



HAL
open science

De la qualité de la baie de raisin à la qualité du grain de sorgho, approches de génomiques fonctionnelles pour décrypter la mise en place la qualité dans la plante

Nancy Terrier

► To cite this version:

Nancy Terrier. De la qualité de la baie de raisin à la qualité du grain de sorgho, approches de génomiques fonctionnelles pour décrypter la mise en place la qualité dans la plante. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Montpellier, 2020. tel-04462994

HAL Id: tel-04462994

<https://hal.inrae.fr/tel-04462994>

Submitted on 16 Feb 2024

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.



Mémoire d'Habilitation à Diriger les Recherches

Nancy TERRIER

Chargée de Recherche INRAE

UMR Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales
(AGAP)

De la qualité de la baie de raisin à la qualité du grain de sorgho,
approches de génomiques fonctionnelles pour décrypter la mise en place de la qualité dans la plante

Mme Mathilde Causse	Directrice de recherche INRAE, Avignon	Rapportrice
Mme Véronique Cheynier	Directrice de recherche INRAE, Montpellier	Examinatrice
Mme Jacqueline Grima-Pettenati	Directrice de recherche CNRS, Toulouse	Rapportrice
Mr Philippe Huguéney	Directeur de recherche INRAE, Colmar	Rapporteur
Mr Jacques Le Gouis	Directeur de recherche INRAE, Clermont-Ferrand	Examineur
Mr Loïc Lepiniec	Directeur de recherche INRAE, Versailles	Examineur



Table des matières

Table des matières	2
Préambule/Remerciements	4
Curriculum Vitae.....	6
Participation/obtention de contrats de recherche	9
Encadrement d'étudiants, formations, jury d'examens.....	11
Les collaborations productives.....	13
Liste des publications indexées	15
Analyse des travaux scientifiques	26
1. 1994-2017 : Une première partie de carrière à étudier la mise en place de la qualité du raisin au cours du développement du fruit	27
1.1. Utilisation d'une approche gènes candidats pour le métabolisme de l'acidité, des parois et de composés d'arômes (1994-2003).....	28
1.1.1. Les modifications d'acidité du raisin pendant son développement	28
1.1.2. Le ramolissement de la baie et l'accumulation de composés d'arômes.....	30
1.2. Le début des approches systématiques à haut-débit pour étudier le développement du fruit (1998-2004)	30
1.2.1. Mise en place des outils transcriptomiques (EST-microarray).....	30
1.2.2. Utilisation des outils de transcriptomiques.....	31
1.3. Une approche intégrative pour étudier le la biosynthèse de flavonoïdes (2004-2017)	32
1.3.1. Les flavonoïdes	33
1.3.2. Les approches utilisées.....	37
1.3.3. Les criblages transcriptomiques	38
1.3.4. Les criblages génétiques : approches QTL et e-QTLs, génétique d'association	40
1.3.5. Les validations fonctionnelles de gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes (2008-2017)	41
2. Une poursuite de carrière pour comprendre la mise en place de la qualité pour différents usages du sorgho (2017-...)	49
2.1. Mise en place des outils de validations fonctionnelles	49
2.2. Qualité de la biomasse	49
Projet de recherche.....	51
1. Contextes scientifiques et socio-économiques.....	52
1.1. Les protéines alimentaires et le sorgho	52

1.2. Le sorgho, une céréale riche d'atouts agronomiques et génétiques...	52
1.3. ...mais dont les protéines sont récalcitrantes à la digestion	53
2. Etat de l'art scientifique et positionnement du projet à l'international	54
3. Plan d'action	56
3.1. Plusieurs types de matériel végétal seront utilisés	56
3.2. Phénotypage biochimique, histologique et protéomique	57
3.3. Analyse de données pour l'identification de gènes et régions candidates	57
3.3.1. Transcriptome et analyse des gènes exprimés au cours du développement du grain de sorgho et dans les transformants.....	57
3.3.2. Analyse du déterminisme de la digestibilité des protéines	58
Références bibliographiques	60
Tirés à part des principaux travaux scientifiques	67

Préambule/Remerciements

On se trouve toujours des excuses pour repousser la rédaction et la présentation de son HDR. D'abord mon tempérament me faisait dire que je n'en avais pas l'envergure (je ne le sais toujours pas). Puis j'ai prétexté le manque de temps, ou plutôt je préférerais le consacrer aux travaux de recherche proprement dits, plutôt qu'à l'écriture d'un document que je considérais comme essentiellement à vocation administrative. J'ai tout de même pu pendant cette période accompagner des doctorants grâce au « prêt » de leur titre par quelques aînés.

J'ai enfin pris mon courage à deux mains en m'inscrivant à une procédure d'encadrement pré-HDR à l'occasion du démarrage de la thèse de Thibaut Bontpart en 2012. Cette procédure, qui a disparu aujourd'hui, permettait au chercheur non encore HDR d'être officiellement affiché comme encadrant de thèse, mais l'engageait à soutenir son HDR avant la fin de la thèse de l'étudiant. Cette procédure m'ayant été refusée (la commission a considéré que je pouvais tenter directement mon HDR), je n'avais plus de dead-line pour postuler à ce fameux sésame. On était reparti pour un tour...

Puis sont arrivés ces événements difficiles dans le cadre de mes activités professionnelles qui ont fait que j'étais devenue incapable de me soumettre à ce genre d'exercice à cette période. Rien que de m'imaginer devant un jury me mettait dans un état de profonde panique. Ecrire ces lignes est encore très douloureux. Vivement que je passe aux pages suivantes.

Rassurez-vous, je ne suis pas responsable de ce virus et du confinement qu'il a provoqué, mais lui seul a permis que je m'y mette vraiment. Confinement le 16 mars, dépôt le 20 avril, avec encore quelques affaires courantes de réunions d'équipes et de projets, l'école à la maison et l'intendance qui n'est plus la même...

Un grand merci au jury d'avoir accepté d'examiner ce travail. J'espère que ce document ne sera pas trop pénible à lire, malgré la relative rapidité avec laquelle je l'ai rédigé.

J'ai croisé de belles personnes pendant ces années de travail :

- les doctorants (Jérôme, Sandrine, Yung-Fen, Thibaut, c'était cool vos thèses), et ceux que je n'ai pas encadrés mais qui sont toujours mes amis (Lolo, Chonchon)
- les collègues de SPO : feu-BMT, feu-BIVR, feu-BCP2 avec Agnès qui a toujours été là, Martine, Clotilde, Thérèse, Jean-Luc, les polyphénols et la plateforme (Véronique, merci de m'avoir fait rentrer dans ton monde des polyphénols, Manue...), les polysacchs (Pascale, Thierry), la microbio (Virginie, Jean-Luc) et plein que je ne peux pas tous citer
- mes nouveaux collègues d'AGAP, merci David de m'avoir fait confiance, les sorghottes Frédérique, Maëlle, Angélique et Caroline, le « couloir du riz » mené par Christophe pour leur accueil tant scientifique qu'humain.

Parmi ces belles personnes, certaines ont quitté la route, David Fournand parti beaucoup trop tôt, Jean-Luc Guiraud qui n'aura pas profité très longtemps de sa retraite, et Eric Lebon avec qui j'ai apprécié travailler.

Je ne remercie pas les personnes qui m'ont fait perdre pied il y a quelques années. Je ne remercie pas non plus celles qui auraient pu/dû faire quelque chose et qui ont laissé pourrir la situation.

Et puis parce que sans eux la vie ne serait pas pareille, un grand merci tous mes amis fidèles de la Cigale et de la Missonie (des délocalisations étant possibles, la Cigale à la Missonie, la Missonie au ski ...).

Mes parents, ma sœur, cœur avec les doigts.

Lucien, Marie, Dide

Curriculum Vitae

mentionnant les stages dans les différents laboratoires

TERRIER Nancy

Chargée de Recherche Hors Classe

INRAE Montpellier

Chercheur en génomique fonctionnelle

nancy.terrier@inrae.fr

UMR Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales

47 ans, vie maritale, 2 enfants (21 et 17 ans)

PARCOURS SCIENTIFIQUE

2017-actuellement **UMR Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales** - Chargée de Recherche INRA

Génomique fonctionnelle de la qualité de la tige et du grain de sorgho

2002-2017 **UMR Sciences Pour l'Œnologie** Chargée de Recherche 1^{ère} classe

Génomique fonctionnelle de la biosynthèse des polyphénols dans la baie de raisin

Equipe Biosynthèse et Composition en Polyphénols et Polysaccharides (N. Terrier) 2013 à 2017

Equipe Polyphénols et Interaction (V. Cheynier) de 2008 à 2013

Equipe Biologie Intégrative de la Vigne et du Raisin (G. Albagnac) de 2002 à 2008

1998-2002 **Laboratoire de Biochimie Métabolique et Technologie. INRA Montpellier** (J.-P. Robin). Chargée de Recherche 2^{ème} classe

Génomique fonctionnelle du développement de la baie de raisin, développement d'outils de transcriptomique haut débit

1994-1997 **Laboratoire de Biochimie Métabolique et Technologie. INRA Montpellier** (C. Romieu) Allocataire de Recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Aspects bioénergétiques et moléculaires du stockage des acides organiques dans la baie de raisin

1993 – 1994 **Laboratoire de Microbiologie Industrielle et Génétique des Micro-organismes. INRA-ENSA Montpellier** (G. Moulin) Stage de DEA et de fin d'étude d'ingénieur

*Influence de l'acide glycérophosphorique sur le métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae**

FORMATION

1994-1997 **Thèse de Doctorat** (mention TH, félicitations du jury) en Sciences des Aliments. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier

1993-1994 **Diplôme d'Etudes Approfondies** Sciences des Aliments, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Ecole Nationale Supérieure Agronomique (Montpellier)

- 1991-1994 **Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier**, Ingénieur diplômée, spécialité : Microbiologie Industrielle et Génétique des Microorganismes
- 1989-1991 **Classes préparatoires aux grandes écoles**, Maths Sup et Maths Spé Bio, Lycée Clémenceau, Reims

CONTRIBUTION À LA VIE ET AU FONCTIONNEMENT DE COLLECTIFS DE RECHERCHE, GESTION DE LA RECHERCHE

- 2013-2017 : Responsable de l'équipe BCP2 (Biosynthèse et Composition en Polyphénols et Polysaccharides), composée de 5 scientifiques et 3 ITA
De 2010 à 2013 : Co-animation avec A. Ageorges du groupe Biosynthèse des flavonoïdes au sein de l'équipe Polyphénols et Interaction
- Membre du collège de direction de l'UMR Science pour l'œnologie de 2013 à 2017
- Membre de la CSS INRA (Commission scientifique spécialisée, évaluation des chercheurs INRA) Sciences des Aliments, Biochimie, Biomatériaux de 2007 à 2010 ; CSS Sciences et Ingénierie des Aliments, des Matériaux, des Molécules pour la chimie et l'énergie de 2011 à 2014

EXPERTISE SCIENTIFIQUE

Encadrements de thèse

- co-encadrement de la thèse de L. Hennet avec D. Pot 2016-2019 (Dir. D. Luquet, H. Etienne). Identification et validation de gènes pour l'amélioration de la qualité de la biomasse du sorgho. Thèse U. Montpellier
- participation à l'encadrement de la thèse de M. Zerbib 2015-2018 (Dir C. Saucier). Etude des flavanols glycosylés de la maturation de la baie de raisin jusqu'à l'élaboration du vin. Thèse U. Montpellier
- encadrement de la thèse de T. Bontpart 2012-2015 (Dir. V. Cheynier). Vers l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la galloylation des proanthocyanidines chez la vigne. Thèse Montpellier SupAgro
- co-encadrement de la thèse de Y.-F. Huang 2008-2011 avec P. This (UMR DIAPC, INRA Montpellier) et V. Cheynier (Directeurs P. This et V. Cheynier). Bases génétiques et fonctionnelles de la composition en proanthocyanidines dans la baie de raisin. Thèse Université de Montpellier II
- encadrement de la thèse de F. Khater 2008-2011 (Dir. V. Cheynier). Identification et validation fonctionnelle de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse des composés phénoliques. Thèse Montpellier SupAgro
- co-encadrement de la thèse de C. Gomez avec A. Ageorges 2006-2009 (Dir. G. Albagnac). Etude des mécanismes de stockage des anthocyanes dans la baie de raisin : Caractérisation fonctionnelle des gènes impliqués dans ces mécanismes. Thèse Montpellier SupAgro
- participation à l'encadrement de la thèse de S. Mathieu (2002-2005) avec Z. Gunata et G. Moulin (Directeurs Z. Gunata et G. Moulin). Etude d'une carotène-dioxygénase de raisin (VvCCD1) : aspects biochimiques et moléculaires. Thèse Montpellier SupAgro
- co-encadrement de la thèse de J. Grimplet (2001-2004) avec C. Romieu (Dir G. Albagnac). Génomique fonctionnelle et marqueurs de qualité chez l'abricot. Thèse INP Toulouse

Reviewer pour des revues à comité de lecture: The Plant Cell, New Phytologist, The Plant

Journal, Plant Physiology, J. Exp. Bot., Planta, Plant Cell Report, Molecules, Nature Scientific Reports, J. Plant. Physiol., BMC Plant Biology, BMC Genomics, Phytochemistry, Phytochemistry Review, J. Plant Sciences, Postharvest Biology and Technology, Australian Journal of Grape and Wine Research, Food Chemistry, Molecules, J. International de la Vigne et du Vin.

Membre de jurys de recrutement

-CR2 INRA en 2002

-Maître de Conférence ENSA Toulouse en 2014

Evaluateur pour des programmes scientifiques

Evaluateur pour des programmes scientifiques nationaux (ANR, région Aquitaine, département BAP) ou internationaux (bilatéral Allemagne-Autriche, République Tchèque, NSF aux USA)

Invitations à des congrès comme conférencier plénier

- COST FA1108 QualityFruit, September 2016, Lisbon, Portugal. Genetic determinism of wine astringency.

- Macrowine, September 2014, Stellenbosch, South Africa. Biosynthesis and chemistry of proanthocyanidin and anthocyanin, from grapes to wine

- COST 858 Final meeting, October 2009, Bordeaux, France. Flavonoid metabolism in grape berry.

Distinctions scientifiques

- Prix Ragai Ibrahim du 'Polyphenol Group' 2016 pour l'article de T. Bontpart (Bontpart *et al.*, 2015)

- Arthur C. Neish Young Investigator Award 2008, prix jeune chercheur de la Phytochemical Society of North America

Participation/obtention de contrats de recherche

Nom du projet	An	Appel d'offre	Porteur	Ma responsabilité	Statut
Lignome	2000-2004	DS PPV/programme Lignome	C. Plomion (toutes plantes)/C. Romieu (vigne)		Accepté
Génomique de la vigne	2001-2003	Géno plante	S. Delrot (Univ. Poitiers)		Accepté
FLAVO	2004-2007	Projet Européen FP6	L. Lepiniec (INRA Versailles)		Accepté
GrapeFlavo	2006	ANR Géno plante	S. Hamdi (Univ. Bordeaux)		Refusé
Allocation Ministère/Ecole doctorale	2006-2009	ED Sciences des Aliments. Université de Montpellier	Dir. Thèse G. Albagnac	Rédaction projet thèse	Acceptée
MetaFlavo	2007	ANR Géno plante	V. Cheynier		Refusé
GnpAnnot	2007	ANR Géno plante 2008-2011	S. Sibide-Bocs		Accepté
Recherche de nouveaux gènes candidats impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes et validation de leur fonction	2008	ANS 2008-2009 Dept INRA CEPIA	Terrier/Ageorges	Co-porteur	Accepté
QualiVino : Effet de la température et du stress hydrique sur la qualité chez la vigne: une approche intégrée	2008	ANR Génomique	S. Delrot (INRA Bordeaux).		Refusé
FlavoPatho : Métabolisme des flavonoïdes et résistance des plantes aux stress biotiques.	2008	ANR Génomique	I. Debeaujon (INRA Versailles)		Refusé
Bourse de thèse Région Languedoc- Roussillon/Départemen ts CEPIA et GAP	2008-2011	Région Languedoc- Roussillon Dpts INRA CEPIA/BAP	N. Terrier / P. This	Co-porteur	Accepté
TRAFIC	2009	FP7-KBBE-2009	I. Debeaujon (IJPB Versailles)		Refusé
EQualiViti : eQTLs for major key enzymes of quality related biosynthetic pathways in grape.	2009	ANR Génomique	N. Terrier	Porteur	Refusé
EQualiViti : Search for regulating network of flavonoid pathways in grape berry through "eQTLs" approach	2010	ANR Génomique	N. Terrier	Porteur	Refusé
Recherche des facteurs géniques régulant les enzymes clés de la voie de biosynthèse des flavonoïdes par une approche « eQTLs »	2010-2011	ANS 2010-2011 Dept CEPIA INRA	N. Terrier	Porteur	Accepté

chez la vigne					
GAMEFLAVO	2011	ERC Advanced Grant	V. Cheynier		Refusé
Viti-Next	2011	Projet Grand Emprunt	P. This		Refusé
Allocation doctorale Ministère/Ecole doctorale	2012-2015	ED Sciences des Aliments Montpellier	Dir ; V. Cheynier	Responsable thèse	Acceptée
Innovine	2013-2016	UE FP7	AF Adam-Blondon		Accepté
COLOR	2013	ANR	I. Debeaujon (IJPB Versailles)	Responsable WP	Refusé 1 ^{er} tour
COLOR	2014	ANR	V. Cheynier (SPO)	Responsable WP	Refusé 1 ^{er} tour
TRANSMET	2014	H2020-ITN	A. Teissier (Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Allemagne)		Refusé
VinBio	2014	AgriBio4	P. Rigou (SPO)	Responsable WP	Refusé
BioFlavo	2015	ANR	V. Cheynier (SPO)	Responsable WP	Passage 1 ^{er} tour, Refusé 2 ^{ème} tour
BioFlavo	2016	ANR	V. Cheynier (SPO)	Responsable WP	Refusé 1 ^{er} tour
NV2	2015	FUI	J-R Mouret (SPO)		Projet accepté mais enveloppe insuffisante, notre volet a été supprimé par le collectif
FlavoAdapt	2016	Etendard Agropolis Fondation	A. Vernhet (SPO)	Responsable WP	Projet fusionné avec un autre pour acceptation, notre volet a été supprimé par le collectif
VitiPhenoDiv	2016	Thought for Food Initiative, Agropolis Fondation	V. Cheynier (SPO)	Responsable scientifique	Refusé
Digestibilité et technofonctionnalité des protéines de sorgho et de blé	2017	CAFES-COFECUB (Brésil)	MH. Morel (IATE)		Refusé
SoKaFi	2018	INRA-Dpt BAP	N. Terrier	Porteur	Accepté
SoProDige	2019	CASDAR AAP semences	N. Terrier	Porteur	Refusé
PreAdapt	2019	H2020-SFS-2018-2020	P. Martre (LEPSE)		Liste d'attente
Eskimo Maïs-Sorgho	2020	AMI Programmes d'Innovation Variétale et de Diversification INRAE	C. Horlow (IJPB)	Co-porteur	Refusé
SoProDige	2020	MUSE lettre d'intention	H. Mameri (IATE)		Refusé
Calico	2020	MUSE lettre d'intension	D. Pot (AGAP)		Lettre d'intention acceptée
NitroSorg	2020	CASDAR AAP Semences	N. Terrier	Porteur	En cours évaluation
PARTS	2020	Labex Agropolis	C. Granier	WP Leader	En cours évaluation

J'ai encadré 8 thèses, à différents niveaux d'implication.

- co-encadrement de la thèse de J. Grimplet (2001-2004) avec C. Romieu (Dir G. Albagnac). Génomique fonctionnelle et marqueurs de qualité chez l'abricot. Thèse INP Toulouse [9] (je ne suis co-auteur que du papier de transcriptomique et pas de ceux en protéomique)
- participation à l'encadrement de la thèse de S. Mathieu (2002-2005) avec Z. Gunata et G. Moulin (Dir. Z. Gunata et G. Moulin). Etude d'une carotène-dioxygénase de raisin (VvCCD1) : aspects biochimiques et moléculaires. Thèse Montpellier SupAgro [8, 13]
- co-encadrement de la thèse de C. Gomez avec A. Ageorges 2006-2009 (Dir. G. Albagnac). Etude des mécanismes de stockage des anthocyanes dans la baie de raisin : Caractérisation fonctionnelle des gènes impliqués dans ces mécanismes. Thèse Montpellier SupAgro [20, 22]
- encadrement de la thèse de F. Khater 2008-2011 (Dir. V. Cheynier). Identification et validation fonctionnelle de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse des composés phénoliques. Thèse Montpellier SupAgro [24, 35]. Fida a changé de sujet au bout d'un an (situation conflictuelle avec son précédent encadrant), elle n'a fait que ses deux dernières années de thèse avec moi
- encadrement de la thèse de T. Bontpart 2012-2015 (Dir. V. Cheynier). Vers l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la galloylation des proanthocyanidines chez la vigne. Thèse Montpellier SupAgro [29, 30, 35]
- co-encadrement de la thèse de Y.-F. Huang 2008-2011 avec P. This (UMR DIAPC, INRA Montpellier) et V. Cheynier (Dir. P. This et V. Cheynier). Bases génétiques et fonctionnelles de la composition en proanthocyanidines dans la baie de raisin. Thèse Université de Montpellier II [25, 26, 27, 28]
- participation à l'encadrement de la thèse de M. Zerbib 2015-2018 (Dir C. Saucier). Etude des flavanols glycosylés de la maturation de la baie de raisin jusqu'à l'élaboration du vin. Thèse U. Montpellier [34]. Je n'ai co-publié que sur la partie à laquelle j'ai participé.
- co-encadrement de la thèse de L. Hennet avec D. Pot 2016-2019 (Dir. D. Luquet). Identification et validation de gènes pour l'amélioration de la qualité de la biomasse du sorgho. Thèse U. Montpellier [36]

Membre de jury de thèse en tant qu'examinateur

- M. Zerbib (Dir C. Saucier, Université Montpellier, 2018)
- T. Bontpart (Dir. V. Cheynier, INRA Montpellier, 2015)
- F. Khater (Dir. V. Cheynier, INRA Montpellier, 2011)
- Y-F. Huang (Dir. P. This et V. Cheynier, INRA Montpellier, 2011)
- B. Auger (Dir. M. Renard, INRA Rennes 2010)
- P. Bidzinski (Dir I. Debeaujon, IJPB, INRA Versailles 2009)

Membre de comité de thèse en tant qu'« extérieur »

- L. Abdelbost (U. Montpellier, Dir MH Morel, 2018-2021)
- K. Coullonge (U. Montpellier, Dir. C. Lanaud, 2018-2021)
- P. Rousserie (U. Bordeaux, Dir L. Geny, 2017-2020)
- L. Wang (U. Bordeaux, Dir Z. Dai, 2016-2019)
- W. Xu (INRA Versailles, Dir L. Lepiniec, 2011-2014)

Jury d'examens

- Jury de M2 Pro, Université de Montpellier, août 2019
- Jury de BTS Biotechnologie, Lycée Albert Camus, Nîmes, juin 2019

- Jury de L3 pro EVAPPMT, Université de Montpellier, septembre 2018
- Jury du Diplôme National d'œnologue, Montpellier SupAgro, octobre 2018

Enseignement

- Montpellier SupAgro, UE phénotypage haut-débit Préparation du TD Apimet/Sepmet "Sorgho Composition de la tige", 6h, décembre 2017.
- Montpellier SupAgro, « Développement de la baie, approches moléculaires », 1 h 30, cours en spécialisation de 3ème année Viticulture-Œnologie de 2001 à 2004.

Les collaborations productives

De 1998 à 2017

Collaborations liées aux développements et compétences en outils transcriptomiques

K. Gruden (encadrement du doctorant M. Hren pendant une COST short mission), National Institute of Biology, Ljubjana, Slovénie

C. Chervin (encadrement du doctorant A. Tira-umphon pour ses expérimentations de transcriptomiques), UMR 990, Génomique et Biotechnologie des Fruits, INRA-INP/ENSA Toulouse

S. Delrot, UMR 1287, ISVV, Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne, Bordeaux

Collaborations thématiques

Collaborations nationales

-UMR DIA-PC, INRA Montpellier (P This, L Torregrosa), collaborations pour les aspects de génétique, transformation

-Laboratoire de Biologie des semences, IJPB, UMR204, INRA Versailles (I Debeaujon, L Lepiniec), montage de plusieurs projets sur la biosynthèse des flavonoïdes

-UMR MISTEA (Mathématiques, Informatique et STatistique pour l'Environnement et l'Agronomie), B. Fontaine et N. Hildgert pour le traitement des données obtenues dans le cadre d'INNOVINE avec le LEPSE, sous la forme d'un partenariat autour de stage de M2 (2017) en Biostatistique de B. Cuer qui sera suivi d'une thèse

-UMR LEPSE (Laboratoire d'EcoPhysiologie sous Stress Environnementaux), E. Lebon : impact du micro-climat des baies sur la synthèse des flavonoïdes dans le cadre d'INNOVINE

Collaborations internationales

Université de Zurich, M. Klein

Au sein de l'unité SPO :

-collaboration avec la plateforme polyphénol PFP (Anna Vallverdu CDD, Emmanuelle Meudec TR., Arnaud Verbaere TR, Nicolas Sommerer IR, JC Boulet IR direction V. Cheynier DR) pour le phénotypage (composition phénolique) d'une core-collection de cépages en condition témoin et en stress hydrique et pour la caractérisation des produits de réactions des différentes enzymes étudiées.

