

Biologie et génétique moléculaires / Molecular biology and genetics

## Identification et caractérisation d'un gène de réponse à la déshydratation « *rd22* » chez la vigne (*Vitis vinifera* L.)

Mohsen Hanana<sup>a,\*</sup>, Laurent Deluc<sup>b</sup>, Romain Fouquet<sup>c</sup>, Samia Daldoul<sup>a</sup>, Céline Léon<sup>c</sup>, François Barrieu<sup>c</sup>, Abdelwahed Ghorbel<sup>a</sup>, Ahmed Mliki<sup>a</sup>, Saïd Hamdi<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de physiologie moléculaire de la vigne, CBBC, BP 901, 2050 Hammam-lif, Tunisie

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Mail Stop 200, University of Nevada, Reno, NV 89557, États-Unis

<sup>c</sup> Unité mixte de recherche 1287, « Écophysiologie et génomique fonctionnelle de la vigne », universités Bordeaux-1 & Bordeaux-2, Inra, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon, France

Reçu le 24 septembre 2007 ; accepté après révision le 22 mai 2008

Disponible sur Internet le 20 juin 2008

Présenté par Philippe Morat

### Résumé

Afin d'identifier et d'isoler des gènes impliqués dans la tolérance aux stress abiotiques (salinité et sécheresse) chez la vigne, nous avons adopté une approche gène candidat qui nous a permis d'isoler l'ADNc complet d'un gène *rd22* chez la variété cabernet sauvignon. Ce dernier, appelé *Vvrd22*, représente un gène de réponse à la déshydratation qui est généralement induit par l'ABA. Nous avons déterminé certains paramètres physicochimiques et obtenu des données structurales (masse moléculaire, structure secondaire, domaines et motifs conservés, sites putatifs de modification post-traductionnelle...) de la protéine découlant de la séquence de ce gène. L'étude de l'expression de *Vvrd22* chez la vigne a été réalisée au cours du développement de la baie de raisin et au niveau de différents organes et tissus de la plante, ainsi qu'en conditions de stress salin et hydrique. Les résultats ont révélé que *Vvrd22* est exprimé de manière constitutive dans tous les tissus analysés, mais à un niveau très faible. Par ailleurs, le stress salin induit particulièrement l'expression de *Vvrd22* chez une variété tolérante de vigne (Razegui), alors que la variété sensible (Syrah) n'affiche aucune variation d'expression au cours du stress, signifiant ainsi que *Vvrd22* est impliqué dans la réponse au stress salin, et que son niveau d'expression dépend de mécanismes régulateurs effectifs et fonctionnels, mais uniquement chez la variété tolérante. En revanche, l'expression de *Vvrd22* après l'application du stress hydrique est constatée de manière identique chez les deux variétés Kahli, tolérante, et Guelb Sardouk, sensible. De plus, des molécules de signalisation de stress comme l'ABA (appliqué seul ou en combinaison avec le saccharose) induisent l'expression de *Vvrd22*, bien que de manière très faible. La connaissance du rôle et de la modalité de fonctionnement de ce gène constitue un pré-requis indispensable avant de réaliser son exploitation dans un programme d'amélioration génétique de la vigne vis-à-vis de sa tolérance à la sécheresse et à la salinité. **Pour citer cet article : M. Hanana et al., C. R. Biologies 331 (2008).**

© 2008 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abbreviations : ABA, acide abscissique ; AIB, acide indole butyrique ; ANA, acide naphtalène acétique ; SDT, site de départ de la transcription.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [punto80@yahoo.com](mailto:punto80@yahoo.com) (M. Hanana).

## Abstract

**Identification and characterization of ‘rd22’ dehydration responsive gene in grapevine (*Vitis vinifera* L.).** To identify and isolate genes related to abiotic stresses (salinity and drought) tolerance in grapevine, a candidate gene approach was developed and allowed isolating a full-length cDNA of *rd22* gene from the Cabernet Sauvignon variety. The latter, named *Vvrd22*, is a dehydration-responsive gene that is usually induced by the application of exogenous ABA. Details of the physicochemical parameters and structural properties (molecular mass, secondary structure, conserved domains and motives, putative post-translational modification sites...) of the encoded protein have also been elucidated. The expression study of *Vvrd22* was carried out at the berry growth stages and at the level of plant organs and tissues as well as under both drought and salt stresses. The results showed that *Vvrd22* is constitutively expressed at a low level in all analyzed tissues. Moreover, salt stress induced *Vvrd22* expression, particularly for the tolerant variety (Razegui), contrary to the sensitive one (Syrah), which did not display any expression variation during the stress, which means that *Vvrd22* is involved in salt stress response and that its expression level depends on regulatory mechanisms that are efficient only for the tolerant variety. On the other hand, under drought stress, *Vvrd22* is induced in an identical manner for both tolerant and sensitive varieties. In addition, stress signal molecules such as ABA (lonely applied or in combination with sucrose) induced *Vvrd22* expression, even at a low level. A minimal knowledge about the role and the functionality of this gene is necessary and constitutes a prerequisite condition before starting and including *Vvrd22* in any program of improvement of grapevine’s abiotic stress tolerance. **To cite this article:** M. Hanana et al., C. R. Biologies 331 (2008).

© 2008 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots-clés :** Déshydratation ; rd22 ; Salinité ; Sécheresse ; Tolérance ; Vigne

**Keywords:** Dehydration; Drought; Grapevine; rd22; Salinity; Tolerance

## Abridged English version

Salinity and drought represent the major environmental constraints that limit crop production and yield in Tunisia. Since grapevine production and planting area are greatly affected by soil salinity and drought, it is of agricultural importance to analyze and improve the tolerance of grapevine to these stresses. So far, attempts for grape productivity improvement are mainly focalized on the processes of berry development and ripening, pathogens and diseases resistance. However, little or poor achievements have been accomplished regarding the improvement of the tolerance of grapevine to abiotic stresses. Among strategies leading to the genetic improvement and adaptation of plants to these stresses, there is the identification and the transfer of genes involved in the tolerance to drought and salinity. Although many genes are induced by drought and salinity, only a few of them seem to be efficient for this stress tolerance. In this respect, we developed a candidate gene approach to identify such genes using a berry cDNA library (var. Cabernet Sauvignon) at the ‘*véraison*’ stage. The conditions for PCR amplification were 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 54 °C for 30 s, 72 °C for 2 min, and 72 °C for 10 min for the final extension step. On the basis of the sequences of the amplified fragments and in order to get both ends of the cDNA, additional nested primers and universal SP6 and T7 primers were used for asymmetric PCRs on the cDNA library. The assembly of contiguous sequences provided

