



HAL
open science

**Effet du statut azoté de la vigne sur le potentiel
aromatique de la baie de raisin et l'arôme du vin :
Approches agronomique, analytique et transcriptomique**

Pierre Helwi

► **To cite this version:**

Pierre Helwi. Effet du statut azoté de la vigne sur le potentiel aromatique de la baie de raisin et l'arôme du vin : Approches agronomique, analytique et transcriptomique. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0246 . tel-01452511

HAL Id: tel-01452511

<https://theses.hal.science/tel-01452511>

Submitted on 2 Feb 2017

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ ŒNOLOGIE

Par **Pierre HELWI**

**Effet du statut azoté de la vigne sur le potentiel aromatique
de la baie de raisin et l'arôme du vin**
Approches agronomique, analytique et transcriptomique

Sous la direction du Pr. Cornelis VAN LEEUWEN

Soutenue le 26 novembre 2015

Membres du jury :

M. Grant CRAMER
M. Ziya GUNATA
M. Vivian ZUFFEREY
Mme. Doris RAUHUT
Mme. Cécile THIBON
M. Cornelis VAN LEEUWEN

Professeur, Université de Nevada
Professeur, Université de Montpellier
Docteur, Institut de recherche Agroscope
Professeur, Université de Geisenheim
Docteur, Université de Bordeaux
Professeur, Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur

Je remercie Grant Cramer, professeur de l'université de Nevada pour avoir présidé le jury de thèse.

Je tiens à remercier Ziya Gunata, professeur de l'université de Montpellier et Vivian Zufferey, docteur de l'institut de recherche Agroscope d'avoir pris le temps de juger ce travail.

Mes remerciements vont également à Doris Rauhut, professeur de l'université de Geisenheim et Cécile Thibon, docteur de l'université de Bordeaux de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Ce projet de thèse est le résultat d'un travail effectué au sein de l'équipe Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne, coordonnée par Serge Delrot, professeur de l'université de Bordeaux, en étroite collaboration avec l'équipe d'œnologie, coordonnée par Philippe Darriet, professeur de l'université de Bordeaux. Je les remercie infiniment de m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires, de leurs confiances et de leurs supports.

J'adresse particulièrement toute ma gratitude à Kees van Leeuwen, professeur de l'université de Bordeaux !

Kees, merci de m'avoir encadré durant ces trois années de thèse. Merci pour tes conseils avisés, tes encouragements et la confiance que tu m'as accordé. Tes connaissances et ta passion pour la vigne et le vin ont rendu possible l'aboutissement de ce travail. Réaliser ce projet avec toi a été une excellente expérience au niveau professionnel et personnel. Merci !

Je remercie vivement Sabine Guillaumie, docteur de l'université de Bordeaux, pour son aide précieuse, ses conseils et son soutien durant les analyses transcriptomiques. Sabine, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et tes remarques pertinentes. Cela a été un véritable plaisir de travailler ensemble !

Je remercie sincèrement Cécile Thibon, docteur de l'université de Bordeaux, pour ses conseils, sa disponibilité ainsi que pour ses encouragements. Merci pour nos fréquents échanges et nos multiples discussions qui m'ont beaucoup apporté. Cécile, je te remercie tout particulièrement pour ton amitié, ça compte beaucoup pour moi !

J'adresse également mes remerciements à Ghislaine Hilbert et Eric Gomès pour leur étroite contribution à ce projet. Votre aide et votre disponibilité m'ont été précieuses.

Je remercie toute les personnes de l'EGFV. Merci pour chaque souvenir que vous avez laissé en moi. Merci pour votre soutien, scientifique et amical. Merci Christel, Zhanwu, David, Fatma, Virginie, Jean-Philippe, Laure et Nathalie. Je remercie également l'équipe technique

pour son aide : Bernard, Claude, Martine, Cyril, Nicolas, Messa, Jean-Pascal, Jean-Paul, Jean-Pierre et Guillaume. Merci également aux Catherine pour leur aide administratif.

Egalement, merci à l'équipe d'œnologie : Warren, Philippe, Pascaline, Sophie et tous les autres.

J'adresse également mes sincères remerciements à l'équipe du Service Interprofessionnel de Conseil Agronomique, de Vinification et d'Analyses du Centre (SICAVAC), à l'équipe de l'unité expérimentale de l'INRA, aux personnels du Château Couhins, du domaine Fontaine d'Audon et du domaine Henri Bourgeois. Merci pour votre précieuse collaboration et pour votre professionnalisme.

Je tiens à remercier tous les étudiants, qui au cours de leurs stages, ont contribué à l'avancement de ces travaux. Laure, Kléo, Paul, Manon, Eloïse, Stelina, Fanny, Etienne, Anne-Lise, Suzanne, Louis et Matthieu, merci beaucoup !

J'adresse mes sincères remerciements à l'équipe du « Wine, Food and Molecular Biosciences département » de l'Université de Lincoln et l'équipe du « Marlborough Wine Research Center » à Blenheim, particulièrement à Brian Jordan, Scott Gregan et Mike Trought. Mon séjour en Nouvelle-Zélande restera un excellent souvenir pour l'éternel.

Je remercie profondément l'équipe MRGM avec qui j'ai passé des moments inoubliables.

Une pensée particulière à Aude, Roberta, Noé, Landry, Guillaume, Isabelle, Antoine, Maria José, Julien, Eric, Mariam et Johann pour les moments sympathiques qu'on a passé ensemble et pour vos encouragements.

Enfin, pour tous ceux avec qui j'ai partagé des souvenirs impérissables : Liliane, Maroun, Talia, Georges, Nicolas, Stéphane, Sami, Bernard, Jacqueline, Julie, Elsa et tous les autres. Pour leur support, leur générosité et leur amitié : Merci !

Pour leur confiance en moi,

Pour leur présence et leur soutien,

A ma famille.

*"Moi aussi, je suis une vigne et mon fruit sera cueilli pour le pressoir..."
Et en hiver, lorsque vous tirez le vin, que s'élève en votre cœur un chant pour
chaque coupe ; Et qu'il y ait dans ce chant une pensée pour les jours
d'automne, et pour la vigne, et pour le pressoir.*

Gibran Khalil Gibran

RESUME

Effet du statut azoté de la vigne sur le potentiel aromatique de la baie de raisin et l'arôme du vin Approches agronomique, analytique et transcriptomique

La composition minérale du sol influence la physiologie de la vigne, le potentiel qualitatif des baies et la qualité du vin. Parmi les éléments que la vigne prélève du sol, l'azote impacte son développement, la composition des baies ainsi que la synthèse de certains métabolites secondaires. Son effet peut être direct sur la voie métabolique, ou indirecte par exemple à travers une modification de la vigueur de la vigne. Le présent travail s'intéresse à un possible effet direct de l'azote sur la synthèse des thiols volatils, en particulier le 3SH (3-sulfanylhexan-1-ol) à l'odeur de pamplemousse et ses précurseurs (Glut-3SH et Cys-3SH), ainsi que l'IBMP (3-isobutyl-2-méthoxypyrazine) à l'odeur de poivron vert, en absence d'une contrainte hydrique et d'une modification de la vigueur des ceps.

La vigne a été étudiée en faisant varier le statut azoté, en conditions contrôlées et en plein champ. Cependant l'état hydrique et la vigueur ont été similaires entre les modalités. Une augmentation de la teneur en Glut-3SH dans les baies et les moûts ainsi que du contenu en 3SH dans le vin a été observée en réponse à une augmentation de l'alimentation en azote. En revanche, aucun effet n'a été perçu sur la teneur en Cys-3SH, ni sur l'expression de *VviGST3*, *VviGST4* et *VviGGT* de sa voie de synthèse. Cette observation semble montrer qu'en réponse à l'azote, le 3SH est synthétisé à partir du Glut-3SH, indépendamment du Cys-3SH et des trois gènes mentionnés. De nouveaux gènes candidats de la voie de biosynthèse des précurseurs du 3SH ont été identifiés par séquençage d'ARN.

Le statut azoté de la vigne n'a pas influencé la teneur en IBMP, ni l'expression de *VviOMT3* et *VviOMT4*, gènes clés de sa voie de biosynthèse. L'effet de N sur l'IBMP décrit précédemment est probablement indirect et dû à une modification du microclimat dans la zone de la grappe, induite par une vigueur plus forte des vignes ayant un statut azoté élevé.

MOTS-CLES: Azote, *Vitis vinifera*, baie de raisin, vin, arômes, 3-sulfanylhexan-1-ol, 3SH, précurseurs du 3SH, *VviGST*, *VviGGT*, 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine, IBMP, *VviOMT*.

ABSTRACT

Effect of vine nitrogen status on grape berries aromatic potential and wine aroma Agronomic, analytic and transcriptomic approaches

Soil is a major component of the viticultural terroir. Its mineral composition influences vine physiology, berry quality potential and wine quality. Among the elements that vines pick up from the soil, nitrogen (N) has the strongest impact on vine physiology, berry composition and the synthesis of compounds that have an important sensory impact. This study has investigated a possible direct effect of N on the synthesis of volatile thiols i.e. 3SH (3-sulfanylhexas-1-ol) responsible for grapefruit aroma and its *S*-conjugates precursors (Glut-3SH and Cys-3SH), as well as IBMP (3-isobutyl-2-methoxypyrazine) responsible for green pepper aroma, without interference with water status and vigor variations.

Vines were grown under variable N status in controlled conditions and in field trials. Water status was controlled during the season and vine vigor was similar among treatments. N supply increased Glut-3SH level in berries and in must and 3SH content in wines. In contrast, no effect of N was perceived on Cys-3SH concentration and on the expression of *VviGST3*, *VviGST4* and *VviGGT* genes, which play a major role in its biosynthetic pathway. This observation indicates that, in response to N supply, 3SH could be synthesized from Glut-3SH, independently from Cys-3SH and the three mentioned genes. New candidate genes from the 3SH precursors pathway were also identified by whole transcriptome shotgun sequencing.

There was no significant effect of vine N status on IBMP levels in berries, musts and wines, neither on the expression of *VviOMT3* and *VviOMT4*, which are key genes in the biosynthetic pathway of IBMP. This result indicates that when an effect of N on IBMP was found in previous studies, it was likely mediated through the modification of bunch-zone microclimate, induced by the increased vigor of high N-status vines.

KEYWORDS: Nitrogen, *Vitis vinifera*, grape berries, wine, aroma compounds, 3-sulfanylhexas-1-ol, 3SH, precursors, *VviGST*, *VviGGT*, 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, IBMP, *VviOMT*.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	19
INTRODUCTION GENERALE	21
A. Terroir viticole	23
A.1. Composante climat du terroir viticole	24
A.1.1. Température et rayonnement	25
A.1.2. Régime hydrique de la vigne	26
A.2. Composante sol du terroir viticole	28
A.2.1. Température du sol	28
A.2.2. Couleur du sol	29
A.2.3. Type et texture du sol.....	29
A.2.4. Réserve en eau	30
A.2.5. Composition minérale du sol.....	30
A.2.6. Matière organique du sol.....	31
A.2.7. Macro et micro-organismes du sol.....	31
A.3. Rôle du matériel végétal dans l'expression du terroir viticole	31
A.4. Facteur humain	32
B. L'azote	34
B.1. Azote du sol.....	34
B.2. Cycle de l'azote au cours du développement	36
B.2.1. Réserve en azote	36
B.2.2. Absorption et assimilation.....	37
B.2.3. Transport et remobilisation	39
B.3. Dynamique et localisation de l'azote dans la baie	39
B.4. Fertilisation azotée et son impact sur la vigne	40

B.5. Statut azoté et effet sur le développement de la vigne et la composition du raisin	40
C. Arômes du vin	42
C.1. Les arômes variétaux libres	43
C.1.1. Les méthoxypyrazines : structure et composante aromatique	43
C.1.2. IBMP ou 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine	44
C.1.2. Voie de biosynthèse de l'IBMP	45
C.1.3. Accumulation de l'IBMP dans la baie	45
C.2. Les thiols volatils du vin	47
C.2.1. Caractéristiques et identification des thiols volatils	47
C.2.2. Origine des thiols volatils	48
C.2.2.1. Notion de retour aromatique et potentiel aromatique	48
C.2.2.2. Biosynthèse des précurseurs d'arômes dans la baie	50
C.2.2.3. Révélation du potentiel aromatique au cours de la fermentation alcoolique	52
C.2.2.4. Accumulation des précurseurs au cours de la maturation	52
C.2.3. Elevage et réactivité des thiols volatils	53
C.2.3.1. Le dioxyde de soufre (SO ₂)	53
C.2.3.2. Glutathion (GSH)	53
D. Effet de l'azote sur la teneur en composés aromatiques	55
OBJECTIFS	59
RESULTATS	61
ARTICLE I	63
Vine nitrogen status does not have a direct impact on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and wines	67

ARTICLE II -----	99
To a better understanding of the impact of vine nitrogen status on volatile thiols from plot to transcriptome level -----	103
ARTICLE III -----	139
Effect of vine nitrogen status, grapevine variety and rootstock on the levels of berry S-glutathionylated and S-cysteinylated precursors of 3-sulfanylhexan-1-ol -----	143
ARTICLE IV -----	163
Modification of berry metabolism through transcriptome reprogramming of grapevine (<i>Vitis vinifera</i> cv. Sauvignon blanc and Cabernet-Sauvignon) in response to nitrogen supply -----	167
CONCLUSION ET PERSPECTIVES -----	195
ANNEXES -----	205
Fosses pédologiques-----	207
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	229

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Interaction entre les différentes composantes du terroir viticole	24
Figure 2. Echanges de l'azote entre le sol et la vigne et remobilisation au cours du développement de la vigne	36
Figure 3. Dynamique de l'absorption de l'azote par la vigne au cours de la saison	37
Figure 4. Les différentes voies d'assimilation de l'azote par la vigne	38
Figure 5. Les méthoxypyrazines présentes dans la baie de raisin.....	44
Figure 6. Voie de biosynthèse de l'IBMP dans la baie de raisin.....	45
Figure 7. Localisation de certains métabolites primaires (sucres et acides organiques) et secondaires (IBMP, précurseurs du 3SH, polyphénols, terpènes et norisoprenoïdes) dans la baie de raisin.....	47
Figure 8. Les trois thiols volatils majeurs et leurs précurseurs cystéinylés et glutathionylés.....	50
Figure 9. Voie de biosynthèse du précurseur glutathionylé (Glut-3SH) et du précurseur cystéinylé (Cys-3SH) du 3SH dans les baies de raisin.....	51

ABREVIATIONS

110R	<i>110 Richter</i>
125AA	<i>125AA Kober</i>
3MH	<i>3-mercaptohexan-1-ol</i>
3SH	<i>3-sulfanylhéxan-1-ol</i>
4MMP	<i>4-mercapto-4-méthylpentan-2-one</i>
4MMPOH	<i>4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-ol</i>
4MSP	<i>4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one</i>
4MSPOH	<i>S-4-(4-méthylpentan-2-ol)-L-cystéine</i>
$\delta^{13}\text{C}$	<i>Discrimination isotopique du carbone</i>
A	
A3SH	<i>Acétate de 3-sulfanylhéxyle</i>
AMT1.1	<i>Ammonium transporter 1</i>
B	
B	<i>Bore</i>
C	
C/N	<i>Carbone/Azote</i>
Ca	<i>Calcium</i>
CEC	<i>Capacité d'échange cationique</i>
CHS	<i>Chalcone synthase</i>
Cu	<i>Cuivre</i>
Cys	<i>Cystéine</i>
Cysgly-3SH	<i>S-3-(hexan-1-ol)-cystéineglycine</i>
D	
DEG	<i>Differentially expressed genes</i>
DFR	<i>Dihydroflavonol 4-reductase</i>
DMS	<i>Dimethyl sulfide</i>
Dp-3-glc	<i>Delphinidin-3-O-glucoside</i>
E	
EtOH	<i>Ethanol</i>
ETP	<i>Evapo transpiration potentielle</i>
ETSH	<i>Ethanethiol</i>
F	
F3'5'H	<i>Flavonoid 3',5'-hydroxylase</i>
FA	<i>Fermentation alcoolique</i>
Fe	<i>Fer</i>
G	
GC-MS	<i>Gas chromatography coupled to mass spectrometry</i>
GGT	<i>γ-glutamyltranspeptidase</i>
Glu	<i>Acide glutamique</i>
Gly	<i>Glycine</i>
GO	<i>Gene ontology</i>

GOGAT	<i>Glutamine-2-oxoglutarate aminotransférase</i>
GSH	<i>Glutamate déshydrogénase</i>
GSH	<i>Glutathion</i>
GSSG	<i>Glutathion oxydé</i>
GST	<i>Glutathion-S-transférase</i>
H	
H ₂ S	<i>Sulfure d'hydrogène</i>
HCl	<i>Acide chlorhydrique</i>
HSO ₃ ⁻	<i>Bisulfite</i>
I	
IBMP	<i>3-isobutyl-2-méthoxypyrazine</i>
IBHP	<i>3-isobutyl-2-hydroxypyrazine</i>
IH	<i>Indice héliothermique de Huglin</i>
IPMP	<i>3-isopropyl-2-méthoxypyrazine</i>
IS	<i>Indice de sécheresse</i>
K	
K	<i>Potassium</i>
L	
LDOX	<i>Leucoanthocyanidin dioxygenase</i>
M	
MeSH	<i>Méthanethiol</i>
Mg	<i>Magnésium</i>
MMSB	<i>4-methoxy-2-methyl-2-sulfanylbutan</i>
Mn	<i>Manganèse</i>
MS	<i>Matière sèche</i>
Mv-3-Glc	<i>Malvidin 3-glucoside</i>
N	
N	<i>Azote</i>
N ₂	<i>Azote élémentaire</i>
NaOH	<i>Soude</i>
NH ₃	<i>Ammoniac</i>
NH ₄ ⁺	<i>Ammonium</i>
NiR	<i>Nitrite réductase</i>
NO ₂ ⁻	<i>Nitrite</i>
NO ₃ ⁻	<i>Nitrate</i>
NR	<i>Nitrate réductase</i>
O	
O.I.V	<i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i>
P	
P	<i>Phosphore</i>
PAL	<i>Phénylalanine ammonia-lyase</i>
Cys-3SH	<i>S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine</i>
Glc-Pt-3	<i>Pétunidine</i>

Glut-3SH	<i>S-3-(hexan-1-ol)-glutathion</i>
Glut-3SHAl	<i>S-3-hexanal-glutathion</i>
R	
RGM	<i>Riparia Gloire de Montpellier</i>
RP-UHPLC-HRMS	<i>Reverse-phase ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry</i>
RU	<i>Réserve utile</i>
S	
S	<i>Soufre</i>
sBMP	<i>3-sec-butyl-2-méthoxy-pyrazine</i>
SE	<i>Erreur standard</i>
SO ₂	<i>Dioxyde de soufre</i>
T	
TDR	<i>Time domain reflectometrie</i>
U	
UV	<i>Ultraviolet</i>
V	
Vvi	<i>Vitis vinifera</i>
VPD	<i>Vapor pressure deficit</i>
Y	
YAN	<i>Yeast available nitrogen</i>
YNAN	<i>Yeast non available nitrogen</i>
Z	
Zn	<i>Zinc</i>

AVANT-PROPOS

Comme l'écrivait Peynaud dans son livre « le goût du vin »: " la qualité d'un vin est l'ensemble de ses qualités, c'est-à-dire de ses propriétés qui le rendent acceptable ou désirable. La qualité est le résultat d'une rencontre entre le vin, avec ses caractéristiques, et le consommateur, avec ses préférences, sa culture, ses conditionnements du moment ". La dégustation apporte donc des indications sur les caractéristiques du vin, notamment en découvrant la palette d'arômes très nuancée développant des notes subtiles et variées. Il est convenu que la qualité d'un vin tient en grande partie à son terroir. La notion de terroir permet d'honorer l'individualité, la personnalité du produit, né d'une terre qui reflète la société humaine qui l'exploite. Un vin de terroir est la manifestation singulière issue de la convergence d'un cépage particulier, cultivé sur un sol donné, dans un climat approprié, par un vigneron passionné.

Façonné au rythme des bouleversements géologiques, pédologiques et climatiques, le terroir viticole est constitué d'un ensemble de composantes naturelles que vient révéler le travail de l'Homme. Dans cette notion, l'élément essentiel est évidemment le sol qui influence par sa structure et ses réserves hydriques et minérales la personnalité du vin. Parmi les nutriments que la vigne prélève du sol, l'azote est certainement le plus indispensable à son développement, à la composition du raisin et par conséquent à la qualité du vin. Reconnu aujourd'hui, comme une des composantes majeures du terroir, cet élément peut, entre autres, influencer le potentiel aromatique du raisin et du vin, en lien avec le cépage, les techniques culturales et les facteurs environnementaux.

Ce travail de thèse apporte des éléments de réponse sur l'effet du statut azoté de la vigne sur le métabolisme primaire et secondaire des baies de raisin. Il se focalise en particulier sur les arômes variétaux majeurs, connus pour leur forte contribution majeure à l'image olfactive des vins bordelais, la 3-isobutyl-2-méthoxypyrazine (IBMP) à l'odeur du poivron vert et le 3-sulfanylhéxanol (3SH) à l'odeur de pamplemousse, libéré au cours de la fermentation alcoolique à partir de ses formes précurseurs présentes dans la baie.

INTRODUCTION GENERALE

A. Terroir viticole

De très nombreux facteurs sont réputés influencer la qualité et la typicité du vin. Parmi eux, l'effet des interactions entre l'environnement naturel (essentiellement le sol et le climat) et le matériel végétal est souvent mis en avant. Il est désigné par le terme « effet terroir ».

Sur le plan étymologique, le terme terroir possède une double origine ¹ :

- du mot latin « territorium » une dérivation de « territorium » qui a donné territoire ou terroir ; il correspondait à une zone conquise par l'armée romaine, bien bornée ou délimitée, gouvernée par l'autorité militaire, régie par le droit romain.
- « produit de terroir » utilisé au moyen âge pour qualifier un produit agricole, naturel, original, inféodé à un lieu précis et difficile à trouver ailleurs.

Selon l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (O.I.V), « le terroir vitivinicole est un concept qui se réfère à un espace sur lequel se développe un savoir collectif des interactions entre un milieu physique et biologique identifiable et les pratiques vitivinicoles appliquées, qui confèrent des caractéristiques distinctives aux produits originaires de cet espace. Le terroir inclut des caractéristiques spécifiques du sol, de la topographie, du climat, du paysage et de la biodiversité » (Résolution OIV/VITI 333/2010).

Autrement dit, le terroir viticole peut être défini comme un écosystème, dans lequel le développement de la vigne, la maturation du raisin et par la suite les caractéristiques organoleptiques du vin sont influencés par l'environnement qui entoure la vigne. Le terroir viticole est donc un concept primordial parce qu'il relie les caractéristiques sensorielles du vin à cet écosystème ². La qualité et la typicité d'un vin peuvent être en partie expliquées par l'effet terroir. Le vin est donc associé à son terroir, à son lieu de production et aux parcelles de vignobles. Selon Vaudour (2003), le terroir peut être défini comme un concept spatial et temporel où plusieurs facteurs influencent le développement de la vigne et par la suite l'élaboration du vin. Cependant, la notion de terroir n'est abouti que dans des conditions socio-économiques favorables à une production de vin de qualité ².

Le terme terroir conduit donc à évoquer l'espace climatique à différentes échelles (macroclimat, mésoclimat, topoclimat et microclimat), les types de sols (déterminés par leur géologie, leur pédologie, leur réserve en eau et leur composition minérale) et les cépages et les porte-greffes (facteurs génétiques). Son fonctionnement résulte d'une interaction entre ces différentes composantes (climat, sol et plante) ² dans laquelle interviennent le facteur humain par le choix des techniques de viticulture et d'œnologie ⁴ (Figure 1).

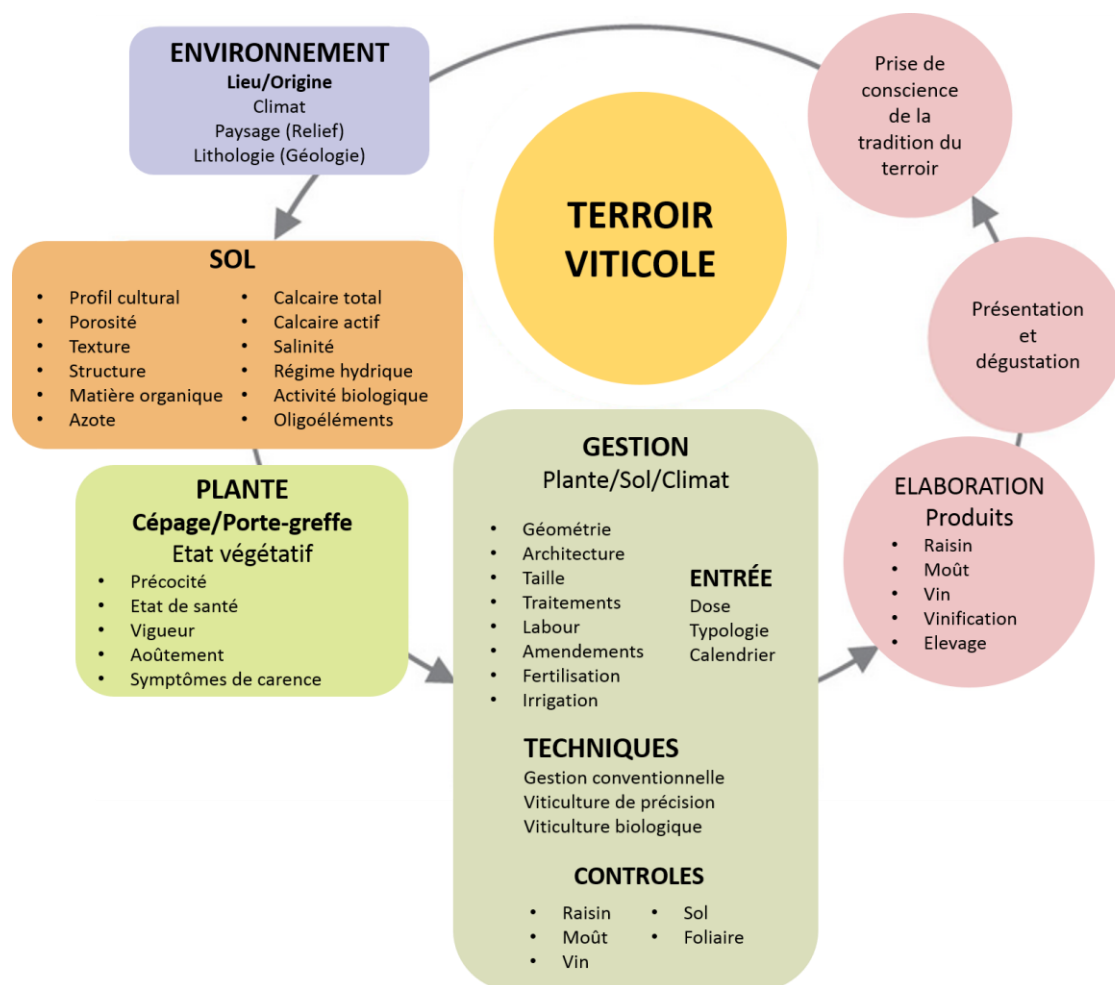


Figure 1. Interaction entre les différentes composantes du terroir viticole (adaptée de Miguel Gómez).

A.1. Composante climat du terroir viticole

Le climat, une composante essentielle de l'expression du terroir viticole, varie dans le temps et dans l'espace. Dans la dimension temporelle, l'effet des variations climatiques

annuelles est connu en tant que « effet millésime »⁵. D'un point de vue spatial, le climat est définie à différentes échelles⁶. Le macroclimat décrit le climat de grandes régions (distances assez étendues allant de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de kilomètres; par exemple la vallée du Rhône ou Bordeaux) étudié sur une longue période (30 ans et plus). Le mésoclimat décrit le climat de régions plus petites (quelques kilomètres; par exemple l'appellation de Châteauneuf-du-Pape ou de Saint-Emilion) et sur une période plus courte (données journalières). A une échelle similaire, on définit le topoclimat, lorsque des facteurs géographiques tels que l'altitude, la pente, l'exposition interviennent sur les paramètres climatiques. Finalement, le microclimat décrit des variations, soit, à l'échelle de la parcelle (quelques dizaines de mètres), soit à l'échelle du cep de vigne lui-même (du centimètre au mètre). Le pas de temps considéré varie généralement de quelques secondes à quelques heures³. Les variations au niveau du microclimat sont principalement induites par le type du sol et par la gestion de la canopée².

Le climat influence la physiologie de la vigne et la maturation du raisin à travers les températures, le rayonnement, les précipitations, le déficit de pression de vapeur (Vapor Pressure Deficit ou VPD), l'Evapo-Transpiration Potentielle (ETP) et le vent. En viticulture, parmi les indices climatiques les plus souvent utilisés, on peut citer l'indice héliothermique de Huglin (IH), qui dépend de la température et du rayonnement, et de l'indice de sécheresse (IS), qui est basé sur le bilan hydrique de la vigne. Avec l'indice de fraîcheur de nuits, ces indices composent l'indice climatique multicritère qui permet de bien caractériser un climat viticole⁷.

A.1.1. Température et rayonnement

La température de l'air et le rayonnement influencent fortement le développement de la vigne, la maturation des baies et ses caractéristiques organoleptiques. La température agit directement sur la plupart des mécanismes ou métabolismes cellulaires ; en effet, la plante répond de façon globale et coordonnée aux variations de températures. En moyenne, il est estimé que 1200 degrés en base de 10°C sont le strict minimum pour obtenir une maturation complète de la grappe, mais ces valeurs dépendent bien entendu, du cépage considéré². L'accumulation des acides, le pH, la production des carbohydrates et la biosynthèse des composés aromatiques et phénoliques sont des phénomènes régulés par la température^{6,8}. Une augmentation de la température induit une augmentation de la concentration en sucres et une baisse de l'acidité au sein des baies de raisin⁹.

Gladstones (1992) suggère que la formation des pigments et la synthèse optimale des anthocyanes et des composés aromatiques auront lieu à des températures comprises entre 20°C et 22°C. A ces températures, la synthèse de sucres est également optimale ¹¹. Des températures élevées provoquent généralement une réduction des teneurs en anthocyanes en favorisant leur dégradation et en inhibant certains gènes de leur voie de biosynthèse ¹²⁻¹⁴.

Quant aux rayonnements, des résultats contradictoires ont été publiés regardant l'effet de ce facteur sur la composition du raisin, probablement parce qu'il est difficile de séparer l'effet de la lumière de celui de la température. Jusqu'à ce jour, une seule étude de Spayd et ses collaborateurs ¹² a réussi, en chauffant ou en refroidissant des grappes exposées aux rayonnements solaires, à découpler l'effet de la lumière de celui des températures sur la teneur en anthocyanes. Ils ont démontré que la teneur en ces métabolites augmente avec le rayonnement directement reçu par les grappes, alors qu'elle diminue avec la température.

A.1.2. Régime hydrique de la vigne

La composante climat du terroir viticole ne peut pas être mentionnée sans évoquer l'alimentation en eau de la vigne. La vigne, une plante pérenne à enracinement profond, peut être considérée comme une espèce très résistante à la sécheresse (besoins en eau estimés à 400 à 500 mm par an). Le régime hydrique de la vigne fait intervenir le climat (évapotranspiration potentielle ou ETP et précipitations) et le sol (réserve utile). La vigne absorbe l'eau par les racines et la relâche par transpiration qui dépend directement de l'ETP. Par ailleurs, le rayonnement fournit l'énergie nécessaire pour transformer l'eau liquide en vapeur. Le régime hydrique est sous l'influence du matériel végétal (cépage, porte-greffe, profondeur d'enracinement), des pratiques viticoles (surface foliaire, architecture de la canopée, densité de plantation, irrigation, drainage, niveau de nutrition azotée) et de l'entretien du sol.

Il est montré que le régime hydrique de la vigne est un facteur qui influence considérablement la qualité et la typicité du vin. Seguin (1969) a démontré pour la première fois l'importance du régime hydrique de la vigne dans l'expression du terroir viticole. Depuis, de nombreuses études ont confirmé la prééminence de l'alimentation en eau dans l'effet terroir. La présence de l'eau dans le sol est indispensable au

développement végétatif de la vigne. Lorsque l'alimentation en eau devient limitante, la croissance de la vigne (développement des feuilles et des tiges) diminue, influençant la qualité des baies. Ces dernières, considérées à ce stade comme un important puits d'accumulation de carbone, sont alors moins en compétition avec la croissance végétative ¹⁶.

Par conséquent, un déficit hydrique est favorable à l'obtention de baies à fort potentiel, et par la suite un vin de qualité ¹⁶⁻¹⁸. La situation idéale pour une production de qualité est de disposer d'un sol et de conditions climatiques qui induisent un niveau de déficit hydrique relativement précoce, mais non excessif ^{16,19-21}.

Il est essentiel donc de distinguer la notion d'un déficit hydrique modéré de celle d'un déficit hydrique sévère ²². Le déficit hydrique est considéré comme modéré quand un arrêt de croissance des rameaux se manifeste sans affecter le feuillage de la plante. En général, ce type de déficit est positif pour l'obtention de raisin de qualité. De plus, la composition en métabolites des baies est affectée d'une façon directe par la disponibilité en eau et d'une façon indirecte *via* l'altération du rapport pellicule/pulpe ²³.

Les premières conséquences d'un déficit hydrique sévère sont une perte de turgescence foliaire suivie d'une défoliation importante de la vigne puis d'un flétrissement partiel ou total des baies induisant ainsi un blocage de la maturation.

Plusieurs expérimentations ont été consacrées à l'effet du régime hydrique de la vigne sur son développement, sa vigueur, la composition du raisin et la qualité du vin. Un déficit hydrique altère la photosynthèse et limite la croissance des rameaux ^{24,25}. Cependant, un déficit hydrique modéré avant la véraison accélère la maturation des baies et provoque une augmentation de la teneur en sucres et en composés phénoliques (anthocyanes et tannins) ²⁶. Il a été montré que l'accélération de l'accumulation des sucres et des anthocyanes pourrait être la conséquence d'une augmentation de la teneur en acide abscissique (hormone sécrétée en cas de déficit hydrique) qui circule de son lieu de synthèse, les racines, vers la baie de raisin ^{27,28}. En revanche, le rendement et la taille des baies ainsi que leur concentration en acide malique diminuent en cas de stress hydrique ²⁹⁻³². Le potentiel aromatique des cépages peut être fortement affecté par un stress hydrique sévère, en particulier pour les cépages blancs ²¹. Il a été montré que les teneurs en précurseurs cystéinylés de la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one à l'odeur de buis et du 3-sulfanylhexanol à l'odeur de pamplemousse sont plus élevées dans les baies

de Sauvignon blanc issues des vignes ayant subies un déficit hydrique modéré par rapport à celles ayant subies un stress hydrique sévère.

