l'étude des interactions entre VvNPR1.1-VvTGA5 et VvNPR1.1-VvTGA2 devra être menée en priorité car ces deux VvTGA sont phylogénétiquement les plus proches d'AtTGA2, 5 et 6. Or, on sait par ailleurs qu'elles interagissent avec AtNPR1. Par conséquent, l'expérience devra également être réalisée avec AtNPR1 et AtTGA3, ce qui constituera le témoin positif de l'interaction NPR1-TGA.

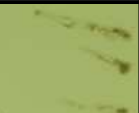
pGADT7- pGBKT7-	VvTGA1	VvTGA4	O
VvNPR1.1			
O			
Témoin +			

Tableau IV.2 : Tests d'interaction entre VvNPR1.1 et les deux VvTGA après étalement sur milieu sélectif sans Ade/His/Trp/Leu.

O : transformation des levures sans pGBKT7 ou sans pGADT7

De plus, les données phylogénétiques indiquent que la protéine VvNPR1.2 appartient à un groupe distinct d'AtNPR1 et les résultats présentés dans les chapitres précédant ainsi que les données obtenues par Gaëlle Le Henanff (2009) suggèrent que VvNPR1.2 pourrait avoir une ou des fonctions différentes de VvNPR1.1 et AtNPR1. Il est possible que VvNPR1.2 n'interagisse pas avec les mêmes facteurs de transcription TGA que ceux avec lesquels AtNPR1 interagit ou bien que VvNPR1.2 ne puisse pas interagir ou interagisse trop faiblement avec les TGA et ainsi, ne soit pas capable de stimuler l'expression des gènes *PR*.

Enfin, il est possible également que VvNPR1.1 et VvNPR1.2 puissent interagir avec d'autres protéines dont des facteurs de transcription différents des TGA. Un crible double-hybride d'une banque d'ADNc de feuilles de vigne infectées permettrait d'identifier de nouveaux partenaires protéiques des deux VvNPR1.

La technique du double-hybride, certes très puissante pour mettre en évidence des interactions protéine-protéine présente cependant quelques limites qui ont été rapportées dans plusieurs travaux scientifiques avec des protéines de différents organismes (Serebriiskii et Golemis, 2001) :

- Une difficulté majeure dans le système double hybride est l'élimination des faux positifs. Il existe des clones qui provoquent l'activation des gènes rapporteurs mais n'ont aucune interaction spécifique avec la protéine appât (Bartel *et al.*, 1993).
- Au contraire, des interactions réelles peuvent ne pas être révélées (faux négatifs).
- De plus, la conformation des protéines fusionnées aux domaines du facteur de transcription peut être affectée et de ce fait, inhiber les interactions.
- Les interactions recherchées peuvent être seulement exprimées en situation d'infection ou de stimulation avec SA (cf AtTGA1 et AtTGA4). Les tests d'interactions réalisés sans stimulus ne permettront pas d'identifier de telles interactions.
- Les protéines n'étant pas dans leur environnement naturel, leur conformation peut être altérée et ainsi empêcher des interactions qui se feraient normalement dans la plante.
- Les résidus glucidiques des protéines exprimées dans les levures sont différents de ceux des protéines végétales. Cette différence peut générer des faux positifs ou des faux négatifs dans la levure (Brooks, 2006).

L'absence d'interactions ou les futures interactions identifiées par le système double-hybride entre VvNPR1.1, VvNPR1.2 et les VvTGA devront être validées par un autre système d'étude des interactions protéine-protéine. Ainsi la technique de la co-immunoprécipitation permet de valider ces interactions. Il s'agit de traduire *in vitro* les VvNPR1 en présence de S³⁵ et de les mettre en présence des facteurs de transcription TGA fusionnés à la GST. La composition du complexe, purifié à l'aide de billes de glutathion sépharose, sera ensuite analysée sur un gel de polyacrylamide. La présence d'une bande radioactive correspondant aux VvNPR1 permettra de vérifier l'interaction. D'autres techniques d'étude des interactions protéine-protéine pourraient également être envisagées, telles que celles basées sur l'émission d'une fluorescence lors du rapprochement de 2 molécules (BRET, FRET ...).

***DISCUSSION GENERALE
ET PERSPECTIVES***

1. Approche développée pour l'étude des gènes *NPR1* chez la vigne

La vigne est une culture d'intérêt agronomique qui est soumise à de nombreux stress biotiques et abiotiques. Ces derniers induisent une baisse de la productivité et de la qualité organoleptique des vins. A l'heure actuelle, la lutte contre ces maladies nécessite l'utilisation de produits phytosanitaires dont l'utilisation est néfaste pour l'environnement et la santé des utilisateurs. Un enjeu à terme est donc de développer des méthodes alternatives à la lutte chimique. Une connaissance détaillée des mécanismes de résistances et de la fonction des gènes impliqués permettrait de stimuler les gènes. En outre, l'opportunité de créer des vignes transformées dont les gènes seraient surexprimés reste envisageable. De cette manière, la résistance de la vigne aux maladies serait augmentée. Au début de mes travaux, les gènes de défense chez la vigne étaient méconnus dans la mesure où le séquençage était disponible qu'à partir du milieu de l'année 2007. Cependant, durant ces dernières années, de nombreux gènes, protéines et d'autres molécules impliqués dans les interactions plantes / pathogènes ont été décrits chez plusieurs plantes modèles et d'intérêts agronomiques (*Arabidopsis*, tabac, tomate, riz). Parmi eux, la protéine codée par le gène *NPR1* joue un rôle clé dans la résistance à large spectre chez les plantes. A la suite d'un stress, la protéine NPR1 est relocalisée vers le noyau et interagit avec des facteurs de transcriptions TGA, assurant ainsi l'expression de protéines PR (Chern *et al.*, 2001; Fitzgerald *et al.*, 2004).

Les objectifs de mon travail de thèse étaient tout d'abord de sélectionner des accessions présentant différents profils de résistance au cours d'interactions avec un agent pathogène virulent. Ensuite, mes travaux de thèse ont eu pour but d'identifier et d'analyser la diversité génétique de potentiels orthologues du gène *NPR1* chez la vigne par une approche gène candidat, enfin de tester l'interaction de la protéine NPR1 avec les facteurs de transcription TGA également identifiés chez la vigne.

2. Validation des accessions de vigne pour l'étude des gènes *NPR1*

Les vignes sont soumises à des stress biotiques auxquels répond une grande variété de comportements caractérisée par les mécanismes de résistance. L'agent pathogène du mildiou, *Plasmopara viticola*, a été privilégié dans cette étude pour des raisons pratiques. En effet, l'équipe Génétique et Amélioration de la Vigne de l'INRA de Colmar bénéficie d'un système performant de notation semi-quantitative OIV 452 pour les tests biologiques au mildiou.

Afin de savoir si les différents niveaux de résistance sont générés par *NPR1* (dans la famille des *Vitaceae*), nous avons tout d'abord sélectionné des accessions représentatives de l'ensemble de la famille des *Vitaceae*. Quinze accessions ont été choisies à partir de la classification des *Vitaceae* (Galet, 1993) et selon leur disponibilité dans la collection ampélographique de l'INRA de Colmar. Nous avons ensuite évalué les différences de résistance à *P. viticola* afin de mettre ces résultats en relation avec la diversité du gène *NPR1* dans la famille des *Vitaceae*. Les accessions sélectionnées présentent une grande diversité de niveau de résistance montrant des mécanismes de résistance probablement différents.

3. Hypothèse évolutive

3.1. Organisation génomique

Une recherche par Blast dans une banque d'ESTs de vignes soumises à un stress abiotique (ESTAP) puis dans la séquence complète du génome de la vigne (Génoscope), nous a permis d'identifier deux gènes *VvNPR1.1* (chromosome 11) et *VvNPR1.2* (chromosome 10) chez la vigne. Ces deux gènes présentent des similarités avec les membres de la famille NPR chez *Arabidopsis*. Il existe également un gène *VvBOP* qui présente de fortes similarités avec *AtNPR5* et *AtNPR6* (*AtBOP1* et *AtBOP2*) impliqués dans le développement floral et foliaire. Nous nous sommes focalisés sur les gènes *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2*.

L'analyse des séquences de *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* révèle des structures types partagées avec les gènes *NPR1* décrits chez les autres plantes. Ces structures incluent deux domaines d'interaction protéine-protéine, le domaine ARD (Ankyrin-Repeat Domain) localisé dans la région centrale de la protéine et le domaine BTB / POZ (Broad complex Tramtrack Bric-à-brac/POx virus and Zinc Finger) en N-terminal (Cao *et al.*, 1997; Ryals *et al.*, 1997; Despres *et al.*, 2003) ainsi qu'un site de localisation nucléaire. Les séquences en acides aminés de *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* montrent 43% d'identité entre elles et *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* montrent respectivement 52% et 37% d'identité avec *AtNPR1*. Une des conséquences de cette conservation est la fonctionnalité attendue des protéines correspondant aux gènes *VvNPR1* tant pour leurs interactions protéine-protéine que pour leur translocation dans le noyau. Cette dernière fonctionnalité a par ailleurs été déjà vérifiée sur les deux gènes *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* par des expériences de surexpression transitoire dans les feuilles de vigne dans le cadre d'une autre thèse de l'équipe (Le Hénanff, 2009).

Les analyses phylogénétiques montrent que les protéines VvNPR1.1, VvNPR1.2 et VvBOP appartiennent à trois sous-groupes distincts qu'on retrouve chez différentes espèces végétales. Au sein du génome des *Vitaceae*, la présence de ces gènes a également été établie. L'analyse comparée du génome de la vigne et de celui d'*Arabidopsis*, du riz et du peuplier a révélé que l'organisation du génome de la vigne semble être le plus proche de celle du génome ancestral des dicotylédones. Ce génome ancestral proviendrait de l'arrangement de trois génomes diploïdes indépendants ancestraux (formation du génome paléo-hexaploïde ancestral) (Jaillon *et al.*, 2007). Les trois sous-groupes mis en évidence lors des analyses phylogénétiques (Figure 2) (Bergeault *et al.*, 2010) et contenant chacun des protéines NPR de différentes espèces suggèrent l'existence de ces trois gènes ancestraux avant la divergence des genres *Arabidopsis* et *Vitis*.

3.2. Diversité de séquence des gènes VvNPR1.1 et VvNPR1.2

Mon travail de thèse s'est, dans un premier temps, focalisé sur l'analyse du polymorphisme des gènes VvNPR au sein de la famille des *Vitaceae*. Une analyse de la diversité des séquences introniques et exoniques montre qu'ils sont soumis à de fortes pressions de sélection. Ces résultats suggèrent donc que la tolérance au mildiou et aux agents pathogènes en générale, n'est pas liée à une différence de fonctionnalité des protéines NPR dans la famille des *Vitaceae*. De plus, malgré le fait que les introns furent découverts il y a près de 30 ans, leur origine et leur fonction nous échappent encore. La plupart des introns n'ont aucune fonction connue et semblent être des morceaux inutiles de gènes qui ralentissent simplement le processus de transcription. Cependant, certains introns jouent un rôle dans la régulation transcriptionnelle et des événements d'épissage alternatif seraient impossibles sans les introns. De plus, leur niveau de conservation inter espèces varie selon leur position intra ou inter génique, suggérant qu'il existe des pressions de sélection liées à des fonctions biologiques encore inconnues (Majewski et Ott, 2002; Gaffney et Keightley, 2006). Il est donc possible que les introns des gènes VvNPR1.1 et VvNPR1.2 se trouvent dans ce cas de figure.

Un codon stop prématuré dans la partie centrale de la protéine NPR1.1 a été identifié dans certaines accessions. La protéine tronquée qui en résulte semble fonctionnelle puisque tous les domaines d'interaction protéine-protéine sont présents.

Le domaine ARD d'AtNPR1 est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec les membres de la famille des facteurs de transcription TGA bien que les interactions de hautes affinités demandent également la partie N-terminale de la protéine (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000).

De plus, l'étude *in silico* des promoteurs des deux gènes *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* montre qu'ils devraient être fonctionnels mais des analyses plus détaillées devront être effectuées. La capacité des promoteurs à exprimer le gène de la β -glucuronidase (GUS) par exemple ou un autre gène rapporteur facilement détectable par la GFP (Green Fluorescence Protein) pourrait être étudiée. Des fragments ou les promoteurs entiers pourront être transformés dans les plantes exposées à divers agents pathogènes et éliciteurs. Ces différentes expériences permettront de mettre en évidence les différentes conditions environnementales qui affectent l'expression des deux gènes. L'étude *in silico* des promoteurs montre également que les régions promotrices sont très variables entre les deux gènes. En effet, les promoteurs des gènes *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* présentent moins de 10% d'identité entre eux et avec la région promotrice d'*AtNPR1*. Il serait intéressant d'analyser le polymorphisme de ces deux promoteurs dans les accessions précédemment utilisées. Les niveaux de résistances pourront également être reliés aux niveaux d'expression des gènes *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* dans les accessions utilisées.

Enfin, le caractère générique du rôle des gènes *NPR1* dans les interactions plante / agents pathogènes offre l'opportunité de comparer le polymorphisme et l'évolution moléculaire de ces gènes chez différentes familles végétales (*Musaceae*, *Brassicaceae* par exemple). Il pourrait être utile d'étudier l'évolution moléculaire de ces gènes chez d'autres plantes ayant des intérêts agronomiques. Celles-ci ont connu des changements qui leur sont propres au gré des sélections humaines et des modes de reproduction spécifiques.

3.3. Co évolution entre les gènes *VvNPR* et les agents pathogènes ?

Les gènes *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* semblent être soumis à de fortes pressions de sélection et être ainsi maintenus au cours de l'évolution. Une hypothèse est que l'éloignement phylogénétique de ces gènes se traduirait par le fait que chaque membre aurait acquis une spécialisation fonctionnelle. La pression de sélection purificatrice détectée sur ces deux gènes dans la famille des *Vitaceae* argumente en faveur de cette hypothèse. Généralement, les gènes de défense ont tendance à maintenir un bas niveau de diversité mais plusieurs auteurs relatent une sélection balancée pour *AtNPR1* (Bakker *et al.*, 2008; Caldwell et Michelmore, 2009).

Nos résultats montrent que *NPR1.1* et *NPR1.2* sont fortement conservés et ne varient pas beaucoup d'une accession à l'autre, indiquant que les mutations ont probablement des conséquences délétères.

Il est cependant parfois difficile d'établir un modèle général d'évolution des gènes de résistance chez les plantes. Un facteur important est le mode de reconnaissance, direct ou indirect, entre la protéine de résistance et la protéine d'avirulence (Dodds *et al.*, 2006; McDowell et Simon, 2006). Dans le cas des reconnaissances directes, une coévolution de type "course aux armements" est retrouvée, avec le maintien d'une forte diversité allélique pour le gène de résistance et le gène d'avirulence.

A l'inverse, dans le cas des reconnaissances indirectes faisant intervenir une protéine de garde, les gènes *R* présentent une faible diversité allélique. Si *AtNPR1* semble être sous l'influence d'une sélection balancée, mes résultats sont en faveur d'une sélection purificatrice pour les gènes *VvNPR1*. Néanmoins, il est tout à fait possible que les gènes *NPR1* soient soumis aux même processus évolutif que *Pto*. En effet, *Pto* semble être influencée à la fois par de la sélection purificatrice et de la sélection balancée selon une périodisation qui lui est propre (Rose *et al.*, 2007). D'après l'auteur, des périodes de pression de sélection forte de l'agent pathogène s'exercent sur *Pto* et s'alternent avec des périodes de relâchement de la contrainte sur ce gène. Ceci serait dû au fait que les agents pathogènes ne possèdent pas les gènes *Avr* adéquats, ce qui favorise l'accumulation des substitutions neutres ou délétères.

4. Interaction avec les facteurs de transcription TGA

Après l'identification des facteurs TGA comme protéines capables de se lier à l'élément *as-1* de l'ADN en 1989 (Katagiri *et al.*, 1989; Lamb *et al.*, 1989), beaucoup de recherches se sont concentrées sur la détermination de leur fonction dans la plante. Une avancée est réalisée dans la fin des années 1990, lorsqu'il a été trouvé que les facteurs de transcription TGA interagissent avec la protéine NPR1 (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Il est maintenant établi que NPR1 est un régulateur important de la fonction des facteurs de transcription TGA *in vitro* et *in planta* (Despres *et al.*, 2000; Fan et Dong, 2002; Johnson *et al.*, 2003). Une étude avec des plantes mutantes dans les trois gènes du groupe II des facteurs TGA d'*Arabidopsis* (TGA2, TGA5, TGA6) a confirmé la nécessité de ces facteurs de transcription pour déclencher l'expression de PR-1 par l'acide salicylique ainsi que par la SAR (Zhang *et al.*, 2003).

Si le rôle de *NPR1* et des facteurs TGA dans la résistance aux maladies chez *Arabidopsis thaliana*, ou chez d'autres plantes mono ou dicotylédones, a été maintes fois mis en lumière, le rôle de ces protéines dans la vigne reste encore mal défini.

La caractérisation de la fonction des deux *VvNPR1* a donc été entreprise par différentes approches. Grâce au séquençage du génome de la vigne, nous avons identifié cinq gènes *VvTGA*. Les analyses des séquences protéiques montrent que ces gènes sont répartis dans les mêmes groupes que ceux d'*Arabidopsis*. Ils possèdent, de plus, toutes les fonctions biologiques des facteurs de transcription TGA d'*Arabidopsis*.

Seules les interactions entre *VvNPR1.1* et *VvTGA1* ou *VvTGA4* ont pu être étudiées. Ces deux *VvTGA* sont phylogénétiquement plus proches d'*AtTGA1* et *AtTGA4*, connus pour être les seuls membres pour ne pas interagir avec *AtNPR1* en système double hybride (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Chez *Arabidopsis*, *NPR1* n'interagit pas ou très faiblement avec les facteurs *TGA1* et *TGA4* dans la levure (Zhang *et al.*, 1999; Despres *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Hepworth *et al.*, 2005). Cependant, on observe dans des feuilles traitées avec le SA une interaction significative entre *NPR1* et *TGA1*. Au contraire, seule une interaction très faible peut être détectée dans celles qui ne sont pas traitées (Despres *et al.*, 2003). Par conséquent, il est possible que nous ayons le même phénomène pour *VvTGA1* et *VvTGA4*.

D'autre part, des études par mutagenèse dirigée montrent que les cystéines 260 et 266 sont cruciales pour les propriétés régulatrices d'*AtTGA1* (Despres *et al.*, 2003). La cystéine 260 régulerait les propriétés de liaison de la protéine de telle façon que *AtTGA1* et *AtTGA4* soient incapables d'interagir avec *AtNPR1* dans la levure. Ces deux cystéines sont présentes dans *VvTGA4* mais *VvTGA1* possède uniquement la cystéine 260. Des études par mutagenèse dirigée permettraient d'étudier le rôle de ces deux cystéines pour *VvTGA1* et *VvTGA4* et de vérifier si la capacité de ces protéines à interagir avec *NPR1* est dépendante des cystéines.

Enfin, la régulation redox à travers la formation de liaisons disulfures entre les cystéines ne doit pas être un phénomène limité à *TGA1* et *TGA4*. Chaque sous-classe de la famille des TGA possède des cystéines conservées caractéristiques. Les membres de la sous-classe I contiennent trois cystéines conservées alors que les membres de la sous-classe II et III n'en possèdent qu'une seule. Ainsi, leur conservation suggère qu'elles soient consubstantielles à la fonction de la protéine. La régulation des facteurs TGA par des conditions redox n'exclut pas la possibilité que celle-ci puisse différer aussi bien entre les sous-classes qu'entre les facteurs TGA de chaque groupe.

5. Interaction de NPR1 avec d'autres facteurs de transcription

Il est également possible que VvNPR1.1 et VvNPR1.2 puissent interagir avec d'autres protéines dont des facteurs de transcription différents des TGA. Un crible double-hybride d'une banque d'ADNc de feuilles de vigne infectées permettrait d'identifier de nouveaux partenaires protéiques des deux VvNPR1.

Des études chez *Arabidopsis* ont indiqué la présence de plusieurs protéines interagissant avec AtNPR1 appelées NIMINs, qui semblent être des régulateurs négatifs de la SAR (Weigel *et al.*, 2005). Il est tout à fait possible que le génome des *Vitaceae* contienne également des orthologues de ces protéines NIMIN et qui interagiraient avec VvNPR1.1 ou VvNPR1.2.

Enfin, il a été montré que les mutants *npr1* accumulent plus d'acide salicylique endogène que les plantes sauvages, suggérant qu'AtNPR1 pourrait freiner la synthèse de SA (Delaney, 1995). Cette fonction doit être due à l'activité des facteurs de transcription WRKY 70 et WRKY 54, dont l'expression est sous la dépendance d'AtNPR1 (Wang *et al.*, 2006).

