

Üzümün Olgunlaşmasında Etkili Olan Transkripsiyon Faktörleri Üzerine Bir Araştırma

Birsen ÇAKIR^{1,2} Rossitza ATANASSOVA³

Geliş tarihi: 30.05.2007

Kabul ediliş tarihi: 25.09.2007

Öz : Olgunlaşma sırasında, üzüm taneleri büyük miktarlarda hekzos biriktirirler (1M). Bu şeker birikimi şeker ve hekzos taşıyıcılarının aktivitesini gerektirir. Ben düşmeden önce ve sonra ekspresyonu ortaya çıkan bir hekzos taşıyıcısını kodlayan cDNA ve genomik klon laboratuvarında daha önceden izole edilmişti. *VvHT1* promotörü, şekerlere cevap veren çeşitli elemanları bulundurmaktadır. Bu çalışmada, *VvHT1* promotörüne bağlanabilecek düzenleyici proteinlerin izolasyonunu tanımlanmıştır. Bunun için, ben düşme aşamasındaki üzümlerden elde edilmiş RNA lardan bir cDNA kütüphanesi hazırlanmıştır. Maya hücrelerinde tek hibrid adı verilen teknik ile transkripsiyon faktörlerini kodlayan dokuz farklı cDNA izole edilmiş ve bu klonlar Genbankasına yatırılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Vitis vinifera*, olgunlaşma, hekzos taşıyıcısı, ekspresyonun düzenlenmesi.

Search of Transcription Factors Involved in Grape Berry Ripening

Abstract: During their ripening, grape berries rapidly accumulate large amounts of hexoses and this rapid accumulation of sugars requires the activity of sucrose and hexoses carriers. A genomic clone (*VvHT1*, *Vitis vinifera* hexose transporter 1) and the corresponding cDNA encoding hexose transporter were isolated previously in our lab. The *VvHT1* promoter sequence contains several sugar responsive elements. To isolate regulatory proteins able to bind to *VvHT1* promoter, a cDNA library was constructed using mRNA from grape berries at the stage of veraison. By a yeast one hybrid system, we obtained nine different cDNAs encoding putative transcription factors that have been submitted to GENBANK.

¹ Araş. Gör. Dr., E.Ü.Z.F. Bornova-İzmir, bircacakir@hotmail.com

² Doctorante, Université de Poitiers, France

³ Prof. Dr., Université de Poitiers, France

Key words : *Vitis vinifera*, hexose transporter, maturation, regulation of expression

Recherche des Facteurs de Transcription Impliqués dans la Maturation de la Baie de Raisin

Introduction

Les baies de raisin étant des fruits nonclimactériques, ils croissent selon une double sigmoïde comme tous les fruits à baie (Coombe, 1973). La division du cycle de développement en 2, 3, ou 4 phases est discutée (Coombe, 1973, 1976, 1980; Blanke, 1992; Kanellis et Roubelakis-Angelakis 1993; Williams 1996). Durant la phase herbacée, on observe une forte accumulation d'acides organiques, notamment d'acides malique et tartrique dans la vacuole des cellules de péricarpe. La véraison qui marque le début de la deuxième phase du développement de la baie correspond à l'induction de la maturation.

La maturation est caractérisée par un ramollissement très rapide de la baie et une forte accumulation de glucose et de fructose, à peu près en quantité équimolaire (1 M), dans les vacuoles des cellules de mésocarpe. On observe aussi une accumulation importante d'acides aminés, de protéines totales et de composés phénoliques (Peyneaud et Ribéreau-Gayon, 1971). Les mécanismes qui sont liés à l'accumulation de ces composés au cours de la maturation sont encore peu connus, bien que des approches moléculaires sur le métabolisme des glucides (Davies et Robinson 1996 ; Fillion 1997 ; Davies et al. 1999; Ageorges et al. 2000) et des acides organiques (Terrier, 1997) soient actuellement développées.