A.2. Composante sol du terroir viticole

En interaction avec le climat, le sol est une composante majeure de l'effet « terroir » et possède un fort impact sur la qualité des baies à la récolte. Le sol peut être caractérisé par la taille des particules le constituant (texture, pourcentage d'éléments grossiers), sa couleur, sa composition chimique (teneur en phosphore, en potassium, en azote...), sa réserve en eau, ses macro- et micro-organismes et sa température (pédoclimat). L'influence du sol sur le développement de la vigne et la qualité du raisin se situe toujours dans le contexte du terroir viticole où le climat, la plante et le facteur humain interviennent également ^{4,33}. En fait, le sol agit sur la qualité, tout à la fois en tant que support de l'enracinement, qu'en tant de réservoir d'eau et de nutriments, ainsi qu'en soumettant un pédoclimat thermique à la plante.

Le sol est un milieu complexe dont son fonctionnement doit être, pour être appréhendé, décomposé en plusieurs composantes comme sa température, sa réserve hydrique et sa composition minérale.

A.2.1. Température du sol

Avec la température de l'air au niveau du couvert végétal, la température du sol (pédoclimat) constitue un important critère de différenciation entre terroirs pour une année donnée. Celle-ci est dépendante de la couleur du sol (un sol clair réfléchit plus de rayonnement qu'un sol foncé), de sa texture (la présence des éléments grossiers dans le sol augmente sa température) et de sa réserve en eau (un sol humide se réchauffe plus lentement qu'un sol sec) ³⁴⁻³⁶. L'importance du pédoclimat thermique sur la précocité de la vigne, ainsi que sur le niveau de maturité des baies atteint au moment des vendanges, a été démontrée dans différents vignobles ³⁷. Asfaw et Kliewer (1979) ont montré que des températures élevées au niveau des racines entraînent une augmentation de la teneur en sucres réducteurs et du pH du moût tandis qu'elles diminuent sa teneur en acide malique ³⁸. Une augmentation de la température du sol au niveau des racines et le microclimat thermique au niveau de la canopée accélèrent le développement de la plante ¹⁰.

A.2.2. Couleur du sol

La couleur est l'un des critères utilisés pour caractériser et classer les sols. La texture du sol, son humidité, sa teneur en oxyde de fer, sa teneur en matière organique, ainsi que ses propriétés minérales agissent sur la couleur du sol. Cette dernière dépend aussi de la roche mère à partir de laquelle le sol est formé ³⁹. La couleur du sol influence le microclimat et par la suite la croissance de la vigne *via* la capacité de la rétention de la chaleur ou de la réflexion de la lumière ^{6,35}. Stoll *et al.*, (2008) ont montré qu'un sol clair, par sa réflexion importante des rayonnements, permet une augmentation de la teneur en composés phénoliques dans la baie de raisin ⁴⁰.

A.2.3. Type et texture du sol

Le type de sol est lié à la nature de la roche mère sur laquelle la vigne se développe. Dans certaines régions, une bonne corrélation est établie entre la roche mère et la qualité du vin produit. Par exemple, des vins produits sur les calcaires du Kimmeridgien (Chablis Premier Cru et Chablis Grand Cru) sont plus renommés que des vins produits sur les calcaires du Portlandien (Petit Chablis) ⁴¹. Löhnertz *et al.*, (2008) ont trouvé de fortes différences de style dans les vins de Riesling en fonction du type de sol. Les vins des sols argileux présentaient plus de corps que les vins produits sur des sols calcaires ⁴².

Le comportement du sol est également influencé par sa texture (teneur en éléments grossiers, en sable, en limon et en argile) car celle-ci peut notamment modifier sa structure, sa capacité à retenir de l'eau, son aération, sa température et sa composition minérale ⁴³. D'ailleurs, Dry et Coombe ⁴⁴ décrivent la texture du sol comme étant la propriété la plus importante du sol vue qu'elle affecte la capacité de rétention d'eau, la capacité d'échange cationique (CEC), la température du sol et la profondeur d'enracinement. Une corrélation entre la texture du sol et la concentration en terpènes a été établie par Reynolds *et al.*, (2007): les moûts issus d'un sol sableux présentaient des faibles teneurs en terpènes. Selon ces mêmes auteurs, les vins produits sur des sols argileux sont marqués par des notes minérales et citronnés très intenses ⁴⁵. Noble (1979) a montré que des baies issues des vignes plantées sur un sol graveleux sont moins sensibles au phénomène d'oxydation ⁴⁶.

A.2.4. Réserve en eau

Le sol influence le comportement de la vigne et la constitution du raisin par ses réserves hydriques (réserve utile, présence d'une nappe d'eau). Un sol limoneux par exemple est caractérisé par une grande disponibilité en eau pour la vigne. Cette disponibilité est plus faible dans un sol argileux et encore plus dans un sol graveleux ^{47,48}. Comme nous l'avons vu précédemment, l'installation d'une contrainte hydrique modérée est favorable à la qualité, car elle induit un arrêt de croissance précoce des rameaux et elle limite le grossissement des baies. Celle-ci sera atteinte plus facilement dans les sols possédant de faibles réserves hydriques, qui sont donc généralement les plus favorables à l'obtention d'un raisin de qualité.

A.2.5. Composition minérale du sol

La composition minérale du sol issue de la dégradation physique puis chimique de la roche-mère est susceptible d'influencer le rendement de la vigne ainsi que le caractère organoleptique des baies de raisin. La teneur du sol en éléments minéraux est souvent jugée comme étant un facteur de qualité, même si ce concept est controversé ⁴⁹. Le développement de la vigne fait appel aux éléments nutritifs majeurs et à des éléments traces qui sont indispensables au bon développement de la vigne ⁴³. La totalité des éléments minéraux représente 5 à 10% de la matière végétale.

Les principaux éléments minéraux sont :

- les macro-éléments : l'azote (N), le potassium (K), le phosphore (P), le calcium (Ca).
- les micro-éléments ou oligo-éléments : le fer (Fe), le magnésium (Mg), le cuivre (Cu), le soufre (S), le bore (B), le zinc (Zn), le manganèse (Mn).

D'une façon globale, le calcium modifie la structure du sol et son pH alors que le potassium et l'azote influencent la composition du raisin ^{21,50,51}. Le phosphore agit sur le métabolisme énergétique de la plante ⁵². En ce qui concerne les micro-éléments, la vigne a besoin du fer et du magnésium pour la synthèse de la chlorophylle ainsi que du cuivre et du soufre pour l'absorption et l'assimilation de l'azote. La vigne utilise le bore puisé du sol pour le transport et le métabolisme du sucre et pour les phénomènes liés à la fécondation, la nouaison et la coulure. Finalement, la plante a besoin du zinc pour la

synthèse d'auxines (hormones de croissance) et la formation de la chlorophylle, du cuivre et du manganèse pour la photosynthèse et la réduction des nitrates ⁵².

La nutrition azotée et son incidence sur le développement de la vigne et la composition de la baie de raisin seront développées explicitement ultérieurement.

A.2.6. Matière organique du sol

La matière organique joue un rôle primordial dans le comportement global du sol. Elle participe à la qualité de la structure du sol et à sa stabilité vis-à-vis des agressions extérieures (pluie, compactations entraînées par le passage d'engins agricoles...). Les éléments contenus dans la matière organique ne peuvent pas être absorbés par la vigne directement. La minéralisation de la matière organique par les macro-organismes assure le stockage intermédiaire et la mise à disposition des nutriments indispensables au développement de la vigne.

A.2.7. Macro et micro-organismes du sol

Le sol héberge une grande diversité de macro- et micro-organismes qui vivent en co-existence avec la plante et ont un rôle important sur la structure du sol et sur la santé de la plante elle-même ^{53,54}. Les macro-organismes participent à la création d'une macroporosité dans le sol et sont impliqués dans la transformation de la matière organique brute en humus ainsi qu'à la minéralisation de l'humus ⁵⁵. Les microorganismes pourraient coloniser l'intérieur des racines ou bien la zone entourant les racines. Cependant, ces microorganismes peuvent également migrer à travers la plante et coloniser les tissus aériens ⁵⁶. Bokulich (2014) a montré que les communautés microbiennes de la surface des raisins étaient différentes entre les régions viticoles étudiées signalant ainsi l'influence du terroir sur ce paramètre ⁵⁶. Pour Bourguignon, la qualité du vin et l'expression du terroir sont liées à l'activité microbiologique du sol ⁵⁷, mais ce concept est controversé.

A.3. Rôle du matériel végétal dans l'expression du terroir viticole

De nombreuses études ont été menées sur la vigne et son fonctionnement à l'échelle de la physiologie, de la génétique et de la biologie moléculaire. Le monde de la viticulture est caractérisé par l'existence d'un très grand nombre de cépages et de porte-greffes,

résultant d'une sélection naturelle et humaine. La conséquence est une grande diversité de vins, dont la typicité est la résultante des interactions entre la plante, le sol, le climat et la vinification. Le choix variétal est un outil puissant dans les mains des viticulteurs pour s'adapter aux différents environnements biotiques et abiotiques auxquelles la vigne est confrontée. Des propriétés déterminées génétiquement (précocité phénologique et date de maturité, aptitude d'absorption de certains minéraux, synthèse et accumulation des métabolites...) présentent une forte variabilité d'un cépage à un autre. Par exemple, des cépages comme le Chasselas et le Pinot noir sont caractérisés par une précocité phénologique provoquant une maturation précoce du raisin ⁵⁸. De la même manière, certains porte-greffes permettent d'avancer la date de la récolte (par exemple Riparia Gloire de Montpellier : RGM) tandis que d'autres la retardent (420A) ⁵⁹. Concernant l'absorption de certains nutriments, notamment l'azote, le Cabernet-Sauvignon ou le Sauvignon blanc clone R3 assimilent fortement cet élément minéral au contraire du Riesling ou du Sauvignon blanc clone CL297 ^{60,61}. Quant à la production et l'accumulation des métabolites, des cépages comme la Carmenère sont connus pour la synthèse de méthoxypyrazines, le Sauvignon blanc pour les précurseurs de thiols volatiles et le muscat pour les terpènes ⁶²⁻⁶⁵.

Le choix du cépage est un outil permettant de valoriser le terroir viticole. Les meilleurs vins sont obtenus lorsque les raisins mûrissent à la fin de l'été, ou au début de l'automne. Par conséquent, il convient de planter des cépages précoces dans des climats frais et des cépages tardifs dans des climats chauds ².

A.4. Facteur humain

Il est important de considérer le facteur humain dans la notion du terroir viticole parce que la création des vignobles et la gestion de la vigne ne peut se faire sans l'intervention de l'être humain ⁴. Le savoir-faire de l'Homme en terme de pratiques viticoles et œnologiques est primordial, dans l'ordre d'une optimisation des autres composantes du terroir afin d'élaborer des vins à fort caractère organoleptique ⁶. L'Homme intervient surtout dans le choix de la variété et du porte-greffe à planter, l'orientation des rangs et la densité de plantation lors de la création du vignoble afin d'optimiser l'adaptation de la vigne à son environnement ⁶⁶. Ainsi, à travers le choix des techniques d'entretien du sol (enherbement, désherbage chimique ou mécanique), le système de protection contre les maladies et ravageurs (conventionnel, raisonné, biodynamie, bio...), la date et la façon de

récolter, l'Homme peut modifier la qualité et la quantité de la récolte. Il agit également sur le microclimat des baies par le type de taille, l'épamprage, le palissage, l'échardage et l'effeuillage. De nombreuses études ont montré qu'une manipulation de la canopée (effeuillage, échardage...) et l'irrigation ont un impact sur la température et le rayonnement au niveau de la grappe et par conséquent sur la composition de la baie ⁶⁷⁻⁶⁹. Par exemple, un effeuillage et une élimination des rameaux secondaires dans la zone de la grappe provoquent une augmentation de la teneur en 3-sulfanylhéxan-1-ol (3SH) et en acétate de 3-sulfanylhéxyle (A3SH) dans le vin de Sauvignon blanc alors que celle de la 3-isobutyl-2-méthoxy-pyrazine (IBMP) diminue considérablement. L'Homme agit également sur les propriétés chimiques et physico-chimiques du sol en modifiant les caractéristiques superficielles par le recours aux fertilisations minérales et à l'utilisation des additifs organiques et minéraux. Au niveau socio-économique, l'être humain est intervenu dans le choix des territoires où les conditions sont favorables pour la production et l'élaboration des vignes et des vins de qualité ².

B. L'azote

La composition minérale du sol est l'un des facteurs clés du fonctionnement d'un terroir viticole. En effet, les éléments minéraux tels que le calcium, le fer, le potassium et l'azote sont essentiels à la synthèse des métabolites primaires, ainsi qu'à la production de nombreux métabolites secondaires tels que les composés phénoliques ou les composés aromatiques ⁷⁰.

Parmi les éléments minéraux que la vigne prélève dans le sol, l'azote est sans doute celui qui influence le plus sa croissance et sa vigueur et, de ce fait, la composition des raisins. Certains auteurs considèrent même que la disponibilité de l'azote participe à l'effet terroir puisqu'elle dépend du type du sol ⁷¹⁻⁷³. En effet, la vigne assimile généralement plus d'azote lorsqu'elle est plantée sur un sol graveleux alors que son statut azoté est plus faible sur un sol argileux. Les besoins de la vigne en azote sont estimés entre 30 et 80 kg par hectare et par an en fonction de la vigueur et du rendement désirés ^{74,75}. Environ 8 à 30 kilogramme d'azote par hectare sont exportés avec la récolte. Ce phénomène est fortement corrélé à la variété et à la vigueur. Il s'agit de la quantité minimale qui doit être fournie chaque année par les engrais ou la fertilisation ⁷⁴ mais les apports doivent être plus conséquents dans les sols où l'azote minérale peut être perdu par lixiviation. Il est essentiel de veiller à préserver un niveau d'azote non limitant et non excessif pour produire une récolte de qualité avec un rendement économiquement acceptable. La gestion du statut azoté de la vigne est donc capitale dans la production de raisins.

La concentration d'azote minéral dans le sol est généralement faible ce qui en fait, un nutriment souvent limitant pour le développement végétatif (0,05 à 0,1% sous forme organique et des quantités encore beaucoup plus faibles sous forme inorganique). De nombreux travaux ont été menés pour comprendre l'effet de l'azote sur la composition de la baie en métabolites primaires et secondaires. Cependant, l'effet direct du statut azoté sur la teneur et la synthèse des métabolites tels que les arômes et leurs précurseurs n'est pas encore élucidé.

B.1. Azote du sol

Dans le sol, l'azote est présent sous deux formes, organique et inorganique. La grande majorité de l'azote est stockée sous sa forme organique. Cette dernière peut être sous

forme d'humus (stable et lentement décomposé) ou sous forme de matière organique fraîche. La forme inorganique ou minérale d'azote existe principalement sous trois formes: élémentaire (N_2), nitrate (NO_3^-) et ammonium (NH_4^+). Du point de vue nutritionnel pour la plante, le NO_3^- et le NH_4^+ sont considérés comme étant les formes essentielles. Les formes organiques de l'azote (humus et matière organique fraîche) ne peuvent pas être assimilées directement par la vigne. Une minéralisation de l'N est indispensable pour le rendre biodisponible. Cette étape est réalisée par les micro-organismes du sol qui assimilent progressivement l'humus ou la matière organique fraîche, ce qui permet une transformation de l'ammoniac (NH_3) en ammonium (NH_4^+) par une réaction réversible ensuite en nitrite (NO_2^-) puis en nitrate (NO_3^-) assimilables par la vigne ⁷⁶. Il est indispensable de noter que l'azote minéral est très faiblement retenu par le sol. Il est donc primordial qu'une activité microbiologique du sol soit maintenue pour alimenter la vigne tout au long de son développement ⁵⁵, en particulier en été. En l'absence de fertilisation, la disponibilité en azote minéral pour la vigne, dépend de la quantité de la matière organique stockée dans le sol et de sa vitesse de minéralisation. Cette dernière sera d'autant plus importante que le rapport C/N de la matière organique est bas, que le pH est proche de la neutralité, que le sol est bien aéré, que la température du sol est élevée et que les réserves en eau sont proches de la capacité de rétention maximale en eau du sol (capacité au champ) ⁷⁷. L'offre du sol en azote dépend aussi des pratiques d'une éventuelle irrigation ⁴³.

Parmi les nombreux facteurs influençant la nutrition azotée de la vigne, le matériel végétal est bien entendu prédominant. Chaque cépage, voire chaque clone ou porte-greffe a une assimilation qui lui est propre. Par exemple, le Cabernet-Sauvignon ou le Pinot noir sont connus pour leur taux élevé d'assimilation d'azote au contraire du Riesling et du Grenache ⁶⁰. Au niveau clonal, le Sauvignon blanc clone R3 possède une meilleure assimilation de l'azote comparé au Sauvignon blanc clone CL297 ⁶¹.

Les pratiques culturales peuvent également impacter la nutrition azotée. Il est connu qu'un enherbement entre les rangs de la parcelle augmente la compétition pour l'azote entre la vigne et l'herbe, diminuant ainsi les quantités d'azote disponibles pour la vigne. Au contraire, les légumineuses, souvent semées comme de l'engrais vert vont enrichir le sol en azote grâce à leur symbiose avec des bactéries augmentant la disponibilité en ce nutriment pour la vigne ⁷⁸.

Enfin, le climat de la région et du millésime peut aussi influencer le statut azoté de la plante, car il agit sur la vitesse de minéralisation de la matière organique ⁷⁹.

B.2. Cycle de l'azote au cours du développement

B.2.1. Réserve en azote

La croissance et le développement de la vigne sont en partie dépendants de ses réserves en éléments minéraux, notamment l'azote, accumulés au cours de la saison précédente. Les réserves en azote sont localisées dans les parties pérennes de la vigne qui sont les racines, le tronc et les tiges et constituent 20 à 40% des besoins annuels de la plante nécessaires pour sa croissance ^{74,80}. L'arginine et l'acide aspartique semblent être les deux principales formes de réserve de ce nutriment. En début de saison, les besoins en azote sont importants afin de former les organes jeunes au printemps. Ils sont principalement puisés dans les réserves constituées notamment à la fin de la saison (n-1), avant que l'absorption racinaire prenne le relais ^{55,81}. A partir de la véraison et si les quantités d'azote puisées du sol demeurent insuffisantes, une nouvelle phase de remobilisation des réserves aura lieu (Figure 2) ⁸².

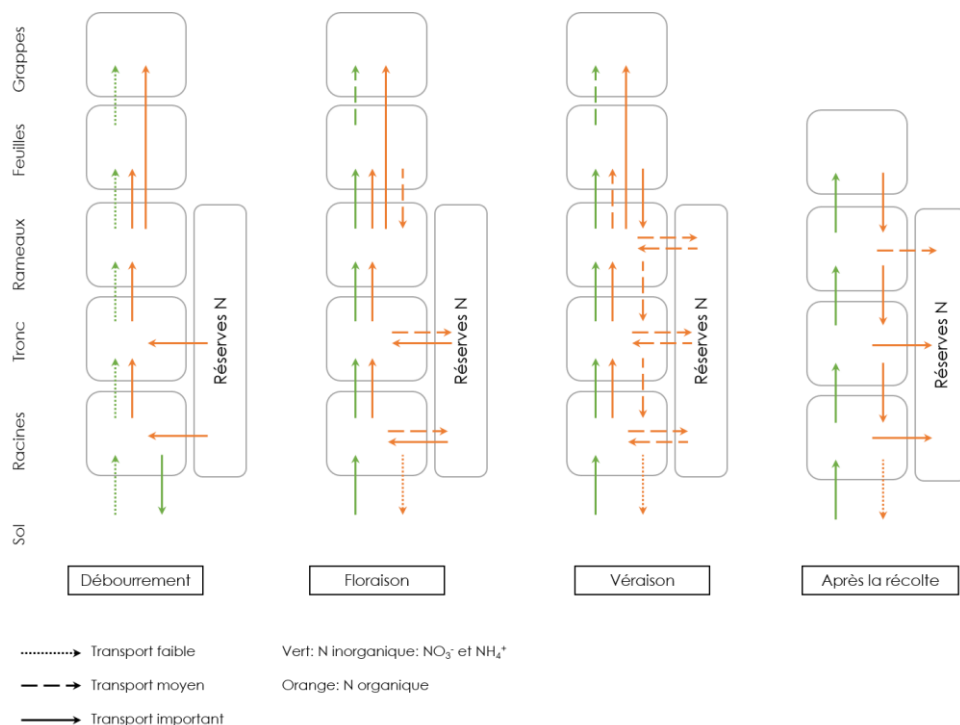


Figure 2. Echanges de l'azote entre le sol et la vigne et remobilisation au cours du développement de la vigne (adaptée de Wermelinger, 1991 ⁸²).

B.2.2. Absorption et assimilation

La quantité d'azote prélevée dans le sol varie en fonction du stade du développement de la vigne. Deux périodes d'absorption intenses de ce nutriment sont décrites : une première période entre le débourrement et la véraison, et une seconde période après la récolte et jusqu'à la chute des feuilles ^{74,83,84}. La quantité d'azote prélevée dans le sol augmente progressivement à partir du stade 3-5 feuilles jusqu'à atteindre 50% du contenu total en azote au stade petit pois (premier pic d'accumulation d'azote) ^{80,83}. Ensuite, l'absorption de l'azote décroît entre la véraison et la maturité ⁸⁵ puis augmente après les vendanges (Figure 3). Des études utilisant de l'azote marqué sont généralement d'accord avec ce calendrier d'absorption, montrant des taux d'incorporation de l'isotope marqué plus élevés lorsque les fertilisations sont appliquées à la floraison plutôt qu'au débourrement ⁷⁴. La quantité de ce nutriment absorbée après la récolte, constitue 30-40% de l'azote total et elle sera majoritairement stockée dans le tronc ⁸³.

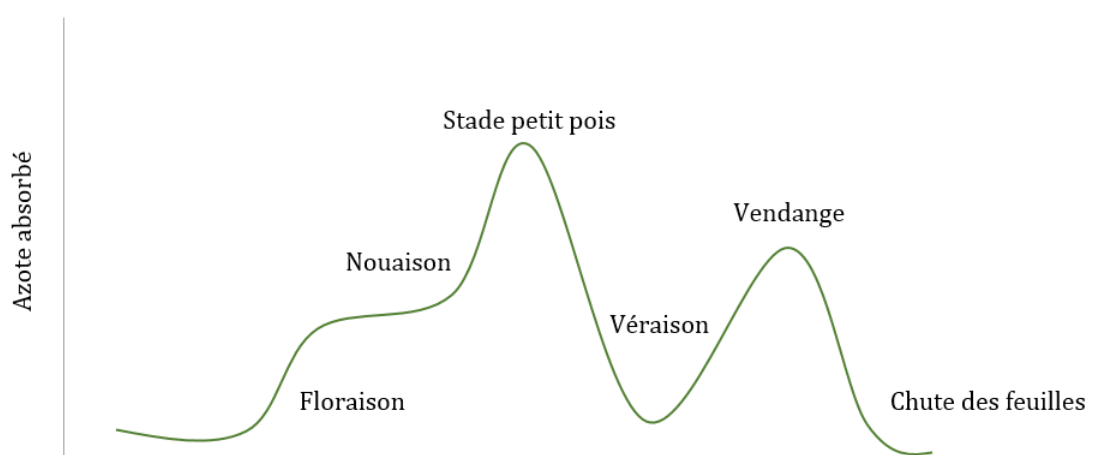


Figure 3. Dynamique de l'absorption de l'azote par la vigne au cours de la saison (adaptée de Conradie 1980 ⁸³).

Chez la vigne, comme chez la plupart des plantes, la forme majeure d'azote prélevée dans le sol est le nitrate (NO_3^-) ⁸⁶. Le nitrate est absorbé par des symporteurs protons/ NO_3^- situés sur le plasmalemme des cellules de l'épiderme et du parenchyme cortical des racines et elle se fait contre son gradient de concentration, en utilisant la composante pH du gradient électrochimique de protons ⁸¹. Le nitrate absorbé peut être soit (i) stocké sur place dans les vacuoles des cellules du cortex racinaire, (ii) soit transformé en NH_4^+ , (iii) soit redistribué *via* le xylème dans le reste de la plante où il est ensuite assimilé ^{87,88}. Au

cours de son assimilation, le nitrate (NO_3^-) est converti en nitrite (NO_2^-), puis en ammonium (NH_4^+) *via* deux étapes de réduction successives catalysées respectivement par la nitrate réductase (NR) et la nitrite réductase (NiR) (Figure 4) ⁸⁹.

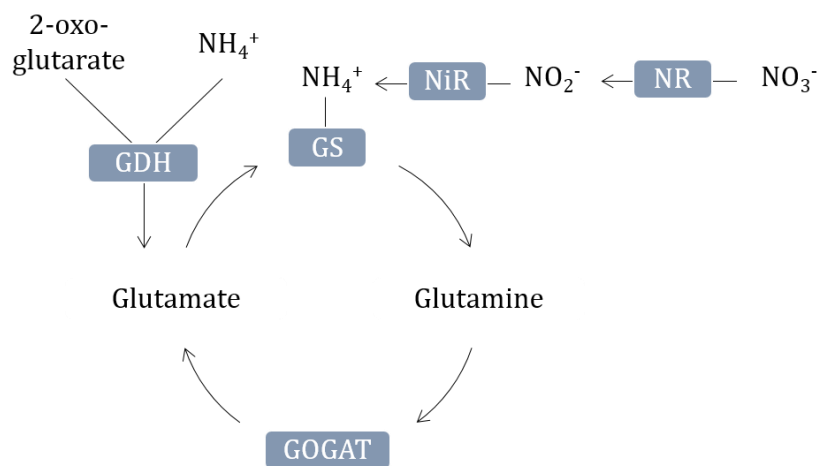


Figure 4. Les différentes voies d'assimilation de l'azote par la vigne.

L'azote est également absorbé du sol sous forme d'ammonium (NH_4^+), directement assimilée à cause de sa forte toxicité due à son effet découplant. L'ammonium peut aussi être issu de l'assimilation du nitrate ou des processus de photorespiration, de déamination des acides aminés ou de la voie des phénylpropanoïdes ⁸⁷. Au niveau moléculaire, l'entrée des ions NH_4^+ dans les cellules du cortex racinaire se fait par un symporteur AMT1.1 ⁹⁰. Le cycle glutamine synthase (GS) –glutamine-2-oxoglutarate aminotransférase (GOGAT) est la voie principale d'assimilation de l'ammonium permettant la synthèse de la glutamine et du glutamate (Figure 4). Ceux-ci peuvent alors donner naissance à d'autres acides aminés, comme la proline ou l'arginine à la suite de réactions de transamination.

Il existe également une voie alternative pour l'assimilation de l'ammonium *via* la glutamate déshydrogénase (GDH) qui catalyse une réaction réversible vers le glutamate ⁸⁸ (Figure 4). Les produits de l'assimilation de l'azote (glutamine, glutamate, proline, arginine) représentent 60% des acides aminés libres de la plante et sont impliqués dans de nombreux processus biochimiques ⁹¹.

B.2.3. Transport et remobilisation

L'azote est transporté en quantités comparables vers tous les organes de la vigne par le xylème, conduisant la sève brute riche en eau et en nutriment depuis le sol jusqu'aux feuilles, et le phloème conduisant la sève élaborée riche en glucide.

A partir de la floraison, la concentration de l'azote total des sarments augmente progressivement pour atteindre son niveau maximal à la fin de la croissance végétative. Cette augmentation est due à une translocation de cet élément des feuilles vers les rameaux et les parties pérennes⁸⁸. La teneur en azote dans les parties aériennes de la plante (limbes, pétioles, tiges et baies) atteint son maximum aux stades précoces du développement, concordant avec la phase où l'absorption de l'azote atteint son maximum, puis diminue au cours de la saison avec des valeurs minimales à la récolte ou à l'automne⁷⁴.

B.3. Dynamique et localisation de l'azote dans la baie

Dans la baie, une allocation significative de l'azote commence après la floraison provoquant ainsi une chute de la teneur de ce macroélément dans les parties pérennes de la plante malgré l'apport continu à partir des racines^{74,83}. Ainsi, la croissance de la grappe et la formation des réserves d'azote semblent être deux processus antagonistes. La translocation de l'azote dans la baie de raisin augmente progressivement pendant la maturation. L'azote est accumulé majoritairement deux semaines avant le stade dit « petit pois » puis à partir de la mi-véraison. Pendant ces deux périodes, la baie accumule plus de 50% de l'azote présent au sein de la plante. A la fin de la maturation, une grande quantité d'azote, alors sous forme d'acides aminés, est transportée des racines vers les baies^{82,92}.

Les teneurs des formes majeures des composés azotés augmentent en concentration au cours du développement de la baie, un processus dépendant de différents paramètres comme les pratiques viticoles (quantités et périodes d'application de l'azote et techniques de travail du sol) et les conditions environnementales⁹³. Le NH_4^+ fait exception : sa teneur diminue de la véraison à la récolte. L'azote total augmente au début de la saison, atteint un plateau puis diminue aux derniers stades phénologiques⁹⁴. La fertilisation azotée augmente la teneur des composés azotés dans tous les compartiments de la baie (pellicules, pulpes et pépins) surtout celle des acides aminés azotés, constituant par la suite l'azote assimilable du moût (Yeast Available Nitrogen, YAN).

B.4. Fertilisation azotée et son impact sur la vigne

La fertilisation azotée stimule le métabolisme azoté et par conséquent la synthèse des protéines ⁹⁵. Deux périodes de fertilisation sont préconisées en fonction du stade de développement et doivent être raisonnées en fonction d'indicateurs du statut azoté du sol ou de la plante ^{79,85}. La première période se situe entre le débourrement et la floraison, période où l'absorption d'azote et le besoin de la plante sont au maximum. La seconde période est le stade post-récolte, au moment où les réserves dont dépend la croissance de l'année (n+1) sont constituées ^{96,97}. Dans des vignobles carencés en azote, un apport d'azote foliaire entre la floraison et la véraison permet généralement d'augmenter l'azote assimilable du moût indispensable pour une meilleure fermentation alcoolique ⁹⁷. La fertilisation est en général accompagnée d'une augmentation de la surface foliaire couplée à une augmentation de la synthèse de la chlorophylle et à un développement des tissus de stockage comme le tronc, les rameaux et les racines permettant donc un accroissement des réserves en ce nutriment, en eau et en d'autres éléments minéraux ⁹⁶.

B.5. Statut azoté et effet sur le développement de la vigne et la composition du raisin

L'effet de la nutrition azotée sur le développement de la vigne et la composition de la baie a été décrit explicitement par Bell et Henschke en (2005). Dans leur revue, ils ont mentionné qu'une carence en azote, définie par des ceps à faible vigueur et par une teneur en azote assimilable du moût (YAN) inférieur à 100 mg L⁻¹, entraîne une diminution de la croissance et des rendements ainsi qu'un jaunissement des feuilles. La présence dans les moûts de trop faibles concentrations de YAN provoque des retards ou des difficultés de fermentation lors de la vinification et entraîne la présence de sulfure d'hydrogène et/ou de composés soufrés indésirables dans les vins. Cette carence peut être provoquée par une disponibilité insuffisante en azote minéral dans le sol, mais aussi par un stress hydrique fort qui empêche l'assimilation de l'azote par le système racinaire.

A l'opposé, un apport excessif d'azote provoque une augmentation du rendement à la récolte, de la vigueur, de l'activité photosynthétique et une sensibilité accrue à *Botrytis cinerea*. Cette augmentation de la vigueur a entre autres pour conséquence un changement du microclimat de la canopée se traduisant ainsi par une diminution du niveau du rayonnement reçue par les différents organes (feuilles, bourgeons et grappes) et de la température. Une diminution du niveau de rayonnement réduit la concentration

des anthocyanes, des terpènes et des phénols totaux dans la grappe ^{14,98}. La diminution de la température à l'intérieur de la canopée, provoque une élévation de l'acidité titrable et une diminution du pH due à une augmentation de la teneur en acide malique ^{12,14}. Par ailleurs, une réduction de la température peut provoquer un ralentissement de la maturation aboutissant à une maturité phénolique insuffisante à la récolte ^{18,94,99}. Les différentes composantes du rendement (poids de la récolte, poids des grappes, nombre des grappes...) augmentent avec la fertilisation azotée *via* l'augmentation de la vigueur ⁹³. Hilbert *et al.*, (2003) ont montré qu'une fertilisation azotée augmente le poids des bois de taille, le nombre des rameaux, la surface foliaire, le nombre des grappes par pied et l'acidité totale du jus de raisin. Un effet inverse a été trouvé sur la concentration en sucre dans les baies ⁹⁴.

En ce qui concerne l'effet de la nutrition azotée sur la teneur en certains acides aminés, il a été montré qu'un apport important d'azote augmente la teneur en proline et en arginine, formes majeurs d'acides aminés présents dans les baies ^{60,100}. En revanche, la teneur d'autres acides aminés comme la phénylalanine diminue avec la fertilisation ⁹⁴.

La fertilisation azotée augmente donc les formes d'azote assimilable, appelé « YAN » (ammonium, acides aminés primaires...) ^{93,101} et induit une meilleure fermentescibilité du moût. A l'inverse, un taux de YAN faible favorise la production des composés soufrés indésirables et provoque une diminution de la synthèse des esters et des acides gras volatils à longues chaînes carbonées. Une valeur du YAN proche de 200 mg L⁻¹ est recommandée pour assurer un bon déroulement de la fermentation alcoolique ¹⁰¹.

C. Arômes du vin

D'après Denis Dubourdieu, la notion du terroir peut être définie comme la capacité avérée d'un territoire, à produire, grâce au savoir-faire, un vin possédant un goût et un arôme typique, apprécié d'un marché qui reconnaît durablement la singularité et la valeur de ce vin ¹⁰². Un vin de terroir est donc un vin unique au goût inimitable. Ainsi la notion de terroir ne peut être abordée sans s'intéresser à la composante organoleptique du vin. Les grands vins, uniques par leur goût et leurs arômes ne peuvent être obtenus qu'à partir de raisin exprimant pleinement l'expression du cépage et de son terroir. Dans ce cas, les procédés de vinification ne sont jamais perceptibles, ils ne sont que des outils au service de la révélation de la typicité du lieu.

Selon Swiegers et Pretorius (2005), les arômes du vin peuvent être classés en trois grandes familles en fonction de leur origine :

- (i) l'arôme provenant du raisin, qualifié d'arôme variétal ou primaire. Dans cette famille, il faut distinguer la fraction libre (directement perceptible dans le fruit tels les méthoxypyrazines), de la fraction conjuguée non perceptible mais révélée au cours de la fermentation alcoolique ou de la fermentation malo-lactique (tels les thiols volatils); on parle alors de précurseur d'arôme.
- (ii) l'arôme fermentaire, ou également dénommé arôme secondaire, formé au cours de la fermentation alcoolique ou de la fermentation malo-lactique par les micro-organismes.
- (iii) enfin l'arôme du vieillissement ou tertiaire issu de réactions chimiques, en général par une oxydation lente au cours de l'élevage ou de la conservation en bouteille.