6. Caractérisation fonctionnelle de VvNPR1.1 et VvNPR1.2

Il est démontré qu'en conditions non induites, AtNPR1 est présent sous forme d'oligomères qui sont formés par des liaisons disulfures (Mou *et al.*, 2003). La localisation nucléaire d'AtNPR1 est liée à la réduction de deux cystéines sur les dix cystéines conservées (C82 et C216) et exige également le site de localisation nucléaire (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003). L'analyse de *NPR1.1* dans la famille des *Vitaceae* montre que toutes les accessions étudiées possèdent huit des dix cystéines conservées et notamment les deux cystéines (C82 et C216) essentielles pour la formation d'oligomères (Mou *et al.*, 2003). En ce qui concerne *NPR1.2*, seules cinq cystéines sur dix sont présentes dans toutes les accessions étudiées au sein de la famille des *Vitaceae*. L'absence de la cystéine C216 suggère également que la protéine NPR1.2 est régulée différemment. Il serait donc intéressant d'ajouter ou de supprimer ces cystéines importantes par mutagenèse dirigée dans les deux gènes afin d'étudier leurs incidences au niveau fonctionnel.

D'autre part, une étude de caractérisation fonctionnelle pour examiner le rôle des deux gènes dans la résistance aux maladies a fait l'objet d'une publication de notre laboratoire (Le Henanff *et al.*, 2009). Des expériences de surexpression transitoire dans les feuilles de vigne ont mis en évidence que VvNPR1.1 et VvNPR1.2 étaient localisées dans le noyau.

La surexpression des gènes *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* est capable de restaurer la SAR et la résistance à *Pseudomonas syringae* pathovar *maculicola* ES4326. Des expériences de surexpression transitoire des protéines *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* permettent de stimuler l'expression de plusieurs gènes *PR*. Dans cette étude, *VvNPR1.1* restaure le développement des mutants *npr1* d'*Arabidopsis*, contrairement à *VvNPR1.2*. Il est possible que la séquence de *VvNPR1.2*, trop éloignée de celle d'*AtNPR1*, indique qu'il s'agisse d'un régulateur négatif des réponses de défense à l'image d'*AtNPR3* et *AtNPR4* (Zhang *et al.*, 2006).

De plus, il est maintenant évident que *NPR1* est également impliquée dans un carrefour de communications entre les voies de signalisation dépendantes de SA et de JA (Pieterse et Van Loon, 2004). Les agents pathogènes nécrotrophes élicitent les voies dépendantes du JA et de l'éthylène alors que les pathogènes biotrophes élicitent les voies dépendantes du SA (Pieterse et van Loon, 1999; Thaler *et al.*, 2004). Chez *Arabidopsis thaliana*, la résistance à *Fusarium oxysporum* requiert en plus des voies de signalisation de l'éthylène, du JA, de SA et implique également le gène *NPR1* (Berrocal-Lobo et Molina, 2004). Les différentes voies de signalisation relayées par les gènes *VvNPR1* devront donc être mieux caractérisées. Il s'agit de déterminer si *VvNPR1.1* est sensible aux agents pathogènes nécrotrophes tandis que *VvNPR1.2* serait sensible vis-à-vis des agents pathogènes biotrophes ; ou bien inversement. La fonction d'un gène dépend donc étroitement de son environnement génétique, en particulier des relations qui peuvent avoir lieu entre le gène étudié et les autres gènes du génome. Une étude en microarrays est une première méthode permettant de montrer les différents réseaux qui agissent au sein des gènes et surtout lorsque les résistances sont complexes. Cette expérience pourrait se faire à partir d'ARN totaux extraits de feuilles de vigne surexprimant transitoirement les *VvNPR1*.

Un codon stop prématuré dans la partie centrale de la protéine *NPR1.1* a été identifié dans plusieurs accessions. La protéine tronquée qui en résulte présente tous les domaines d'interaction protéine-protéine. Ces données ne sont cependant pas suffisantes et l'expression du gène ainsi que la localisation cellulaire de la protéine reste à déterminer. Pour cela, plusieurs expériences peuvent être envisagées. Tout d'abord, le profil d'expression du gène *VvNPR1.1* tronqué peut être évalué après un traitement par du BTH, un analogue du SA. Si l'expression du gène est validée, des expériences de localisation intracellulaire pourront être réalisées par fusion avec de la GFP des séquences codantes et par surexpression transitoire dans *N. benthamiana*. La fonction de la protéine peut ensuite être étudiée par des expériences de surexpression transitoire chez *N. benthamiana* ou la vigne.

Enfin, des expériences de complémentation du mutant *npr1* d'*Arabidopsis* pourront être entrepris par transformation stable. Tous les résultats pourront alors être confrontés à ceux obtenus par Gaëlle Le Henanff au cours de sa thèse (Le Hénanff, 2009) pour le gène *VvNPR1.1*. Des expériences d'interactions protéine-protéines dans la levure pourront également être envisagées.

Afin de mieux comprendre le rôle de ces différentes protéines chez la vigne, la méthode d'extinction de gène par VIGS (Virus-Induced Gene Silencing) peut également être envisagée. L'utilisation du VIGS affecte l'expression de gènes d'intérêt dans un tissu spécifique à un stade de développement choisi sans faire appel à un promoteur spécifique. Des résultats intéressants ont déjà été obtenus par cette technique. Le rôle de *NbNPR1* et de *LeNPR1* a été mis en évidence par VIGS (Liu *et al.*, 2002; Ekengren *et al.*, 2003). Malgré le faible développement d'outils efficaces pour l'analyse fonctionnelle de la vigne, une méthode de VIGS applicable à la vigne a été récemment développée (Muruganantham *et al.*, 2009). Cette méthodologie peut être utilisée, préalablement aux transformations stables puisque la surexpression stable des gènes chez la vigne reste difficile à réaliser.

7. Contribution de l'étude pour la résistance face aux agents pathogènes chez la vigne

L'apparition de souches résistantes chez *Botrytis cinerea* et le mildiou ainsi qu'une prise de conscience accrue de l'environnement ont fait naître, au cours des dernières décennies, le besoin de stratégies alternatives qui pourraient conduire à une réduction des traitements antifongiques très importants chaque année. Diverses possibilités de stratégie alternative visant non pas à s'attaquer au champignon lui-même mais à aider la plante à se défendre contre l'agresseur sont envisagées.

Une possibilité consiste à modifier génétiquement les plantes en exprimant des gènes de défense issus d'autres organismes ou en sur-exprimant les gènes de défenses déjà existants (Cornelissen et Melchers, 1993 ; Shah, 1997 ; Punja, 2001 ; Gilbert *et al.*, 2006). La surexpression stable de *VvNPR1.1* et *VvNPR1.2* s'inscrit entièrement dans cette dernière perspective.

Les protéines VvNPR1 que nous avons identifiées induisent la synthèse de protéines PR dans différents systèmes. Nous ne savons toutefois pas si ces protéines PR sont efficaces dans la lutte contre les agents pathogènes de la vigne. Par ailleurs, VvNPR1.2 semble avoir des effets opposés à ceux d'AtNPR3 et AtNPR4 dont elle est plus proche. Ces données montrent que les familles NPR de la vigne et d'*Arabidopsis* pourraient être organisées différemment et jouer des rôles différents chez ces deux espèces végétales. Ainsi, une étude plus approfondie et en système homologue de la fonction de VvNPR1, apparaît comme une suite logique de mon travail de thèse.

***MATERIELS
ET METHODES***

1. Matériels biologiques

1.1. Matériel végétal

L'échantillon est constitué de 15 accessions : *Ampelopsis japonica*, *Muscadinia rotundifolia* cv. Carlos, *Pathenocissus quinquefolia*, cinq *Vitis* Américains (*arizonica*, *labrusca* Isabelle, *rupestris* du Lot, *aestivalis* et *cinerea*), six cultivars *Vitis vinifera* (Gouais blancs, Muscat reine des vignes, Cabernet Sauvignon clone 169, Riesling clone 49, Pinot noir clone 162, Gewurztraminer clone 47) et *V. vinifera* lignée 40024 [(dérivé du Pinot noir et multiplié par autofécondation successives (homozygote à environ 93%) (Bronner et Oliveira, 1991; Jaillon *et al.*, 2007)].

1.2. Souche de bactéries

La souche DH5 α dérivant d'*Escherichia coli* [*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (*r_k*-*m_k*⁺), *relA1*, *supE44*, Δ (*lac-proAB*), (*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI^qZ* Δ M15)], a été utilisée pour l'amplification des plasmides lors des clonages de fragments PCR.

Sa culture est réalisée à 37°C, dans un milieu LB (10 g.l⁻¹ de NaCl, 10 g.l⁻¹ de Bactotryptone, 5 g.l⁻¹ d'extrait de levure, 20 g.l⁻¹ d'agar) à pH 7,5, additionné d'ampicilline (50 μ g.ml⁻¹ final).

1.3. Souche de levures

La souche de levure AH109 utilisée dans la technique du double-hybride, dérive de la souche PJ69-2A de *Saccharomyces cerevisiae*. Ces levures ont été génétiquement manipulées de manière à s'adapter efficacement au système double-hybride. Elles sont auxotrophes pour la leucine et le tryptophane. De plus, elles diminuent le risque de faux positifs, lors des tests de double-hybride, grâce à un système de trois gènes rapporteurs ADE2, HIS3 et lacZ (ou MEL1). Ces gènes sont placés sous le contrôle de deux signaux de transcription (GAL4_{UAS} et GAL4_{TATA}). Dans notre système double-hybride, nous utilisons uniquement les deux gènes rapporteurs ADE2 et HIS3 qui synthétisent des enzymes intervenant respectivement dans les voies de synthèse de l'adénine et de l'histidine.

1.4. *Plasmopara viticola*

Plasmopara viticola nous a été fourni par le Dr Sabine Wiedemann-Merdinoglu (INRA Colmar). *Plasmopara viticola* a été multiplié sur du tissu végétal vivant par un repiquage tous les 7 jours sur un cépage sensible (Muscat ottonel ou Chardonnay). Des feuilles infectées ont été placées dans une bouteille contenant de l'eau stérile et agitée vigoureusement. Cette étape permet la récupération des spores de *P. viticola*.

1.5. Vecteurs de clonage et d'expression

1.5.1. Vecteur de clonage : pCR2.1 (Invitrogen)

Le plasmide pCR2.1 (annexe 2) possède deux marqueurs de résistance à des antibiotiques, l'ampicilline et la kanamycine ; il est ouvert au niveau d'un troisième marqueur de sélection, correspondant à un gène codant pour la partie N-terminale de la β -galactosidase (la partie C-terminale étant codée par le génome de la bactérie transformée). Ce gène sera muté lors de l'insertion du produit de PCR, empêchant ainsi la production de la β -galactosidase, et donc la dégradation de son substrat, le X-Gal. Ce dernier est introduit dans le milieu de culture et la coloration des colonies en bleu indique un gène de la β -galactosidase intact. Le site d'insertion est entouré de deux sites de restriction EcoRI, permettant la libération de l'insert, effectué lors de la dernière vérification avant l'envoi au séquençage.

Les fragments des gènes VvNPR ont été clonés dans le vecteur pCR2.1 à l'aide du kit Original TA Cloning® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Le vecteur n'utilise pas de site de restriction pour insérer un ADN hétérologue mais une simple thymine qui s'associe avec l'adénine présente aux extrémités des fragments produits lors d'une PCR ; il faut donc ou avoir une PCR « fraîche » suivie d'une élongation normale ou réaliser une élongation (1h à 72°C, avec de l'ATP uniquement).

1.5.2. Vecteurs double hybride : pGBKT7 et pGADT7 (Clontech)

Dans le système double-hybride, les vecteurs, pGBKT7 et pGADT7 (annexes 3 et 4) sont utilisés pour exprimer fortement les protéines de fusion sous le contrôle du promoteur constitutif ADH1 et du terminateur ADH1. Ces vecteurs sont des plasmides navettes *E. coli* / *S. cerevisiae* c'est-à-dire qu'ils peuvent être utilisés chez les deux types d'organismes. Les plasmides navettes se répliquent de façon autonome chez *E. coli* et chez *S. cerevisiae* à partir des origines de répllication des plasmides pUC et 2 μ respectivement.

Dans le premier cas, le vecteur sera présent en grand nombre de copies (20 à 50 copies par cellule), tandis que dans le second, le nombre de copies sera réduit (1 à 3 par cellule).

Le pGBKT7 permet l'expression d'une protéine de fusion entre la protéine d'intérêt et le domaine de fixation à l'ADN (DF) du facteur de transcription GAL4 qui correspond aux 147 premiers acides aminés de la protéine. Ce plasmide possède également l'épitope c-Myc permettant d'étiqueter les protéines de fusion, un gène de résistance à la kanamycine pour la sélection des clones transformés d'*E. coli* et le gène de sélection nutritionnel *TRP1* permettant la sélection des levures recombinantes sur un milieu déficient en tryptophane.

Le plasmide pGADT7 permet l'expression de protéines fusionnées au domaine d'activation du facteur de transcription GAL4 (DA) correspondant aux acides aminés 768 à 881 de la protéine. Le pGADT7 possède un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des colonies recombinantes chez *E. coli* et le marqueur nutritionnel *LEU2* qui permet aux levures auxotrophes portant le plasmide de survivre dans un milieu déficient en leucine.

On notera que les acides aminés 148 à 767 du GAL4 ne sont pas nécessaires à l'initiation de la transcription.

Le plasmide pGBKT7 a servi à l'expression des protéines VvNPR et le plasmide pGADT7 à celles des facteurs de transcription (TGA).

1.6. Oligonucléotides

Les différentes séquences qui ont été utilisées dans ce travail proviennent principalement des deux génomes séquencés de la vigne : consortium « International Grape Genome Program » site du Génoscope (http://www.cns.fr/externe/English/corps_anglais.html) et le site de « Istituto Agrario San Michele all'Adige » (<http://www.ismaa.it/>) ainsi que de différentes bases de données accessibles sur Internet, GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), ESTAP (<http://staff.vbi.vt.edu/estap/index.shtml>).

Les recherches de séquences par mots clefs ont également été réalisées.

2. Méthodes

2.1. Extraction des acides nucléiques

2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

Les extractions sont réalisées sur 80 mg de feuilles de vignes finement broyées dans l'azote liquide. La qualité du broyage est un élément déterminant de l'efficacité d'extraction. Un traitement à la RNase permet de dégrader les ARN. L'extraction est ensuite réalisée à l'aide du kit « DNeasy® Plant Mini Kit » (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant. L'ADN génomique est ensuite conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

2.1.2. Extraction d'ARN

Environ 300 mg de feuilles sont broyées en présence d'azote liquide et 130 mg de broyat sont prélevés pour servir à l'extraction des ARN totaux en utilisant le kit commercialisé par QIAGEN « RNeasy Plant Mini Kit ». Le kit a été modifié pour l'extraction d'ARN totaux de *Vitis vinifera*. Nous avons adapté le tampon de lyse fourni par QIAGEN à cause des composés phénoliques très présents dans la vigne et qui interagissent avec les acides nucléiques : 2,5% (p/v) de PVP 40 et 1% (v/v) de β -mercaptoéthanol sont ajoutés au tampon de lyse du kit et 600 μ l de ce nouveau tampon sont ajoutés à 50 mg de tissus broyés. Cette solution est ensuite mélangée puis 60 μ l de sarkosyl 20% sont ajoutés. L'échantillon est alors chauffé à 70°C pendant 10 minutes. Après l'étape de lyse, le reste de la procédure a été réalisé selon les recommandations du fabricant. L'ARN est ensuite conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

2.2. Clonage de fragments d'ADN dans les vecteurs

2.2.1. PCR

La technique de PCR permet l'amplification *in vitro* des fragments d'ADN présents en très faible quantité de façon exponentielle par l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable isolée de la bactérie *Thermophilus aquaticus* (Taq polymérase).

Produits	Concentrations
Tampon PCR 10X	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	200 µM
Oligonucléotide sens	200 nM
Oligonucléotide anti-sens	200 nM
Taq polymérase	1,5 U
ADN	10 ng

Tableau M.1 : Conditions générales d'amplification par la technique de PCR

Utilisation	Gene	Sens (5'→3')	Anti-sens (5'→3')
Exons	<i>VvNPR1.1</i>	ATG GAC TAC AGA GCT GCT C	CTG ATA AAG GCC GAC CAA T
		AGA CGC CTG ATG GAC ATT C	CTC TAT TTT CCT TGA GGT ACA ACA G
		TTG GAC TAG CAA AAC TTC TAT TCC	CAG TTT TGG ACA GTG CTC TTA GCC
		TGG ACC TTG GGA AAC GCT TTT	TTA CTT CTT GCA AGA GAG TCT A
	<i>VvNPR1.2</i>	ATG GCC AAT TCA GCT GAG C	CTG AAA AAG TGA GAC CAG CTC TGG TA
		CGG CGT CTT ACC AAC T	CTC TAT TTT CCA GGT ACA G
		TGG CAT TTG CAC GAT TAT TCT TCC	CTG TTT TCA CAA GGG CAT TCA TCC TTG AAC G
		TGG AGA TGG GTC GAC GC	TCA TAA TTT TCT AGC CTT GTG AC
	<i>VvNPR1.1</i>	GGC GTT TTT TTA TTC TCT TTC CCC	CAT AAC ACG ACA GTA GAT GAT A
		GGA ATT TGG GTT TTT GTT TTG GAA TGT C	GCA CAA AAA TGT TAA AAT CAA TAC C
		GGG AGG CTT CGT TTT CTC TTG C	CAT CAA ACT CAA CCC AAC AAA CC
		GAA TCA TTT GAT GTT ATG CAT A	CAG TGG CAA AAG ATG CAG TT
Introns + Exons	<i>VvNPR1.2</i>	GGC GTA ATT CAC TTT GGT TGG TTG	CCC ATC TAT TGG TTG CAA GTC ACC
		GGG GAA ACT TGT GCT TGC TGC AAT TTT TAT C	GGG AGA TCT AAA CTT TTT CCC AAG GC
		GAT TTT TCC TCA TAT TTG CAT	TCA TAA ATT GTC ATT AGC GTG GGA
		GAG AAC AAA CAT GTA AGT TG	GCC CCC AAA TTA AAC AGT TTT AC
		TCA TAG GAA TGA AAA TCA TAA ATG	AAT CAT CGA GGA AAA GTC TGA CAA GAC
		ou	
		CTT TCA AAA GAG CCT TGC TCA TTA	
		GAA AAA TTA AAT CAA TAA TGC AG	TCT GCA GTA AAT CAC CTC TAT TTT CCA G
	<i>VvNPR1.1</i>	GCA AAA ATG GAA CAG GGG CAG GAA A	ATG GAA ACA GGG GAA TTC AAG AAA TG
		CCT TGT GAG ATT TGT ATG AC	CAA CAC TAG CAT TTA GGT TTG ATC
		ATG ATA TTG TGA TTG TGA TGG A	CCA ACC ACA AAA CTA AAA ATA AGT C
		GGA CCT TAA AAA GTT AAA ACA	TGC TTT TAC AAA CAA GGG CCA G
	<i>VvTGA1</i>	CCA GTG AAT TCC ACC CGG GTG GGC ATC	ATC TGC AGC TCG AGC TCG ATG GAT
		GAT TAA TGA GCT CTT CAT CAA CTC AAT TTG C	CCA CTA GGC AGG CTC ACG GGG A
	<i>VvTGA4</i>	TGA ATT CCA CCC GGG TGG GCA TCG ATT	ATT CAT CTG CAG CTC GAG CTC GAT GGA TCC ACT ATT
		AAT GAA CTC TTC ATC CAC TCA CTT TGT C	CAA CTA AAT TAC CTT GTG AAA TAA TAC AA
Double hybride	<i>VvNPR1.1</i>	CCA TGG AGG CCG AAT TCC CGG GGA TCC	CCC CAA GGG GTT ATG CTA GTT ATG CGG CCG CTG CAG
		TTA TGG ACT ACA GAG CTG CTC TCT CC	ATT ACT TCT TGC AAG AGA GTC TAC TGT TAT TC

Tableau M.2 : Liste des amorces utilisées

La synthèse d'ADN par cette méthode repose sur une succession de cycles (25 à 30), comprenant chacun trois étapes : (a) une dénaturation à haute température séparant les deux brins constituant la matrice d'ADN, (b) une hybridation de la matrice avec des amorces oligonucléotidiques à une température légèrement inférieure à leur point de fusion (temperature melting ou T_m), (c) une étape d'élongation réalisée en présence de tous les composants requis pour la polymérisation (Tableau M.1).

Pour ajouter des sites de restriction aux extrémités des fragments d'ADN à cloner, nous utilisons des amorces contenant une extension 5' non appariée à la matrice portant les séquences correspondant aux sites de restriction. Dans ce cas, la réaction de PCR se fait en deux étapes : 25 cycles, à une température de fusion correspondant à -2°C de la séquence complète des oligonucléotides, sont précédés de 3 cycles à la température de fusion de la séquence de l'amorce complémentaire à l'ADN.