Un clone d'ADNc codant une protéine homologue (appelé *VvHT1* pour *Vitis vinifera hexoses transporter 1*) à un transporteur d'hexoses a été isolé à partir des baies de raisin (cépage Pinot Noir) au stade de la véraison (Fillion et al. 1999). Le clone génomique complet correspondant (cépage Ugni Blanc) contient une région promotrice de 2,5 kb et une séquence génomique de 2,9 kb. Il s'exprime dans les jeunes feuilles, et dans les baies 3-4 semaines avant et après la véraison (Fillion et al. 1999). L'analyse in silico du promoteur a révélé la présence d'éléments *cis*-régulateurs par les glucides (Fillion et al. 1999; Atanassova et al. 2003). Le promoteur entier 2,4 kb contient les quatre motifs potentiels de réponse aux glucides, un

couple SURE1 et « Sucrose Box 3 » situé dans la partie proximale, un autre dans la région distale et deux motifs de répression, appelés *AMYBOX1* et *AMYBOX2*. Les éléments-*cis* intervenant potentiellement dans la régulation par les phytohormones sont nombreux sur le promoteur *VvHTI*.

La régulation de l'expression de *VvHTI* a été étudiée en transformant des cellules de tabac par le gène rapporteur *GUS* sous contrôle de différents fragments de la région promotrice de *VvHTI* (Leterrier, 2002; Atanassova et al. 2003). L'activité du promoteur est induite par le glucose et le saccharose, la kinétine et l'ABA. L'induction du promoteur *pVvHTI* par les analogues de glucides a également été étudiée (Leterrier, 2002). Le palatinose, le mélibiose et le turanose, qui contiennent une moitié glucosyl, induisent l'activité du promoteur *pVvHTI*.

Étant donné qu'aucune protéine régulatrice spécifique des boîtes sucres n'était connue, nous avons donc consacré notre travail au clonage et la caractérisation de facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation de l'expression du promoteur *VvHTI* par les glucides. Dans cette étude, par l'approche de simple hybride, nous avons isolé des ADNc codant des protéines régulatrices impliquées dans la régulation de l'expression du *VvHTI* durant la maturation de la baie de raisin.

Matériels et Methodes

Des baies de raisin

La récolte des baies de raisin à partir du cépage Ugni blanc a été réalisée au Domaine de Peu à Cognac en 1995, au stade de la véraison. Les baies ont été congelées dans de l'azote liquide immédiatement au vignoble, puis conservées à -80°C .

Construction de la banque d'ADNc

Les ARN totaux ont été isolés par la technique du gradient de CsCl (Tesnière et Vayda 1991; Fillion et al. 1999). Les ARNm poly A ont été obtenus après purification sur colonne "Poly (A) Quik mRNA isolation kit" du Stratagene (USA). La banque est construite avec le "SuperScriptTM Plasmid System" de Gibco BRL à partir de 5 μg de messagers poly-A. Le marquage au $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP lors de la synthèse du premier brin a permis le contrôle de l'efficacité à toutes les étapes et l'estimation quantitative des

fractions d'ADNc obtenues par fractionnement sur colonne de filtration du gel (comptage de la radioactivité des différentes fractions par effet Cerenkov). Tous les ADNc de taille supérieure à 600 pb ont été ligaturés comme inserts Sall/NotI dans le plasmide pSPORT1 (Gibco BRL). Le titre de la banque est de l'ordre de 1.5×10^8 et la taille moyenne des inserts est de 1,1 kb. Le sous-clonage des ADNc a été effectué dans le vecteur navette pPC86. Les ADNc de la banque dans le vecteur pSPORT1 ont été extraits par digestion enzymatique Sall/NotI et clonés dans le vecteur navette pPC86 entre les sites de restriction Sall et NotI en aval du gène codant le domaine d'activation du facteur de transcription GAL4 de la levure.