Par définition, il n'existe pas d'arôme fermentaire associé à la notion de terroir puisqu'il résulte du métabolisme de la levure ou de la bactérie lactique. En revanche, les arômes variétaux peuvent être le reflet parfait d'un terroir. De même, certains grands vins en vieillissant développent un bouquet de réduction qui leur est propre. La baie de raisin peut être définie comme le lieu de biosynthèse et d'accumulation de plusieurs composés aromatiques qui par leur présence et leurs interactions entre eux contribuent fortement au caractère organoleptique des vins de terroir. Ces composés aromatiques peuvent

exister sous forme libre et sont alors directement perceptibles par les récepteurs olfactifs ou bien, sous forme de précurseurs non volatils et inodores dans la baie de raisin dont le clivage en composés odorants intervient au cours des différentes opérations pré-fermentaires, fermentaires ou du vieillissement. C'est le cas des thiols volatils et de leurs précurseurs.

C.1. Les arômes variétaux libres

Parmi les arômes variétaux libres dans la baie de raisin, il existe par exemple les terpénols, les composés en C6, les méthoxypyrazines ou encore la rotundone récemment identifiée ^{64,104,105}.

Concernant la rotundone, elle participe aux notes épicées (poivre blanc et noir) d'un nombre important de vins rouges. Cette molécule a été mise en évidence dans les vins de Syrah, de Gamay et dans plusieurs autres. Elle a été également retrouvée dans les vins blancs de Grüener Veltliner. Les terpénols, quant à eux, sont spécifiques des cépages muscatés. Les principaux terpénols retrouvés dans le raisin sont le linalol, le nérol et le géraniol à l'odeur de rose, l'alpha-terpinéol à l'odeur de muguet, le citronellol à l'arôme de la citronnelle et le ho-trienol à l'arôme de tilleul ^{63,64}. Ces arômes ne sont pas ou peu présents dans les cépages cultivés dans la région de Bordeaux. Enfin, les méthoxypyrazines sont des composés hétérocycliques azotés appartenant à la famille des pyrazines. Elles sont responsables de l'arôme végétal d'un grand nombre d'espèces du règne végétal tels que le poivron, le pois, l'haricot vert, le piment, ainsi que le raisin ^{106,107}. Ces notes sont généralement associées à une maturation insuffisante du raisin.

C.1.1. Les méthoxypyrazines : structure et composante aromatique

Les méthoxypyrazines sont des composés hétérocycliques azotés. Parmi eux, certains possèdent un groupe alkyl comme la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine (IBMP) à l'odeur de poivron vert, la 2-méthoxy-3-sec-butylpyrazine (SBMP) à l'odeur d'asperge et la 2-méthoxy-3-isopropylpyrazine (IPMP) évoquant l'odeur de petit pois (Figure 5). Ces molécules ont été identifiées pour la première fois dans les raisins du Cabernet-Sauvignon par Bayonove en 1975 ¹⁰⁴. Les pyrazines ont été trouvées dans différents cépages comme le Cabernet franc, le Sauvignon blanc, le Merlot, la Carménère et le Verdejo ¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Elles ont été également identifiées dans le Pinot noir, le Chardonnay, le Riesling, le Chenin blanc, le Traminer, la Syrah et le Pinotage mais en plus faibles concentrations.

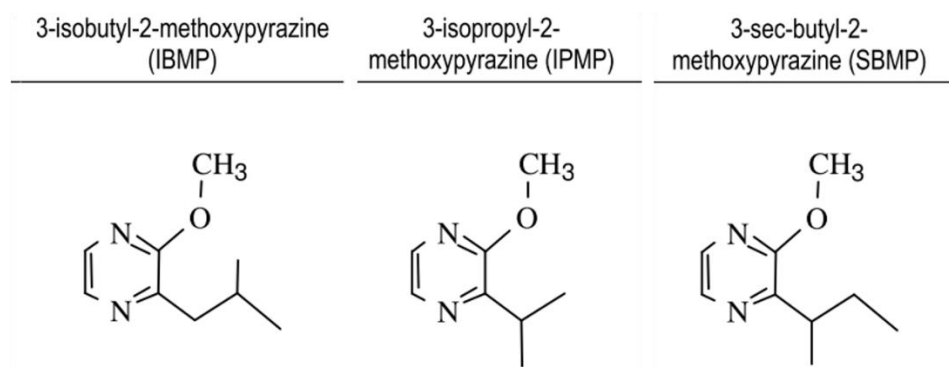


Figure 5. Les méthoxypyrazines présentes dans la baie de raisin.

C.1.2. IBMP ou 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine

Dans la baie de raisin, le moût et le vin, la 3-isobutyl-2-méthoxypyrazine (IBMP) est la plus abondante des méthoxypyrazines. L'IBMP est présente dans le raisin à des teneurs allant de quelques ng kg^{-1} à plusieurs dizaines de ng kg^{-1} et dans le moût et le vin de quelques ng L^{-1} à quelques dizaines de ng L^{-1} . L'IBMP est caractérisée par un seuil de perception très faible lui conférant son fort pouvoir odorant. Il a été établi à 15 ng L^{-1} dans un vin rouge de Bordeaux ^{111,112}. Des cépages comme le Cabernet-Sauvignon, la Carmenère et le Cabernet franc sont susceptibles de contenir des teneurs élevées en IBMP. Sa concentration dans le Cabernet-Sauvignon par exemple varie entre 0,5 et 100 ng L^{-1} . D'autres cépages comme le Merlot et le Sauvignon blanc peuvent en contenir également. L'IBMP a été identifiée dans le Sauvignon blanc à des concentrations allant de $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ à 40 ng L^{-1} ¹¹¹⁻¹¹⁴. Il est à noter que la teneur en IBMP est largement dépendante du cépage ainsi que de l'état de maturité du raisin.

La présence de certaines notes herbacées due à l'IBMP n'est pas souhaitable dans un vin rouge et sont souvent décrites comme des notes négatives ¹¹¹. Cependant, dans un vin blanc leur présence peut être tolérée, voire même recherchée dans certains pays, car elle peut apporter une certaine fraîcheur à la dégustation, mais en aucun cas les saveurs herbacées ne doivent dominer les saveurs fruitées ^{115,116}.

C.1.2. Voie de biosynthèse de l'IBMP

L'IBMP est présente sous forme libre dans le raisin et dans le moût. C'est une molécule stable, non transformée au cours de la vinification dont la concentration dans le moût à la récolte est comparable à celle trouvée dans le vin correspondant. L'origine de l'IBMP n'est pas complètement connue. Néanmoins, des hypothèses ont été formulées sur sa biosynthèse.

Plusieurs études ont montré que le précurseur de l'IBMP est la 3-isobutyl-2-hydroxypyrazine (IBHP) ^{107,117,118}. L'IBHP serait issue de l'amidation de la leucine en leucinamide qui s'associerait par la suite avec une molécule de glyoxal (éthane-1,2-dione) pour former l'IBHP ^{107,119-121} (Figure 6). Récemment, Dunlevy *et al.*, (2013) et Guillaumie *et al.*, (2013) ont mis en évidence, chez *Vitis vinifera*, l'existence du gène *VviOMT3* codant pour une *O*-méthyltransférase responsable de la dernière étape de la voie de biosynthèse de l'IBMP, c'est-à-dire de l'*O*-méthylation de l'IBHP en IBMP ^{109,122}. La méthylation de l'IBHP est réalisée à partir de la *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM), donneur de méthyl ¹⁰⁹. Une réaction de déméthylation de l'IBMP pourrait avoir lieu pour former à nouveau de l'IBHP ¹²³. Ainsi, bien que partiellement identifiée, la voie de synthèse de l'IBMP est loin d'être élucidée.

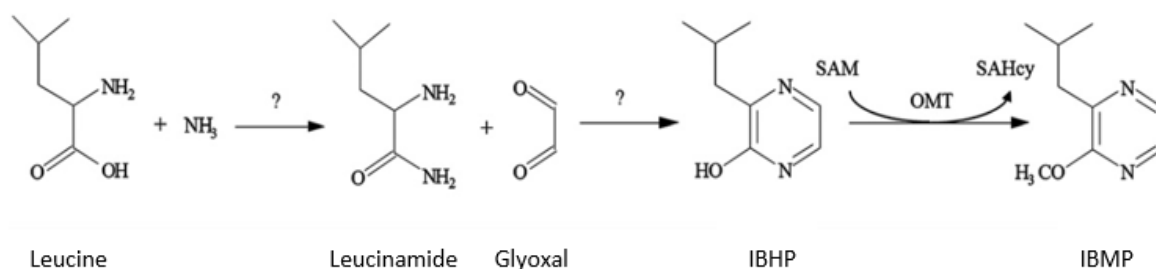


Figure 6. Voie de biosynthèse de l'IBMP dans la baie de raisin.

IBHP, 3-isobutyl-2-hydroxypyrazine; IBMP, 3-isobutyl-2-méthoxy-pyrazine; OMT, *O*-méthyltransférase; SAHcy, *S*-Adénosyl-L-homo-Cys; SAM, *S*-Adénosyl-L-Méthionine (adaptée de Hashizume *et al.*, 2001 ¹⁰⁹).

C.1.3. Accumulation de l'IBMP dans la baie

L'IBMP est accumulée dans la baie verte jusqu'au stade fermeture de la grappe ⁶⁷. Après ce pic d'accumulation, la teneur en IBMP diminue jusqu'au stade de la maturité. En effet,

la croissance végétative de la vigne amorce la biosynthèse de cette molécule ¹¹¹. Il est important de signaler que le phénomène de chute de la teneur en IBMP est indépendant de la dilution due à l'augmentation de la taille de la baie. L'IBMP serait en fait dégradée par photodégradation et/ou thermodégradation ^{67,124}. Dans le vin, la teneur en IBMP est corrélée à sa concentration dans le moût correspondant ¹²⁵. L'IBMP est très stable au cours de vieillissement des vins et elle n'est pas affectée par les mécanismes d'oxydation. Néanmoins, plusieurs paramètres comme le clone ¹¹⁰, les techniques viticoles ¹¹¹, le régime hydrique et le statut azoté ¹²⁶ possèdent un impact sur la biosynthèse et l'accumulation de cette molécule. Il est à noter que le pic d'accumulation de l'IBMP est d'autant plus élevé chez les cépages producteurs d'IBMP et sa hauteur est le reflet de l'abondance de cette méthoxypyrazine.

Au niveau de la grappe, l'IBMP se trouve principalement dans la rafle (53%). Dans la baie de raisin, elle est retrouvée majoritairement dans la pellicule (67%) et les pépins (32%) (Figure 7). Sa concentration est très faible au niveau de la pulpe ¹²⁷. Roujou de Boubée (2000), par un marquage de la molécule au deutérium, a mis en évidence l'existence d'un transport de l'IBMP des feuilles jusqu'aux baies *via* le phloème ¹¹¹. L'IBMP deutériée déposée initialement sur le limbe, est détectée dans le pétiole montrant ainsi une pénétration de cette molécule dans le limbe puis un transport vers le pétiole. En plus, l'IBMP marquée est faiblement redistribuée vers les parties de la vigne en croissance telles les jeunes feuilles et les apex (moins de 10%) signalant que la grappe constitue le centre d'appel vers lequel l'IBMP est préférentiellement dirigée. Au niveau de la grappe, l'IBMP deutériée est détectée dans la rafle mais également dans les pépins et la pellicule. Cette observation pourrait faire des feuilles un potentiel lieu de synthèse de cette méthoxypyrazine qui alimente la grappe. Cependant, une étude de Koch *et al.*, (2010) a montré que la synthèse de l'IBMP se déroule dans la baie, avec une intensité qui dépend du cépage ¹²⁸.

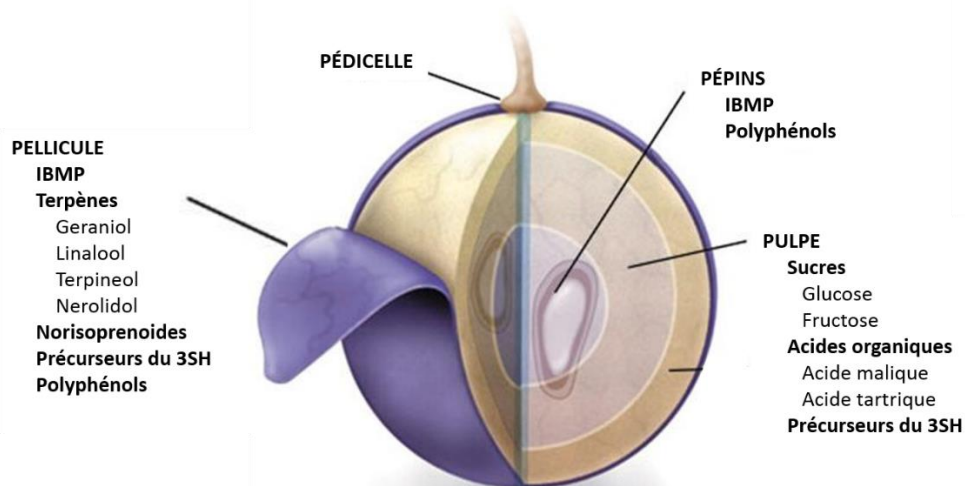


Figure 7. Localisation de certains métabolites primaires (sucres et acides organiques) et secondaires (IBMP, précurseurs du 3SH, polyphénols, terpènes et norisoprenoïdes) dans la baie de raisin (adaptée de Lund & Bohlmann 2006 ¹²⁹).

C.2. Les thiols volatils du vin

C.2.1. Caractéristiques et identification des thiols volatils

Les thiols volatils sont des composés organiques soufrés odorants et abondants dans le règne végétal. Ils peuvent contribuer négativement ou positivement au potentiel aromatique d'un vin ¹³⁰. Certains peuvent conférer des arômes négatifs comme l'odeur d'œuf pourri due à la présence du dioxyde de soufre (H₂S) formé par la levure au cours de la fermentation. Cependant, d'autres composés peuvent être responsables de certaines notes désirables telles que l'odeur de fruit de la passion et de goyave ¹³¹. Au début des années 1990, plusieurs thiols ont été identifiés dans les vins de cépage Sauvignon. La 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP), anciennement nommée la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP) a été la première molécule découverte comme étant caractéristique de l'arôme des vins de Sauvignon blanc ^{132,133}. La 4MSP évoque une odeur marquée de buis et de genêt. Elle participe à l'arôme caractéristique des feuilles de buis et des tiges foliées de genêt. Il s'agit d'une molécule extrêmement odorante possédant un seuil de perception de l'ordre de 0,8 ng L⁻¹ en solution modèle. Dans les années 1996 et 1997, Tominaga et ses collaborateurs ont identifié deux autres thiols volatils odorants d'origine variétale qui sont le 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH) anciennement nommé le 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) à l'odeur de pamplemousse et de fruit de la passion ¹³⁴ et l'acétate de 3-sulfanylhexyle (A3SH ou A3MH), issu de l'acétylation de la fonction alcool

du 3SH par la levure, évoquant le buis et le fruit de la passion ¹³⁵. Ces deux composés participent à l'arôme caractéristique du pamplemousse où ils ont été également identifiés ¹³⁶. Le seuil de perception de l'A3SH est de l'ordre de 4 ng L⁻¹ et celui du 3SH est de 60 ng L⁻¹. Dans le vin, l'A3SH est trouvé en des teneurs allant de 0 à 500 ng L⁻¹ alors que le 3SH à des concentrations beaucoup plus importantes (150–3500 ng L⁻¹). D'autres thiols volatils ont été identifiés par ces mêmes auteurs en 1998, le 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-ol (4MMPOH) associé à l'arôme de zeste d'agrumes et le 3-méthyl-3-sulfanylbutan-1-ol associé à l'odeur de poireau cuit ¹³⁷. Récemment, le 3-sulfanylpentan-1-ol et le 3-sulfanylheptan-1-ol à l'arôme de pamplemousse et le 2-méthyl-3-sulfanylbutan-1-ol à l'odeur d'oignon ont été identifiés par Sarrazin en 2007 dans les vins liquoreux issus des baies atteintes par la pourriture noble ¹³⁸.

Ultérieurement, le 3SH et le A3SH ont été aussi identifiés dans d'autres cépages blancs et noirs tels que le Gewürztraminer, le Muscat, la Negrette, le Pinot gris, le Riesling, le Sémillon, le Merlot et le Cabernet-Sauvignon ¹³⁸⁻¹⁴¹. La présence de la 4MSP est plus spécifique au Sauvignon, mais a toutefois été signalée dans les vins de Maccabeo, de Scheurebe et de Grenache.

Le 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH) est le thiol le plus abondant et qui est retrouvé dans un grand nombre de vins. Il est présent dans le vin à des teneurs généralement supérieures à son seuil de perception. Dans le vin, il est présent sous forme d'énantiomères : R et S avec un ratio de 50:50 dans les vins blancs secs. Ces énantiomères possèdent respectivement des seuils de perceptions de 50 et de 60 ng L⁻¹. Les arômes qu'ils évoquent sont légèrement différents : la forme R évoque des notes de pamplemousse et de citron alors que la forme S serait associée à des nuances de fruit de la passion. Les 2 formes énantiomériques de l'A3SH sont également présentes dans le vin. La forme R (à l'odeur de fruit de la passion) est beaucoup moins abondante que la forme S (à l'odeur de buis) (30:70) ¹⁴².

C.2.2. Origine des thiols volatils

C.2.2.1. Notion de retour aromatique et potentiel aromatique

La notion de précurseur d'arôme non volatile ou de retour aromatique dans la baie avait été pressentie par Peynaud dans les années 80 ¹⁴³. En effet, les vins de Sauvignon blanc à l'arôme si caractéristique, sont obtenus à partir de moûts à complexité aromatique

modérée. Le Sauvignon blanc est d'ailleurs classé dans les cépages à saveurs simples. Peynaud l'exprimait dans ces termes : « ...lorsqu'on croque le grain doré à peau épaisse du Sauvignon, on ressent le parfum particulier quoique peu intensément. De même, le jus fraîchement préparé est peu odorant et dans un premier temps, l'arôme de bouche est discret. C'est vingt ou trente secondes plus tard après l'avoir avalé, que brusquement apparaît dans l'arrière cavité du nez, en une explosion parfumée, un retour aromatique sauvignonné... On peut dire que la vinification révèle l'arôme primaire caché dans le fruit. Le vin présente plus l'odeur de fruit que le raisin... La fermentation agit comme un révélateur d'arôme et libère les principes odorants du raisin ».

Ainsi il semblait évident que la baie renfermait des composés à l'origine de ces arômes. Contrairement à certains composés comme les méthoxypyrazines, les thiols volatils sont quasiment absents de la baie et du moût. Toutefois, ils sont issus de précurseurs non volatils et inodores présents dans la baie de raisin et libérés au cours de la fermentation alcoolique ^{133,135}. Ces derniers peuvent être considérés comme le potentiel aromatique variétal du vin. Une dizaine d'années après les premières observations de Peynaud, l'existence d'un précurseur de la 4MSP dans le raisin a été démontrée mais sa nature chimique demeurait encore inconnue ¹³². C'est en 1998 que les premiers précurseurs ont été identifiés. Tominaga a montré que le 3SH et la 4MSP étaient présents dans le moût sous forme de *S*-conjugué à la cystéine : le *S*-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine et la *S*-4-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine décrits respectivement comme précurseurs du 3SH et de la 4MSP ¹⁴⁴ (Figure 8). Plus récemment, d'autres précurseurs cystéinylés, associés aux thiols volatils spécifiques des vins liquoreux, ont pu être identifiés dans les moûts obtenus à partir de raisins infectés par la pourriture noble ¹⁴⁵.

En 2002, Peyrot des Gachons a mis en évidence la présence du précurseur glutathionylé du 3SH, le *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathion (Glut-3SH) dans le moût ¹³⁶. Dans cette même étude, il a été supposé que la forme cystéinylée du précurseur du 3SH (Cys-3SH) proviendrait du catabolisme du Glut-3SH. Une forme glutathionylée de la 4MSP a également été retrouvée dans les moûts de Sauvignon blanc ¹⁴⁶.

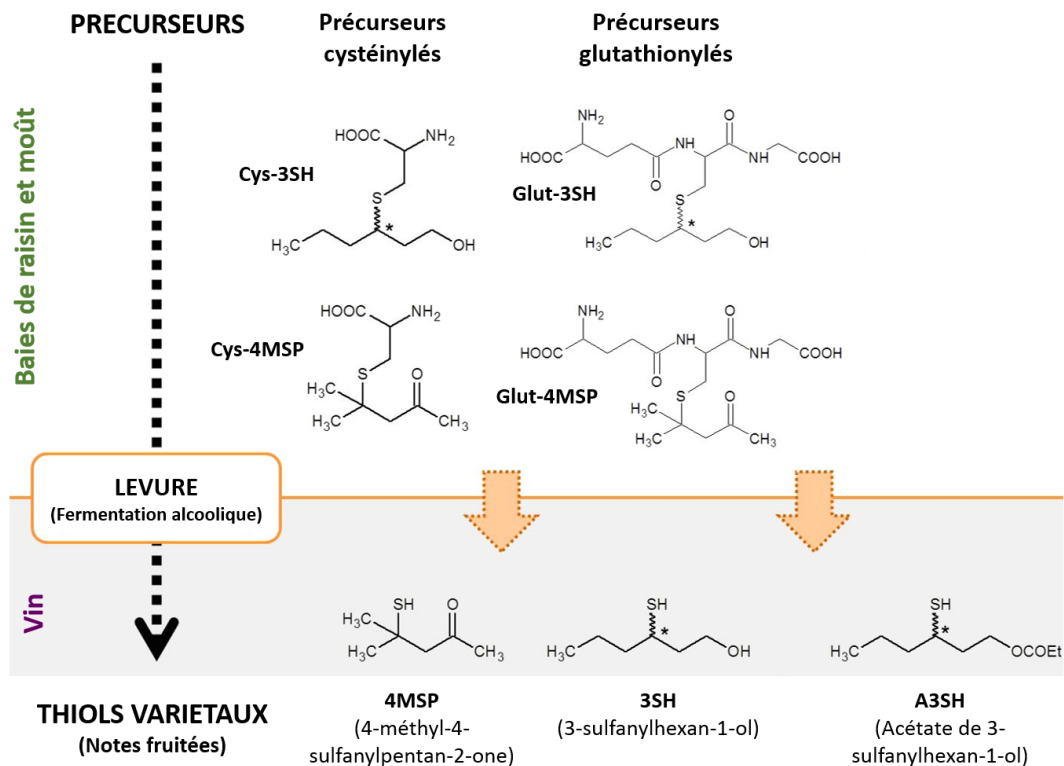


Figure 8. Les trois thiols volatils majeurs et leurs précurseurs cystéinylés et glutathionylés (adaptée de Roland *et al.*, 2010¹⁴⁷).

C.2.2.2. Biosynthèse des précurseurs d'arômes dans la baie

Les voies de biosynthèse des précurseurs des thiols volatils sont encore loin d'être totalement élucidées. Des études récentes¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ ont montré la formation du Cys-3SH à partir du Glut-3SH lui-même obtenu par la conjugaison du glutathion (GSH) avec le *trans*-2-hexenal issu de la voie de lipoxygénase. La présence d'un intermédiaire aldéhyde (Glut-3SHAl) résultant de la conjugaison du *trans*-2-hexenal et du glutathion a été mise en évidence par Capone en 2011¹⁵⁰ et par Thibon en 2015 (article soumis). Kobayashi *et al.*, (2010) ont signalé l'existence du précurseur 3SH-cystéineglycine (Cysgly-3SH) comme étant un intermédiaire entre le précurseur glutathionylé et le précurseur cystéinylé¹⁴⁸ (Figure 9).

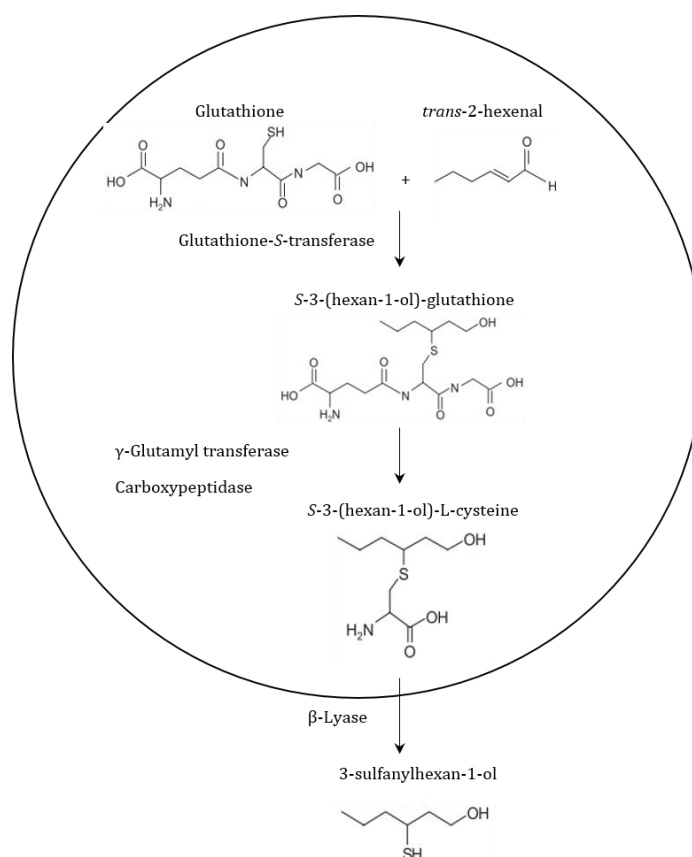


Figure 9. Voie de biosynthèse du précurseur glutathionylé (Glut-3SH) et du précurseur cystéinylé (Cys-3SH) du 3SH dans les baies de raisin.

La formation du 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH) a lieu au cours de la fermentation alcoolique par la levure (adaptée de Kobayashi *et al.*, 2010¹⁴⁸ et Thibon *et al.*, 2011¹⁴⁹).

La réaction d'addition du *trans*-2-hexenal au glutathion pour générer le Glut-3SH est réalisée par une Glutathion-S-transférase (GST). Ainsi la synthèse du Cys-3SH à partir du Glut-3SH nécessite la présence de 2 autres enzymes : la γ -glutamyltranspeptidase (GGT) qui catalyse la réaction d'élimination de l'acide glutamique et une carboxypeptidase responsable de l'élimination de la glycine afin de produire le Cys-3SH. Récemment, une étude de Kobayashi *et al.*, (2011) a identifié trois gènes, *VviGST3*, *VviGST4* et *VviGGT*, comme étant des gènes clés codant des enzymes indispensables dans la voie de biosynthèse du 3SH¹⁵¹. Dans cette étude, il a été montré qu'une induction des gènes *VviGST3* et *VviGST4* est suivie par une accumulation du Glut-3SH. Ces mêmes auteurs ont également démontré *in vitro* que la conjugaison du GSH au *trans*-2-hexenal est réalisée *via* l'activité de *VviGST3* et *VviGST4* permettant ainsi la formation du Glut-3SH et que ce dernier peut être converti en Cysgly-3SH par la GGT, puis en Cys-3SH par une carboxypeptidase.

C.2.2.3. Révélation du potentiel aromatique au cours de la fermentation alcoolique

Au cours de la fermentation alcoolique, les thiols volatils sont libérés à partir de leurs formes précurseurs sous l'action de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par un clivage de la liaison carbone-sulfure (C-S) par une enzyme de type β -lyase^{136,144,146,152}. Il a été montré que le taux de libération des thiols est dépendant de la souche de levure utilisée^{140,153}. Ce taux de conversion est faible (quelques pourcents) ce qui explique que les concentrations des précurseurs des thiols volatils dans la baie ou le moût sont plus importantes que celles en thiols retrouvées dans le vin¹⁵⁴. Moins de 5% du Glut-3SH est transformé en 3SH alors que le taux de conversion du Cys-3SH est de 0,1 à 12%^{148,155-157}. Les teneurs en thiols volatils dans les vins de Sauvignon blanc seraient corrélées aux celles en précurseurs cystéinylés présentes dans le moût¹³⁶, bien que ce sujet soit controversé. Le mécanisme de conversion du précurseur glutathionylé en son thiol n'est pas encore bien élucidée mais des hypothèses d'un processus à plusieurs étapes a été déjà discuté^{155,157,158}. Dans ce processus, la première étape consiste tout d'abord à une dégradation du tripeptide glu-cys-3SH-gly en ces acides aminés correspondants (Glu, Cys-3SH et Gly)¹⁵⁹ suivi d'un clivage du Cys-3SH par une enzyme de type β -lyase afin de libérer le thiol. Dans son étude en 2011, Winter *et al.*, ont signalé que le taux de conversion des précurseurs dépend également du type de transporteur qui va prendre en charge le précurseur sachant que chaque précurseur est porté par un transporteur différent¹⁵⁷.

C.2.2.4. Accumulation des précurseurs au cours de la maturation

Dans la baie de raisin, la teneur des deux précurseurs du 3SH (Glut-3SH et Cys-3SH) augmente au cours de la maturation. Leurs teneurs sont considérées maximales 16 semaines après la floraison^{136,148,160} et cette augmentation paraît être dépendante des facteurs environnementaux tels que le climat et le type de sol (en particulier le régime hydrique et la nutrition azotée), le clone et le porte-greffe. Par ailleurs, il a été montré que le mode de récolte (main *versus* mécanique), la durée de transport, les opérations pré-fermentaires telles que la macération pelliculaire, le pressurage, le débourbage ou encore la stabulation influencent la teneur des précurseurs dans le raisin^{21,148,154,156,161-164}.

Dans la baie de raisin ainsi que dans le moût, la concentration du précurseur glutathionylé du 3SH (Glut-3SH) est beaucoup plus importante que celle du précurseur cystéinylé (Cys-

3SH). Elle peut atteindre des teneurs proches de 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ dans le moût de Sauvignon blanc ^{148,150,154,155,165,166}.

C.2.3. Elevage et réactivité des thiols volatils

Au cours de l'élevage et du vieillissement du vin, la teneur en thiols volatils diminue très certainement en lien avec les conditions d'oxydation.

Les thiols volatils sont des composés aromatiques très réactifs de part leur noyau nucléophile. Ils peuvent s'oxyder en présence de l'oxygène pour former entre autres des bisulfites. De faibles quantités d'O₂ sont suffisantes pour déclencher les phénomènes d'oxydation ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Deux types principaux d'oxydation sont décrits : l'oxydation chimique très lente et l'oxydation enzymatique rapide au cours de laquelle intervient des enzymes de type tyrosinase ou laccase ¹⁷⁰.

Les propriétés nucléophiles des thiols leur confèrent la possibilité de réagir avec des composés électrophiles tels que les *o*-quinones, des formes oxydées des polyphénols ¹⁷¹⁻¹⁷³. Il a été montré que ces phénomènes d'oxydation dépendent de l'activité des enzymes d'oxydation (polyphénol oxydase et laccase), de la teneur en substrat des enzymes impliquées (acide *trans*-caftaric, flavan-3-ols), de la température du milieu et de la présence des métaux jouant le rôle de catalyseurs ^{173,174}.

C.2.3.1. Le dioxyde de soufre (SO₂)

En plus de ces propriétés antiseptiques, le dioxyde de soufre (SO₂) est un antioxydant puissant qui combine, en présence de catalyseurs, l'oxygène dissout. Cette réaction est lente et met les vins à l'abri de l'oxydation de nature chimique. En plus, le SO₂ permet d'inhiber ou de détruire les enzymes responsables de l'oxydation des phénols, des sucres et des acides aminés ¹⁷⁵. Selon Sayavedra-Soto et Montgomery (1986), la forme bisulfite (HSO₃⁻) du SO₂ est à l'origine de son rôle protecteur. Le bisulfite se lie à ces enzymes *via* une réaction irréversible et modifie leur structure provoquant ainsi une altération de leur activité ^{170,176,177}.

C.2.3.2. Glutathion (GSH)

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (L-glutamate, L-cystéine et glycine) possédant de nombreux rôles physiologiques et biochimiques dans la cellule végétale (détoxification, métabolisme du soufre et de l'azote, contrôle du potentiel redox...) ¹⁷⁸. Il se trouve

majoritairement dans la cellule sous forme réduite (>90%)¹⁷⁹. Les propriétés nucléophiles et redox du GSH lui confèrent un rôle clé en viticulture et en œnologie. En piégeant les *o*-quinones, le GSH protège les thiols volatils contre les phénomènes d'oxydation limitant ainsi la perte des composés d'arômes^{164,180,181}.

La teneur en GSH dans la baie de raisin varie entre 17 et 114 mg kg⁻¹ dépendant de la variété et du cépage. Cette teneur est également dépendante du millésime, du sol et des techniques viticoles¹⁸², en particulier le statut azoté de la vigne¹⁸³. Dans la baie, la teneur en GSH augmente au cours de la maturation¹⁸⁴. Dans le moût, la concentration en cette molécule est très variable (allant du non détectable à une centaine de milligramme par litre) et pourrait être affectée par plusieurs facteurs tels que le statut azoté de la vigne, la présence de l'oxygène pendant les étapes pré-fermentaires, le pressurage et la vinification^{161,185,186}. Au cours de la fermentation alcoolique (FA), il a été montré que *Saccharomyces cerevisiae* assimile très rapidement le GSH. En revanche, si la FA est totale et relativement rapide, une partie du GSH assimilé est libéré dans le vin après la FA. Par ailleurs, la présence de GSH dans le vin blanc améliore son aptitude au vieillissement^{164,187,188}.

D. Effet de l'azote sur la teneur en composés aromatiques

Le type de sol, ses réserves en eau et sa composition minérale agissent sur la concentration en composés aromatiques du raisin. L'objectif de ce travail est de progresser dans la compréhension de l'impact du sol et de la nutrition minérale qu'il confère à la vigne sur la composition du raisin et du vin en arômes et en précurseurs d'arômes. L'étude se concentre sur l'azote, qui est sans aucun doute l'élément minéral qui influence le plus fortement le développement de la vigne, son rendement et la composition de ses raisins.

Il est bien connu que des vignes ayant une alimentation azotée non limitante possèdent généralement une vigueur excessive. Ce fort développement de la canopée provoque généralement un ombrage important et limite l'éclairement reçu par les baies. Il diminue également les températures au niveau de la grappe. Ces phénomènes ont pour conséquence un retard de la maturité des baies ainsi qu'une modification des métabolismes primaire et secondaire ^{67,189-191}. La sous-maturité est généralement caractérisée par des notes aromatiques végétales provoquées, entre autres, par la présence de méthoxyypyrazines telles que l'IBMP. Il a été montré que la teneur en IBMP dans le raisin est dépendante du rayonnement. L'effet inhibiteur est maximal à partir de 25 à 50% du rayonnement incident normal ¹⁹¹. Cet effet est plus marquant si une absence de contrainte hydrique a lieu aux stades précoces du développement de la vigne ^{111,113-115,192,193}. Concernant les thiols volatils, une augmentation de la température ou du rayonnement au niveau de la grappe pourrait être favorable à l'accumulation du 3SH et du A3SH dans les raisins de Sauvignon blanc ¹⁹⁴. Il a été montré qu'une réduction des rayons UV diminue leurs teneurs et celle du GSH dans le moût à la récolte ¹⁹⁴. Un même effet des rayonnements UV sur les précurseurs du 3SH dans la baie de raisin a été décrit par Kobayashi et ses collaborateurs en 2011 ¹⁵¹. Une étude de Schüttler sur le Riesling a montré une augmentation de la concentration en précurseur glutathionylé du 3SH dans les baies exposées à la lumière ¹⁶⁵.