a full-length cDNA of 1.358 kb. Thus, we have identified and cloned ‘*Vvrd22*’, a gene encoding a response to dehydration protein from var. Cabernet Sauvignon. The predicted ORF encodes a protein of 364 amino acids with a calculated molecular mass of 39.2 kDa that shared similarities with rd22 proteins from other plants (i.e. 73% with *Bruguiera gymnorrhiza*). The physicochemical and structural properties of the putative protein deriving from this cDNA have been characterized using bioinformatics tools. The structural parameters, the conserved domains and the post-translational modification sites identified are of great importance in understanding the function of this protein. Similarly to other rd22 proteins in higher plant, the *Vvrd22* protein contained the conserved BURP domain. RT-PCR was used to examine *Vvrd22* expression during berry development as well as in the organs and tissues of the plant. In this respect, var. Cabernet Sauvignon berries were harvested from a vineyard in Bordeaux (France) between June and September in order to obtain samples corresponding to the five phenological stages of the berry development. Roots and leaves were sampled from plants grown under hydroponic conditions. For first-strand cDNA synthesis, RT was run with reverse transcriptase on 2 µg of total RNA (denatured at 75 °C for 10 min) at 42 °C for 60 min. After completion of first-strand cDNA synthesis, 5-µl aliquots were taken for PCR. These RT-PCR amplifications allowed concluding that *Vvrd22* is constitutively expressed among all tissues and organs of grape, but at a very low level.

Rooted cuttings were submitted to salt and drought stress. Northern analysis showed that *Vvrd22* mRNA is induced by salt stress as well as by water deficit. Indeed, salt treatment (100 mM NaCl) was able to induce early and late expression of *Vvrd22* in a tolerant variety (Razegui), but not in the sensitive one (Syrah), suggesting that this gene is involved in the response to salt stress. Moreover, under control condition, *Vvrd22* displayed constitutively a higher level of expression in the tolerant variety than in the sensitive one. Regarding drought, *Vvrd22* is induced in both tolerant and sensitive varieties. Since the plant hormone abscisic acid (ABA) is produced under water-deficit conditions and is instrumental in the development of tolerance against drought, we studied the expression of *Vvrd22* in berry cell suspensions under both ABA and sucrose treatments. The grape berry cell suspension derived from Cabernet Sauvignon berries was maintained at 25 °C in an orbital shaker (100 rpm) by weekly subculture. At the exponential growth phase, ABA (10 µM) and/or sucrose (58 mM) were supplemented to the medium. Northern blots showed that ABA could poorly induce *Vvrd22*. However, combined with sucrose, ABA could enhance the expression of *Vvrd22*, even if it is still at a low level. Molecular cloning, preliminary characterization and further overexpression of this protein through genetic transformation will allow the validation of its function and consequently would promote the improvement of the tolerance of grapevine to drought and salinity.

## 1. Introduction

L'amélioration génétique classique des cultures s'est donnée, pendant longtemps, pour objectif primordial l'augmentation de la productivité. Toutefois, le succès de cette stratégie d'amélioration est étroitement lié à l'existence de conditions pédoclimatiques favorables. Or, le territoire tunisien est en grande partie marqué par des contraintes de déficit hydrique et de salinité [1, 2], qui entravent le bon développement des cultures en général et celui de la vigne (*Vitis vinifera* L.) en particulier. Outre la dégradation de la structure des sols et les baisses substantielles de la productivité des vignobles, ces conditions stressantes engendrent des effets dépréciatifs sur la qualité du raisin, et par conséquent des problèmes quant à sa commercialisation [3,4]. Les efforts déployés pour améliorer la tolérance des plantes à la sécheresse et à la salinité à travers les travaux de sélection classique n'ont eu jusqu'à aujourd'hui qu'un succès très limité, en raison de la complexité génétique des espèces et de la lourdeur de la technique [5,6]. Des progrès sont

actuellement initiés par le biais d'études de génomique comparative au sein d'organismes modèles, et à travers l'utilisation de techniques nouvelles telles que l'analyse d'EST (étiquette de gènes exprimés), l'analyse parallèle de l'expression d'une large gamme de gènes (microarray), de mutagenèse ciblée ou aléatoire... [5,7]. L'environnement dans lequel les plantes sont cultivées n'offre généralement pas des conditions optimales de croissance [8]. De ce fait, et en guise de réponse et d'adaptation à ces conditions stressantes, les plantes ont élaboré des mécanismes et adopté des stratégies de tolérance et de survie complexes, qui, au niveau moléculaire, impliquent le fonctionnement coordonné d'un grand nombre de gènes [9]. Plusieurs gènes ont déjà été identifiés chez les céréales, les cultures maraîchères, et particulièrement chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Cependant, chez la vigne, les recherches ont été plutôt axées sur les aspects qualitatifs de la baie de raisin et phytosanitaires de la plante, délaissant quelque peu les conditions environnementales de culture. Pourtant, ce dernier volet représente en Tunisie une des contraintes les plus dépressives sur le développement de la vigne, sur les rendements et la qualité des raisins. Au niveau du laboratoire de physiologie moléculaire de la vigne (centre de biotechnologies de Borj-Cédria, Tunisie), nous avons axé nos recherches sur l'identification, l'isolement et la caractérisation de gènes impliqués dans la tolérance aux stress salin et hydrique chez la vigne. L'identification et la validation de la fonction de tels gènes représentent un préalable pour les exploiter dans un programme d'amélioration génétique. À cet égard, nous avons développé une approche gène candidat qui consiste d'abord en une exploration bibliographique de gènes pertinents dont l'efficacité au niveau de la tolérance aux stress abiotiques a été déjà prouvée chez diverses espèces végétales ; le principe est ensuite de se baser sur l'homologie des séquences et d'essayer de les identifier chez la vigne en les amplifiant par PCR, et enfin de les isoler par clonage dans des vecteurs adéquats pour des études de génomique fonctionnelle. La découverte de nouveaux gènes, la détermination de leur modalité d'expression ainsi qu'une meilleure compréhension de leurs rôles dans l'adaptation aux stress pourraient conduire à l'établissement des bases effectives d'une stratégie conférant aux plantes une meilleure tolérance au stress [5,10]. En effet, la disposition d'une base moléculaire et d'un pool génétique varié constitue une étape indispensable avant d'entamer des travaux de génomique fonctionnelle et de transformation génétique visant à améliorer la tolérance des plantes aux contraintes environnementales. Dans ce cadre, nous avons identifié et isolé un gène de réponse à la déshy-

dratation *rd22*, dont nous avons réalisé une caractérisation moléculaire et étudié l'expression sous différentes conditions, afin de pouvoir l'exploiter efficacement dans un programme d'amélioration génétique de la tolérance aux stress abiotiques chez la vigne.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel végétal