Construction des gènes rapporteurs

Un fragment de 160 pb du promoteur de *VvHT1* (Fillion et al. 1999) a été cloné en amont de deux gènes rapporteurs, *HIS3* et *LacZ*, respectivement dans des vecteurs navettes pYC7 et pSK1. La partie proximale du promoteur *VvHT1* a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces spécifiques (directe, 5'TAGAACGGGGAGTTAGAAACAA-3'; indirecte, 5'AGCTGTCCCCGATAATATCTAA-3') situées en amont des boîtes TATA et CAAT. Ce fragment de 160 pb du promoteur *VvHT1* a été clone dans les sites NotI-SpeI du vecteur navette pSK1 portant un marqueur de sélection +Leu en amont du gène rapporteur *HIS3* sous le contrôle du promoteur minimale *GALI*. Pour la deuxième construction du gène rapporteur, le fragment de 160 pb du promoteur a été cloné entre les sites SpeI-EcoRI dans le vecteur intermédiaire pcDNAII (Invitrogen, San Diego, CA). Ensuite, ce fragment a été inséré entre les sites KpnI-XhoI dans le vecteur pYC7 portant un marqueur de sélection +Ura en amont du gène rapporteur *LacZ* sous le contrôle du promoteur minimale *CYC1*.

Technique de simple hybride

Les levures YM954 ont été transformées avec 5 µg de minipréparation d'ADN plasmidique brut correspondant aux plasmids navettes pSK1 portant le gène rapporteur *HIS3* et pYC7 portant le gène rapporteur *LacZ* selon la technique de transformation utilisée par Geitz et Woods (1993).

Les cellules co-transformées avec les deux gènes rapporteurs ont été utilisées pour la transformation avec 4 µg de la banque d'ADNc

(pPC86 portant les ADNc et le marqueur de sélection -trp). Une double sélection a été réalisée pour le criblage des clones positifs (Kim et al. 1997). Les colonies ayant poussé sur milieu sélectif (-leu-ura-trp-his) ont subi une deuxième sélection par le test d'activité enzymatique de la β -galactosidase (Breedon et Nasmyth 1985). L'ADN plasmidique de chaque clone de levure a été isolé et utilisé pour la transformation des bactéries DH5 α par électroporation (Hoffman et Winston 1987). Les colonies bactériennes ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose pour être incubées avec la sonde radioactive, spécifique au domaine d'activation Gal4. Les colonies positifs ont été révélés par l'exposition sur un film autoradiographique.

Les réactions de séquençage ont été réalisées par la société Eurogentec selon une technique dérivée de la méthode décrite par Sanger et al. (1977). Les comparaisons des séquences avec les banques de données ont été réalisées avec le programme BLAST (Altschul et al. 1997).

Resultats

Isolement et Caractérisation des Clones Positifs

Les levures transformées portant les deux gènes rapporteurs, pYC7 et pSK1 et la banque d'ADNc dans le vecteur pPC86, sélectionnées sur milieu sélectif (-Ura-Leu-Trp-His) sont transférées sur des filtres pour la deuxième sélection par le test d'activité enzymatique de la β -galactosidase. Nous avons obtenu 126 colonies bleues sur 227 clones positifs issus de la sélection génétique sur milieu sans histidine (Fig. 1). Ainsi, cette double sélection nous a permis d'éliminer un nombre important de faux positifs.

L'ADN plasmidique de chaque clone de levure a été isolé selon la technique décrite par Hoffman et Winston (1987). Ensuite, les ADN plasmidiques ont subi deux digestions enzymatiques différentes (NotI/SalI et HindIII), afin de trouver les colonies présentant le profil de restriction de pPC86. Les inserts d'ADNc obtenus ont été clonés dans le vecteur pKS, entre les sites de restriction SalI et NotI afin d'être séquencés. Nous avons isolé plus de 60 clones dans le plasmide pPC86. Après établissement de profil de restriction et séquençage de ces clones isolés, 20 ADNc différents ont été retenus. Dans certains cas, plusieurs clones positifs correspondaient au même ADNc, par exemple quatre clones portant l'ADNc de l'histone H3.3.



Fig. 1 : Sélection des clones positifs par l'activité β -galactosidase. Le gène *LacZ* dans le vecteur navette pYC7 sous le contrôle de son propre promoteur minimal *CYCI* code une protéine β -galactosidase. Lorsque la protéine codée par l'ADNc de la banque d'expression reconnaît le promoteur *VvHTI* devant le gène *lacZ*, le facteur de transcription chimérique GAL4 induit le promoteur minimale *CYCI* et l'expression du gène *LacZ* est déclenchée. Les colonies exprimant cette enzyme deviennent bleues en présence de son substrat X-gal.