Roujou de Boubée a montré que la teneur en IBMP des baies dépend du type de sol. La concentration en IBMP de baies produites sur un sol sableux était quatre fois plus élevée comparée à celle des raisins produits sur un sol graveleux ¹¹¹.

La fertilité minérale du sol mais aussi sa capacité à retenir l'eau peuvent agir sur la vigueur des ceps, notamment sur la surface foliaire ; la modification du micro-climat ou du nombre et de la surface des feuilles induit par la plus forte vigueur pourrait en partie expliquer les différentes teneurs en IBMP.

Mendez-Costabel en 2014 a également montré qu'une fertilisation azotée accompagnée d'une irrigation des ceps stimule la croissance végétative, diminue l'exposition des grappes à la lumière et par conséquent, augmente la teneur en IBMP dans les baies au cours de la maturation ¹²⁶. Dans cette même étude, aucune différence significative sur le contenu en IBMP a été observée entre les plantes entièrement irriguées et celles entièrement irriguées et fertilisées avec de l'azote.

✓ *L'étude de l'effet du statut azoté de la vigne sur la teneur en IBMP des raisins n'a pas été menée en l'absence d'une modification de la vigueur et d'une contrainte hydrique.*

L'azote peut être considéré comme étant un nutriment limitant pour le développement de la vigne et pour la maturation du raisin. En outre, il est bien connu que dans le règne végétal, le nitrate et les métabolites azotés agissent comme des molécules de signalisation qui régulent la synthèse ou la dégradation des composés impliqués dans divers processus et mécanismes, y compris le métabolisme secondaire, le transport des hormones et la production des protéines.

✓ *Une question importante est de savoir si l'azote influence directement la synthèse et/ou la dégradation de l'IBMP (qui est un composé azoté), via une modification de l'expression des gènes VviOMTs ou, si cet effet est médié par une influence de l'azote sur la vigueur de la vigne et la modification du micro-climat lumineux et thermique associé.*

A la fin des années 1990, Tominaga et ses collaborateurs ont identifié le 3-sulfanylhéxan-1-ol (3SH), un composé évoquant l'odeur de pamplemousse et de fruit de la passion décrits dans les vins de Sauvignon blanc ¹³⁷. Ensuite, ce même auteur a mis en évidence la présence d'un précurseur cystéinylé (Cys-3SH) du 3SH dans le moût ¹⁴⁴. En effet, au cours de la fermentation alcoolique, le 3SH est libéré du précurseur sous l'effet de *Saccharomyces cerevisiae*. En 2002, Peyrot des Gachons a montré l'existence d'un précurseur du Cys-3SH, le précurseur glutathionylé (Glut-3SH) dans le moût ¹³⁶. Dans un deuxième temps, des études ont été conduites sur l'effet des facteurs environnementaux

sur l'accumulation de ces précurseurs dans la baie de raisin, notamment la nutrition azotée ^{21,161,183}.

Peyrot des Gachons en 2005 a montré que sur un sol riche en azote, la teneur en précurseurs du 3SH dans le moût du Sauvignon blanc est plus élevée que sur un sol pauvre en ce nutriment. Par conséquent, l'alimentation en azote de la vigne doit être au moins modérée pour l'obtention des raisins blancs à fort potentiel œnologique ²¹. Choné *et al.*, (2006) ont montré de la même façon un effet positif de la fertilisation azotée sur le précurseur cystéinylé du 3SH et le glutathion dans le moût du Sauvignon blanc planté sur un sol carencée en azote ¹⁶¹. Lacroux *et al.*, (2008) ont étudié l'effet de la fertilisation azotée foliaire sur les composés aromatiques, particulièrement le 3SH et le glutathion. Ils ont mis en évidence un effet positif d'une pulvérisation d'azote foliaire sur la concentration de ces métabolites par rapport à celle du témoin non fertilisé ¹⁸³.

✓ *La fertilisation azotée permet ainsi une augmentation de la teneur en précurseur cystéinylé du 3SH dans la baie de raisin et dans le moût ainsi que de la teneur en 3SH dans le vin. Cependant, l'impact éventuel de la nutrition azotée sur la teneur en précurseur glutathionylé du 3SH n'a pas encore été étudié.*

Récemment, des hypothèses sur la voie de biosynthèse des précurseurs du 3SH et la contribution de chacun des deux précurseurs (Glut-3SH et Cys-3SH) dans la libération de ce thiol ont été évoquées dans de nombreuses études ^{149,151,155-158}. En se basant sur les processus chimiques conduisant à la formation de chacun des précurseurs, l'implication d'une glutathion-S-transferase (GST), d'une γ -glutamyltranspeptidase (GGT) et d'une carboxypeptidase semble être prépondérante. De plus, trois gènes (*VviGST3*, *VviGST4* et *VviGGT*) ont été décrits en 2011 comme étant les gènes clés dans la biosynthèse des précurseurs du 3SH ¹⁵¹. Cependant, les voies de biosynthèse sont encore loin d'être totalement élucidées.

✓ *La réponse des gènes *VviGST3*, *VviGST4* et *VviGGT* à la nutrition azotée n'a pas été établie. Ainsi, une fertilisation azotée comparée à un témoin non fertilisé, suivie d'un « screening » tout d'abord de toutes les *VviGSTs*, des *VviGGTs* et des carboxypeptidases, ensuite de tous les gènes qui répondent à la variation du statut azoté de la vigne, semble être une stratégie pertinente permettant l'identification de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans cette voie de biosynthèse.*

OBJECTIFS

En se basant sur ces données, mon projet de recherche a eu pour objectifs :

- de déterminer l'effet direct du statut azoté de la vigne sur la biosynthèse de l'IBMP et sur l'expression des gènes *VviOMTs* en l'absence d'un déficit hydrique et d'une variation de la vigueur des ceps.
- de suivre la synthèse et l'accumulation des précurseurs du 3SH au cours de la maturation du raisin et d'étudier l'effet direct du statut azoté de la vigne sur leurs teneurs dans la baie et dans le moût à la récolte ainsi que sur la teneur en 3SH dans le vin.
- d'étudier la réponse des gènes *VviGST3*, *VviGST4* et *VviGGT* de la voie de biosynthèse des précurseurs du 3SH à la nutrition azotée et d'identifier d'autres gènes clés impliqués dans cette voie.
- d'améliorer les connaissances sur les voies métaboliques influencées par le statut azoté de la vigne par une étude globale du transcriptome de la vigne.

Afin de réaliser cette étude, différentes modalités de fertilisation azotée en comparaison avec un témoin non fertilisé ont été mises en place dans des parcelles de Sauvignon blanc, de Cabernet-Sauvignon et de Pinot noir à Bordeaux, à Sancerre et en Nouvelle-Zélande. En parallèle, un dispositif d'étude de la nutrition azotée de la vigne sur le métabolisme de la baie de raisin a été mis en place sur des plants en pots afin d'atteindre certains des objectifs dans des conditions plus contrôlées.

RESULTATS

ARTICLE I

Recherche sur l'effet du statut azoté de la vigne sur la biosynthèse de la 2-methoxy-3-isobutylpyrazine dans la baie de raisin et le vin

Les arômes perçus dans le vin retracent son histoire. Ils sont liés à l'encépagement, les techniques culturales, à la vinification, l'élevage, ainsi que les caractéristiques du terroir. Les composés aromatiques contribuent aux propriétés organoleptiques du vin et participent ainsi à sa typicité et son style. Parmi eux, les méthoxy-pyrazines (MP) responsables de l'arôme végétal décrit dans les vins issus de plusieurs cépages tels que Cabernet-Sauvignon ou Sauvignon blanc, sont très étudiées. Les MP appartiennent à la famille des arômes variétaux libres dont la biogenèse a lieu dans la baie de raisin et qui sont directement perceptibles par les récepteurs olfactifs.

Trois MP sont décrites dans les vins : la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine (IBMP) à forte odeur de poivron vert, la 2-méthoxy-3-*sec*-butylpyrazine (SBMP) à l'odeur d'asperge et la 2-méthoxy-3-isopropylpyrazine (IPMP) évoquant l'odeur du petit pois. Dans la baie de raisin, le moût et le vin, la 3-isobutyl-2-méthoxy-pyrazine (IBMP) est la plus abondante des MP et peut contribuer d'une façon significative à l'arôme variétal du vin. Dans un vin rouge, la présence des notes végétales due à la présence d'IBMP n'est, en règle générale, pas souhaitable. Cependant, dans un vin blanc, leur présence peut apporter une certaine fraîcheur mais en aucun cas les saveurs herbacées ne doivent dominer les saveurs fruitées.

La voie de biosynthèse de l'IBMP n'est pas encore bien élucidée mais il a été montré que le substrat de l'IBMP est la 3-isobutyl-2-hydroxypyrazine (IBHP), elle-même issue du métabolisme de la leucine. Récemment, deux gènes clés de sa voie de biosynthèse ont été identifiés, *VviOMT3* et *VviOMT4*, impliqués tous les deux dans l'*O*-méthylation de l'IBHP en IBMP.

De nombreuses études se sont intéressées à l'effet de l'azote, considéré comme une composante essentielle du terroir viticole et des pratiques culturales, sur les composés aromatiques du raisin et notamment l'IBMP. Il a été montré que la fertilisation azotée (i) stimule la croissance végétative conduisant à une augmentation de la surface foliaire, (ii) diminue l'exposition des grappes à la lumière et (iii) augmente la teneur en IBMP dans les baies au cours de la maturation. Les mêmes observations sont décrites dans le cas d'une fertilisation azotée couplée à une irrigation.

En outre, le nitrate et les métabolites azotés agissent comme des molécules de signalisation qui régulent la synthèse et/ou la dégradation de nombreux composés y compris les métabolites secondaires.

Cependant la question qui n'a pas encore trouvé de réponse satisfaisante est la suivante : est-ce que le statut azoté de la vigne impacte directement la synthèse et/ou la dégradation de l'IBMP (qui est un composé azoté) *via* la modification de l'expression des gènes *VviOMT3* et *VviOMT4* ou bien cet effet est-il médié par une influence de l'azote sur la vigueur de la vigne et la modification du micro-climat lumineux et thermique associé ?

Dans cette partie, nous avons cherché à découpler l'effet de l'azote de ceux de la vigueur et du statut hydrique de la vigne.

L'étude a été menée en 2013 et 2014 sur trois variétés de *Vitis vinifera* (Sauvignon blanc, Cabernet-Sauvignon et Pinot noir) dans trois vignobles (Pessac Léognan-France, Sancerre-France et Marlborough-Nouvelle-Zélande). Dans le cadre des vignobles français, quatre modalités ont été étudiées : un contrôle où aucune fertilisation n'a été appliquée, une fertilisation de 50 ou de 100 kg d'azote par hectare ajoutés au sol et une fertilisation foliaire de 15 kg d'azote par hectare sous forme d'urée. En Nouvelle-Zélande, l'étude a été réalisée uniquement en 2014 et seules deux conditions ont été étudiées : un contrôle *versus* N+ où 375 g d'azote par cep ont été ajoutés au sol.

Concernant l'expérimentation réalisée en France, l'analyse des métabolites primaires et secondaires a été réalisée sur les baies produites dans les deux vignobles pour les quatre modalités. Toutefois l'analyse de l'expression des gènes a été uniquement mise en œuvre sur les baies du vignoble bordelais (Sauvignon blanc et Cabernet-Sauvignon) pour les modalités contrôle et N100.

En Nouvelle-Zélande, l'étude a été menée en collaboration avec le « Wine, Food and Molecular Biosciences département » de l'Université de Lincoln et avec le « Marlborough Wine Research Center » à Blenheim. Les résultats obtenus en Nouvelle-Zélande sont comparés à ceux obtenus à Bordeaux et à Sancerre. Ils sont présentés en données supplémentaires à la fin de cette partie.

Vine nitrogen status does not have a direct impact on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and wines

Pierre Helwi^{1,2,3}, Aude Habran^{1,3}, Sabine Guillaumie^{1,3}, Cécile Thibon^{4,5}, Ghislaine Hilbert^{1,3}, Eric Gomes^{1,3}, Serge Delrot^{1,3}, Philippe Darriet^{4,5}, Cornelis van Leeuwen^{*,2}

Accepted for publication in the *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
(*jf-2015-03838c*)

¹Univ. de Bordeaux, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), Ecophysiology and Functional Genomics of the Vine (EGFV), UMR 1287, 33140 Villenave d'Ornon, France.

²Bordeaux Sciences Agro, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), Ecophysiology and Functional Genomics of the Vine (EGFV), UMR 1287, 33140 Villenave d'Ornon, France.

³INRA, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), Ecophysiology and Functional Genomics of the Vine (EGFV), UMR 1287, 33140 Villenave d'Ornon, France.

⁴Univ. de Bordeaux, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), Unité de recherche Œnologie, EA4577, 33140 Villenave d'Ornon, France.

⁵INRA, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), USC 1366 Œnologie, 33140 Villenave d'Ornon, France.

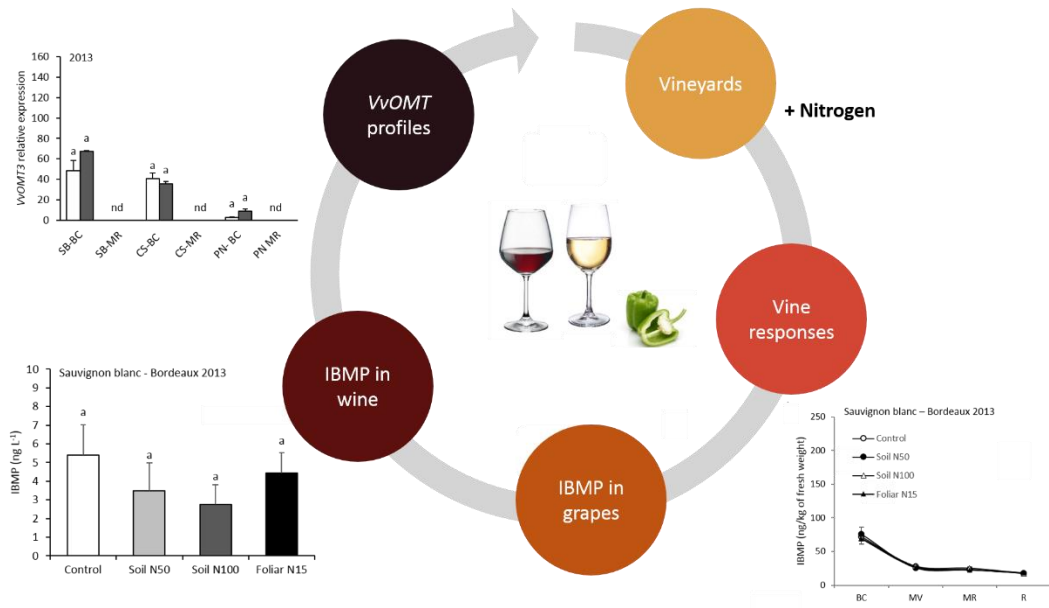
*(C.v.L)

Phone: +33 05 57 35 07 55

Fax: +33 05 57 35 07 59

E-mail: vanleeuwen@agro-bordeaux.fr

TABLE OF CONTENT GRAPHIC



No direct effect of vine N-status on grape and wine IBMP, nor on the genes involved in its biosynthesis

ABSTRACT

Methoxypyrazines (MP) constitute a large family of compounds which contribute to the vegetative varietal aroma of many grapevine varieties and wines. The berry content in 2-methoxy-3-isobutylpyrazine (IBMP), a major MP reminiscent of green-pepper aroma, can be influenced by environmental factors or cultural practices as water status or mineral nutrition. To date, no study has investigated a possible direct effect of nitrogen (N) on IBMP synthesis without possible interference with water status and vigor variations. In this study, only vine nitrogen status was significantly different among treatments. Water status was controlled during the season and vine vigor was similar among treatments. IBMP level is maximal at bunch closure and decreases during the season. There was no significant effect of nitrogen nutrition on this metabolite. Moreover the expression profile of *VviOMT3* and *VviOMT4*, key genes in IBMP biosynthetic pathway was similar between treatments. This result indicates that when an effect of N on IBMP was found in previous studies, it was likely mediated through the modification of bunch-zone microclimate, induced by the higher vigor of high N-status vines.

KEYWORDS: 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, aroma, IBMP, nitrogen, *Vitis vinifera*, grape berries, wine, *VviOMT*

A

Name	3-sec-butyl-2-methoxypyrazine(SBMP)	2-isopropyl-3-methoxypyrazine (IPMP)	3-isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP)
Threshold (ng L ⁻¹)	1	2	2

B

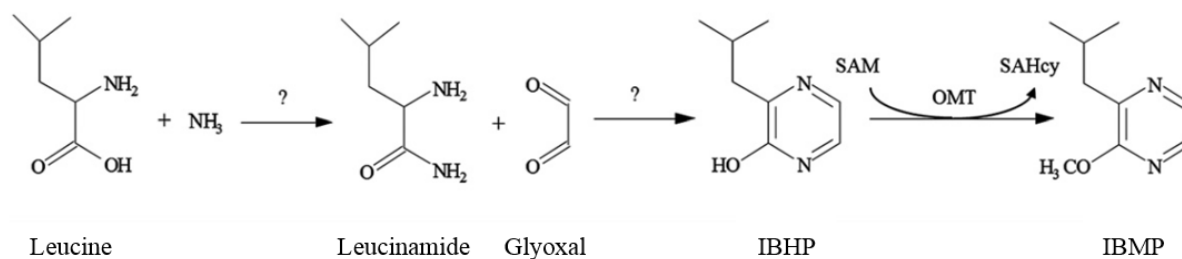


Figure 1. Methoxypyrazines found in grape berries and their detection threshold in water in ng L⁻¹ (A) and an hypothetical biosynthetic pathway of IBMP in grape berries adapted from Hashizume *et al.*, 2001¹⁰⁹ (B).

IBHP, 3-isobutyl-2-hydroxypyrazine; IBMP, 3-isobutyl-2-methoxypyrazine; OMT, *O*-methyltransferase; SAHcy, *S*-Adenosyl-l-homo-Cys; SAM, *S*-Adenosyl-l-Methionine.

INTRODUCTION

Aromas are major contributors to the organoleptic proprieties of wine. They are an essential part of the characteristics that define its typicality and style. The sensory aroma perception is the result of the presence and the interaction of many volatile compounds. The molecules responsible for these aromas are largely influenced by environmental conditions, viticultural practices and wine making techniques. These molecules can be divided into three main families: primary (varietal) aromas originating from the berry, secondary aromas produced during alcoholic fermentation by the yeast and tertiary aromas formed during wine aging ¹⁰³.

Among varietal aromas that can be considered as key elements in the olfactory image of a wine, pyrazines play an important role in flavor chemistry. These volatile molecules are very odorant heterocycles with vegetable-like fragrances. They are widely existing in the plant kingdom ¹⁹⁵. Their perception thresholds in wines are very low, in order of 15 ng L^{-1} ¹¹¹. These varietal aromas can be found in grape berries as free volatile molecules ^{104,196}. Among others, methoxypyrazines (MP) are present in wines produced from Sauvignon blanc, Cabernet-Sauvignon, Cabernet franc, Carmenère, and Semillon ¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Three methoxypyrazines are described in grapes: SBMP (2-methoxy-3-*sec*-butylpyrazine), IPMP (2-methoxy-3-isopropylpyrazine) and IBMP (2-methoxy-3-isobutylpyrazine) (Figure 1A). The odors of these molecules are vegetable-like, and show sometimes earthy nuances. IPMP is described to have an aroma of asparagus ¹¹⁹ while the aroma of SBMP is described as being similar to galbanum oil ^{107,197}, and IBMP has a distinct green capsicum (bell pepper) aroma ¹⁰⁶ (Figure 1A). Among these three methoxypyrazines, IBMP was found in the highest concentrations ¹¹¹ and contributes largely to the varietal aroma of wines. In red wine produced from Cabernet-Sauvignon cultivar, IBMP is considered as an off-flavor and can have a negative effect on wine when its concentration is above 10 ng L^{-1} ^{110,111}. On the other hand, the same aroma can contribute to some freshness and desirable flavors in white wines produced from Sauvignon blanc berries if its concentration do not largely exceed its detection threshold ^{115,116}. In grape berries, IBMP content increases during early stages of berry development and a maximum level is reached 2 to 3 weeks prior to veraison, before it decreases until ripeness ¹²³. Its concentration in wine is highly correlated with the grape berry content at harvest ¹²⁷ and its sensory detection threshold in wine matrixes ranges between 1 and 15 ng L^{-1} ¹⁹³.

Little is known about the biosynthetic pathway of IBMP, and the one proposed refers to microbial synthesis. The first step of biosynthesis is an addition reaction of a α -dicarbonyl (presumably glyoxal) on a branched amino acid (leucine for IBMP) leading to the formation of a 2-hydroxy-3-isobutylpyrazine (IBHP) non-volatile intermediate. IBHP is subsequently methylated by an *O*-methyltransferase (OMT) to release the corresponding volatile MP (IBMP) (Figure 1B) ^{107,109,120,122}. In 2010, two OMT named VviOMT1 and VviOMT2 were characterized but their activity towards the IBHP substrate was not specific ¹⁹⁸. In 2013, Guillaumie *et al.* and Dunlevy *et al.* have identified in grape berries two other OMT, VviOMT3 and VviOMT4, which were able to catalyze such reaction with a high specificity ^{65,199} (Figure 1B).

In viticulture, *terroir* is defined as an interactive ecosystem, including climate, soil, the vine and human factors like viticultural and enological practices ^{4,200}. As IBMP contributes to the varietal aroma of wines produced from Sauvignon blanc and Cabernet-Sauvignon, among other varieties, several studies have been conducted to investigate the influence of different *terroir* factors on the level of this compound in these varieties ^{111,126,190,193,201,202}. Nitrogen, an essential element that vines pick up from the soil, can be considered as a key contributor to the *terroir* effect ^{2,50}. Nitrogen influences berry sugar content, total phenolics, flavonoid ²⁰³ and aroma compounds such as volatile thiols precursors ^{161,183}. Regarding vine development, nitrogen has a major impact on shoot growth, yield and sensitivity to fungal diseases, and in particular to *Botrytis cinerea* ⁷⁰. Nitrogen influences the plant vegetative growth referred as vine vigor which is stimulated by an excessive nitrogen supply ⁸⁸. Vigorous vines are characterized by an important leaf area which results in shaded grapes characterized by high amounts of IBMP ⁶⁷. Furthermore, high irrigation level coupled to nitrogen addition promotes vine vigor, resulting in increased amounts of IBMP in grape berries ¹²⁶. In plants, nitrate and N metabolites derived from nitrate pathways act as signaling molecules that regulate the transcript levels of genes involved in various processes, including secondary and hormone metabolism, hormone transport, and protein synthesis and degradation ^{204–206}. The question remains however whether nitrogen status has a direct impact on IBMP synthesis and/or degradation (considering IBMP as a nitrogen-containing compound) or whether this effect is mediated through the influence of nitrogen on vine vigor. The present study, in which the nitrogen effect was decoupled from those of vigor and water status, investigates this question in three *Vitis vinifera* varieties (Sauvignon blanc,

Cabernet-Sauvignon and Pinot noir) in two different wine making regions (Bordeaux and Sancerre, France). Furthermore, as some genes involved in the biosynthesis of IBMP are known, the influence of nitrogen nutrition on their expression was examined.

MATERIALS AND METHODS

Location, vine material and experimental set up. The experimental study was conducted in 2013 and 2014 in French vineyards (Château Couhins, Pessac-Léognan, France; Domaine Fontaine-Audon, Sancerre, France and Domaine Henri Bourgeois, Sancerre, France). The study plots were planted with the varieties *Vitis vinifera* cv. Sauvignon blanc (Château Couhins and Domaine Fontaine-Audon), Cabernet-Sauvignon (Château Couhins) and Pinot noir vines (Domaine Henri Bourgeois). These plots were chosen for their low nitrogen status in previous years (Yeast Available Nitrogen (YAN) < 100 mg L⁻¹), making a possible impact of nitrogen additions more likely. Hence, through modulated nitrogen supply a gradient of vine nitrogen status was obtained. On each plot, four treatments were compared: control without fertilization, soil N50: 50 kg N per ha (ammonitrate 33.5% N) applied to the soil in two applications (bud break and flowering), soil N100: 100 kg N per ha (ammonitrate 33.5% N) applied to the soil in two applications (bud break and flowering) and foliar N15: 15 kg N per ha in the form of urea (Folur TRADECORP) in three applications (fruit set, bunch closure and mid-veraison stages). Each treatment was conducted with four randomized replicates of 10 vines each. Vines were irrigated during the whole season and similar viticultural practices were adopted by the four vineyards during the grape-growing period. In 2014, the experiment was conducted in different plots than those used in 2013 but located in same vineyards to avoid a cumulative effect of nitrogen in year n+1. One hundred fresh berries were randomly sampled from each block at four different harvested stages: bunch closure (BC), mid-veraison (MV), mid-ripening (MR) and ripeness (R). All plant materials were frozen immediately in liquid nitrogen, grounded and stored at -80°C until implementation of analyses.

Vine water status. Vine water status was assessed several times during the season by means of stem water potential measurements. Measures were carried out at midday with a pressure chamber on three primary leaves per block covered with an opaque plastic bag one hour prior to measurement ^{20,207,208}.

Vine vigor. Soil or foliar nitrogen fertilizations were applied late in the season and in several passages to limit a possible effect of nitrogen on vine vigor. In both years and for each variety in Bordeaux and Sancerre, vine vigor was determined by measuring primary and secondary leaf area after shoot growth cessation as described by ²⁰⁹ and by

determining the yield of each block at harvest. For leaf areas, a correlation curve was established between the length of primary or secondary shoots and their corresponding leaf area using a LI-3100 LICOR leaf area meter (Lincoln, Nebraska USA). The length of all primary and secondary shoots of two vines per block was measured and primary and secondary leaf area was deduced from the correlation obtained between shoot length and shoot leaf area. Yields were determined for each elementary plot at harvest by weighing all bunches of ten vines per replicate.

Plant nitrogen (N) status and berry nitrogen content. Vine nitrogen status was assessed by means of two indicators: i) the N-tester device, which measures leaf blade color intensity in relation to chlorophyll concentration which itself depends on plant nitrogen status (N-tester, Norsk Hydro, Oslo, Norway). Thirty measurements were made on primary leaves in the bunch zone across each block to obtain an average value representing vine N status^{18,71}. ii) Yeast Available Nitrogen (YAN) in grape juice at harvest⁷¹. One hundred berries from each replicate were sampled and pressed manually. The juice was analyzed with a Fourier Transform Infra-Red spectrometer (FTIR, WineScan FOSS®, FRANCE, 92000 Nanterre).

Berries and grape must composition. At ripening, berries were collected in liquid nitrogen then grounded to fine powder. Primary metabolites were extracted, from aliquots of 250 mg of frozen powdered berry material, with 80% ethanol at 80°C for 15 min followed by two extractions with respectively 50% ethanol and ultrapure water. Sugars (glucose and fructose) were measured manually by an enzymatic method using the Glucose/Fructose kit from BioSenTec (BioSenTec, Toulouse, France). Malic acid was analyzed by a colorimetric method using a Bran and Luebbe TRAACS 800 autoanalyzer.

Must was obtained by pressing manually of approximately one hundred berries sampled just prior to commercial harvest. Sugar, acidity, pH and malic acid contents were analyzed using a FTIR spectrometer (FTIR, WineScan FOSS®, FRANCE, 92000 Nanterre).

Microvinifications. Microvinifications were conducted on Sauvignon blanc and Cabernet-Sauvignon from each plot in Bordeaux and Sancerre. For Sauvignon blanc wine, in Bordeaux, one kilogram of Sauvignon blanc grapes were pressed manually. 50 mg.L⁻¹ of SO₂ was added and the juice (100 mL) was clarified at 4°C overnight with pectolytic enzymes (10 mg L⁻¹, LAFAZYM CL Laffort oenologie). In Sancerre, 20 kg of grapes were

pressed with a small wine press (Socma, Narbonne, France) and 60 mg L⁻¹ of sulfur dioxide was added to the must (5 L) and static clarification of the juice was completed at 18°C overnight. In both microvinifications in Bordeaux and Sancerre, must turbidity was adjusted to 150 - 200 NTU and Yeast Available Nitrogen (YAN) was amended to 220 mg L⁻¹ with Thiazote (0.1 mg µl⁻¹). The must was then inoculated with X5 yeast strain (ZYMAFLORE X5 – Laffort, final concentration of 20 mg ml⁻¹). In Bordeaux and Sancerre, fermentations were carried on 100 mL and 5 L of must respectively at 20°C. At the end of the fermentation, 70 mg L⁻¹ of SO₂ was added and wines were stored at 4°C before analysis of volatile thiols. In Sancerre, wines were conserved at 10°C and aromas or sensorial analysis were performed 6 months later. For Cabernet-Sauvignon wine, microvinifications were achieved on 6 kg of grapes by the experimental group of INRA. Analytical and sensorial analysis were performed 10 months after the malolactic fermentation.

Wine sensory evaluation was performed by a panel of experienced tasters according to the methodology described by Larson-Powers and Pangborn (1978) ²¹⁰.

IBMP analyses: extraction and quantification. IBMP was quantified in whole grape berries, and wines by a stable isotope dilution assay using headspace solid phase microextraction coupled to a gas chromatograph and a mass spectrometer (SIDA-SPME-GC-MS) adapted from ^{68,198,211}. Sample preparation involved weighing 1 g of grounded frozen berries dissolved in 6 mL of deionized water, or 2.5 mL of wine diluted in 7.5 mL of deionized water into a brown 20 mL SPME vials along with 4 g of sodium chloride (NaCl). An internal standard, [²H₃]-IBMP, was also added to yield at final concentration of 100 ng L⁻¹.

IBMP extraction and assay methods were adapted from ⁶⁵. Samples were submitted to agitation (500 rpm for 5 s, stop for 2 s) for 5 min at 50°C and then to the extraction with the SPME fiber for 40 min at 50°C. A three-phase divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane fibre (DVB/CAR/PDMS 50/30 µm thickness, 24 gauge, Supelco Bellefonte, Pennsylvania, USA) was inserted, and the vial was agitated at 500 rpm for 40 min at 50°C. SPME injection was then implemented in splitless mode for 10 min with a desorption temperature of 240°C. Automated GC-MS analysis was carried out on a 6890 N Gas Chromatograph (Agilent Technologies) equipped with a Combi PAL autosampler (CTC Analytics). The GC was coupled to an HP 5973N mass selective detector (Agilent

Technologies) functioning in electron impact mode at 70 eV. The analyses were performed on a Carbowax 20 M capillary column (BP20, 50 m, 0.25-mm internal diameter, 0.2- μ m film thickness, Scientific Glass Engineering). Helium N60 (Air Liquide) was used as a carrier gas at a flow rate of 0.9 mL min⁻¹. The temperature program was as follows: initial hold for 5 min at 45°C, followed by a 3°C. min⁻¹ ramp to 140°C and then 30°C min⁻¹ to 240°C, 10 min hold. The injector port was at 240°C. During the elution of the methoxy pyrazine, the GC-MS was switched to single-ion monitoring mode and tuned to measure *m/z* values of 127, 94, and 154 for ²H₃-IBMP and 124, 94, and 151 for IBMP. Data processing was carried out by MSD Chemstation software (5973n Data Analysis, Agilent Technologies). Results were reported on a per weight basis of ng kg⁻¹ of fresh weight for berries and ng L⁻¹ for wines.

RNA extraction and gene expression analysis. Total RNA were extracted according to the procedure described by Reid et al., 2006²¹² from 1 g of grounded frozen berries. Total RNAs were treated by a DNase I according to the manufacturer's instructions (Ambion TURBO DNA-free DNase, Life Technologies) to remove all traces of genomic DNA. RNAs were quantified using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific) and checked for integrity on an 1.8% agarose gel. 1.5 μ g of DNA-free RNA were used to synthesize cDNAs using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time PCR was carried out using a CFX96 Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad). PCR reaction mix and specific oligonucleotide primer pairs were those from⁶⁵ PCR conditions were 3 min at 95°C, 40 cycles of 10 s at 95°C and 15 s at 60°C. The amplification efficiencies were determined by serial dilution. Melting curves to control the annealing specificity of oligonucleotides were recorded after each run. All experiments were performed with three biological replicates and two technical replicates. Normalized expression of each gene was calculated using the Bio-Rad CFX Manager software. Gene transcripts were quantified upon normalization to *VviGAPDH* and *VviActin* as internal standards by comparing the cycle threshold of the target gene with those of standard genes.

Statistical analysis. Statistical analyses were conducted using the statistical package of the R software (R Development Core team, 2010). All the data are expressed as the arithmetic average \pm standard error (SE) from four biological replicates for IBMP

measurements and from three biological replicates and two technical replicates for gene expression profiling. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test were carried out at p value < 0.05.