Afin de limiter les mutations non spécifiques liées à la réaction de polymérisation, nous avons utilisé une polymérase de haute fidélité [(Platinum Taq (Invitrogen) ou Taq High Fidelity (Invitrogen)]. Le produit final a ensuite été soit introduit dans le vecteur de clonage pCR2.1 puis séquencé pour vérifier son intégrité, soit séquencé puis utilisé pour la recombinaison homologue dans la levure.

Les gènes *VvNPR* et *VvTGA* ont été amplifiés par PCR à partir d'un extrait d'ADN génomique ou d'ADN complémentaire à l'aide d'amorces gène-spécifiques (Tableau M.2).

2.2.2. RT-PCR

Nous avons utilisé le kit (Superscript III Rtase, Invitrogen) qui permet grâce à l'utilisation d'amorces oligo dT de rétro-transcrire sur toute leur longueur des ARN polyadénylés. La procédure a été réalisée selon les recommandations du fabricant. L'ADN complémentaire synthétisé est ensuite amplifié par PCR. Cette approche a été utilisée pour analyser en double hybride l'interaction entre les gènes *VvNPR* et les facteurs de transcriptions *VvTGA*.

2.2.3. Digestion d'ADN par des enzymes de restriction

Les endonucléases coupent spécifiquement l'ADN bicaténaire et génèrent des extrémités franches ou cohésives. Chaque enzyme de restriction présente une activité optimale dans un tampon spécifique et à une température donnée. En général, l'hydrolyse se déroule à 37°C pendant 1 à 2 heures en présence d'enzyme à raison de 10 unités pour 1 μg d'ADN à digérer.

2.2.4. Analyse de fragments d'ADN en gel d'agarose

Les fragments d'ADN obtenus après PCR ou digestion enzymatique sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose dont le pourcentage [0,8 à 2% (p/v)] varie selon la taille des fragments à analyser. L'ADN en suspension dans le tampon de charge 6X [glycérol 15% (v/v) ; bleu de bromophénol 0,2% (p/v)], est déposé sur le gel préparé dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM ; EDTA 2 mM ; pH 7,8). Après électrophorèse, sous ampérage constant (150 à 200 mA), le gel est coloré au bromure d'éthidium et les fragments d'ADN sont visualisés sous lumière UV et photographiés par le système Gel Doc Quantity One (BioRad). Ceci permet de vérifier l'intégrité de l'ADN et d'estimer la taille des fragments par comparaison avec un marqueur de taille (marqueur de taille 1 Kb plus, Invitrogen).

2.2.5. Purification de fragments d'ADN sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN séparés sur gels d'agarose sont découpés sous UV et purifiés en utilisant le kit Macherey-Nagel « Nucleospin® Extract II » selon la procédure décrite par le fabricant.

2.2.6. Quantification

La quantité et la qualité des acides nucléiques (ADN génomique, ADN complémentaire et produits d'amplification par PCR) sont déterminées par dosage spectrophotométrique à 260 nm (maximum d'absorption des acides nucléiques) et à 280 nm (maximum d'absorption du noyau phénolique des protéines et des polyphénols).

L'absorbance à 260 nm permet d'évaluer la concentration en acides nucléiques sachant qu'une unité de densité optique à 260 nm représente 40 µg/ml d'ARN ou d'ADN simple brin et 50 µg/ml d'ADN double brin. Le rapport de densité optique entre 260 et 280 nm témoigne de la pureté de l'échantillon. Un rapport supérieur ou égal à 1,8 atteste de sa pureté, un rapport inférieur est souvent lié à une contamination par des protéines ou des polyphénols.

2.2.7. Ligation

La ligation est assurée par la ligase extraite du bactériophage T4 (T4 DNA ligase). Elle catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 3'OH libres et 5'P des molécules d'ADN en présence d'ATP. La réaction est réalisée avec une unité d'enzyme dans un tampon spécifique pendant la nuit à 16°C.

Antibiotiques	Milieu liquide	Milieu solide
Ampicilline	100 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycine	50 µg/ml	50 µg/ml

Tableau M.3 : Concentrations des antibiotiques

Concentrations à ajouter dans les milieux LB liquide ou solide pour les cultures d'*E. coli*.

2.2.8. Culture des bactéries

Milieu LURIA-BERTANI (LB) : c'est un milieu complet utilisé pour la culture d'*E. coli* qui contient 1% de bactotryptone, 0,5% de Bacto-Yeast Extract et 1% de NaCl.

Milieu SOC : 2% Bactotryptone, 0,5% de bacto yeast extract, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ et 20 mM de glucose.

Le milieu SOC liquide est utilisé lors de la transformation des bactéries, immédiatement après le choc thermique d'*E.coli*.

Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 30 min puis additionnés, si nécessaire, d'antibiotiques pour sélectionner les cellules résistantes. Les souches bactériennes sont cultivées en milieu liquide sous agitation ou sur milieu solide par addition de 1,5% d'agar, à une température de 37°C pour les souches dérivant d'*E.coli*.

2.2.9. Transformation de la souche bactérienne DH5α

2.2.9.1. Préparation des cellules compétentes

Un volume de 100 ml de milieu LB est inoculé avec 5 ml d'une pré-culture bactérienne en phase stationnaire. La culture est incubée à 37°C avec agitation jusqu'à une absorbance à 600 nm de 0,2 à 0,4. La culture est centrifugée à 6.000 rpm pendant 8 minutes à 4°C. Le culot est repris délicatement avec 20 ml d'une solution de chlorure de calcium 50 mM conservée à 4°C. Les cellules en suspension sont laissées dans la glace pendant 20 min puis sont à nouveau centrifugées (6.000 rpm, 8 min, 4°C). Le culot est finalement repris avec 4 ml de solution de chlorure de calcium additionnée de glycérol 17% (v/v). Les cellules peuvent être utilisées tout de suite ou aliquotées par fraction de 50 µl et conservées à -80°C.

2.2.9.2. Choc thermique

La transformation permet d'introduire de l'ADN dans une cellule bactérienne hôte dont la paroi a été traitée par des ions calcium qui augmentent sa compétence à la transformation.

A 50 µl de cellules compétentes est ajouté 0,1 à 1 µg de plasmide ou d'extraits issus d'une ligation. Le mélange est laissé 20 minutes dans la glace, puis soumis à un choc thermique de 90 secondes à 42°C. Un volume de 150 µl de milieu SOC est alors ajouté et la culture est incubée à 37°C pendant une heure pour permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques adéquats. Les bactéries sont ensuite étalées dans des boîtes de Pétri préparées auparavant avec un milieu sélectif (Tableau M.3) et éventuellement supplémentées en X-Gal (40 µg/ml) permettant un criblage blanc/bleu.

Obtention d'un culot bactérien 1,5 ml de culture bactérienne d'une nuit Centrifugation 5 minutes 13 000 rpm à 4°C
Remise en suspension des bactéries <i>100 µl solution I</i> Tris-HCl 25 mM pH 8 EDTA 10 mM Glucose 50 mM Remise en suspension à température ambiante
Lyse alcaline des bactéries <i>200 µl solution II</i> NaOH 200 mM SDS 10% Agitation douce par inversement et incubation 5 minutes à température ambiante
Précipitation de l'ADN chromosomique <i>150 µl solution III</i> Acétate de potassium 3 M Acide acétique 5 M Agitation douce par inversement et incubation 5 minutes à 4°C Centrifugation 10 minutes 14 000 rpm à 4°C
Précipitation de l'ADN plasmidique Sumageant + 2 volumes d'éthanol 100 % Incubation 2 minutes à température ambiante Centrifugation 10 minutes 14 000 rpm à 4°C
Lavage à l'éthanol 70 % Séchage sous vide
Reprise du culot dans 30 µl d'eau

Tableau M.4 : Préparation d'ADN plasmidique par la technique de lyse alcaline

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les bactéries non transformées ne se multiplieront pas car elles sont sensibles à l'antibiotique. Les colonies sont ensuite déposées dans un milieu sélectif liquide pour une nuit à 37°C.

2.2.10. Extraction de plasmides par la technique de la lyse alcaline

Cette étape consiste à extraire l'ADN plasmidique des bactéries et de l'isoler. L'ADN plasmidique a été préparé à partir d'une colonie d'*E.coli* d'intérêt cultivée pendant une nuit dans un milieu LB contenant le ou les antibiotiques appropriés. L'ADN plasmidique a été obtenu par la technique de la lyse alcaline présentée dans le tableau M.4.

Le principe de cette extraction d'ADN est la mise en contact du culot bactérien avec un détergent anionique (SDS) et de la soude provoquant la lyse des parois cellulaires, la dénaturation de l'ADN chromosomique et des protéines, ainsi que la libération de l'ADN plasmidique. Pendant la lyse, les protéines bactériennes, les parois cellulaires et l'ADN chromosomique dénaturé se complexent avec le SDS. Ces complexes sont ensuite efficacement précipités en remplaçant les ions sodium par des ions potassium. L'ADN plasmidique présent dans le surnageant peut ensuite être récupéré par précipitation à l'éthanol. Le produit final est ensuite analysé sur gel d'agarose puis éventuellement purifié grâce au kit commercialisé par Macherey-Nagel « Nucleospin® Extract II ».

2.2.11. Séquençage

Le séquençage dans les deux sens des fragments d'intérêt a été effectué par la plateforme de séquençage de l'IBMP de Strasbourg et par la société Genoscreen (Lille) selon la méthode de Sanger utilisant la Taq polymérase en présence de didésoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1977).

2.2.12. Conservation des souches de bactéries et de levures

Les souches sont conservées à -80°C dans 15% de glycérol (concentration finale), ce qui permet de limiter la formation de cristaux à l'intérieur des cellules.

2.3. Technique du double hybride dans la levure

2.3.1. Culture des levures

Milieu Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) : ce milieu complet (extraits de levure 1% ; peptone 2% ; dextrose 2% ; pH 6,5) offre des conditions optimales de croissance pour la plupart des souches de *S. cerevisiae*.

Milieu Synthetic Dextrose (SD) : le milieu SD est un milieu synthétique utilisé pour la culture des levures et qui peut être déficient pour certains acides aminés permettant ainsi la sélection des transformants.

Milieu Yeast Nitrogen Base (YNB) : 1,7% YNB sans sulfate d'ammonium, 5% sulfate ammonium, 20 % dextrose.

Ces milieux (mis à part le milieu complet) peuvent être supplémentés en fonction des auxotrophies des souches. Les levures sont cultivées à 28°C en milieu liquide sous agitation ou sur milieu solide contenant 1,5% d'agar. En conditions optimales de croissance, lors de la phase exponentielle, le temps de génération est de 1 h 30 environ sur milieu complet et de 2 h 30 environ sur milieu minimum.

2.3.2. Double hybride

La méthode du double-hybride dans la levure est une technique qui permet d'étudier les interactions physiques entre deux protéines *in vivo*.

2.3.2.1. Préparation des levures

Ensemencez 30 ml de milieu YPD avec une colonie de levure AH109. Le tout est incubé sous agitation (220 rpm) toute la nuit à 28°C. Par la suite, préchauffer 100 ml de milieu YPD à 28°C ensemencé avec 30 ml de la pré-culture. La culture est incubée à 28°C sous agitation jusqu'à une absorbance à 660 nm de 2 à 2,2. La culture est centrifugée à 3.000 rpm pendant 5 min à 20°C. Le culot est repris avec 40 ml de Tris 10 mM pH 7,5 et centrifugé 5 min à 3.000 rpm à 20°C. Puis il est repris avec 50 ml de tampon LiAc 1X (LiAc 0,1 M, Tris 10 mM, pH 7,5) et incubé 40 min à température ambiante sous légère agitation. La culture est centrifugée à 14.000 rpm pendant 5 min à 20°C. Le culot est délicatement repris avec 2,25 ml de LiAc 1X.

2.3.2.2. Transformation des levures par choc thermique

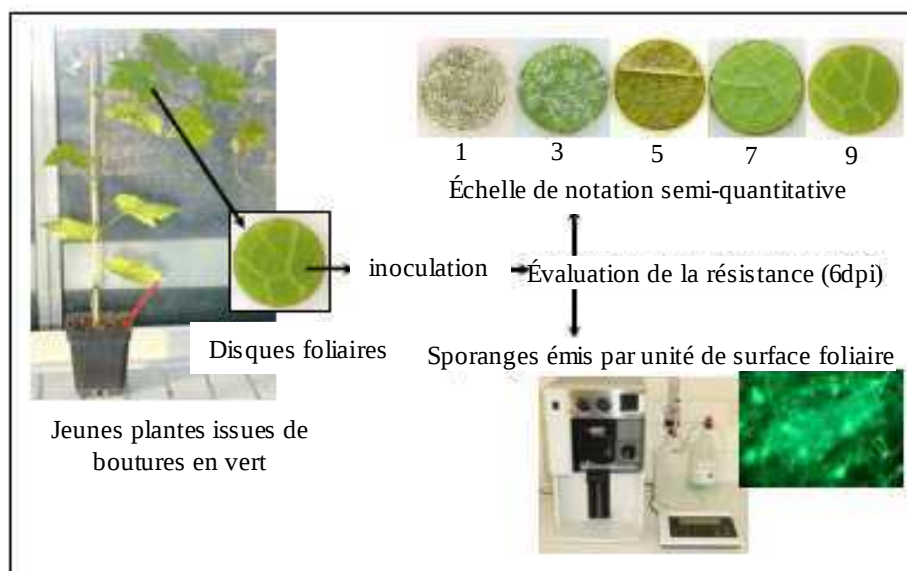
Pour chaque transformation, on ajoute successivement 100 μ l de cellules, 10 μ l d'ADN entraîneur (sperme de saumon à 2 μ g. μ l⁻¹, préalablement dénaturé 5 min à 100°C puis immédiatement refroidi dans la glace) et l'ADN à intégrer. Il s'agira soit de 500 ng de plasmide linéaire et 1 à 2 μ g de fragment PCR pour la recombinaison homologue *in vivo*, soit de 150 ng de plasmide circulaire. Le mélange est incubé 10 min à température ambiante puis 300 μ l d'une solution de LiAc/PEG (40% de PEG 3350 dans LiAc) sont ajoutés.

Le PEG fragilise la paroi cellulaire et l'ADN entraîneur facilite l'entrée des plasmides dans les levures. Après homogénéisation par inversement, le mélange de transformation est incubé 10 min à température ambiante puis 15 min à 42°C. Après une centrifugation de 4 min à 14.000 rpm à 20°C, le surnageant est éliminé. Le culot est repris dans 500 μ l d'YPD puis incubé 1 h à 28°C sans agitation. Le mélange est centrifugé 4 min à 14.000 rpm à 20°C puis le culot est repris dans 1 ml de Tris 10 mM pH 7,5 et 100 μ l sont étalés sur un milieu sélectif déficient en acides aminés adéquats. Seuls les transformants ayant soit réalisé la recombinaison homologue, soit intégré le ou les plasmides souhaités pourront pousser sur ce milieu après 2 à 3 jours d'incubation à 28°C.

2.3.3. Extraction d'ADN plasmidique des clones recombinants de levure

Une colonie de la souche de levures d'intérêt est inoculée dans 5 ml de milieu sélectif approprié. Après une nuit à 28°C sous agitation, la culture est centrifugée à 3.000 rpm pendant 5 min à 4°C et le culot est repris dans 250 μ l de tampon de broyage (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton 2%, SDS 1%). Après ajout de 250 μ l de phénol/chloroforme et de billes de verre (0,5 mm de diamètre), le tout est mélangé énergiquement avec un vortex pendant 3 min. La phase aqueuse est récupérée après une centrifugation de 10 min à 12.000 rpm à 4°C. Les acides nucléiques sont précipités toute la nuit à -20°C avec de l'AcNH₄ 0,4 M et 3 volumes d'éthanol 100%. Une sédimentation des acides nucléiques par une centrifugation de 40 min, 13.000 rpm, 4°C, puis un lavage avec 1 ml d'éthanol 70% sont réalisés.

Une dernière centrifugation de 10 min à 13.000 rpm et 4°C est effectuée avant le séchage du culot sous vide. Le culot est ensuite repris avec 40 μ l d'eau.



Note OIV 452	Définitions
1	Très faible : taches non délimitées et très étendues, ou limbe entièrement parasité – fructifications abondantes du champignon – faciès « point de tapisserie » très marqué – chute de feuilles très précoce.
3	Faible : taches non délimitées et étendues – fructifications abondantes du champignon – nombreux points de tapisserie – chute de feuilles moins précoce que dans la classe 1.
5	Moyen : taches délimitées, d'un diamètre de 1 à 2 cm – fructifications du champignon plus ou moins abondantes – formation des points de tapisserie irrégulière.
7	Élevé : taches nécrotiques réduites – fructifications rares – points de tapisserie rares.
9	Très élevé ou total : taches nécrotiques ponctuelles ou absence de symptômes – pratiquement pas de fructifications ni de points de tapisserie.

Figure M.1 : Principales étapes de l'évaluation quantitative de la résistance au mildiou.

2.4. Evaluation de la résistance des plantes aux pathogènes

2.4.1. Récolte du matériel végétal et mise en place du dispositif

Une à deux feuilles de vignes (plantes cultivées en serre ou au vignoble) sont prélevées entre la 5^{ème} et la 10^{ème} feuilles en partant du sommet du plant. Des disques de 1 cm de diamètre sont ensuite découpés à l'emporte pièce. Parallèlement, du papier absorbant est humidifié et placé au fond de chaque boîte de Pétri. Les disques sont alors disposés dans les boîtes de Pétri face inférieure vers le haut.

2.4.2. Inoculation de l'agent pathogène *Plasmopara viticola*

La pulvérisation de l'inoculum (3.10^4 spores/ml) s'effectue à l'aide d'un pulvérisateur à main à réserve d'air comprimé en 1 fois 2 passages. Les boîtes contenant les disques foliaires sont ensuite refermées et mises dans la chambre de culture à 21°C et sous une photopériode de 16h de jour / 8h de nuit pendant 6 jours sous une lumière blanche. Les conditions de culture de l'inoculum au laboratoire sont plus favorables à l'infection et à la sporulation de l'agent pathogène qu'au vignoble.

2.4.3. Observations : Notations OIV

La nécrose des plantes et la sporulation de l'agent pathogène sont observées de manière concomitante par une observation visuelle utilisant la notation semi quantitative OIV 452 (Figure M.5) recommandée par l'Organisation Internationale de la vigne et du Vin (http://news.reseau-concept.net/images/oiv/client/Code_descripteurs_2ed_FR.pdf). Parallèlement le nombre de spores a été compté (Beckman coulter).

3. Méthodes de bioinformatique

Les logiciels ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>), BioEdit et Finch TV nous ont permis de vérifier les données de séquençages et de réaliser les alignements de séquences. Le logiciel Blast (NCBI) a été utilisé pour la recherche de séquences nucléotiques et protéiques chez d'autres espèces présentant des homologies avec les VvNPR et les VvTGA.

Les traductions des séquences nucléiques en séquences protéiques ont été réalisées sur le site EXPASY (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>).

Les arbres phylogénétiques ont été réalisés avec le logiciel Phylo_win (Galtier *et al.*, 1996). Les arbres phylogénétiques ont été calculés avec la méthode du « Neighbour joining » (Saitou et Nei, 1987) en éliminant systématiquement les positions « Gaps » des analyses. Enfin, la technique du « Bootstrap » a été utilisée pour estimer la probabilité de l'existence des différents nœuds de chacun des arbres phylogénétiques.

Le contexte génomique de chacun des gènes *VvNPR* a été analysé avec le programme PLACE « Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements » (Higo *et al.*, 1999) disponible en ligne sur le site PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>).

La recherche d'éléments transposables a été réalisée à l'aide du logiciel RepBase (<http://www.girinst.org/censor/index.php>).