Participation à des réseaux

- Réseau LACCAVE faisant partie du Metaprogramme ACCAF 2012-2016 (coord. N. Ollat INRA Bordeaux et JM. Touzard, INRA Montpellier), réunissant des acteurs français essentiellement INRA, mais également CNRS, IFV (Institut Français du Vin), Montpellier SupAgro, Bordeaux ScienceAgro... autour des thématiques Vigne et Vin et Changement Climatique

- Participation au réseau COST Quality Fruit (tomate-raisin) animé par Mondher Bouzayen et Mario Pezzoti

Depuis 2017

Au sein de l'unité AGAP :

- collaboration avec l'équipe GIV (Génétique et Innovation Variétale, David Pot) pour les aspects de génétique
- collaboration avec l'équipe DAR (développement adaptatif du Riz dirigée par C. Périn) dans le cadre de la mise au point des méthodes de, transformation et régénération du sorgho et d'édition du génome
- collaboration avec la plateforme d'imagerie PHIV (JL Verdeil), pour la mise en évidence par imagerie des différents composés dans la tige du sorgho (acides phénols, lignine, subérine, anthocyanes), hybridation *in situ* pour la localisation de l'expression de gènes d'intérêt
- collaboration avec l'équipe PAM (Delphine Luquet, Christine Granier, Phénotypage et Adaptation des Monocotylédones)
- collaboration avec le Plateau de Phénotypage Biochimique (A. Clément-Vidal) pour la caractérisation des échantillons d'un point de vue biochimique et par SPIR

Au niveau national

- collaboration avec l'UMR IATE (Ingénierie des Agro-polymères et Technologies Émergentes), M.H. Morel et H. Mameri, recruté CR INRA en 2017, sur la qualité de la graine de sorgho.
- collaboration avec l'IJPB (Matthieu Reymond, Sylvie Coursol, Valérie Méchin, Herman Hofte...) dans le cadre du projet PIA Biomass For the Future (qualité de la biomasse)
- collaboration avec l'IJPB (François Perreau, Grégory Mouille, Loïc Lepiniec) dans le cadre du projet SPS MetSpé (Métabolites spécialisés)

A l'international

Lauriane Henet (doctorante) a effectué un stage de 3 mois pour acquérir une technique de transformation par biolistique du sorgho en utilisant la technologie CRISPR-Cas9 chez Ian Godwin (Univ. Queensland, Brisbane, Australie)

Liste des publications indexées

Je suis à ce jour auteur de 36 publications et 5 chapitres d'ouvrage. D'après la classification Noria des publications, 9 sont classées en Exceptionnelles, 22 en Excellentes et 5 en Correctes. Les références précédées d'une étoile sont jointes à la fin de ce mémoire

- *36- Hennet L, Berger A, Trabanco N, Ricciuti E, Dufayard JF, Sidibe-Bocs S, Bastianelli D, Bonnal L, Rossini L, Luquet D, Terrier N[♦], Pot D[♦]. (2020) Transcriptional regulation of sorghum stem composition: key players identified through Co-expression gene network and comparative genomics analyses. *Frontiers in Plant Science*, 11, 224. doi: 10.3389/fpls.2020.00224. ♦These authors have contributed equally to this work
- 35- Bontpart, T., Ferrero, M., Khater, F., Marlin, T., Vialet, S., Vallverdu Queralt, A., Pinasseau, L., Ageorges, A., Cheynier, V., Terrier, N. (2018). Focus on putative serine carboxypeptidase-like acyltransferases in grapevine. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130, 356-366. , DOI : 10.1016/j.plaphy.2018.07.023
- 34- Zerbib, M., Mazauric, J. P., Meudec, E., Le Guerneve, C., Lepak, A., Nidetzky, Cheynier, V., Terrier, N., Saucier, C. (2018). New flavanol O-glycosides in grape and wine. *Food Chemistry*, 266, 441-448. , DOI : 10.1016/j.foodchem.2018.06.019
- 33- Pinasseau, L., Vallverdu Queralt, A., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Le Cunff, L., Peros, J.-P., Ageorges, A., Sommerer, N., Boulet, J. C., Terrier, N., Cheynier, V. (2017). Cultivar diversity of grape skin polyphenol composition and changes in response to drought investigated by LC-MS based metabolomics. *Frontiers in Plant Science*, 8, 24. DOI : 10.3389/fpls.2017.01826
- 32- Apolinar-Valiente, R., Gómez-Plaza, Terrier, N., Doco, T., Ros-García (2017). The composition of cell walls from grape skin in *Vitis vinifera* intraspecific hybrids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97 (12), 4029-4035. , DOI : 10.1002/jsfa.8270
- 31- Pinasseau, L., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Vallverdu Queralt, A., Terrier, N., Boulet, J. C., Cheynier, V., Sommerer, N. (2016). A fast and robust UHPLC-MRM-MS method to characterize and quantify grape skin tannins after chemical depolymerization. *Molecules*, 21 (10), 13 p. , DOI : 10.3390/molecules21101409
- *30- Bontpart, T., Marlin, T., Vialet, S., Guiraud, J.-L., Pinasseau, L., Meudec, E., Sommerer, N., Cheynier, V., Terrier, N. (2016). Two shikimate dehydrogenases, VvSDH3 and VvSDH4, are involved in gallic acid biosynthesis in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 67 (11), 3537-3550. , DOI : 10.1093/jxb/erw184
- *29- Bontpart, T., Cheynier, V., Ageorges, A., Terrier, N. (2015). BAHD or SCPL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds. *New Phytologist*, 208 (3), 695-707. , DOI : 10.1111/nph.13498
- *28- Huang, Y. F., Vialet, S., Guiraud, J.-L., Torregrosa, L., Bertrand, Y., Cheynier, V., This, P., Terrier, N. (2014). A negative MYB regulator of proanthocyanidin accumulation, identified through expression quantitative locus mapping in the grape berry. *New Phytologist*, 201 (3), 795-809. , DOI : 10.1111/nph.12557
- 27- Huang, Y.-F., Bertrand, Y., Guiraud, J.-L., Vialet, S., Launay, A., Cheynier, V., Terrier, N., This, P. (2013). Expression QTL mapping in grapevine--revisiting the genetic determinism of grape skin colour. *Plant Science*, 207, 18-24. , DOI : 10.1016/j.plantsci.2013.02.011

- 26- Carrier, G., Huang, Y. F., Le Cunff, L., Fournier Level, A., Vialet, S., Souquet, J. M., Cheynier, V., Terrier, N., This, P. (2013). Selection of candidate genes for grape proanthocyanidin pathway by an integrative approach. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72 (SI), 87-95. , DOI : 10.1016/j.plaphy.2013.04.014
- *25- Huang, Y. F., Doligez, A., Fournier Level, A., Le Cunff, L., Bertrand, Y., Canaguier, A., Morel, C., Miralles, V., Veran, F., Souquet, J. M., Cheynier, V., Terrier, N., This, P. (2012). Dissecting genetic architecture of grape proanthocyanidin composition through quantitative trait locus mapping . *BMC Plant Biology*, 12. , DOI : 10.1186/1471-2229-12-30
- *24- Khater, F., Fournand, D., Vialet, S., Meudec, E., Cheynier, V., Terrier, N. (2012). Identification and functional characterization of cDNAs coding for hydroxybenzoate/hydroxycinnamate glucosyltransferases co-expressed with genes related to proanthocyanidin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 63 (3), 1201 - 1214. , DOI : 10.1093/jxb/err340
- 23- Guillaumie, S., Fouquet, R., Kappel, C., Camps, C., Terrier, N., Moncomble, D., Dunlevy, J. D., Davies, C., Boss, P. K., Delrot, S. (Auteur de correspondance) (2011). Transcriptional analysis of late ripening stages of grapevine berry. *BMC Plant Biology*, 11, 27 p. , DOI : 10.1186/1471-2229-11-165
- 22- Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N., Ageorges, A. (2011). In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *Plant Journal*, 67 (6), 960-970. , DOI : 10.1111/j.1365-313X.2011.04648.x
- 21- Olle, D., Guiraud, J.-L., Souquet, J. M., Terrier, N., Ageorges, A., Cheynier, V., Verries, C. (2011). Effect of pre- and post-veraison water deficit on proanthocyanidin and anthocyanin accumulation during Shiraz berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17 (1), 90 - 100. , DOI : 10.1111/j.1755-0238.2010.00121.x
- *20- Gomez, C., Terrier, N., Torregrosa, L., Vialet, S., Fournier Level, A., Verries, C., Souquet, J. M., Mazauric, J. P., Klein, M., Cheynier, V., Ageorges, A. (2009). Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters. *Plant Physiology*, 150 (1), 402-415. , DOI : 10.1104/pp.109.135624
- 19- Hren, M., Nikolić, P., Rotter, A., Blejec, A., Terrier, N., Ravnikar, M., Dermastia, M., Gruden, K (2009). 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics*, 10, 17 p. , DOI : 10.1186/1471-2164-10-460
- *18- Terrier, N., Torregrosa, L., Ageorges, A., Vialet, S., Verries, C., Cheynier, V., Romieu, C. (2009). Ectopic expression of VvMybPA2 promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway. *Plant Physiology*, 149 (2), 1028-1041. , DOI : 10.1104/pp.108.131862
- 17- Cutanda-Perez, M.C., Ageorges, A., Gomez, C., Vialet, S., Terrier, N., Romieu, C., Torregrosa, L. (2009). Ectopic expression of VlmybA1 in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport. *Plant Molecular Biology*, 69 (6), 633-648. , DOI : 10.1007/s11103-008-9446-x
- 16- Chervin, C., Tira-Umphon, A., Terrier, N., Zouine, M., Severac, D., Roustan, JP (2008). Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts,

- over the ripening phase. *Physiologia plantarum*, 134 (3), 534-46. , DOI : 10.1111/j.1399-3054.2008.01158.x
- 15- Verries, C., Guiraud, J.-L., Souquet, J. M., Vialet, S., Terrier, N., Ollé, D. (2008). Validation of an extraction method on whole pericarp of grape berry (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz) to study biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (14), 5896-5904. , DOI : 10.1021/jf800028k
 - 14- Fernandez, L., Torregrosa, L., Terrier, N., Sreekantan, L., Grimplet, J., Davies, C., Thomas, M. R., Romieu, C., Ageorges, A. (2007). Identification of genes associated with flesh morphogenesis during grapevine fruit development. *Plant Molecular Biology*, 63 (3), 307–323. , DOI : 10.1007/s11103-006-9090-2
 - 13- Mathieu, S., Bigey, F., Procureur, J., Terrier, N., Günata, Z. (2007). Production of a recombinant carotenoid cleavage dioxygenase from grape and enzyme assay in water-miscible organic solvents. *Biotechnology Letters*, 29 (5), 837-841. , DOI : 10.1007/s10529-007-9315-8
 - 12- Ageorges, A., Fernandez, L., Vialet, S., Merdinoglu, D., Terrier, N., Romieu, C. (2006). Four specific isogenes of the anthocyanin co-expressed with the red colour of grape berries. *Plant Science*, 170 (2), 372-383. , DOI : 10.1016/j.plantsci.2005.09.007
 - 11- Chervin, C., Terrier, N., Ageorges, A., Ribes, F., Kuapunyakoon, T. (2006). Influence of ethylene on sucrose accumulation in grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (4), 511-513.
 - *10- Terrier, N., Glissant, D., Grimplet, J., Barrieu, F., Abbal, P., Couture, C., Ageorges, A., Atanassova, R., Léon, C., Renaudin, J.-P., Déddaldéchamp, F., Romieu, C., Delrot, S., Hamdi, S. (2005). Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta*, 222 (5), 832-847. , DOI : 10.1007/s00425-005-0017-y
 - 9- Grimplet, J., Romieu, C., Audergon, J.M., Marty, I., Albagnac, G., Lambert, P., Bouchet, J.P., Terrier, N. (2005). Transcriptomic study of apricot fruit (*Prunus armeniaca*) ripening among 13 006 expressed sequence tags. *Physiologia Plantarum*, 125, 281-292.
 - 8- Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., Günata, Z. (2005). A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: Functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 56 (420), 2721-2731. , DOI : 10.1093/jxb/eri265
 - 7- Terrier, N., Ageorges, A., Abbal, P., Romieu, C. (2001). Generation of ESTs from grape berry at various developmental stages. *Journal of Plant Physiology*, 158 (12), 1575-1583.
 - 6- Terrier, N., Sauvage, F.X., Ageorges, A., Romieu, C. (2001). Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. *Planta*, 213, 20-28.
 - 5- Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., Pellerin, P. (2001). Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry*, 58 (5), 693-701.
 - 4- Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., Pellerin, P. (2000). Analysis

of cell wall neutral sugar composition, beta-galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38 (4), 289-300.

- 3- Terrier, N., Romieu, C. (1998). Inhibition of vacuolar proton pumps by ethanol impairs grape berry compartmentation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4 (1), 39-45. , DOI : 10.1111/j.1755-0238.1998.tb00133.x
- 2- Terrier, N., Deguilloux, C., Sauvage, F.X., Martinoia, E., Romieu, C. (1998). Proton pumps and anion transport in *Vitis vinifera*: The inorganic pyrophosphatase plays a predominant role in the energization of the tonoplast. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36 (5), 367-377.
- 1- Kraeva, E., Tesnière, C., Terrier, N., Romieu, C., Sauvage, F.X., Bierne, J., Deloire, A. (1998). Transcription of a beta-1,3-glucanase gene in grape berries in a late developmental period, or earlier after wounding treatments. *Vitis*, 37 (3), 107-111.

Ouvrages, chapitres d'ouvrages, rapports diplômants

- Ageorges, A., Cheynier, V., Terrier, N. (2014). Fruit nutritional quality : Polyphenols. In: P. Nath, M. Bouzayen, A.K. Mattoo, J.C. Pech, dir., Fruit ripening: physiology, signalling and genomics. (p. 151-177). USA : CABI Publishing
- Huang, Y.-F., Cheynier, V., Terrier, N. (2012). Shedding light on the black boxes of the proanthocyanidin pathway with grapevine. In: Veronique Cheynier, Pascale Sarni-Manchado, Stephane Quideau, Recent Advances in Polyphenol Research. Vol. 3 (p. 161-190). Malden, USA : Wiley-Blackwell. 384 p.
- Terrier N, Olle D, Verries C and Cheynier V. (2009) Biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development in *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology* Roubelakis (Ed), Springer Book, pp. 365-388.
- Terrier N, Poncet-Legrand C and Cheynier V (2009). Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols in *Wine Chemistry and Biochemistry*,y Polo, C. and Moreno-Arribas, M. V. (Eds), Springer Science, pp. 463-507.
- Terrier N. and C. Romieu (2001). Grape berry acidity. In: K.A. Roubelakis-Angelakis , *Molecular biology and biology of the grapevine* (p. 35-46). NLD : Luwer Academic Publishers.

Communications à des congrès et colloques (l'auteur dont le nom est souligné a présenté oralement)

Conférences invitées

- Le Cunff, L., Doligez, A., Souquet, J. M., Huang, Y. F., Carrier, G., Guiraud, J.-L., Vialet, S., Roux, C., Cheynier, V., This, P., Terrier, N. (2015). Genetics determinism of wine astringency. Highlight of a gene involved in the regulation of proanthocyanidin polymerization. Presented at COST Action FA1106 "QualityFruit" - 2 nd Annual Conference *Fleshy Fruit Development & Ripening* , Lisbonne, PRT (2015-09). <http://prodinra.inra.fr/record/404705>
- Terrier, N., Ageorges, A., Cheynier, V. (2014). Biosynthesis and chemistry of proanthocyanidin

and anthocyanin, from grapes to wine. Presented at Macrowine 2014, Stellenbosch, ZAF (2014-09-07 - 2014-09-10). <http://prodinra.inra.fr/record/398839>

Ageorges, A., Gomez, C., Conejero, G., Terrier, N., Cheynier, V. (2011). Grape Berry: A model for study trafficking and sequestration of anthocyanins. Presented at 6. International workshop on Anthocyanins, Charlotte/Condord, USA (2011-09-11 - 2011-09-14).

Ageorges, A., Terrier, N., Cheynier, V. (2011). Anthocyanin in grape berries: Biosynthesis, decoration, trafficking and storage. Presented at EPSO Workshop on Plant pigments and Human health, Gérone, ESP (2011-05-24 - 2011-05-26).

Terrier, N., Le Cunff, L., Vialet, S., Torregrosa, L., Gomez, C., This, P., Cheynier, V., Ageorges, A. (2009) Flavonoid metabolism in grape berry. *COST 858 Final meeting*, October 27-30, Bordeaux, France.

Terrier, N., Ollé, D., Guiraud, J.-L., Ageorges, A., Sauvage, F. X., Romieu, C. (2004). Selective activation of different water channels at the tonoplast and plasma membrane during the two different phases of berry development in *Vitis vinifera* L. . Presented at Cost 858 meeting Water transport and aquaporins in grapevine, Alcudia Mallorca , ESP (2004-10-21 - 2004-10-22).

Communications avec actes

Présentations orales

Hennet, L., Richaud, F., Rios, M., Calatayud, C., Berger, A., Godwin, I., Dufayard, J.6F, Pot, D., Luquet D., Terrier, N. (2019) Identification of new genes involved in secondary cell wall deposition in sorghum. Presented at 12èmes journées du Réseau Français des Parois, 14 au 16 Mai 2019, Roscoff, FRA.

Cheynier, V., Pinasseau, L., Vallverdu Queralt, A., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Le Cunff, L., Peros, J.-P., Ageorges, A., Sommerer, N., Boulet, J. C., Terrier, N. (2018). Cultivar diversity of grape polyphenol composition and changes in response to drought investigated by LC-MS based metabolomics. Presented at Macrowine 2018, Saragoze, ESP (2018-05-28 - 2018-05-31).

Bontpart, T., Marlin, T., Vialet, S., Guiraud, J.-L., Pinasseau, L., Meudec, L., Sommerer, N., Cheynier, V., Terrier, N. (2016) SHEDDING LIGHT ON GALLIC ACID BIOSYNTHESIS IN GRAPEVINE. Polyphenols communications, Vienna, Austria, 11th-15th July 2016.

Bontpart, T., Marlin, T., Vialet, S., Guiraud, J.-L., Meudec, E., Ageorges, A., Cheynier, V., Terrier, N. (2014). Grape shikimate dehydrogenase involvement in gallic acid biosynthesis. Presented at COST Action FA1106 "QualityFruit" - 2 nd Annual Conference Fleshy Fruit Development & Ripening , Chania, GRC (2014-09).

Huang, Y. F., Carrier, G., Le Cunff, L., Vialet, S., Guiraud, J.-L., Torregrosa, L., Bertrand, Y., Cheynier, V., This, P., Terrier, N. (2013). A MYB factor, identified through expression quantitative locus mapping, negatively regulates the proanthocyanidin pathway in grape berry.. Presented at COST Action FA1106 "QualityFruit" - 2 nd Annual Conference Fleshy Fruit Development & Ripening , Chania, GRC (2013-09-22 - 2013-09-25).

Khater, F., Fournand, D., Vialet, S., Meudec, E., Cheynier, V., Terrier, N. (2012). The first step of proanthocyanidin galloylation involves glucosyltransferases. *Pharmaceutical Biology*, 50

(5). Presented at 50. Anniversary Meeting of the Phytochemical Society of North America, Hilo, Hawaii, USA (2011-12-10 - 2011-12-15). Londres, GBR : Informa Healthcare.

Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N., Ageorges, A. (2010). Different anthocyanin transport mechanisms coexist in grapevine. Presented at 3. International Symposium Macrowine, Turin, ITA (2010-06-16 - 2010-06-18). 1 p.

Gomez, C., Conejero, G., Cheynier, V., Terrier, N., Ageorges, A. (2010). Characterization of new MYB genes potentially regulating anthocyanin synthesis in *Vitis vinifera*. Presented at 3. International Symposium on MACROWINE, Torino, ITA (2010-06-16 - 2010-06-18).

Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N., Ageorges, A. (2010). Grapevine anthocyanin transport involves in vivo vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. Presented at 25. International Conference on Polyphenols, Montpellier, FRA (2010-08-24 - 2010-08-27). 1 p.

Gomez, C., Vialet, S., Romieu, C., Torregrosa, L., Klein, M., Cheynier, V., Terrier, N., Ageorges, A. (2008). Identification and characterization of MATE family genes involved in anthocyanin transport in grape berries. Presented at 24. International Conference on Polyphenols, Salamanca, ESP (2008-07-08 - 2008-07-11).

Terrier, N. (2008) Molecular aspect of biosynthesis of flavonoid in grape berries. Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America, June 25-30, Washington State University, Pullman, WA, USA. **Arthur C. Neish Young Investigator Award 2008**

Terrier, N., Vialet, S., Verries, C., Romieu, C., Ageorges, A., Torregrosa, L. (2008) A new Myb factor VvPA2 is implicated in proanthocyanidin biosynthesis regulation in grape berries. XXIVth International Conference on Polyphenols, July 2008, Salamanca, Spain.

Gomez, C., Vialet, S., Romieu, C., Torregrosa, L., Klein, M., Cheynier, V., Terrier, N., Ageorges, A. (2008) Identification and characterization of a MATE family genes involved in anthocyanins transport in grape berries. XXIVth International Conference on Polyphenols, July 2008, Salamanca, Spain.

Gomez, C., Vialet, S., Romieu, C., Torregrosa, L., Klein, M., Cheynier, V., Terrier, N., Ageorges, A. (2008). Two *Vitis vinifera* MATE proteins act as tonoplast acylated anthocyanin / H⁺ antiporters. Presented at 8. International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Adelaide, AUS (2008-11-23 - 2008-11-28).

Terrier, N., Vialet, S., Guiraud, J.L., Souquet, J.M., Verriès, C., Ollé, D., Ageorges, A. (2006) Identification of genes involved in the proanthocyanidin biosynthesis in grape berry. Macromolecules of Grape and Wines Macrowine, Reims, France, 18-21 mai

Fernandez, L., Ageorges, A., Cutanda, M., Velasco, R., Bouquet, A., Terrier, N., Lopez, G., Pradal, M., Sreekantan, L., Thomas, M., Romieu, C., Torregrosa, L. (2006). Towards a better understanding of the biological and molecular basis of grapevine berry early morphogenesis through the analysis of small-sized berry mutants. Presented at 9. International Symposium Grapevine Genetics and Breeding, Udine, ITA (2006-07-02 - 2006-07-06).

Fernandez, L., Ageorges, A., Terrier, N., Doligez, A., Thomas, M., Bouquet, A., Romieu, C.,

Torregrosa, L. (2005). Searching key regulatory genes at the origin of cell differentiation inside the pericarp. Presented at COST 858 Workshop, Geilweilerhof, DEU (2005-10-06 - 2005-10-07).

Terrier N., Glissant D., Grimplet J., Barrieu F., Abbal P., Couture C., Ageorges A., Atanassova R., Léon C., Renaudin J.P., Dedaldechamp F., Delrot S., Hamdi S. and Romieu C. (2004) Isogene Specific Oligo Arrays Reveal Multifaceted Changes in Gene Expression During Grape Berry (*Vitis vinifera* L.) Development. 7th International symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Davis (California, USA), 21-25 juin

Grimplet, J., Romieu, C., Sauvage, F.X., Terrier, N., Lambert, P., Audergon, J.M., Dirlwanger, E., Cosson, P., Le Dantec, L., Moing, A. (2004). EST in Prunus genus (apricot and peach). In: Rosaceae genome mapping (p. 1 p.). Presented at International rosaceae genome mapping conference, Clemson, SC, USA (2004-05-22 - 2004-05-24).

Grimplet, J., Romieu, C., Sauvage, F.X., Lambert, P., Audergon, J.M., Terrier, N. (2004). Transcriptomics and proteomics tools towards ripening markers assisted selection in apricot. In: Fruit breeding and genetics (p. 291-295). Acta Horticulturae (663). Presented at 11. Eucarpia Symposium, Angers, FRA (2003-09-01 - 2003-09-05). Wageningen, NLD : ISHS.

Couture, C., Terrier, N., Glissant, D., Abbal, P., Ageorges, A., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Grimplet, J., Barrieu, F., Delrot, S., Romieu, C., Hamdi, S. (2003). Development and maturation of grape berries : transcriptome analysis for highthroughput studies. Presented at 7. International Symposium of Enology, Bordeaux, FRA .

Terrier, N., Couture, C., Glissant, D., Atanassova, R., Abbal, P., Ageorges, A., Dédaldéchamp, F., Grimplet, J., Delrot, S., Hamdi, S., Romieu, C., Barrieu, F. (2003). Transcriptome analysis of developing grape berries. Presented at Séminaire Génoplante, Poitiers, FRA .

Terrier, N., Ageorges, A., Romieu C. (2000). Developmental changes in grape berry vacuolar acidity : functional and molecular aspects. 6th International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Heraklion, Grèce, 11-15 juin (communication orale, résumé).

Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., Pellerin, P. (1999). Les parois cellulaires et la maturation de la baie de raisin : activités enzymatiques participant à leur évolution. In: Oenologie 99 (p. 12-16). Presented at 6. Symposium d'Oenologie, Bordeaux, FRA (1999-06-10 - 1999-06-12). Paris, FRA : Editions TEC et DOC.

Terrier, N., Issaly, N., Sauvage, F.X., Ageorges, A., Romieu, C. (1997). Aspects of grape berry development bioenergetics. In: Grapevine physiology (p. 331-335). Acta Horticulturae (526). Presented at 5. International symposium sur la physiologie de la vigne, Jérusalem, ISR (1997-04-25 - 1997-04-30). Louvain, BEL : ISHS.

Kraeva, E., Terrier, N., Tesnière, C., Romieu, C., Sauvage, F.X., Deloire, A. (1997). Partial microsequencing and cDNA cloning of putative beta-1,3-glucanases in *Vitis vinifera* berry cell suspension cultures. In: Grapevine physiology (p. 52). Presented at 5. International symposium, Jerusalem, ISR (1997-05-25 - 1997-05-30).

Terrier, N., Sauvage, F.X., Romieu, C. (1996). Absence de crise respiratoire, induction de l'activité alcool déshydrogénase et diminution de l'acidité vacuolaire lors de la maturation du

raisin. In: *Oenologie* 95 (p. 24-28). Presented at 5. Symposium international d'oenologie, Bordeaux, FRA (1995-06-15 - 1995-06-17). Paris, FRA : Lavoisier - Technique et Documentation.

Posters

Hennet, L., Berger, A., Trabanco, N., Ricciuti, E., Dufayard, J.-F., Sidibe-Bocs, S., Rossini, L., Luquet, D., Terrier, N., Pot, D. (2019) Secondary cell wall molecular determinism in sorghum is not a simple copy paste of arabidopsis story. Presented at XV Cell Wall Meeting, 7-12 July 2019. Cambridge, UK

Doligez, A., Le Cunff, L., Flutre, T., Launay, A., Nicolas, S., Lacombe, T., Romieu, C., Fodor, A., Ahmed, D., Cheynier, V., Terrier, N., Pinasseau, L., Boulet, J. C., Berger, G., Bertrand, Y., Roques, M., This, D., Peros, J.-P. (2017). Towards genome-wide association studies under abiotic stress in *Vitis vinifera*. Presented at Genetic resources section meeting of Eucarpia, Montpellier, FRA (2017-05).

Apolinar Valiente, R., Lopez-Roca, J. M., Maria Ros-Garcia, J., Boulet, J. C., Terrier, N., Doco, T., Gómez-Plaza, E. (2016). When crossbreeding in *Vitis vinifera* intraspecific hybrid helps to improve the characteristics of cell wall composition from grape skin . In: *In Vino Analytica Scientia*. Presented at 9. Symposium In *Vino Analytica Scientia*, Trente, ITA.

Pinasseau, L., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Vallverdu Queralt, A., Le Cunff, L., Peros, J.-P., Ageorges, A., Terrier, N., Boulet, J. C., Sommerer, N., Cheynier, V. (2016). Polyphenomics based on UPLC-QqQ-MS for deciphering the genetic bases of grapevine response to drought. In: *Sustainable grape and wine production in the context of climate change* (p. 84). Presented at *ClimWine 2016 (Sustainable grape and wine production in the context of climate change)*, Bordeaux, FRA (2016-04-10 - 2016-04-13). 152 p.