#### 2.1.1. Cultures en plein champ et hydroponique de la vigne

Les baies de raisin de *Vitis Vinifera* var. cabernet sauvignon, utilisées pour les études d'expression du gène *Vvrd22* au cours du développement, ont été prélevées dans le vignoble du domaine Inra du Grand Parc de Bordeaux. Les prélèvements ont eu lieu entre les mois de juin et septembre 2000, afin de pouvoir disposer de cinq stades représentatifs du développement de la baie de raisin. Les stades 1, 2, 3, 4 et 5 correspondent respectivement à 3, 6, 8, 10 et 12 semaines après la floraison. Les baies sont débarrassées de leur pinceau, puis sont immédiatement congelées dans de l'azote liquide et stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$ , jusqu'à leur utilisation [11]. Ultérieurement, les baies ont été pesées au laboratoire pour homogénéiser les différents poids à chaque stade. Les études d'expression sur la pellicule et sur la pulpe ont nécessité de peler la pellicule des baies et de séparer la pulpe des pépins sur le lieu de récolte. En ce qui concerne les racines et les feuilles, les prélèvements d'organes ont été effectués sur des boutures fructifères de la même variété cabernet sauvignon, cultivées en conditions hydroponiques [11].

#### 2.1.2. Bouturage ligneux

L'étude de l'expression des gènes par «Northern Blot» a été effectuée sur deux variétés de vigne à comportement contrasté, l'une, Razegui, tolérante, et l'autre, Syrah, sensible au sel. Les plantes issues de bouturage ligneux effectué en décembre sont enracinées et repiquées en pot individuel pour subir graduellement le stress salin (100 mM NaCl) [12]. Des rameaux lignifiés ont été prélevés sur des ceps de vigne dont les bourgeons sont dormants (novembre–décembre). Ensuite, ceux-ci sont débités en fragments ligneux portant deux bourgeons. Après éborgnage, les boutures sont trempées à leur base dans de l'exubérone (solution d'AIB commerciale) afin de favoriser la rhizogenèse, puis paraffinées et repiquées dans des cagettes remplies de sable. Les cagettes sont ensuite mises dans une chambre climatisée (température :  $25^{\circ}\text{C}$ , humidité relative : 70%, photopériode : 16 h). Après deux semaines, les boutures com-

mencent à débousser et à développer le système racinaire [12]. Après enracinement des boutures, les jeunes plants ont été repiqués dans des pots individuels en plastique de 2 l contenant du sable inerte lavé avec de l'acide sulfurique concentré et rincé plusieurs fois avec de l'eau distillée. Après une période d'acclimatation de deux semaines les boutures enracinées sont arrosées avec la solution nutritive de Long Ashton [13], additionnée de 100 mM de NaCl. Le sel est apporté progressivement dans le milieu nutritif à raison de 25 mM de plus de NaCl tous les 15 jours, jusqu'à atteindre 100 mM [12]. Les échantillons foliaires sont prélevés 6 et 24 h après le début d'application de 100 mM de NaCl. Le stress hydrique a été appliqué sur les deux variétés Kahli (tolérante) et Galb Serdouk (sensible) de façon progressive, par cycles de déshydratation suivis par un arrêt total de l'irrigation pendant un mois, stade auquel les échantillons foliaires ont été prélevés [14].

#### 2.1.3. Suspension cellulaire de vigne

Les cultures de suspensions cellulaires ont été obtenues à partir de cals de tissus fructifères de la variété cabernet sauvignon, puis stabilisées à l'obscurité dans une chambre thermostatée à  $25^{\circ}\text{C}$  sous agitation (160 rpm) dans le milieu MS [15] additionné de 920  $\mu\text{l}$  ANA (0,5 mg/l), de 1,2 ml BAP (0,1 mg/l), de 20 g/l saccharose et de 0,25 g/l hydrolysate de caséine enzymatique (Sigma, C0626) [16]. Pour les études d'expression du gène, les apports de saccharose (58 mM) et d'ABA (10  $\mu\text{M}$ ) ont été réalisés quatre jours après le repiquage des suspensions, afin que les cellules se trouvent en phase de croissance exponentielle [11].

### 2.2. Identification et clonage du gène *Vvrd22*

Pour identifier des gènes de vigne associés à la tolérance à la sécheresse et/ou à la salinité, une approche gène candidat a été adoptée. Celle-ci consiste en premier lieu à identifier des régions conservées à partir de l'alignement de différentes séquences de gènes d'intérêt en vue de désigner des oligonucléotides en guise d'amorces. Par la suite, en utilisant ces amorces, des réactions PCR sont réalisées sur une banque d'ADNc de baie de raisin (var. cabernet sauvignon) au stade de la véraison, en vue d'amplifier le gène recherché. Les conditions d'amplification sont les suivantes : une phase d'initiation à  $94^{\circ}\text{C}$  pendant 2 min suivie d'une phase d'élongation de 30 cycles ( $94^{\circ}\text{C}$  : 1 min,  $54^{\circ}\text{C}$  : 30 s et  $72^{\circ}\text{C}$  : 2 min) et une phase de terminaison à  $72^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min. Les fragments amplifiés sont purifiés à partir des gels d'agarose puis clonés dans le vecteur pGEMT-easy (Promega) et enfin séquencés (Génome

Express). L'obtention de l'ADNc complet est effectuée par des PCR asymétriques additionnelles en utilisant des amorces universelles SP6 et T7 et des amorces internes désignées selon la séquence de ces fragments préliminaires. L'assemblage final des séquences contiguës permet l'obtention de l'ADNc complet. C'est ainsi qu'un ADNc dénommé *Vvrd22* a été identifié et isolé. Sa séquence finale a été enregistrée sous le numéro d'accèsion AY634282 au niveau de la base de données Genbank (NCBI).

### 2.3. Étude de l'expression spatio-temporelle du gène *Vvrd22*

L'analyse par RT-PCR semi-quantitative a été utilisée pour décrire l'expression spatiotemporelle du gène *Vvrd22*, mais également sa réponse à certains éliciteurs, tels que le saccharose et l'ABA.