REFERENCES

- Adam-Blondon A F, Roux C, Claux D, Butterlin G, Merdinoglu D and This P. 2004.** Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **109**:1017-1027.
- Adam-Blondon A F, Bernole A, Faes G, Lamoureux D, Pateyron S, Grando M S, Caboche M, Velasco R and Chalhoub B. 2005.** Construction and characterization of BAC libraries from major grapevine cultivars. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **110**:1363-1371.
- Aguilera A and Gomez-Gonzalez B. 2008.** Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetics*, **9**:204-217.
- Alleweldt G and Possingham J V. 1988.** Progress in grapevine breeding. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **75**:669-673.
- Amarger V, Gauguier D, Yerle M, Apiou F, Pinton P, Giraudeau F, Monfouilloux S, Lathrop M, Dutrillaux B, Buard J and Vergnaud G. 1998.** Analysis of distribution in the human, pig, and rat genomes points toward a general subtelomeric origin of minisatellite structures. *Genomics*, **52**:62-71.
- Aravind L and Koonin E V. 1999.** Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: Structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *Journal of Molecular Biology*, **285**:1353-1361.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann M R, Chiu W L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel F M and Sheen J. 2002.** MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, **415**:977-983.
- Attaran E, Zeier T E, Griebel T and Zeier J. 2009.** Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**:954-971.
- Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bezier A, Lambert B, Joubert J M and Pugin A. 2003.** Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**:1118-1128.
- Aziz A, Heyraud A and Lambert B. 2004.** Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*, **218**:767-774.
- Aziz A, Gauthier A, Bezler A, Poinssot B, Joubert J M, Pugin A, Heyraud A and Baillieul F. 2007.** Elicitor and resistance-inducing activities of beta-1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with beta-1,3 glucans and alpha-1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany*, **58**:1463-1472.
- Bailey B A. 1995.** Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology*, **85**:1250-1255.
- Bakker E G, Toomajian C, Kreitman M and Bergelson J. 2006.** A genome wide survey of *R* gene polymorphisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18**:1803-1818.
- Bakker E G, Traw M B, Toomajian C, Kreitman M and Bergelson J. 2008.** Low levels of polymorphism in genes that control the activation of defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **178**:2031-2043.
- Balakirev E S and Ayala F J. 2003.** Pseudogenes: Are they "Junk" or functional DNA? *Annual Review of Genetics*, **37**:123-151.
- Baldwin A S. 1996.** The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*, **14**:649-683.
- Bamshad M and Wooding S P. 2003.** Signatures of natural selection in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, **4**:99-111A.
- Bardwell V J and Treisman R. 1994.** The POZ domain - a conserved protein-protein interaction motif. *Genes & Development*, **8**:1664-1677.

- Barker C L, Donald T, Pauquet J, Ratnaparkhe M B, Bouquet A, Adam-Blondon A F, Thomas M R and Dry I. 2005.** Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **111**:370-377.
- Bartel P, Chien C T, Sternglantz R and Fields S. 1993.** Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*, **14**:920-&.
- Basse C W, Fath A and Boller T. 1993.** High-affinity binding of glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal-membranes and displacement by specific glycan suppressors. *Journal of Biological Chemistry*, **268**:14724-14731.
- Baureithel K, Felix G and Boller T. 1994.** Specific, high-affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes: competitive-inhibition of binding by derivatives of chitooligosaccharides and a nod factor of rhizobium. *Journal of Biological Chemistry*, **269**:17931-17938.
- Beaumont M A and Nichols R A. 1996.** Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **263**:1619-1626.
- Beaumont M A and Balding D J. 2004.** Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology*, **13**:969-980.
- Becerra C, Jahrman T, Puigdomenech P and Vicient C M. 2004.** Ankyrin repeat-containing proteins in *Arabidopsis*: characterization of a novel and abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane proteins. *Gene*, **340**:111-121.
- Beckers G J M and Spoel S H. 2006.** Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate. *Plant Biology*, **8**:1-10.
- Beckmann J S and Weber J L. 1992.** Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, **12**:627-631.
- Belkhadir Y, Subramaniam R and Dangl J L. 2004.** Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**:391-399.
- Bellin D, Peressotti E, Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Adam-Blondon A-F, Cipriani G, Morgante M, Testolin R and 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. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **120**:163-176.
- Benhamou N, Belanger R R and Paulitz T C. 1996.** Pre-inoculation of Ri T-DNA-transformed pea roots with *Pseudomonas fluorescens* inhibits colonization by *Pythium ultimum* trow: An ultrastructural and cytochemical study. *Planta*, **199**:105-117.
- Benhamou N, Kloepper J W, QuadtHallman A and Tuzun S. 1996.** Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology*, **112**:919-929.
- Benhamou N and Nicole M. 1999.** Cell biology of plant immunization against microbial infection: The potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiology and Biochemistry*, **37**:703-719.
- Bennetzen J L. 2000.** Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology*, **42**:251-269.
- Bennetzen J L. 2002.** Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants. *Genetica*, **115**:29-36.
- Bennetzen J L. 2007.** Patterns in grass genome evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**:176-181.
- Bent A F. 1996.** Plant disease resistance genes: Function meets structure. *Plant Cell*, **8**:1757-1771.

- Bent A F and Mackey D. 2007.** Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology*, **45**:399-436.
- Bergeault K, Bertsch C, Merdinoglu D and Walter B. 2010.** Low level of polymorphism in two putative NPR1 homologs in the Vitaceae family. *Biology Direct*, **5**.
- Berrocal-Lobo M and Molina A. 2004.** Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**:763-770.
- Bessis R. 2007.** Evolution of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) imprinted by natural and human factors. *Canadian Journal of Botany*, **85**:679-690.
- Bezier A, Lambert B and Baillieul F. 2002.** Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, **108**:111-120.
- Bezier A. 2003.** Caractérisation de gènes de défense exprimés par la vigne en réponse à l'infection par *Botrytis cinerea* par la technique de differential display RT-PCR., pp. 337.
- Bianco P R, Tracy R B and Kowalczykowski S C. 1998.** DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Front Biosci*, **3**:D570-603.
- Biswas S and Akey J M. 2006.** Genomic insights into positive selection. *Trends in Genetics*, **22**:437-446.
- Blanc G, Hokamp K and Wolfe K H. 2003.** A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome. *Genome Research*, **13**:137-144.
- Blanc G and Wolfe K H. 2004.** Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell*, **16**:1667-1678.
- Boller T and Felix G. 2009.** A renaissance of elicitors: perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and danger signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, **60**:379-406.
- Bonas U and Lahaye T. 2002.** Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology*, **5**:44-50.
- Bonomelli A, Mercier L, Franchel K, Baillieul F, Benizri E and Mauro M C. 2004.** Response of grapevine defenses to UV-C exposure. *American Journal of Enology and Viticulture*, **55**:51-59.
- Boyle P, Le Su E, Rochon A, Shearer H L, Murmu J, Chu J Y, Fobert P R and Despres C. 2009.** The BTB/POZ Domain of the Arabidopsis Disease Resistance Protein NPR1 Interacts with the Repression Domain of TGA2 to Negate Its Function. *Plant Cell*, **21**:3700-3713.
- Broekaert W F, Terras F R G, Cammue B P A and Osborn R W. 1995.** Plant defensins : novel antimicrobial peptides as components of the host-defense system. *Plant Physiology*, **108**:1353-1358.
- Broekaert W F, Delaure S L, De Bolle M F C and Cammuel B P A. 2006.** The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **44**:393-416.
- Bronner A and Oliveira J. 1991.** Création et étude de lignées chez le Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.). *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, **25**:133-148.
- Brookes A J. 1999.** The essence of SNPs. *Gene*, **234**:177-186.
- Brooks A R, Nagy B P, Taylor S, Simonet W S, Taylor J M and Levywilson B. 1994.** Sequences containing the 2nd intron enhancer are essential for transcription of the human apolipoprotein B gene in the livers of transgenic mice. *Molecular and Cellular Biology*, **14**:2243-2256.
- Brooks S A. 2006.** Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins. *Expert Review of Proteomics*, **3**:345-359.

- Brunner F, Rosahl S, Lee J, Rudd J J, Geiler C, Kauppinen S, Rasmussen G, Scheel D and Nurnberger T. 2002.** Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *Embo Journal*, **21**:6681-6688.
- Busam G, Kassemeyer H H and Matern U. 1997.** Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiology*, **115**:1029-1038.
- Caicedo A L, Schaal B A and Kunkel B N. 1999.** Diversity and molecular evolution of the *RPS2* resistance gene in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**:302-306.
- Caicedo A L and Schaal B A. 2004.** Heterogeneous evolutionary processes affect *R* gene diversity in natural populations of *Solanum pimpinellifolium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**:17444-17449.
- Caldwell K S and Michelmore R W. 2009.** *Arabidopsis thaliana* genes encoding defense signaling and recognition proteins exhibit contrasting evolutionary dynamics. *Genetics*, **181**:671-684.
- Cao H, Bowling S A, Gordon A S and Dong X. 1994.** Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **6**:1583-1592.
- Cao H, Glazebrook J, Clarke J D, Volko S and Dong X N. 1997.** The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, **88**:57-63.
- Cao H, Li X and Dong X N. 1998.** Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**:6531-6536.
- Chapman B A, Bowers J E, Feltus F A and Paterson A H. 2006.** Buffering of crucial functions by paleologous duplicated genes may contribute cyclicity to angiosperm genome duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**:2730-2735.
- Charlesworth D and Wright S I. 2001.** Breeding systems and genome evolution. *Current Opinion in Genetics & Development*, **11**:685-690.
- Chen W Q, Provart N J, Glazebrook J, Katagiri F, Chang H S, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G Z, Whitham S A, Budworth P R, Tao Y, Xie Z Y, Chen X, Lam S, Kreps J A, Harper J F, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl J L, Wang X and Zhu T. 2002.** Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, **14**:559-574.
- Chern M, Canlas P E, Fitzgerald H A and Ronald P C. 2005.** Rice NRR, a negative regulator of disease resistance, interacts with *Arabidopsis NPR1* and rice *NH1*. *Plant Journal*, **43**:623-635.
- Chern M, Fitzgerald H A, Canlas P E, Navarre D A and Ronald P C. 2005.** Overexpression of a rice *NPR1* homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**:511-520.
- Chern M S, Fitzgerald H A, Yadav R C, Canlas P E, Dong X N and Ronald P C. 2001.** Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the *NPR1*-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **27**:101-113.
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T and Felix G. 2006.** The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, **18**:465-476.
- Chisholm S T, Coaker G, Day B and Staskawicz B J. 2006.** Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124**:803-814.

- Chuang C F, Running M P, Williams R W and Meyerowitz E M. 1999.** The PERIANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, **13**:334-344.
- Clark D. 2005.** *Molecular Biology*, Southern Illinois University: Elsevier Academic Press.
- Clarke A, Mur L A J, Darby R M and Kenton P. 2005.** Harpin modulates the accumulation of salicylic acid by *Arabidopsis* cells via apoplastic alkalization. *Journal of Experimental Botany*, **56**:3129-3136.
- Cohen Y R. 2002.** Beta-aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Disease*, **86**:448-457.
- Comai L, Young K, Till B J, Reynolds S H, Greene E A, Codomo C A, Enns L C, Johnson J E, Burtner C, Odden A R and Henikoff S. 2004.** Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant Journal*, **37**:778-786.
- Conrath U, Beckers G J M, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman M A, Pieterse C M J, Poinssot B, Pozo M J, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B and Prime A P G. 2006.** Priming: Getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**:1062-1071.
- Copley R R, Goodstadt L and Ponting C. 2003.** Eukaryotic domain evolution inferred from genome comparisons. *Current Opinion in Genetics & Development*, **13**:623-628.
- Coryell V H, Jessen H, Schupp J M, Webb D and Keim P. 1999.** Allele-specific hybridization markers for soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**:690-696.
- Coutos-Thevenot P, Goebel-Tourand I, Mauro M C, Jouanneau J P, Boulay M, Deloire A and Guern J. 1992.** Somatic embryogenesis from grapevine cells - I-Improvement of embryo development by changes in culture conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **29**:125-133.
- Coutos-Thevenot P, Poinssot B, Bonomelli A, Yean H, Breda C, Buffard D, Esnault R, Hain R and Boulay M. 2001.** *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible *PR 10* promoter. *Journal of Experimental Botany*, **52**:901-910.
- Creelman R A and Mullet J E. 1997.** Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**:355-381.
- Crow J F. 1995.** Spontaneous mutation as a risk factor. *Experimental and Clinical Immunogenetics*, **12**:121-128.
- Cui J, Bahrami A K, Pringle E G, Hernandez-Guzman G, Bender C L, Pierce N E and Ausubel F M. 2005.** *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**:1791-1796.
- Dangl J L and Jones J D G. 2001.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**:826-833.
- Dayhoff M O. 1976.** Origin and evolution of protein superfamilies. *Federation Proceedings*, **35**:2132-2138.
- De Waard M A, Georgopoulos S G, Hollomon D W, Ishii H, Leroux P, Ragsdale N N and Schwinn F J. 1993.** Chemical Control of Plant Diseases: Problems and Prospects. *Annual Review of Phytopathology*, **31**:403-421.
- De Wit P. 2007.** How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**:2726-2732.
- Delaney T P, Friedrich L and Ryals J A. 1995.** *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**:6602-6606.

- Delledonne M, Xia Y J, Dixon R A and Lamb C. 1998.** Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, **394**:585-588.
- Derckel J P, Legendre L, Audran J C, Haye B and Lambert B. 1996.** Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L): Five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science*, **119**:31-37.
- Derckel J P, Baillieul F, Manteau S, Audran J C, Haye B, Lambert B and Legendre L. 1999.** Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, **89**:197-203.
- Despres C, DeLong C, Glaze S, Liu E and Fobert P R. 2000.** The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell*, **12**:279-290.
- Despres C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux D and Fobert P R. 2003.** The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell*, **15**:2181-2191.
- Di Gaspero G and Cipriani G. 2003.** Isolation and characterisation of resistance gene analogs (RGAs) in grape. *Proceedings of the 8th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Vols 1 and 2*:419-427.
- Di Gaspero G, Cipriani G, Adam-Blondon A-F and Testolin R. 2007.** Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. *Theor Appl Genet*, **114**:1249 - 1263.
- Dietrich R A, Delaney T P, Uknes S J, Ward E R, Ryals J A and Dangl J L. 1994.** *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, **77**:565-577.
- Dodds P N, Lawrence G J, Catanzariti A M, Teh T, Wang C I A, Ayliffe M A, Kobe B and Ellis J G. 2006.** Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**:8888-8893.
- Donald T M, Pellerone F, Adam-Blondon A F, Bouquet A, Thomas M R and Dry I B. 2002.** Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, **104**:610-618.
- Dong X. 2004.** NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**:547-552.
- Dong X N. 2001.** Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**:309-314.
- Doolittle R F. 1994.** Protein sequence comparisons: Searching databases and aligning sequences. *Current Opinion in Biotechnology*, **5**:24-28.
- Dorey S, Baillieul F, Pierrel M A, Saindrenan P, Fritig B and Kauffmann S. 1997.** Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **10**:646-655.
- Duarte J M, Cui L Y, Wall P K, Zhang Q, Zhang X H, Leebens-Mack J, Ma H, Altman N and dePamphilis C W. 2006.** Expression pattern shifts following duplication indicative of subfunctionalization and neofunctionalization in regulatory genes of *Arabidopsis*. *Molecular Biology and Evolution*, **23**:469-478.
- Dubcovsky J and Dvorak J. 2007.** Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, **316**:1862-1866.
- Dubos B. 1999.** *Maladies cryptogamiques de la vigne. Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne.*, Bordeaux: Editions Féret.

- Duda T F and Palumbi S R. 1999.** Molecular genetics of ecological diversification: Duplication and rapid evolution of toxin genes of the venomous gastropod *Conus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**:6820-6823.
- Durrant W E and Dong X. 2004.** Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **42**:185-209.
- Eckardt N A and Innes R. 2003.** Resistance rodeo: Rounding up the full complement of *Arabidopsis* NBS-LRR genes. *Plant Cell*, **15**:806-807.
- Ekengren S K, Liu Y L, Schiff M, Dinesh-Kumar S P and Martin G B. 2003.** Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant Journal*, **36**:905-917.
- Ellis J G, Lawrence G J, Luck J E and Dodds P N. 1999.** Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine differences in gene-for-gene specificity. *Plant Cell*, **11**:495-506.
- Elmer P A G and Reglinski T. 2006.** Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, **55**:155-177.
- Endah R, Beyene G, Kiggundu A, van den Berg N, Schluter U, Kunert K and Chikwamba R. 2008.** Elicitor and *Fusarium*-induced expression of *NPR1*-like genes in banana. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**:1007-1014.
- Enkerli J, Felix G and Boller T. 1999.** The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiology*, **121**:391-397.
- Essenberg M, Grover Jr P B and Cover E C. 1990.** Accumulation of antibacterial sesquiterpenoids in bacterially inoculated *Gossypium* leaves and cotyledons. *Phytochemistry*, **29**:3107-3113.
- Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S and Somssich I E. 2000.** The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, **5**:199-206.
- Eulgem T. 2005.** Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends in Plant Science*, **10**:71-78.
- Eulgem T and Somssich I E. 2007.** Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**:366-371.
- Fan W H and Dong X N. 2002.** In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**:1377-1389.
- Farmer E E and Ryan C A. 1992.** Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase-inhibitors. *Plant Cell*, **4**:129-134.
- Fay J C and Wu C I. 2000.** Hitchhiking under positive Darwinian selection. *Genetics*, **155**:1405-1413.
- Felix G, Duran J D, Volko S and Boller T. 1999.** Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*, **18**:265-276.
- Felix G and Boller T. 2003.** Molecular sensing of bacteria in plants - The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *Journal of Biological Chemistry*, **278**:6201-6208.
- Fellbrich G, Romanski A, Varet A, Blume B, Brunner F, Engelhardt S, Felix G, Kemmerling B, Krzymowska M and Nurnberger T. 2002.** NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **32**:375-390.
- Feys B J and Parker J E. 2000.** Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics*, **16**:449-455.

- Fields S and Song O K. 1989.** A novel genetic system to detect protein protein interactions. *Nature*, **340**:245-246.
- Fields S and Sternglanz R. 1994.** The two hybrid system - An assay for protein interactions. *Trends in Genetics*, **10**:286-292.
- Fischer B M, Salakhutdinov I, Akkurt M, Eibach R, Edwards K J, Töpfer R and Zyprian E M. 2004.** Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **108**:501-515.
- Fitch W M. 1966.** An improved method of testing for evolutionary homology. *Journal of Molecular Biology*, **16**:9-&.
- Fitch W M. 1970.** Distinguishing homologous from analogous proteins. *Systematic Zoology*, **19**:99-&.
- Fitzgerald H A, Chern M S, Navarre R and Ronald P C. 2004.** Overexpression of (*At*)*NPR1* in rice leads to a BTH- and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**:140-151.
- Fitzgerald H A, Canlas P E, Chern M S and Ronald P C. 2005.** Alteration of TGA factor activity in rice results in enhanced tolerance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Journal*, **43**:335-347.
- Fliegmann J, Mithofer A, Wanner G and Ebel J. 2004.** An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *Journal of Biological Chemistry*, **279**:1132-1140.
- Flor H H. 1971.** Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, **9**:275-296.
- Force A, Lynch M, Pickett F B, Amores A, Yan Y L and Postlethwait J. 1999.** Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, **151**:1531-1545.
- Ford M J. 2002.** Applications of selective neutrality tests to molecular ecology. *Molecular Ecology*, **11**:1245-1262.
- Friedrich L, Lawton K, Dietrich R, Willits M, Cade R and Ryals J. 2001.** NIM1 overexpression in *Arabidopsis* potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**:1114-1124.
- Fromm H, Katagiri F and Chua N H. 1989.** An octopine synthase enhancer element directs tissue-specific expression and binds ASF-1, a factor from tobacco nuclear extracts. *Plant Cell*, **1**:977-984.
- Fu Y X and Li W H. 1993.** Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, **133**:693-709.
- Fu Y X. 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**:915-925.
- Gaffney D J and Keightley P D. 2006.** Genomic selective constraints in murid noncoding DNA. *Plos Genetics*, **2**:1912-1923.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H and Ryals J. 1993.** Requirement of salicylic-acid for the induction of systemic acquired-resistance. *Science*, **261**:754-756.
- Galet P. 1977.** *Les maladies et parasites de la vigne*, Montpellier: Imprimerie du "Paysan du Midi".
- Galet P. 1993.** *Précis de viticulture*, Montpellier: Edition Dehan.
- Galet P. 2000.** *Dictionnaire encyclopédique des cépages*: Editions Hachette.

- Galtier N, Gouy M and Gautier C. 1996.** SEAVIEW and PHYLO_WIN: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**:543-548.
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D and Pugin A. 2006.** Early signaling events induced by elicitors of plant Defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**:711-724.
- Garreton V, Carpinelli J, Jordana X and Holuigue L. 2002.** The *as-1* promoter element is an oxidative stress-responsive element and salicylic acid activates it *via* oxidative species. *Plant Physiology*, **130**:1516-1526.
- Garrigan D and Hedrick P W. 2003.** Perspective: Detecting adaptive molecular polymorphism: Lessons from the MHC. *Evolution*, **57**:1707-1722.
- Gindro K, Pezet R and Viret O. 2003.** Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**:846-853.
- Glazebrook J, Rogers E E and Ausubel F M. 1996.** Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics*, **143**:973-982.
- Glazebrook J, Rogers E E and Ausubel F M. 1997.** Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review of Genetics*, **31**:547-569.
- Glazebrook J. 2001.** Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* - 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**:301-308.
- Glazebrook J. 2005.** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **43**:205-227.
- Gomez-Gomez L and Boller T. 2002.** Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, **7**:251-256.
- Gomès E, Sagot E, Gaillard C, Laquitaine L, Poinssot B, Sanejouand Y H, Delrot S and Coutos-Thevenot P. 2003.** Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cells in response to fungal elicitor treatments. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**:456-464.
- Govrin E M and Levine A. 2000.** The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, **10**:751-757.
- Granado J, Felix G and Boller T. 1995.** Perception of fungal sterols in plants: subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalinization in tomato cells. *Plant Physiology*, **107**:485-490.
- Grant J J and Loake G J. 2000.** Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology*, **124**:21-29.
- Grant S R, Fisher E J, Chang J H, Mole B M and Dangl J L. 2006.** Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **60**:425-449.
- Ha C M, Jun J H, Nam H G and Fletcher J C. 2004.** BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **45**:1361-1370.
- Hamiduzzaman M M, Jakab G, Barnavon L, Neuhaus J-M and Mauch-Mani B. 2005.** β -Aminobutyric Acid-Induced Resistance Against Downy Mildew in Grapevine Acts Through the Potentiation of Callose Formation and Jasmonic Acid Signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**:819-829.
- Hammerschmidt R. 1999.** Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**:77-84.