Pinasseau, L., Doligez, A., Adiveze, A., Ageorges, A., Ahmed, D., Ballester, J. F., Barthelemy, B., Berger, G., Bertrand, Y., Bouckenooghe, V., Boulet, J. C., Flutre, T., Fodor, A., Guiraud, J.-L., Launay, A., Lacombe, T., Marlin, T., Meudec, E., Nicolas, S., Lollier, A., Romieu, C., Roques, M., Guerin Schneider, R., Sommerer, N., This, P., Valverde-Queralt, A., VERBAERE, A., Lecunff, L., Cheynier, V., Terrier, N., Peros, J.-P., Dal Santo, S., Zenoni, S., Torielli, G. B., Pezzotti, M., Carvalho, L., Goncalves, E., Amancio, S., Martins, A., Carbonell-Bejano, P., Torres-Perez, R., Arrizabalaga, M., Oyarzun, M., Royo, C., Baroja, E., Garcia-Escudero, E., Morales, F., Pascual, I., Martinez-Zapater, J. (2017). Screening germplasm for adaptation to drought and temperature. In: Adam Blondon A-F (ed) *Innovine, innovation in vineyard*, Toulouse, France, 2016. INRA, pp 14-15. Presented at *Innovine, innovation in vineyard*, Toulouse, France, Toulouse, FRA (2016).

Zerbib, M., Puech, C., Abelanet, M., Mazauric, J. P., Meudec, E., Cheynier, V., Terrier, N., Saucier, C. (2016). Flavanol glycosides in grapes and wines as potential key intermediates in proanthocyanidin biosynthesis. Presented at *Macrowine 2016*, Changins, CHE (2016-06).

Bontpart, T., Marlin, T., Vialet, S., Guiraud, J.-L., Meudec, E., Ageorges, A., Cheynier, V., Terrier, N. (2015). Involvement of grape shikimate dehydrogenases in gallic acid metabolism. Presented at *Congrès annuel de la Society for Experimental Biology*, Prague, CZE (2015-06-29 - 2015-07-03).

Lebon, E., Guiraud, J.-L., Hamard, P., Souquet, J. M., Ageorges, A., Cheynier, V., Terrier, N. (2015). Deciphering the impacts of berry irradiation and temperature on flavonoid composition in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Syrah). Presented at GIESCO, Gruissan, FRA (2015-06).

Huang YF, Carrier G, Lecunff L, Vialet S, Guiraud JL, Torregrosa L, Bertrand Y, Cheynier V, This P, Terrier N. 2012. Identification of VvMybRep, a new MYB factor, negatively regulating the PA pathway in grapevine. XXVIth International Conference on Polyphenols, July 2012, Florence, Italy.

Khater F, Fournand D, Vialet S., Meudec E, Cheynier V and Terrier N. 2010. Identification and functional validation of new genes potentially involved in phenolic compounds biosynthesis. XXVth International Conference on Polyphenols, August 2010, Montpellier, France.

Verries C, Ollé D, Guiraud J-L, Ageorges A and Terrier N. 2010. Flavonoid accumulation kinetic analysed on grape berries of four cultivars from a Syrah x Grenache progeny. XXVth International Conference on Polyphenols, August 2010, Montpellier, France.

Huang YF, Le Cunff L, Bertrand Y, Guiraud J-L, Cheynier V, Terrier N, This P. 2010. Using genetic approaches to understand proanthocyanidins biosynthesis in grape berries. XXVth International Conference on Polyphenols, August 2010, Montpellier, France.

Sidibe-Bocs, S., Legeai, F., Droc, G., Rouard, M., Alaux, M., Leroy, P., Fournier, P., Terrier, N., Baurens, F.-C., Garsmeur, O., Poiron, C., Guignon, V., Simon, A., Hoede, C., Steinbach, D., Lebrun, M.-H., Tagu, D., Quesneville, H., Amselem, J. (2009). GnpAnnot community annotation system: features, qualifiers, values. In: 3. International Biocuration Conference (p. 66). Presented at 3. International Biocuration Conference, Berlin, DEU (2009-04-16 - 2009-04-19).

Le Cunff, L., Fournier Level, A., Doligez, A., Fernandez, L., Romieu, C., Torregrosa, L., Ageorges, A., Cheynier, V., Souquet, J. M., Terrier, N., Vezzulli, S., Constantini, L., Emmanuelli, F., Grando, S. M., Micheletti, D., Troggo, M., Velasco, R., Canaguier, A., Moroldo, M., Adam-Blondon, A.-F., This, P. (2008). Association genetic studies in grape . In: Plant and Animal Genomes XVI Conference. Presented at Plant and Animal Genomes Conference, San Diego, California, USA .

Grimplet, J., Romieu, C., Terrier, N., Bureau, S., Grotte, M., Gouble, B., Marty, I., Albagnac, G., Audergon, J.M., Bouchet, J.P., Lambert, P. (2004). Génomique fonctionnelle chez l'abricotier. In: Séquençage (p. 2 p.). Presented at Séminaire, Paris, FRA (2004-12-02 - 2004-12-03).

Ageorges, A., Fernandez, L., Vialet, S., Terrier, N., Romieu, C. (2004). Red or white ? Searching for genes controlling pulp and skin colour in grape berries. Presented at Plant Genomics European Meeting, Lyon, FRA (2004-09-22 - 2004-09-25).

Grimplet, J., Romieu, C., Audergon, J.M., Albagnac, G., Lambert, P., Bouchet, J.P., Bureau, S., Grotte, M., Gouble, B., Marty, I., Reich, M., Terrier, N. (2003). Bioanalysis of apricot (*Prunus armeniaca*) fruit ESTs. In: Fruit breeding and genetics. Programme and abstracts (p. 1 p.). Presented at EUCARPIA Symposium, Angers, FRA (2003-09-01 - 2003-09-05).

Abbal, P., Ageorges, A., Atanassova, R., Barrieu, F., Couture, C., Dédaldéchamp, F., Delrot, S., Grimplet, J., Romieu, C., Terrier, N. (2003). International Plant and Animal Genome. Presented at Isogene specific probes for high throughput studies on grape berry development, Californie, USA .

Ageorges, A., Albagnac, G., Doligez, A., Dosba, F., Notteghem, J.L., Peros, J.-P., Terrier, N., Tesnière, C., This, P., Torregrosa, L. (2002). Towards a better understanding of berry quality and powdery mildew resistance in grapevine: genetic determinism and pathways. Presented at Plant, animal and microbe genomes X conference, San Diego, USA (2002-01-12 - 2002-01-16). 1 p.

Barnavon, L., Doco, T., Pellerin, P., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., Tesnière, C. (2000). Cloning of a partial cDNA sequence coding for grape pectin methyl esterase transcript expression in relation with enzymatic activity during grape berry ripening. In: Proceedings of the Seventh International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding (p. 267-269). Acta Horticulturae, 528. Presented at Proceedings of the 7. International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding, Montpellier, FRA (1998-07-06 - 1998-07-10). NLD : International Society of Horticultural Science.

Kraeva, E., Renault, A.S., Terrier, N., Tesnière, C., Romieu, C., Sauvage, F.X., Bierne, J., Deloire, A. (2000). Beta-1,3-glucanase mRNA synthesis in grapevine leaves after Botrytis inoculation, and in berries after wounding or during ripening. In: Proceedings of the Fifth International Symposium on Grapevine Physiology (p. 429-435). Acta Horticulturae, 526. Presented at Proceedings of the 5. International Symposium on Grapevine Physiology, Jerusalem, ISR (1997-05-25 - 1997-05-30). NLD : International Society of Horticultural Science.

Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., Tesnière, C., Pellerin, P. (1999). Enzymic activities and cell walls during grape berry ripening: pectin methyl-esterase and transcript expression. Presented at 8. International cell wall meeting, NOR (1998-09-01 - 1998-09-05). 1 p.

Terrier, N., Sauvage, F.X., Ageorges, A., Romieu, C. (1999). Evolution de l'acidité vacuolaire au cours du développement de la baie de raisin. In: Oenologie 99 (p. 48-51). Presented at 6. Symposium d'Oenologie, Bordeaux, FRA (1999-06-10 - 1999-06-12). Paris, FRA : Editions TEC et DOC.

Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., Tesnière, C., Pellerin, P. (1998). Cloning of a partial cDNA sequence coding for grape pectin methyl-esterase. Transcript expression in relation with enzymatic activity during grape berries ripening. In: Génétique et amélioration de la vigne (p. 1 p.). Presented at 7. Symposium international, Montpellier, FRA (1998-07-06 - 1998-07-10).

Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., Tesnière, C., Pellerin, P. (1998). Enzymatic activities and cell walls during grape berry ripening: pectin methyl-esterase and transcript expression. In: 8th International Cell Wall Meeting (p. n.p.). Presented at 8. International Cell Wall Meeting, Norwich, GBR (1998-09-01 - 1998-09-05). Norwich, GBR : John Innes Centre.

Terrier, N., Sauvage, F.X., Ageorges, A., Romieu, C. (1995). Anion transport at grape

tonoplast. In: Plant membrane biology (p. 1 p.). Presented at 10. International workshop, Regensburg, CHE (1995-08-06 - 1995-08-11).

Présentation des travaux de recherche/vulgarisation lors de journées d'informations techniques auprès des professionnels

- Mars 2015, 13e Matinée des Oenologues de Bordeaux / "Cherchons la p'tite Brett". Conférence intitulée « Précurseurs des éthylphénols dans le raisin » suivie d'une interview pour le magazine « La Vigne » sur ce sujet
- Juin 2014, Carrefour de l'Innovation Agronomique (CIAG) Viticulture et stress hydrique - conférence « Impact du stress hydrique sur la qualité de la vendange, l'exemple des flavonoïdes » et article dans « Innovations Agronomiques »
- Novembre 2001, Lien de la Vigne, journée dédiée à la “ Maîtrise du développement de la baie ” Les acquisitions récentes en matière d'étude du transcriptome de la baie de raisin ...
- Janvier 2010, Colloque Euroviti, Angers, Sélection et Création Variétale, Qualité du Raisin, Adaptation des Levures ; Les contributions de la Génomique pour la filière Viticole,
- Mai 2009, Lien de la Vigne, Paris, Génomique et Amélioration de la Vigne-Nouvelles opportunités pour la filière
- Avril 2008, Montpellier Supagro, Journées scientifiques : Du Gène à la Bouteille,
- Avril 2008, Inter-Rhône, Château-Neuf de Gadagne, 12^{ème} rencontres rhodaniennes,

Le fil directeur de mes travaux de recherche est d'identifier et comprendre les **mécanismes moléculaires qui interviennent dans la construction de la qualité de la matière première**, pour des espèces végétales d'intérêt agronomique, à l'aide des outils de génomique fonctionnelle. La matière première est ici considérée comme la matière végétale à la récolte, qui servira de base pour la transformation. La qualité de la matière première est une notion complexe, multicritère, et qui pour chaque critère (nutritionnel, organoleptique, technologique...), peut se décliner en caractères (composition en métabolites, propriétés physiques...). Pour chaque utilisation de la matière première, de nouveaux critères de qualité peuvent être définis, en lien avec les acteurs de la filière, agriculteurs, agronomes, technologues, sélectionneurs, consommateurs... Les critères de qualité requis peuvent être extrêmement divergents, voire opposés suivant les usages. Cependant, comprendre comment certains caractères se construisent et sont régulés dans la plante apparaissent comme des connaissances génériques qui pourront être mobilisées pour concevoir les plantes destinées aux différents utilisations. Mes apports sur les différents projets relèvent essentiellement de la génomique fonctionnelle et de la biochimie, même si ma formation initiale d'ingénieur agronome (bien que lointaine) et mes acquisitions au cours de mon parcours me permettent d'échanger avec des technologues, des agronomes, des chimistes, des bio-informaticiens ou des généticiens.

La première partie de ma carrière (1994-2017), réalisée dans l'UMR SPO (Sciences Pour l'Oenologie) a été consacrée à la compréhension de certains critères de qualité du raisin pour la fabrication du vin comme l'acidité, la teneur en métabolites secondaires et plus particulièrement en polyphénols. Depuis 2017, mes travaux à l'UMR AGAP (Amélioration, Génétique et Adaptation des Plantes) concernent le sorgho et les cibles prises en considérations sont la qualité de la biomasse (composition de la tige pour différents usages tels que le fourrage pour l'alimentation animale, la production d'énergie ou les biomatériaux), et la qualité du grain pour l'alimentation (teneur et digestibilité des protéines, composition en métabolites secondaires).

La **stratégie** générale que je développe est d'identifier et de caractériser la variation pour chaque caractère étudié, qu'elle soit liée au tissu considéré, à un stade de développement, au génotype, à l'effet de l'environnement. Ces variations sont ensuite exploitées par une approche comparative ou différentielle multi-échelle : métabolomique, transcriptomique, histologique et génétique (pour les différentiels liés au génotype) afin de mettre en évidence les acteurs moléculaires potentiellement impliqués dans ces phénotypes et leur variabilité. La dernière étape consiste ensuite à valider la fonction des gènes identifiés, par génétique inverse dans la plante d'intérêt par exemple ou en utilisant des systèmes de validation plus simples (plante hétérologue, micro-organismes).

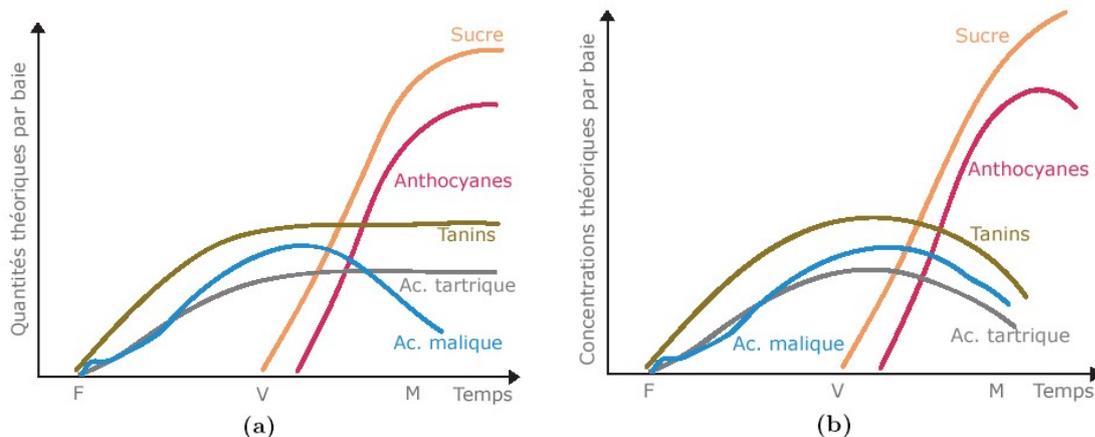
Les **outils** ont considérablement évolué au cours de mes premières années de carrière. Le fait de soutenir une HDR tardivement permet dans un même document de relater des résultats obtenus avec des amorces dégénérées et le séquençage « à la maison », la bibliographie sur les current contents, la soumission d'articles par la poste... jusqu'à l'apparition du haut-débit et des stratégies « omiques », le séquençage de génomes d'un très grand nombre de plantes, et la mise à disposition de ces informations à portée de main à l'aide d'un smartphone. Ces innovations technologiques ont en outre permis des changements d'échelle (et notamment l'accès aux informations multi-échelles pour un même objet d'étude) et la modification des rapports entre disciplines : des barrières entre la génétique et la génomique fonctionnelle ont

ainsi pu être levées et le phénotypage peut souvent être considéré comme le facteur limitant de la plupart des études. Ces années ont vu l'émergence de nouvelles disciplines telles que la bio-informatique ou d'outils mathématiques permettant de s'orienter vers l'exploitation de données hétérogènes. La notion d'espèce modèle vs espèce orpheline a eu tendance à s'atténuer avec la démocratisation des outils, permettant de mieux exploiter les spécificités des plantes considérées comme « non-modèle ».

Les pages suivantes retracent le cours de mes travaux de 1994 à 2019. En italique, je précise quelques éléments du contexte dans lequel ont été réalisés ces travaux, en bleu les financements qui ont accompagné ces projets.

1. 1994-2017 : Une première partie de carrière à étudier la mise en place de la qualité du raisin au cours du développement du fruit

La vigne est une espèce d'intérêt économique. La qualité des vins dépend étroitement de la composition initiale des raisins en métabolites primaires et secondaires. Mes travaux de recherche se sont inscrits dans ce cadre : identifier et comprendre les mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués dans la construction de la qualité du raisin. L'accumulation de composés d'intérêt œnologique dans la baie de raisin est un processus étroitement lié à la physiologie du développement du fruit. Le développement de la baie de raisin se caractérise par la succession de 2 phases (**Fig. 1**) (i) pendant le stade vert, le gonflement de la baie est tributaire de la synthèse et du stockage d'acides organiques (malique et tartrique) dans la vacuole. Le pH vacuolaire est extrêmement bas pendant tout ce stade, de l'ordre de 2,5. Les tanins condensés ou proanthocyanidines (PA) s'accumulent dans la pellicule et dans les pépins tout au long de cette période. (ii) La véraison, qui dure environ 24h au niveau d'une baie, marque l'induction de la maturation. Le stockage massif des sucres est alors responsable de cette deuxième période de croissance. Elle s'accompagne d'une désacidification liée à l'oxydation du malate, d'une coloration des baies due à l'accumulation d'anthocyanes dans la pellicule des cépages rouges et de l'acquisition d'un certain nombre de composés d'arômes et/ou de leurs précurseurs. Au début de ma carrière, les événements moléculaires et hormonaux responsables de ce changement radical étaient encore largement méconnus. Les stratégies que j'ai mises en œuvre tout au long de ces années pour les comprendre sont étroitement liées à la disponibilité des outils qui ont considérablement évolué au cours de cette période dans la communauté de recherche vigne.



PPase, Pyrophosphatase vacuolaire ; ADH, alcool déshydrogénase, ; PDC, pyruvate décarboxylase ; ME, enzyme malique ; AOA, acide oxaloacétique ; ALDH, Aldéhyde Déshydrogénase. De (Terrier and Romieu, 2001)

Pendant le stade vert, les sucres importés sont dégradés par la glycolyse. Le PEP (phosphoénolpyruvate) formé est carboxylé en malate grâce à l'intervention de la PEPcase (PEP carboxylase) et de la MDH (malate déshydrogénase), malate qui sera stocké dans la vacuole, ou bien sera respiré pour aboutir à la production d'énergie (**Fig. 2**). Après la véraison, le flux de sucre est brutalement multiplié par 6 (Ollat, 1997). Une partie du saccharose importé emprunte la même voie qu'au stade vert. Cependant, une grande partie ne peut pas être dégradée par la respiration, le flux de sucre étant largement supérieur aux capacités oxydatives des baies. Ces sucres sont stockés dans la vacuole sous forme d'hexoses. Une partie du malate vacuolaire est destocké et respiré via l'intervention de l'enzyme malique (EM). Le suivi de la PEPcase et de la MDH pour la synthèse du malate ou de l'EM pour sa dégradation n'ont cependant pas permis d'expliquer ni le sens ni l'intensité du métabolisme du malate au cours du développement de la baie (Hawker, 1969a). De plus, l'invertase vacuolaire est déjà très active en stade vert (Hawker, 1969b) et les deux clones d'invertase vacuolaire qui venaient d'être obtenus récemment sont induits bien avant la véraison (Davies and Robinson, 1996). L'activité invertasique ne représenterait donc pas un facteur limitant au stockage d'hexoses dans la vacuole. Cette absence de modification d'activité chez les enzymes solubles avait déjà amené Hawker et Ruffner (Ruffner, 1982; Hawker, 1969a, b) à émettre l'hypothèse que le développement de la baie de raisin serait sous le contrôle d'événements membranaires et bioénergétiques.

Cette hypothèse est déjà ancienne et nous avons voulu la vérifier en étudiant le coût du stockage de l'acidité par rapport aux capacités de production d'énergie. Nous avons ainsi cherché à (i) décrire et comprendre les mécanismes qui interviennent dans les stockages vacuolaires et les transports tonoplastiques (ii) étudier l'influence de ces événements sur le développement de la baie, en mettant en relation le niveau énergétique de la cellule et l'intensité de stockage des acides organiques. Les deux pompes à protons vacuolaires V-ATPases et V-PPases (pyrophosphatases) sont présentes sur le tonoplaste de raisin vert et sont suffisamment électrogènes pour créer les gradients de pH de 5 unités rencontrés *in vivo*. Le fonctionnement simultané et synergique des deux pompes permettrait une accumulation efficace des acides organiques, malique et tartrique, via un même transporteur. De plus, les vésicules tonoplastiques de fruit vert sont extrêmement étanches. Le stockage des acides est donc relativement peu coûteux. Pendant la maturation, le tonoplaste devient plus perméable, provoquant une décompartmentation relative entre le contenu vacuolaire et le cytoplasme. Une augmentation de l'abondance des transcrits, des protéines et de l'activité des deux pompes vacuolaires est effectivement observée. L'absence de crise respiratoire, typique d'un fruit non-climactérique, ne permet pas la production d'énergie suffisante pour un fonctionnement accéléré des pompes tonoplastiques, malgré l'induction de l'alcool déshydrogénase permettant un apport énergétique d'appoint. Ces événements ont pour conséquence une décompartmentation des acides organiques, qui permet la dégradation cytoplasmique de l'acide malique (Terrier *et al.*, 1998, 2001b).

J'ai soutenu ma thèse en décembre 1997, puis j'ai effectué un contrat écourté (avril-juin 1998) dans le laboratoire du Pr Teyssandier de la Serve (Laboratoire de Biochimie et

Physiologie Végétales, ENSAM-INRA-CNRS, Montpellier), portant sur la mise en évidence des protéines de type P16 et P19 dans le raisin (Logan et al., 1997). Je devais effectuer un stage post-doctoral dans le laboratoire du Pr Enrico Martinoia à partir de septembre 1998 (Université de Zürich, Suisse). Mais entre-temps, j'ai été recrutée pour un poste de CR2 dans le laboratoire où j'ai effectué ma thèse à compter du 1^{er} juillet 1998. Les choses ne se passeraient plus de cette façon de nos jours... Ce poste a été ouvert au sein du département BFLD (Biologie des Fruits Légumes et Dérivés), ancêtre des départements TPV (Transformation des Produits Végétaux) puis CEPIA (Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture) et Transform actuellement, à une période où le décryptage des mécanismes moléculaires intervenant dans la construction de la qualité de la matière première s'inscrivait pleinement dans la politique scientifique du département.

1.1.2. Le ramollissement de la baie et l'accumulation de composés d'arômes

Après mon recrutement, j'ai poursuivi quelques activités similaires de type « gène candidat ». Ce type de stratégie a été appliqué dans le cadre de la thèse de L. Barnavon (1996-1999 ; encadrement P Pellerin, T. Doco) portant sur les enzymes susceptibles d'intervenir lors du ramollissement de la baie. Une Pectine Methyl Estérase (clone partiel dont l'expression est suivie par Northern Blot) est induite juste avant la véraison et son expression augmente pendant la maturation, en lien avec la diminution du taux de méthylation des pectines de parois de cellules de baies de raisin (Barnavon *et al.*, 2001). En revanche, une β -galactosidase isolée montre une expression importante pendant les premiers stades de développement des baies alors que le taux de galactose augmente dans les parois des baies (Barnavon *et al.*, 2000). J'ai participé à l'encadrement des travaux de thèse de S. Mathieu (2002-2005 ; direction Z. Günata Université Montpellier II et G. Moulin INRA Montpellier) portant sur l'étude d'une Carotenoid Cleavage Dioxygenase dont l'activité permet de cliver des caroténoïdes en C₁₃ norisoprénoides odorants (Mathieu *et al.*, 2005, 2007). Le chaînon manquant entre les caroténoïdes et les norisoprénoides, depuis longtemps soupçonné venait d'être identifié chez *Arabidopsis* (Schwartz *et al.*, 2001) et son travail de thèse a consisté à isoler ce gène chez le raisin, à étudier les propriétés de l'enzyme correspondante et son rôle pendant le développement du raisin dans l'accumulation de C₁₃-norisoprénoides.

Cependant, ces approches de type gène candidat se sont avérées relativement lourdes étant données (i) le caractère multigénique voire multimérique des gènes/protéines, (ii) le nombre important de fonctions à étudier pour expliquer les modifications au cours du développement du fruit, (iii) le risque d'échec de la méthode lié à l'éventuelle non-pertinence des cibles. De plus cette approche suppose que les gènes ou protéines à étudier aient déjà été identifiés chez d'autres espèces végétales, ce qui n'est pas toujours le cas. C'est pourquoi une stratégie de recherche systématique de marqueurs de développement et de qualité a été engagée.

1.2. Le début des approches systématiques à haut-débit pour étudier le développement du fruit (1998-2004)

1.2.1. Mise en place des outils transcriptomiques (EST-microarray)

L'approche EST couplée aux microarrays est apparue au début des années 2000 comme extrêmement puissante pour détecter les gènes dont l'expression varie avec le caractère considéré et qui pourraient être responsables de la variation de composition. C'est l'approche

que j'ai développée après mon recrutement en CR2 (juillet 1998), sous la responsabilité scientifique de C. Romieu au sein du Laboratoire de Biochimie Métabolique et Technologie (BMT). Trois banques orientées ont été construites à partir d'ARN de raisin de cépage Syrah à différents stades de développement. D'autres banques générées à partir de baies d'autres cultivars ont été produites ensuite par les autres partenaires du [projet Lignome financé Genoplante](#) (Université de Bordeaux, S. Hamdi ; Université de Poitiers, S. Delrot). Nous avons choisi de séquencer les clones à partir de leur extrémité 3' non codante, plus divergente entre membres d'une famille multigénique que la partie codante, pour différencier par la suite sans ambiguïté les expressions des différents isogènes. Au total, 25000 séquences ont été obtenues, dont plus de 11000 provenant des banques montpelliéraines (Terrier *et al.*, 2001a, 2005). Cet effort de séquençage pour découvrir le transcriptome complet du raisin a ensuite été poursuivi au niveau international puis par le séquençage complet du génome de la vigne en 2007 (consortium franco-italien). Le traitement bioinformatique de ces données a été réalisé avec Jérôme Grimplet (doctorant dans l'équipe 2002-2005, sur des approches similaires sur l'abricot) et P. Abbal (IR dans l'équipe).

J'ai conçu et fait développer (par MWG Biotech) les lames de microarray de première génération comportant 3200 unigènes. Ces unigènes sont représentés par des oligonucléotides de 50 mers définis dans la région 3' non codante afin de pouvoir différencier l'expression des membres d'une même famille multigénique. Ces lames ont été utilisées pour comparer le transcriptome de baies de Syrah à 9 stades de développement. L'analyse des profils de développement des transcrits révèle que la plupart des variations d'expression ont lieu simultanément avec la véraison. Ce travail nous a permis d'identifier un certain nombre de facteurs de transcription ou de gènes impliqués dans la signalétique hormonale dont le profil d'expression suggère qu'ils puissent avoir un rôle dans le contrôle du développement de la baie. Pendant la maturation, on assiste à des réarrangements parmi les familles multigéniques impliquées dans les métabolismes primaires et secondaires. Ainsi, ce travail nous a permis d'identifier de nouveaux isogènes comme points de contrôle potentiels de ces métabolismes d'intérêt (Terrier *et al.*, 2005).