#### 2.3.1. Extraction de l'ARN à partir des différents organes de la vigne

L'extraction de l'ARN des feuilles et des racines a été effectuée sur des plants (var. cabernet sauvignon) provenant de cultures hydroponiques, en utilisant le protocole au bromure de cétyltriméthylammonium et la précipitation au chlorure de lithium, tel qu'ils ont été décrits par Chang et al. [17]. Les baies (var. cabernet sauvignon) destinées à l'extraction de l'ARN sont prélevées dans le vignoble et au cours des différents stades phénologiques précédemment cités. La baie de raisin est un matériel récalcitrant à l'extraction de l'ARN total, du fait de l'accumulation au cours du développement de polyphénols et de sucres. Nous avons utilisé le protocole mis au point par Boss et al. [18], qui a permis d'obtenir de bons rendements pour les stades compris entre le stade de la véraison et le stade de la récolte. Toutefois, les rendements pour les extractions des stades plus précoces (avant véraison) se sont avérés faibles. Nous avons donc opté pour un autre protocole utilisé chez la banane [19], qui nous a permis d'obtenir de meilleurs rendements pour ces stades. Afin d'éliminer les contaminations par l'ADN génomique, l'ARN total a été traité par la DNAase I (Promega) et extrait de nouveau par la méthode utilisant le phénol/chloroforme/alcool iso-amylque et précipité par l'acétate de sodium et finalement resuspendu dans de l'eau distillée stérile traitée par du diéthylpyrocarbonate. L'ARN des suspensions cellulaires de la variété cabernet sauvignon a été extrait à l'aide du kit d'extraction d'ARN, selon les recommandations du fournisseur (Qiagen).

#### 2.3.2. Réactions de RT-PCR

Pour la synthèse du premier brin d'ADNc, la réaction de transcription inverse a été effectuée à l'aide d'une reverse transcriptase (100 unités de MMLV RNase H, Promega) sur 2 µg d'ARN total (dénaturé à 75 °C pendant 10 min) durant 60 min à 42 °C, en présence de 1,2 µM d'oligo(dT), tampon RT 5X, 4 mM DTT, 800 µM dNTPs, et 20 unités de RNAasin. Par la suite, 5 µl d'aliqots sont prélevés de cette réaction pour l'étape de PCR. La détection des transcrits *Vvrd22* (200 pb) a été effectuée en utilisant les amorces sens 5'-GGACTTGAGATTTGTTAG-3' et antisens 5'-TACGGAATAATGACTC-3'. La PCR est constituée d'une phase d'initiation à 94 °C pendant 2 min, suivie d'une phase d'élongation de 24 cycles (94 °C : 1 min, 42 °C : 30 s, et 72 °C : 1 min) et une phase de terminaison à 72 °C pendant 10 min. Le facteur d'élongation EF1γ de la vigne (numéro d'accèsion : AF176496), amplifié (200 pb) à l'aide des amorces sens 5'-TCAATCTGTCTAGGAAAGGAAG-3' et antisens 5'-GCGGGCAAGAGATACCTCAA-3', a servi de contrôle pour ces réactions PCR (avec une température d'hybridation de 54 °C). Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1%).

#### 2.4. Étude de l'expression de *Vvrd22* suite à l'application de stress salin et hydrique

Les feuilles ont été récoltées après l'application du stress et conservées à -80 °C avant de subir l'extraction d'ARN et les analyses par Northern Blot. Dix microgrammes d'ARN total sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) formaldéhyde (2,3 M) dans un tampon MOPS (1 X) durant 3 h à 100 V [20]. L'ARN total est transféré sur une membrane de nitrocellulose Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia biotech) dans un tampon SSC (10 X, NaCl 1,5 M, citrate trisodique 0,15 M, pH 7,0). Les étapes d'hybridation et de lavage de la membrane sont effectuées selon la procédure décrite par Höfer et al. [21]. L'hybridation est effectuée avec un fragment d'ADNc de 349 pb synthétisé par PCR. Cette sonde a été marquée au [ $\alpha$ <sup>32</sup>P] selon les recommandations du Random Primed Labeling Kit (MBI-Fermentas). La révélation et la détection ont été faites par exposition de la membrane sur écran phosphor-imager (Molecular Imager FX, Bio-Rad).

#### 2.5. Analyse bioinformatique

L'alignement des séquences et l'établissement des relations phylogénétiques ont été effectués à l'aide du

programme CLUSTALX [22]. Les prédictions topologiques de structure ont été réalisées avec les logiciels TopPred2 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>), DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>), TMpred ([http://www.isrec.isbsib.ch/software/TMPRED\\_form.html](http://www.isrec.isbsib.ch/software/TMPRED_form.html)) et ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>). Les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel DNASTAR (*Expert Sequence Analysis Software*, DNASTAR Inc.), et la recherche de séquences homologues a été effectuée au niveau de la base de données NCBI [23].

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Caractérisation de *Vvrd22*

L'ADNc *Vvrd22* (var. cabernet sauvignon) que nous avons identifié et isolé est constitué de 1358 nucléotides et possède une région 5' non traduite de 81 nucléotides, une région 3' non traduite de 182 nucléotides et une région codante de 1095 nucléotides. Le cadre de lecture identifié code une protéine putative de 364 acides aminés, dont la masse moléculaire a été estimée à 39,2 kDa. La Fig. 1 montre l'organisation génomique du gène *Vvrd22*. Ce dernier est localisé au niveau du chromosome 4 du génome de la vigne ; il possède 10 exons et mesure 1,8 kb (*the first genome sequence of an elite grapevine cultivar Pinot noir Vitis vinifera L. clone ENTAV 115*). Notons qu'une autre isoforme du gène *Vvrd22* a été identifiée au niveau du même chromosome, avec seulement trois exons et une longueur de 1,7 kb. La recherche dans la base de données NCBI a permis d'identifier une région, située en amont du site de départ de la transcription (SDT) du gène *Vvrd22*, contenant des éléments putatifs de régulation de la transcription. Cette partie génomique, adjacente à *Vvrd22* et mesurant environ 0,5 kb, a fait l'objet d'une recherche d'éléments régulateurs potentiels au niveau des deux brins. Ainsi, différents éléments de régulation ont été identifiés en amont du SDT du gène *Vvrd22*. Les premières boîtes TATA et CCAAT sont situées 50 pb en amont du SDT. Un groupe d'éléments de réponse aux facteurs de transcription Myb/Myc est localisé directement en amont du SDT. Par ailleurs, six boîtes Myb/Myc ont été recensées