- Hammond-Kosack K E and Jones J D G. 1997.** Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**:575-607.
- Hammond-Kosack K E and Parker J E. 2003.** Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**:177-193.
- Harborne J B. 1999.** The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, **27**:335-367.
- He S Y, Huang H C and Collmer A. 1993.** *Pseudomonas syringae* pv *syringae* harpin_(ps): a protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, **73**:1255-1266.
- Heath M C. 2000.** Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**:315-319.
- Hepworth S R, Zhang Y L, McKim S, Li X and Haughn G. 2005.** BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17**:1434-1448.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M and Korenaga T. 1999.** Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research*, **27**:297-300.
- Hocquigny S, Pelsy F, Dumas V, Kindt S, Heloir M C and Merdinoglu D. 2004.** Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome*, **47**:579-589.
- Hoffman T, Schmidt J S, Zheng X Y and Bent A F. 1999.** Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology*, **119**:935-949.
- Holliday R and Grigg G W. 1993.** DNA methylation and mutation. *Mutation Research*, **285**:61-67.
- Holub E B. 2001.** The arms race is ancient history in *Arabidopsis*, the wildflower. *Nature Reviews Genetics*, **2**:516-527.
- Hudson R R, Kreitman M and Aguade M. 1987.** A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data. *Genetics*, **116**:153-159.
- Hudson R R. 2000.** A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics*, **155**:2011-2014.
- Huglin P and Schneider C. 1998.** *Biologie et écologie de la vigne*, Paris: Tec & doc.
- Imazio S, Labra M, Grassi F, Winfield M, Bardini M and Scienza A. 2002.** Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar 'Traminer'. *Plant Breeding*, **121**:531-535.
- Ito Y, Kaku H and Shibuya N. 1997.** Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *The Plant Journal*, **12**:347-356.
- Jacobs A K, Dry I B and Robinson S P. 1999.** Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology*, **48**:325-336.
- Jacquemont G. 1993.** *Le grand livre des vins d'Alsace*: Editions Chêne.

- 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, Bruyere 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, Pe M E, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon A F, Weissenbach J, Quetier F, Wincker P and French-Italian P. 2007.** The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, **449**:463-U465.
- Jakab G, Cottier V, Toquin V, Rigoli G, Zimmerli L, Metraux J P and Mauch-Mani B. 2001.** Beta-Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology*, **107**:29-37.
- Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F and b Z I P R G. 2002.** bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, **7**:106-111.
- Jander G and Barth C. 2007.** Tandem gene arrays: a challenge for functional genomics. *Trends in Plant Science*, **12**:203-210.
- Jeandet P, Sbaghi M and Bessis R. 1992.** The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grapevine *in vitro* cultures, and its application to screening for grey mould resistance. *Journal of Wine Research*, **3**:47 - 57.
- Jeandet P, Bessis R, Sbaghi M and Meunier P. 1995.** Production of the phytoalexin reveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, **143**:135-139.
- Jeandet P, Douillt-Breuil A C, Bessis R, Debord S, Sbaghi M and Adrian M. 2002.** Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**:2731-2741.
- Jeffreys A J, Wilson V and Thein S L. 1985.** Hypervariable minisatellite regions in Human DNA. *Nature*, **314**:67-73.
- Jeffreys A J, Neil D L and Neumann R. 1998.** Repeat instability at human minisatellites arising from meiotic recombination. *Embo Journal*, **17**:4147-4157.
- Johansson A, Staal J and Dixelius C. 2006.** Early responses in the *Arabidopsis-verticillium longisporum* pathosystem are dependent on *NDR1*, JA- and ET-associated signals via cytosolic *NPR1* and *RFO1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**:958-969.
- Johnson C, Boden E and Arias J. 2003.** Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **15**:1846-1858.
- Jones J D G. 2001.** Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**:281-287.
- Jones J D G and Dangl J L. 2006.** The plant immune system. *Nature*, **444**:323-329.
- Joubert D A, Slaughter A R, Kemp G, Becker J V W, Krooshof G H, Bergmann C, Benen J, Pretorius I S and Vivier M A. 2006.** The grapevine polygalacturonase-inhibiting protein (VvPGIP1) reduces *Botrytis cinerea* susceptibility in transgenic tobacco and differentially inhibits fungal polygalacturonases. *Transgenic Research*, **15**:687-702.
- Jourdan E, Ongena M and Thonart P. 2008.** Molecular characteristics of the rhizobacteria-triggered plant immunity. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement*, **12**:437-449.
- Jung H W, Tschaplinski T J, Wang L, Glazebrook J and Greenberg J T. 2009.** Priming in systemic plant immunity. *Science*, **324**:89-91.

- Kamoun S. 2006.** A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, **44**:41-60.
- Katagiri F, Lam E and Chua N H. 1989.** Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature*, **340**:727-730.
- Katagiri F, Seipel K and Chua N H. 1992.** Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcription activator. *Molecular and Cellular Biology*, **12**:4809-4816.
- Katsir L, Schillmiller A L, Staswick P E, He S Y and Howe G A. 2008.** COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**:7100-7105.
- Kaul S, Koo H L, Jenkins J, Rizzo M, Rooney T, Tallon L J, Feldblyum T, Nierman W, Benito M I, Lin X Y, Town C D, Venter J C, Fraser C M, Tabata S, Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Asamizu E, Kato T, Kotani H, Sasamoto S, Ecker J R, Theologis A, Federspiel N A, Palm C J, Osborne B I, Shinn P, Conway A B, Vysotskaia V S, Dewar K, Conn L, Lenz C A, Kim C J, Hansen N F, Liu S X, Buehler E, Altafi H, Sakano H, Dunn P, Lam B, Pham P K, Chao Q, Nguyen M, Yu G X, Chen H M, Southwick A, Lee J M, Miranda M, Toriumi M J, Davis R W, Wambutt R, Murphy G, Dusterhoft A, Stiekema W, Pohl T, Entian K D, Terryn N, Volckaert G, Salanoubat M, Choisne N, Rieger M, Ansorge W, Unseld M, Fartmann B, Valle G, Artiguenave F, Weissenbach J, Quetier F, Wilson R K, de la Bastide M, Sekhon M, Huang E, Spiegel L, Gnoj L, Pepin K, Murray J, Johnson D, Habermann K, Dedhia N, Parnell L, Preston R, Hillier L, Chen E, Marra M, Martienssen R, McCombie W R, Mayer K, White O, Bevan M, Lemcke K, Creasy T H, Bielke C, Haas B, Haase D, Maiti R, Rudd S, Peterson J, Schoof H, Frishman D, Morgenstern B, Zaccaria P, Ermolaeva M, Perteu M, Quackenbush J, Volfovsky N, Wu D Y, Lowe T M, Salzberg S L, Mewes H W, Rounsley S, Bush D, Subramaniam S, Levin I, Norris S, Schmidt R, Acarkan A, Bancroft I, Brennicke A, Eisen J A, Bureau T, Legault B A, Le Q H, Agrawal N, Yu Z, Copenhaver G P, Luo S, Pikaard C S, Preuss D, Paulsen I T, Sussman M, Britt A B, Selinger D A, Pandey R, Mount D W, Chandler V L, Jorgensen R A, Pikaard C, Juergens G, Meyerowitz E M, Dangl J, Jones J D G, Chen M, Chory J, Somerville M C and Ar Gen I. 2000.** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**:796-815.
- Kelly J K. 1997.** A test of neutrality based on interlocus associations. *Genetics*, **146**:1197-1206.
- Kesarwani M, Yoo J M and Dong X N. 2007.** Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **144**:336-346.
- Kim H S and Delaney T P. 2002.** Over-expression of TGA5, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in *Arabidopsis thaliana* to *Peronospora parasitica*. *Plant Journal*, **32**:151-163.
- Kimura M. 1983.** *The neutral theory of molecular evolution*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Kinkema M, Fan W H and Dong X N. 2000.** Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell*, **12**:2339-2350.
- Klarzynski O, Plesse B, Joubert J M, Yvin J C, Kopp M, Kloareg B and Fritig B. 2000.** Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*, **124**:1027-1037.
- Klarzynski O, Descamps V, Plesse B, Yvin J C, Kloareg B and Fritig B. 2003.** Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**:115-122.
- Koga J, Yamauchi T, Shimura M, Ogawa N, Oshima K, Umemura K, Kikuchi M and Ogasawara N. 1998.** Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *Journal of Biological Chemistry*, **273**:31985-31991.
- Koonin E V. 2005.** Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics*, **39**:309-338.

- Kortekamp A, Wind R and Zyprian E. 1997.** The role of callose deposits during infection of two downy mildew-tolerant and two-susceptible *Vitis* cultivars. *Vitis*, **36**:103-104.
- Kortekamp A. 2006.** Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**:58-67.
- Kuc J. 1995.** Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, **33**:275-297.
- Kunkel B N and Brooks D M. 2002.** Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**:325-331.
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T and Felix G. 2004.** The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, **16**:3496-3507.
- Lam E, Kato N and Lawton M. 2001.** Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, **411**:848-853.
- Lamb C and Dixon R A. 1997.** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**:251-275.
- Lamb C J. 1994.** Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. *Cell*, **76**:419-422.
- Lamb C J, Lawton M A, Dron M and Dixon R A. 1989.** Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*, **56**:215-224.
- Laquitaine L, Gomes E, Francois J, Marchive C, Pascal S, Hamdi S, Atanassova R, Delrot S and Coutos-Thevenot P. 2006.** Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against *Botrytis cinerea*: Induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**:1103-1112.
- Lawton K A, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessmann H, Staub T and Ryals J. 1996.** Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal*, **10**:71-82.
- Le Henanff G, Heitz T, Mestre P, Mutterer J, Walter B and Chong J. 2009.** Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of *Pathogenesis-Related* gene expression. *Bmc Plant Biology*, **9**.
- Le Hénanff G. 2009.** Caractérisation fonctionnelle de genes de signalisation intervenant dans les réponses de défense aux agents pathogènes chez la vigne, pp. 201.
- Lebel E, Heifetz P, Thorne L, Uknes S, Ryals J and Ward E. 1998.** Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **16**:223-233.
- Lee J, Klessig D F and Nurnberger T. 2001.** A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene *HIN1* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell*, **13**:1079-1093.
- Leeman M, Vanpelt J A, Denouden F M, Heinsbroek M, Bakker P and Schippers B. 1995.** Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to *Fusarium* wilt, using a novel bioassay. *European Journal of Plant Pathology*, **101**:655-664.
- Lepoivre P. 2003.** *Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*, Brussels, Belgium: De Boeck Université et Presses Agronomiques de Gembloux.
- Leroux P, Fritz R, Debieu D, Albertini C, Lanen C, Bach J, Gredt M and Chapeland F. 2002.** Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, **58**:876-888.

- Lewontin R C and Krakauer J. 1973.** Distribution of gene frequency as a test of theory of selective neutrality of polymorphisms. *Genetics*, **74**:175-195.
- Li J, Hsia A P and Schnable P S. 2007.** Recent advances in plant recombination. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**:131-135.
- Li W H, Ellsworth D L, Krushkal J, Chang B H J and HewettEmmett D. 1996.** Rates of nucleotide substitution in primates and rodents and the generation time effect hypothesis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **5**:182-187.
- Li W H, Wu C I and Luo C C. 1985.** A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Molecular Biology and Evolution*, **2**:150-174.
- Lin W C, Lu C F, Wu J W, Cheng M L, Lin Y M, Yang N S, Black L, Green S K, Wang J F and Cheng C P. 2004.** Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis NPR1* gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Research*, **13**:567-581.
- Litt M and Luty J A. 1989.** A hypervariable microsatellite revealed by invitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac-muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, **44**:397-401.
- Liu G S, Holub E B, Alonso J M, Ecker J R and Fobert P R. 2005.** An *Arabidopsis* NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. *Plant Journal*, **41**:304-318.
- Liu X J and Lam E. 1994.** Two binding-sites for the plant transcription factor ASF-1 can respond to auxin treatments in transgenic tobacco. *Journal of Biological Chemistry*, **269**:668-675.
- Liu Y L, Schiff M, Marathe R and Dinesh-Kumar S P. 2002.** Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Journal*, **30**:415-429.
- Loake G and Grant M. 2007.** Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**:466-472.
- Luck J E, Lawrence G J, Dodds P N, Shepherd K W and Ellis J G. 2000.** Regions outside of the leucine-rich repeats of flax rust resistance proteins play a role in specificity determination. *Plant Cell*, **12**:1367-1377.
- Lynch M and Force A. 2000.** The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics*, **154**:459-473.
- Lynch M, O'Hely M, Walsh B and Force A. 2001.** The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate. *Genetics*, **159**:1789-1804.
- Mahalingam R, Gomez-Buitrago A, Eckardt N, Shah N, Guevara-Garcia A, Day P, Raina R and Fedoroff N V. 2003.** Characterizing the stress/defense transcriptome of *Arabidopsis*. *Genome Biology*, **4**.
- Mahanil S, Reisch B I, Owens C L, Thipyapong P and Laosuwan P. 2007.** Resistance gene analogs from *Vitis cinerea*, *Vitis rupestris*, and *Vitis* hybrid Horizon. *American Journal of Enology and Viticulture*, **58**:484-493.
- Maia S F, Mangolin C A, Collet S A O and Machado M F P S.** Genetic diversity in somatic mutants of grape (*Vitis vinifera*) cultivar Italia based on random amplified polymorphic DNA.
- Maillot P, Lebel S, Schellenbaum P, Jacques A and Walter B. 2009.** Differential regulation of *SERK*, *LEC1-Like* and *Pathogenesis-Related* genes during indirect secondary somatic embryogenesis in grapevine. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**:743-752.
- Majewski J and Ott J. 2002.** Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Research*, **12**:1827-1836.

- Malamy J, Carr J P, Klessig D F and Raskin I. 1990.** Salicylic Acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, **250**:1002-1004.
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton K A, Dangl J L and Dietrich R A. 2000.** The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics*, **26**:403-410.
- Malnoy M, Jin Q, Borejsza-Wysocka E E, He S Y and Aldwinckle H S. 2007.** Overexpression of the apple *MpNPR1* gene confers increased disease resistance in *malus x domestica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**:1568-1580.
- Martin G B. 1999.** Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**:273-279.
- Martin G B, Bogdanove A J and Sessa G. 2003.** Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology*, **54**:23-61.
- Martinez C, Blanc F, Le Claire E, Besnard O, Nicole M and Baccou J C. 2001.** Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiology*, **127**:334-344.
- Mattinen L, Tshuikina M, Mae A and Pirhonen M. 2004.** Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**:1366-1375.
- Mauch F, Mauch-Mani B and Boller T. 1988.** Antifungal Hydrolases in Pea Tissue : II. Inhibition of Fungal Growth by Combinations of Chitinase and {beta}-1,3-Glucanase. *Plant Physiol.*, **88**:936-942.
- Mauricio R, Stahl E A, Korves T, Tian D C, Kreitman M and Bergelson J. 2003.** Natural selection for polymorphism in the disease resistance gene *Rps2* of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **163**:735-746.
- McCallum C M, Comai L, Greene E A and Henikoff S. 2000.** Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology*, **18**:455-457.
- McDonald J H and Kreitman M. 1991.** Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature*, **351**:652-654.
- McDowell J M, Cuzick A, Can C, Beynon J, Dangl J L and Holub E B. 2000.** Downy mildew (*Peronospora parasitica*) resistance genes in *Arabidopsis* vary in functional requirements for NDR1, EDS1, NPR1 and salicylic acid accumulation. *The Plant Journal*, **22**:523-529.
- McDowell J M and Woffenden B J. 2003.** Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*, **21**:178-183.
- McDowell J M and Simon S A. 2006.** Recent insights into *R* gene evolution. *Molecular Plant Pathology*, **7**:437-448.
- McGuinness D H, Dehal P K and Pleass R J. 2003.** Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends in Parasitology*, **19**:312-319.
- Mendgen K and Hahn M. 2002.** Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*, **7**:352-356.
- Merdinoglu D, Wiedeman-Merdinoglu S, Coste P, Dumas V, Haetty S, Butterlin G and Greif C. 2003.** Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. In *VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding* 451-456.
- Metraux J P, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W and Inverardi B. 1990.** Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, **250**:1004-1006.

- Meur G, Budatha M, Gupta A D, Prakash S and Kirti P B. 2006.** Differential induction of NPR1 during defense responses in *Brassica juncea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **68**:128-137.
- Meyer A, Puhler A and Niehaus K. 2001.** The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta*, **213**:214-222.
- Meyers B C, Dickerman A W, Michelmore R W, Sivaramakrishnan S, Sobral B W and Young N D. 1999.** Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal*, **20**:317-332.
- Meyers B C, Kozik A, Griego A, Kuang H H and Michelmore R W. 2003.** Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **15**:809-834.
- Meziane H, Van der Sluis I, Van Loon L C, Hofte M and Bakker P. 2005.** Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*, **6**:177-185.
- Mighell A J, Smith N R, Robinson P A and Markham A F. 2000.** Vertebrate pseudogenes. *Febs Letters*, **468**:109-114.
- Moffat A S. 2000.** Genetics - Transposons help sculpt a dynamic genome. *Science*, **289**:1455-+.
- Monteiro S, Barakat M, Picarra-Pereira M A, Teixeira A R and Ferreira R B. 2003.** Osmotin and thaumatin from grape: A putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology*, **93**:1505-1512.
- Moroldo M, Paillard S, Marconi R, Fabrice L, Canaguier A, Cruaud C, De Berardinis V, Guichard C, Brunaud V, Le Clainche I, Scalabrin S, Testolin R, Di Gaspero G, Morgante M and Adam-Blondon A-F. 2008.** A physical map of the heterozygous grapevine 'Cabernet Sauvignon' allows mapping candidate genes for disease resistance. *BMC Plant Biology*, **8**:66.
- Mou Z, Fan W H and Dong X N. 2003.** Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, **113**:935-944.
- Mpiga P, Belanger R R, Paulitz T C and Benhamou N. 1997.** Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **50**:301-320.
- Muruganantham M, Moskovitz Y, Haviv S, Horesh T, Fenigstein A, du Preez J, Stephan D, Burger J T and Mawassi M. 2009.** Grapevine virus A-mediated gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Vitis vinifera*. *Journal of Virological Methods*, **155**:167-174.
- Nadeau J H and Sankoff D. 1997.** Comparable rates of gene loss and functional divergence after genome duplications early in vertebrate evolution. *Genetics*, **147**:1259-1266.
- Nakamura Y, Leppert M, Oconnell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E and White R. 1987.** Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for Human gene mapping. *Science*, **235**:1616-1622.
- Nei M and Gojobori T. 1986.** Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, **3**:418-426.
- Neuhaus G, Neuhausurl G, Katagiri F, Seipel K and Chua N H. 1994.** Tissue-specific expression of *as-1* in transgenic Tobacco. *Plant Cell*, **6**:827-834.
- Newman M A, von Roepenack-Lahaye E, Parr A, Daniels M J and Dow J M. 2002.** Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant Journal*, **29**:487-495.