1.2.2. Utilisation des outils de transcriptomiques

Des collaborations ont permis de valoriser le lourd investissement méthodologique tout en répondant à des questions scientifiques en lien avec mes préoccupations. Ce fut le cas de la thèse de L. Fernandez (2002-2005), co-encadrée par C. Romieu, A. Ageorges et L. Torregrosa sur l'étude du déterminisme de la taille des baies au cours de laquelle le transcriptome d'un mutant présentant un développement anormal de la pulpe et sa contrepartie sauvage ont été comparés (Fernandez *et al.*, 2007). Quelques gènes présentent une expression différentielle et notamment des gènes impliqués dans la régulation du développement. Des études ultérieures montreront que la mutation est provoquée par l'insertion d'un rétrotransposon dans la région promotrice de l'un d'entre eux, l'homologue de *PISTILLATA* chez le raisin (Fernandez *et al.*, 2013; Goto and Meyerowitz, 1994).

Une collaboration a également été mise en place avec Ch. Chervin (ENSA Toulouse) sur l'influence de l'éthylène dans le déclenchement de la maturation de la baie en identifiant les gènes dont l'expression est affectée par cette hormone (Chervin *et al.*, 2006, 2008). Le raisin est considéré comme un fruit non-climactérique, c'est-à-dire dont l'induction de la maturation est indépendante de l'éthylène. Une première étude « à bas débit » a mis en évidence que

l'application de 1-MCP, inhibiteur des récepteurs d'éthylène, inhibe l'expression de 2 transporteurs de saccharose, ce qui pourrait expliquer le retard de maturation et d'accumulation de sucres observé chez les baies traitées. A plus large échelle, une application d'éthylène sur des baies à la véraison n'induit la modulation significative que de 73 gènes (sur 14000 présents sur les lames) 24h plus tard. Ces gènes appartiennent principalement à deux catégories : modification de la paroi cellulaire et des flux d'eau, ce qui pourrait expliquer les augmentations de taille des baies observées.

J'ai encadré M. Hren (dirigé par K. Gründen, National Institute of Biology, Ljubljana, Slovénie) sur le projet «Analyse du transcriptome de vignes infectées par des phytoplasmes » (Hren *et al.*, 2009). Cette étude a mis en évidence dans les feuilles infectées une induction de gènes liés au métabolisme carboné et à la biosynthèse de composés phénoliques et une répression de gènes liés à la photosynthèse. Dans le cadre d'un [programme ADAR](#) « Développement de nouveaux descripteurs de maturité du raisin applicables au vignoble » (plusieurs Instituts techniques et Université de Bordeaux II-ISVV S. Delrot), des marqueurs de maturité du raisin ont été recherchés par analyse transcriptomique haut-débit sur des raisins prélevés aux alentours de la date de vendange (Guillaumie *et al.*, 2011). Sept gènes pourraient apparaître comme des marqueurs potentiels de la date idéale de vendange (leur expression est significativement différente entre les stades entourant cette date, et ce sur deux cépages différents). Ils appartiennent à diverses voies métaboliques.

Les concepts et stratégies développés ont été appliqués à d'autres espèces. C'est le cas de la thèse de J. Grimplet (2001-2004) qui porte sur la génomique fonctionnelle de la maturation de l'abricot, effectuée dans notre équipe en lien avec l'UMR SQPOV (I. Marty, S. Bureau) et l'UGAFL (J.-M. Audergon, P. Lambert) de l'INRA d'Avignon. J'ai assuré l'encadrement scientifique, en lien avec C Romieu pour les aspects protéomiques. 15000 séquences EST ont été obtenues à partir de 3 banques d'ADNc correspondant à des stades de développement différents (Grimplet *et al.*, 2005). Des microarrays ont été conçus et différents criblages transcriptomiques ont été réalisés (suivi de l'évolution du transcriptome au cours de la maturation, différentiel d'expression des gènes sur 3 variétés de phénotypes contrastés pour des critères de qualité). Les résultats obtenus ont permis de générer une liste de 71 candidats appartenant aux voies de signalisation de l'éthylène, du métabolisme des sucres et des acides ou des métabolites secondaires.

1.3. Une approche intégrative pour étudier le la biosynthèse de flavonoïdes (2004-2017)

2004 marque un tournant dans la structuration de l'environnement dans lequel j'effectue mes recherches. En effet, le département CEPIA demande la dissolution de notre équipe Biologie Intégrative de la Vigne et du Raisin. C. Romieu est affecté dans l'UMR Dia-PC (qui deviendra AGAP), deux autres chercheuses sont affectées dans l'équipe de microbiologie de l'unité et à l'UMR BPMP. Seules A. Ageorges et moi-même continuons à maintenir une activité de génomique sur le raisin au sein de l'UMR SPO. Nous rejoignons l'équipe Polyphénols et Interactions de l'unité, dirigée par V. Cheynier et composée jusqu'à lors de chimistes et physico-chimistes et effectuons un recentrage de notre activité sur les

polyphénols, thème majeur de l'équipe. Nous avons travaillé en binôme avec Agnès Ageorges sur ces aspects de 2004 à 2013, en co-animant la thématique Biosynthèse des flavonoïdes au sein de l'équipe Polyphénols et Interaction, composée de Sandrine Vialet TR (jusqu'en 2013 puis mobilité), Thérèse Marlin TR (60% puis 100% à partir de 2013), Jean-Luc Guiraud IE (retraité en 2013), Didier Ollé IE Supagro (20% jusqu'en 2012), Clotilde Verriès IE (retraitée en 2011), auxquels s'ajoutent les doctorants et stagiaires. A. Ageorges était plus en charge des aspects anthocyanes et moi des PAs.

Ce recentrage sur les polyphénols s'effectue notamment dans le cadre du [programme UE « FLAVO »](#) (2004-2007 coordonné par L. Lepiniec, INRA Versailles, IJPB).

1.3.1. Les flavonoïdes

Ces travaux ont concerné la compréhension des mécanismes de biosynthèse des flavonoïdes, leur décoration, leur polymérisation (dans le cas des proanthocyanidines), leur transport intracellulaire et la régulation de ces phénomènes. Les flavonoïdes sont caractérisés par une structure en C6-C3-C6 (**Fig. 3**). Ils se différencient par rapport à la position et au degré d'hydroxylation et de saturation des différents noyaux. Dans le raisin, trois principaux types de flavonoïdes sont accumulés, les flavan-3-ols, les flavonols et les anthocyanes.

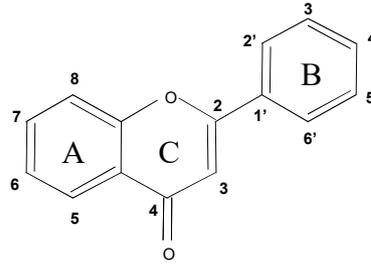


Figure 3 : Squelette carboné des flavonoïdes et numérotation des carbones et des cycles adoptée

- les anthocyanes, molécules colorantes des cépages et vins rouges, synthétisées pendant la deuxième partie de la vie du fruit dans la pellicule. Différentes anthocyanes peuvent être retrouvées dans le raisin, différant selon le niveau d'hydroxylation (et méthylation ensuite) du cycle B en R1 ou R2, et l'acylation du sucre en R3 (**Fig. 4**)

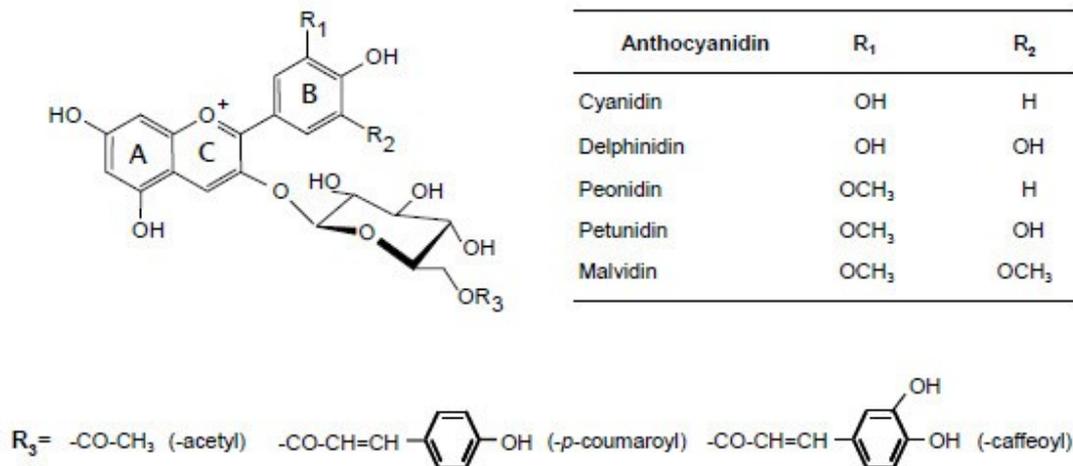


Figure 4: Principales anthocyanes du raisin

- les proanthocyanidines (PAs ou tanins condensés), sont des polymères de flavan-3-ols, impliquées dans l'astringence et la stabilisation de la couleur, synthétisées pendant les premières semaines de développement du fruit dans la pellicule et les pépins.

Chez le raisin, ils sont composés de 4 sous-unités principales (**Fig. 5**) qui diffèrent en fonction de leur stéréochimie (catéchine/épicatéchine), leur niveau de trihydroxylation sur le cycle B (épicatéchine/épicatéchine), et leur acylation par l'acide gallique (épicatéchine/épicatéchine-3-0-gallate). Les PAs du raisin diffèrent également selon leur niveau de polymérisation (**Fig. 6**), caractérisé par leur DP (degré de polymérisation) entre cépages et entre tissus (les PAs de la pellicule ont des DP plus élevés que ceux du pépin). La donnée accessible après dépolymérisation et analyse des sous-unités est le DPm (Degré de Polymérisation moyen). Au niveau de la plante, ces molécules interviennent dans les mécanismes de réponse aux stress biotiques et abiotiques (Dixon *et al.*, 2005). La teneur en PAs influence ainsi la résistance de la vigne à *Botrytis cinerea* ou à *Plasmopara viticola* (Iriti *et al.*, 2005; Kortekamp, 2006). De plus, ces molécules sont généralement considérées comme

bénéfiques pour la santé humaine et interviendraient dans la prévention de certaines pathologies.

Les propriétés des PAs sont étroitement liées à leur structure chimique : les esters galliques de catéchines et de leurs oligomères ont des propriétés antibactériennes, antivirales et antioxydantes supérieures que sans galloyl ester (Kajiya *et al.*, 2001; Kajiya *et al.*, 2002; da Silva Porto *et al.*, 2003). Les propriétés astringentes augmentent avec la longueur de chaîne du polymère (DP) et le taux de galloylation (Vidal *et al.*, 2002).

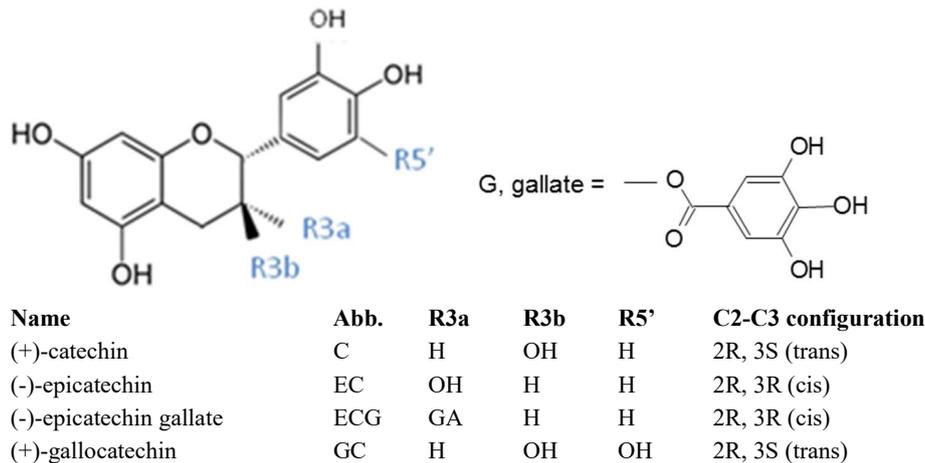


Figure 5: Principales sous-unités du raisin, extrait de (Huang *et al.*, 2012a)

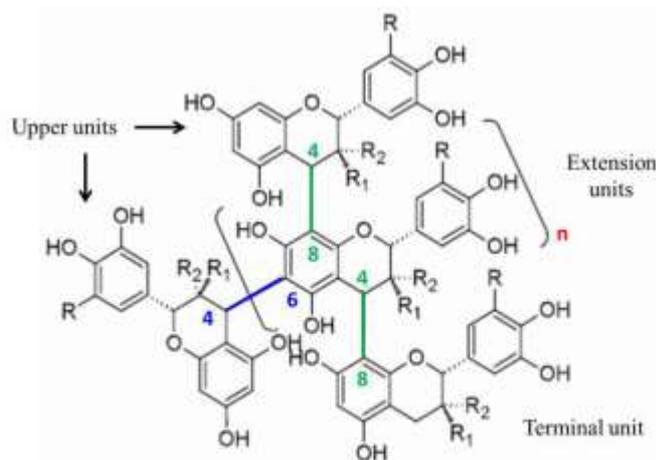


Figure 6: Structure des proanthocyanidines du raisin (type B). n: nombre d'unités d'extension. En vert: liaison C4-C8, en bleu: liaison C4-C6, extrait de (Huang *et al.*, 2012a).

L'enjeu de ces travaux est important. Ces mécanismes influencent directement la composition de la matière première, l'extractibilité des composés d'intérêt et donc à terme leur teneur dans les produits finis. Même si le raisin était ici le modèle d'étude, les recherches menées se voulaient génériques. En effet, les mécanismes que je cherche à élucider ne sont encore que partiellement connus dans le règne végétal (Zhao *et al.*, 2010) et font l'objet d'une assez forte concurrence au niveau international.

L'utilisation de banques de mutants déficients, comme celles développées chez l'orge, pétunia, maïs et Arabidopsis (Winkel-Shirley, 2001) a permis d'élucider certaines grandes étapes de la biosynthèse des flavonoïdes chez les plantes, qui ont été transposées chez la vigne (**Fig. 7**). Les points d'interrogations marquent les points encore méconnus au début de nos travaux.

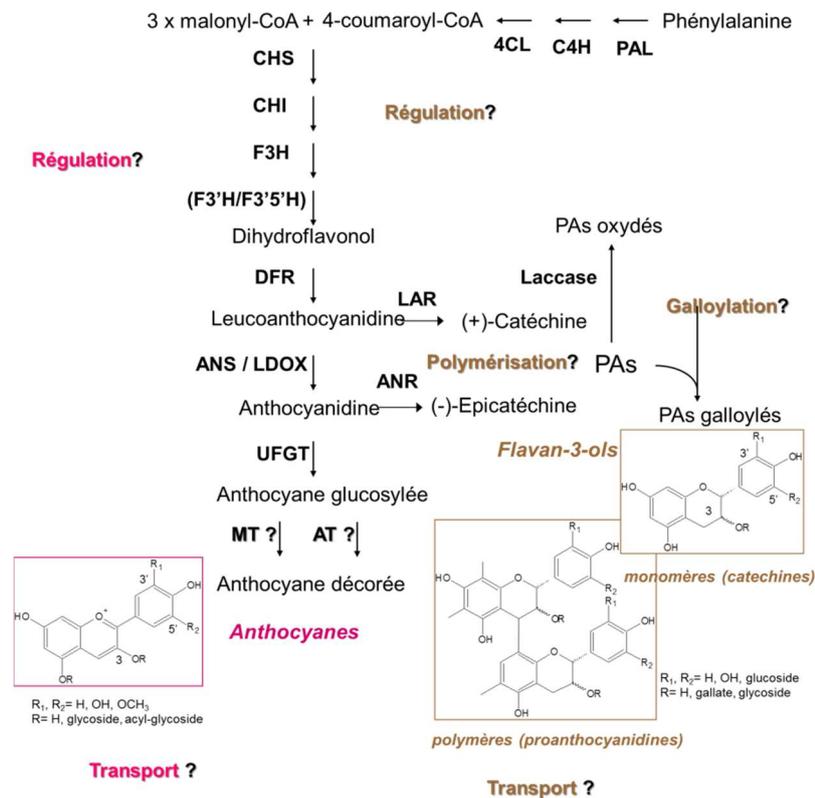


Figure 7: Représentation schématique de la biosynthèse des anthocyanes et PAs chez la vigne. Les étapes manquantes sont indiquées avec un point d'interrogation. Le nom des enzymes est en gras. PAL, phenylalanine ammonia lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate CoA ligase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavonone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; ANS, anthocyanidine synthase; LDOX, leucoanthocyanidin dioxygenase; LAR, leucoanthocyanidin reductase; ANR, anthocyanidin reductase; UFGT, UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase; AT, acyltransferase; MT, méthyltransférase.

Cependant, la composition en flavonoïdes, et en particulier en PA est plus complexe chez la vigne que chez les plantes précédemment étudiées. Quantitativement, la teneur en PA est beaucoup plus importante dans la vigne que chez beaucoup d'autres espèces et diffère déjà d'un organe à l'autre. Qualitativement, il existe plus de sous-unités constitutives (quatre types majoritaires dont des sous-unités galloylées v.s. deux chez l'orge et un seul chez Arabidopsis) et un DPM plus important que chez beaucoup d'autres plantes et variable selon les organes. Plusieurs étapes restent cependant à élucider comme la polymérisation, la galloxylation, celles liées au transport, au stockage de ces molécules dans la cellule, et les mécanismes régulant cette voie de biosynthèse, au niveau des facteurs de l'environnement jusqu'au niveau moléculaire. Il s'avère donc non seulement pertinent d'utiliser la vigne comme modèle d'étude, mais également insuffisant de s'appuyer uniquement sur la connaissance et l'étude des plantes considérées comme « modèles » pour élucider la synthèse des PAs dans le règne végétal (Huang *et al.*, 2012a).

Ma thématique de recherche s'inscrivait donc sur un front de science important pour la recherche en « plant science ».

1.3.2. Les approches utilisées

La stratégie générale de mes travaux consiste à exploiter la variabilité de composition en flavonoïdes à la fois quantitative et qualitative. Cette variabilité peut être naturelle (core-collection ou collection de cépages représentant la variabilité phénotypique et génotypique de *Vitis vinifera*, entre différents tissus, ou encore organes à différents stades de développement) ou induite (population issue d'un croisement, plantes transformées surexprimant un facteur de transcription régulant positivement ou négativement la voie de biosynthèse des anthocyanes et des PAs, plantes soumises à différents stress biotiques ou abiotiques).

La caractérisation de ces échantillons s'effectue dans notre groupe ou sur la plateforme polyphénols (PFP) lorsque le nombre d'échantillons est important (comme c'est souvent le cas lors des approches de génétique), nécessitant l'utilisation d'approches haut-débit mises en place sur la PFP.

Une fois cette variabilité identifiée et caractérisée, l'étape suivante consiste à en expliquer l'origine. Deux hypothèses peuvent être émises, qui chacune correspond à une stratégie de recherche pour laquelle le haut-débit sera recherché :

- Les différences phénotypiques sont liées à des variations d'expression de gènes de la voie de biosynthèse, d'abondance des protéines correspondantes ou d'activité d'enzyme. Les dernières variations sont plus à même d'expliquer les variations d'une voie de biosynthèse mais sont les plus délicates à aborder méthodologiquement (problème du haut débit difficilement applicable pour les activités enzymatiques, problèmes d'abondance des protéines recherchées dans le cas d'une approche protéomique). Je privilégie donc les approches transcriptomiques haut-débit, même si une approche protéomique a pu également être envisagée via une collaboration avec Loïc Rajou (AgroParisTech) dans le cadre du programme COLOR (cf liste des programmes déposés).

- Les différences phénotypiques sont liées à des modifications de séquence dans le génome à proximité ou dans les gènes de la voie de biosynthèse (qui peuvent provoquer des modifications d'expression, auquel cas l'approche précédente et celle-ci peuvent générer le même résultat). Dans ce cas, des approches de génétique (QTL, eQTL, Génétique d'association) sont mises en place en collaboration avec l'UMR AGAP (P. This) et l'IFV (UMT Genovigne, L. Lecunff).

La combinaison des deux approches apporte de la robustesse à la recherche et l'identification de gènes candidats. Un exemple de double screening transcriptomique et génétique sur le caractère de galloylation des PAs est présenté dans Carrier *et al.* (Carrier *et al.*, 2013).

Afin d'identifier les étapes manquantes de ces voies, nous avons étudié différents types de paramètres permettant d'obtenir des teneurs contrastées en flavonoïdes (en terme qualitatif et quantitatif).

- (1) le cycle de **développement de la baie** en comparant les stades précoces, lors de l'accumulation des tanins, et les phases tardives du développement synchrones de l'accumulation des anthocyanes;

(2) la **compartimentation tissulaire** (pulpe/pellicule/pépins), les anthocyanes étant spécifiques de la pellicule et les tanins plus concentrés dans la pellicule et les pépins. Cette approche a permis de montrer la présence de PA dans la pulpe en quantité non négligeable (Verries *et al.*, 2008);

(3) le patrimoine **génétique** (coll. P. This, UMR Dia-PC, INRA Montpellier) en comparant des cépages à teneur contrastée en tanin et/ou anthocyanes.

Le couplage de ces 3 premiers paramètres a été exploité en comparant le transcriptome de pulpe d'un cépage teinturier et d'un cépage à chair blanche, de pellicule de variétés de Pinot à pellicule noire/blanche, et le péricarpe de Syrah à différents stades de développement (Ageorges *et al.*, 2006).

(4) l'effet de l'**environnement**, notamment stress hydrique. Dans un premier essai, la composition en anthocyanes a été modifiée de façon significative à la fois en termes de quantité et de qualité, la teneur en PA est très peu affectée (Ollé *et al.*, 2011). L'effet du changement climatique a plus largement été abordé, dans le cadre du [programme UE FP7 « Innovine »](#) (2013-2016), coordonné par A.-F. Adam-Blondon :

-Différentes conditions de stress thermique et lumineux ont été appliquées, mesurées en continu sur la parcelle au niveau des baies individuellement (Collab. LEPSE, E. Lebon), la composition des baies en flavonoïdes a été évaluée, sur 3 années consécutives. *Le décès soudain d'E. Lebon en 2016 a compliqué l'exploitation des résultats*. Une thèse en analyse des données est en cours à l'UMR MISTEA (coll. N. Hilgert, B. Fontez) permettant d'envisager une valorisation.

-L'analyse de la variabilité génétique de la réponse au stress hydrique d'une core-collection (279 génotypes) sur la composition phénolique soumise à un stress hydrique a été évaluée, sur deux années. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une variabilité des génotypes dans leurs réponses phénoliques au stress, sans lien apparent avec leur origine géographique, et une réponse différenciée des différents polyphénols analysés (après la mise au point d'une méthode d'analyse compatible avec le haut-débit), permettant d'émettre de nouvelles hypothèses quant à leur mécanisme de biosynthèse (Pinasseau *et al.*, 2016, 2017).

(5) La création de hairy-roots de **vignes transgéniques surexprimant un facteur de transcription** régulant la voie de biosynthèse des anthocyanes (Cutanda-Perez *et al.*, 2009) ou des PAs (Terrier *et al.*, 2009), permettant ainsi la suraccumulation des flavonoïdes dans les tissus.

1.3.3. Les criblages transcriptomiques

Comme nous l'avons vu précédemment (Terrier *et al.*, 2005), l'analyse du développement du fruit n'est pas un criblage suffisamment fin pour permettre de mettre en évidence de gènes liés au métabolisme étudié, l'expression d'environ la moitié du transcriptome étant affecté pendant le développement. Ces études sont nécessaires mais pas suffisantes. Elles doivent être complétées par d'autres types de criblages transcriptomiques ou bien analysées avec des outils bioinformatiques encore peu développés à l'époque comme les analyses de réseau de gènes qui seront présentées et utilisées plus loin dans ce document.

Une première étude exploitant la variabilité naturelle concernant la teneur en anthocyanes et notamment la mutation de la couleur de la pulpe (caractère teinturier). Jusqu'à lors, seules les expressions de l'*UFGT* (UDP-glucose:flavonoïde 3-O-glucosyltransférase), enzyme de l'étape ultime de glucosylation des anthocyanes (Boss *et al.*, 1996) et le facteur de

transcription *MybA1* (Kobayashi *et al.*, 2002; Kobayashi, 2004) avaient été mises en évidence comme corrélées à la coloration des tissus. Ce différentiel a été exploité avec des outils de SSH (Suppressive Soustractive Hybridization) et les premières lames de microarrays (3K) (Ageorges *et al.*, 2006). Quatre isogènes systématiquement différentiellement exprimés en fonction du caractère coloré ont été mis en évidence dans cette étude : une chalcone synthase, une glutathion S-transférase (*GST*), l'*UFGT*, et une « caféoyl méthyl transférase » (*CaOMT*). Cette étude a été poursuivie par la création de hairy-root transgéniques surexprimant un facteur de transcription régulant la synthèse des anthocyanes (*MybA1* ; Kobayashi *et al.*, 2002) via la transformation par *Agrobacterium rhizogenes* (**Fig. 8** coll. L. Torregrosa UMR Dia-PC, Montpellier SupAgro), induisant une accumulation des anthocyanes dans les racines transformées. Un criblage transcriptomique en utilisant des microarrays représentant la moitié du génome de vigne (14K) a mis en évidence 600 gènes différentiellement exprimés dont la moitié environ sont induits. Parmi les gènes les plus induits, on retrouve les 4 isogènes identifiés précédemment, un transporteur de type MATE (multidrug and toxin extrusion) de fonction inconnue et un facteur de transcription de type Myb (Cutanda-Perez *et al.*, 2009). La validation de la fonction de ce transporteur et du facteur Myb seront détaillées plus bas. Agnès Ageorges en collaboration avec P. Hugueneu (INRA Colmar) montreront plus tard que le gène annoté « caféoyl méthyl transférase » était en fait une anthocyane méthyl transférase (Hugueneu *et al.*, 2009).

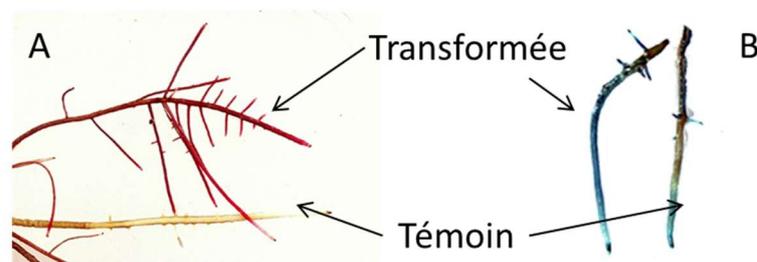


Figure 8: Racines témoins et transformées par *VvMybA1* (A) ou *VvMybPA1/2* (B). Les racines de (B) ont été colorées au DMACA mettant en évidence les PAs.