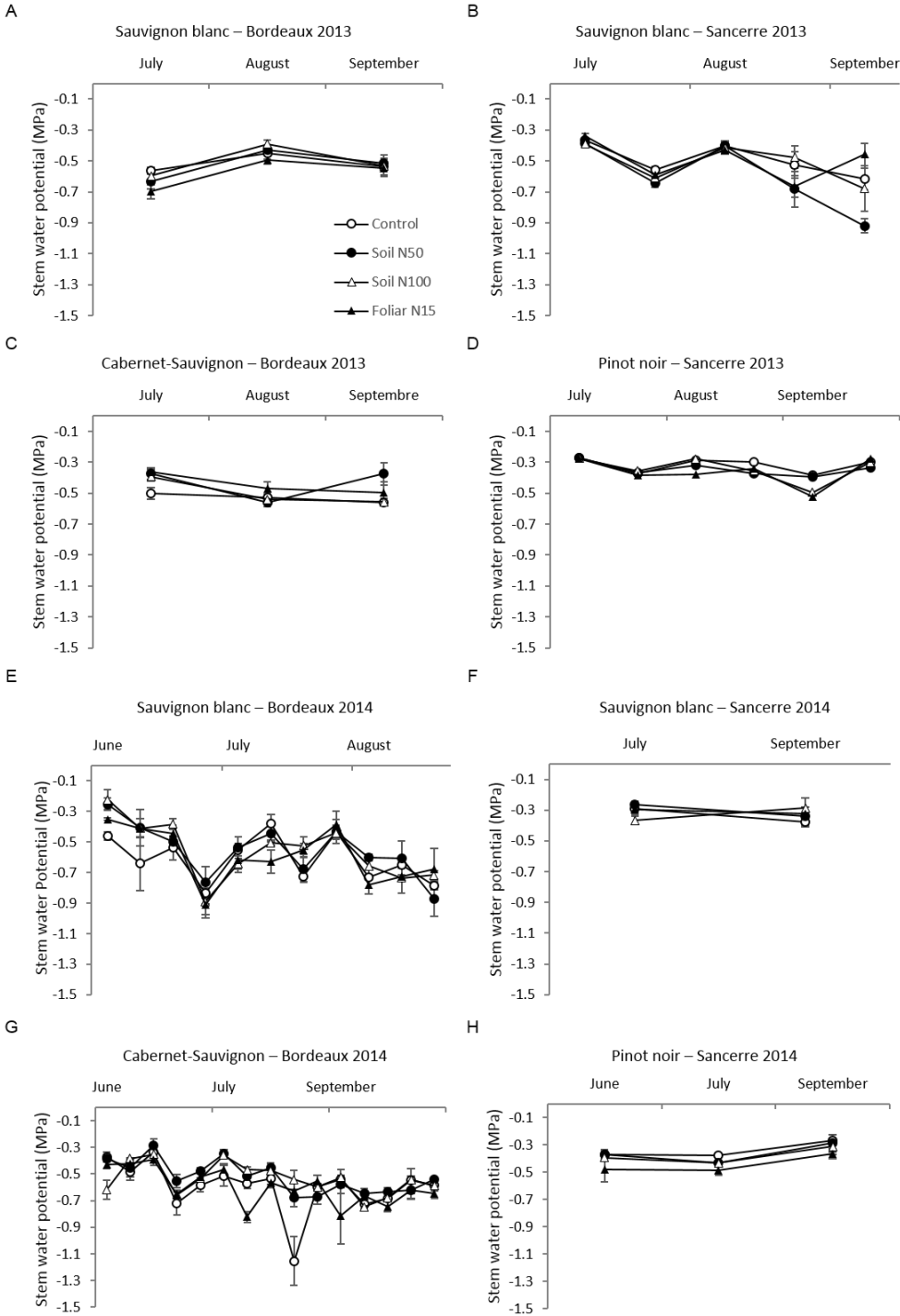


Figure 2. Vine water status as measured by stem water potential (MPa) assessed in the experimental plots in the summer of 2013 and 2014 in Bordeaux and Sancerre. Error bars indicate SE. Each point is the mean of four replicates.

RESULTS

In this experiment, vines, grown on soils with a naturally low nitrogen content, were fertilized with different amounts of nitrogen: a control without any fertilization, soil N50 (50 kg N per ha applied to the soil), soil N100 (100 kg N per ha applied to the soil) and foliar N15 (15 kg N per ha supplied as urea). Plants were irrigated during the season to avoid a possible effect of water deficit on IBMP levels in grape berries. Nitrogen addition was applied relatively late in the season and split into two applications for soil fertilization and into three applications for foliar fertilization to minimize possible effects of nitrogen supply on plant vigor. Experiments were carried out in two vintages, two regions and on three grapevine varieties to rule out possible interactions of nitrogen status with climate, soil and cultivar. Viticulture practices were identical in all treatments.

Vine water status. Like mentioned before, vines were irrigated during all the developmental stages in order to avoid possible water deficit that could influence aroma potential and to allow an optimal assimilation of nitrogen by the plant²¹. Vine water status was determined by measurements of stem water potential several times during plant development (Figure 2). Values of stem water potential were lower in 2014 compared to those measured in 2013. They ranged between -0.25 MPa and -0.90 MPa in 2013 (Figure 2A-D) and between -0.20 MPa and -0.95 MPa in 2014 (Figure 2E-H) but in both years stem water potential did not decrease below -1.00 MPa, which can be considered as the threshold for water deficit in vines²⁰, except for one date (August 20, 2014) on the control for Cabernet-Sauvignon in Bordeaux. With this exception, vines did not face any water deficit in this experiment permitting to study the influence of nitrogen supply, excluding a possible interaction with water status.

Vine vigor. Vine vigor can be quantified by measuring primary and secondary leaf areas after shoot growth cessation and by determining yield at harvest (Table 1). Primary leaf area did not differ between the four modalities regardless of variety or region. In Bordeaux in 2013 and 2014 for Sauvignon blanc and Cabernet-Sauvignon, it ranged between 1.05 m² per vine and 1.28 m² per vine respectively. In Sancerre in both years, Sauvignon blanc primary leaf area ranged from 1.59 m² per vine to 1.76 m² per vine while in Pinot noir it ranged between 0.99 m² per vine and 1.12 m² per vine. Soil or foliar applications of nitrogen did not affect primary leaf area in this study. Secondary leaf area of Bordeaux varieties in both years varied between 0.63 m² per vine to 1.70 m² per vine.

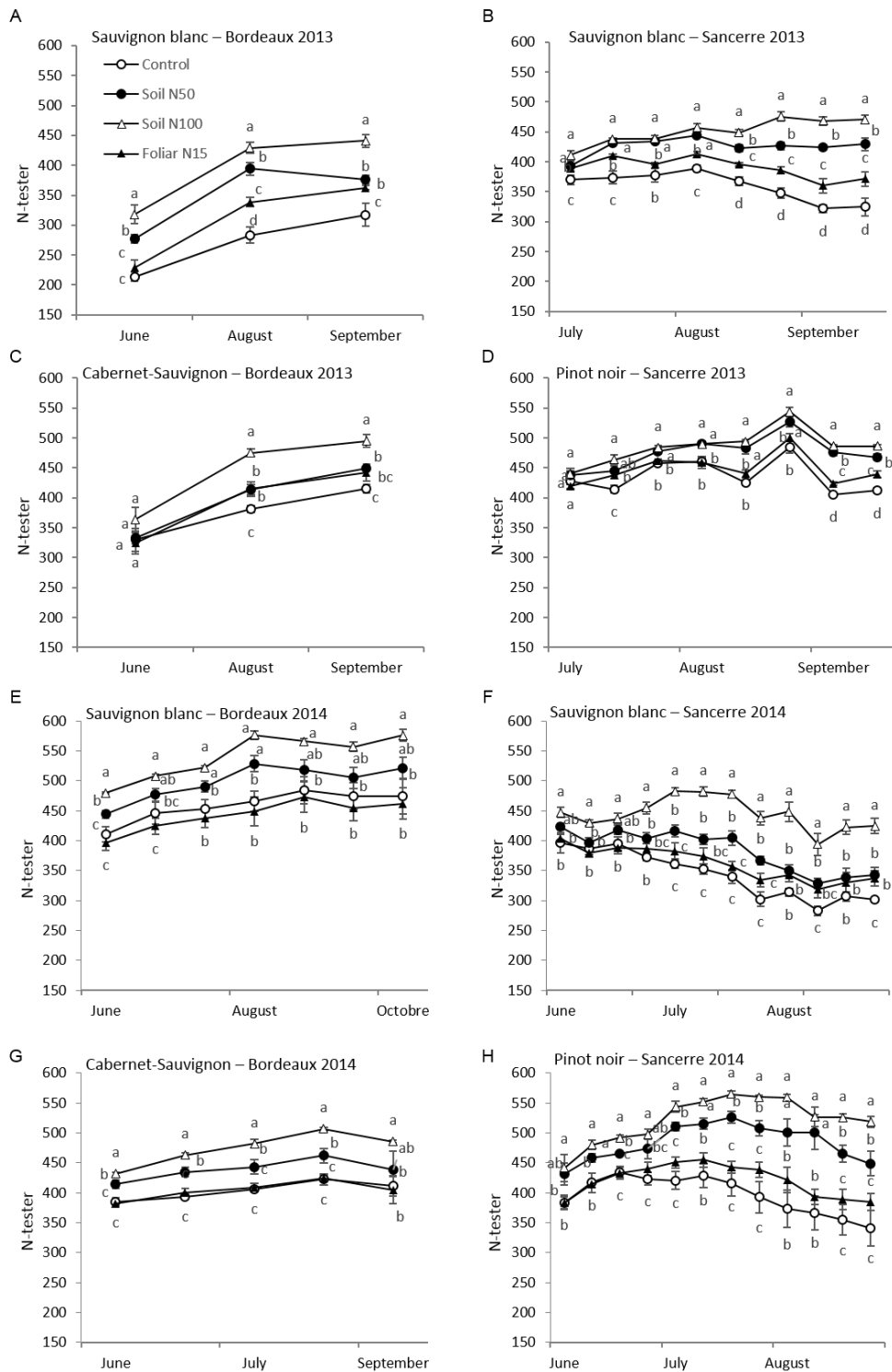


Figure 3. N-tester measurements in Bordeaux and Sancerre plots in 2013 and 2014. Leaf blade color intensity, in relation with chlorophyll content, was measured using an N-tester at different developmental stages. Each point is the mean of four replicates. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (p value < 0.05). Error bars indicate SE.

In Sauvignon blanc vineyard in Sancerre, it ranged between 0.56 m² per vine and 1.37 m² per vine and it went from 0.59 m² per vine to 1.29 m² per vine for Pinot noir. Secondary leaf area was significantly different only in the soil N100 treatment in 2014 for Sauvignon blanc in Bordeaux and Sancerre and for Pinot noir in Sancerre. Yield of Sauvignon blanc in Bordeaux was higher compared to Cabernet-Sauvignon. Yield ranged from 1.05 kg per vine to 1.48 kg per vine for Sauvignon blanc and from 0.72 kg per vine to 1.21 kg per vine for Cabernet-Sauvignon. In Sancerre, it ranged between 1.44 kg per vine and 2.57 kg per vine for Sauvignon blanc and between 2.01 kg per vine to 2.20 kg per vine for Pinot noir, where it was determined only in 2014. Yield was not significantly different among treatments in any of the varieties or locations. Except of the slight variations observed in secondary leaf area, vine vigor was similar among treatments resulting in a comparable microclimate in the bunch zone for all modalities. Hence, in the absence of water deficit and with no differences in microclimate in the bunch zone, any modification of aroma compounds in this study would result of a direct (i.e. nutrient signaling) effect of nitrogen nutrition.

Plant and berry nitrogen status. To investigate the direct effect of nitrogen nutrition on compounds of interest, an accurate assessment of vine nitrogen status was critical. For this, nitrogen status was monitored in leaf and berries (Figures 3 and 4, respectively) in both years. Leaf blade color intensity, in relations with chlorophyll content, was measured several times during vine development with an N-tester device ^{18,71}. Except for some measurement dates very early in the season (early June in Bordeaux and early July in Sancerre), soil N100 treatment was always significantly higher compared to the control (Figure 3). In most vintages, locations and varieties, vines with the soil N50 treatment had the second highest nitrogen status. Vines with the foliar N15 treatment generally had the third highest nitrogen status. For Pinot noir in Sancerre in 2013 (Figure 3D), and for all cultivars *versus* locations in 2014 (Figure 3E-H), N-tester values on foliar N15 treatment did not significantly differ from the control at most dates of measurement. Wine nitrogen status was also assessed by measuring grape berry Yeast Available Nitrogen (YAN). It was measured at harvest (Figure 4). This parameter is considered as one of the most reliable indicators for vine nitrogen status ⁷¹.

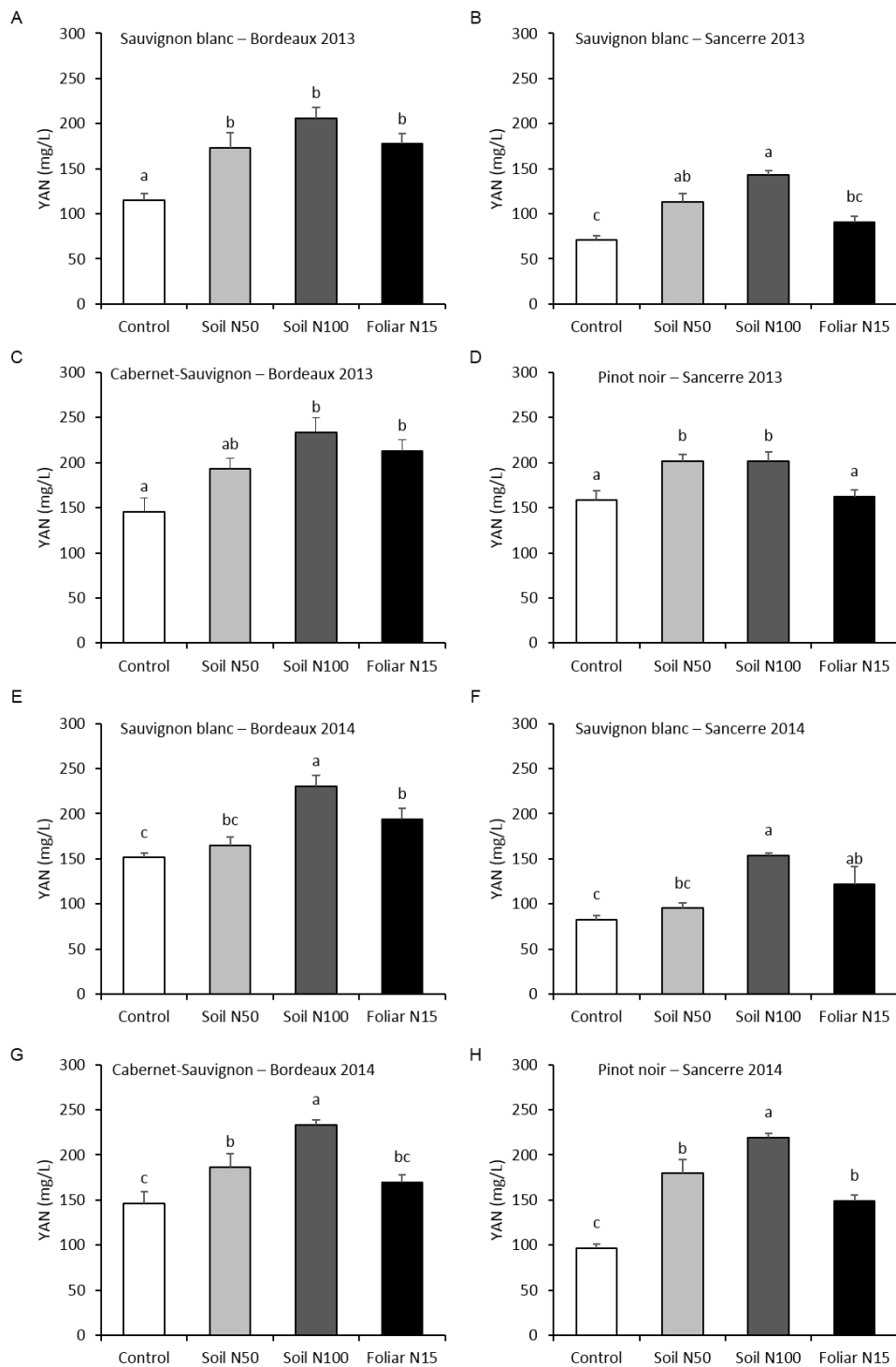


Figure 4. Figure 4. Yeast Available Nitrogen (YAN) in mg L⁻¹ determined at harvest. Each point is the mean of four replicates. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (p value < 0.05). Error bars indicate SE. Different letters indicate significant differences.

YAN values followed the same tendency as those of N-tester where soil N100 treatment had constantly the highest values among other treatments and differences with the control were always significant. However, berry YAN content was similar in soil N50 and foliar N15 treatments, except in Pinot noir in Sancerre in 2013 where soil N50 YAN was higher compared to foliar N15 YAN (Figure 4D). In these treatments YAN was generally, but not always, significantly different from the control. Finally YAN was higher in Bordeaux (Figure 4 A, C, E, G) compared to Sancerre in particular in 2013 (Figure 4 B, D, F, H). These data show that applied nitrogen was correctly assimilated by fertilized vines, and that both N-tester and YAN were pertinent indicators to assess differences in vine nitrogen status.

Berry and must composition at ripeness. Just prior to harvest, berry weight and quality-relevant primary metabolites (glucose, fructose and malic acid) were determined in the berries. The purpose was to assess whether nitrogen fertilization affected these parameters, which reflect berry ripeness (Table 2). Nitrogen addition did not influence berry weight in any of the vineyards and vintages, except on Pinot noir in Sancerre in 2013 where berry weight was surprisingly lower in N treatments. A general trend for a higher glucose and fructose content was observed in the control in Bordeaux Sauvignon blanc and Cabernet-Sauvignon vineyards; differences were statistically significant for glucose in Sauvignon blanc in Bordeaux in 2013, for glucose and fructose in Cabernet-Sauvignon in 2013 and 2014 and for fructose in Sauvignon blanc in Sancerre in 2013. In the other vineyards, glucose and fructose levels were similar for the four treatments. The same trend was observed for malic acid where differences were never statistically significant except for the Sauvignon blanc in Sancerre in 2013 (Table 2).

Evaluation of grape must maturity (sugar, total acidity, pH and malic acid) is presented in Table 3. For all treatments, no significant differences in total acidity, pH and malic acid content were observed. Must sugar content was similar in the control compared to the N treatments, except in two situations; it was lower in soil N100 treatment in Sauvignon blanc in Sancerre in 2013, compared to other treatments and it was higher in Cabernet-Sauvignon in Bordeaux in 2013.

In Bordeaux, differences in sugar contents between modalities were observed in Sauvignon blanc berries in 2013 and Cabernet-Sauvignon berries in 2014. These differences were not significant in the corresponding must. Variations in sugar levels

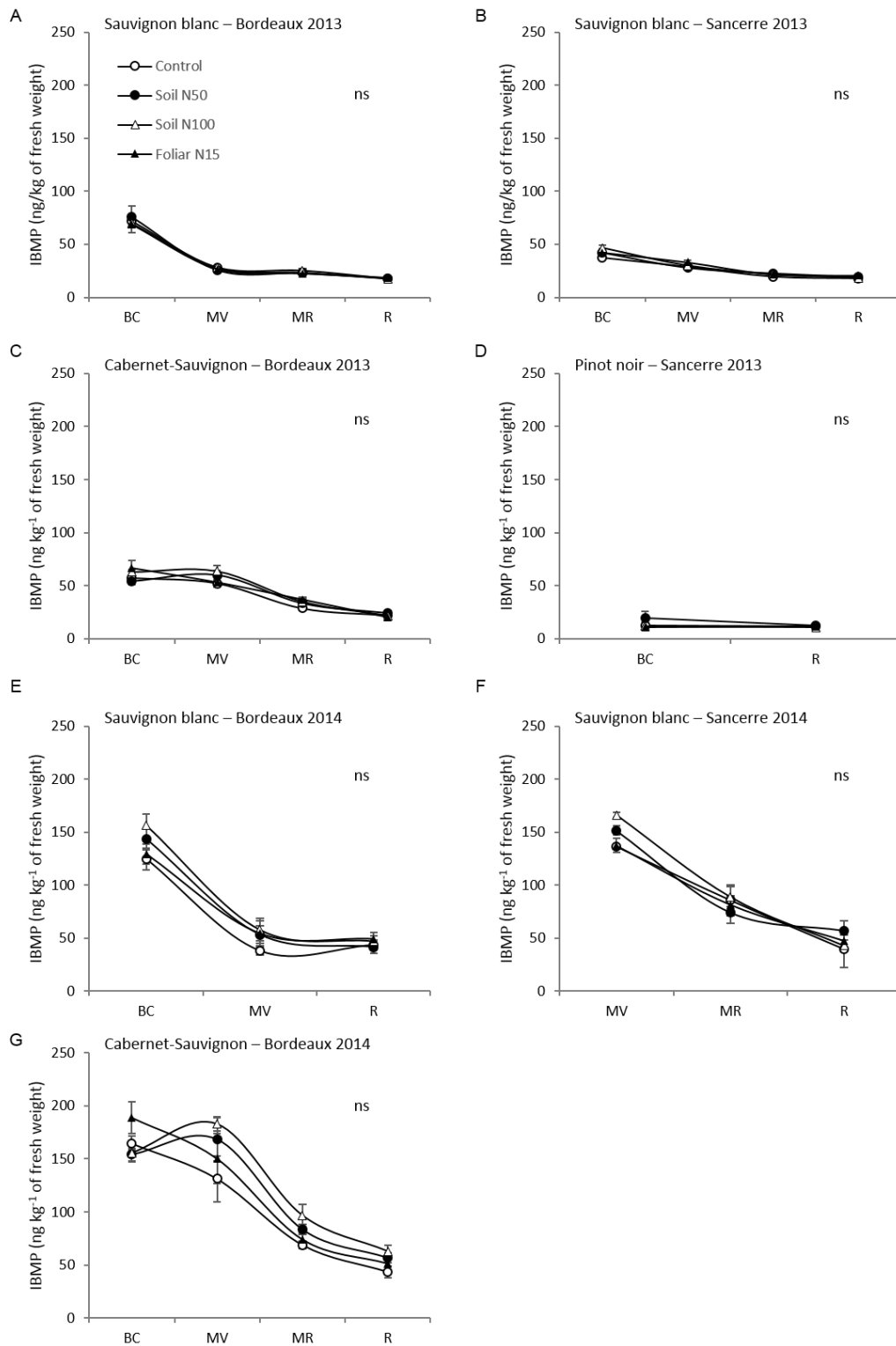


Figure 5. Effects of nitrogen supply on the amount of IBMP (ng kg⁻¹ of fresh weight) in grape berries at bunch closure (BC), Mid-Veraison (MV), Mid-Ripening (MR) and Ripeness (R).

Each point is the mean of four replicates. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (p value < 0.05). Error bars indicate SE. No significant difference among treatments was observed in any variety, any vintage at any date. ns, non-significant.

between treatments in 2013 in Bordeaux Cabernet-Sauvignon and in Sancerre Sauvignon blanc musts were not observed in corresponding berries. However, all these differences were small and corresponded to only marginal differences in ripeness. Because grape composition was highly similar for control and nitrogen treatments when sampled the same day, it can be concluded that nitrogen fertilization did not delay ripeness in this experiment.

IBMP content in grape berries and wines. IBMP in grape berries was analyzed in the four vineyards at different berry developmental stages. Figure 5 shows the IBMP content obtained in 2013 and 2014. IBMP levels are maximum at bunch closure and decrease dramatically throughout ripening (Figure 5A-G), which is consistent with the literature ¹¹¹. In 2013, for Sauvignon blanc in Bordeaux and Sancerre and Cabernet-Sauvignon in Bordeaux, the level of IBMP was around 60 ng kg⁻¹ FW at the earliest point of analysis and decreased to around 20 ng kg⁻¹ FW at harvest (Figure 5A and B). Pinot noir is a variety known for producing little amount of methoxypyrazines ^{109,123}. This is confirmed by our results where IBMP levels in Pinot noir berries in Sancerre in 2013 never exceeded 19 ng kg⁻¹ of FW (Figure 5D). Samples from fertilized and non-fertilized vines did not show significant differences in IBMP content (Figure 5A-D). In 2014, IBMP levels were higher compared to the previous year (Figure 5E-G *versus* Figure 5A-D). For Sauvignon blanc in both regions and Cabernet-Sauvignon in Bordeaux, IBMP content at bunch closure were 2- to 2.5-fold higher compared to 2013. At harvest, IBMP was close to 50 ng kg⁻¹ of FW. In Pinot noir berries, IBMP was not detectable. Again, no significant differences were detected among the four treatments at any of the investigated berry developmental stages (Figure 5E-G).

Wines obtained by micro-scale vinifications showed low vegetal characters. In wines of Sauvignon blanc in 2013 and 2014 and Cabernet-Sauvignon in 2014, IBMP content was close to the detection limit. Like in berries, nitrogen fertilization did not have any effect on the level of this methoxypyrazine (Figure 6). Moreover, sensorial analyses of these wines by a jury of experts did not reveal any significant differences between the four modalities showing that nitrogen supply did not affect this aroma compound (data not shown).

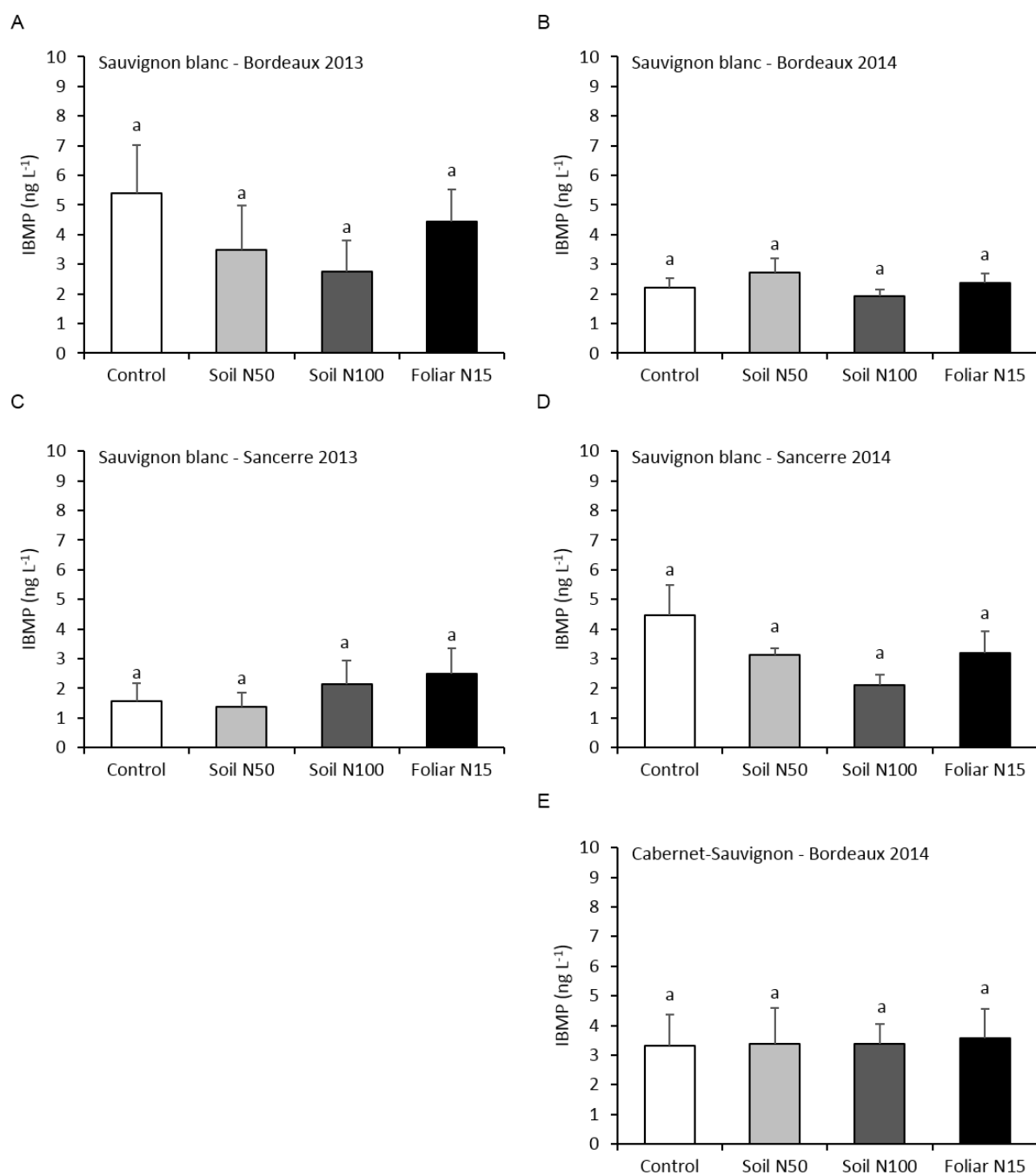


Figure 6. Effects of nitrogen supply on the level of IBMP (ng L⁻¹) in wines.

Each point is the mean of eight replicates. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (p value < 0.05). Error bars indicate SE. Different letters indicate significant differences.

***VviOMT3* and *VviOMT4* expressions.** Recently two genes from the family of methyltransferases (*VviOMT3* and *VviOMT4*) were shown to be involved in the biosynthetic pathway of IBMP^{65,198}. These genes are implicated in the final step of the pathway, in the methylation of IBHP to generate IBMP. To determine if nitrogen addition impacts on their transcript level, the expression profile of these genes was monitored during berry ripening in two modalities (control *versus* soil N100) in Sauvignon blanc and Cabernet-Sauvignon berries from Bordeaux and in Pinot noir berries from Sancerre. These modalities were chosen for gene expression analysis because their nitrogen status showed the largest contrast. Expression patterns of these two genes were studied at different stages of vine development (Figure 7). Nitrogen reductase gene (*VviNiR*), which encodes an essential enzyme in the nitrogen assimilation pathway, was used as a positive control for gene induction in response to nitrogen treatment⁸⁹.

With the exception of Cabernet-Sauvignon in 2014, *VviNiR* was differently expressed among the varieties for both vintages, although not always at the same developmental stage. Globally, *VviNiR* transcript level increases with nitrogen supply revealing that the fertilization had an impact at the transcriptomic level. In 2013, *VviNiR* expression level responds positively to nitrogen addition at bunch closure and ripening stages for all varieties (Figure 7A). For 2014 (Figure 7B), *VviNiR* expression level increased significantly in soil N100 treatment at bunch closure in Sauvignon blanc and Pinot noir and at ripening in Pinot noir. Significant differences between the control and the soil N100 treatment in YAN and in *VviNiR* expression level at bunch closure stage, where *VviOMT3* and *VviOMT4* are expressed, demonstrate that N was correctly assimilated by fertilized plants.

Moreover, *VviNiR* transcript level was variety and year dependent. For 2013, in Sauvignon blanc, its expression profile increased during ripening. In Cabernet-Sauvignon and Pinot noir control berries, *VviNiR* had the same expression profile in the two varieties, i.e. maximum at bunch closure stage followed by a decrease during the rest of the growing season. In 2014, the same expression pattern of this gene was observed for the three varieties. Its expression level increased with berry development, reached a maximum level at mid-ripening before decreasing slightly at maturity (Figure 7B).

In 2013, the relative expression of *VviOMT3* and *VviOMT4* followed the same trend as IBMP content in grape berries: it was maximal at bunch closure stage and undetectable

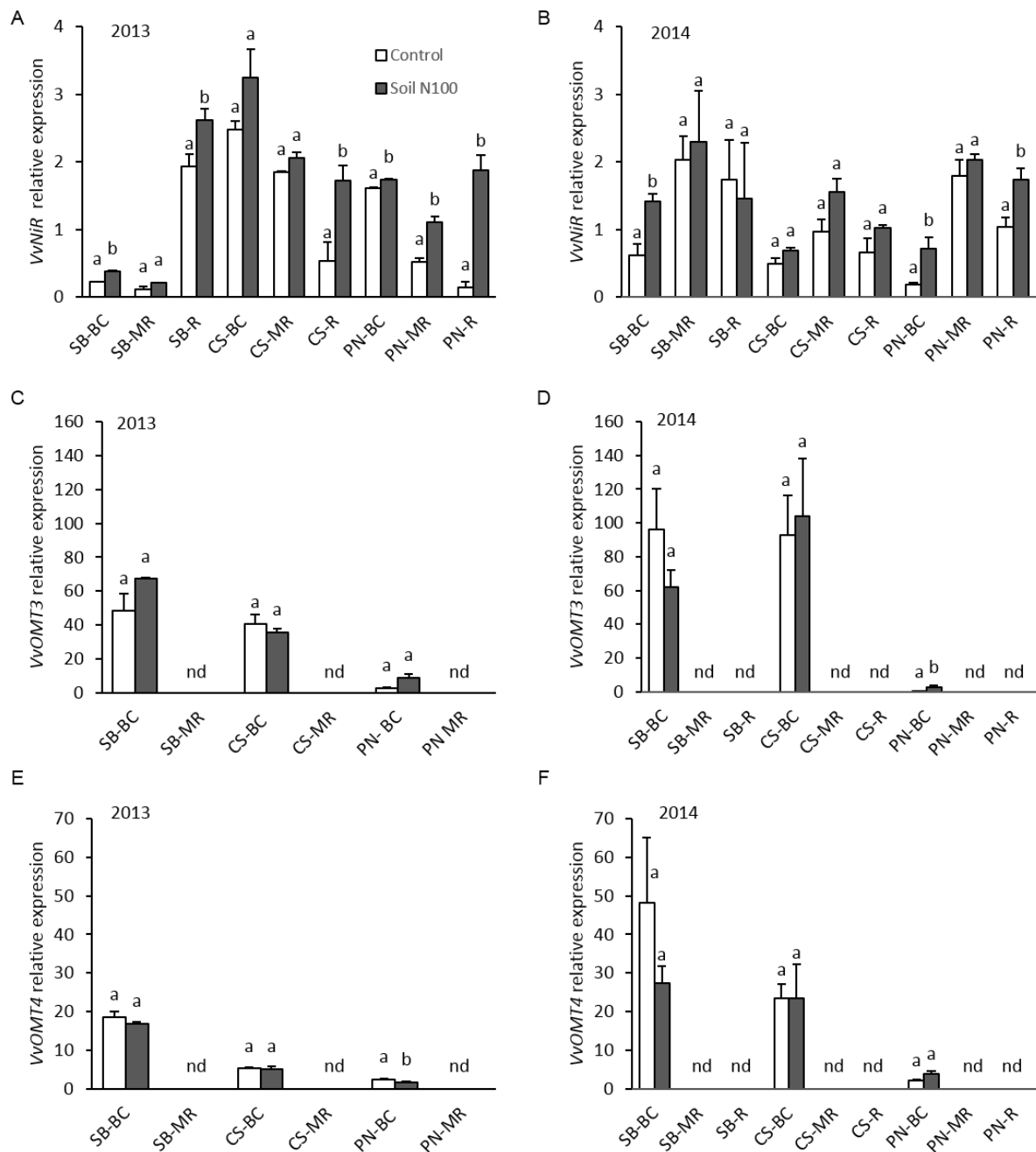


Figure 7. Relative transcript abundance of *VviNiR*, *VviOMT3* and *VviOMT4* in grape berries throughout development. Transcript levels were analyzed by real-time PCR and are shown relative to expression of *VviGAPDH* and *VviActin* in each sample. Each point is the mean of three biological replicates and two technical replicates. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (p value < 0.05). Error bars indicate SE. Different letters indicate significant differences. BC, Bunch closure; MR, Mid-Ripening; R, Ripeness; SB, Sauvignon blanc; CS, Cabernet-Sauvignon; PN, Pinot noir; nd, not detected.

after during grape berry maturation (Figure 7C-D). In both locations in 2014, higher IBMP levels and higher *VviOMTs* expression levels compared to 2013 were reported in this study (Figure 7E and F). This observation is consistent with the higher expression of green bell pepper aroma in wines from 2014. In the case of *VviOMT3* which is considered as the key gene in the latest step of the biosynthetic pathway of IBMP, its expression level at the bunch closure stage is 50- to 70- fold higher compared to the mid-ripening berry development stage where it is unexpressed for both cultivars Sauvignon blanc and Cabernet-Sauvignon (Figure 7C and D). For Pinot noir, a low producer of IBMP, *VviOMT3* showed a relatively low expression level during berry development. *VviOMT4* followed the same expression profile as *VviOMT3* but with lower transcript levels. No significant differences were observed in the expression profiles of *VviOMT3* and *VviOMT4* genes between the control and the soil N100 treatment in the high IBMP producer varieties (Sauvignon blanc and Cabernet-Sauvignon). These results are consistent with those obtained for IBMP content in grape berries and wines as well as for sensorial analysis of wines where no differences were detected between the control and the nitrogen-supplemented treatments.