- Nickerson D A, Taylor S L, Weiss K M, Clark A G, Hutchinson R G, Stengard J, Salomaa V, Vartiainen E, Boerwinkle E and Sing C F. 1998.** DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nature Genetics*, **19**:233-240.
- Nielsen R. 2001.** Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics. *Heredity*, **86**:641-647.
- Nielsen R. 2005.** Molecular signatures of natural selection. *Annual Review of Genetics*, **39**:197-218.
- Niggeweg R, Thurow C, Kegler C and Gatz C. 2000.** Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of *as-1*-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of *as-1*-containing target promoters. *Journal of Biological Chemistry*, **275**:19897-19905.
- Niggeweg R, Thurow C, Weigel R, Pfitzner U and Gatz C. 2000.** Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA-binding properties. *Plant Molecular Biology*, **42**:775-788.
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H and Foyer C H. 2002.** Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany*, **53**:1283-1304.
- Nordborg M and Innan H. 2002.** Molecular population genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**:69-73.
- Nowak M A, Boerlijst M C, Cooke J and Smith J M. 1997.** Evolution of genetic redundancy. *Nature*, **388**:167-171.
- Nurnberger T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks W R, Hahlbrock K and Scheel D. 1994.** High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma-membranes triggers multiple defense responses. *Cell*, **78**:449-460.
- Nurnberger T and Lipka V. 2005.** Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*, **6**:335-345.
- O'Donnell P J, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser H M O and Bowles D J. 1996.** Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, **274**:1914-1917.
- Ohno S. 1970.** *Evolution by gene duplication*, Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag.
- Osborn T C, Pires J C, Birchler J A, Auger D L, Chen Z J, Lee H S, Comai L, Madlung A, Doerge R W, Colot V and Martienssen R A. 2003.** Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics*, **19**:141-147.
- Osbourn A E. 2003.** Saponins in cereals. *Phytochemistry*, **62**:1-4.
- Osman H, Vauthrin S, Mikes V, Milat M L, Panabieres F, Marais A, Brunie S, Maume B, Ponchet M and Blein J P. 2001.** Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Molecular Biology of the Cell*, **12**:2825-2834.
- Otto S P and Whitton J. 2000.** Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, **34**:401-437.
- Ouyang S and Buell C R. 2004.** The TIGR Plant Repeat Databases: a collective resource for the identification of repetitive sequences in plants. *Nucleic Acids Research*, **32**:D360-D363.
- Pajerowska K M, Parker J E and Gebhardt C. 2005.** Potato homologs of *Arabidopsis thaliana* genes functional in defense signaling - Identification, genetic mapping, and molecular cloning. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**:1107-1119.
- Pan Y, Pylatuik J D, Ouyang J, Famili A F and Fobert P R. 2004.** Discovery of functional genes for systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana* through integrated data mining. *J Bioinform Comput Biol*, **2**:639-655.

- Papp B, Pal C and Hurst L D. 2003.** Evolution of cis-regulatory elements in duplicated genes of yeast. *Trends in Genetics*, **19**:417-422.
- Pascuzzi P, Hamilton D, Bodily K and Arias J. 1998.** Auxin-induced stress potentiates trans-activation by a conserved plant basic/leucine-zipper factor. *Journal of Biological Chemistry*, **273**:26631-26637.
- Pauquet J, Bouquet A, This P and Adam-Blondon A F. 2001.** Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **103**:1201-1210.
- Pearson C E, Edamura K N and Cleary J D. 2005.** Repeat instability: Mechanisms of dynamic mutations. *Nature Reviews Genetics*, **6**:729-742.
- Pelsy F. 2010.** Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties. *Heredity*, **104**:331-340.
- Pelsy F, Hocquigny S, Moncada X, Barbeau G, Forget D, Hinrichsen P and Merdinoglu D. 2010.** An extensive study of the genetic diversity within seven French wine grape variety collections. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **120**:1219-1231.
- Pemberton C L and Salmond G P C. 2004.** The Nep1-like proteins - a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Molecular Plant Pathology*, **5**:353-359.
- Penninckx I, Eggermont K, Terras F R G, Thomma B, DeSamblanx G W, Buchala A, Metraux J P, Manners J M and Broekaert W F. 1996.** Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, **8**:2309-2323.
- Penninckx I, Thomma B, Buchala A, Metraux J P and Broekaert W F. 1998.** Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**:2103-2113.
- Perazzolli M, Dagostin S, Ferrari A, Elad Y and Pertot I. 2008.** Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological Control*, **47**:228-234.
- Pieterse C M J, vanWees S C M, Hoffland E, vanPelt J A and vanLoon L C. 1996.** Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, **8**:1225-1237.
- Pieterse C M J, van Wees S C M, van Pelt J A, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek P J and van Loon L C. 1998.** A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**:1571-1580.
- Pieterse C M J and van Loon L C. 1999.** Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, **4**:52-58.
- Pieterse C M J, Van Wees S C M, Ton J, Van Pelt J A and Van Loon L C. 2002.** Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, **4**:535-544.
- Pieterse C M J and Van Loon L. 2004.** NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**:456-464.
- Pitte J. 2004.** *Le vin et le divin*: Fayard.
- Planchon J E. 1887.** *Ampelideae in "Monographia phanerogamorum prodromi" de A et C. de Candolle*, Paris: Editions Masson.
- Poinssot B, Vandelle E, Bentejac M, Adrian M, Levis C, Brygoo Y, Garin J, Sicilia F, Coutos-Thevenot P and Pugin A. 2003.** The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**:553-564.

- Polesani M, Desario F, Ferrarini A, Zamboni A, Pezzotti M, Kortekamp A and Polverari A. 2008.** CDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *Bmc Genomics*, **9**.
- Pontier D, Miao Z H and Lam E. 2001.** Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *Plant Journal*, **27**:529-538.
- Potlakayala S D, DeLong C, Sharpe A and Fobert P R. 2007.** Conservation of NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 function between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **71**:174-183.
- Pouget R. 1990.** *Histoire de la lutte contre le phylloxéra de la vigne en France (1868-1895)*: INRA Editions.
- Pylatuik J D and Fobert P R. 2005.** Comparison of transcript profiling on *Arabidopsis* microarray platform technologies. *Plant Molecular Biology*, **58**:609-624.
- Qin X F, Holuigue L, Horvath D M and Chua N H. 1994.** Immediate-early transcription activation by salicylic-acid via the Cauliflower Mosaic-Virus *as-1* element. *Plant Cell*, **6**:863-874.
- Qutob D, Kamoun S and Gijzen M. 2002.** Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *Plant Journal*, **32**:361-373.
- Rafalski A. 2002.** Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**:94-100.
- Rairdan G J and Delaney T P. 2002.** Role of salicylic acid and NIM1/NPR1 in race-specific resistance in *Arabidopsis*. *Genetics*, **161**:803-811.
- Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V and Samiyappan R. 2001.** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, **20**:1-11.
- Ramonell K M, Zhang B, Ewing R M, Chen Y, Xu D, Stacey G and Somerville S. 2002.** Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, **3**:301-311.
- Rausher M D. 2001.** Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature*, **411**:857-864.
- Rayapuram C and Baldwin I T. 2007.** Increased SA in *NPR1*-silenced plants antagonizes JA and JA-dependent direct and indirect defenses in herbivore-attacked *Nicotiana attenuata* in nature. *Plant Journal*, **52**:700-715.
- Renault A S, Deloire A and Bierne J. 1996.** Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Vitis*, **35**:49-52.
- Reuveni M. 1998.** Relationships between leaf age, peroxidase and beta-1,3-glucanase activity, and resistance to downy mildew in grapevines. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, **146**:525-530.
- Riaz S, Dangl G S, Edwards K J and Meredith C P. 2004.** A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **108**:864-872.
- Richards R I. 2001.** Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Human Molecular Genetics*, **10**:2187-2194.
- Richman A D and Kohn J R. 1999.** Self-incompatibility alleles from *Physalis*: Implications for historical inference from balanced genetic polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**:168-172.

- Riechmann J L, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C Z, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe O J, Samaha R R, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang J Z, Ghandehari D, Sherman B K and Yu C L. 2000.** *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290**:2105-2110.
- Robert N, Ferran J, Breda C, Coutos-Thevenot P, Boulay M, Buffard D and Esnault R. 2001.** Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*: Expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *European Journal of Plant Pathology*, **107**:249-261.
- Robert N, Roche K, Lebeau Y, Breda C, Boulay M, Esnault R and Buffard D. 2002.** Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Science*, **162**:389-400.
- Rochon A, Boyle P, Wignes T, Fobert P R and Despres C. 2006.** The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell*, **18**:3670-3685.
- Ron M and Avni A. 2004.** The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell*, **16**:1604-1615.
- Rose L E, Bittner-Eddy P D, Langley C H, Holub E B, Michelmore R W and Beynon J L. 2004.** The maintenance of extreme amino acid diversity at the disease resistance gene, *RPP13*, in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **166**:1517-1527.
- Rose L E, Langley C H, Bernal A J and Michelmore R W. 2005.** Natural variation in the *Pto* pathogen resistance gene within species of wild tomato (*Lycopersicon*). I. Functional analysis of *Pto* alleles. *Genetics*, **171**:345-357.
- Rose L E, Michelmore R W and Langley C H. 2007.** Natural variation in the *Pto* disease resistance gene within species of wild tomato (*Lycopersicon*). II. Population genetics of *Pto*. *Genetics*, **175**:1307-1319.
- Rossard S, Luini E, Perault J M, Bonmort J and Roblin G. 2006.** Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergosterol in cotyledons of *Mimosa pudica*. *Journal of Experimental Botany*, **57**:1245-1252.
- Rowley A and Ribaut J. 2003.** *Le vin - Une histoire de goût*: Gallimard.
- Royle N J, Clarkson R E, Wong Z and Jeffreys A J. 1988.** Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of Human autosomes. *Genomics*, **3**:352-360.
- Rozas J and Rozas R. 1999.** DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, **15**:174-175.
- Ryals J A, Neuenschwander U H, Willits M G, Molina A, Steiner H Y and Hunt M D. 1996.** Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **8**:1809-1819.
- Ryals J, Weymann K, Lawton K, Friedrich L, Ellis D, Steiner H Y, Johnson J, Delaney T P, Jesse T, Vos P and Uknes S. 1997.** The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *Plant Cell*, **9**:425-439.
- Ryu C M, Hu C H, Reddy M S and Kloepper J W. 2003.** Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist*, **160**:413-420.
- Ryu C M, Murphy J F, Mysore K S and Kloepper J W. 2004.** Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against *Cucumber mosaic virus* by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *Plant Journal*, **39**:381-392.

- Sabeti P C, Reich D E, Higgins J M, Levine H Z P, Richter D J, Schaffner S F, Gabriel S B, Platko J V, Patterson N J, McDonald G J, Ackerman H C, Campbell S J, Altshuler D, Cooper R, Kwiatkowski D, Ward R and Lander E S. 2002.** Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature*, **419**:832-837.
- Sabeti P C, Schaffner S F, Fry B, Lohmueller J, Varilly P, Shamovsky O, Palma A, Mikkelsen T S, Altshuler D and Lander E S. 2006.** Positive natural selection in the human lineage. *Science*, **312**:1614-1620.
- Saitou N and Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**:406-425.
- Salzman R A, Tikhonova I, Bordelon B P, Hasegawa P M and Bressan R A. 1998.** Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiology*, **117**:465-472.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson A R. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**:5463-5467.
- Sankoff D. 2001.** Gene and genome duplication. *Current Opinion in Genetics & Development*, **11**:681-684.
- Schiermeyer A, Thurow C and Gatz C. 2003.** Tobacco bZIP factor TGA10 is a novel member of the TGA family of transcription factors. *Plant Molecular Biology*, **51**:817-829.
- Schornack S, Meyer A, Romer P, Jordan T and Lahaye T. 2006.** Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *Journal of Plant Physiology*, **163**:256-272.
- Sedgwick S G and Smerdon S J. 1999.** The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in Biochemical Sciences*, **24**:311-316.
- Sefc K, Lefort F, Grando M, Scott K, Steinkellner H and Thomas M. 2001.** **Microsatellite markers for grapevine: a state of the art**, pp. 433-463.
- Serebriiskii I G and Golemis E A. 2001.** Two-hybrid system and false positives. Approaches to detection and elimination. *Methods Mol Biol*, **177**:123-134.
- Shah J, Tsui F and Klessig D F. 1997.** Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **10**:69-78.
- Shah J. 2003.** The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**:365-371.
- Shailasree S, Kini K R, Deepak S, Kumudini B S and Shetty H S. 2004.** Accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in pearl millet seedlings in response to *Sclerospora graminicola* infection. *Plant Science*, **167**:1227-1234.
- Sharma R P and Mohapatra T. 1996.** Molecular mapping and tagging of genes in crop plants. *Genetica*, **97**:313-320.
- Shibuya N and Minami E. 2001.** Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **59**:223-233.
- Shiu S H and Bleeker A B. 2003.** Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **132**:530-543.
- Shulaev V, Silverman P and Raskin I. 1997.** Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, **385**:718-721.
- Stahl E A, Dwyer G, Mauricio R, Kreitman M and Bergelson J. 1999.** Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpm1* locus of *Arabidopsis*. *Nature*, **400**:667-671.

- Staudt G and Kassemeyer H H. 1995.** Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species. *Vitis*, **34**:225-228.
- Sterck L, Rombauts S, Vandepoele K, Rouze P and Van de Peer Y. 2007.** How many genes are there in plants (. . . and why are they there)? *Current Opinion in Plant Biology*, **10**:199-203.
- Sticher L, Mauch-Mani B and Métraux a J. 1997.** Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **35**:235-270.
- Strompen G, Gruner R and Pfitzner U M. 1998.** An *as-1*-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco. *Plant Molecular Biology*, **37**:871-883.
- Subramaniam R, Desveaux D, Spickler C, Michnick S W and Brisson N. 2001.** Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nature Biotechnology*, **19**:769-772.
- Tajima F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**:585-595.
- Tamogami S and Kodama O. 2000.** Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (*Oryza sativa* L.) in the same manner as jasmonic acid. *Phytochemistry*, **54**:689-694.
- Tattersall D B, vanHeeswijck R and Hoj 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 Physiology*, **114**:759-769.
- Tautz D. 1989.** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, **17**:6463-6471.
- Tautz D. 1993.** Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *DNA Fingerprinting : State of the Science*, **67**:21-28.
- Thaler J S, Owen B and Higgins V J. 2004.** The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology*, **135**:530-538.
- Thiéry D, Rey P, Delière L, Calonnec A, Lecomte P, Cartolaro P, Fermaud M, Guerin L, Blancard D, M. v H, G. L, Delmotte F, M. C-C, Papura D, Schneider C, Merdinoglu-Wiedemann S, Merstre P, Prado E and Merdinoglu D. 2007.** Démarches innovantes pour une protection durable du vignoble. In *Innovations agronomiques*.
- Tian D, Traw M B, Chen J Q, Kreitman M and Bergelson J. 2003.** Fitness costs of *R*-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **423**:74-77.
- Tian D C, Araki H, Stahl E, Bergelson J and Kreitman M. 2002.** Signature of balancing selection in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**:11525-11530.
- Tiffin P and Moeller D A. 2006.** Molecular evolution of plant immune system genes. *Trends in Genetics*, **22**:662-670.
- Ton J, De Vos M, Robben C, Buchala A, Mettraux J P, Van Loon L C and Pieterse C M J. 2002.** Characterization of *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance. *Plant Journal*, **29**:11-21.
- Trouvelot S, Varnier A-L, Allègre M, Mercier L, Baillieul F, Arnould C, Gianinazzi-Pearson V, Klarzynski O, Joubert J-M, Pugin A and 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**:232-243.

- Truman W, de Zabala M T and Grant M. 2006.** Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant Journal*, **46**:14-33.
- Uknes S, Mauchmani B, Moyer M, Potter S, Williams S, Dincher S, Chandler D, Slusarenko A, Ward E and Ryals J. 1992.** Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **4**:645-656.
- Umemura K, Tanino S, Nagatsuka T, Koga J, Iwata M, Nagashima K and Amemiya Y. 2004.** Cerebroside elicitor confers resistance to *Fusarium* disease in various plant species. *Phytopathology*, **94**:813-818.
- Vallad G E and Goodman R M. 2004.** Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, **44**:1920-1934.
- Van der Hoorn R A L, De Wit P and Joosten M. 2002.** Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends in Plant Science*, **7**:67-71.
- Van Loon L C and Van Strien E A. 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**:85-97.
- Van Loon L C, Bakker P and Pieterse C M J. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **36**:453-483.
- Van Loon L C, Rep M and Pieterse C M J. 2006.** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, **44**:135-162.
- Van Wees S C M, Pieterse C M J, Trijssenaar A, VantWestende Y A M, Hartog F and VanLoon L C. 1997.** Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **10**:716-724.
- Van Wees S C M, de Swart E A M, van Pelt J A, van Loon L C and Pieterse C M J. 2000.** Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**:8711-8716.
- Vanpeer R, Niemann G J and Schippers B. 1991.** Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological-control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp strain WCS417r. *Phytopathology*, **81**:728-734.
- Varnier A L, Sanchez L, Vatsa P, Boudesocque L, Garcia-Brugger A, Rabenoelina F, Sorokin A, Renault J H, Kauffmann S, Pugin A, Clement C, Baillieul F and Dorey S. 2009.** Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant Cell and Environment*, **32**:178-193.
- Veit S, Worle J M, Nurnberger T, Koch W and Seitz H U. 2001.** A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco. *Plant Physiology*, **127**:832-841.
- 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 Z, 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 and Viola R. 2007.** A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *Plos One*, **2**.

- Venter J C, Adams M D, Myers E W, Li P W, Mural R J, Sutton G G, Smith H O, Yandell M, Evans C A, Holt R A, Gocayne J D, Amanatides P, Ballew R M, Huson D H, Wortman J R, Zhang Q, Kodira C D, Zheng X Q H, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas P D, Zhang J H, Miklos G L G, Nelson C, Broder S, Clark A G, Nadeau C, McKusick V A, Zinder N, Levine A J, Roberts R J, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarri C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z M, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian A E, Gan W, Ge W M, Gong F C, Gu Z P, Guan P, Heiman T J, Higgins M E, Ji R R, Ke Z X, Ketchum K A, Lai Z W, Lei Y D, Li Z Y, Li J Y, Liang Y, Lin X Y, Lu F, Merkulov G V, Milshina N, Moore H M, Naik A K, Narayan V A, Neelam B, Nusskern D, Rusch D B, Salzberg S, Shao W, Shue B X, Sun J T, Wang Z Y, Wang A H, Wang X, Wang J, Wei M H, Wides R, Xiao C L, Yan C H, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W Q, Zhang H Y, Zhao Q, Zheng L S, Zhong F, Zhong W Y, Zhu S P C, Zhao S Y, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H J, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng M L, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratt S E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers Y H, Rombold D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint N N, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril J F, Guigo R, Campbell M J, Sjolander K V, Karlak B, Kejariwal A, Mi H Y, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang Y H, Coyne M, Dahlke C, Mays A D, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X J, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M Y, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A and Zhu X H. 2001. The sequence of the human genome. *Science*, 291:1304-+.
- Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditzjawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H and Ryals J. 1994. Salicylic-acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired-resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell*, 6:959-965.
- Vialard F, Benahmed M, Lombroso R and Selva J. 2004. Genomic instability and male infertility. *Gynecol Obstet Fertil*, 32:1013-1022.
- Vijayan P, Shockey J, Levesque C A, Cook R J and Browse J. 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:7209-7214.
- Vitalis R, Dawson K and Boursot P. 2001. Interpretation of variation across marker loci as evidence of selection. *Genetics*, 158:1811-1823.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Vandelee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407-4414.
- Wang D, Amornsiripant N and Dong X N. 2006. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *Plos Pathogens*, 2:1042-1050.
- Ward E R, Uknes S J, Williams S C, Dincher S S, Wiederhold D L, Alexander D C, Ahlgoy P, Mettraux J P and Ryals J A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired-resistance. *Plant Cell*, 3:1085-1094.

- Waspi U, Schweizer P and Dudler R. 2001.** Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew. *Plant Cell*, **13**:153-161.
- Wasternack C and Parthier B. 1997.** Jasmonate signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science*, **2**:302-307.
- Weigel R R, Pfitzner U M and Gatz C. 2005.** Interaction of *NIMIN1* with *NPR1* modulates *PR* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17**:1279-1291.
- Welsh J and McClelland M. 1990.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**:7213-7218.
- Wendel J F. 2000.** Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*, **42**:225-249.
- Wiedemann-Merdinoglu S, Prado E, Schneider C, Coste P, Onimus C, Dumas V, Butterlin G, Bouquet A and Merdinoglu D. 2006.** Resistance to downy mildew derived from *Muscadinia rotundifolia*: genetic analysis and use of molecular markers for breeding. In *Proceedings of the in 5th International workshop on grapevine downy and powdery mildew (San Michele all'Adige, Italie)*.
- Wigge P A, Kim M C, Jaeger K E, Busch W, Schmid M, Lohmann J U and Weigel D. 2005.** Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, **309**:1056-1059.
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A and Tingey S V. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**:6531-6535.
- Wright S I and Gaut B S. 2005.** Molecular population genetics and the search for adaptive evolution in plants. *Molecular Biology and Evolution*, **22**:506-519.
- Wyman C and Kanaar R. 2004.** Homologous recombination: Down to the wire. *Current Biology*, **14**:R629-R631.
- Xiang C B, Miao Z H and Lam E. 1996.** Coordinated activation of *as-1*-type elements and a tobacco glutathione S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl-jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Molecular Biology*, **32**:415-426.
- Xiang C B, Miao Z H and Lam E. 1997.** DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of *TGA6*, a new member of the *TGA* family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **34**:403-415.
- Xiao S Y, Calis O, Patrick E, Zhang G G, Charoenwattana P, Muskett P, Parker J E and Turner J G. 2005.** The atypical resistance gene, *RPW8*, recruits components of basal defence for powdery mildew resistance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **42**:95-110.
- Xu Y, Chang P F L, Liu D, Narasimhan M L, Raghothama K G, Hasegawa P M and Bressan R A. 1994.** Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*, **6**:1077-1085.
- Yalpani N, Enyedi A J, Leon J and Raskin I. 1994.** Ultraviolet-light and ozone stimulate accumulation of salicylic-acid, pathogenesis-related proteins and virus-resistance in tobacco. *Planta*, **193**:372-376.
- Yamaguchi T, Yamada A, Hong N, Ogawa T, Ishii T and Shibuya N. 2000.** Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: beta-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell*, **12**:817-826.
- Yu D Q, Chen C H and Chen Z X. 2001.** Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell*, **13**:1527-1539.