sur ce fragment et sont toujours présentes conjointement sur les deux brins. Enfin, deux éléments ABRE, potentiellement requis pour la réponse à l'ABA, ont été localisés 500 pb en amont du SDT. De plus, des motifs impliqués dans l'expression au niveau de tissus spécifiques (tels que le pollen et le mésophylle) ont également été identifiés au niveau de ce fragment. La présence de tous ces éléments régulateurs suggère qu'il s'agit très probablement d'une région régulatrice et promotrice du gène *Vvrd22*, et que ce dernier pourrait jouer un rôle important dans la réponse aux stress hydrique et salin et que les facteurs de transcription Myb/Myc seraient impliqués dans la régulation de sa transcription ainsi que dans la signalisation du stress (via l'ABA). Cette dernière hypothèse a été effectivement démontrée chez *A. thaliana* [24,25]. L'étude de la séquence protéique a révélé que *Vvrd22* présente un niveau de similitude élevé avec les autres protéines rd22 végétales (Fig. 2). Par ailleurs, un domaine BURP a été identifié au niveau de la séquence peptidique. La présence de ce domaine, conservé au niveau de la partie C terminale de diverses protéines végétales, laisse supposer que ce domaine joue un rôle important [26]. Ce dernier est constitué de 210 à 230 résidus d'acides aminés et est caractérisé par l'enchaînement suivant : deux aa phénylalanine au niveau de la partie N terminale, puis deux aa cystéine, et quatre motifs répétés cystéine–histidine arrangés de la manière suivante CH–X(10)–CH–X(25–27)–CH–X(25–26)–CH, où X peut être n'importe quel aa. Le domaine BURP a été identifié pour la première fois chez *Brassica napus*, et sa fonction biologique demeure encore inconnue [26]. La protéine possède une multitude de sites putatifs de régulation et de modification post-traductionnelles, dont une quinzaine de sites de phosphorylation (Tableau 1). La présence d'un site d'attachement du glycosaminoglycan à la position 74 indique un probable mécanisme de glycosylation de la protéine, qui deviendrait une glycoprotéine à la suite de cette modification. Les aa lysine, glycine et valine représentent ensemble 30% de la protéine totale. Les espaces entre les différentes cystéines présentes dans la protéine sont disposés de la sorte : H2N–220–C–11–C–51–C–11–C–26–C–26–C–13–COOH, permettant ainsi plusieurs possibilités pour l'établissement des ponts disulfures nécessaires à l'établissement de la structure tertiaire. Par ailleurs, le motif en tandem simple VGVGKGTGVNVHAGKKGKPGGGTT est répété trois fois au niveau des positions 58–79, 80–102 et 103–119. Cette répétition a été également identifiée trois à six fois chez les protéines rd22 de *Prunus*, *Medicago*, *Brassica*, *Avena* et *Arabidopsis*. La structure de *Vvrd22* est organisée à 16,5% en hélice  $\alpha$ , 31,3%



Fig. 1. Organisation génomique du gène *Vvrd22* (1,8 kb) au niveau du chromosome 4 du génome de la vigne (cultivar Pinot noir *Vitis vinifera L. clone ENTAV 115*). Boîte noire : exon ; boîte blanche : région non traduite (RNT) ; trait noir : intron.

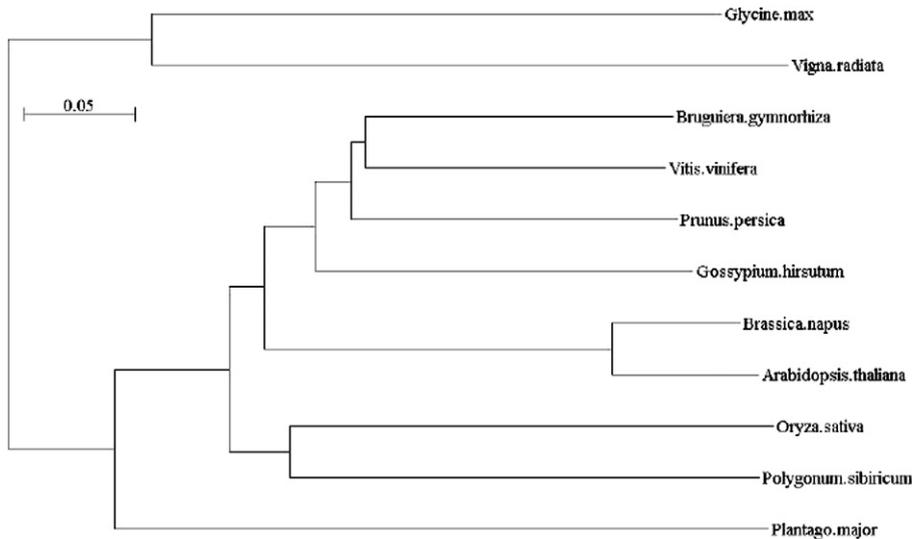


Fig. 2. Arbre phylogénétique de *Vvrd22* et ses homologues (*Glycine max* : AAM03361, *Vigna radiata* : BAC22500, *Brugiera gymnorhiza* : BAB60848 ; *Prunus persica* : AAL26909, *Vitis vinifera* : AAV36561, *Gossypium hirsutum* : AAQ22345, *Brassica napus* : AAC15700, *Arabidopsis thaliana* : BAA01546, *Oryza sativa* : BAF06075, *Polygonum sibiricum* : ABH09493, *Plantago major* : CAH59196).

Tableau 1  
Inventaire des sites putatifs de modification post-traductionnelle chez *Vvrd22*

SITE	Attachement du glycosaminoglycan	Phosphorylation par tyrosine kinase	Phosphorylation par protéine kinase C	Phosphorylation par caséine kinase II	N-Myristoylation
Position	74	131–261	191–203–213–217–245–302	132–164–217–235–239–257	55–75–81–98–104–124–312

en feuillet  $\beta$  et 52,2% en simple coude ou en chaîne linéaire. Bien qu'aucun peptide signal d'adressage de la protéine n'ait été identifié chez *Vvrd22*, celle-ci possède une région hélicoïdale transmembranaire tout au début de la séquence (aa : 2–24) pouvant jouer le rôle d'ancrage au niveau des membranes des organites et structures cellulaires, notamment le réticulum endoplasmique [27].