Concernant les PAs, une précédente étude australienne avait déjà identifié un facteur de transcription de type Myb, *VvMybPA1* (Bogs *et al.*, 2007). Ce facteur de transcription régule l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des tanins dans le raisin. Cependant, ce facteur de transcription est essentiellement exprimé dans les pépins. Nous avons identifié un autre facteur de transcription, *VvMybPA2*, qui est en revanche presque exclusivement exprimé dans les pellicules de raisins immatures et dans les jeunes feuilles (Terrier *et al.*, 2009). La séquence protéique de ce facteur de transcription est très homologue avec des facteurs Myb impliqués dans la régulation de la synthèse des flavonoïdes dans d'autres plantes (riz, colza, ...). Nous avons obtenu des racines transgéniques de vigne surexprimant soit le facteur de transcription *VvMybPA1*, soit *VvMybPA2* (**Fig. 8**, coll. L. Torregrosa UMR Dia-PC, Montpellier SupAgro). Ces racines transgéniques ont 5 fois plus de tanins condensés que les racines non-transgéniques témoins. Un criblage transcriptomique haut-débit sur ces transformants nous a permis de révéler l'existence d'un relativement petit nombre de gènes (51, sur les 14 000 représentés sur les lames) dont l'expression est augmentée de façon significative dans les deux types de transformants. Certains d'entre eux étaient déjà connus pour appartenir aux voies de biosynthèse de ces flavonoïdes, d'autres sont de nouveaux gènes (Terrier *et al.*, 2009). Ils

représentent donc potentiellement de nouveaux acteurs de cette voie de biosynthèse et leur rôle précis dans la voie reste à élucider.

Ces analyses réalisées en surexprimant un facteur de transcription régulant la voie métabolique étudiée nous sont apparues comme les plus stringentes en nous apportant le plus d'informations pertinentes : l'expression de peu de gènes est affectée, et le métabolisme étudié est affecté. La présence dans la liste de gènes déjà connus comme appartenant à cette voie donne de la pertinence à l'étude de ceux dont la fonction est encore inconnue. Elle nécessite cependant en amont la connaissance d'un facteur de transcription régulant le métabolisme étudié. Ce type d'approche ne doit pas être considéré comme exclusif : la mise en place d'une voie de biosynthèse dans un tissu est un phénomène complexe, régulé par de nombreux facteurs de transcriptions qui interagissent directement physiquement entre eux ou sont impliqués dans des cascades de régulation. Par exemple, dans notre système simplifié, la surexpression de *VvMybPA1* induit la synthèse de PAs et notamment les sous unités epigallocatechines. Dans la baie, *VvMybPA1* est presque exclusivement exprimé dans les pépins aux stades précoces. Or les PAs extraits des pépins ne contiennent pas de sous-unités epigallocatechines. D'autres mécanismes de régulations ou de synthèses sont donc absents de notre système simplifié et nécessiteraient des approches complémentaires pour y avoir accès.

1.3.4. Les criblages génétiques : approches QTL et e-QTLs, génétique d'association

En collaboration avec l'équipe de P. This (UMR Dia-PC, INRA Montpellier), et dans le cadre de la thèse de YF Huang (2008-2011), des approches de QTL et eQTL ont été mises en œuvre pour identifier les régions du génome contrôlant la variation de la composition en PA ou le niveau d'expression des gènes de cette voie de biosynthèse. Une analyse de l'architecture génétique de la composition en PAs dans la pellicule et dans les pépins a été entreprise à l'aide d'une descendance F1 de 191 individus issue d'un croisement Syrah × Grenache, pour un certain nombre de sous-caractères impliqués dans la composition en PA (quantité totale, pourcentage des différentes sous-unités d'élongation et terminales et ratio entre variables, notamment le DP). De nombreux QTLs ont été identifiés avec un effet significatif sur la variation des traits. Les deux tissus étudiés (pellicule et pépin) présentent une architecture génétique différente pour un même caractère. Ces études nous ont permis d'obtenir d'une liste de régions du génome contrôlant par exemple le taux de galloylation des PAs ou leur degré de polymérisation. Puisque le génome de la vigne est séquencé, ces régions correspondent à des listes de gènes. Neuf gènes candidats connus pour appartenir à cette voie ont été utilisés pour effectuer une approche de génétique d'association sur un panel de diversité de 141 cépages (Huang *et al.*, 2012b) (*VvLAR1* (leucoanthocyanidin reductase); *VvMYB5b*; *VvF3'5'H1.1* (flavonoid 3'-5' hydroxylase); *VvF3'5'H2.1*; *VvMYB5a*; *VvMYBPA2*; *VvCH11* (chalcone isomerase); *VvCH12*; *VvMYBPA1*; *VvDFR* (dihydroflavonol reductase)). Huit d'entre eux sont localisés dans des régions QTL. L'implication potentielle de certains gènes candidats (*VvLAR1*, *VvMYBPA2*, *VvCH11*, *VvMYBPA1*) a été confirmée par les résultats d'association. Les résultats des tests concernant *VvLAR2* n'avaient pas été inclus dans cette publication.

Afin d'approfondir les mécanismes régissant cette composition complexe en PAs, et notamment les facteurs de régulation, une approche de cartographie de QTL d'expression a été engagée sur la descendance F1. Nous avons d'abord voulu tester notre approche sur la voie de biosynthèse des anthocyanes dont la régulation était mieux connue chez la vigne (Huang *et al.*,

2013). Nous avons mesuré par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) le niveau d'expression de *VvUGT*, enzyme terminale de la synthèse des anthocyanes, sur des baies de la descendance F1 prélevées au même stade de développement pendant la maturation. Deux eQTL ont été identifiés. Comme attendu, un trans-eQTL, situé sur le chromosome 2, explique environ 35% de la variance génotypique et co-localise avec les *VvMybAs*, les facteurs de transcription activant la voie de biosynthèse des anthocyanes (This *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2007). Notre analyse a notamment permis d'enrichir la connaissance de la régulation de la couleur des baies, précédemment basée uniquement sur les gènes *MybAs* puisqu'un cis-eQTL, situé sur le chromosome 16, a été identifié expliquant environ 20% de la variance génotypique.

La même approche a été utilisée pour la voie des PAs en étudiant l'expression de *VvDFR*, *VvLDOX*, *VvLARI*, *VvLAR2* et *VvANR* sur deux années (Huang *et al.*, 2014). Des cis-eQTL à effet important ont été identifiés sur les deux années alors que les trans-eQTL étaient de plus faible effet avec une détection fluctuante selon les années.

Ces criblages génétiques ont été poursuivis dans le cadre du programme EU Innovine (2013-2017): une core-collection de 274 cultivars a été phénotypée pour la composition en composés phénoliques, en condition témoin et de stress hydrique (Pinasseau *et al.*, 2016, 2017). Des marqueurs moléculaires liés à la composition d'une part et liés à la modification de la composition dans des conditions de contraintes hydriques d'autre part seront recherchés (coll. Plateforme Polyphénols, IFV-UMT Génovigne).

1.3.5. Les validations fonctionnelles de gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes (2008-2017)

Certains des gènes identifiés au cours des criblages transcriptomiques, voire répondant positivement au double criblage transcriptomique et génétique, sont apparus comme des candidats pertinents pour expliquer les variations des phénotypes (Carrier *et al.*, 2013). Leur validation fonctionnelle a permis de préciser leur rôle dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Elle s'effectue soit par expression hétérologue de la protéine dans un micro-organisme suivie d'études enzymatiques, soit par transgénèse et mesure du phénotype des plantes/racines transformées. Le choix de la cible à étudier dans le cadre des études fonctionnelles est assez critique, surtout lorsqu'il fait l'objet du sujet de thèse d'un doctorant. Il faut trouver la juste balance entre :

- la caractérisation d'un gène « nouveau », c'est-à-dire dont aucun orthologue n'a encore été caractérisé dans la littérature, et pour lequel l'enjeu de la découverte est important, mais le risque d'échec également ;

- la caractérisation d'un gène dont des orthologues ont déjà été identifiés et caractérisés dans la littérature chez d'autres espèces, qui présente donc moins de risque, mais également moins d'intérêt scientifique.

La construction d'un faisceau d'indices (expression spatio-temporelle compatible avec l'accumulation du métabolite considéré, régulée par un facteur de transcription contrôlant la voie, situé dans une région génomique impliquée dans la régulation du caractère étudié, orthologue identifié mais pas encore caractérisé chez d'autres espèces...) sont donc autant d'arguments qui m'ont permis de m'orienter vers l'étude de gènes « nouveaux ».

1.3.5.1. Etude des mécanismes de transport et stockage des anthocyanes

L'analyse des travaux bibliographiques sur le sujet (Zhao *et al.*, 2010) indique que la synthèse des flavonoïdes et le stockage de ces molécules se font dans des compartiments cellulaires différents, impliquant nécessairement des mécanismes de transport intracellulaire, des composés terminaux ou des intermédiaires métaboliques. La « décoration » des molécules a son importance dans ces phénomènes.

Ces travaux ont porté sur la caractérisation de deux gènes appartenant à la famille de transporteurs secondaires de type MATE, *anthoMATE1* (AM1) et *anthoMATE3* (AM3) et une glutathion transférase (GST) potentiellement impliqués dans le transport d'anthocyanes, identifiés lors de criblages transcriptomiques sur des tissus présentant des teneurs contrastées en anthocyanes. Jusqu'à lors, aucun transporteur vacuolaire d'anthocyane n'avait été mis en évidence. Cependant, le gène arabidopsis *TT12* codant pour une protéine MATE avait déjà été identifié comme nécessaire à la séquestration des PAs dans la vacuole (Debeaujon *et al.*, 2001). Ces travaux ont fait l'objet de la thèse de C. Gomez (2006-2009), co-encadrée par A. Ageorges et moi. La caractérisation fonctionnelle de ces protéines (Coll. M. Klein, Univ. Zurich) après leur expression dans la levure a montré que AM1 et AM3 sont impliqués spécifiquement dans le transport d'anthocyanes acylées *in vitro* (Gomez *et al.*, 2009). *In planta*, un trafic vésiculaire d'anthocyanes du RE (réticulum endoplasmique) vers la vacuole a été mis en évidence. Les anthocyanes sont compartimentées dans des vésicules de petite taille au sein du cytoplasme, et probablement au sein de la vacuole, dans des inclusions appelées "anthocyanic vacuolar inclusions" (AVIs). Les transporteurs AM1 et AM3 ont été localisés *in vivo* sur la face externe du RE, sur les membranes entourant les petites vésicules et sur le tonoplaste. Par ailleurs, une glutathion S-transférase (GST), également impliquée dans l'accumulation des anthocyanes dans le raisin, a été localisée au sein du cytoplasme et associée au RE. Dans la baie de raisin, les anthocyanes seraient transportées de leur site de biosynthèse jusqu'à leur site de stockage, la vacuole, par deux mécanismes de transport indépendants : un trafic vésiculaire impliquant les transporteurs d'anthocyanes acylées AM1 et AM3 et un transport impliquant la GST qui servirait de ligand pour l'anthocyane (Gomez *et al.*, 2011).

1.3.5.2. Des facteurs de transcription régulant la synthèse des PA

Par analyse génomique comparative, nous avons identifié un nouveau facteur de transcription, *VvMybPA2*, orthologue de *TT2*, régulateur de la voie de biosynthèse des PAs chez *Arabidopsis* (Nesi *et al.*, 2001), et dont la fonction comme régulateur positif de la biosynthèse des PAs a été décrite plus haut (Terrier *et al.*, 2009).

Les approches couplées de eQTL et QTL, nous ont permis d'identifier une région du génome sur le chromosome 1 contrôlant, la quantité de PA dans la pellicule et l'expression de plusieurs des gènes étudiés. Une annotation de cette région couplée à l'utilisation des études transcriptomiques antérieures a permis de poser l'hypothèse qu'un des gènes, codant pour une protéine de type R2R3-MYB appelée *VvMybC2-L1*, pourrait être impliquée dans la régulation de la synthèse des PAs. En effet, ce facteur de transcription faisait partie des gènes induits suite à la surexpression des facteurs de transcriptions régulant les voies de biosynthèse des PAs et des anthocyanes dans les hairy-roots (Cutanda-Perez *et al.*, 2009; Terrier *et al.*, 2009). Son expression spatio-temporelle dans la plante coïncide avec la synthèse des tanins, mais il est

également exprimé en fin de maturation. Sa caractérisation fonctionnelle via sa surexpression dans des racines de vigne a permis de démontrer que cette protéine provoque une répression des gènes de synthèse de PAs, ce qui a pour conséquence une diminution de la teneur en tanin. Cette protéine aurait également un effet régulateur sur d'autres branches parallèles de biosynthèse des composés phénoliques, tels que les stilbènes (Huang *et al.*, 2014). Cela illustre l'existence probable de boucles de régulations complexes au sein de la plante pour une voie métabolique.

1.3.5.3. Etude des gènes impliqués dans la galloylation des PAs

Parmi les gènes dont l'expression est corrélée avec la synthèse des PAs et dont la fonction reste à démontrer, une shikimate déshydrogénase (*SDH*), trois glucosyltransférases (*GT*) et deux « glucose-acyl transférases » (*GAT*) ont été identifiées (Carrier *et al.*, 2013). Elles sont situées dans des régions du génome correspondant à un QTL « galloylation » (acylation de monomère de PA par l'acide gallique).

Les shikimates déshydrogénases

Dans les plantes, la déhydroquinone déshydrogénase/shikimate déshydrogénase DQD / SDH (EC 4.2.1.10/1.1.1.25) est connue comme une enzyme bifonctionnelle catalysant la troisième et la quatrième étape de la voie du shikimate: déshydratation du 3-déhydroquinone et réduction du 3-déhydroshikimate (3-DHS) NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) - dépendante (réactions 1 et 2, respectivement, **Fig. 9**). Cette dernière réaction est réversible; le shikimate peut être soumis à une NADP⁺ -oxydation dépendante pour former du 3-DHS (réaction 3). La voie du shikimate fournit des structures de carbone utilisées pour la biosynthèse des acides aminés aromatiques et des différents métabolites secondaires en aval, y compris les flavonoïdes. Des hypothèses avaient été émises que d'autres métabolites puissent être produits aux points de branchement dans la voie du shikimate, notamment l'acide quinique (Herrmann and Weaver, 1999) et l'acide gallique (Werner *et al.*, 2004). Récemment, il avait été démontré qu'en plus de ses propriétés catalytiques déjà connues, DQD / SDH serait responsable de la biosynthèse de l'acide gallique chez *Juglans regia* (Muir *et al.*, 2011) même si la démonstration est discutable.

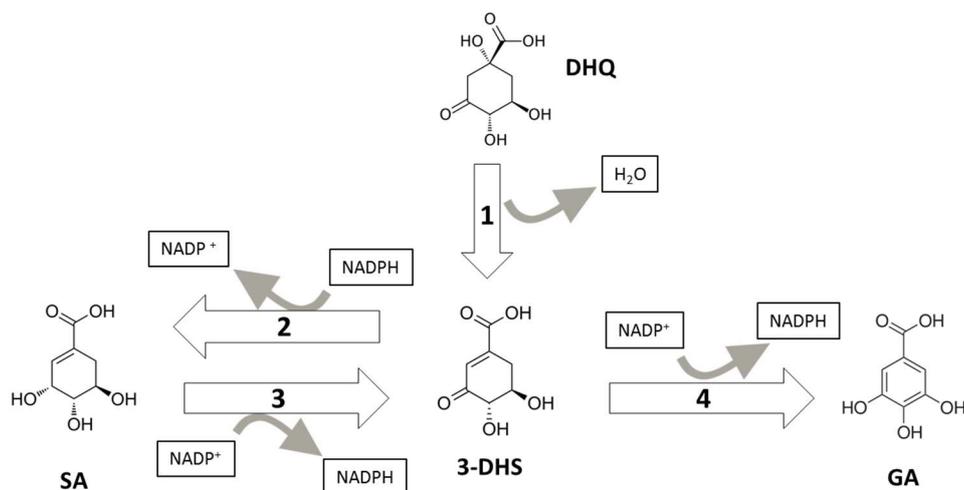


Figure 9. Synthèse des acides gallique et shikimique chez les plantes.

Réaction 1: Déshydratation de l'acide déhydroquinique (DHQ) catalysé par le domaine déhydroquininate déshydratase (DQD) de la déshydroquininate déshydratase/shikimate déshydrogénase (DQD/SDH) produisant l'acide 3-déhydroshikimique (3-DHS). Réaction 2: réduction NADPH-dépendante du 3-DHS catalysée par le domaine shikimate déshydrogénase (SDH) de la DQD/SDH produisant l'acide shikimique (SA). Réaction 3: oxydation NADP⁺-dépendante du SA catalysée par le domaine SDH de la DQD/SDH produisant le 3-DHS. Réaction 4: oxydation NADP⁺-dépendante du 3-DHS catalysé par le domaine SDH de la DQD/SDH produisant l'acide gallique.

Leur étude fait l'objet de la thèse de T. Bontpart (2012-2015). Les 4 gènes de *SDH* présents dans le génome de la vigne, potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'acide gallique, ont été clonés, permettant la production des protéines correspondantes chez *E. coli*. Trois des 4 protéines sont actives, capables de former du dehydroshikimate à partir d'acide shikimique. Deux d'entre elles ont la capacité de produire de l'acide gallique à partir de 3-DHS (**Fig. 9**, réaction 4). Ces deux gènes sont exprimés dans des tissus de la baie de raisin riches en acide gallique et de façon synchrone avec l'accumulation de ce métabolite. La validation fonctionnelle *in planta* a été réalisée pour l'un de ces gènes en produisant des racines de vigne transgéniques surexprimant le gène d'intérêt. Les analyses biochimiques mettent en évidence une teneur en acide gallique (libre ou associé) supérieure dans les racines transgéniques par rapport aux racines non transformées. Une analyse des séquences protéiques de SDH de dicotylédones (divergences des acides aminés des sites actifs et analyse phylogénétique) a permis d'émettre des hypothèses sur la relation structure/fonction de cette famille de protéines (Bontpart *et al.*, 2016).

Les glucosyltransférases

La caractérisation de ces gènes a fait l'objet de la thèse de F. Khater (2008-2011), initialement co-encadrée par D. Fournand (MC SupAgro, décédé en novembre 2008) et moi-même. L'induction de glucosyltransférases par les facteurs de transcription régulant les PAs était surprenante puisque les tanins de vigne ne sont pas glucosylés. Nous avons donc formulé l'hypothèse que la molécule formée par les GT était un intermédiaire réactionnel utilisé ensuite comme substrat par les glucose-acyltransférases pour acyler les PAs. Or, chez le raisin, les PAs sont dans une certaine proportion acylés par de l'acide gallique (galloylés). Les mécanismes de galloylation des PAs chez les plantes sont inconnus. Les 3 *GT* sont homologues à des gènes

codant pour des GT de plantes catalysant la formation de glucose-ester. Les 3 GT s'expriment plutôt en stade vert, parallèlement à l'accumulation des PAs dans la baie.

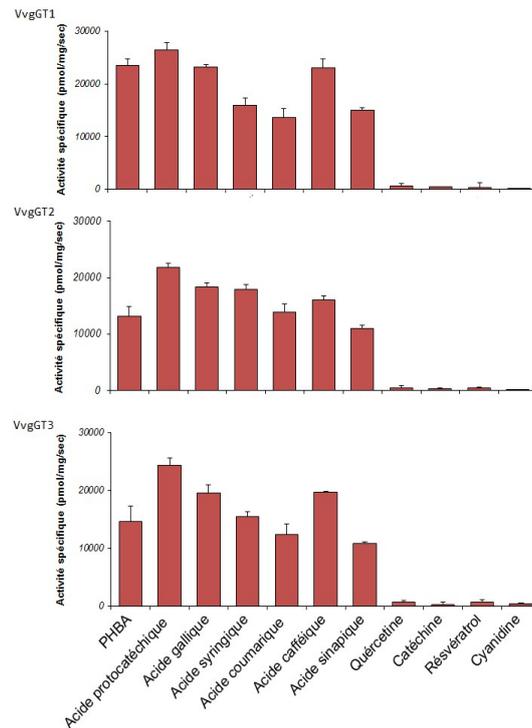


Figure 10: Spécificité de substrat des 3 GT recombinantes testées *in vitro* à pH 6,5. VvgGT=*Vitis vinifera* galloyl GlucosylTransférase. Chaque barre représente la moyenne de trois essais \pm déviation standard.

La production hétérologue de ces 3 GT a été ensuite effectuée chez *E. coli*. Une validation de l'activité enzymatique *in vitro* de ces 3 GT a été réalisée sur 11 substrats dont les dérivés benzoïques (C6-C1) et cinnamiques (C6-C3) et sur des stilbènes et des flavonoïdes, à différents pH (**Fig. 10**). Elle a permis de démontrer que ces enzymes sont capables de catalyser la formation de glucose-esters en présence d'acides phénols (dont l'acide gallique). Une méthode de dosage par électrophorèse capillaire a été utilisée pour doser l'activité enzymatique par quantification d'UDP libéré (mise au point par D. Fournand). Ce dosage est complété par une validation en HPLC/spectrométrie de masse de la nature des produits formés (coll. Plateforme). Tous les substrats phénoliques testés produisent des glucose-esters en présence des GT, en revanche, nous n'avons détecté aucune glucosylation des stilbènes et des flavonoïdes. Le produit de réaction de l'acide gallique, le β -glucogalline, serait un composé intermédiaire de la galloylation (**Fig. 11**) (Khater *et al.*, 2012).

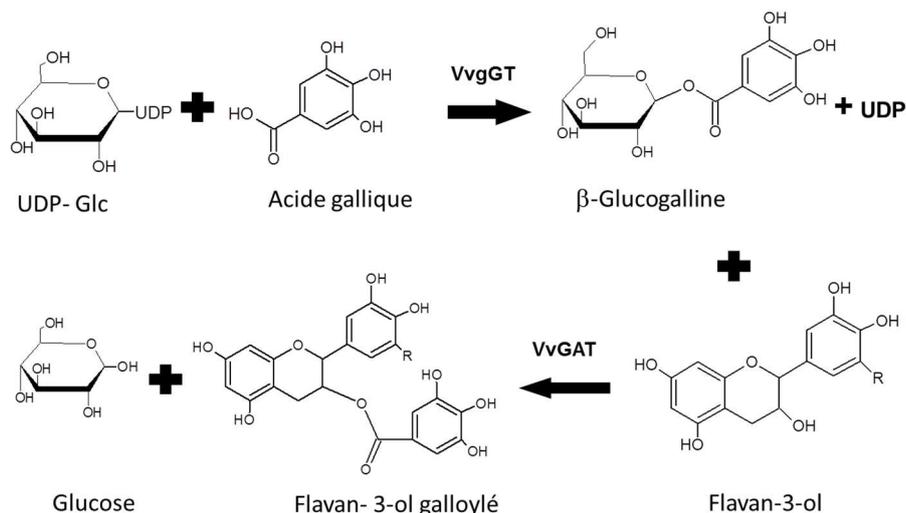


Figure 11 : Mécanisme réactionnel proposé pour la galloylation des flavan-3-ols. VvgGT=Vitis vinifera galloyl GlucosylTransférase, UDP-Glc=UridineDiPhosphate-Glucose, VvGAT=Vitis vinifera GlucoseAcylTransférase

Les glucose-acyltransférases

Ces travaux ont été initiés au cours de la thèse de Fida Khater puis poursuivis par Thibaut Bontpart. Les 2 *GATs* (*GAT1* et *GAT2*) identifiées sont homologues avec des gènes codants pour des acyltransférases de type Serine Carboxypeptidases-Like (SCPL). Une analyse de la littérature a montré que l'acylation des métabolites secondaires est gouvernée par deux grandes familles d'acyltransférases : les acyltransférases de type BAHD (ainsi nommées à partir de la première lettre des quatre premiers gènes caractérisés appartenant à cette famille (D'Auria, 2006), et de type SCPL (beaucoup moins nombreuses à être décrites), qui utilisent des esters d'acyl CoA et des esters de glucose comme molécules donneuses, respectivement (Bontpart *et al.*, 2015). Les séquences protéiques codées par les gènes de vigne annotés comme sérine carboxypeptidases et celles de sérine carboxypeptidases caractérisées chez d'autres plantes ont été collectées dans le but de construire un arbre phylogénétique. Cinquante et une séquences complètes de sérine carboxypeptidase ont été identifiées dans le génome de la vigne. Les séquences se regroupent en 4 clades principaux. Douze séquences de vigne, y compris *GAT1* et -2, se regroupent dans un clade avec toutes les séquences déjà identifiées comme des acyltransférases dans le règne végétal. Les 2 *GATs* identifiées s'expriment également de façon synchrone avec l'accumulation des PAs (Bontpart *et al.*, 2018). VvGAT1 a été localisée dans des vésicules intracytoplasmiques suggérant l'existence de transporteurs spécifiques pour les substrats nécessaires au mécanisme de galloylation. Plusieurs systèmes de production de protéines ont été testés : *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, feuille de tabac, feuille de vigne (coll. P. Mestre INRA Colmar). Aucun ne nous a permis de valider nos hypothèses concernant l'activité de ces protéines dans la galloylation des PAs (**Fig. 11**).

1.3.5.4. Mécanismes de polymérisation des tanins

Les mécanismes de polymérisation des PAs restent la grande dernière énigme de cette voie de biosynthèse. Un QTL expliquant plus de 50% de la variabilité a été identifié sur le chromosome 17 (Huang *et al.*, 2012b). Cette région contient 80 gènes dont *VvLAR2*, sur lequel une étude d'association a été engagée (collab. L. Lecunff, P This, UMR AGAP). Quatorze

polymorphismes sont significativement liés au DPM et 11 avec la teneur en catéchine comme unité terminale. Neuf haplotypes différents ont été reconstruits, et les 2 haplotypes extrêmes ont été clonés. Les deux cultivars homozygotes pour ces haplotypes ont été sélectionnés dans la core-collection, le DPM de leur PA dans les pellicules sont respectivement de 10 et de 85. Les protéines de ces deux *VvLAR2* ont été produites chez *E. coli* et leur activité testée *in vitro* s'est révélée identique. Des hairy-roots surexprimant ces deux gènes voient le degré de polymérisation de leur PAs significativement diminuer (de 20 à 5), ce qui pourrait suggérer que c'est surtout un effet dose d'activité de *VvLAR2* qui modifierait le DP. Cette hypothèse est confortée par la quasi-disparition du QTL DPM lorsque l'expression de *VvLAR2* est utilisée comme cofacteur dans la détection des QTL (**Fig. 12**, résultats non publiés).