- Yuan Y X, Zhong S H, Li Q, Zhu Z R, Lou Y G, Wang L Y, Wang J J, Wang M Y, Li Q L, Yang D L and He Z H. 2007.** Functional analysis of rice *NPR1*-like genes reveals that *OsNPR1/NH1* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnology Journal*, **5**:313-324.
- Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P and Durner J. 2004.** Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**:15811-15816.
- Zhang B, Foley R C and Singh K B. 1993.** Isolation and characterization of two related *Arabidopsis* ocselement bZIP binding proteins. *Plant Journal*, **4**:711-716.
- Zhang Y, Wang X, Cheng C, Gao Q Q, Liu J Y and Guo X Q. 2008.** Molecular cloning and characterization of *GhNPR1*, a gene implicated in pathogen responses from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Bioscience Reports*, **28**:7-14.
- Zhang Y J and Wang L J. 2005.** The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *Bmc Evolutionary Biology*, **5**.
- Zhang Y L, Cheng Y T, Qu N, Zhao Q G, Bi D L and Li X. 2006.** Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two *NPR1* paralogs. *Plant Journal*, **48**:647-656.
- Zhang Y L, Fan W H, Kinkema M, Li X and Dong X N. 1999.** Interaction of *NPR1* with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**:6523-6528.
- Zhang Y L, Tessaro M J, Lassner M and Li X. 2003.** Knockout analysis of *Arabidopsis* transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **15**:2647-2653.
- Zheng Z Y, Abu Qamar S, Chen Z X and Mengiste T. 2006.** *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant Journal*, **48**:592-605.
- Zhou J M, Trifa Y, Silva H, Pontier D, Lam E, Shah J and Klessig D F. 2000.** *NPR1* differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**:191-202.
- Zhu Y J, Qiu X H, Moore P H, Borth W, Hu J, Ferreira S and Albert H H. 2003.** Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **63**:237-248.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones J D G, Boller T and Felix G. 2006.** Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, **125**:749-760.
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley E J, Jones J D G, Felix G and Boller T. 2004.** Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, **428**:764-767.

ANNEXES

Élément régulateur	Séquence	Position VvNPR1.1	Position VvNPR1.2	Régulation d'expression
-10PEHVPSBD	TATTCT	-1840(+), -1534(+), -85(+), -1138(-), -917(-), -430(-)	-794(-)	Plaste
-300ELEMENT	TGHAAARK	-705(+), -1695(-), -1978(-), -164(-)	-1552(+)	Graine
ABRELATERD1	ACGTG		-946(+)	Déshydratation sénescence, étiolement
ABREOSRAB21	ACGTSSSC		-1302(+)	ABA, stress osmotique
ACGTABREMOTIFA2OSEM	ACGTGKC		-946(+)	ABA
ACGTATERD1	ACGT		-1933(+), -946(+)(-), -1302(-)	Déshydratation sénescence, étiolement
AMYBOX1	TAACARA	-1023(+)	-589(-)	a-amylase
AMYBOX2	TATCCAT		-1410(+)	a-amylase, stockage sucre
ANAERO1CONSENSUS	AAACAAA	-207(+), -1711(-), -529(-)		Voie anaérobie
ANAERO2CONSENSUS	AGCAGC		-946(-)	Voie anaérobie
ANAERO3CONSENSUS	TCATCAC		-473(-)	Voie anaérobie
ARFAT	TGTCTC	-1884(+), -16(+)		Auxine, liaison ARF1
ARR1AT	NGATT	-1367(+), -1041(+), -295(+), -181(+), -1932(+), -997(+), -534(+), -1857(+), -1835(+), -1444(+), -1319(+), -1257(+), -987(+), -952(+), -782(+), -311(+), -1969(-), -1679(-), -1607(-), -1275(-), -1269(-), -1246(-), -1192(-), -1179(-), -1099(-), -1072(-), -746(-), -640(-), -213(-), -103(-)	-1679(+), -1626(+), -849(+), -799(+), -628(+), -508(+), -13(+), -8(+), -895(+), -903(+), -1556(+), -1529(+), -1513(+), -1280(+), -773(+), -1998(-), -1954(-), -1932(-), -1895(-), -1861(-), -1706(-), -1674(-), -1523(-), -1351(-), -1336(-), -1182(-), -1083(-), -813(-)	Cytokines
ASF1MOTIFCAMV	TGACG		-1136(+), -1080(-)	as-1 élément, auxine, SA, lumière, stress biotique et abiotique (as-1 élément), FT TGA, SAR, résistance maladie
AUXREPSIAA4	KGTCCCAT		-1033(+)	Auxine, racine, meristème
BIHD1OS	TGTCA	-1031(+), -1362(-), -475(-)	-1847(+), -1095(-)	Liaison FT BELL
BOXIINTPATPB	ATAGAA	-427(+), -1622(-), -1532(-), -568(-)	-1979(-), -148(-)	Plaste atpB
BOXLCOREDCPAL	ACCWWCC	-452(+)	-1062(+), -62(-)	Liaison DCMYB1, elicitateur PAL
CAATBOX1	CAAT	-1921(+), -1665(+), -1176(+), -1052(+), -1026(+), -891(+), -816(+), -478(+), -446(+), -1993(-), -1892(-), -1846(-), -1603(-), -1518(-), -1280(-), -1236(-), -1039(-), -971(-), -954(-), -594(-), -355(-), -323(-), -313(-), -309(-)	-1999(+), -1945(+), -1929(+), -1671(+), -1230(+), -1105(+), -1084(+), -890(+), -424(+), -232(+), -1856(-), -1828(-), -1739(-), -1624(-), -1554(-), -901(-), -872(-), -718(-), -679(-), -476(-), -422(-), -214(-), -6(-)	Graine

Élément régulateur	Séquence	Position VvNPR1.1	Position VvNPR1.2	Régulation d'expression
CACTFTPPCA1	YACT	-1646(+), -1436(+), -174(+), -71(+), -32(+), -1900(+), -1874(+), -1813(+), -1687(+), -558(+), -443(+), -62(+), -1827(-), -1801(-), -1588(-), -1571(-), -1497(-), -1418(-), -1202(-), -1009(-), -982(-), -929(-), -260(-)	-1215(+), -1169(+), -361(+), -68(+), -1382(+), -843(+), -317(+), -1644(-), -1594(-), -1591(-), -1574(-), -1534(-), -1292(-), -1129(-), -856(-), -730(-), -467(-), -390(-), -280(-), -272(-), -138(-), -107(-), -95(-), -34(-)	Mésophylle
CAREOSREP1	CAACTC	-1092(+), -1505(-), -539(-), -267(-)	-522(-)	Gibbérelline, graine
CARGCW8GAT	CWWWWWWW WG	-1898(+)(-), -1865(+)(-), -1530(+)(-), -1457(+)(-), -1327(+)(-), -816(+)(-)	-1719(+)(-)	Liaison des FT à MADS domaine
CATATGGMSAUR	CATATG	-1261(+)(-)	-1472(+)(-), -1208(+)(-), -1164(+)(-), -186(+)(-)	Auxine
CBFHV	RYCGAC		-1221(+), -1019(+), -1446(+)(-), -299(-)	Déshydratation, froid
CCA1ATLHCB1	AAMAATCT	-1041(-)		Liaison à CCA1
CCAATBOX1	CCAAT	-447(+), -1603(-), -1518(-)	-1231(+), -233(+), -1624(-), -872(-), -422(-)	Augmente expression gènes HS
CDA1ATCAB2	CAAAACGC		-1040(-), -910(-)	Liaison DtRE (noir)
CEREGLUBOX1P SLEGA	TGTTAAAGT		-1650(+)	Graine
CGACGOSAMY3	CGACG		-1017(+)	a-amylase, stockage sucre
CIACADIANLEL HC	CAANNNNATC	-1370(-), -294(-)	-753(-), -12(-)	Expression circadienne (lumière, feuille, pousse)
CMSREI1BSPOA	TGGACGG		-420(+)	Carbohydate, sucre
CPBCSPOR	TATTAG	-831(+), -945(-)	-1683(+)	Cytokinine
CRTDREHVCBF2	GTCGAC		-1446(+)(-)	Froid
CTRMCAV35S	TCTCTCTCT	-123(+), -121(+)		Enhancer, CAMV 35S
CURECORECR	GTAC	-1946(+)(-), -1800(+)(-), -237(+)(-)	-1948(+)(-), -1291(+)(-), -939(+)(-)	Oxygène
DOFCOREZM	AAAG	-1912(+), -1829(+), -1822(+), -1818(+), -1761(+), -1542(+), -1484(+), -1420(+), -1250(+), -1018(+), -1011(+), -919(+), -691(+), -1978(-), -1904(-), -1635(-), -1431(-), -1206(-), -1185(-), -1121(-), -795(-), -589(-), -556(-), -546(-), -164(-), -126(-), -114(-), -79(-), -69(-), -21(-)	-1646(+), -1638(+), -1628(+), -564(+), -1488(+), -1453(+), -1101(+), -981(+), -560(+), -97(+), -36(+), -1840(-), -1703(-), -1333(-), -1225(-), -1198(-), -1190(-), -1152(-), -990(-), -986(-), -841(-), -758(-), -655(-), -634(-), -599(-), -442(-), -310(-), -227(-), -81(-), -66(-)	Liaison des FT DOF
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	-1512(-), -1499(-)	-1442(+), -282(-)	Liaison des b-ZIP FT (ABA)
DRE2COREZMR AB17	ACCGAC		-1221(+), -1019(+), -299(-)	SA, ABA
DRERTCOREAT	RCCGAC		-1221(+), -1019(+), -299(-)	Déshydratation, froid
E2FCONSENSUS	WTTSSCSS	-78(+)		Liaison à E2F

Élément régulateur	Séquence	Position VvNPR1.1	Position VvNPR1.2	Régulation d'expression
EBOXBNNAPA	CANNTG	-1951(+)(-), -1573(+)(-), -1512(+)(-), -1499(+)(-), -1339(+)(-), -1261(+)(-), -204(+)(-), -158(+)(-), -136(+)(-)	-1940(+)(-), -1472(+)(-), -1464(+)(-), -1208(+)(-), -1164(+)(-), -424(+)(-), -274(+)(-), -259(+)(-), -253(+)(-), -186(+)(-)	Lumière
EECCRCAH1	GANTTNC	-1856(+), -1505(+), -951(+), -1427(-), -1093(-), -106(-)	-1512(+), -772(+), -627(+), -1973(-), -432(-), -403(-), -74(-)	Liaison aux FT MYB LCR1
ELRECOREPCRP1	TTGACC	-278(-)	-1149(+), -516(-)	Liaison WRKY1 et WRKY2, PR1, SA
ERELEE4	AWTTCAAA	-1425(+), -619(-)	-499(-), -493(-)	Sénescence
GADOWNAT	ACGTGTC		-946(+)	Graine
GAREAT	TAACAAR	-1023(+), -220(+)		Germination graine
GARE1OSREP1	TAACAGA		-589(-)	Gibbérelline
GATABOX	GATA	-1917(+), -1909(+), -1675(+), -1536(+), -1370(+), -370(+), -352(+), -320(+), -1619(-), -1416(-), -1303(-), -1220(-), -1085(-), -992(-), -54(-)	-1935(+), -1913(+), -1710(+), -1635(+), -1272(+), -1267(+), -1013(+), -689(+), -676(+), -479(+), -1666(-), -1410(-), -1201(-), -1176(-), -996(-), -930(-), -687(-), -262(-)	Liaison des FT GATA, (Forte expression, lumière, nitrate)
GGTCCCATGMSAUR	GGTCCCAT		-1033(+)	Auxine
GT1CONSENSUS	GRWAAW	-1940(+), -1939(+), -1917(+), -1334(+), -1153(+), -1015(+), -704(+), -352(+), -320(+), -229(+), -1670(-), -1578(-), -1305(-), -1111(-), -950(-), -926(-), -896(-), -729(-), -551(-), -1977(-), -1651(-), -1398(-), -1344(-), -1222(-), -1162(-), -1126(-), -1110(-), -994(-), -574(-), -163(-)	-1935(+), -1710(+), -1503(+), -1317(+), -1308(+), -1267(+), -1511(-), -610(-), -1668(-), -1224(-), -1197(-), -593(-), -287(-), -176(-), -175(-), -151(-)	Liaison des FT GT1, (lumière, stabilise complexe transc, SA , pathogènes , sels)
GT1GMSCAM4	GAAAAA	-1939(+), -704(+), -229(+), -1977(-), -1651(-), -1344(-), -1162(-), -1126(-), -574(-), -163(-)	-593(-), -176(-), -151(-)	Pathogène
GT1MOTIFPSRB CS	KWGTGRWAAW RW	-1653(-)		Liaison avec FT GT-1
GTGANTG10	GTGA	-1507(+), -1445(+), -259(+), -1965(-), -1647(-), -1437(-), -1265(-), -1029(-), -175(-), -33(-)	-1461(+), -1242(+), -1137(+), -1128(+), -1096(+), -774(+), -729(+), -641(+), -547(+), -473(+), -238(+), -1170(-), -1064(-), -409(-), -362(-), -69(-)	Pollen
IBOX	GATAAG	-1087(-)	-1272(+), -1412(-), -932(-), -264(-)	Liaison LeMYB1
IBOXCORE	GATAA	-1917(+), -1909(+), -370(+), -352(+), -320(+), -1304(-), -1221(-), -1086(-), -993(-)	-1935(+), -1710(+), -1272(+), -1267(+), -1667(-), -1411(-), -931(-), -263(-)	Lumière
IBOXCORENT	GATAAGR	-1088(-)	-1272(+), -1413(-), -933(-)	Lumière
INRNTPSADB	YTCANTYY	-1648(+), 1561(+), -893(+), -1894(-), -973(-), -262(-)	-1171(+), -1697(+), -363(+), -70(+), -22(+), -1907(-), -1549(-)	Initiateur, lumière
LTRECOREATCOR15	CCGAC		-1220(+), -1018(+), -484(-), -299(-)	ABA, froid, sécheresse
MARABOX1	AATAAAYAAA	-1706(-), -1702(-)		A-Box

Élément régulateur	Séquence	Position VvNPR1.1	Position VvNPR1.2	Régulation d'expression
MARARS	WTTTATRITTW	-496(-)		Élément ARS
MARTBOX	TTWTWTTWTT	-1659(+), -1658(+), -1657(+), -1656(+), -661(+), -520(+), -91(+), -1289(-), -908(-), -907(-), -755(-), -754(-), -738(-), -629(-), -497(-)	-840(+), -839(+)	Liaison
MYB1AT	WAACCA	-1809(+), -454(+), -1601(-), -716(-), -523(-)	-1723(+)	Liaison à MYB, déshydratation
MYB1LEPR	GTTAGTT		-181(+)	MYB
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	-275(+), -1394(-)	-253(-)	Liaison à MYB, déshydratation
MYBCORE	CNGTTR	-1394(+), -275(-)	-1651(+), -588(+), -552(+), -397(+), -253(+)	Liaison à MYB (ATMYB1 et ATMYB2)
MYBCOREATCYCB1	AACGG	-274(+), -1394(-)		Cyclin B1
MYBGAHV	TAACAAA	-1023(+)		Liaison à MYB
MYBPLANT	MACCWAMC	-453(+), -775(-), -719(-), -526(-)	-62(-)	Liaison à MYB
MYBPZM	CCWACC	-451(+)	-62(-)	Liaison à P-gene
MYBST1	GGATA		-480(+), -1410(-), -930(-), -687(-)	Liaison à MybSt1
MYCATERD1	CATGTG	-1512(+)	-1464(+)	Déshydratation, senescence
MYCATRD22	CACATG	-1512(-)	-1464(-)	Liaison à MYC (rd22BP1)
MYCCONSENSUSAT	CANNTG	-1951(+)(-), -1573(+)(-), -1512(+)(-), -1499(+)(-), -1339(+)(-), -1261(+)(-), -204(+)(-), -158(+)(-), -136(+)(-)	-1940(+)(-), -1472(+)(-), -1464(+)(-), -1208(+)(-), -1164(+)(-), -424(+)(-), -274(+)(-), -259(+)(-), -253(+)(-), -186(+)(-)	Liaison à MYC
NODCON1GM	AAAGAT	-1912(+), -1542(+), -797(-)	-1638(+), -1628(+), -1564(+), -1705(-), -1335(-), -1200(-), -636(-)	Nodule
NODCON2GM	CTCTT	-1644(+), -1472(+), 1089(+), -116(+), -81(+)	-1192(+), -760(+), -312(+), -559(-), -524(-)	Nodule
NTBBF1ARROLB	ACTTTA	-1186(+), -590(+), -1830(-), -1762(-)	-443(+), -1647(-), -37(-)	Liaison à DOF (NtBBF1)
OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	-1912(+), -1542(+), -797(-)	-1638(+), -1628(+), -1564(+), -1705(-), -1335(-), -1200(-), -636(-)	Nodule racinaire
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	-1644(+), -1472(+), -1089(+), -116(+), -81(+)	-1192(+), -760(+), -212(+), -559(-), -524(-)	Nodule racinaire
PALBOXAPC	CCGTCC		-703(-), -419(-)	Promoteur du gène PAL
POLASIG1	AATAAA	-1764(+), -977(+), -738(+), -381(+), -1842(-), -1773(-), -1715(-), -1706(-), -1702(-), -1698(-), -1239(-), -1065(-), -962(-), -647(-), -597(-), -582(-), -554(-), -516(-), -87(-)	-1888(+), -1726(+), -1104(+), -1878(-), -1781(-), -1734(-), -875(-)	Signal de polyadenylation
POLASIG2	AATTAAA	-815(+), -679(+), -1722(-), -958(-), -652(-), -330(-)	-1872(+), -1867(+), -1763(+), -1777(-), -1772(-), -1691(-), -598(-)	Signal de polyadenylation