### 3.2. Étude de l'expression de *Vvrd22* chez la vigne

*Vvrd22* s'exprime de manière constitutive dans tous les tissus analysés, mais à un niveau réduit (Fig. 3). Il est transcrit de manière basale dans les feuilles (jeune et adultes), racines et baies à tous les stades, mais, cependant, à un moindre degré au niveau des racines. Il ne semble pas être spécifiquement lié à un stade de développement particulier de la plante, mais son expression serait probablement induite sous des conditions de stress hydrique et/ou osmotique. Le profil d'expression des gènes *rd22* est variable tant sur le plan quantitatif que spatial [28]. Chez le soja (*Glycine max*), les gènes *rd22* Gm3 et Gm4 sont principalement exprimés au niveau des feuilles sénescents et quasiment absents des

autres organes de la plante, alors que Gm5 est plutôt exprimé au niveau des fleurs, bourgeons végétatifs et graines [28]. Chez *A. thaliana*, le gène *rd22* est spécifiquement exprimé au niveau de la fleur et de la graine [29,30]. Chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), celui-ci semble être exprimé au niveau des méristèmes du tubercule dormant, mais réprimé au cours de la levée de dormance [31].

### 3.3. Étude de l'expression de *Vvrd22* en conditions de stress salin et hydrique

Les analyses par Northern Blot (Figs. 4 et 5) montrent que *Vvrd22* est induit par les stress salin et hydrique. Le stress hydrique induit l'expression du gène *Vvrd22* à la fois chez les variétés tolérante et sensible, avec toutefois un niveau d'expression plus intense chez la variété tolérante. En revanche, le stress salin induit l'expression de *Vvrd22* uniquement et spécifiquement chez la variété tolérante. Cette réponse est rapide, elle est visible après 6 h de stress et se poursuit en s'intensifiant après 24 h. On constate, par ailleurs, que chez la plante contrôle de la variété tolérante Razegui, *Vvrd22* affiche un niveau d'expression constitutif supérieur à

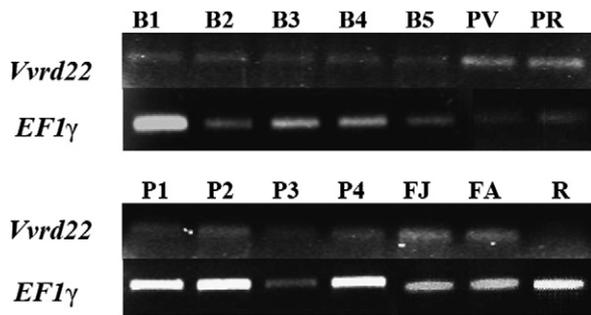


Fig. 3. Étude par RT-PCR du niveau d'expression de *Vvrd22* au cours des différents stades du développement de la baie et dans différents organes de la vigne (Bi : baie au stade *i*, Pi : pépin au stade *i*, PV : pellicule verte, PR : pellicule rouge, FJ : feuille jeune, FA : feuille adulte, R : racine). Le facteur d'élongation *EF1γ* est utilisé en guise de contrôle interne.

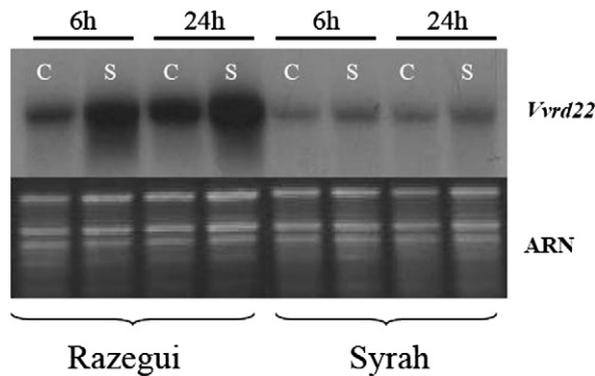


Fig. 4. Analyse par Northern Blot de l'expression du gène *Vvrd22* consécutive à l'application d'un stress salin chez les variétés Razegui (tolérante) et Syrah (sensible). C : Plante contrôle, S : plante stressée. Les analyses ont été effectuées 6 et 24 h après l'application du stress.

celui de la plante contrôle de la variété sensible Syrah. Ainsi, *Vvrd22* semble être différemment exprimé au niveau des variétés tolérante et sensible aussi bien en condition standard qu'en conditions de stress hydrique ou salin. Il serait par conséquent impliqué dans la réponse et la tolérance aux stress hydrique et salin chez la vigne. La régulation du niveau d'expression serait un facteur déterminant pour la tolérance au stress. L'expression de *rd22* en réponse aux stress hydrique et salin a été également démontrée chez *A. thaliana* [25, 30]. Chez *Bruguiera gymnorhiza*, Banzai et al. [32] ont constaté, consécutivement à l'application d'un stress salin (500 mM), une surexpression de gènes homologues à *rd22* au niveau des feuilles apicales, contrairement aux feuilles basales.

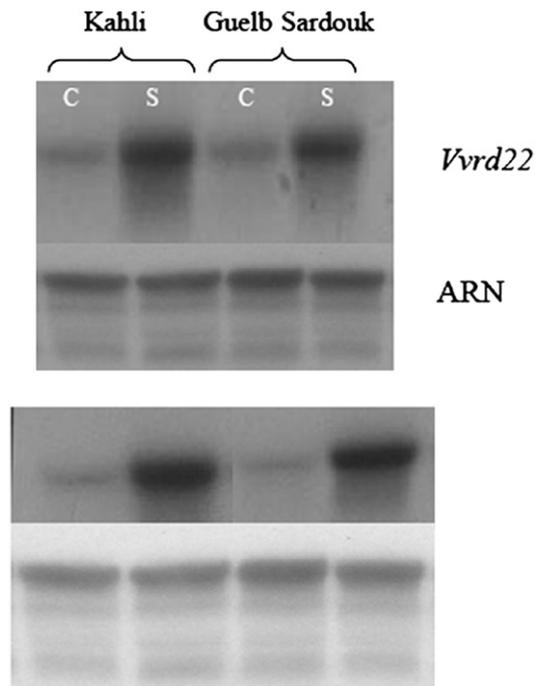


Fig. 5. Analyse par Northern Blot de l'expression du gène *Vvrd22* suite à l'application d'un stress hydrique chez les variétés Kahli (tolérante) et Guelb Sardouk (sensible). C : Plante contrôle, S : plante stressée.

