

Résumé

Certains composés phénoliques tels que les stilbènes participent aux défenses de la vigne contre les maladies fongiques. Tirant parti du récent séquençage du génome de la vigne, l'objectif de ce travail est de réaliser une analyse structurale, fonctionnelle et évolutive des familles de gènes impliqués dans la biosynthèse des stilbènes chez la vigne, et de préciser leur rôle dans les défenses contre le mildiou (*Plasmopara viticola*).

La première étape de la biosynthèse des stilbènes est catalysée par la stilbène synthase (STS), pour former le resvératrol. L'annotation détaillée des gènes *STS* a permis d'identifier 48 gènes *STS*, dont 32 gènes potentiellement fonctionnels. Une telle amplification de gène *STS* n'avait jamais été mise en évidence chez d'autres plantes productrices de stilbènes. La caractérisation fonctionnelle des protéines STS a pu confirmer leur activité stilbène synthase, et une analyse par RT-PCR a permis de constater une induction globale de la famille des gènes *STS* suite à un stress UV, ce qui confirme leur fonctionnalité. L'analyse évolutive des gènes *STS* montre que la famille est soumise à une sélection purificatrice, sans trace de néo-fonctionnalisation. La famille des *STS* représente donc un exemple unique d'expansion d'une famille de gènes conservant leur fonction, et la signification biologique de cette expansion est discutée.

Une seconde enzyme importante du métabolisme des stilbènes est la resvératrol O-méthyltransférase (ROMT). La ROMT est impliquée dans la méthylation du resvératrol pour former le ptérostilbène, un composé hautement fongitoxique *in vitro*, et qui pourrait jouer un rôle important dans les mécanismes de défenses de la vigne. La famille ROMT est constituée de 17 gènes, dont seulement 2 gènes (*VvROMT1* et *VvROMT2*) semblent impliqués dans la synthèse de ptérostilbène. Ces deux gènes sont induits suite à une inoculation par *P. viticola* au niveau des feuilles de vigne. Deux autres gènes de la famille, *VvROMT12* et *VvROMT13*, sont exprimés constitutivement et au niveau des racines, et ne semblent pas être induits par *P. viticola* ou par un stress aux rayons ultraviolets. Des analyses métabolomiques sur des plants de *Nicotiana benthamiana* transgéniques exprimant ces deux ROMT ainsi que des tests enzymatiques *in vitro* ont été réalisés afin de déterminer la fonction des gènes *ROMT12* et *13*.

L'ensemble de ces résultats fait apparaître une amplification remarquable des gènes impliqués dans la synthèse des stilbènes chez la vigne et ouvrent la voie à l'étude détaillée de la régulation de cette voie importante du métabolisme de défense de la vigne.

Mots clefs : stilbène synthase, resvératrol O-méthyltransférase, ptérostilbène, *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*.

Abstract

One defense mechanism of grapevine against pathogens relies on the synthesis of anti-fungal secondary metabolites, such as resveratrol and its derivatives, which belongs to the stilbene family. With the help of the recent sequencing of *Vitis vinifera*, the objectives of this study is to initiate the structural, functional and evolutionary analysis of families of genes that belong to the stilbene metabolism, in order to clarify the role of the secondary metabolism in grapevine defense during the interaction with *Plasmopara viticola* (*P. viticola*).

The first step of the biosynthesis of stilbenes is catalysed by the stilbene synthase (STS), giving resveratrol. The annotation of the *STS* gene family yielded 48 STS genes, including at least 32 potentially functional ones. This unusual expansion of the *STS* family is original, since it is not found in other stilbene-producing plants. Functional characterization of *STS* proteins indicated that all of them showed a STS activity, and RT-PCR analysis after a UV-light stress indicated a global induction of all the *STS* gene family, giving us the proof for their functionality. Evolutionary analysis of the *STS* gene family revealed that *STS* evolution is dominated by purifying selection, with no evidence for strong selection for new functions among *STS* genes. *STS* family then represents a unique example of expansion of such a big family of genes that maintained their original function, and the biological significance of this amplification is discussed.

A second relevant enzyme of stilbene metabolism is represented by the resveratrol O-methyltransferase (ROMT). This enzyme carries the O-methylation of resveratrol to yield pterostilbene a high-toxic compound against fungi cells *in vitro* that seems to be important for the plant defense mechanisms. ROMT family is constituted of 17 genes, and only two genes (*VvROMT1* and *VvROMT2*) seem to be involved in pterostilbene biosynthesis. qPCR analyses have shown an induction of these two genes after an inoculation of *P. viticola* on grapevine leaves. Two others genes, *VvROMT12* and *VvROMT13*, are constitutively expressed in grapevine roots, and the expression of these genes is not induced by *P. viticola* or UV-light. Metabolomic analysis on transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing these two ROMT individually, together with *in vitro* enzymatic assays, has been performed in order to determine the function of ROMT12 and ROMT 13.

All the results show a remarkable amplification of genes that are involved in stilbenes biosynthesis in grapevine. These results lead the way for a detailed study of the regulation of this important pathway of defense metabolism in grapevine.

Keywords: stilbene synthase, resveratrol O-méthyltransférase, pterostilbene, *Plasmopara viticola*, *Vitis vinifera*.