DISCUSSION

To date, no published work allows a clear distinction between a possible *direct* (i.e. through nutrient signaling) effect of nitrogen and a possible *indirect* effect through vigor and modified micro- climate on the IBMP content of grapes, and wine. Here we show that no significant effect of vine nitrogen status on grape berry or wine IBMP content exists between treatments in any vintage, location or variety.

In a study by Roujou de Boubée *et al.* (2000) ¹¹¹, IBMP concentration in grape berries produced on a sandy soil was shown to be four times higher compared to those obtained on a soil with a high proportion of gravel. This soil type effect can either be mediated through its effect on the nitrogen or water status of the vines, or indirectly through an effect of water and nutrient status on vine vigor. Vine vigor was not controlled in relation to soil type. It can modify the microclimate in the bunch zone, which in turn can impact grape IBMP content. A recent study by Mendez-Costabel *et al.* (2014) ¹²⁶ showed that irrigation of vines associated to nitrogen fertilization stimulated vegetative growth, reduced light exposure of clusters and consequently increased the IBMP content in berries. However, no significant difference in IBMP content was observed between fully irrigated plants and those fully irrigated and supplemented with nitrogen. Therefore, differences in IBMP levels observed between half and fully irrigated vines supplied with nitrogen are not due to the fertilization but rather mediated through the effect of vigor variations induced by differential water input. Furthermore, vine nitrogen status was not assessed, making it difficult to determine if nitrogen possibly contributed to the observed effect.

In our study, YAN, N-tester and the *VviNiR* expression profile confirmed that supplied nitrogen was assimilated by vine. However, IBMP content and the expression pattern of key genes of the IBMP biosynthetic pathway (i.e. *VviOMT3* and *VviOMT4*) ^{65,199} were comparable between treatments, demonstrating that they were not regulated by nitrogen. Based on these results, it can be assumed that the postulate of a direct effect of nitrogen on IBMP synthesis cannot be retained. IBMP content is rather dependent on the level of vine vigor which can be related to nitrogen nutrition.

Also, grape berry IBMP concentrations varied strongly depending on the vintage. In 2014, berries contained more IBMP in all developmental stages in both regions. This could be

explained by temperatures or solar radiation for a given year and their known effects on IBMP. Solar irradiation data for Bordeaux and Sancerre in 2013 and 2014 can be found in Supplementary figures in the Supporting Information. In both regions in 2014, July and August were characterized by low solar irradiation compared to 2013 explaining the higher amount of IBMP in grape berries in 2014. IBMP contents also varied depending on the grapevine variety. Consequently, levels were higher for Cabernet-Sauvignon and Sauvignon blanc compared to Pinot noir, results which are consistent with the literature ^{109,123}.

In this experimental study, soil N50 and foliar N15 applications were chosen based on the rate of nitrogen normally used for fertilization in commercial vineyards producing high quality table wines ^{101,213}. Soil N100 treatment is not a usual condition in vineyards producing high quality wine. 100 kg N per ha is an excessive quantity that could cause several problems for the plant (excessive vigor, poor fruit set and increased incidence of *Botrytis cinerea* on grapes) and for the environment (leaching of NO₃⁻ to water tables). However, soil N100 treatment was included in this experiment to make sure that nitrogen was not a limiting factor in at least one of the treatments. Foliar applications in the range of 10 to 15 kg N per ha per year are commonly used in vineyard management ^{101,183}. However, it is very difficult to control how much of the applied nitrogen dose actually reaches the canopy in non-automated conditions. A substantial amount can be lost on the soil or in the atmosphere. This can explain why in some of our experiments vine nitrogen status was similar between the control and the foliar N15 treatment.

Many studies on vines are dedicated to nitrogen, due to its crucial role on berry quality. In plant kingdom, slight variations of this nutrient content affect the synthesis or the degradation of several metabolites. Nitrogen directly impacts the content in flavonoid compounds *i.e.* anthocyanins ^{203,214}, the content in non-flavonoid compounds *i.e.* gallic acid and coumaric acid ²¹⁴, as well as the levels of total terpenoids ²¹⁵, thiols precursors, *i.e.* cysteinylated precursor of 3-sulfanylhexan-1-ol ⁵⁰ and other grape quality compounds. However in this study, nitrogen did not directly influence IBMP concentrations in grape berries, an original phenomenon rarely described in plant species. This observation could in part be explained by the lack of an impact of nitrogen on *VviOMT3* and *VviOMT4* expression levels. In future experiments, it will be interesting to investigate if these genes are regulated by other biotic or abiotic stresses, to know how they are regulated, if their

regulation factors respond to nitrogen supply and if the accumulation of their substrate, the IBHP, is influenced by nitrogen addition.

It is known that nitrogen is stored in perennials parts of the vines during the winter, which are remobilized during the year after ⁸⁸. Hence, high nitrogen status in the previous year could have an impact on vine vigor and subsequently on IBMP content in grape berries. This question is not addressed in this paper, but is of potential interest. The use of labeled nitrogen (¹⁵N) in year n-1 would allow to verify if stored nitrogen will be used during year n in primary and secondary metabolism and if, how it will impact grape berry composition.

Table 1. Nitrogen effect on vigor determined by primary and secondary leaf areas and yield.

Primary and secondary leaf areas (in m² per vine) at shoot growth cessation and yield (in kg per vine) at harvest were measured for the four treatments on each vineyard in 2013 and 2014. Each point is the mean of four replicates. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (*p* value < 0.05). Different letters indicate significant differences. na, not available.

	2013				2014			
	Control	Soil N50	Soil N100	Foliar N15	Control	Soil N50	Soil N100	Foliar N15
Sauvignon blanc - Bordeaux								
Primary leaf area (m ² /vine)	1.11 ^a	1.05 ^a	1.18 ^a	1.17 ^a	1.06 ^a	1.20 ^a	1.18 ^a	1.13 ^a
Secondary leaf area (m ² /vine)	1.02 ^a	1.19 ^a	1.30 ^a	1.12 ^a	1.21 ^{ab}	1.19 ^{ab}	1.43 ^b	1.03 ^a
Yield (kg/vine)	1.18 ^a	1.48 ^a	1.24 ^a	1.40 ^a	1.24 ^a	1.26 ^a	1.10 ^a	1.05 ^a
Cabernet-Sauvignon - Bordeaux								
Primary leaf area (m ² /vine)	1.18 ^a	1.22 ^a	1.12 ^a	1.15 ^a	1.28 ^a	1.27 ^a	1.24 ^a	1.05 ^a
Secondary leaf area (m ² /vine)	0.63 ^a	0.94 ^a	0.87 ^a	0.86 ^a	1.46 ^a	1.70 ^a	1.57 ^a	1.56 ^a
Yield (kg/vine)	0.85 ^a	0.72 ^a	0.77 ^a	0.80 ^a	1.02 ^a	1.03 ^a	1.21 ^a	0.92 ^a
Sauvignon blanc - Sancerre								
Primary leaf area (m ² /vine)	1.59 ^a	1.74 ^a	1.69 ^a	1.61 ^a	1.63 ^a	1.63 ^a	1.76 ^a	1.65 ^a
Secondary leaf area (m ² /vine)	0.59 ^a	0.87 ^a	0.95 ^a	1.34 ^b	0.56 ^a	0.68 ^a	1.37 ^b	0.87 ^{ab}
Yield (kg/vine)	1.44 ^a	1.50 ^a	1.47 ^a	1.46 ^a	2.57 ^a	2.39 ^a	2.39 ^a	2.50 ^a
Pinot noir - Sancerre								
Primary leaf area (m ² /vine)	1.02 ^a	1.12 ^b	1.12 ^b	0.99 ^a	1.05 ^a	1.12 ^a	1.05 ^a	1.01 ^a
Secondary leaf area (m ² /vine)	1.08 ^a	1.27 ^a	1.29 ^a	1.08 ^a	0.71 ^a	0.95 ^{ab}	1.17 ^b	0.59 ^a
Yield (kg/vine)	na	na	na	na	2.01 ^a	2.18 ^a	2.20 ^a	2.02 ^a

Table 2. Influence of nitrogen supply on berry weight (g per berry), glucose, fructose and malic acid contents (mg g⁻¹ of fresh material) measured for each treatment just prior to harvest.

Each point is the mean of four replicates. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (p value < 0.05). Different letters indicate significant differences.

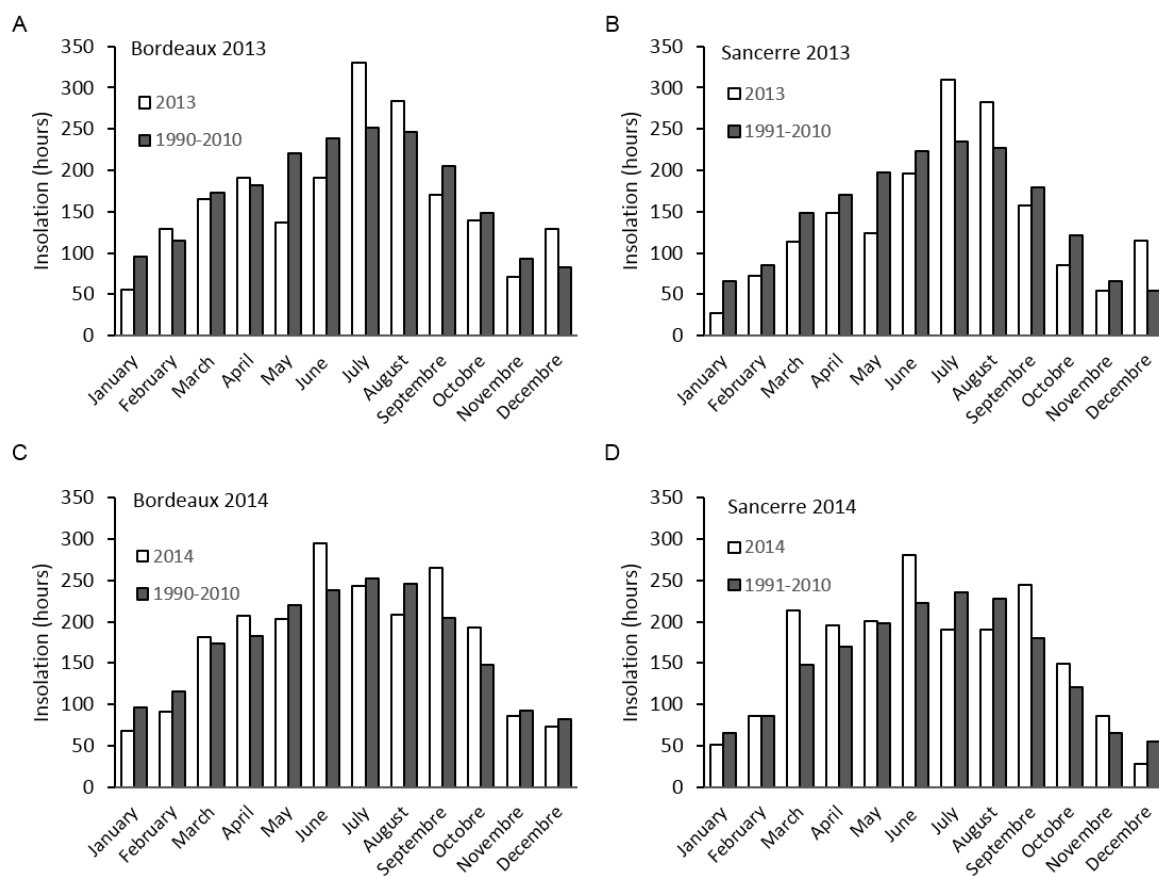
	2013				2014			
	Control	Soil N50	Soil N100	Foliar N15	Control	Soil N50	Soil N100	Foliar N15
Sauvignon blanc - Bordeaux								
Berry weight (g per berry)	1.62 ^a	1.75 ^a	1.79 ^a	1.72 ^a	2.26 ^a	2.24 ^a	2.18 ^a	2.23 ^a
Glucose (mg g ⁻¹)	112.8 ^a	98.3 ^c	98.4 ^{bc}	98.9 ^{ab}	82.9 ^a	81.9 ^a	79.0 ^a	80.6 ^a
Fructose (mg g ⁻¹)	111.1 ^a	95.7 ^a	97.2 ^a	95.9 ^a	81.1 ^a	78.9 ^a	77.5 ^a	79.7 ^a
Malic acid (mg g ⁻¹)	4.3 ^a	4.8 ^a	5.1 ^a	4.3 ^a	3.4 ^a	4.1 ^a	4.4 ^a	3.4 ^a
Cabernet-Sauvignon - Bordeaux								
Berry weight (g per berry)	1.13 ^a	1.25 ^a	1.22 ^a	1.20 ^a	1.43 ^a	1.44 ^a	1.52 ^a	1.48 ^a
Glucose (mg g ⁻¹)	103.6 ^a	112.1 ^a	94.9 ^b	107.8 ^a	103.6 ^{ab}	112.1 ^b	94.9 ^a	107.8 ^{ab}
Fructose (mg g ⁻¹)	106.6 ^a	112.5 ^a	94.9 ^b	107.6 ^a	106.6 ^{ab}	112.5 ^b	94.9 ^a	107.6 ^{ab}
Malic acid (mg g ⁻¹)	13.0 ^a	13.5 ^a	16.0 ^a	15.8 ^a	12.7 ^a	11.7 ^a	9.6 ^a	11.2 ^a
Sauvignon blanc - Sancerre								
Berry weight (g per berry)	1.49 ^a	1.61 ^a	1.59 ^a	1.56 ^a	1.89 ^a	1.91 ^a	1.96 ^a	2.05 ^a
Glucose (mg g ⁻¹)	100.6 ^a	102.4 ^a	106.4 ^a	104.8 ^a	82.2 ^a	83.6 ^a	83.8 ^a	83.9 ^a
Fructose (mg g ⁻¹)	96.4 ^a	100.2 ^{ab}	105.4 ^c	102.1 ^{bc}	79.5 ^a	81.3 ^a	81.4 ^a	80.8 ^a
Malic acid (mg g ⁻¹)	3.1 ^a	3.5 ^{ab}	3.9 ^b	3.3 ^a	4.2 ^a	4.0 ^a	4.6 ^b	4.2 ^a
Pinot noir - Sancerre								
Berry weight (g per berry)	1.79 ^a	1.63 ^b	1.64 ^b	1.56 ^b	1.74 ^a	1.93 ^a	1.76 ^a	1.83 ^a
Glucose (mg g ⁻¹)	110.7 ^a	109 ^a	113.3 ^a	112 ^a	110.7 ^a	109 ^a	113.3 ^a	112 ^a
Fructose (mg g ⁻¹)	114 ^a	108.9 ^a	113.7 ^a	113.3 ^a	114 ^a	108.9 ^a	113.7 ^a	113.3 ^a
Malic acid (mg g ⁻¹)	9.8 ^a	15.2 ^a	15.5 ^a	16.0 ^a	11.5 ^a	11.7 ^a	13.13 ^a	12.3 ^a

Table 3. The influence of nitrogen supply on grape must composition: sugar content, acidity, pH and malic acid content at harvest 2013 and 2014.

Each point is the mean of four replicates. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (p value < 0.05). Different letters indicate significant differences.

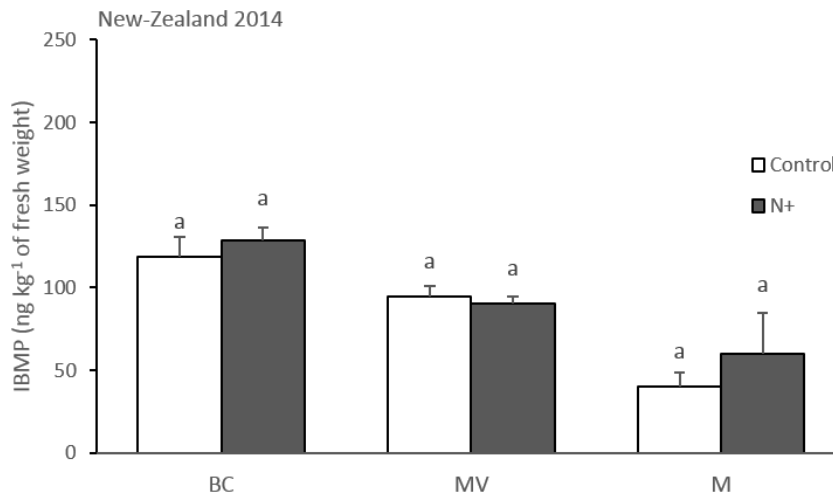
	2013				2014			
	Control	Soil N50	Soil N100	Foliar N15	Control	Soil N50	Soil N100	Foliar N15
Sauvignon blanc - Bordeaux								
Sugar (g L ⁻¹)	193.3 ^a	184.9 ^a	174.3 ^a	185.9 ^a	203.8 ^a	204.6 ^a	198.1 ^a	204.0 ^a
Acidity (g H ₂ SO ₄ L ⁻¹)	7.3 ^a	7.5 ^a	7.8 ^a	7.09 ^a	7.1 ^a	7.2 ^a	7.5 ^{ab}	7.9 ^b
pH	2.99 ^a	2.99 ^a	3.01 ^a	3.00 ^a	3.08 ^a	3.07 ^a	3.10 ^a	3.05 ^a
Malic acid (g L ⁻¹)	7.7 ^a	5.1 ^a	6.0 ^a	4.6 ^a	5.0 ^a	5.0 ^a	5.8 ^a	5.8 ^a
Cabernet-Sauvignon - Bordeaux								
Sugar (g L ⁻¹)	199.5 ^a	191.0 ^b	188.4 ^b	191.7 ^b	206.4 ^a	197.2 ^a	198.4 ^a	203.3 ^a
Acidity (g H ₂ SO ₄ L ⁻¹)	5.1 ^a	5.3 ^a	5.8 ^a	5.2 ^a	6.5 ^a	7.6 ^a	7.4 ^a	7.0 ^a
pH	3.39 ^a	3.38 ^a	3.35 ^a	3.41 ^a	3.26 ^a	3.17 ^a	3.24 ^a	3.23 ^a
Malic acid (g L ⁻¹)	3.3 ^a	3.7 ^a	4.3 ^a	3.9 ^a	4.2 ^a	5.2 ^a	5.5 ^a	4.8 ^a
Sauvignon blanc - Sancerre								
Sugar (g L ⁻¹)	205.0 ^a	198.2 ^a	189.5 ^b	204.0 ^a	204.7 ^a	209.2 ^a	204.2 ^a	207.0 ^a
Acidity (g H ₂ SO ₄ L ⁻¹)	5.3 ^a	5.0 ^a	5.1 ^a	5.0 ^a	6.0 ^a	6.0 ^a	6.2 ^a	5.9 ^a
pH	3.17 ^a	3.21 ^a	3.20 ^a	3.18 ^a	3.05 ^a	3.06 ^a	3.07 ^a	3.06 ^a
Malic acid (g L ⁻¹)	3.7 ^a	3.6 ^a	3.7 ^a	3.5 ^a	4.6 ^a	4.7 ^{ab}	5.1 ^b	4.4 ^a
Pinot noir - Sancerre								
Sugar (g L ⁻¹)	195.7 ^a	194.5 ^a	195.7 ^a	197.5 ^a	210.2 ^a	210.0 ^a	216.2 ^a	214.2 ^a
Acidity (g H ₂ SO ₄ L ⁻¹)	5.5 ^a	5.8 ^a	5.8 ^a	5.7 ^a	5.4 ^a	5.7 ^a	5.7 ^a	5.4 ^a
pH	3.25 ^a	3.27 ^a	3.25 ^a	3.26 ^a	3.21 ^a	3.22 ^a	3.25 ^b	3.23 ^{ab}
Malic acid (g L ⁻¹)	4.2 ^a	4.4 ^a	4.5 ^a	4.5 ^a	4.5 ^a	4.9 ^a	4.8 ^a	4.5 ^a

SUPPLEMENTARY DATA



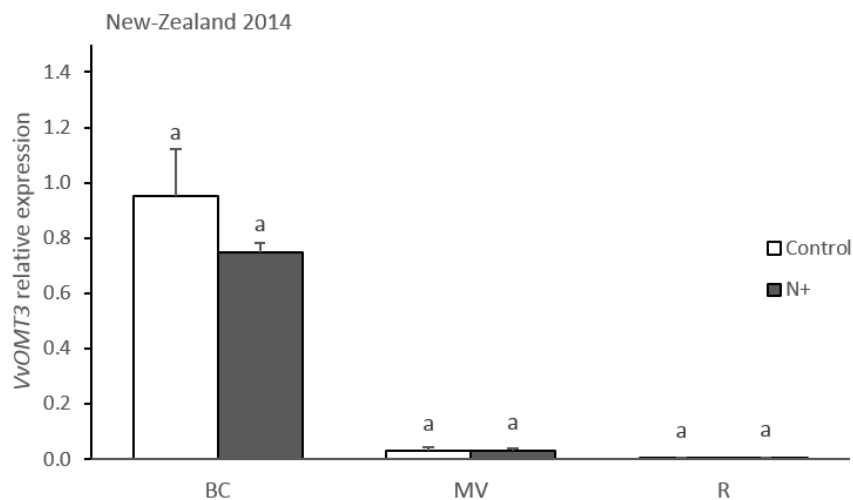
Supplementary figure 1. Insolation in Bordeaux (A-B) and Sancerre (C-D) in 2013 and 2014.

Data were registered in hours (33) for Bordeaux vineyard and in Nevers (58) for Sancerre vineyard. Insolation was compared to values from 1990-2010 for Bordeaux and to values from 1991-2010 for Sancerre.



Supplementary figure 2. Effect of nitrogen supply on the amount of IBMP (ng kg⁻¹ of fresh weight) in grape berries at bunch closure (BC), Mid-Veraison (MV) and Ripeness (R) from Marlborough, New-Zealand.

Each point is the mean of four replicates. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (p value < 0.05). Error bars indicate SE. No significant difference among treatments was observed.



Supplementary figure 3. Relative transcript abundance of *VviOMT3* in grape berries throughout development.

Transcript levels were analyzed by real-time PCR and are shown relative to expression of *VviGAPDH* and *VviActin* in each sample. Each point is the mean of three biological replicates and two technical replicates. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (p value < 0.05). Error bars indicate SE. Different letters indicate significant differences. BC, Bunch closure; MV, Mid-Veraison; R, Ripeness.

ABBREVIATIONS USED

BC, bunch closure; CS, Cabernet-Sauvignon; FW, fresh weight; IBHP, 3-isobutyl-2-hydroxypyrazine; IBMP, 3-isobutyl-2-methoxypyrazine; IPMP, 3-isopropyl-2-methoxypyrazine; MP, methoxypyrazines; MR, mid-ripening; MV, mid-veraison; PN, Pinot noir; R, ripeness; SAHcy, *S*-Adenosyl-L-homo-Cys; SAM, *S*-Adenosyl-L-Methionine; SB, Sauvignon blanc; SBMP, 3-*sec*-butyl-2-methoxypyrazine; *VviOMT*, *Vitis vinifera* *O*-methyltransferase; *VviNiR*, *Vitis vinifera* nitrogen reductase; YAN, Yeast Available Nitrogen.

ARTICLE II

Impact de la nutrition azotée de la vigne sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc : de la parcelle au transcriptome

Les arômes variétaux, originaires et caractéristiques de la variété, sont ces notes que le vin tire du cépage et du terroir qui les façonne. Certains d'entre eux sont caractérisés par un pouvoir odorant intense qui peut influencer fortement le profil du vin. Les arômes variétaux peuvent exister sous forme libre directement perceptible par les récepteurs olfactifs tels les pyrazines, les terpénols et la rotundone ou bien sous forme de précurseurs non volatils qui sont à l'origine de composés odorants formés au cours de la fermentation alcoolique ou lors de l'élevage ou du vieillissement du vin.

Parmi ces derniers, les thiols volatils, évoquant des notes fruitées souvent recherchées par les dégustateurs, ont été identifiés pour la première fois dans les vins de Sauvignon blanc au début des années 90. Plus tard, il a été démontré qu'ils participent également à l'arôme de vins issus d'autres cépages comme le Sémillon, le Riesling, le Pinot gris ou le Colombard. Les trois principaux thiols variétaux identifiés contribuant significativement à l'arôme variétal du Sauvignon blanc sont le 3-sulfanylhéxan-1-ol (3SH), à l'odeur de pamplemousse et d'agrumes, l'acétate de 3-sulfanylhéxan-1-ol (A3SH), à l'odeur de fruit de la passion et la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP), à l'odeur de buis. Ces thiols sont libérés au cours de la fermentation alcoolique par le métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae* à partir de leurs précurseurs non volatils présents dans la baie de raisin.

Présentant un seuil de perception de l'ordre de 50 ng L⁻¹, le 3-sulfanylhéxan-1-ol (3SH) est le thiol le plus abondant, retrouvé dans un grand nombre de vins. Ce thiol volatil est libéré au cours de la fermentation alcoolique sous l'action d'enzyme de type β -lyase à partir de formes précurseurs décrites comme étant des *S*-conjuguées au glutathion (Glut-3SH) ou à la cystéine (Cys-3SH).

La voie de biosynthèse des précurseurs du 3SH est encore loin d'être élucidée. Il a été montré que le Glut-3SH est formé par la conjugaison du glutathion (GSH) sur le *trans*-2-hexenal par l'action de deux enzymes à activité de type glutathion-*S*-transférase (GST), VviGST3 et VviGST4. Le Glut-3SH est ensuite converti en Pcysgly-3SH par l'action d'une γ -glutamyltranspeptidase (VviGGT), puis en Cys-3SH par une carboxypeptidase. La présence d'un intermédiaire aldéhydique (Glut-3SHal) résultant de la conjugaison du *trans*-2-hexenal et du glutathion a été mise en évidence récemment.

L'azote est considéré comme une composante majeure du terroir viticole, mais son niveau d'absorption peut aussi être modifié par les pratiques de fertilisation ou de l'entretien du

sol. Son effet sur la teneur en Cys-3SH dans la baie et le moût et sur le contenu en 3SH dans le vin a été bien documenté. Un apport de ce nutriment permet une augmentation de la teneur en Cys-3SH ainsi que de la teneur en 3SH dans le vin de Sauvignon blanc. Il est cependant difficile de séparer l'impact direct de l'azote de celui de la vigueur des ceps, modifiée par le statut azoté de la vigne.

Dans cette partie de ce projet, où l'effet de l'azote sur la vigueur a été minimisé, nous avons déterminé l'impact direct de la nutrition azotée sur la synthèse et l'accumulation du Glut-3SH et du Cys-3SH dans les baies de raisin au cours de la maturation et dans le moût ainsi que sur le contenu en 3SH dans le vin. En outre le profil d'expression de *VviGST3*, *VviGST4* et *VviGGT* a été évaluée afin de déterminer leurs réponses à la fertilisation azotée et leur implication dans la voie de biosynthèse des précurseurs du 3SH. En plus, des gènes candidats potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse ont été identifiés par un séquençage haut débit à ARN de type RNA-seq.

L'étude a été menée en 2013 et en 2014 sur du Sauvignon blanc issu de deux vignobles différents, à Pessac Léognan–France et à Sancerre–France.

Quatre modalités ont été étudiées : un contrôle où aucune fertilisation n'a été appliquée, une fertilisation de 50 ou de 100 kg d'azote par hectare ajoutés au sol et une fertilisation foliaire de 15 kg d'azote par hectare sous forme d'urée. Due à l'hétérogénéité de la réponse des vignes ayant subies un apport de 50 kg N/ha et au statut azotée de la modalité foliaire qui a été proche de celui du contrôle, les métabolites ont été dosés uniquement pour les vignes fertilisées avec 100 kg N/ha et le contrôle. L'analyse des profils d'expression des gènes a été réalisée sur les baies du vignoble bordelais (N100 *versus* contrôle).

Concernant l'étude de RNA-seq, uniquement les résultats obtenus en 2013 sont présentés dans ce manuscrit. Pour la publication, cet article sera complété par les résultats obtenus en 2014, une fois qu'ils sont disponibles.

To a better understanding of the impact of vine nitrogen status on volatile thiols from plot to transcriptome level

ABSTRACT

Volatile thiols contribute largely to the organoleptic characteristics and typicality of Sauvignon blanc wines. Among this family of odorous compounds, 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH) has a major impact on wine flavor. This thiol is formed during alcoholic fermentation by the yeast from odorless and non-volatile precursors found in the berry and the must. The effect of vine nitrogen status on 3SH in Sauvignon blanc wine and on its glutathionylated (Glut-3SH) and cysteinylated (Cys-3SH) precursors was investigated in this study. Moreover the impact of nitrogen fertilization on the expression of the glutathione-*S*-transferase 3 and 4 (*VviGST3* and *VviGST4*) and the γ -glutamyltranspeptidase (*VviGGT*), considered as key genes in its genesis, was also evaluated. Nitrogen supply increased Glut-3SH levels in grape berries mainly at mid-ripening and ripeness and in must at harvest. No significant effect of nitrogen addition was noticed on Cys-3SH concentration. Furthermore, nitrogen influenced positively the 3SH content in wine. The expression pattern of the three mentioned genes was similar between the control and the fertilized modality. New candidate genes which might be implicated in the biosynthetic pathway of 3SH precursors were identified by whole transcriptome shotgun sequencing (RNA-seq).

KEYWORDS: 3-sulfanylhexan-1-ol, 3SH, aroma, precursors, glutathionylated precursor, cysteinylated precursor, Glut-3SH, Cys-3SH, nitrogen, *Vitis vinifera*, grape berries, wine, *VviGST*, *VviGGT*.

INTRODUCTION

Wine aroma is a blend of nuances and a delicate balance among them is required to offer a unique sensation to consumers. Aromas contribute to a large extent to the organoleptic characteristics and to the typicality of wine. Slight differences in the concentrations of these volatile molecules craft the diversity in the aromatic quality of wines^{216,217}. According to Swiegers and Pretorius¹⁰³, wine aromas can be classified into three main groups according to their origin: primary or “varietal” aromas specific for grape varieties, secondary or “winemaking” aromas produced during the fermentations and tertiary or “mature” aromas developed during aging.

Varietal aromas, characteristic of the variety, play a major role in the wine quality potential. Their concentrations may be impacted by soil, climate and grapevine variety²¹. Some varietal aromas exist as free compounds which are directly perceivable by the olfactory receptors, like pyrazines¹⁰⁴, terpenols²¹⁸ and rotundone¹⁰⁵. Others are present as non-volatile and odorless precursors in the grape berry, whose cleavage into fragrant compounds occurs during winemaking and aging, like volatile thiols, glycosidic precursors, dimethylsulfide, volatile phenols, C6 compounds and furaneol^{62,137,196,219–224}.

Volatile thiols represent a large family of compounds that contribute positively or negatively to the aromatic potential of the wine^{130,225}. Many odorous thiols were identified in the early 1990s in Sauvignon blanc wines. The contribution of thiols to the flavor depends on their concentration and the composition of the matrix in which they are present²²⁶. Subsequently, these thiols were identified in a large panel of cultivars like Sauvignon blanc, Semillon, Riesling, Pinot gris and Colombard¹³⁵. Among them, 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH) is a major thiol identified by Tominaga in 1995¹⁵². The 3SH has a smell of grapefruit or passion fruit in Sauvignon blanc wines¹³⁶ and can be transformed during the alcoholic fermentation into its acetate reminiscent to boxwood, grapefruit zest and passion fruit¹³⁵. The 3SH is not present in berries and musts, it is liberated during the alcoholic fermentation from non-volatile and odorless precursors present originally in the grape berry^{133,135}. It has been shown that these precursors are *S*-conjugates to glutathione or to cysteine: *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathione (Glut-3SH) and *S*-3-(hexan-1-ol)-cysteine (Cys-3SH) for the 3SH respectively^{136,144}. The release of the volatile thiol from its precursor takes place during the fermentation by a β -lyase-like activity of *Saccharomyces*

cerevisiae that induces the cleavage of Carbon-Sulfur bonds ^{133,140,144}. As for the biosynthetic pathways of these precursors, they are still far from being fully understood. In 2002, a study of Peyrot des Gachons ¹³⁶ assumed that the cysteinylated precursor of 3SH derives from the catabolism of the glutathionylated precursor. However this reaction requires the presence of two enzymes: a γ -glutamyltranspeptidase (VviGGT) which catalyzes the elimination of the glutamic acid, and a carboxypeptidase responsible for the removing of the glycine to produce the Cys-3SH. Recent studies by Kobayashi *et al.*, (2010) ¹⁴⁸ and Thibon *et al.*, (2011) ¹⁴⁹ also showed the formation of Cys-3SH in cell cultures of *Vitis vinifera* from Glut-3SH. The latter was formed by the combination of the glutathione (GSH) with the *trans*-2-hexenal. This step requires a glutathione-S-transferase (VviGST) enzyme (Figure 1) ^{227,228}. Kobayashi *et al.*, (2011) ¹⁵¹ identified three genes *VviGST3*, *VviGST4* and *VviGGT* in Sauvignon blanc berries putatively implicated in the biosynthetic pathway of 3SH precursors.

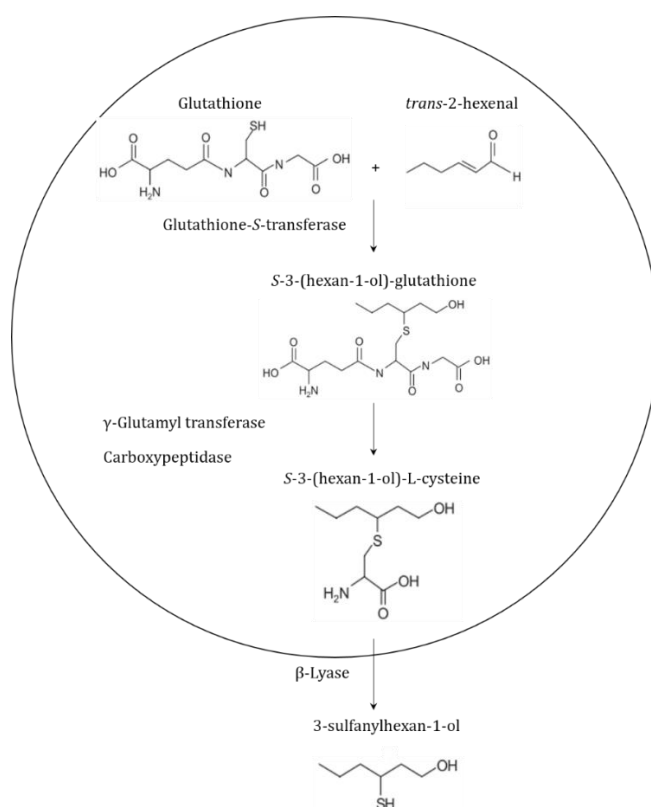


Figure 1. Pathway of the glutathionylated precursor (Glut-3SH) and cysteinylated precursor (Cys-3SH) in grape berries as described by Kobayashi *et al.*, 2010 and Thibon *et al.*, 2011 ^{148,149}.