### 3.4. Étude de l'expression de *Vvrd22* en réponse à l'ABA et/ou au saccharose

Ayant démontré que *Vvrd22* est induit par les stress salin et hydrique, nous avons réalisé des essais préliminaires pour rechercher les voies de signalisation de ces stress. Sachant qu'une des voies de signalisation des stress hydrique et salin pouvait suivre celle de l'ABA [33–35], nous avons, d'une part, étudié l'effet de cette hormone sur l'expression du gène *Vvrd22* et, d'autre part, comme il est également connu que le saccharose induit une tolérance à la déshydratation des tissus et cellules végétales cultivés *in vitro* [33,36], nous l'avons combiné avec l'ABA dans nos essais.

#### 3.4.1. Utilisation de l'ABA

Nos résultats ont montré que le gène *Vvrd22* est faiblement induit par 10  $\mu$ M d'ABA (Fig. 6). Chez *A. thaliana*, une forte induction du gène *rd22* a été rapportée à partir de 40  $\mu$ M d'ABA [25,37,38], ce qui expliquerait la faible induction de *Vvrd22*, avec seulement 10  $\mu$ M d'ABA dans notre cas. Pourtant cette dernière concentration est suffisante pour induire l'expression de gènes de réponse à la déshydratation et de tolérance au stress salin chez la vigne [39,40]. Dans le cas de la mangrove, l'application d'un traitement ABA a inhibé l'expression

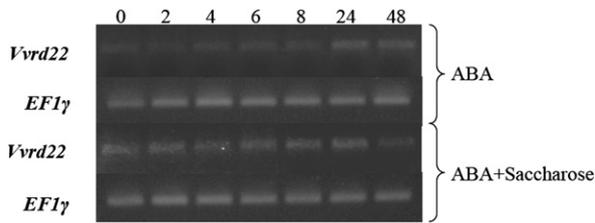


Fig. 6. Étude par RT-PCR du niveau d'expression du gène *Vvrd22* en réponse à l'application d'ABA (10  $\mu$ M) et de saccharose (58 mM) sur des suspensions cellulaires de baie de raisin. Les numéros des pistes (0, 2, 4, 6, 8, 24 et 48) indiquent le temps écoulé (en h) depuis l'application du traitement.

de gènes homologues à *rd22* [32]. Par ailleurs, différentes études ont mis en évidence l'expression de gènes suite à l'application de stress hydrique mais sans pour autant que ces derniers soient induits par l'ABA [29, 30]. Chez *A. thaliana*, l'expression du gène *rd22* pouvait être induite par l'ABA dans tous les organes de la plante, sauf dans la graine où elle ne semblait pas être régulée par l'ABA [30].

#### 3.4.2. Utilisation du saccharose

L'application de saccharose seul n'engendre aucune induction d'expression du gène *Vvrd22*.

#### 3.4.3. Utilisation de la combinaison ABA/saccharose

L'expression du gène suit le même profil que celui du traitement contenant l'ABA uniquement, mais gagne légèrement en intensité et en rapidité de réponse lors du traitement ABA + saccharose. En effet, la Fig. 6 décrit une légère amplification du signal lorsque les deux composés sont additionnés au milieu de culture des suspensions cellulaires. Des résultats similaires ont été obtenus pour les gènes *VvNHX1* [39], *VvMyb* [40] et *VvDhn* (non publié) de la vigne. Le saccharose semble interagir positivement avec l'ABA au niveau de la signalisation du stress.

## 4. Conclusions et perspectives

En utilisant une approche gène candidat, nous avons identifié un gène codant une protéine de type *rd22* impliquée dans la réponse à la déshydratation, mais aussi au stress salin chez la vigne. Au niveau structural, celle-ci est composée de 365 aa et possède un domaine conservé BURP dont la fonction demeure inconnue, bien qu'il ait été identifié chez plusieurs protéines végétales. L'analyse bioinformatique effectuée a révélé la complexité de la régulation de cette protéine, notamment par la présence putative de multiples sites de régulation ainsi que de motifs probables de modifications

post-traductionnelles. Sur le plan fonctionnel, ce gène affiche un faible niveau d'expression constitutif au niveau des différents tissus et organes de la vigne. Son expression semble plutôt être induite par les stress hydrique et salin, particulièrement chez la variété tolérante à ces stress. De plus, des molécules de signalisation de stress comme l'ABA (appliqué seul ou en combinaison avec le saccharose) induisent faiblement son expression dans des cellules de baie de raisin cultivées en suspension. Ainsi, malgré la présence d'un domaine conservé BURP chez les gènes *rd22*, ceux-ci affichent un profil d'expression variable et seraient par conséquent impliqués dans diverses fonctions cellulaires, notamment la réponse aux stress salin et hydrique. De ce fait, nos travaux d'identification et de caractérisation du gène *Vvrd22* chez la vigne ainsi que la détermination spatiotemporelle de son niveau d'expression dans les différents organes de la plante constituent une étape primordiale avant d'entamer des travaux d'analyse d'activité et de caractérisation fonctionnelle. À cet égard, l'ADNc *Vvrd22* a été cloné dans le vecteur d'expression pGREEN muni d'un promoteur constitutif P35S afin de pouvoir réaliser sa surexpression dans des plantes modèles (tabac, *Arabidopsis*) afin de valider sa fonction. L'ensemble de ces démarches constitue un pré-requis indispensable avant d'entamer un programme d'amélioration génétique de la vigne ou de tout autre plante d'intérêt agronomique dans le but d'obtenir des plants capables de mieux tolérer le stress hydrique et/ou salin.

## Références

- [1] N. Ennabli, L'irrigation en Tunisie, INAT-DGREF, 1995, Chap. 44, pp. 278–304.
- [2] M. Hachicha, Les sols salés et leur mise en valeur en Tunisie, Sécheresse 18 (2007) 45–50.
- [3] L.D. Prior, A.M. Grieve, B.R. Cullis, Sodium chloride and soil texture interactions in irrigated field grown sultana grapevines, I. Yield and fruit quality, Aust. J. Agric. Res. 43 (1992) 1051–1066.
- [4] R.M. Stevens, G. Harvey, D.L. Partington, B.G. Coombe, Irrigation of grapevines with saline water at different growth stages. I. Effects on soil, vegetative growth, and yield, Aust. J. Agric. Res. 50 (1999) 343–355.
- [5] J.C. Cushman, H.J. Bohnert, Genomic approaches to plant stress tolerance, Genome studies and molecular genetics, Curr. Opin. Plant. Biol. 3 (2000) 117–124.
- [6] M.P. Apse, E. Blumwald, Engineering salt tolerance in plants, Curr. Opin. Biotechnol. 13 (2002) 146–150.
- [7] P.M. Hasegawa, R.A. Bressan, J.K. Zhu, H.J. Bohner, Plant cellular and molecular responses to high salinity, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51 (2000) 463–499.
- [8] M. Rossignol, How plants react to stress: comprehensive study on gene response, Presse info, 2001, <http://www.inra.fr/PRESSE/janv01/gb/nb5.htm>.