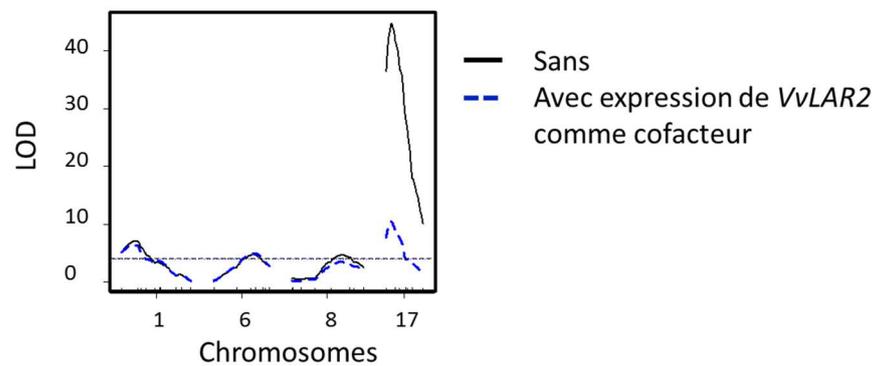


Figure 12: Profil LOD des QTLs détectés sur 4 des chromosomes du génome de la vigne pour le caractère DPM des PAs de la pellicule, sur la descendance Syrah X Grenache. En bleu, en utilisant l'expression de *VvLAR2* comme cofacteur, en noir sans co-facteur (extrait de la thèse de YF Huang, 2011).

Ces résultats concernant l'intervention de la LAR dans la modulation du DP ont été confirmés avec les avancées récentes de l'équipe de Dixon (Liu *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2019) qui précisent que la polymérisation ferait intervenir des intermédiaires catéchine et épicatechine cystéinylés.

Certaines hypothèses concernant la polymérisation des PAs mettent en jeu des intermédiaires glycosylés. Dans le cadre de la thèse de M. Zerbib (2015-2018, Dir C. Saucier), des monomères et dimères de flavan-3-ols glycosylés ont été identifiés et quantifiés tout au long du développement de la baie de raisin et dans différents tissus (Zerbib *et al.*, 2018), l'un d'entre eux a un profil spatio-temporel d'accumulation compatible avec un rôle dans la synthèse des PAs.

Ces travaux auraient dû être complétés, comme illustré sur la **Fig. 13**, concernant la polymérisation des PAs, mais également la validation fonctionnelle des SCPL pour la galloylation (et éventuellement l'acylation des anthocyanes). Un grand volet pour la compartimentation de toutes ces étapes aurait également mérité une investigation :

- dans l'espace : où se déroulent ces différentes étapes dans la cellule ? Avec la question corrolaire : quels sont les mécanismes impliqués dans le transport des différents substrats ?

- comment sont coordonnées toutes ces étapes d'un point de vue spatio-temporel (tissulaire et développemental) ? D'autres régulateurs sont certainement encore inconnus.

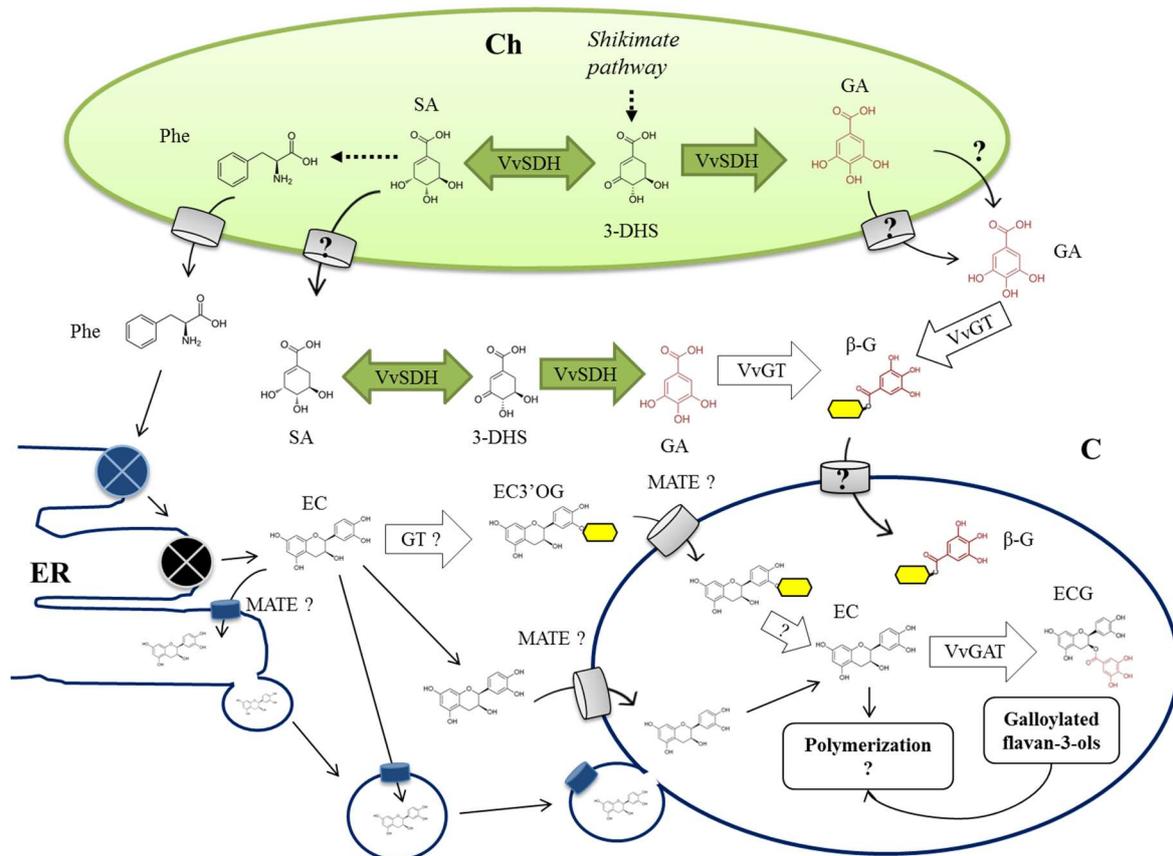


Figure 13. Proposition de modèle pour la biosynthèse des PAs galloylés dans la cellule de raisin. Extrait de la thèse de T. Bontpart (2015).

Les transporteurs sont représentés par des cylindres. Les métabolites sont représentés par des disques avec une croix, en bleu pour les phénylpropanoïdes, en noir pour les flavonoïdes. L'acide gallique est en rouge, le glucose en jaune. Abréviations: Ch: chloroplaste, C: cytosol, ER: réticulum endoplasmique, N: noyau, SA: acide shikimique, 3-DHS: 3-déhydroshikimate, GA: acide gallique, β-G: β-glucogalline, EC: épicatechine, EC3'OG: epicatechin 3'-O-glucose, Phe: phénylalanine, VvSDH: Vitis vinifera Shikimate déshydrogénase, VvGT: Vitis vinifera Glucosyltransférase, VvGAT: Vitis vinifera Glucose Acyltransférase, ?: acteur ou étape inconnu.

Mes dernières années d'activité au sein de l'UMR SPO ont été particulièrement difficiles humainement. Mon ancienne équipe Polyphénols et Interactions s'est séparée en deux nouvelles équipes. Je me suis investie dans la responsabilité d'un des nouveaux collectifs avec notamment A. Ageorges et V. Cheynier au sein de cette équipe. J'ai été confrontée à des comportements hostiles et violents de certains collègues (dans et hors de l'unité). L'absence de soutien ou de réaction de mes directions par rapport à ces agissements a affecté de manière significative mes activités mais également ma confiance en moi. Ces événements ont provoqué une profonde remise en question de ma place dans le milieu de la recherche et une interrogation sur les thématiques de recherches que j'étais en mesure de porter. La seule solution qui a été trouvée face à cette situation (qualifiée de « harcèlement ») a été d'effectuer une mobilité d'urgence. Après réflexions et discussions, j'ai décidé d'essayer de m'engager sur une autre thématique de recherche en effectuant une mobilité vers l'UMR AGAP.

2. Une poursuite de carrière pour comprendre la mise en place de la qualité pour différents usages du sorgho (2017-...)

Depuis avril 2017, j'ai intégré l'équipe DDSE (Dynamiques de la diversité, sociétés et environnements) de l'UMR AGAP. Mon rôle est d'apporter au collectif sorgho de l'unité, jusque-là composé surtout d'agents CIRAD généticiens (D. Pot, J-F Rami...) et écophysiologistes (D. Luquet, ..), mes compétences en génomique fonctionnelle et mes connaissances de voies métaboliques chez les plantes. Ce collectif a été consolidé en 2018 par l'arrivée de C. Granier (INRA, département EA).

Je travaille avec Frédérique Richaud (Ingénieure CIV CIRAD) depuis mon arrivée, Maelle Rios (CDD 1 an 2018) et Angélique Berger (Ingénieure Biologie Moléculaire CIRAD) et Caroline Calatayud (Technicienne CIRAD) depuis janvier 2019.

2.1. Mise en place des outils de validations fonctionnelles

Implanter une activité de génomique fonctionnelle sur une « nouvelle » plante nécessite de mettre en place un certain nombre d'outils et notamment des outils de transformations de la plante étudiée (et les aspects réglementaires associés pour l'agrément OGM). Le sorgho a la réputation d'être l'espèce monocotylédone de grande culture la plus récalcitrante à la transformation et en particulier à la culture *in vitro* et à la régénération de plantes entières (Altpeter *et al.*, 2016). Depuis mon arrivée, j'ai initié la transformation de cette plante et cette technique est en cours d'optimisation, quelques plantes de sorgho transgéniques ont déjà été obtenues. Cependant, les taux de transformations sont encore extrêmement faibles (<1%) et ces approches nécessitent encore des optimisations. Je développe également la nouvelle technologie d'édition des génomes Crispr/Cas9 pour le sorgho, en parallèle de chercheurs de l'équipe DAR travaillant sur le riz (Développement Adaptatif du Riz, C. Périn).

Si la transformation stable est un outil puissant pour l'étude du rôle des gènes, cependant, elle n'est pas toujours disponible et optimisée chez toutes les espèces, et chez le sorgho en particulier. Le développement des technologies « omics » donne accès à de grandes quantités de données et de résultats, et potentiellement beaucoup d'hypothèses concernant la fonction des gènes à tester. Il apparaît nécessaire de pouvoir disposer d'une technique rapide de criblages des gènes à valider. Bien que la transformation de protoplastes ne permette pas d'étudier l'impact d'une mutation sur le phénotype d'une plante ou d'un organe entier, ce système de transformation transitoire représente une solution pour étudier rapidement, les interactions protéine-protéine (Yu *et al.*, 2017), la localisation subcellulaire (Jia *et al.*, 2018), les cascades de régulation (Wehner *et al.*, 2011) ou la validation des constructions CRISPR / Cas9 (Li *et al.*, 2014). La production de protoplastes à partir de plantules de sorgho a été mise en place permettant la validation rapide des constructions de plasmides et l'étude fonctionnelle de facteurs de transcriptions (Berger *et al.*, en préparation).

2.2. Qualité de la biomasse

Dans le cadre du [projet investissement d'avenir Biomass For the Future](#) (BFF, 2012-2020, porté par H. Höfte, IJPB), il s'agit d'apporter des connaissances génériques sur la mise en place de la tige et en particulier des composants de la paroi secondaire (cellulose, hémicellulose et lignine) pour optimiser les différentes utilisations de la biomasse (alimentation

du bétail, bioéthanol, matériaux pour construction habitat, plastiques). Durant les premières années de ce projet, beaucoup de données biochimiques (composition de la tige), transcriptomiques (RNAseq au cours de l’allongement et la différenciation des entre-nœuds de la tige, sur différents génotypes, en conditions témoin et de contrainte hydrique) et génétiques (GWAS) ont été accumulées. L’objectif est d’identifier puis de valider la fonction de certains gènes dans les mécanismes de biosynthèse des composés d’intérêt et/ou leur régulation. Je participe à ce projet notamment via le co-encadrement avec David Pot de la thèse de Lauriane Henet (2016-2019). Les facteurs de transcription (FT) sont des cibles privilégiées étudiées dans le cadre de cette thèse. L’importance des FT des familles MYB et NAC dans la biosynthèse des parois secondaires a été démontrée chez plusieurs espèces mais reste à préciser chez le sorgho (Zhong *et al.*, 2008). Dans un premier temps, des analyses de génomique comparative et de réseaux de co-expression ont été développées pour identifier l’ensemble des NAC et MYB du génome du sorgho ainsi que de 8 autres espèces afin de construire des arbres phylogénétiques et identifier les relations d’orthologies entre les FT du sorgho et ceux déjà identifiés chez d’autres espèces comme régulateurs de la synthèse des parois (**Fig. 14**).

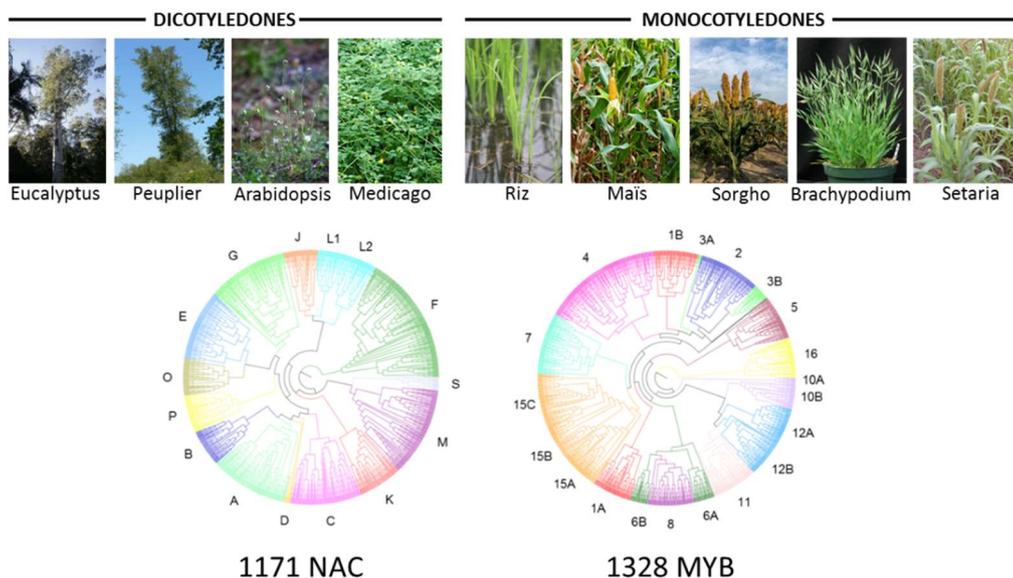


Figure 14 : Arbres phylogénétiques des NAC et des MYB basés sur les séquences protéiques de 5 monocotylédones et 4 dicotylédones. Les couleurs correspondent aux différents clades.

Dans un deuxième temps, des données d’expression sur des entre-nœuds en cours de développement, en condition de stress hydrique ou témoin, obtenues sur trois années de culture en champ, ont été compilées puis utilisées dans des analyses de réseaux de co-expression de gènes (Langfelder and Horvath, 2008). L’enrichissement en catégories fonctionnelles (GO-terms) liées aux parois a été recherché de façon systématique dans les groupes issus de l’analyse de co-expression et dans les réseaux de gènes entourant tous les facteurs de transcriptions de type Myb et NAC identifiés plus haut. Nous avons pu identifier deux groupes de gènes co-exprimés présentant des indicateurs d’implication dans la mise en place des parois secondaires (enrichissement en catégories fonctionnelles liées aux parois, expression des gènes du réseau compatible avec l’accumulation des composantes de la paroi) (**Fig. 15**). Nous avons montré que dans une grande majorité des cas (mais pas tous), pour chaque homologue des FT clés chez

Arabidopsis, un rôle similaire est attendu pour le sorgho. En revanche, nous avons également identifié quelques gènes MYB et NAC non validés à ce jour chez Arabidopsis pour lesquels les résultats suggèrent qu'ils pourraient également avoir un rôle dans la régulation de la mise en place des parois chez le sorgho (Hennet *et al.*, 2020).

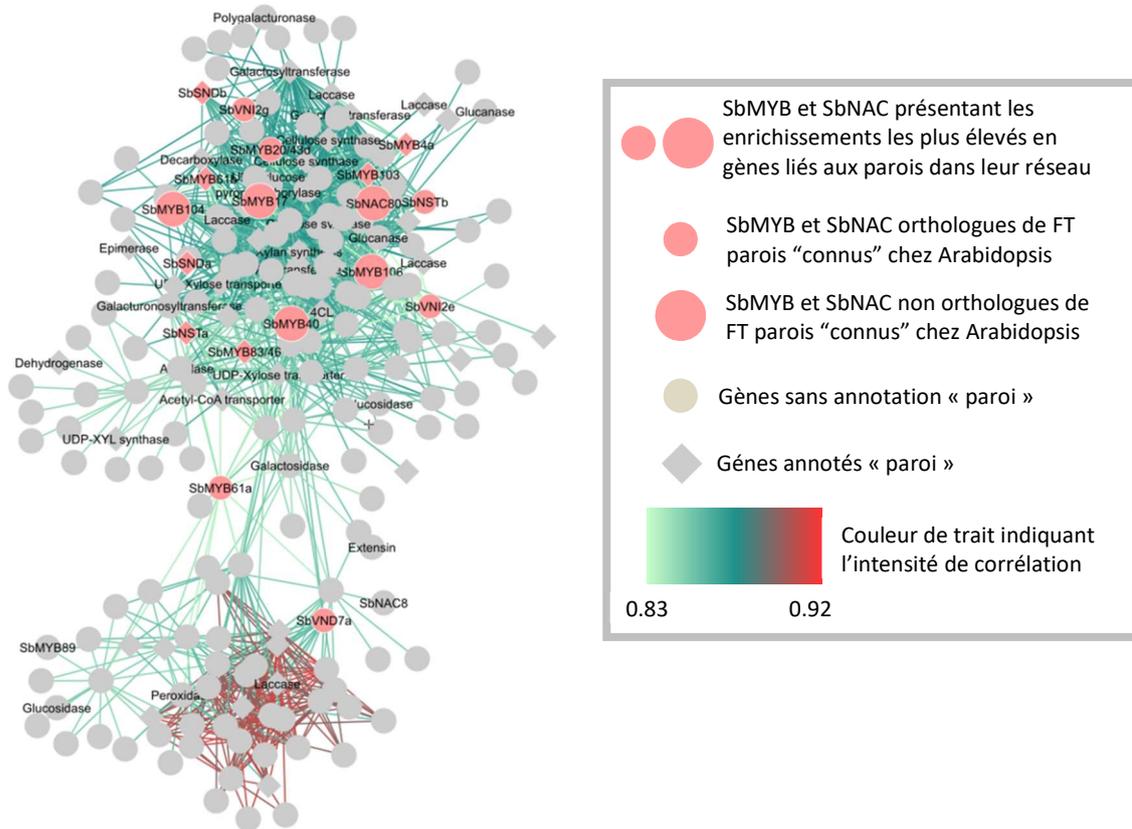


Figure 15 : Extrait de réseau de co-expression de gènes présentant des enrichissements en GO-terms liés aux parois.

Le rôle de plusieurs de ces FT est en cours de validation par transgénèse, soit par KO par CRISPR-Cas9 chez le riz (coll. C. Périn), soit par surexpression dans des protoplastes de sorgho. A terme, ils seront utilisés pour la transformation de sorgho en plante entière.

Dans le cadre de ce projet, des travaux similaires sont en cours sur le maïs (coll. IJPB, Matthieu Reymond, Sylvie Coursol). Une comparaison des résultats, à la fois expressionnels (réseaux de gène) et des régions du génome impliqués dans ces caractères (synthénie) permettra d'identifier d'éventuelles similitudes et donnera ainsi de la robustesse à l'identification de gènes et mécanismes impliqués dans ces caractères de composition de la tige.

Projet de recherche.

1. Contextes scientifiques et socio-économiques

1.1. Les protéines alimentaires et le sorgho

Un apport qualitatif et quantitatif en protéines est indispensable pour maintenir le bon fonctionnement de l'organisme. En occident, c'est la consommation de produits dérivés de l'exploitation des animaux (viande, lait, œuf, poisson) qui assure cet apport indispensable. A l'échelle de la planète la transition vers des ressources protéiques végétales est cependant un impératif pour l'avenir compte tenu des perspectives démographiques et du coût environnemental de l'élevage animal.

En 2050 la population mondiale atteindra 9 milliards d'individus dont 60% des apports caloriques journaliers dériveront des céréales. Le sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) est une céréale appartenant aux Poacées, originaire du Nord Est de l'Afrique (Smith and Frederiksen, 2000). C'est aujourd'hui la **5^{ème} production céréalière mondiale** derrière le blé, le riz, le maïs et l'orge (Chantereau *et al.*, 2013), avec 61 millions de tonnes produites (FAO, 2016), principalement aux Etats-Unis (où 30% de la production sert à produire des agrocarburants). Au sein de **l'Union Européenne, la France et l'Italie** sont les deux principaux pays producteurs de sorgho, mais plus de la moitié du sorgho consommé dans l'UE est importée. Le grain de cette céréale peut servir à l'alimentation animale (principale utilisation dans les pays développés) et humaine (essentiellement en Afrique et en Asie). En outre, contrairement à certaines céréales comme le blé ou l'orge, le sorgho ne contient pas de gluten qui est à l'origine de plusieurs pathologies comme l'allergie et la maladie cœliaque (Rai *et al.*, 2018). La biomasse végétative est utilisée comme fourrage et représente un réservoir de ressources énergétiques (production de méthane et biocarburants) et pour l'ingénierie de biomatériaux. Les produits alimentaires à base de sorgho sont très divers en Afrique et en Inde (porridges, galettes, biscuits, boissons, semoules,...). Dans les pays tempérés, l'utilisation du sorgho en alimentation humaine se développe depuis une dizaine d'années. De nombreuses initiatives voient le jour pour l'élaboration et la promotion de nouveaux produits pour l'alimentation humaine, sous l'impulsion notamment de l'interprofession du sorgho, aux USA (<http://www.simplysorghum.com/cooking-tips>) ou en **France** et en **Europe (Sorghum ID, <https://www.sorghum-id.com/>, association interprofessionnelle européenne du sorgho)**.

1.2. Le sorgho, une céréale riche d'atouts agronomiques et génétiques...

Ses **propriétés agronomiques** sont des atouts majeurs pour sa culture dans un contexte de changement climatique et de diminution des intrants chimiques. En effet, cette plante à photosynthèse en C4 est capable d'une meilleure assimilation du carbone à haute température que les plantes en C3, ce qui lui a permis de se développer sous des climats tropicaux, en poussant à une température optimale de 30°C et au-delà d'une température de base de 11°C (Chantereau *et al.*, 2013). De plus, elle possède une forte efficacité d'utilisation de l'eau et des nutriments (notamment grâce à un système racinaire profond) lui conférant une forte tolérance à la sécheresse, des cycles de croissance courts (3-4 mois), et une rusticité vis-à-vis des ravageurs et maladies (Steduto *et al.*, 1997). Non seulement le sorgho consomme peu d'engrais azoté, mais de plus, 40 % de l'azote mobilisé par la culture est restitué au sol sous forme organique. Le sorgho représente ainsi une alternative à la culture du maïs dans les zones où les disponibilités en eau sont critiques. Avec ces caractéristiques, le sorgho, dont dépendaient déjà

500 millions de personnes au quotidien en 2011 (Kumar *et al.*, 2012a) deviendra très certainement une culture essentielle pour la sécurité alimentaire de la planète à l’horizon 2050 compte-tenu de la nécessaire réduction des intrants et dans un contexte de changement climatique.

D’autre part, cette plante représente un **modèle d’étude** intéressant pour les céréales. Le génome du sorgho (730Mb), plus petit que celui du maïs (2,3Gb) ou encore du blé (17Gpb) et n’ayant pas subi de duplication de génome, fait de cette espèce diploïde (2n=20) un modèle facile à étudier génétiquement (Paterson, 2008; Schnable *et al.*, 2009). Entièrement séquencé (Paterson *et al.*, 2009), le génome de référence BTx623 comprend 36 338 gènes associés à des transcrits codants pour des protéines. De plus, plus d’un millier d’accession de sorgho sont actuellement en cours de séquençage (Terra Ref Project <https://terraref.org/> et Sorghum Genomic Toolbox : <https://www.iavao.org/projets/sorghum-gt>). Plusieurs travaux relatent la possibilité de transgénèse chez cette plante (Wu *et al.*, 2014) et des banques de mutants sont disponibles (Jiao *et al.*, 2016).

1.3. ...mais dont les protéines sont récalcitrantes à la digestion

Malgré ces atouts, la **faible digestibilité des protéines** du grain de sorgho par les protéases gastro-intestinales, qui présente la particularité de diminuer encore après cuisson (**Fig. 16**) (Duodu *et al.*, 2003; Gulati *et al.*, 2017), et leur déséquilibre en acides aminés, en particulier en lysine (Shelton *et al.*, 1951), représentent des freins importants à une utilisation plus large du sorgho pour l’alimentation. Une meilleure maîtrise de la valeur nutritive et de la digestibilité des protéines du sorgho représente donc un enjeu majeur pour l’alimentation humaine et animale, pour les pays du Nord comme ceux du Sud, et permettra d’exploiter au mieux les avantages agronomiques de cette plante.

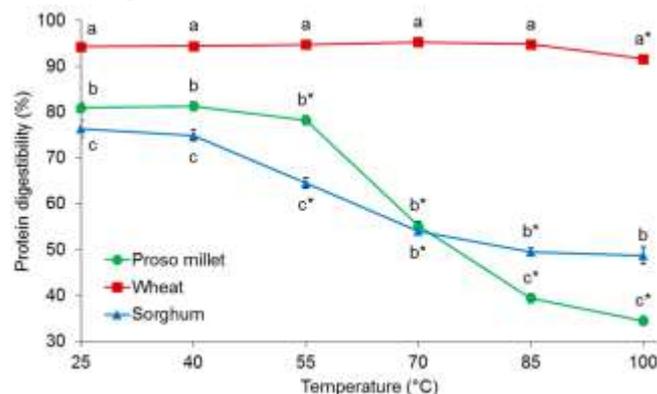


Figure 16: Digestibilité des protéines de blé, sorgho et millet en fonction de la température de cuisson. D’après (Gulati *et al.*, 2017).