The production of 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH) occurred during the alcoholic fermentation by the yeast.

In Sauvignon blanc musts, 3SH precursors are present in several hundred of micrograms per liter ^{21,136,162}. In berries and during ripening, their accumulation and their concentration are largely dependent on different factors like soil composition and viticultural techniques ^{21,151,154,156,160,161,163,229}. Among the minerals vines pick up from the soil, nitrogen influences greatly the content of 3SH in wine and its precursors in grapes ^{21,161,183}. Nitrogen supply enhances their synthesis and their accumulation in Sauvignon blanc grape berries, musts or wines ^{161,183}.

In this paper, the accumulation of Glut-3SH and Cys-3SH in grape berries during ripening was investigated and the effect of vine nitrogen status on its level in berries and in musts, as well as on 3SH content in wines, was confirmed. Moreover *VviGST3*, *VviGST4* and *VviGGT* expression profiling was evaluated to determine their responses to nitrogen addition and their implication in 3SH synthesis. Furthermore, an identification of potential candidate genes which might be involved in the biosynthetic pathway was performed by whole transcriptome shotgun sequencing (RNA-seq). A monitoring of 3SH precursors formation in grape berries and must, 3SH liberation in wine and the expression profiling of candidate genes from the biosynthetic pathway was established in order to improve the comprehension of 3SH synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Location, vine material and experimental set up. Commercial vineyards located in Pessac-Léognan area, Bordeaux, France (Château Couhins) and Sancerre area, France (Domaine Fontaine-Audon) were used in this experiment. Planting density was 6667 vines/ha in Château Couhins and 7000 vines/ha at domaine Fontaine-Audon. The study was performed on Sauvignon blanc vines (*Vitis vinifera* L.) in 2013 and 2014. Experimental plots were selected for their low nitrogen status in previous years (Yeast Available Nitrogen (YAN) < 100 mg L⁻¹). On each plot, two treatments were compared: control without fertilization and soil N100: 100 kg per hectare of nitrogen applied to the soil in two applications (bud break and flowering). Each treatment was repeated by means of four randomized replicates of 10 vines each. Ammonium nitrate (NH₄NO₃) containing 33% of nitrogen was used as fertilizer. Irrigation was managed during the whole season to avoid possible water deficit. All viticultural practices were carried out according to standard commercial vineyard practices and were identical for both modalities. Approximately, one hundred fresh berries were randomly collected per treatment from each block at three different developmental stages: mid-veraison (v), mid-ripening (28 days after mid-veraison; v+28) and ripeness (35 days after mid-veraison; v+35). Mid-veraison was determined at the time when 50% of the berries were soft. Berries were cut at the pedicel without wounding berry skin and were frozen immediately in liquid nitrogen, grounded and stored at -80°C until implementation of analyses.

Vine water status. Vine water status was monitored during the season by measuring the leaf water potential with a pressure chamber ^{207,208}. Measurements were carried out at midday on three primary leaves per block covered with an opaque plastic bag one hour prior to measurement ²⁰. Irrigation was implemented when leaf water potential was close to -1 MPa.

Vine vigor. Primary and secondary leaf areas measured as described by Mabrouk and Carbonneau ²⁰⁹ and yield determined for each treatment at harvest were used to quantify vine vigor. To determine leaf areas, a correlation curve was established between the length of primary and secondary shoots and their corresponding leaf area using a LI-3100 LICOR leaf area meter (Lincoln, Nebraska, USA). Subsequently, the length of all primary and secondary shoots of two vines per replicate was measured and primary and

secondary leaf areas were deduced from the correlation obtained between shoot length and shoot leaf area. Yield was determined for each elementary plot at harvest by weighing all grape bunches of ten vines per replicate.

Vine and berry nitrogen status. N-tester indicator (N-tester, Norsk Hydro, Oslo, Norway) and Yeast Available Nitrogen (YAN) were used to assess vine nitrogen status ⁷¹. N-tester measures, determining leaf blade color intensity which is in relation with the chlorophyll concentration and the nitrogen status, were performed on thirty primary leaves in the bunch zone across each block in order to obtain an average value representing vine nitrogen status ^{18,71}. Yeast Available Nitrogen (YAN) was assessed in grape juice obtained by pressing of approximately one hundred berries collected at harvest stage. The juice was analyzed with a Fourier Transform Infra-Red spectrometer (FTIR, WineScan FOSS®, FRANCE, 92000 Nanterre) ⁷¹.

Berry and must composition. Harvest of Bordeaux vineyard occurred on September 23 in 2013 and on September 08 in 2014. In Sancerre, these dates were respectively October 10 in 2013 and September 25 in 2014. One day prior to these dates, approximately twenty five berries were collected in liquid nitrogen for primary metabolite analyses and one hundred berries were sampled and pressed to assess grape must composition. Primary metabolites of berries were extracted from 250 mg of frozen powdered berry material, with 80% ethanol at 80°C for 15 min followed by two extractions with respectively 50% ethanol and ultrapure water. Glucose and fructose were assessed using an enzymatic method (Glucose/Fructose kit from BioSenTec, BioSenTec, Toulouse, France). Malic acid was measured using a colorimetric method (Bran and Luebbe TRAACS 800 autoanalyzer, Norderstedt, Germany).

Grape juice was obtained by pressing one hundred berries. After centrifugation, grape must was analyzed using a WineScan™ Auto analyzer (FOSS FRANCE, 92000 Nanterre). Sugar, Total Acidity, pH and malic acid contents were measured twice on each sample through two successive determinations ²³⁰.

Extraction and quantification of 3SH precursors from berries and grape musts. The extraction of 3SH precursors in grape berries and musts was performed on an inverted solid phase column as follows: SPE columns (LC-18 500 mg 6 mL, Supelco France, Saint

Germain-Laye cedex, France) were conditioned with 5 mL methanol, followed by 4 mL ultrapure water/methanol (50/50, v/v) and finally by two successive washes with 2 mL of water. A mix of 1 mL of grape juice obtained by defrosting of 2 g of frozen berry powder in the presence of sulfur dioxide (200 mg L⁻¹) or directly from grape must, 1 mL of water and a final concentration of 50 µg L⁻¹ of the internal standard solution containing a deuterated form of the glutathionylated S-conjugate of 3SH ((3-S-hexan-1-ol)-glutathione-d₃) was percolated through the SPE columns. After the adsorption step, SPE columns were rinsed twice with 1 mL of water and dried for 1 minute. Precursors were then eluted with 3 mL of water/methanol (70/30; v/v) in hemolysis tubes. The flow-through was subsequently evaporated using a RapidVap Vertex Dry Evaporators (Labconco, Kansas City, MO, USA) (speed 60-75%, temperature 45°C; pressure 4-10 mbar). Residues were dissolved in 700 µL of aqueous formic acid solution (0.1%) and filtered with a 0.45 µm membrane before the quantification using an Accela UHPLC (Thermo Fisher Scientific) connected in series to an Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) mass spectrometer equipped with a heated ESI ion source. The separation was performed on a Synchronis aQ column (100×2.1 mm i.d., 1.7 µm, Synchronis aQ, Thermo Scientific, Bremen, Germany) with a flow rate of 300 µL min⁻¹ of solvent A (0.1% aqueous formic acid) and solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile). The gradient for solvent B was as follows: 0 min, 9%; 0.8 min, 9%; 5 min, 40%; 5.2 min, 90%. The column was equilibrated with 9% of solvent B for 1 min prior to an injection. The ion source was operated in the positive ion mode at 3.5 kV. The vaporizer temperature of the source was set at 300°C, the capillary temperature at 350°C, the nitrogen sheath gas at 80, and the auxiliary and sweep gas at 5 (arbitrary units). A mass range of 100-500 was acquired in full scan MS mode. The resolution setting was 25000 (m/Δm, fwhm at m/z 400).

Quantification of 3SH in wines. For fifty milliliters of centrifuged wine, 2 mM of *p*-hydroxymercuribenzoate diluted in 0.1 M Tris and 50 µL of internal standard mix (6-sulfanylhexanol: 6SH, 30 µmol L⁻¹, EtOH and 4-methoxy-2-methyl-2-sulfanylbutan: MMSB, 30 µmol L⁻¹, EtOH) were added successively. Sample pH was adjusted to 7 (with concentrated NaOH solution), and then purified on an ion exchange resin (Dowex 1, Sigma; 1x2-100) previously activated for 15 minutes with HCl (0.1 M) and washed with water until its pH reached a value of 5. The resin was washed with an acetate buffer (50

mL, 0.1 M, pH 7) and subsequently thiols were eluted by a cysteine buffer (50 mL, 10 g L⁻¹, pH 7). The flow-through was collected, mixed with 500 µL of ethyl acetate and volatile thiols were extracted twice with dichloromethane (4 than 3 mL). The organic phase containing thiols was dried with anhydrous sodium sulfate and then concentrated to obtain a final volume of 50 µL. Samples were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) as described by Tominaga *et al.*, (1998) ²³¹.

Microvinification. Microvinifications were conducted on Sauvignon blanc from each plot in Bordeaux and Sancerre. In Bordeaux, one kilogram of grapes were pressed manually. 50 mg.L⁻¹ of sulfur dioxide (SO₂) was added and the juice was clarified at 4°C overnight with pectolytic enzymes (10 mg L⁻¹, LAFAZYM CL Laffort oenologie). In Sancerre, 20 kg of grapes were pressed with a small wine press and 6 g per hectoliter of sulfur dioxide was added to the must and static clarification of the juice was completed at 18°C overnight. In both microvinifications, in Bordeaux and Sancerre, must turbidity was adjusted to 150-200 NTU and Yeast Available Nitrogen (YAN) was amended to 220 mg L⁻¹ with Thiazote (0.1 mg µL⁻¹). The must was then inoculated with X5 yeast strain (ZYMAFLORE X5–Laffort, final concentration of 20 mg mL⁻¹). In Bordeaux and Sancerre, fermentations were carried on 100 mL and 5 L of must respectively at 20°C. At the end of the fermentation, 7 g hL⁻¹ of SO₂ was added and wines were stored at 4°C before analysis of volatile thiols. In Sancerre, wines were conserved at 10°C and aromas or sensorial analysis were performed 6 months later.

RNA extraction and gene expression analysis. Total RNAs were isolated according to the procedure of Reid *et al.*, (2006) ²¹² from 1 g of grounded frozen berries from Bordeaux in 2013 and 2014. Traces of genomic DNA were removed by a DNase I treatment according to the manufacturer's instructions (Ambion TURBO DNA-free DNase, Life Technologies). RNAs were quantified using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific) and checked for integrity on an 1.8% agarose gel. For cDNA synthesis, 1.5 µg of total RNA were reverse transcribed with OligodT primers in an 20 µL reaction mixture using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Relative transcript quantification of *VviGSTs*, *VviGGT* and *VviNiR* genes was achieved by quantitative real-time PCR using a CFX96 Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad). PCR

conditions and specific oligonucleotide primer pairs were those from Kobayashi *et al.*, 2011¹⁵¹ and Guillaumie *et al.*, 2013⁶⁵. The amplification efficiencies were determined by serial dilutions and normalized expression of each gene was calculated using the Bio-Rad CFX Manager software. Amplifications of the *VviGAPDH* and *VviActin* genes were used for normalization by comparing the cycle threshold of the target gene with those of standard genes. All experiments were performed with three biological replicates and two technical replicates.

RNA-seq library construction and sequencing. Grape berry mRNA was purified using oligo (dT) magnetic beads and fragmented using divalent cations at 94°C for 8 minutes. mRNA was cleaved into short fragments of about 200 bp and double strand cDNA was synthesized using random primers and DNA polymerase I. The double stranded cDNA fragments were blunted using T4 DNA polymerase, Klenow DNA polymerase and T4 PNK. A single 'A' nucleotide was added to the 3' ends of the blunt DNA fragments using a Klenow fragment enzyme. Sequencing adaptors were ligated to the fragments that were enriched by PCR amplification (TruSeq™ RNA Sample Preparation v2 kit, Illumina Inc.). Surplus PCR primers were removed by purification using AMPure XP beads (Agencourt Biosciences Corporation). DNA libraries were checked for quality and quantified using 2100 Bioanalyzer (Agilent). The grape berry cDNA library products were ready for sequencing analysis via Illumina HiSeq 2500.

Analysis of Illumina reads. Reads were mapped onto the 12X assembly of the *Vitis vinifera* genome using TopHat v2.0.10²³² and the Bowtie2 v2.1.0 aligner²³³ and less than two mismatches were allowed when mapping. Only uniquely aligned reads have been retained for analyses. Quantification of gene expression was performed using HTSeq v0.5.4p3²³⁴ with the intersection nonempty mode and CRIBI V1 annotations. The gene expression level was calculated by using RPKM (reads per exon kilo base per million mapped sequence reads).

Read count have been normalized across libraries with the method proposed by Anders and Huber (2010)²³⁵. Comparison of interest were performed using the method proposed by Love *et al.*, (2014)²³⁶ and implemented in the DESeq2 Bioconductor library (DESeq2 v1.0.19). Resulting *p* values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg (1995) method²³⁷. The log₂ Fold-Change was estimated using the method proposed by Love *et al.*, (2014). Genes of interest were defined by their gene ontology

from Ath_AGI_TAIR9_Jan2010 using MapMan interface²³⁸. Differentially expressed genes with a p value ≤ 0.05 and an absolute value of log₂ ratio ≥ 0.75 were used as the thresholds to judge the significance of gene expression difference. RNA-seq data were averaged of 3 biological replicates.

Statistical analysis. Statistical analyses were conducted using the statistical package of the R software (R Development Core team, 2010). All the data are expressed as the mean average \pm standard error (SE) from four biological replicates for metabolites measurements and from three biological replicates and two technical replicates for gene expression profiling. Statistical significance was analyzed with Student's t test. A value of p value < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

RESULTS

Vine water status. The aim of this experimentation was to study the direct effect of nitrogen status on aroma potential without interference of water deficit. Irrigation was implemented to avoid water deficit stress. Vines water status was assessed during both seasons from July through September, by measuring stem water potential using a pressure chamber ²⁰. Stem water potential values for both vineyards are shown in figure 2.

In 2013, stem water potential values ranged between -0.7 MPa and -0.3 MPa and so did not exceed the threshold for water deficit of -1 MPa. In 2014, stem water potential values ranged between -0.95 MPa and -0.2 MPa in Bordeaux and -0.45 MPa and -0.3 MPa in Sancerre. Hence, vines did not face any severe water deficit, which allowed us to study the influence of nitrogen fertilization without much interference with water stress.

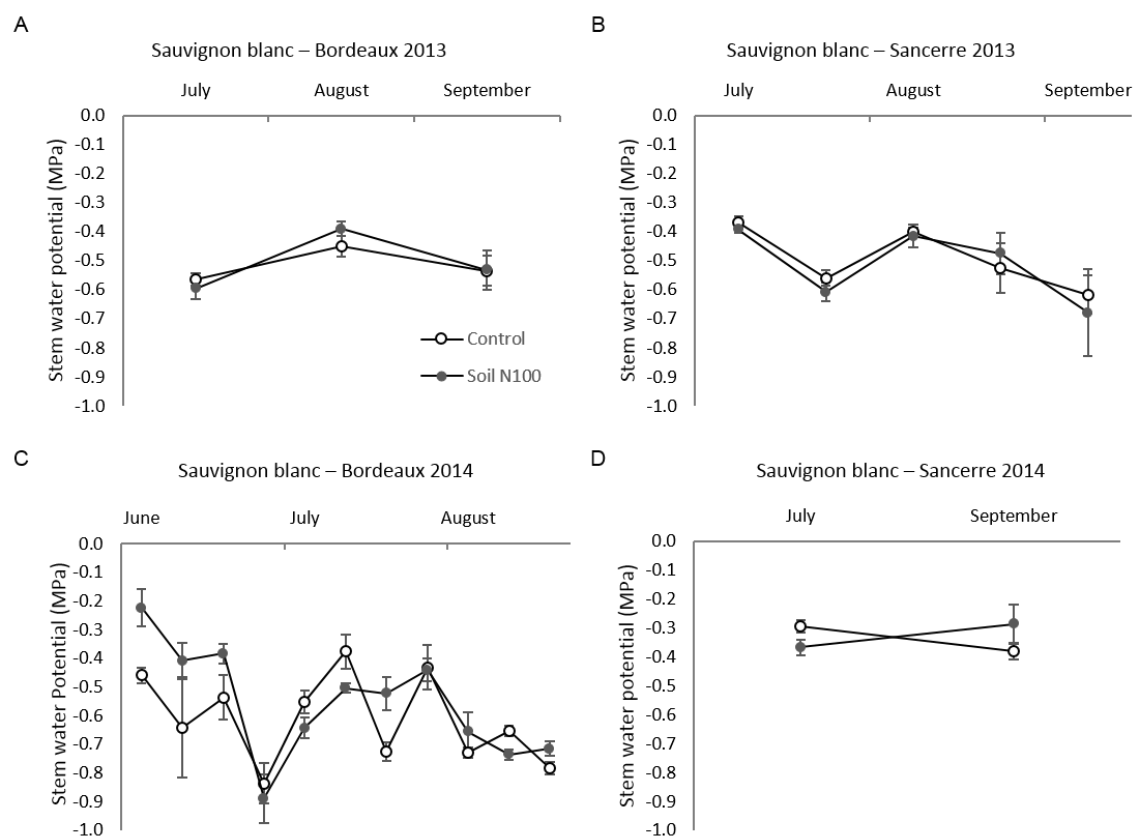


Figure 2. Stem water potential (MPa) measured in Bordeaux and Sancerre in 2013 and 2014.

All data are presented as the mean of four biological replicates. Error bars indicate Standard Error (SE).

Vine vigor. Nitrogen supply could enhance vegetative growth referred as vine vigor and in consequence leaf area and yield. To limit an impact of nitrogen supply on vine vigor, the fertilization was fractionated into two doses for the soil N100 treatment and it was applied late in the season (at budbreak and at bloom). Vine vigor was estimated by measuring primary and secondary leaf areas at shoot growth cessation and by estimating the yield at harvest (Table 1).

	Bordeaux			Sancerre		
	Primary leaf area	Secondary leaf area	Yield	Primary leaf area	Secondary leaf area	Yield
2013						
Control	1.11 ^a	1.02 ^a	1.18 ^a	1.59 ^a	0.59 ^a	1.44 ^a
Soil N100	1.18 ^a	1.30 ^a	1.24 ^a	1.69 ^a	0.95 ^b	1.47 ^a
2014						
Control	1.06 ^a	1.21 ^a	1.24 ^a	1.63 ^a	0.56 ^a	2.57 ^a
Soil N100	1.18 ^a	1.43 ^a	1.10 ^a	1.76 ^b	1.37 ^b	2.39 ^a

Table 1. The influence of nitrogen supply on primary and secondary leaf areas (in m²/vine) measured at shoot growth cessation and yield (in kg/vine) determined at harvest in 2013 and 2014.

Values are means of four replicates. In case of significant differences between the two treatments, different letters within the same parameter indicate significant differences. Statistical significance was determined by Student's t test (p value < 0.05).

In Bordeaux, in both years, primary leaf areas for the control and for the soil N100 treatment were similar. No differences were recorded either for secondary leaf area in this region. In Sancerre, nitrogen supply did not influence primary leaf area in 2013 while it was affected in 2014. Furthermore, a difference was observed for secondary leaf area in this region in both years. Soil N100 treatment developed greater leaf area compared to the control. Yields at harvest were determined for both treatments in both vineyards. For each year and location, no significant differences of yield were observed between the fertilized vines and non-fertilized vines (Table 1). Hence, nitrogen supply did not modify vine vigor in the Bordeaux experiment in both years. In the Sancerre experiment, vine vigor was increased, as shown by a greater secondary leaf area in the soil N100 treatment compared to the control in both years. However, primary leaf area was similar and yield did not increase by N supply.

Vine and berry nitrogen status. Vine and berry nitrogen status were assessed in order to check if the fertilization affected the plant nitrogen status and if this mineral was correctly assimilated. In both years, two parameters were monitored. N-tester values were recorded during vine development, which determine leaf blade color intensity, which is in relation with chlorophyll concentration and plant nitrogen status. Yeast Available Nitrogen (YAN) was measured in grape must at harvest. For soil N100 treatment, vine nitrogen status determined by N-tester measurements was higher compared to the control during the whole season in both regions and years (Figure 3). Differences were statistically significant for all measurements.

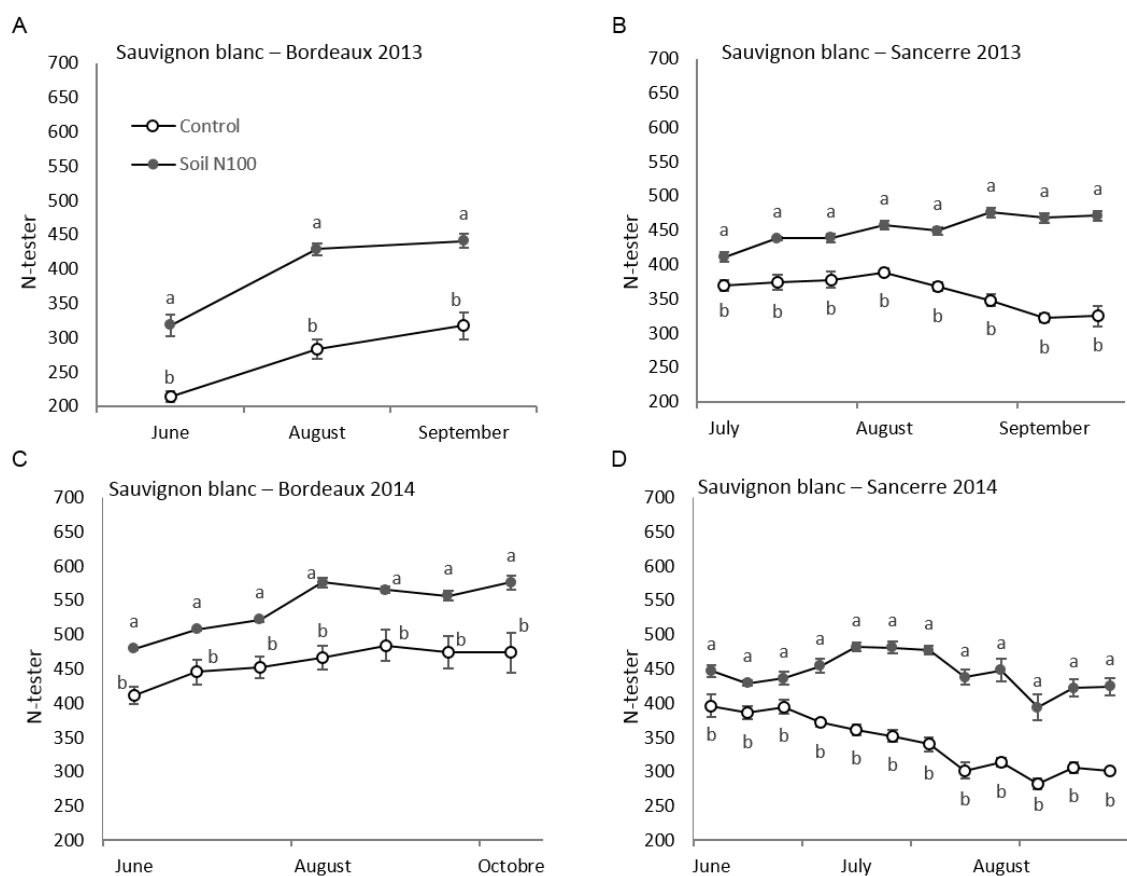


Figure 3. N-tester measurements in Bordeaux and Sancerre vineyards in 2013 and 2014.

This device measures the intensity of the leaf blade color which is in relation with chlorophyll content. All data are presented as the mean of four biological replicates. Different letters indicate significant differences. Error bars indicate Standard Error (SE). Statistical significance was determined by Student's t test (p value < 0.05).

Grape must nitrogen content was confirmed by measuring YAN just prior to commercial harvest. In Bordeaux, YAN of the control was 115 mg L⁻¹ and 151 mg L⁻¹ in 2013 and 2014 respectively while in Sancerre, it was lower, 71 mg L⁻¹ in 2013 and 82 mg L⁻¹ in 2014 (Figure 4). Furthermore, YAN was higher in fertilized plots where an increase of about 80 mg L⁻¹ was noticed in both regions and in both years. Differences were statistically significant and prove that added nitrogen was assimilated by the vine.

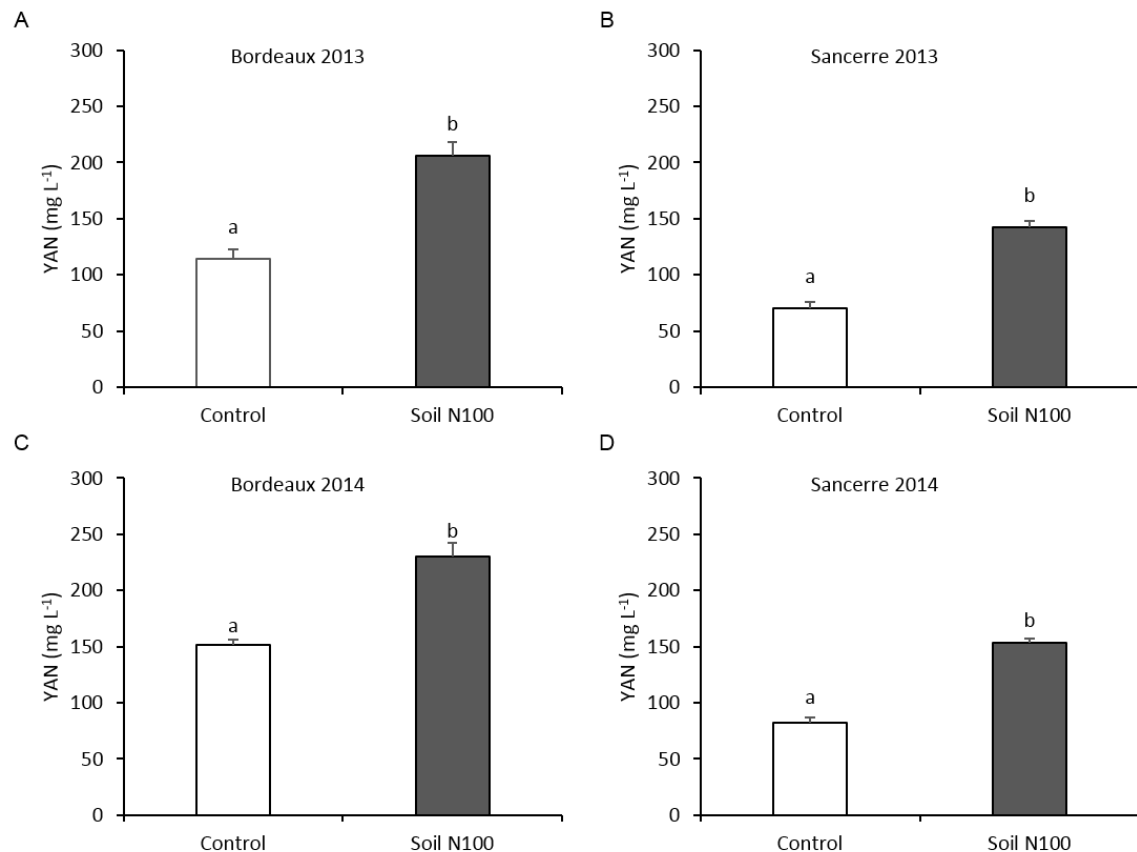


Figure 4. Yeast Available Nitrogen (YAN) in mg L⁻¹ determined for each plot in 2013 and 2014 prior to commercial harvest.

All data are presented as mean of four biological replicates. Different letters indicate significant differences. Error bars indicate Standard Error (SE). Statistical significance was determined by Student's t test (p value < 0.05).

Grape berries maturity and must composition. The effect of nitrogen supply on Sauvignon blanc grape berry and must composition was investigated to determine if the rate of maturity of berries was affected by the fertilization (Table 2). Grape maturity was estimated by the assay of berry weight and sugars (glucose and fructose) and malic acid

content at ripeness. Vine nitrogen status did not have an effect on berry weight in this study except for Bordeaux in 2013 where berry weight was higher in the soil N100 modality (Table 2). It should be noted that this difference, although statistically significant, is not relevant from an enological point of view. The concentration of berry sugars (glucose and fructose) were similar among the two treatments, except in Bordeaux in 2013 where a difference of approximately 15 mg L⁻¹ was observed between the control and the fertilized modality. Malic acid was always lower in the control compared to N100 treatment. In Bordeaux in 2013, malic acid content was 4.3 mg g⁻¹ in the control and increased to 5.1 mg g⁻¹ with nitrogen supply. The same order of difference was perceived in 2014 where malic acid level passed from 3.4 mg g⁻¹ to 4.4 mg g⁻¹. In Sancerre, an increase of 0.8 mg g⁻¹ and 0.4 mg g⁻¹ was noticed in 2013 and 2014 respectively.

	Bordeaux				Sancerre			
	Berry weight	Glucose	Fructose	Malic acid	Berry weight	Glucose	Fructose	Malic acid
2013								
Control	1.62 ^a	112.8 ^a	111.1 ^a	4.3 ^a	1.49 ^a	100.6 ^a	96.4 ^a	3.1 ^a
Soil N100	1.79 ^b	98.4 ^b	97.2 ^b	5.1 ^b	1.59 ^a	106.4 ^a	105.4 ^a	3.9 ^b
2014								
Control	2.26 ^a	82.9 ^a	81.1 ^a	3.4 ^a	1.89 ^a	82.2 ^a	76.6 ^a	4.2 ^a
Soil N100	2.18 ^a	79.1 ^a	77.5 ^a	4.4 ^b	1.96 ^a	83.9 ^a	78.9 ^a	4.6 ^b

Table 2. Nitrogen effect on berry weight (in g/berry), sugars (glucose and fructose) and malic acid contents (in mg g⁻¹ of fresh material) measured just prior to harvest. Values are means of four replicates. In case of significant differences between the two treatments, different letters within the same parameter indicate significant differences. Statistical significance was determined by Student's t test (p value < 0.05).

The effect of nitrogen addition on sugar and malic acid content, pH and acidity was also measured in grape must just prior to commercial harvest (Table 3). No effect of nitrogen fertilization was noticed on sugar level in Bordeaux in 2013 and Sancerre in 2014. A decrease of 16 g L⁻¹ and 5 g L⁻¹ in sugar content was observed in soil N100 treatment in Bordeaux in 2014 and Sancerre in 2013 respectively. pH was not impacted by the fertilization and only in Bordeaux in 2014 an increase of 0.4 g H₂SO₄ L⁻¹ in Total Acidity was observed (7.2 g H₂SO₄ L⁻¹ in the control *versus* 7.6 g H₂SO₄ L⁻¹ in the fertilized modality). In Bordeaux in both years and in Sancerre in 2014, malic acid concentration was higher in berries harvested in soil N100 treatment. In Bordeaux, differences in malic

acid level between the two treatments were in the order of 1.3 g L⁻¹ and 0.7 g L⁻¹ in 2013 and 2014 respectively while in Sancerre in 2014, an increase of 0.4 g L⁻¹ was perceived in fertilized modality. Moreover, these modifications were statistically significant in Bordeaux and Sancerre in 2014. Grape ripening was delayed by nitrogen fertilization, as shown by decreased sugar concentrations and/or increased malic acid concentrations. However, although differences are statistically significant, they correspond to a delay in ripeness of only 2-4 days, depending on location and year. Difference was not great enough to justify different sampling dates for maturity for the control *versus* the soil 100N treatment.

	Bordeaux				Sancerre			
	Sugar	Total Acidity	pH	Malic acid	Sugar	Total Acidity	pH	Malic acid
2013								
Control	193 ^a	7.3 ^a	2.99 ^a	4.7 ^a	205 ^a	5.3 ^a	3.17 ^a	3.8 ^a
Soil N100	174 ^a	7.8 ^a	3.01 ^a	6.0 ^a	190 ^b	5.1 ^a	3.20 ^a	3.8 ^a
2014								
Control	204 ^a	7.2 ^a	3.08 ^a	5.1 ^a	205 ^a	6.0 ^a	3.05 ^a	4.6 ^a
Soil N100	198 ^b	7.6 ^b	3.10 ^a	5.8 ^b	204 ^a	6.3 ^a	3.07 ^a	5.1 ^b

Table 3. The effect of nitrogen addition on sugar level (g L⁻¹), Total Acidity (g H₂SO₄ L⁻¹), pH and malic acid content (g L⁻¹) in grape musts prior to harvest in 2013 and 2014.

Values are means of four replicates. In case of significant differences between the two treatments, different letters within the same parameter indicate significant differences. Statistical significance was determined by Student's t test (*p* value < 0.05).

Nitrogen effect on Glut-3SH and Cys-3SH contents in grape berries. To determine the effect of nitrogen supply on the glutathionylated (Glut-3SH) and the cysteinylated (Cys-3SH) precursors of 3SH in Sauvignon blanc berries, their content in the control and in the soil N100 treatment was monitored during three developmental stages, at mid-veraison (v), mid-ripening (v+28) and ripeness (v+35). Glut-3SH and Cys-3SH contents in grape berries are shown in figure 5.

Glut-3SH concentration increased during berry ripening and reached a peak at (v+35) except for Bordeaux in 2014 where highest value was attained at (v+28). Glut-3SH content was related to vine nitrogen status. Glut-3SH level was higher in the soil N100 treatment compared to the control in all combinations, although differences were not always

significant. For example in Bordeaux in 2013 at (v+35), Glut-3SH content was 10-fold higher in the fertilized modality: values were 3.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the control vines *versus* 35.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the soil N100 vines (Figure 5A). In the same year in Sancerre at (v+28), the content of the glutathionylated precursor in the fertilized modality was 5-fold higher compared to the control (3.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ *versus* 15.2 $\mu\text{g L}^{-1}$).