- [9] A. Levigneron, F. Lopez, G. Vansuyt, P. Berthomieu, P. Fourcroy, F. Casse-Delbart, Les plantes face au stress salin, Cahiers d'Études et de Recherches francophones/Agricultures 4 (1995) 263–273.
- [10] K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Molecular responses to drought and cold stress, Curr. Opin. Biotechnol. 7 (1996) 161–167.
- [11] L. Deluc, F. Barriau, C. Marchive, V. Lauvergeat, A. Decendit, T. Richard, J.-P. Carde, J.-M. Mérillon, S. Hamdi, Characterization of a grapevine R2R2–MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway, Plant Physiol. 140 (2006) 499–511.
- [12] L. Hamrouni, M. Hanana, C. Abdelly, A. Ghorbel, Variabilité de la réponse au sel chez la vigne au stade de développement végétatif, Communication orale au 83<sup>e</sup> congrès mondial de l'Office de la vigne et du vin, Paris, France, 2003.
- [13] E.J. Hewitt, Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical communication No. 22, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK, 1966.
- [14] I. Toumi, W. Msheli, S. Bourgo, N. Jallouli, A. Ben Salem-Fnayou, A. Ghorbel, A. Mliki, Response of ungrafted and grafted grapevine cultivars and rootstocks (*Vitis* sp.) to water stress, J. Int. Sci. Vigne Vin 41 (2007) 85–93.
- [15] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant. 15 (1962) 473–497.
- [16] A. Decendit, K.G. Ramawat, P. Waffo, G. Deffieux, A. Badoc, J.M. Mérillon, Anthocyanins, catechins, condensed tannins and piceid production in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures, Biotechnol. Lett. 18 (1996) 659–662.
- [17] S. Chang, J. Puryear, J. Cairney, A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees, Plant Mol. Biol. Rep. 11 (1993) 113–116.
- [18] P.K. Boss, C. Davies, S.P. Robinson, Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation, Plant Physiol. 111 (1996) 1059–1066.
- [19] M.H. Asif, P. Dhawan, P. Nath, A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening Banana fruit, Plant Mol. Biol. Rep. 18 (2000) 109–115.
- [20] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [21] M.U. Höfer, U.J. Santore, P. Westhoff, Differential accumulation of the 10-, 16- and 23-kDa peripheral components of the water-splitting complex of photosystem II in mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of the dicotyledonous C<sub>4</sub> plant *flaveria trinervia* (Spreng.) C. Mohr, Planta 186 (1992) 304–312.
- [22] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, Nucleic Acids Res. 25 (1997) 4876–4882.
- [23] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215 (1990) 403–410.
- [24] H. Abe, T. Urao, T. Ito, M. Seki, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling, Plant Cell 15 (2003) 63–78.
- [25] H. Abe, K. Yamaguchi-Shinozaki, T. Urao, T. Iwasaki, D. Hosokawa, K. Shinozaki, Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression, Plant Cell 9 (1997) 1859–1868.
- [26] J. Hattori, K.A. Boutillier, M.M. Van Lookeren Campagne, B.L. Miki, A conserved BURP domain defines a novel group of plant proteins with unusual primary structures, Mol. Gen. Genet. 4 (1998) 424–428.
- [27] R. Bassuner, H. Baumlein, A. Huth, R. Jung, U. Wobus, T.A. Rapoport, G. Saalbach, K. Muntz, Abundant embryonic mRNA in field bean (*Vicia faba* L.) codes for a new class of seed proteins: cDNA cloning and characterization of the primary translation product, Plant Mol. Biol. 11 (1988) 321–334.
- [28] C. Granger, V. Coryell, A. Khanna, P. Keim, L. Vodkin, R.C. Shoemaker, Identification, structure, and differential expression of members of a BURP domain containing protein family in soybean, Genome/Génome 45 (2002) 693–701.
- [29] K. Yamaguchi-Shinozaki, M. Koizumi, S. Urao, K. Shinozaki, Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein, Plant Cell Physiol. 33 (1992) 217–224.
- [30] K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*, Mol. Gen. Genet. 238 (1993) 17–25.
- [31] L. Beers, Analysis of RD22 in Dormant and Non-Dormant Potato Meristems, Final reports for student projects, abstract p. 14; <http://www.pserie.psu.edu/research/sciencefinalreports.pdf>.
- [32] T. Banzai, K. Sumiya, N. Hanagata, Z. Dubinsky, I. Karube, Molecular cloning and characterization of genes encoding BURP domain-containing protein in the mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza*, Trees – Struct. Funct. 16 (2002) 87–93.
- [33] J. Ingram, D. Bartels, The molecular basis of dehydration tolerance in plants, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47 (1996) 377–403.
- [34] P.K. Busk, M. Pagès, Regulation of abscisic acid-induced transcription, Plant Mol. Biol. 37 (1998) 425–435.
- [35] J.-K. Zhu, Salt and drought stress signal transduction in plants, Annu. Rev. Plant Biol. 53 (2002) 247–273.
- [36] X.-J. Wang, C.-S. Loh, H.-H. Yeoh, W.Q. Sun, Differential mechanisms to induce dehydration tolerance by abscisic acid and sucrose in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) protocorms, Plant Cell Environ. 26 (2003) 737–744.
- [37] C.-H. Goh, H.G. Nam, Y.S. Park, Stress memory in plants: a negative regulation of stomatal response and transient induction of *rd22* gene to light in abscisic acid-entrained *Arabidopsis* plants, Plant J. 36 (2003) 240–255.
- [38] K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, A novel cisacting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress, Plant Cell 6 (1994) 251–264.
- [39] M. Hanana, O. Cagnac, T. Yamaguchi, S. Daldoul, S. Hamdi, A. Ghorbel, E. Blumwald, A grape berry (*Vitis vinifera* L.) cation/proton antiporter is associated with berry ripening, in: XIV International Workshop on Plant Membrane Biology, Valencia, Spain, 26–30 June 2007, Poster 7-6.
- [40] L. Deluc, Identification et caractérisation fonctionnelle de deux gènes régulateurs du métabolisme des composés phénoliques de la baie de raisin, thèse, université Bordeaux-I, 2004, p. 255.