165

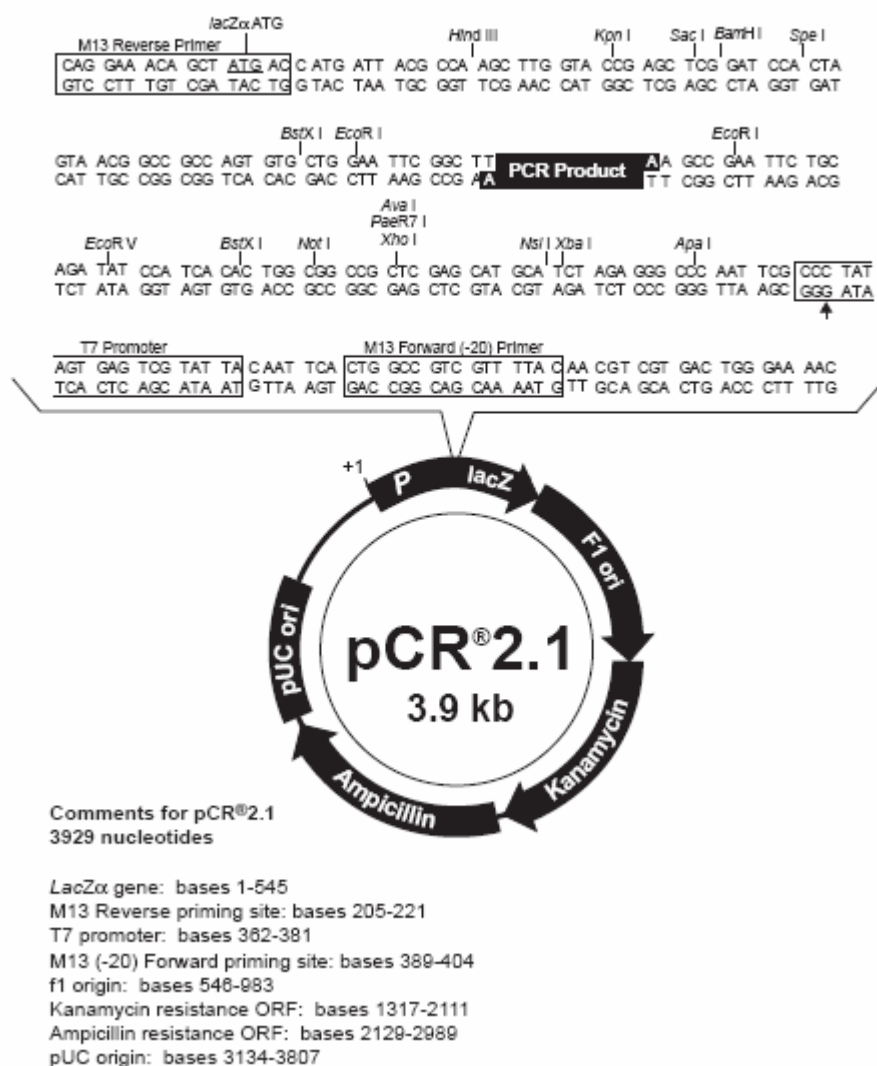
Élément régulateur	Séquence	Position VvNPR1.1	Position VvNPR1.2	Régulation d'expression
SORLIP1AT	GCCAC	-285(-)	-387(-)	Lumière
SORLIP2AT	GGGCC		-1238(-)	Lumière
SORLIP5AT	GAGTGAG	-261(+)	-1171(-)	Lumière
SP8BFIBSP8BIB	TACTATT	-1874(+)		Liaison SP8BF
SREATMSD	TTATCC		-1411(+), -931(+)	Sucre
SURECOREATSU LTR11	GAGAC	-1982(+), -1883(-), -38(-), -15(-)	-1378(+)	Sucre
TAAAGSTKST1	TAAAG	-1830(+), -1762(+), -1485(+), -1206(-), -1185(-), -589(-)	-1647(+), -1639(+), -1629(+), -1565(+), -1454(+), -1102(+), -37(+), -1840(-), -1225(-), -1190(-), -599(-), -442(-)	Liaison FT DOF
TATABOX2	TATAAAT	-607(+), -196(+), -1732(-), -362(-)	-1605(-)	Initiation
TATABOX3	TATTAAT	-1683(+), -340(+), -1326(-), -339(-)	-1876(+)	Initiation
TATABOX4	TATATAA	-1197(+), -634(+), -609(+), -509(+), -1198(-), -512(-)	-1751(-)	Initiation
TATABOX5	TTATTT	-1778(+), -1734(+), -1714(+), -1705(+), -1701(+), -1697(+), -1295(+), -1113(+), -1064(+), -961(+), -866(+), -656(+), -646(+), -578(+), -553(+), -1784(-), -1765(-), -1611(-), -978(-), -734(-), -625(-), -615(-), -382(-), -193(-)	-1784(+), -1780(+), -1607(+), -1919(-), -1889(-), -1885(-), -1727(-), -1501(-)	Initiation
TATABOXOSPAL	TATTTAA	-1294(+), -960(+), -913(+), -645(+), -687(-)	-1779(+)	Liaison à OsTBP2
TATAPVTRNALE U	TTTATATA	-634(-), -609(-)		Liaison à TBP
TATCCAOSAMY	TATCCA		-1410(+)	a-amylase, sucre
TATCCAYMOTIF OSRAMY3D	TATCCAY		-1410(+)	a-amylase, sucre
TBOXATGAPB	ACTTTG	-1421(-)	-67(+), -98(-)	Promoteur du gène GAPB
TELOBOXATEEF 1AA1	AAACCCCTAA	-226(+)		Racine
TGTCACACMCU CUMISIN	TGTCACA	-1031(+)		Fruit
TRANSINITMON OCOTS	RMNAUGGC	-1627(-)		Initiation, traduction monocot
UP2ATMSD	AAACCCCTA	-226(+)		Bourgeon axillaire
WBOXPCWRKY 1	TTTGACY	-1759(-)	-1150(+), -516(-)	W-box, Liaison WRKY
WBOXATNPR1	TTGAC	-1363(+), -593(+), -1758(-), -1592(-), -277(-)	-1149(+), -959(+), -250(+), -515(-)	W-box, AtNPR1
WBOXHVIS01	TGACT	-592(+), -132(+), -1759(-), -1593(-), -1522(-), -1439(-), -470(-)	-958(+), -249(+), -143(+)	W-box, Liaison de SUSIBA2 (répression / sucres)
WBOXNTCHN48	CTGACY	-133(+)		W-box, WRKY
WBOXNTERF3	TGACY	-592(+), -132(+), -1759(-), -1593(-), -1522(-), -1439(-), -470(-), -1792(-), -1515(-), -278(-)	-1148(+), -958(+), -249(+), -237(+), -143(+), -516(-)	W-box, NtERF3 (blessure)

Élément régulateur	Séquence	Position VvNPR1.1	Position VvNPR1.2	Régulation d'expression
WRKY71OS	TGAC	-1362(+), -592(+), -475(+), -132(+), -1791(-), -1758(-), -1592(-), -1521(-), -1514(-), -1438(-), -1030(-), -469(-), -277(-)	-1148(+), -1136(+), -1095(+), -958(+), -249(+), -237(+), -143(+), -1846(-), -1079(-), -515(-)	W-box, Osamy32 (répresseur de voie GA)
WUSATAg	TTAATGG		-831(+)	Bois
XYLAT	ACAAAGAA	-1433(-)		Racine

Annexe 1 : Récapitulatif des séquences régulatrices potentielles de la région promotrice des VvNPR1 identifiées par la programme PLACE (Higo *et al.*, 1999)

Les éléments qui semblent intéressants ont été marqués en rouge.

(+) et (-) indiquent respectivement si les séquences sont en position sens ou antisens.

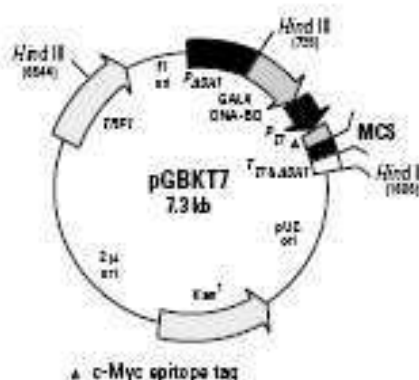


Annexe 2 : Carte de restriction du plasmide pCR2.1 (Invitrogen)

PT3248-5

GenBank Accession #: Submission In Progress.

Catalog # K1612-1



Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of p3BKT7. Unique restriction sites are in bold

Description:

Description: The pGBKT7 vector expresses proteins fused to amino acids 1–147 of the GAL4 DNA binding domain (DNA-BD). In yeast, fusion proteins are expressed at high levels from the constitutive ADHI promoter (P_{ADHI}); transcription is terminated by the T7 and ADHI transcription termination signals (T_{7A} and ADHI₁). pGBKT7 also contains the T7 promoter, a c-Myc epitope tag, and a MCS. pGBKT7 replicates autonomously in both *E. coli* and *S. cerevisiae* from the pUC and 2 μ ori, respectively. The vector carries the Kan^r for selection in *E. coli* and the *TRP1* nutritional marker for selection in yeast. Yeast strains containing pGBKT7 exhibit a higher transformation efficiency than strains carrying other DNA-BD domain vectors (1).

(PF8Z150)

pGBKT7

Vector Information

Use:

pGBKT7 is the DNA-BD Vector included with MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 (#K1612-1). The MCS of pGBKT7 contains unique restriction sites in frame with the 3' end of the GAL4 DNA-BD for constructing fusion proteins with a bait protein. The bait protein is also expressed as a fusion to a c-Myc epitope tag. c-Myc tagged proteins can be identified with antibodies raised to this common epitope, eliminating the need to generate specific antibodies to new proteins. The T7 promoter is used for *in vitro* transcription and translation of the epitope tagged fusion protein. Note that the DNA-BD is not expressed during the *in vitro* transcription and translation reactions.

The MCS in pGBKT7 is compatible with those in pMyc-CMV and pHA-CMV, CLONTECH's epitope tagged mammalian expression vector set (#K6003-1). The MCS in pGBKT7 is compatible with those in pMyc-CMV and pHA-CMV, CLONTECH's epitope tagged mammalian expression vector set (#K6003-1). As a result, the target gene can be shuttled into these vectors in order to confirm protein interactions *in vivo*.

Location of features:

- Truncated *S. cerevisiae* ADHI promoter (P_{ADHI}): 30–736
- GAL4 DNA binding domain (DNA-BD) polypeptide amino acids 1–147: 762–1202
- T7 RNA polymerase promoter: 1212–1235
- c-Myc epitope tag: 1248–1280
- Multiple Cloning Site: 1281–1334
- Transcription termination signals
 - T7 terminator: 1335–1381
 - ADHI terminator: 1414–1610
- pUC plasmid replication origin: 1838–2635
- Kanamycin resistance gene: 4144–3222
- Yeast 2 μ replication origin: 4148–5493
- TRP1 coding sequences
 - promoter: 5559–6755
 - gene: 6031–6705
- f1 bacteriophage origin of replication: 6756–29

Location of primers:

- T7 Sequencing Primer: 1213–1233
- 3' DNA-BD Sequencing Primer: 1510–1487
- MATCHMAKER 5' DNA-BD Vector Insert Screening Amplimer (#5417-1): 1155–1171
- MATCHMAKER 3' DNA-BD Vector Insert Screening Amplimer (#5417-1): 1506–1485

Propagation in *E. coli*:

- Suitable host strains: DH5 α , DH10 & other general purpose strains
- Selectable marker: plasmid confers resistance to kanamycin (50 μ g/ml) in *E. coli* hosts
- *E. coli* replication origin: pUC
- Copy number: ~500
- Plasmid incompatibility group: pMB1/Col E1

Propagation in *S. cerevisiae*:

- Suitable host strains: Y187(α), Y190(α), SFY526(α), CG1945(α), HF7c(α), or AH109(α)
- Selectable marker: TRP1
- *S. cerevisiae* origin: 2 μ

Reference:

1. Lounis, O. F., et al. (1997) *BioTechniques* 23: 818–819.

Notice to Purchaser:

pGBKT7 is a derivative of pGBS-8 and is licensed from the Université de Bordeaux.

This product is intended for research purposes only. It is not to be used for drug or diagnostic purposes nor is it intended for human use. CLONTECH products may not be resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products without written approval of CLONTECH.

Note: The attached sequence file has been compiled from information in the sequence databases, published literature, and other sources, together with partial sequences obtained by CLONTECH. This vector has not been completely sequenced.

© 1999, CLONTECH Laboratories, Inc.

CLONTECH Laboratories, Inc.,

2

INTERNET: www.clontech.com

Protocol # PT3288-5

Version #P002158

Annexe 3 : Carte de restriction du plasmide pGBKT7 (Clontech)

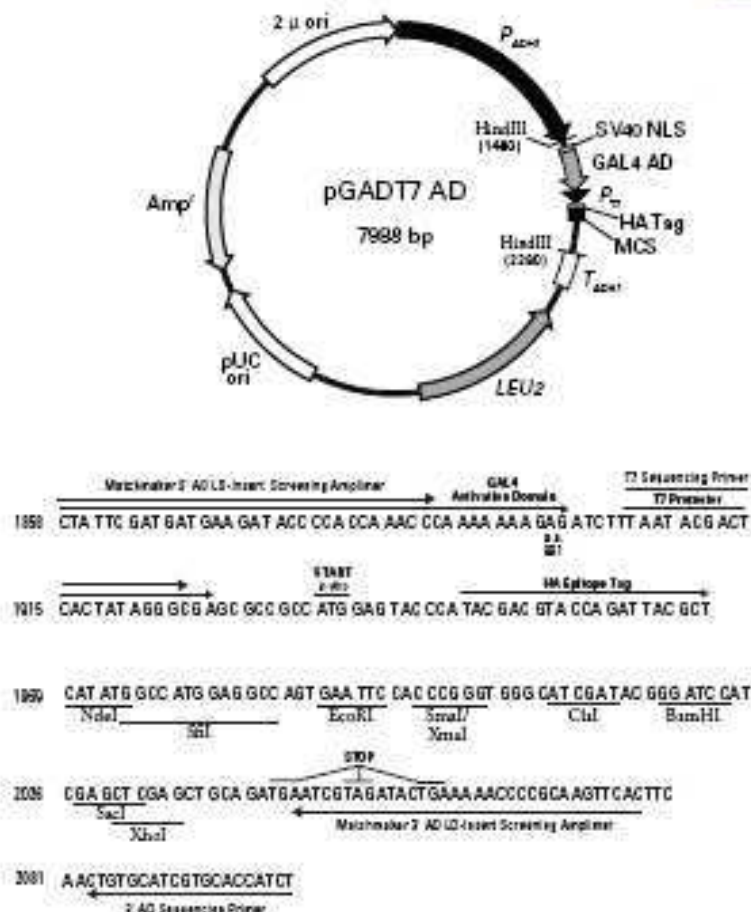
pGADT7 AD Vector Information

PT3249-5

Cat. Nos. 630442

630489

630491



pGADT7 AD Vector Map and Multiple Cloning Site (MCS).

Description

pGADT7 AD is a yeast expression vector that is designed to express a protein of interest fused to a GAL4 activation domain (AD; amino acids 768–881). Transcription of the GAL4AD fusion is driven by the constitutively active *ADH1* promoter (P_{ADH1}), and is terminated at the *ADH1* transcription termination signal (T_{ADH1}). The GAL4 AD fusion contains an N-terminal SV40 nuclear localization signal (SV40 NLS; 1) that targets the protein to the yeast nucleus, and a hemagglutinin epitope tag (HA Tag), located between the GAL4 AD and the protein of interest, that allows the protein to be easily detected with HA-tag antibodies.

The T7 promoter (P_{T7}), located just upstream of the HA tag sequence, allows *in vitro* transcription and translation of the HA-tagged protein of interest (without the GAL4 AD and the SV40 NLS). pGADT7 AD replicates autonomously in both *E. coli* and *S. cerevisiae* from the pUC and 2 μ ori, respectively. The vector also contains an ampicillin resistance gene (Amp^r) for selection in *E. coli* and a *LEU2* nutritional marker for selection in yeast.

(PR822682; published 5 January 2009)

pGADT7 AD	Vector Information
Use pGADT7 AD is the AD Cloning Vector provided in Clontech's Matchmaker™ GoldYeast One- and Two-Hybrid Screening Systems (Cat. Nos. 630491 and 630499, respectively). The vector allows the generation of GAL4 AD fusion proteins from either a gene of interest or a cDNA library. Important: Genes must be cloned into the MCS so that they are in-frame with the GAL4 AD and HA tag coding sequences. The vector can also be used as a negative "prey" control for the One-Hybrid System. GAL4 AD/HA-tagged fusion proteins expressed by the vector can be detected with either our GAL4 AD Monoclonal Antibody (Cat. No. 630402) or our HA-Tag Polyclonal Antibody (Cat. No. 631207). Note: <i>In vitro</i> transcription/translation from the T7 promoter, located between the GAL4 AD and HA tag sequences, produces an HA-tagged protein that lacks the GAL4 AD. Such proteins can be detected by the HA-Tag Polyclonal Antibody, but not the GAL4 AD Monoclonal Antibody.	
Location of features • P_{ADHI} (full-length <i>S. cerevisiae</i> ADHI promoter): 7–1479 • GAL4 AD (GAL4 activation domain with SV40 Nuclear Localization Signal [NLS]) SV40 NLS: 1501–1557 GAL4 (amino acids 768–881): 1561–1899 • P_{T7} (T7 RNA polymerase promoter): 1905–1927 • HA Tag (hemagglutinin epitope tag): 1942–1968 • MCS (multiple cloning site): 1969–2041 • T_{ADHI} (<i>S. cerevisiae</i> ADHI Terminator): 2290–2605 • LEU2 coding sequences: 2723–3814 (complementary) • pUC ori (pUC replication origin): 4591–5418 • Amp^r (ampicillin resistance gene): 5574–6434 (complementary) • 2 μ ori (Yeast 2 μ replication origin): 6999–7998	
Location of primers • T7 Sequencing Primer: 1905–1925 • 3' AD Sequencing Primer: 2102–2083 • Matchmaker 5' AD LD-Insert Screening Amplimer (Cat. No. 630433): 1859–1889 • Matchmaker 3' AD LD-Insert Screening Amplimer (Cat. No. 630433): 2078–2048	
Propagation in <i>E. coli</i> • Suitable host strains: DH5α, DH10 & other general purpose strains • Selectable marker: plasmid confers resistance to ampicillin (100 μg/ml) to <i>E. coli</i> hosts • <i>E. coli</i> replication origin: pUC • Copy number: ~500 • Plasmid incompatibility group: pMB1/Col E1	
Propagation in <i>S. cerevisiae</i> • Suitable host strains: Y1HGold, Y2HGold, AH109(MATα), Y197(MATα), Y190(MATα), SFY526(MATα), CG1945(MATα), HF7c(MATα) • Selectable marker: LEU2 • <i>S. cerevisiae</i> origin: 2 μ	
Reference 1. Chien, C. T., Bartol, P. L., Sternglanz, R. & Fields, S. (1991) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 88:9578–9582.	
Note: The vector sequence was compiled from information in the sequence databases, published literature, and other sources, together with partial sequences obtained by Clontech. This vector has not been completely sequenced.	
Notice to Purchaser Clontech products are to be used for research purposes only. They may not be used for any other purpose, including, but not limited to, use in drugs, <i>in vitro</i> diagnostic purposes, therapeutics, or in humans. Clontech products may not be transferred to third parties, resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products or to provide a service to third parties without written approval of Clontech Laboratories, Inc. Clontech, Clontech Logo and all other trademarks are the property of Clontech Laboratories, Inc., unless noted otherwise. Clontech is a Takara Bio Company. ©2009 Clontech Laboratories, Inc.	
Clontech Laboratories, Inc. 2	www.clontech.com Protocol No. PT3249-6 Version No. PR0226A9

RESUME

La vigne est soumise à de nombreuses maladies impliquant l'utilisation de produits phytosanitaires en grande quantité dont l'utilisation est néfaste pour l'environnement et la santé des utilisateurs. Un enjeu à terme est donc de développer des méthodes alternatives à la lutte chimique. Durant ces dernières années, de nombreux gènes, protéines et autres molécules impliqués dans les interactions plante / agent pathogène ont été décrits. La protéine codée par le gène *NPR1* (*Nonexpressor of pathogenesis-related gene 1*) joue un rôle clef dans la résistance à large spectre chez les plantes. Des éliciteurs tels que l'acide salicylique ou des agents pathogènes couplés à l'accumulation des espèces activées de l'oxygène influencent l'activation de *NPR1* dans le cytoplasme. La translocation de *NPR1* dans le noyau et son interaction avec des facteurs de transcription TGA induit l'expression des gènes *PR* (*Pathogenesis-related*). Nous avons identifié par une approche gène candidat, sept homologues potentiels des gènes *NPR1* et *TGA* chez *Vitis vinifera* (*VvNPR1.1*, *VvNPR1.2*, *VvTGA1* à 5). L'étude de la diversité de séquences dans les exons de 15 accessions de *Vitaceae* indique qu'ils sont soumis à une forte pression de sélection purificatrice. De plus, l'analyse *in silico* des régions promotrices des *VvNPR1* montre la présence, d'éléments *cis*-régulateurs potentiels, en réponse aux stress biotiques et abiotiques ainsi que des motifs de liaison à des facteurs de transcription. Une étude plus poussée des introns montre quelques éléments transposables et un faible polymorphisme dans six accessions de *Vitis vinifera*. Ces résultats argumentent en faveur d'une pression de sélection forte agissant sur ces gènes. Ces différents résultats nous ont menés à formuler des hypothèses fonctionnelles et à réaliser une étude d'interaction avec les facteurs de transcription *VvTGA1* et *VvTGA4* par la technique du double hybride. Ces deux facteurs de transcription n'interagissent pas avec *VvNPR1.1*. Ces expériences devraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes de défense de la vigne ainsi que l'obtention de vignes plus résistantes aux agents pathogènes.

ABSTRACT

Numerous diseases affect grapevine, resulting in the use of phytochemicals in large quantities that are harmful for environment and user's health. In the long term, the aim is to develop alternative methods to chemicals. Moreover, in the last few years, many genes, proteins and other molecules implied in plant/pathogen interactions were described. The protein encoded by *NPR1* (*Nonexpressor of pathogenesis-related gene 1*) plays a pivotal role in conferring broad spectrum pathogen resistance in plants. Activation of *NPR1* in the cytoplasm is influenced by elicitors such as salicylic acid or pathogens associated with the accumulation of reactive oxygen species. Translocation of *NPR1* into the nucleus and interaction with TGA transcription factors induce the expression of *PR* (*Pathogenesis-related*) genes. Using a candidate gene approach, we have identified seven putative homologs to *NPR1* and *TGA* in the grapevine genome (*VvNPR1.1*, *VvNPR1.2*, *VvTGA1* to 5). The study of sequence diversity in exons of 15 accessions of the *Vitaceae* family indicates that these exons are subjected to a strong purifying selection pressure. Moreover, *in silico* analysis in the promoters of *VvNPR1* shows putative *cis*-regulator elements, in answer to biotic and abiotic stresses as well as link patterns to transcription factors. An intron study shows transposable elements and a low polymorphism in six accessions of *Vitis vinifera*. These results suggest a strong selection pressure on these genes. Functional hypotheses were formulated, and an interaction study with transcription factors *VvTGA1* and *VvTGA4* was conducted using a method based on yeast two hybrid, showing that they do not interact with *VvNPR1.1*. These experiments should allow a better understanding of defence mechanisms in *Vitis vinifera* as well as to obtain pathogen resistant grapevines.