Des approches de génétique ont déjà permis l’identification de quelques gènes/régions candidats impliqués dans de la qualité du grain, notamment au sein de l’UMR AGAP (Rami *et al.*, 1998; de Alencar Figueiredo *et al.*, 2008, 2010; Gilding *et al.*, 2013; Guindo *et al.*, 2016; Rhodes *et al.*, 2014, 2017). En outre, une seule étude a traité de la digestibilité des protéines et sur une seule population (Winn *et al.* 2009), faute de méthode de phénotypage adaptée pour cribler un grand nombre de génotypes. Cependant, dans le test *in vitro* utilisé dans cette étude, les quantités d’enzymes n’ont pas été normalisées en fonction de la teneur en protéines des

échantillons. Or le rapport enzyme/substrat est un paramètre clé qui doit être pris en compte lors des études de digestibilité des protéines. Les résultats issus de cette étude sont donc à considérer avec précaution. Un de nos enjeux, en partenariat avec l'UMR IATE (H. Mameri et M.-H. Morel) est de mettre au point ce type de test compatible avec le haut-débit. Cependant, en parallèle de ces approches de génétique, des travaux complémentaires concernant la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la qualité du grain sont nécessaires pour aider au pilotage de la sélection. En effet, les régions identifiées sont souvent très grandes et l'apport d'un crible supplémentaire, notamment via la génomique fonctionnelle est souvent nécessaire pour aider à orienter les recherches parmi ces listes de gènes.

L'objectif de ce projet est de mettre en œuvre des **approches couplées de génomique, de génétique et de biochimie et de biologie cellulaire** pour décrypter les mécanismes et mettre en évidence les gènes impliqués dans la mise en place des protéines de réserve et susceptibles de régir la digestibilité des protéines.

2. Etat de l'art scientifique et positionnement du projet à l'international

Les grains de sorgho peuvent contenir 7,6 à 13% de protéines constituées majoritairement (environ 70%) des prolamines nommées kafirines, réparties en fonction de leur séquence et de leur poids moléculaire en 4 classes : α - (23-25 kDa), β - , γ - (18 et 27 kDa respectivement) et δ - (12-14 kDa) (Lasztity, 1995 ; Schull *et al.*, 1991). Comme les zéïnes de maïs, les kafirines sont stockées dans le réticulum endoplasmique dans des corps protéiques (CP), dans lesquels les β - et γ -kafirines sont principalement détectées dans les régions périphériques, emprisonnant les α -kafirines (Lasztity, 1995).

Cette faible digestibilité peut être attribuée à l'interaction des protéines avec d'autres composés du grain (notamment les tanins), mais serait surtout liée au réseau tri-dimensionnel de ces CP structurés par de nombreux ponts disulfures entre des cystéines (Schull *et al.*, 1992). Le taux de protéines liées par des ponts disulfure augmente pendant le développement du grain mais les protéines sont encore partiellement réduites dans le grain mur ; la cuisson favorise l'apparition de ponts disulfures supplémentaires, ce qui expliquerait la perte de digestibilité observée (Oria *et al.*, 1995). La partie vitreuse du grain contient plus de ces CP que la partie farineuse (Kumari et Chandrashekar, 1994). Ils emprisonnent les grains d'amidon, en diminuent la digestibilité, et la valeur nutritionnelle du grain est donc encore dégradée (Ezeogu *et al.*, 2005).

In vitro, l'ajout d'un réducteur lors du traitement thermique limite l'agrégation des protéines et facilite par conséquent l'attaque des protéines par les protéases digestives (Hamaker *et al.*, 1987; Elkhalfa and Bernhardt, 2010). Cependant, la balance entre les types d'interactions (faibles et covalentes) qui contribuent à l'agrégation des protéines de réserve des céréales reste très peu étudiée. De même, l'impact de transformation par des procédés technologiques et/ou physiologiques sur la structure des agrégats protéiques et ultimement sur leur digestibilité est une question rarement traitée.

Chez le sorgho, les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces mises en place et modifications de ces CP sont encore peu connus. Un mutant nommé *hdhl* (high digestibility high lysine) a été identifié, présentant une forte digestibilité de ses protéines (Weaver *et al.*, 1998), une structure modifiée de ses CP (Oria *et al.*, 2000), une teneur en lysine élevée probablement liée à l'accumulation de protéines autres que les kafirines dans le grain (Dowling

et al., 2002), mais une structure farineuse qui le rend sensible aux attaques biotiques.

La mutation modifie un acide aminé dans le signal d'adressage d'une α -kafirine, ce qui perturberait le trafic intracellulaire et l'assemblage des protéines dans les CP (Wu *et al.*, 2013). La mutation et son phénotype ont été reproduits récemment par édition du génome (Li *et al.*, 2018). Une mutation similaire chez le maïs est à l'origine du phénotype très comparable *floury2* (Coleman *et al.*, 1997). Des lignées RNAi contre différentes classes de kafirines ont été construites et montrent toutes une augmentation de la digestibilité des protéines et de la teneur en lysine associée à une modification structurelle des CP mais avec un phénotype farineux du grain (da Silva *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012b; Grootboom *et al.*, 2014). Des variations alléliques dans les loci codant pour les kafirines ont été identifiées ; cependant, leurs effets sur la digestibilité des protéines restent à tester au travers d'essais d'une plus grande puissance statistique (Cremer *et al.*, 2014).

Des protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles et les liaisons intra et inter-protéiques, dans les étapes terminales de la formation des CP (telles que des thioredoxines, des glutaredoxines ou des Protein Disulfite Isomerases) ont été identifiées chez le riz, le blé ou le maïs mais aucune encore chez le sorgho (Li and Larkins, 1996; Wong *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2012).

La compréhension de la régulation de la mise en place de ces CP de réserve chez les céréales a largement progressé grâce à l'étude de la mutation *Opaque2* chez le maïs. La mutation affecte un facteur de transcription de type bZip (Schmidt *et al.*, 1990), et a permis de mettre par la suite en évidence un réseau plus complexe de facteurs de transcription impliquant des Zinc Finger Protein, des MADS... (Zhang *et al.*, 2015, 2016; Qiao *et al.*, 2016; Xiong *et al.*, 2017). Ce réseau régule la synthèse des zéïnes, mais également de l'amidon (Zhang *et al.*, 2015) et d'autres cibles dont les fonctions sont progressivement mises en évidence (Lappe *et al.*, 2018). L'orthologue du gène *Opaque2* chez le riz, *OsSMF1* possède la même fonction (Onodera *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2013), son partenaire de type Zinc Finger Protein, *RPBF*, a été identifié (Yamamoto *et al.*, 2006). L'orthologue de *Opaque2* chez le sorgho a été cloné, et des expériences d'activation transitoire ont montré qu'il peut activer un promoteur de zéïne de maïs (Pirovano *et al.*, 1994). Des associations entre la variabilité nucléotidique d'*Opaque2* du sorgho, la texture et la dureté des grains ont été mises en évidence (de Alencar Figueiredo *et al.*, 2010), tandis qu'aucune association n'a été mise en évidence avec la teneur en protéine totale dans cette étude. Chez le sorgho, les liens entre ce gène et la conformation des CP n'ont pas été testés, ni au niveau du déterminisme génétique, ni à un niveau plus fonctionnel.

Cette synthèse bibliographique montre que les **modifications de composition et de digestibilité des protéines** de sorgho mettent probablement en jeu un **réseau d'acteurs** impliqué dans la **régulation** de la synthèse des protéines, de leur processus **d'assemblage**, via la modulation des ratios des différentes sous-unités ou bien une modulation de leur **trafic intracellulaire**. Les objectifs de travail sont une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la digestibilité des protéines. Pour aborder cet aspect, ce projet repose sur les hypothèses que (i) l'expression des gènes impliqués dans la mise en place des structures protéiques varie au cours du développement du grain en parallèle de cette mise en place; (ii) un certain nombre d'entre eux sont sous la régulation du (ou des) facteur(s) de

transcription qui régule(nt) l'accumulation des protéines (*iii*) qu'une faible diversité pour la digestibilité des protéines a été explorée jusqu'à lors et qu'elle peut être enrichie au travers de l'utilisation d'une base génétique plus large. L'exploration de cette diversité sera permise par l'accès à des méthodes de phénotypage à moyen et haut-débit de la digestibilité des protéines et permettront de développer à terme des stratégies de sélection pour contribuer aux enjeux actuels d'accès aux protéines végétales.

Sur le sorgho, trois autres groupes principaux travaillant sur le sujet ont été identifiés: groupe du Pr Hamaker, Université de Purdue, West Lafayette, USA, orienté Food Science ; équipe du Pr Taylor, Université de Pretoria, Afrique du Sud, en Food Science et Génomique ; Pr Godwin et Jordan, Université du Queensland, Brisbane, Australie, en Génétique et Génomique.

3. Plan d'action

3.1. Plusieurs types de matériel végétal seront utilisés

Un **échantillonnage de grains en cours de développement** sur un génotype sera utilisé. La variété tropicale Macia type « grain » classique, ne contenant pas de tanin (Mkandawire *et al.*, 2013), a été choisie. Ainsi, nous pourrons dans un premier temps étudier la digestibilité des protéines intrinsèquement, sans rajouter les problèmes d'interactions protéines-tanins susceptibles de diminuer encore cette digestibilité. Dix stades de développement ont été prélevés durant l'été 2017 et de nouveau en 2018 (3 répliquas biologiques, tous les 4 jours depuis la floraison pendant 40 jours). Le phénotypage des grains en cours de leur développement, nous permettra d'identifier les stades clés auxquels ont lieu les modifications structurales et biochimiques importantes pour notre caractère d'intérêt.

Des **plantes affectées pour la mise en place des corps protéiques** seront générées. Pour cela, nous construirons des lignées KO pour l'orthologue de *Opaque2* chez le sorgho, probable régulateur de la synthèse des prolamines, grâce à des outils d'édition du génome (Crispr/Cas9). Une étude phylogénétique préliminaire a montré que, en comparaison au maïs, le gène *Opaque2* aurait été dupliqué et deux paralogues sont présents dans le génome du sorgho. Une construction multiplex permettant d'invalider simultanément ces deux gènes est donc envisagée. Des grains seront prélevés sur les lignées sauvages et transformées et seront utilisés pour les analyses transcriptomiques, récoltés à des stades assez précoces choisis à l'aide de données de phénotypage sur grains « sauvage » et des lignées transformées, et des données de transcriptomiques obtenues sur grains sauvages. En parallèle de la construction de ces transformants, nous pourrons également avoir accès au réseau de gènes coordonné par les orthologues de *Opaque2* (et ses partenaires potentiels) via leur surexpression dans des protoplastes de sorgho suivi par leur analyse au niveau transcriptomique.

Des **panels de diversité** seront utilisés pour identifier les régions du génome impliquées dans le caractère digestibilité des protéines par des approches de GWAS (coll. D. Pot, équipe Génétique et Innovation Variétale, UMR AGAP).

3.2. Phénotypage biochimique, histologique et protéomique

Biochimie - Des analyses de la teneur globale en protéines du grain seront réalisées (UMR IATE). Les profils en acides aminés issus de l'hydrolyse des protéines seront également appréhendés par HPLC (UMR SPO). Enfin la teneur du grain en amidon sera quantifiée (Plateau de Phénotypage Biochimique, PPB, UMR AGAP). La digestibilité des protéines sera évaluée avant et après cuisson. Un test miniaturisé utilisable en haut-débit sera mis au point (UMR IATE), qui sera en particulier utilisé pour caractériser les populations.

Protéomique – Les protéines du grain seront extraites séquentiellement (Nielsen *et al.*, 2016) et fractionnées par électrophorèse ou RP-HPLC sera réalisée (Wu and Wall, 1980; Morel, 1994). Le niveau d'oxydo-réduction des thiols au sein des complexes protéiques sera également évalué.

Analyse SPIR (Spectroscopie Proche Infra Rouge) - De nouvelles calibrations seront développées pour les stades immatures des grains et des calibrations plus anciennes seront mobilisées pour la teneur en protéines et amidon, utilisables uniquement pour le point final, à maturité des grains. Elles permettront par la suite d'accélérer les analyses biochimiques pour pouvoir cribler rapidement un plus grand nombre d'échantillons (stades et génotypes). Nous tenterons également d'analyser conjointement les spectres SPIR et les valeurs de digestibilités pour évaluer si il est possible d'utiliser la SPIR pour développer des calibrations de prédiction pour ce paramètre.

Histologie – Des approches d'imagerie seront mises en œuvre pour la localisation cellulaire des protéines et de leur arrangement (description de l'ultrastructure de corps protéiques par microscopie électronique à transmission). Une étude ultrastructurale de l'ontogenèse de ces corps protéiques sera effectuée. Une étude structurale visera à comparer la partie vitreuse du grain et la partie farineuse et mettra en évidence les structures polymériques de kafirines et leurs interactions avec les grains d'amidon. Ces aspects seront développés en lien avec PHIV, Plateforme d'histocytologie et d'imagerie cellulaire végétale, de l'UMR AGAP (J.-L. Verdeil).

3.3. Analyse de données pour l'identification de gènes et régions candidates

3.3.1. Transcriptome et analyse des gènes exprimés au cours du développement du grain de sorgho et dans les transformants

Des cinétiques d'évolution du transcriptome au cours du développement du grain de sorgho sont déjà disponibles. Cependant, elles sont construites pour étudier d'autres critères de qualité de la graine : la synthèse de la dhurrin (Nielsen *et al.*, 2016), ou la taille du grain (Tao *et al.*, 2017) et ne permettent donc pas d'identifier les gènes impliqués dans la mise en place des corps protéiques de réserve. Ces données seront cependant mobilisées pour les analyses de réseau de gènes.

Nous générerons des données transcriptomiques par RNAseq sur les grains en développement et sur les transformants générés. Nous utiliserons ces données pour mettre en évidence des réseaux de co-régulation de gènes (WGCNA Langfelder and Horvath, 2008), comme cela a déjà été fait dans le cadre de la thèse de L. Hennet. Nous mettrons en parallèle ces réseaux et l'expression des gènes avec nos caractères d'intérêt (données protéomiques et biochimiques, données d'imagerie en particulier nombre, taille et densité des corps protéiques) pour tenter de mettre en évidence quels sont les gènes dont l'expression leur est corrélée.

Un focus particulier sera mis pour la recherche dans ces réseaux, de gènes codant pour des facteurs de transcriptions, des protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles et les liaisons intra et inter-protéiques, dans les étapes terminales de la formation des CP, dans le trafic intracellulaire ... dont l'identification chez le sorgho est *a priori* délicate sans autre information fonctionnelle (117 protéines répondent au mot clé thioredoxin, 54 à glutaredoxin, etc..).

3.3.2. Analyse du déterminisme de la digestibilité des protéines

Les données de génotypage et de phénotypage qui seront produites sur les panels de diversité seront utilisées pour disséquer le déterminisme génétique de la digestibilité des protéines. Ceci permettra l'identification des régions génomiques impliquées dans la digestibilité par des approches de génétique positionnelles et donnera accès à une liste de gènes situés dans ces régions.

Cette liste sera comparée à la liste des gènes dont l'expression est co-régulée avec les caractères d'intérêt. La comparaison (intersection) de ces inventaires permettra d'obtenir une liste réduite de gènes potentiellement pertinents pour expliquer les caractères qui nous intéressent.

Ce projet peut être considéré comme un point de départ permettant d'envisager ensuite des projets de plus grande envergure. Ainsi, pour la suite :

- Des échantillonnages en cours de cinétiques de développement du grain ont également été effectués sur **d'autres variétés de sorgho** présentant des profils contrastés en termes de protéines et d'autres composés impliqués dans la qualité du grain pouvant intervenir dans la digestibilité des protéines (tanins).

- La recherche de **mutation naturelle pour les gènes candidats** identifiés ou **générée** (introduction de protéine chimère, Crispr/Cas9 pour générer des protéines tronquées, mutants EMS disponibles) pourra être effectuée. La diversité allélique, sera exploitée : Quel impact ces modifications de séquences ont-elles sur la structure des protéines et des corps protéiques, la composition et les propriétés technologiques du grain ?

- L'impact des conditions abiotiques sur la digestibilité des protéines pourra être étudié et notamment l'impact **de stress thermiques récurrents**, qui sont plus représentatifs des conditions réelles de culture au champ (Coll. C. Granier, équipe PAM, Phénotypage et Adaptation des Monocotylédones, UMR AGAP). Ces aspects font partie du projet PARTS déposé par C. Granier auprès d'Agropolis Fondation).

- Des travaux avec des **technologues de l'alimentation**, et notamment de l'alimentation animale ont été sollicités pour mettre en application les résultats de nos travaux et tester les variétés dont la digestibilité en protéines est modulée. Ainsi l'ITAVI (Institut Technique pour l'AVIculture), l'UMR BOA et l'UE PEAT sont partenaires du projet CASDAR déposé pour tester sur volailles des aliments préparés à partir de variétés de sorgho présentant des digestibilités en protéines contrastées.

- Enfin, les liens avec **des semenciers privés**, ayant déjà confirmé être très intéressés par ce critère de qualité du grain, seront renforcés. L'une de ces entreprises, EuroSorgho, fait d'ailleurs partie du Projet CASDAR NitroSorgh déposé en mars 2020.

A terme, ces résultats seront mobilisables pour développer des stratégies de sélection qui contribueront à la **sélection de variétés de sorgho** présentant une meilleure digestibilité des protéines, et présentant de ce fait une valeur nutritionnelle améliorée.

Dans un contexte de financement sur projet, il n'est pas toujours facile de construire de manière cohérente une problématique de recherche sur plusieurs années, en impliquant des collaborateurs et des étudiants à plus ou moins long terme. Différents aspects de ce projet ont été soumis pour obtenir des financements : département BAP ([SoKafi](#) obtenu), AAP CASDAR semences, Agropolis Fondation, MUSE. De l'obtention de ces financements dépendra la vitesse à laquelle pourra avancer ce projet et ses orientations.

Je souhaite également aborder un autre aspect de la qualité du grain, la **composition en métabolites spécialisés**. Ce projet vient d'être initié grâce à un premier volet de financement accordé par l'Ecole Universitaire de Recherche des Sciences des Plantes de Saclay, le [projet Métabolites Spécialisés](#), dont une partie portera sur les graines (L. Lepiniec, G. Mouille, F. Perreau, INRAE, IJPB). Le sorgho fait partie des graines dont la diversité métabolique sera explorée par analyse métabolique fine (LC-MS) non ciblée. Ces profils métaboliques seront mis en lien avec la diversité génétique (GWAS) et des données de transcriptomique acquises en cours de développement de la graine de certains génotypes aux profils métaboliques particuliers.

Références bibliographiques

- Ageorges, A., Fernandez, L., Vialet, S., Merdinoglu, D., Terrier, N., Romieu, C., 2006. Four specific isogenes of the anthocyanin metabolic pathway are systematically co-expressed with the red colour of grape berries. *Plant Sci.* 170, 372–383. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.09.007>
- Altpeter, F., Springer, N.M., Bartley, L.E., Blechl, A.E., Brutnell, T.P., Citovsky, V., Conrad, L.J., Gelvin, S.B., Jackson, D.P., Kausch, A.P., Lemaux, P.G., Medford, J.I., Orozco-Cárdenas, M.L., Tricoli, D.M., Van Eck, J., Voytas, D.F., Walbot, V., Wang, K., Zhang, Z.J., Stewart, C.N., 2016. Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing[OPEN]. *Plant Cell* 28, 1510–1520. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>
- Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., Pellerin, P., 2000. Analysis of cell wall neutral sugar composition, β -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 289–300. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00749-X](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00749-X)
- Bogs, J., Jaffé, F.W., Takos, A.M., Walker, A.R., Robinson, S.P., 2007. The Grapevine Transcription Factor VvMYBPA1 Regulates Proanthocyanidin Synthesis during Fruit Development. *Plant Physiol.* 143, 1347–1361. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093203>
- Bontpart, T., Cheynier, V., Ageorges, A., Terrier, N., 2015. BAHD or SCPL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds. *New Phytol.* 208, 695–707. <https://doi.org/10.1111/nph.13498>
- Bontpart, T., Ferrero, M., Khater, F., Marlin, T., Vialet, S., Vallverdú-Queralt, A., Pinasseau, L., Ageorges, A., Cheynier, V., Terrier, N., 2018. Focus on putative serine carboxypeptidase-like acyltransferases in grapevine. *Plant Physiol. Biochem.* 130, 356–366. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.07.023>
- Bontpart, T., Marlin, T., Vialet, S., Guiraud, J.-L., Pinasseau, L., Meudec, E., Sommerer, N., Cheynier, V., Terrier, N., 2016. Two shikimate dehydrogenases, *VvSDH3* and *VvSDH4*, are involved in gallic acid biosynthesis in grapevine. *J. Exp. Bot.* 67, 3537–3550. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw184>
- Boss, P.K., Davies, C., Robinson, S.P., 1996. Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol. Biol.* 32, 565–569. <https://doi.org/10.1007/BF00019111>
- Carrier, G., Huang, Y.-F., Le Cunff, L., Fournier-Level, A., Vialet, S., Souquet, J.-M., Cheynier, V., Terrier, N., This, P., 2013. Selection of candidate genes for grape proanthocyanidin pathway by an integrative approach. *Plant Physiol. Biochem.* 72, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.04.014>
- Coleman, C.E., Clore, A.M., Ranch, J.P., Higgins, R., Lopes, M.A., Larkins, B.A., 1997. Expression of a mutant α -zein creates the floury2 phenotype in transgenic maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 7094–7097. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.7094>
- Cremer, J.E., Bean, S.R., Tilley, M.M., Ioerger, B.P., Ohm, J.B., Kaufman, R.C., Wilson, J.D., Innes, D.J., Gilding, E.K., Godwin, I.D., 2014. Grain Sorghum Proteomics: Integrated Approach toward Characterization of Endosperm Storage Proteins in Kafirin Allelic Variants. *J. Agric. Food Chem.* 62, 9819–9831. <https://doi.org/10.1021/jf5022847>
- Cutanda-Perez, M.-C., Ageorges, A., Gomez, C., Vialet, S., Terrier, N., Romieu, C., Torregrosa, L., 2009. Ectopic expression of VvmybA1 in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport. *Plant Mol. Biol.* 69, 633–648. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9446-x>
- da Silva, L.S., Taylor, J., Taylor, J.R.N., 2011. Transgenic Sorghum with Altered Kafirin Synthesis: Kafirin Solubility, Polymerization, and Protein Digestion. *J. Agric. Food Chem.* 59, 9265–9270. <https://doi.org/10.1021/jf201878p>
- da Silva Porto, P.A.L., Laranjinha, J.A.N., de Freitas, V.A.P., 2003. Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 66, 947–954. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00458-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00458-1)
- D’Auria, J.C., 2006. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr. Opin. Plant Biol., Physiology and metabolism* / edited by Eran Pichersky and Krishna Niyogi 9, 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.016>
- Davies, C., Robinson, S.P., 1996. Sugar Accumulation in Grape Berries (Cloning of Two Putative Vacuolar Invertase cDNAs and Their Expression in Grapevine Tissues). *Plant Physiol.* 111, 275–283. <https://doi.org/10.1104/pp.111.1.275>
- de Alencar Figueiredo, L.F., Calatayud, C., Dupuits, C., Billot, C., Rami, J.-F., Brunel, D., Perrier, X., Courtois, B., Deu, M., Glaszmann, J.-C., 2008. Phylogeographic Evidence of Crop Neodiversity in Sorghum. *Genetics* 179, 997–1008. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.087312>
- de Alencar Figueiredo, L.F., Sine, B., Chantereau, J., Mestres, C., Fliedel, G., Rami, J.-F., Glaszmann, J.-C., Deu, M., Courtois, B., 2010. Variability of grain quality in sorghum: association with polymorphism in Sh2, Bt2, SssI, Ae1, Wx and O2. *Theor. Appl. Genet.* 121, 1171–1185. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1380-z>

- Debeaujon, I., Peeters, A.J.M., Léon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M., n.d. The TRANSPARENT TESTA12 Gene of Arabidopsis Encodes a Multidrug Secondary Transporter-like Protein Required for Flavonoid Sequestration in Vacuoles of the Seed Coat Endothelium 20.
- Dixon, R.A., Xie, D.-Y., Sharma, S.B., 2005. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 165, 9–28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01217.x>
- Dowling, L.F., Arndt, C., Hamaker, B.R., 2002. Economic Viability of High Digestibility Sorghum as Feed for Market Broilers. *Agron. J.* 94, 1050–1058. <https://doi.org/10.2134/agronj2002.1050>
- Duodu, K.G., Taylor, J.R.N., Belton, P.S., Hamaker, B.R., 2003. Factors affecting sorghum protein digestibility. *J. Cereal Sci.* 38, 117–131. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(03\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(03)00016-X)
- Elkhalifa, A.E.O., Bernhardt, R., 2010. Influence of grain germination on functional properties of sorghum flour. *Food Chem.* 121, 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.041>
- Ezeogu, L.I., Duodu, K.G., Taylor, J.R.N., 2005. Effects of endosperm texture and cooking conditions on the in vitro starch digestibility of sorghum and maize flours. *J. Cereal Sci.* 42, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.02.002>
- Fernandez, L., Chaïb, J., Martinez-Zapater, J.-M., Thomas, M.R., Torregrosa, L., 2013. Mis-expression of a PISTILLATA-like MADS box gene prevents fruit development in grapevine. *Plant J.* 73, 918–928. <https://doi.org/10.1111/tpj.12083>
- Fernandez, L., Torregrosa, L., Terrier, N., Sreekantan, L., Grimplet, J., Davies, C., Thomas, M.R., Romieu, C., Ageorges, A., 2007. Identification of genes associated with flesh morphogenesis during grapevine fruit development. *Plant Mol. Biol.* 63, 307–323. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9090-2>
- Chantereau J, Jean-François Cruz, Alain Ratnadass et Gilles Trouche, Le sorgho. Versailles-Gembloux, Éditions Quæ-Presses agronomiques de Gembloux, « Agricultures tropicales en poche », 2013, 245 p. Études Rural.
- Gilding, E.K., Frère, C.H., Cruickshank, A., Rada, A.K., Prentis, P.J., Mudge, A.M., Mace, E.S., Jordan, D.R., Godwin, I.D., 2013. Allelic variation at a single gene increases food value in a drought-tolerant staple cereal. *Nat. Commun.* 4, 1483. <https://doi.org/10.1038/ncomms2450>
- Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N., Ageorges, A., 2011. In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST: Anthocyanin trafficking in grapevine. *Plant J.* 67, 960–970. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04648.x>
- Gomez, C., Terrier, N., Torregrosa, L., Vialet, S., Fournier-Level, A., Verriès, C., Souquet, J.-M., Mazauric, J.-P., Klein, M., Cheynier, V., Ageorges, A., 2009. Grapevine MATE-Type Proteins Act as Vacuolar H⁺-Dependent Acylated Anthocyanin Transporters. *Plant Physiol.* 150, 402–415. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135624>
- Goto, K., Meyerowitz, E.M., 1994. Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene PISTILLATA. *Genes Dev.* 8, 1548–1560. <https://doi.org/10.1101/gad.8.13.1548>
- Grimplet, J., Romieu, C., Audergon, J.-M., Marty, I., Albagnac, G., Lambert, P., Bouchet, J.-P., Terrier, N., 2005. Transcriptomic study of apricot fruit (*Prunus armeniaca*) ripening among 13 006 expressed sequence tags. *Physiol. Plant.* 125, 281–292. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00563.x>
- Grootboom, A.W., Mkhonza, N.L., Mbambo, Z., O’Kennedy, M.M., da Silva, L.S., Taylor, J., Taylor, J.R.N., Chikwamba, R., Mehlo, L., 2014. Co-suppression of synthesis of major α -kafirin sub-class together with γ -kafirin-1 and γ -kafirin-2 required for substantially improved protein digestibility in transgenic sorghum. *Plant Cell Rep.* 33, 521–537. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1556-5>
- Guillaumie, S., Fouquet, R., Kappel, C., Camps, C., Terrier, N., Moncomble, D., Dunlevy, J.D., Davies, C., Boss, P.K., Delrot, S., 2011. Transcriptional analysis of late ripening stages of grapevine berry. *BMC Plant Biol.* 11, 165. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-165>
- Guindo, D., Davrieux, F., Teme, N., Vaksman, M., Doumbia, M., Flidel, G., Bastianelli, D., Verdeil, J.-L., Mestres, C., Kouressy, M., Courtois, B., Rami, J.-F., 2016. Pericarp thickness of sorghum whole grain is accurately predicted by NIRS and can affect the prediction of other grain quality parameters. *J. Cereal Sci.* 69, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.03.008>
- Gulati, P., Li, A., Holding, D., Santra, D., Zhang, Y., Rose, D.J., 2017. Heating Reduces Proso Millet Protein Digestibility via Formation of Hydrophobic Aggregates. *J. Agric. Food Chem.* 65, 1952–1959. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05574>
- Hamaker, B.R., Kirleis, A.W., Butler, L.G., Axtell, J.D., Mertz, E.T., 1987. Improving the in vitro protein digestibility of sorghum with reducing agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 626–628. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.3.626>
- Hawker, J.S., 1969a. Changes in the activities of malic enzyme, malate dehydrogenase, phosphopyruvate carboxylase and pyruvate decarboxylase during the development of a non-climacteric fruit (the grape). *Phytochemistry* 8, 19–23. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85789-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85789-1)