La levure de la souche YM954 a été retransformée avec chacun de ces ADNc afin de vérifier la spécificité de l'interaction entre les protéines codées par chacun de ces ADNc et le fragment de 160 pb. Le test de l'activité de la β -galactosidase effectué sur les transformants a permis de confirmer la spécificité de l'interaction entre les protéines codées et le promoteur cible. Enfin, tous les clones sont devenus bleues (Fig. 2; 1). Ces résultats confirment ces clones positifs contiennent des ADNc codant des protéines capables d'interagir directement avec le fragment de 160 pb du *pVvHTI*.

Enfin, une dernière vérification a été réalisée en transformant la souche YN954 avec les gènes rapporteurs pSK1 et pYC7 portant les promoteurs minimaux *CYCI* et *GALI*. Ces deux vecteurs-navettes ne contiennent pas de fragment de 160 pb du *pVvHTI*. Pour sept d'entre eux (44B, 47A, 96B3, 49B, 72F, 60B, 63c1) que nous avons testés par ce moyen, il n'y a pas eu de transformants sur milieu sélectif (YNB-Ura-Trp-Leu-His) (Fig. 2; 2, 3) sauf pour 63c1. Nous avons observé quelques transformants pour ce clone.

Caractérisation des ADNc isolés par l'approche de simple hybride

La comparaison de la séquence nucléotidique et de la séquence protéique déduite et de chacun des 20 ADNc avec les banques de données par Blast (NCBI) a permis de leur assigner une fonction potentielle. Seize des ADNc identifiés par la technique de simple hybride présentent des homologies de séquences soit avec des protéines régulatrices connues, soit avec des protéines de fonction inconnue chez d'autres végétaux.

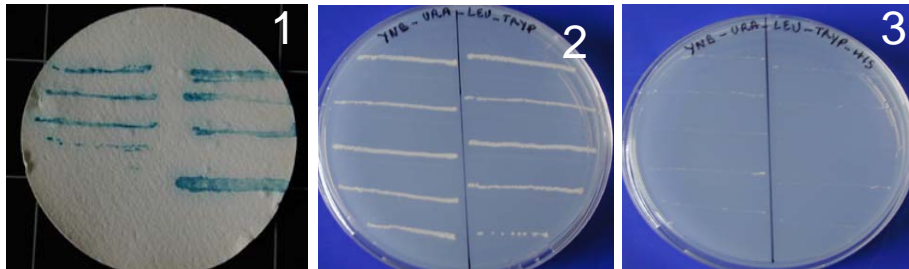


Fig. 2 : Vérification de la spécificité de fixation des clones positifs isolés par l'approche de simple hybride sur le *pVvHTI*. 1. la souche YN954 de levure a été retransformée avec les clones positifs isolés par simple hybride et les transformants ayant poussé sur milieu sans His ont subi une deuxième sélection par l'activité β -galactosidase. 2. souche rapporteuse portant les gènes rapporteurs *His 3* et *LacZ* sous le contrôle des promoteurs minimaux (sans *pVvHTI*), transformée avec le clone positif 72F sur un milieu -Trp-Ura-Leu+His (témoin positif). 3. souche rapporteuse portant les gènes rapporteurs *His 3* et *LacZ* sous le contrôle des promoteurs minimaux (sans *pVvHTI*), transformée avec le clone positif 72F sur un milieu -Trp-Ura-Leu- (témoin négatif).

Plusieurs clones d'ADNc (2D, 19A, 63b2, 63c1) possèdent des similitudes importantes avec les variants d'histone H3.3 de différentes espèces végétales. Parmi eux, un clone d'ADNc (63c1) séquencé en entier partage 86 % d'homologies au niveau nucléotidique avec des gènes codant pour des variants d'histones H3.3 isolés de *Lycopersicon esculentum* et de *Gossypium hirsutum*. Le clone complet est soumis dans les banques de données sous le numéro d'accès AF501624.