- Hawker, J. S., 1969b. Changes in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries. *Phytochemistry* 8, 9–17. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85788-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85788-X)
- Hennet, L., Berger, A., Trabanco, N., Ricciuti, E., Dufayard, J.-F., Bocs, S., Bastianelli, D., Bonnal, L., Roques, S., Rossini, L., Luquet, D., Terrier, N., Pot, D., 2020. Transcriptional Regulation of Sorghum Stem Composition: Key Players Identified Through Co-expression Gene Network and Comparative Genomics Analyses. *Front. Plant Sci.* 11, 224. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00224>
- Herrmann, K.M., Weaver, L.M., 1999. THE SHIKIMATE PATHWAY 32.
- Hren, M., Nikolić, P., Rotter, A., Blejec, A., Terrier, N., Ravnikar, M., Dermastia, M., Gruden, K., 2009. “Bois noir” phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics* 10, 460. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-460>
- Huang, Y.-F., Bertrand, Y., Guiraud, J.-L., Vialet, S., Launay, A., Cheynier, V., Terrier, N., This, P., 2013. Expression QTL mapping in grapevine—Revisiting the genetic determinism of grape skin colour. *Plant Sci.* 207, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.02.011>
- Huang, Y.-F., Cheynier, V., Terrier, N., 2012a. Shedding Light on the Black Boxes of the Proanthocyanidin Pathway with Grapevine, in: *Recent Advances in Polyphenol Research*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 161–190. <https://doi.org/10.1002/9781118299753.ch7>
- Huang, Y.-F., Doligez, A., Fournier-Level, A., Le Cunff, L., Bertrand, Y., Canaguier, A., Morel, C., Miralles, V., Veran, F., Souquet, J.-M., Cheynier, V., Terrier, N., This, P., 2012b. Dissecting genetic architecture of grape proanthocyanidin composition through quantitative trait locus mapping. *BMC Plant Biol.* 12, 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-30>
- Huang, Y.-F., Vialet, S., Guiraud, J.-L., Torregrosa, L., Bertrand, Y., Cheynier, V., This, P., Terrier, N., 2014. A negative MYB regulator of proanthocyanidin accumulation, identified through expression quantitative locus mapping in the grape berry. *New Phytol.* 201, 795–809. <https://doi.org/10.1111/nph.12557>
- Huguency, P., Provenzano, S., Verriès, C., Ferrandino, A., Meudec, E., Batelli, G., Merdinoglu, D., Cheynier, V., Schubert, A., Ageorges, A., 2009. A Novel Cation-Dependent *O*-Methyltransferase Involved in Anthocyanin Methylation in Grapevine. *Plant Physiol.* 150, 2057–2070. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140376>
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., Ferrara, L., Faoro, F., 2005. Induction of Resistance to Gray Mold with Benzothiadiazole Modifies Amino Acid Profile and Increases Proanthocyanidins in Grape: Primary versus Secondary Metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9133–9139. <https://doi.org/10.1021/jf050853g>
- Jia, N., Zhu, Y., Xie, F., 2018. An Efficient Protocol for Model Legume Root Protoplast Isolation and Transformation. *Front. Plant Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00670>
- Jiao, Y., Burke, J., Chopra, R., Burrow, G., Chen, J., Wang, B., Hayes, C., Emendack, Y., Ware, D., Xin, Z., 2016. A Sorghum Mutant Resource as an Efficient Platform for Gene Discovery in Grasses. *Plant Cell* 28, 1551–1562. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00373>
- Kajiya, K., Kumazawa, S., Nakayama, T., 2002. Effects of External Factors on the Interaction of Tea Catechins with Lipid Bilayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2330–2335. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2330>
- Kajiya, K., Kumazawa, S., Nakayama, T., 2001. Steric Effects on Interaction of Tea Catechins with Lipid Bilayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2638–2643. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.2638>
- Khater, F., Fournand, D., Vialet, S., Meudec, E., Cheynier, V., Terrier, N., 2012. Identification and functional characterization of cDNAs coding for hydroxybenzoate/hydroxycinnamate glucosyltransferases co-expressed with genes related to proanthocyanidin biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 63, 1201–1214. <https://doi.org/10.1093/jxb/err340>
- Kim, Y.J., Yeu, S.Y., Park, B.S., Koh, H.-J., Song, J.T., Seo, H.S., 2012. Protein Disulfide Isomerase-Like Protein 1-1 Controls Endosperm Development through Regulation of the Amount and Composition of Seed Proteins in Rice. *PLoS ONE* 7, e44493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044493>
- Kobayashi, S., 2004. Retrotransposon-Induced Mutations in Grape Skin Color. *Science* 304, 982–982. <https://doi.org/10.1126/science.1095011>
- Kobayashi, S., M., I., K., H., C., H., 2002. Myb -related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* 215, 924–933. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0830-5>
- Kortekamp, A., 2006. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.01.008>
- Kumar, T., Dweikat, I., Sato, S., Ge, Z., Nersesian, N., Chen, H., Elthon, T., Bean, S., Ioerger, B.P., Tilley, M., Clemente, T., 2012b. Modulation of kernel storage proteins in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Plant Biotechnol. J.* 10, 533–544. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00685.x>
- Kumari, S.R., and Chandrashekar, A., 1994. Relationship between grain vitreousness and the contents of prolamins and three anti-fungal proteins in sorghum *J. Cereal Sci.* 20, 93-99.
- Langfelder, P., Horvath, S., 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 9, 559. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>

- Lappe, R.R., Baier, J.W., Boehlein, S.K., Huffman, R., Lin, Q., Wattedled, F., Settles, A.M., Hannah, L.C., Borisjuk, L., Rolletschek, H., Stewart, J.D., Scott, M.P., Hennen-Bierwagen, T.A., Myers, A.M., 2018. Functions of maize genes encoding pyruvate phosphate dikinase in developing endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E24–E33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715668115>
- Lasztity, R., 1995. *The Chemistry of Cereal Proteins*, Second Edition. CRC Press.
- Li, A., Jia, S., Yobi, A., Ge, Z., Sato, S.J., Zhang, C., Angelovici, R., Clemente, T.E., Holding, D.R., 2018. Editing of an Alpha-Kafirin Gene Family Increases Digestibility and Protein Quality in Sorghum. *Plant Physiol.* 177, 1425–1438. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00200>
- Li, C.P., Larkins, B.A., 1996. Expression of protein disulfide isomerase is elevated in the endosperm of the maize floury-2 mutant. *Plant Mol. Biol.* 30, 873–882. <https://doi.org/10.1007/BF00020800>
- Li, J.-F., Zhang, D., Sheen, J., 2014. Cas9-Based Genome Editing in Arabidopsis and Tobacco, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 459–472. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00022-2>
- Liu, C., Wang, X., Shulaev, V., Dixon, R.A., 2016. A role for leucoanthocyanidin reductase in the extension of proanthocyanidins. *Nat. Plants* 2, 1–7. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.182>
- Logan, D.C., Domergue, O., Serve, B.T. de la, Rossignol, M., 1997. A new family of plasma membrane polypeptides differentially regulated during plant development. *IUBMB Life* 43, 1051–1062. <https://doi.org/10.1080/15216549700204871>
- Mathieu, S., Bigey, F., Procureur, J., Terrier, N., Günata, Z., 2007. Production of a recombinant carotenoid cleavage dioxygenase from grape and enzyme assay in water-miscible organic solvents. *Biotechnol. Lett.* 29, 837–841. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9315-8>
- Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., Günata, Z., 2005. A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. *J. Exp. Bot.* 56, 2721–2731. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri265>
- Mkandawire, N.L., Kaufman, R.C., Bean, S.R., Weller, C.L., Jackson, D.S., Rose, D.J., 2013. Effects of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) Tannins on α -Amylase Activity and in Vitro Digestibility of Starch in Raw and Processed Flours. *J. Agric. Food Chem.* 61, 4448–4454. <https://doi.org/10.1021/jf400464j>
- Morel, M.-H., 1994. Acid-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Wheat Glutenins: A New Tool for the Separation of High and Low Molecular Weight Subunits. *Cereal Chem.* 713, 238–242
- Muir, R.M., Ibáñez, A.M., Uratsu, S.L., Ingham, E.S., Leslie, C.A., McGranahan, G.H., Batra, N., Goyal, S., Joseph, J., Jemmis, E.D., Dandekar, A.M., 2011. Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*). *Plant Mol. Biol.* 75, 555–565. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9739-3>
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M., Lepiniec, L., 2001. The Arabidopsis TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* 13, 2099–2114. <https://doi.org/10.1105/tpc.010098>
- Nielsen, L.J., Stuart, P., Pičmanová, M., Rasmussen, S., Olsen, C.E., Harholt, J., Møller, B.L., Bjarnholt, N., 2016. Dhurrin metabolism in the developing grain of *Sorghum bicolor* (L.) Moench investigated by metabolite profiling and novel clustering analyses of time-resolved transcriptomic data. *BMC Genomics* 17, 1021. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3360-4>
- Ollat, N., 1997. Bases physiologiques et anatomiques de la croissance des baies de *vitis vinifera* cv. Cabernet sauvignon (thesis). <http://www.theses.fr>. Montpellier, ENSA.
- Ollé, D., Guiraud, J.L., Souquet, J.M., Terrier, N., Ageorges, A., Cheynier, V., Verries, C., 2011. Effect of pre- and post-veraison water deficit on proanthocyanidin and anthocyanin accumulation during Shiraz berry development: Water stress and flavonoid biosynthesis. *Aust. J. Grape Wine Res.* 17, 90–100. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2010.00121.x>
- Onodera, Y., Suzuki, A., Wu, C.-Y., Washida, H., Takaiwa, F., 2001. A Rice Functional Transcriptional Activator, RISBZ1, Responsible for Endosperm-specific Expression of Storage Protein Genes through GCN4 Motif. *J. Biol. Chem.* 276, 14139–14152. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007405200>
- Oria, M.P., Hamaker, B.R., and Shull, J.M., 1995. Resistance of Sorghum .alpha.-, .beta.-, and .gamma.-Kafirins to Pepsin Digestion. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2148–2153.
- Oria, M.P., Hamaker, B.R., Axtell, J.D., Huang, C.-P., 2000. A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 5065–5070. <https://doi.org/10.1073/pnas.080076297>
- Paterson, A.H., 2008. Genomics of Sorghum [WWW Document]. *Int. J. Plant Genomics*. <https://doi.org/10.1155/2008/362451>
- Pinasseau, L., Vallverdú-Queralt, A., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Le Cunff, L., Péros, J.-P., Ageorges, A., Sommerer, N., Boulet, J.-C., Terrier, N., Cheynier, V., 2017. Cultivar Diversity of Grape Skin Polyphenol Composition and Changes in Response to Drought Investigated by LC-MS Based Metabolomics. *Front. Plant Sci.* 8, 1826. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01826>

- Pinasseau, L., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Vallverdú-Queralt, A., Terrier, N., Boulet, J.-C., Cheynier, V., Sommerer, N., 2016. A Fast and Robust UHPLC-MRM-MS Method to Characterize and Quantify Grape Skin Tannins after Chemical Depolymerization. *Molecules* 21, 1409. <https://doi.org/10.3390/molecules21101409>
- Pirovano, L., Lanzini, S., Hartings, H., Lazzaroni, N., Rossi, V., Joshi, R., Thompson, R.D., Salamini, F., Motto, M., 1994. Structural and functional analysis of an Opaque-2-related gene from sorghum. *Plant Mol. Biol.* 24, 515–523. <https://doi.org/10.1007/BF00024119>
- Qiao, Z., Qi, W., Wang, Q., Feng, Y., Yang, Q., Zhang, N., Wang, S., Tang, Y., Song, R., 2016. ZmMADS47 Regulates Zein Gene Transcription through Interaction with Opaque2. *PLOS Genet.* 12, e1005991. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005991>
- Rai, S., Kaur, A., Chopra, C.S., 2018. Gluten-Free Products for Celiac Susceptible People. *Front. Nutr.* 5. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00116>
- Rami, J.-F., Dufour, P., Trouche, G., Flidel, G., Mestres, C., Davrieux, F., Blanchard, P., Hamon, P., 1998. Quantitative trait loci for grain quality, productivity, morphological and agronomical traits in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench): *Theor. Appl. Genet.* 97, 605–616. <https://doi.org/10.1007/s001220050936>
- Rhodes, D.H., Hoffmann, L., Rooney, W.L., Herald, T.J., Bean, S., Boyles, R., Brenton, Z.W., Kresovich, S., 2017. Genetic architecture of kernel composition in global sorghum germplasm. *BMC Genomics* 18, 15. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3403-x>
- Rhodes, D.H., Hoffmann, L., Rooney, W.L., Ramu, P., Morris, G.P., Kresovich, S., 2014. Genome-Wide Association Study of Grain Polyphenol Concentrations in Global Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Germplasm. *J. Agric. Food Chem.* 62, 10916–10927. <https://doi.org/10.1021/jf503651t>
- Schmidt, R.J., Burr, F.A., Aukerman, M.J., Burr, B., 1990. Maize regulatory gene opaque-2 encodes a protein with a “leucine-zipper” motif that binds to zein DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 46–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.1.46>
- Schnable, P.S., Ware, D., Fulton, R.S., Stein, J.C., Wei, F., Pasternak, S., Liang, C., Zhang, J., Fulton, L., Graves, T.A., Minx, P., Reily, A.D., Courtney, L., Kruchowski, S.S., Tomlinson, C., Strong, C., Delehaunty, K., Fronick, C., Courtney, B., Rock, S.M., Belter, E., Du, F., Kim, K., Abbott, R.M., Cotton, M., Levy, A., Marchetto, P., Ochoa, K., Jackson, S.M., Gillam, B., Chen, W., Yan, L., Higginbotham, J., Cardenas, M., Waligorski, J., Applebaum, E., Phelps, L., Falcone, J., Kanchi, K., Thane, T., Scimone, A., Thane, N., Henke, J., Wang, T., Ruppert, J., Shah, N., Rotter, K., Hodges, J., Ingenthron, E., Cordes, M., Kohlberg, S., Sgro, J., Delgado, B., Mead, K., Chinwalla, A., Leonard, S., Crouse, K., Collura, K., Kudrna, D., Currie, J., He, R., Angelova, A., Rajasekar, S., Mueller, T., Lomeli, R., Scara, G., Ko, A., Delaney, K., Wissotski, M., Lopez, G., Campos, D., Braidotti, M., Ashley, E., Golser, W., Kim, H., Lee, S., Lin, J., Dujmic, Z., Kim, W., Talag, J., Zuccolo, A., Fan, C., Sebastian, A., Kramer, M., Spiegel, L., Nascimento, L., Zutavern, T., Miller, B., Ambroise, C., Muller, S., Spooner, W., Narechania, A., Ren, L., Wei, S., Kumari, S., Faga, B., Levy, M.J., McMahan, L., Buren, P.V., Vaughn, M.W., Ying, K., Yeh, C.-T., Emrich, S.J., Jia, Y., Kalyanaraman, A., Hsia, A.-P., Barbazuk, W.B., Baucom, R.S., Brutnell, T.P., Carpita, N.C., Chaparro, C., Chia, J.-M., Deragon, J.-M., Estill, J.C., Fu, Y., Jeddelloh, J.A., Han, Y., Lee, H., Li, P., Lisch, D.R., Liu, S., Liu, Z., Nagel, D.H., McCann, M.C., SanMiguel, P., Myers, A.M., Nettleton, D., Nguyen, J., Penning, B.W., Ponnala, L., Schneider, K.L., Schwartz, D.C., Sharma, A., Soderlund, C., Springer, N.M., Sun, Q., Wang, H., Waterman, M., Westerman, R., Wolfgruber, T.K., Yang, L., Yu, Y., Zhang, L., Zhou, S., Zhu, Q., Bennetzen, J.L., Dawe, R.K., Jiang, J., Jiang, N., Presting, G.G., Wessler, S.R., Aluru, S., Martienssen, R.A., Clifton, S.W., McCombie, W.R., Wing, R.A., Wilson, R.K., 2009. The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science* 326, 1112–1115. <https://doi.org/10.1126/science.1178534>
- Schull, J.M., Watterson, J.J., and Kirleis, A.W., 1991. Proposed nomenclature for the alcohol soluble proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* (L. Moench) endosperm based on molecular weight, solubility, and structure. *J. Agric. Food Chem.* 39, 83-87.
- Schull, J.M., Watterson, J.D., and Kirleis, A.W., 1992. Purification and immunochemical localization of kafirins in *Sorghum bicolor* (L. Moench) endosperm. *Protoplasma* 171, 64-74.
- Schwartz, S.H., Qin, X., Zeevaert, J.A.D., 2001. Characterization of a Novel Carotenoid Cleavage Dioxygenase from Plants. *J. Biol. Chem.* 276, 25208–25211. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102146200>
- Shelton, M., Couch, J.R., Hole, F., Jones, J.H., Leighton, R.E., Lyman, C.M., and Briggs, J.K., 1951. Grain sorghum byproduct feeds for farm animals. *Texas Agr. Exp. Sta. Bull.* 743.
- Smith, C.W., Frederiksen, R.A., 2000. *Sorghum: Origin, History, Technology, and Production*. John Wiley & Sons.
- Steduto, P., Katerji, N., Puertos-Molina, H., U’nlü, M., Mastrorilli, M., Rana, G., 1997. Water-use efficiency of sweet sorghum under water stress conditions Gas-exchange investigations at leaf and canopy scales. *Field Crops Res.* 54, 221–234. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00050-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00050-6)

- Tao, Y., Mace, E.S., Tai, S., Cruickshank, A., Campbell, B.C., Zhao, X., Van Oosterom, E.J., Godwin, I.D., Botella, J.R., Jordan, D.R., 2017. Whole-Genome Analysis of Candidate genes Associated with Seed Size and Weight in Sorghum bicolor Reveals Signatures of Artificial Selection and Insights into Parallel Domestication in Cereal Crops. *Front. Plant Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01237>
- Terrier, N., Ageorges, A., Abbal, P., Romieu, C., 2001a. Generation of ESTs from grape berry at various developmental stages. *J. Plant Physiol.* 158, 1575–1583. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00566>
- Terrier, N., Deguilloux, C., Sauvage, F.-X., Martinoia, E., Romieu, C., 1998. Proton pumps and anion transport in *Vitis vinifera*: The inorganic pyrophosphatase plays a predominant role in the energization of the tonoplast. *Plant Physiol. Biochem.* 36, 367–377. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(98\)80078-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80078-8)
- Terrier, N., Glissant, D., Grimplet, J., Barrieu, F., Abbal, P., Couture, C., Ageorges, A., Atanassova, R., Léon, C., Renaudin, J.-P., Dédaldéchamp, F., Romieu, C., Delrot, S., Hamdi, S., 2005. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* 222, 832–847. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0017-y>
- Terrier, N., Romieu, C., 2001. Grape Berry Acidity, in: Roubelakis-Angelakis, K.A. (Ed.), *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 35–57. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2308-4_2
- Terrier, N., Sauvage, F.-X., Ageorges, A., Romieu, C., 2001b. Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. *Planta* 213, 20–28. <https://doi.org/10.1007/s004250000472>
- Terrier, N., Torregrosa, L., Ageorges, A., Vialet, S., Verriès, C., Cheynier, V., Romieu, C., 2009. Ectopic Expression of VvMybPA2 Promotes Proanthocyanidin Biosynthesis in Grapevine and Suggests Additional Targets in the Pathway. *Plant Physiol.* 149, 1028–1041. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131862>
- This, P., Lacombe, T., Cadle-Davidson, M., Owens, C.L., 2007. Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene VvmybA1. *Theor. Appl. Genet.* 114, 723–730. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0472-2>
- Verriès, C., Guiraud, J.-L., Souquet, J.-M., Vialet, S., Terrier, N., Ollé, D., 2008. Validation of an Extraction Method on Whole Pericarp of Grape Berry (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz) to Study Biochemical and Molecular Aspects of Flavan-3-ol Synthesis during Berry Development. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5896–5904. <https://doi.org/10.1021/jf800028k>
- Vidal, S., Cartalade, D., Souquet, J.-M., Fulcrand, H., Cheynier, V., 2002. Changes in Proanthocyanidin Chain Length in Winelike Model Solutions. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2261–2266. <https://doi.org/10.1021/jf011180e>
- Walker, A.R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D.A.J., Thomas, M.R., Robinson, S.P., 2007. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant J.* 49, 772–785. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02997.x>
- Wang, J.-C., Xu, H., Zhu, Y., Liu, Q.-Q., Cai, X.-L., 2013. OsBZIP58, a basic leucine zipper transcription factor, regulates starch biosynthesis in rice endosperm. *J. Exp. Bot.* 64, 3453–3466. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert187>
- Weaver, C.A., Hamaker, B.R., Axtell, J.D., 1998. Discovery of Grain Sorghum Germ Plasm with High Uncooked and Cooked In Vitro Protein Digestibilities. *Cereal Chem.* 75, 665–670. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1998.75.5.665>
- Wehner, N., Hartmann, L., Ehlert, A., Böttner, S., Oñate-Sánchez, L., Dröge-Laser, W., 2011. High-throughput protoplast transactivation (PTA) system for the analysis of Arabidopsis transcription factor function. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 68, 560–569. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04704.x>
- Werner, R.A., Rossmann, A., Schwarz, C., Bacher, A., Schmidt, H.-L., Eisenreich, W., 2004. Biosynthesis of gallic acid in *Rhus typhina*: discrimination between alternative pathways from natural oxygen isotope abundance. *Phytochemistry* 65, 2809–2813. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.020>
- Winkel-Shirley, B., 2001. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiol.* 126, 485–493. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.485>
- Winn, J.A., Mason, R.E., Robbins, A.L., Rooney, W.L., Hays, D.B., 2009. QTL Mapping of a High Protein Digestibility Trait in *Sorghum bicolor*. *Int. J. Plant Genomics* 2009, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2009/471853>
- Wong, J.H., Cai, N., Tanaka, C.K., Vensel, W.H., Hurkman, W.J., Buchanan, B.B., 2004. Thioredoxin Reduction Alters the Solubility of Proteins of Wheat Starchy Endosperm: An Early Event in Cereal Germination. *Plant Cell Physiol.* 45, 407–415. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch044>
- Wu, E., Lenderts, B., Glassman, K., Berezowska-Kaniewska, M., Christensen, H., Asmus, T., Zhen, S., Chu, U., Cho, M.-J., Zhao, Z.-Y., 2014. Optimized Agrobacterium-mediated sorghum transformation protocol and molecular data of transgenic sorghum plants. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 50, 9–18. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9583-z>

- Wu, Y., Yuan, L., Guo, X., Holding, D.R., Messing, J., 2013. Mutation in the seed storage protein kafirin creates a high-value food trait in sorghum. *Nat. Commun.* 4, 2217. <https://doi.org/10.1038/ncomms3217>
- Wu, Y.V., and Wall, J.S., 1980. Lysine content of protein increased by germination of normal and high-lysine sorghums. *J Agric Food Chem.* 28, 455-8.
- Xiong, W., Wang, C., Zhang, X., Yang, Q., Shao, R., Lai, J., Du, C., 2017. Highly interwoven communities of a gene regulatory network unveil topologically important genes for maize seed development. *Plant J.* 92, 1143–1156. <https://doi.org/10.1111/tpj.13750>
- Yamamoto, M.P., Onodera, Y., Touno, S.M., Takaiwa, F., 2006. Synergism between RPBF Dof and RISBZ1 bZIP Activators in the Regulation of Rice Seed Expression Genes. *Plant Physiol.* 141, 1694–1707. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082826>
- Yu, G., Cheng, Q., Xie, Z., Xu, B., Huang, B., Zhao, B., 2017. An efficient protocol for perennial ryegrass mesophyll protoplast isolation and transformation, and its application on interaction study between LpNOL and LpNYC1. *Plant Methods* 13, 46. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0196-0>
- Yu, K., Jun, J.H., Duan, C., Dixon, R.A., 2019. VvLAR1 and VvLAR2 Are Bifunctional Enzymes for Proanthocyanidin Biosynthesis in Grapevine. *Plant Physiol.* 180, 1362–1374. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00447>
- Zerbib, M., Mazaure, J.-P., Meudec, E., Le Guernevé, C., Lepak, A., Nidetzky, B., Cheyner, V., Terrier, N., Saucier, C., 2018. New flavanol O-glycosides in grape and wine. *Food Chem.* 266, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.019>
- Zhang, Z., Yang, J., Wu, Y., 2015. Transcriptional Regulation of Zein Gene Expression in Maize through the Additive and Synergistic Action of opaque2, Prolamine-Box Binding Factor, and O2 Heterodimerizing Proteins. *Plant Cell* 27, 1162–1172. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00035>
- Zhang, Z., Zheng, X., Yang, J., Messing, J., Wu, Y., 2016. Maize endosperm-specific transcription factors O2 and PBF network the regulation of protein and starch synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 10842–10847. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613721113>
- Zhao, J., Pang, Y., Dixon, R.A., 2010. The Mysteries of Proanthocyanidin Transport and Polymerization. *Plant Physiol.* 153, 437–443. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155432>

Tirés à part des principaux travaux scientifiques