Une séquence complète (96B3) codant une protéine qui présente 87 % d'homologie au niveau protéique avec une protéine sérine/thréonine kinase d'*A. thaliana* (numéro d'accès AF 488697) a été obtenue.

Un autre clone complet (44B1) montre 64 % d'homologie au niveau protéique avec une protéine appelé IAA9 de tabac appartenant à la famille Aux/IAA et 82% d'homologie au niveau nucléotidique avec IAA2 de *Cucumis sativus* (numero d'accension : AFY082522).

Un clone d'ADNc (47A) complet code une protéine présentant 94 % d'homologie de séquence nucléotidique avec une séquence partielle appelé GASR de *Vitis vinifera* codant pour une protéine induite par le stress, la maturation et l'ABA. Cette protéine appartient à la famille de protéines ASR trouvées dans différentes espèces végétales (tomate, pêche, citrus, pin, riz, maïs) dont la fonction n'est pas connue. Les protéines ASR de la Tomate sont supposées être nucléaires et se fixer sur l'ADN (Gilad *et al.*, 1997).

Un autre clone (49B) code pour une protéine qui présente 87 % d'homologie au niveau protéique avec une protéine riche en glycine se fixant sur l'ARN (GR-RNP) de soja (*Glycine max*). Les protéines riches en glycine seraient impliquées dans l'épissage des ARN prémessagers ou l'épissage alternatif dans le noyau, et le contrôle de la traduction des ARNm dans le cytoplasme (Birney *et al.*, 1993).

En revanche, pour quatre ADNc (40 E1, 88 E3, 1B3, 3B1) complets isolés par l'approche de simple hybride, aucune fonction n'a pu être attribuée. En effet, la comparaison par BLAST dans les banques de données révèle majoritairement des homologies de séquence avec de protéines de fonction inconnue d'*A. thaliana*. Pour trois d'entre eux (40 E1, 1B3, 3B1) sont soumis dans les banques de données sous les numeros AF501623, AF501621, AF501622. Nous avons aussi isolé d'autres clones d'ADNc non complets, présentant des homologies de séquence avec des facteurs de transcription du type MADS-box, en doigts à zinc et MYB.

Un clone incomplet (60B) présentant 80 % d'homologies de séquence au niveau protéique avec un transporteur ABC d'*A. thaliana* et un autre clone de l'ADNc entier (72F) correspondant à un gène codant une glutathion-S-transférase ont été isolé et déposé dans les banques de données (numéros d'accension : AF488698 pour 60B et AF501625 pour 72F).

Discussion

L'approche de simple hybride permet d'isoler de nouveaux gènes codant des facteurs de transcription susceptibles de se fixer sur les éléments *cis* régulateurs des promoteurs de leurs gènes cibles. Un fragment de 160 pb du *pVvHTI* portant deux séquences de réponse positive au saccharose nous a permis d'isoler plusieurs ADNc codant des protéines (96B3, 44B, 122, 111, 102, 49B, 39A 63c1, 47A) présentant de fortes homologies avec les protéines régulatrices déjà connues dans d'autres végétaux. Quatre d'entre eux (96B3, 44B, 63c1, 47A) qui ont des séquences complètes ont été déposées dans les banques de données (Tableau 1).

<i>clones</i>	<i>Numéro d'accension</i>	<i>Meilleuer homologues</i>	<i>identité</i>
63c1	AF501624	Variant d'histone (H3.3 de <i>Gossypiumhirsutum</i>)	86 %
60B	AF488698	Transporteur ABC d' <i>A. thaliana</i>	80%
72F	AF501625	Glutathion-S-transférase de <i>Glycine max</i>	81%
47A	AF281656	GASR (<i>Vitis vinifera</i> ripening protein)	94 %
44B1	AFY08222	Protéine IAA2 de <i>Cucumis sativa</i>	82 %
96B3	AF488697	Protéine sérine/thréonine kinase d' <i>A. thaliana</i>	87 %
40E1	AF501623	Protéine de fonction inconnue d' <i>A. thaliana</i>	76%
1B3	AF501621	Protéine de fonction inconnue d' <i>A. thaliana</i> .	74%
3B1	AF501622	Protéine de fonction inconnue d' <i>A. thaliana</i>	53%

Tableau 1 : Les ADNc isolés par la technique de simple hybride présentant des homologies de séquence avec des gènes codant des protéines régulatrices et de fonction inconnue. Les homologies de séquence des ADNc isolés ont été analysées par BLAST à partir du National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA).

Un ADNc complet (44B) présente une forte homologie avec IAA9 de Tabac, de la famille des protéines régulatrices Aux/IAA. Ces protéines sont régulées par l'auxine et l'auxine stimule la dégradation rapide des protéines Aux/IAA par l'interaction avec le complexe SCF^{TIR1} chez *A. thaliana*. Les protéines Aux/IAA doivent être polyubiquitinylées pour devenir cibles du protéasome 26S. Cette étape d'ubiquitylation est réalisée par les protéines ubiquitine ligases (E1, E2, E3) conjuguées aux ubiquitines. Les enzymes E3 de différentes classes ont été identifiées chez les eucaryotes (Deshaies 1999; Voges et al. 1999; Xiao et Jang 2000).

Parmi elles, le complexe SCF multiprotéique composé d'au moins quatre sous-unités a été isolé chez la levure, les animaux et les végétaux (Mathias et al. 1996; Ruegger et al. 1998). Ce complexe (SCF^{Grr1}) chez la levure est responsable de l'induction de l'expression des transporteurs d'hexoses en réponse au glucose (Bernard et Andre, 2001). De plus, les interactions entre Grr1 et Skp1 du complexe SCF^{Grr1} de levure sont aussi régulées par le glucose (Li et Johnston 1997). Les protéines cibles pour le protéasome 26S, y compris les protéines Aux/IAA, subissent une modification post-traductionnelle comme la phosphorylation avant d'être ubiquitinylées. Le rôle des protéines kinases dans la signalisation par les auxines chez *A. thaliana* a été déjà évoqué (Mockaitis et Howell 2000). Si la phosphorylation est nécessaire à l'interaction avec le complexe SCF^{TIR1}, il est possible que cette étape puisse être assurée par d'autres protéines adaptatrices qui sont phosphorylables (Kepinski et Leyser 2002). Parmi les clones positifs, l'existence d'un ADNc (96B3) présentant une forte homologie avec la protéine sérine/thréonine kinase d'*A. thaliana* nous permet de supposer qu'il pourrait jouer un rôle dans la phosphorylation soit de la protéine (44B) Aux/IAA, soit d'autres facteurs hypothétiques isolés, notamment *VvMSA* (47A) qui contient des sites de phosphorylation potentiels.

Un autre clone complet (63c1) isolé par la technique du simple hybride, présentant des homologies avec le variant d'histone H3.3 de la Tomate, peut aussi être impliqué dans la régulation de l'expression du gène *VvHT1*. L'acétylation de résidus de lysine, situés à l'extrémité N-terminale des protéines d'histones permet de neutraliser leur charge positive et ainsi leur affinité pour l'ADN devient faible (Hong et al. 1993). Par conséquent, l'acétylation des histones affecte la conformation des nucléosomes (Norton et al. 1989), ce qui favorise l'accès des protéines régulatrices à l'ADN (Lee et al. 1993; Vettese-Dadey et al. 1996). De plus, les transcrits de l'histone H3 sont positivement régulés par le saccharose dans des suspensions cellulaires du riz (Ho et al. 2001).

Bien que nous ayons effectué une double sélection pour minimiser les faux positifs, nous avons aussi isolé des ADNc partageant des homologies avec d'autres protéines qui n'ont pas de fonction régulatrice. L'utilisation du fragment de 160 pb de la partie proximale du promoteur *VvHT1*, une taille qui est à la limite supérieure des séquences appâts

utilisées en simple hybride, peut expliquer le nombre important de clones positifs.

Parmi les clones isolés à l'aide de l'approche de simple hybride, notre travail a été focalisé sur un clone d'ADNc codant une protéine induite par l'ABA, le stress et la maturation, appelée *VvMSA* (pour *Vitis vinifera* Maturation, Stress, ABA). Nous avons attribué une fonction plus précise au *VvMSA* (un membre de la famille ASR) en tant que protéine régulatrice de l'expression de gènes impliqués dans le transport ou bien la signalisation des sucres (Cakir et al. 2003). En ce qui concerne d'autres clones positifs isolés par l'approche de simple hybride et déposés dans les banques de données, il serait intéressant d'étudier leurs interactions avec le promoteur *VvHT1*.

Résumé

Au cours de la maturation, des baies de raisin accumulent une forte quantité d'hexoses. Cette accumulation requiert l'activité des transporteurs de saccharose et d'hexoses. Le clone génomique et l'ADNc correspondant codant un transporteur d'hexoses (*VvHT1*, *Vitis vinifera* hexose transporter 1) a été déjà isolé au laboratoire. Le promoteur du *VvHT1* contient des éléments de réponse par les sucres. Pour isoler des facteurs de transcription capable de se fixer sur le promoteur du *VvHT1*, une banque d'ADNc a été construite à partir des ARNm de baies de raisin au stade de la véraison. Par l'approche de simple hybride, neuf ADNc codant des facteurs de transcription hypothétiques ont été isolés et déposés dans les banques de données.

Mots-clés : *Vitis vinifera*, maturation, transporteur d'hexoses, régulation de l'expression

References

- Ageorges, A., N. Issaly, S. Picaud, and S. Delrot. 2000. Characterization of an active sucrose transporter gene expressed during the ripening of grape berry (*Vitis vinifera* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 38, 177-185.
- Altschul S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389 - 3402.
- Atanassova, R., M. Leterrier, C. Gaillard, A. Agasse, E. Sagot, P. Coutos-Thévenot, and S. Delrot. 2003. Sugar-Regulated Expression of a Putative Hexose Transport Gene in Grape. *Plant Physiology*, 131: 326.
- Bernard F. and B Andre. 2001. Ubiquitin and the SCF(Grr1) ubiquitin ligase complex are involved in the signalling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 496(2-3): 81-5.

- Birney E., S. Kumar, and R. Krainer Adrian. 1993. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res.*, 21: 5803 - 5816.
- Blanke, M. M. 1992. Carbon economy of the grape inflorescence : 8. Lag phase during berry growth-fact or artefact. *Vitic. Enol. Sci.* 47, 112-115.
- Breeden, L. and K Nasmyth. 1985. Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 50: 643-50.
- Coombe, B. G. 1973. Regulation of set and development of the grape berry. *Acta Horticulturæ* 34, 261-269.
- Coombe, B. G. 1976. The development of fleshy fruits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27, 207-228.
- Coombe, B. G. 1980. Development of the grape berry. I. Effect of the time of flowering and competition. *Aust. J. of Agricultural Research* 31, 125-131.
- Çakır B., A. Agasse, C. Gaillard, A. Saumonneau, S. Delrot, and R. Atanassova. 2003. A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Abscisic Acid Signaling. *Plant Cell*, 15: 2165.
- Davies, C. and S. P. Robinson. 1996. Sugar Accumulation in Grape Berries (Cloning of Two Putative Vacuolar Invertase cDNAs and Their Expression in Grapevine Tissues. *Plant Physiology*, 111: 275.
- Davies, C., P. K. Boss, and S. P. Robinson. 1997. Treatment of Grape Berries, a Nonclimacteric Fruit with a Synthetic Auxin, Retards Ripening and Alters the Expression of Developmentally Regulated Genes. *Plant Physiology*, 115: 1155.
- Davies, C., Wolf, T. and Robinson, S. P. 1999. Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues. *Plant Science* 147, 93-100.
- Dessaies, R. J. 1999. SCF and Cullin/RING-H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 435-467.
- Fillion L., A. Ageorges, S. Picaud, P. Coutos-Thévenot, R. Lemoine, C. Romieu, and S. Delrot. 1999. Cloning and Expression of a Hexose Transporter Gene Expressed during the Ripening of Grape Berry. *Plant Physiology*, 120: 1083.
- Geitz, R. D. and R. A. Woods, 1993. Highly efficiency transformation with lithium acetate. In *Molecular Genetics of Yeast: A practical approach* (Johnston, J. R. ed.). Oxford IRL Press, 121-134.
- Gilad, A., H. Amitai-Zeigerson, D. Bar-Zvi, and P. A. Scolnik. 1997. ASR1, a tomato water-stress regulated gene : genomic organization, developmental regulation and DNA binding activity. *Acta Hortica.* 447, 441-453.
- Ho S-L., C. Yu-Chan, T. Wu-Fu, and Y. Su-May. 2001. Sugar Coordinately and Differentially Regulates Growth- and Stress-Related Gene Expression via a Complex Signal Transduction Network and Multiple Control Mechanisms. *Plant Physiology*, 125: 877.
- Hoffman, C.S. and F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3): 267-72.
- Hong, L., G.P. Schroth, H.R. Matthews, P. Yau, and E.M. Bradbury 1993. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation

- studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J. Biol. Chem.*, 268: 305 - 314.
- Kanellis, A. K. and K. A. Roubelakis-Angelakis, 1993. Grape. In *Biochemistry of Fruit Ripening*. Eds : Seymour, G., Taylor, J. and Tucker, G. Chapman et Hall, Londres, 198-234.
- Kepinski S. and O. Leyser. 2002. Ubiquitination and Auxin Signaling: A Degrading Story. *Plant Cell*, 14: 81.
- Kim, S.Y., H.J. Chung, and T.L. Thomas. 1997. Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J*, 11(6): 1237-51.
- Lee, D.Y., J.J. Hayes, D. Pruss and A.P. Wolffe 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, 72(1): 73-84.
- Letierrier M., R. Atanassova, L. Laquitaine, C. Gaillard, P. Coutos-Thévenot, and S. Delrot. 2003. Expression of a putative grapevine hexose transporter in tobacco alters morphogenesis and assimilate partitioning. *J. Exp. Bot.*, 54: 1193 - 1204.
- Li, F.N. and M Johnston. 1997. Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J*, 16(18): 5629-38.
- Mathias, N., S. Johnson, B. Byers and M. G. Goeble. 1996. The abundance of cell cycle regulatory protein Cdc4p is controlled by interactions between its F box and Skp1P. *Mol Biol. Cell* 19, 1759-1767.
- Mockaitis, K. and SH Howell. 2000. Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J*, 24(6): 785-96.
- Norton, V.G., B.S. Imai, P. Yau, and E.M. Bradbury. 1989. Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell*, 57(3): 449-57.
- Peyneaud, E. and Ribéreau-Gayon, P. 1971. The grape. In *The Biochemistry of fruits and their products*, Vol 2 ed. Hulme A. C., Academic Press, London, 179-205.
- Ruegger, M., Elizabeth D., William M. Gray, Lawrence H., Jocelyn T., and Mark E. 1998. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes & Dev.*, 12: 198
- Sanger F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *PNAS*, 74: 5463 - 5467.
- Terrier, N. 1997. Aspects bioenergetiques et moléculaires du stockage des acides organiques dans la baie de raisin (*Vitis vinifera* L.). These « Science des Aliments », Ecole nationale supérieure Agronomique de Montpellier.
- Tesnière, C. and M. E. Vayada. 1991. Method for the isolation of high-quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9, 242-251.
- Vettese-Dadey, M., P.A. Grant, T.R. Hebbes, C. Crane- Robinson, C.D. Allis and J.L. Workman. 1996. Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO J*, 15(10): 2508-18.

- Voges, D., P. Zwickl, and W. Baumeister. 1999. The 26S proteasome : molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 1015-1068.
- Williams, L. E. 1996. Grape. In *Photoassimilates distribution in plants and crops. Source-sink*. Zamski, E. and Scaffer, A. A. Eds. Marcel dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, 851-881.
- Xiao W. and J. Jang. 2000. F-box proteins in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*, 5(11): 454-7.