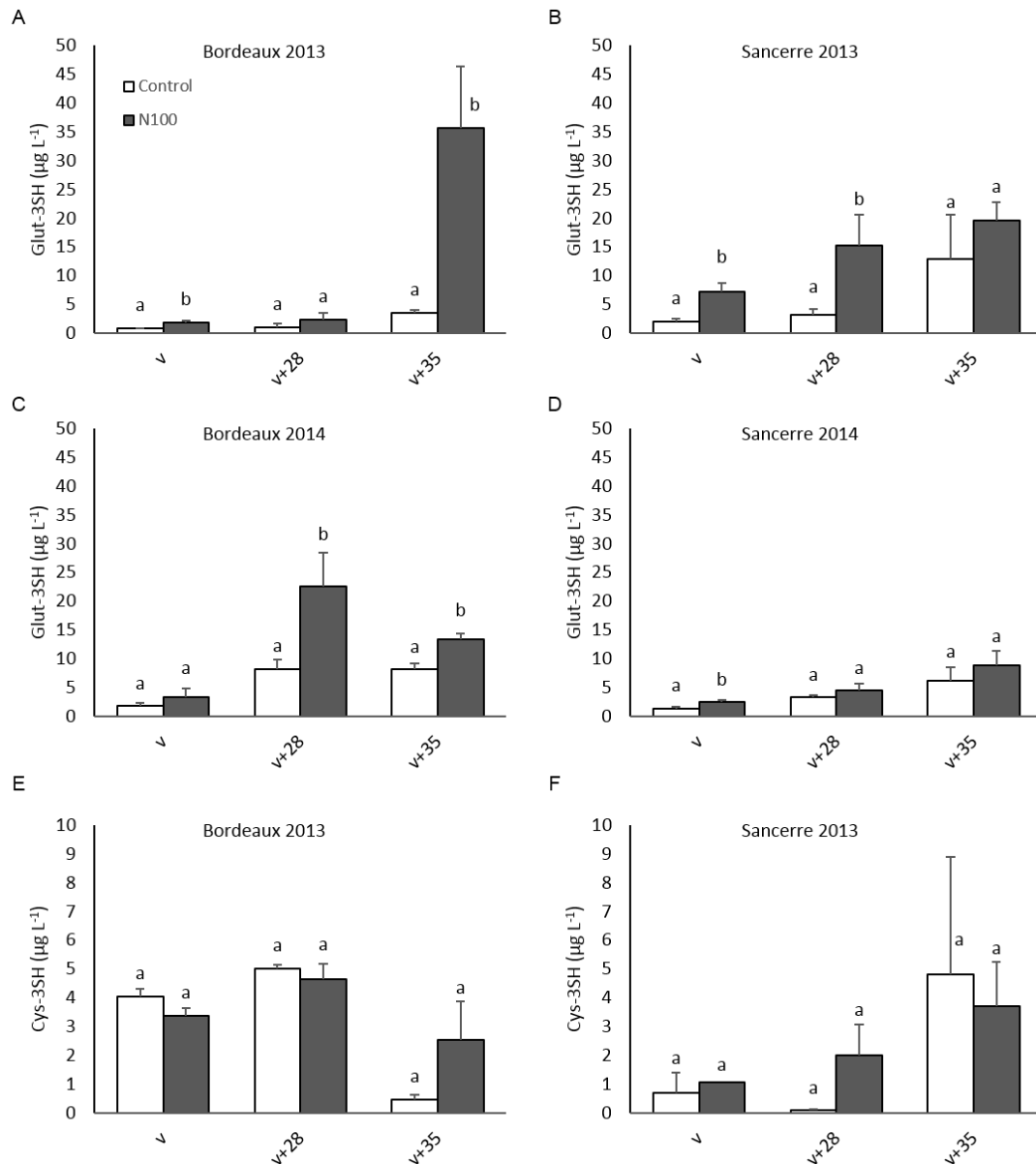


Figure 5. Effects of nitrogen supply on the amount of Glut-3SH and Cys-3SH ($\mu\text{g L}^{-1}$) in grape berries at (v), (v+28) and (v+35).

All data are presented as mean of four biological replicates. Different letters indicate significant differences. Error bars indicate Standard Error (SE). Statistical significance was determined by Student's t test (p value < 0.05).

Cys-3SH was only detectable in Bordeaux and Sancerre in 2013 (Figure 5E-F). In 2014 in both areas, its level was below the detection limits of the method. The concentration of Cys-3SH was relatively low and stable in the subsequent developmental stages. Moreover the content of this molecule was similar between the control and the soil N100 treatment, indicating that nitrogen fertilization did not influence Cys-3SH content in Sauvignon blanc grape berries.

Nitrogen effect on Glut-3SH and Cys-3SH contents in musts. Analyzing 3SH precursors in grape musts is important due to the fact that those precursors will be transformed in 3SH during the alcoholic fermentation. Several enological techniques like destemming, crushing, pressing and clarification may influence their level during must preparation before fermentation. The glutathionylated and the cysteinylated precursors of 3SH were assessed in Bordeaux and Sancerre Sauvignon blanc musts at harvest in 2013 and 2014 (Figure 6). Compared to berries, concentrations of Glut-3SH and Cys-3SH were approximately 20-fold higher in the corresponding must. These differences may result from differences in the technology of grape processing: immediate freezing in liquid nitrogen for grape berries *versus* pressing at room temperature to obtain grape must. Musts from Sancerre were richer in these precursors compared to musts from Bordeaux, probably due to differences in the way of pressing the grapes. In Bordeaux, 2014 was characterized by higher levels of Glut-3SH compared to 2013 which confirms observations at berry level.

The fertilization led to a significant increase in the concentration of Glut-3SH in 2013 in both vineyards (Figure 6A-B). Levels of Glut-3SH in the control were in order of 91 $\mu\text{g L}^{-1}$ in Bordeaux and 328 $\mu\text{g L}^{-1}$ in Sancerre and they increased to 178 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 544 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectively in the soil N100 treatment. In 2014 in both regions, Glut-3SH content was higher in the must from high N vines but differences were not significant (Figure 6C-D).

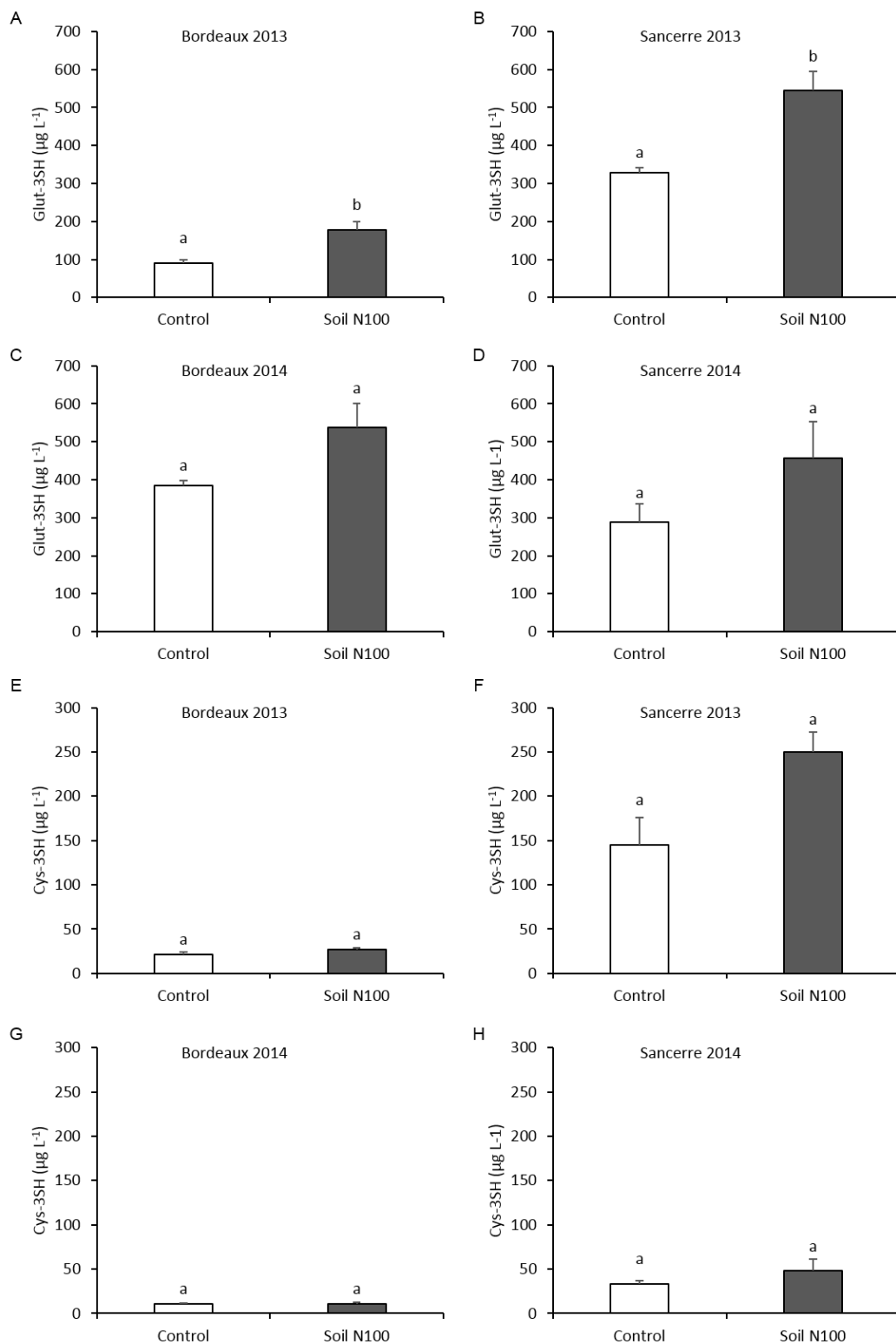


Figure 6. Effects of nitrogen supply on the level of Glut-3SH and Cys-3SH ($\mu\text{g L}^{-1}$) in grape musts.

All data are presented as mean of four biological replicates. Different letters indicate significant differences. Error bars indicate Standard Error (SE). Statistical significance was determined by Student's t test (p value < 0.05).

Levels of Cys-3SH were lower compared to Glut-3SH, an observation described in a previous study ¹⁵¹. In both years, nitrogen did not affect Cys-3SH level, no significant difference was observed between the two treatments in both regions (Figure 6E-H). In Bordeaux, Cys-3SH content ranged between 21 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 27 $\mu\text{g L}^{-1}$ in 2013 while in 2014 it was in the order of 11 $\mu\text{g L}^{-1}$. In Sancerre, Cys-3SH level was particularly high in 2013 where values ranged between 145 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 250 $\mu\text{g L}^{-1}$. In 2014, the concentration of this molecule was at the same order compared to Bordeaux and values ranged from 30 to 45 $\mu\text{g L}^{-1}$.

These results showed that higher vine and berry nitrogen status stimulated the synthesis of the glutathionylated precursor of 3SH in Sauvignon blanc grapes and musts while the concentration of the cysteinylated precursor was not affected.

Nitrogen effect on 3SH level in wines. The effect of nitrogen fertilization on 3SH in Sauvignon blanc wine from Bordeaux and Sancerre was investigated during 2013 and 2014 (Figure 7). Higher levels of 3SH were recorded in 2013 in both vineyards compared to 2014. The concentration of 3SH was particularly high in Sancerre in 2013, where it reached 2198 ng L^{-1} for the soil N100 treatment *versus* 570 ng L^{-1} in Bordeaux. Concerning the impact of nitrogen supply on 3SH levels, wines made from berries grown on fertilized vines had higher 3SH concentration than those made from berries grown on non-fertilized vines, although this difference was not significant in Bordeaux in 2013 (Figure 7). For example, 3SH level in the soil N100 treatment compared to the control was 2.5-fold higher in Sancerre in 2013 (2198 ng L^{-1} *versus* 911 ng L^{-1}), 1.5-fold higher in Sancerre in 2014 (299 ng L^{-1} *versus* 201 ng L^{-1}) and 3.5-fold higher in Bordeaux in 2014 (429 ng L^{-1} *versus* 123 ng L^{-1}). It is worth emphasizing that maximal level of 3SH was measured in Sancerre in 2013 where corresponding must also showed the highest concentrations of Glut-3SH and Cys-3SH, revealing a positive relationship between the thiol and its precursors.

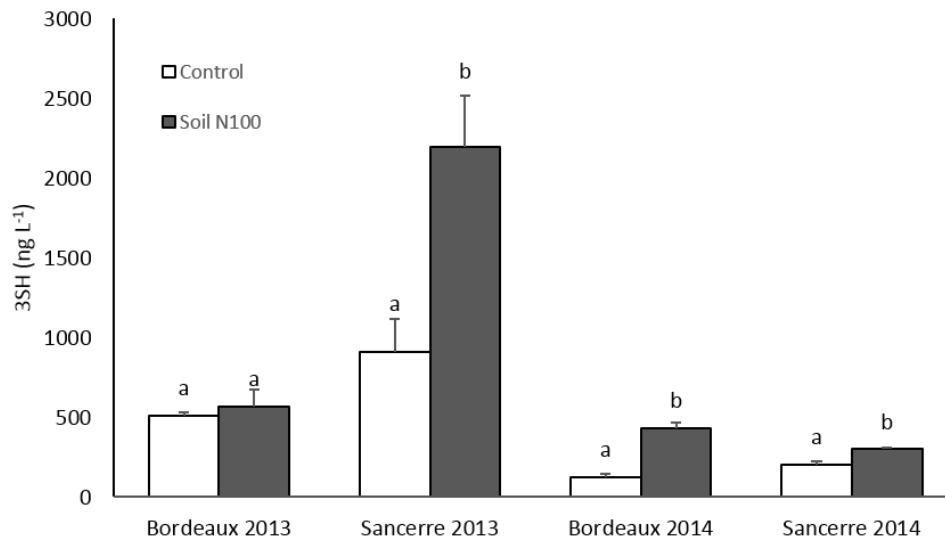


Figure 7. Effects of nitrogen supply on the level of 3SH (ng L⁻¹) in wines made by small-scale vinifications.

All data are presented as mean of four biological replicates. Different letters indicate significant differences. Error bars indicate Standard Error (SE). Statistical significance was determined by Student's t test (p value < 0.05).

Gene expression from the 3SH pathway and their response to nitrogen fertilization.

In a study published in 2011¹⁵¹, Kobayashi *et al.*, described two genes, *VviGST3* and *VviGST4*, from the family of the glutathione-*S*-transferase as essential genes in the biosynthetic pathway of 3SH. These genes are responsible for the addition of the glutathione to the *trans*-2-hexanal to produce the Glut-3SH. Another gene, *VviGGT*, responsible for the conversion of Glut-3SH to Cysgly-3SH, an intermediate precursor, was also identified¹⁵¹. The expression profile of these three genes and of *VviNiR*, a gene from the nitrogen assimilation pathway which serves as a positive control for vine nitrogen status⁸⁹, was determined in Sauvignon blanc berries from Bordeaux at different developmental stages (Figure 8). Their expression was evaluated relative to the expression of two endogenous reference genes used as internal standards *VviGAPDH* and *VviActin*.

The *VviNiR* expression profile increased in 2013 during ripening and reached a maximum at (v+35) stage. Nitrogen supply resulted in an increasing of *VviNiR* transcript levels and differences were statistically significant at (v-20), an early developmental stage and at (v+35) (Figure 8A). In 2014, the expression of *VviNiR* increased with berry development,

attained a maximum level at (v+28) before decreasing at (v+35). As for 2013, nitrogen had a positive effect on relative transcript abundance of this gene mainly at (v-20) (Figure 8B).

VviGST3 and *VviGST4* expression profiles were also studied during grape ripening. Their transcript abundance is shown in figure 8. In 2013 and 2014, the relative expression of *VviGST3* for both treatment increased during ripening. It was 3-fold higher at (v+35) compared to (v-20) (Figure 8C–D). As for *VviGST3*, *VviGST4* had the same profile in 2013 and 2014 where its expression increased during the season (Figure 8E–F). The transcript abundance of *VviGGT* which encodes the enzyme that catalyzes the elimination of the glutamic acid to generate the Cysgly-3SH was also similar in both years. Its expression was low at (v-20) compared to the two other stages where it was to a large extent stable: the expression of *VviGGT* was 2-fold higher at (v+35) compared to (v-20) (Figure 8G–H). No significant differences were observed in the expression of *VviGST3*, *VviGST4* and *VviGGT* genes between the control and the soil N100 treatment at all stages in both years.

Furthermore, the expression profile of these genes were also investigated in the RNA-seq data. No significant differences in their expression level were observed between the fertilized and non-fertilized vines confirming results obtained by the qRT-PCR. Hence, these genes are clearly not regulated by nitrogen.

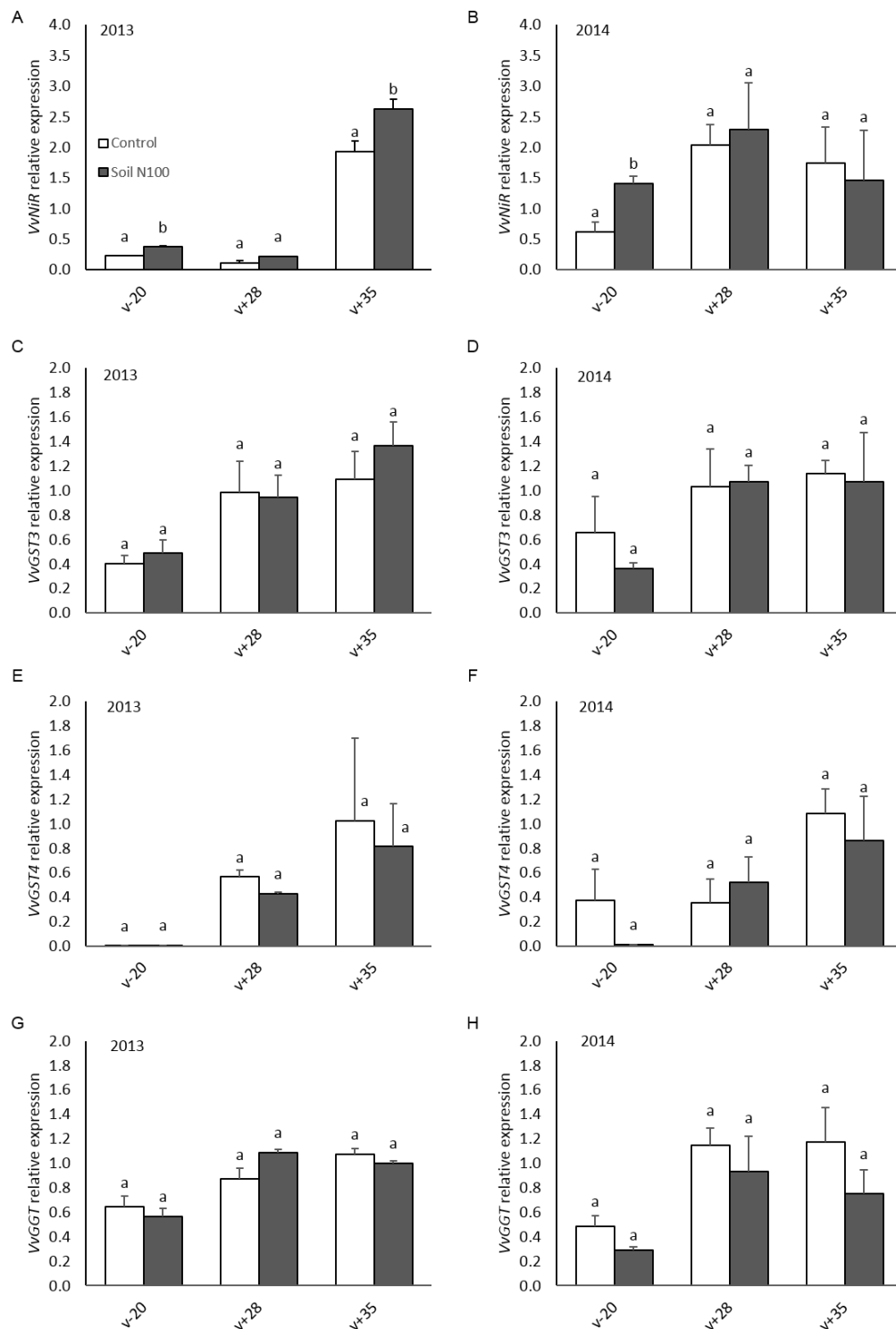


Figure 8. Changes in relative transcript levels of genes of *VviNiR*, *VviGST3*, *VviGST4* and *VviGGT* in grape berries throughout their development.

Transcript levels were analyzed by real-time PCR and are shown relative to expression of *VviGAPDH* and *VviActin* in each sample. All data are presented as mean of three biological replicates and two technical replicates. Different letters indicate significant differences. Error bars indicate Standard Error (SE). Statistical significance was determined by Student's t test (p value < 0.05).

Identification of candidate genes from the biosynthetic pathway of 3SH precursors.

- Only results obtained in 2013 were represented in this part of our study. For publication, this article will be completed by results obtained in 2014 once they are available.

Only differentially expressed genes in response to nitrogen supply were studied due to their potential implication in differences observed on Glut-3SH level between N treatments. Two strategies were conducted in order to identify new candidate genes from the biosynthetic pathway of 3SH precursors. The first one, “*a priori* method”, consists in searching for genes from families already described in the literature as implicated in the pathway. The second one, “without *a priori* method”, consists in a screening of all common genes between (v+28) and (v+35), stages where nitrogen effect on Glut-3SH was observed, and which are differentially expressed between the control and the soil N100 treatment.

For the “*a priori* method”, we referred to the pathway already described by Kobayashi *et al.*, (2010)¹⁴⁸ and Thibon *et al.*, (2011)¹⁴⁹ where a glutathione-S-transferase (GST), a γ -glutamyltranspeptidase (GGT) and a carboxypeptidase were assumed to be essential for generating the precursors.

According to the National Center for Biotechnology Information reference sequence (NCBI RefSeq, 03 August 2015) database, 118 genes encoding GST enzymes were identified in *Vitis vinifera*. Of these genes, 94 GST transcripts at (v+28) and 96 at (v+35) were perceived in our RNA-seq data (Supplementary table 1). *VviGSTs* with p value < 0.05 and $|\log_2(\text{Soil N100}/\text{Control})| \geq 0.75$ were considered to respond to nitrogen supply and might be involved in differences observed on Glut-3SH level among treatments. A list of these *VviGSTs* is represented in Table 4. At (v+28), *VIT_19s0015g02680* was found to be 2-fold up-regulated in the soil N100 treatment compared to the control. At this same developmental stage, the 2 other GSTs (*VIT_16s0039g01070* and *VIT_07s0104g01800*) were 1.7-fold and 1.8-fold up-regulated in the fertilized modalities.

VviGSTs identified at (v+35) were different from those described at (v+28). At this stage, *VIT_19s0015g02690* and *VIT_01s0026g02400* were found to be 1.7-fold up-regulated in the fertilized vines compared to the control. However, *VIT_12s0035g02100* expression profile was down-regulated by nitrogen supply (Table 4).

Moreover, all identified *VviGSTs* were from the tau family (GSTU) except for *VIT_07s0104g01800* and *VIT_12s0035g02100* which are from phi (GSTF) and zeta (GSTZ) family respectively.

ID	Best identity description (organism)	Log2(Soil N100/C)
Putative Glutathione-S-transferase at (v+28)		
<i>VIT_07s0104g01800</i>	GSTF13 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	0.87
<i>VIT_16s0039g01070</i>	GSTU8 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	0.79
<i>VIT_19s0015g02680</i>	GSTU25 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	0.94
Putative Glutathione-S-transferase at (v+35)		
<i>VIT_01s0026g02400</i>	GSTU10 (<i>Vitis vinifera</i>)	0.79
<i>VIT_12s0035g02100</i>	GSTZ2 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	-0.94
<i>VIT_19s0015g02690</i>	GSTU25 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	0.79
Putative carboxypeptidase at (v+28)		
<i>VIT_00s2015g00020</i>	F-box protein FBW2-like (<i>Vitis vinifera</i>)	1.12
<i>VIT_00s2507g00010</i>	F-box family protein (<i>Populus trichocarpa</i>)	2.26
<i>VIT_03s0091g01290</i>	Serine carboxypeptidase 18-like (<i>Vitis vinifera</i>)	1.06
<i>VIT_06s0061g00710</i>	Zinc finger family protein (<i>Ricinus communis</i>)	0.99
<i>VIT_08s0040g01140</i>	Putative serine carboxypeptidase (<i>Ricinus communis</i>)	1.19
<i>VIT_10s0116g00560</i>	Polyphenol oxidase (<i>Vitis vinifera</i>)	1.60
<i>VIT_14s0006g00180</i>	Aspartic proteinase nepenthesin-2-like (<i>Vitis vinifera</i>)	-0.80
<i>VIT_18s0041g00370</i>	Cysteine proteinase inhibitor 1-like (<i>Vitis vinifera</i>)	0.85
Putative carboxypeptidase at (v+35)		
<i>VIT_00s2507g00010</i>	F-box protein FBW2-like (<i>Vitis vinifera</i>)	0.81
<i>VIT_01s0010g02860</i>	Mitochondrial chaperone BCS1-like (<i>Vitis vinifera</i>)	-0.90
<i>VIT_01s0137g00330</i>	Cysteine proteinase (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	-0.93
<i>VIT_01s0150g00330</i>	U-box domain-containing protein 43-like (<i>Vitis vinifera</i>)	0.79
<i>VIT_03s0088g00260</i>	Serine carboxypeptidase 18-like (<i>Vitis vinifera</i>)	0.91
<i>VIT_03s0091g01290</i>	Serine carboxypeptidase 18-like (<i>Vitis vinifera</i>)	1.09
<i>VIT_05s0020g05000</i>	Serine carboxypeptidase-like (<i>Vitis vinifera</i>)	1.46
<i>VIT_06s0061g00710</i>	Zinc finger family protein (<i>Vitis vinifera</i>)	0.87
<i>VIT_10s0116g00560</i>	Polyphenol oxidase (<i>Vitis vinifera</i>)	2.19
<i>VIT_13s0019g05120</i>	Cysteine proteinase 15A-like (<i>Vitis vinifera</i>)	-0.75
<i>VIT_13s0047g00200</i>	Xylem serine proteinase 1-like (<i>Ricinus communis</i>)	0.84
<i>VIT_19s0085g01110</i>	Putative aspartic proteinase (<i>Ricinus communis</i>)	1.19

Table 4. Glutathione-S-transferase and carboxypeptidase genes differentially expressed between the control and the soil N100 treatment at mid-ripening (v+28) and ripeness (v+35).

p value < 0.05 and $|\log_2(\text{Soil N100}/\text{Control})| \geq 0.75$. C, control.

The 3SH precursor pathway involves also the presence of a GGT and a carboxypeptidase. Eleven *VviGGTs* were identified in our data but using the same criteria as for *VviGSTs* (p value < 0.05 and $|\log_2(\text{Soil N100}/\text{Control})| \geq 0.75$), none was differentially expressed between the fertilized and unfertilized vines.

Concerning the large family of carboxypeptidases, 97 at (v+28) and 98 at (v+35) were found to be expressed in our RNA-seq data. Among these carboxypeptidases, 8 at (v+28) and 12 at (v+35) had a different expression pattern among treatments (Table 4). Except for one at (v+28) and 3 at (v+35), all the identified carboxypeptidases were up-regulated by nitrogen (Table 4). Gene ontology of the correspondent genes was defined using Ath_AGI_TAIR9_Jan2010 and MapMan interface. At (v+28), *VIT_18s0041g00370* belongs to the cysteine pathway, *VIT_14s0006g00180* to aspartate pathway while *VIT_08s0040g01140* and *VIT_03s0091g01290* are implicated in serine pathway. The latter two genes were 2.28 and 2.08-fold differentially expressed between treatments. At the same stage, two genes encoding zinc finger transcription factors (*VIT_06s0061g00710* and *VIT_10s0116g00560*) and two others from the F-box family (*VIT_00s2015g00020* and *VIT_00s2507g00010*) were identified. At (v+35), 4 genes already described at (v+28) were also found to have different expression profiles between the control and the soil N100 treatment (*VIT_03s0091g01290*, *VIT_06s0061g00710*, *VIT_06s0061g00710* and *VIT_00s2507g00010*). Moreover, most of carboxypeptidases identified at this stage belong to protein degradation pathways and encode cysteine or aspartate or serine proteases.

For the “without *a priori* method”, all genes affected by nitrogen supply at (v+28) and (v+35) were identified (Figure 9). As represented in the Venn diagram, 132 genes were up-regulated at (v+28) and 44 genes were down-regulated by nitrogen at the same developmental stage. At (v+35), 84 genes were stimulated by nitrogen while 43 were repressed. We also identified 53 up-regulated genes common between (v+28) and (v+35) and 7 down-regulated genes common between the 2 stages (Figure 9). For the “without *a priori* method”, only common genes between the 2 stages that were differentially expressed between the control and the N100 treatment were examined due to the fact that Glut-3SH level was modified at both stages. The complete list of these genes is detailed in the supplementary data (Supplementary table 2).

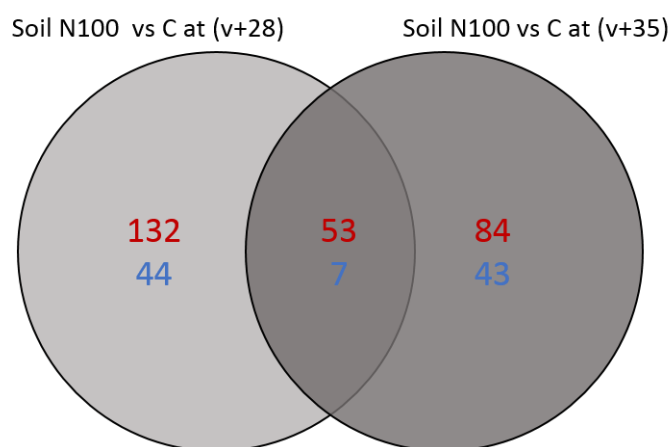


Figure 9. Comparison of differential gene expression between the soil N100 and the control at two developmental stages.

Venn diagrams indicate overlap of all differentially expressed genes obtained from each comparison between the soil N100 treatment and the control at mid-ripening (v+28) and ripeness (v+35). The numbers of up-regulated genes and down-regulated genes are given in red and in blue, respectively. C, control.

Within the up-regulated genes common between (v+28) and (v+35) stages, the largest sets were for unclassified proteins (9 genes), various proteins and enzymes (6 genes) protein fate (7 genes) and transport (5 genes). Moreover there were differentially expressed genes encoding proteins related to photosynthesis (3 genes), cell wall (3 genes), and lipid and hormone metabolism (1 gene in each gene ontology). A gene encoding an asparagine synthetase from the amino acid pathway and two genes related to secondary metabolism were identified. We also found genes encoding a protochlorophyllide reductase, thaumatine-like proteins, pathogenesis-related proteins and osmotin. Within the redox gene ontology (GO), a thioredoxin and an hemoglobin were described. There was also transcripts involved in nucleotide and RNA metabolism, cell organization and development mechanisms (an acid phosphatase and a nodulin MtN21 protein).

Of the 7 down-regulated genes, genes encoding for a stachyose synthase, a carboxylesterase, an invertase, an endonuclease, a Prolifera protein involved in chromatin structure and a peptide from nodulin MtN3 family were identified. Interestingly the expression of a gene encoding an oligopeptide transporter (*VIT_19s0015g00860*) was also differentially expressed between treatments. It was 2-fold lower in the soil N100 treatment compared to the control.

DISCUSSION

The aim of this study was to investigate the effect of vine nitrogen status on the accumulation of the precursors of 3SH in grape berries and must and on 3SH content in wine. The implication of *VviGST3*, *VviGST4* and *VviGGT* genes in the biosynthetic pathway of this volatile thiol was also assessed and new candidate genes that might be involved in its genesis were identified.

In berries, Glut-3SH content was very low in early stages of development and increased during ripening regardless of vine nitrogen status. This phenomenon was described previously by Roland *et al.*, in 2010 and Cerreti *et al.*, in 2015^{156,160}. However, the increase was significantly greater in fertilized condition compared to the control particularly at mid-ripening and ripeness. Cys-3SH was detectable only in Bordeaux and Sancerre berries in 2013. Its concentration was stable during berry ripening and its synthesis was not impacted by vine nitrogen status. Like in the berry, Glut-3SH content in must was affected by N fertilization while Cys-3SH did not reveal any response to nitrogen supply. In the wine, a positive effect of nitrogen was observed on 3SH level which was statistically significant in the majority of combinations. Both precursors are supposed to be implicated in the genesis of 3SH and until recently the Cys-3SH was considered being the major precursor used by the yeast to liberate the 3SH. Nitrogen addition did not affect Cys-3SH level in our study while it impacted the content of Glut-3SH and consequently the content of 3SH. This observation seems to indicate that 3SH could be synthesized from Glut-3SH, independently from Cys-3SH. This result is consistent with that of Subileau *et al.*, (2008)¹⁵⁸ and Roland *et al.*, (2010)²³⁹, who showed that Glut-3SH can be a direct precursor of 3SH. Furthermore, it should be noted that in order to obtain a wine with high levels of 3SH, the must should contain high concentrations of both precursors (Glut-3SH and Cys-3SH) (i.e. Sancerre 2013 *versus* Bordeaux 2014). Still, further studies are required to elucidate possible pathways for the release of this thiol (i.e. from C6 compounds pathway...) ^{158,240,241}.

In 2011, Kobayashi *et al.*,¹⁵¹ demonstrated that *VviGST3*, *VviGST4* and *VviGGT* are key genes in the biosynthetic pathway of 3SH precursors and that their expression is correlated to Glut-3SH and Cys-3SH levels in grape berries. Higher expression rates of *VviNiR* observed in soil N100 treatment confirmed the effect of nitrogen at a

transcriptomic level in our study. *VviGST3*, *VviGST4* and *VviGGT* presented similar responses and expression profile patterns in vines with highly different N status (control versus soil N100 treatment) while Glut-3SH content was influenced by nitrogen supply. Thus, in this study, *VviGST3* or *VviGST4* expression do not relate to Glut-3SH contents. Hence, it can be assumed that these two genes are not responsible of the variation observed in Glut-3SH levels in berries. The identification of the specific *VviGST* implicated in the pathway of 3SH needs further research.

In plants, the glutathione-S-transferases are a superfamily of proteins involved in enzymatic detoxification of endo- and xenobiotics. Plant GSTs are divided into six subclasses namely tau (U), phi (F), zeta (Z), theta (T), lambda (L) and dehydroascorbate reductases²⁴². In *Arabidopsis thaliana*, AtGSTU25 was demonstrated to bind to S-hexanol-glutathione which can be the product of the addition of glutathione to *trans*-2-hexenal²⁴³⁻²⁴⁵. These compounds serve as precursors of the 3SH in the grape berries. The protein sequence of *VIT_19s0015g02680*, one of the GSTs identified in this study, presents 69% of similarity with that of AtGSTU25. *VIT_19s0015g02680* gene sequence is constituted by 2 coding exons and 1 intron. The length of the corresponding transcript is 998 bps generating a protein of 219 residues. Taken all together, *VIT_19s0015g02680* could be a potential candidate gene encoding enzyme implicated in the biosynthetic pathway of 3SH precursors.

In our study, no difference was observed in *VviGGT* expression in relation to vine N status, nor in the level of Cys-3SH, the metabolite supposed to be formed in response to its enzymatic activity. The expression of *VviGGT* gene was not regulated by nitrogen which may explain the absence of an effect of nitrogen on the cysteinylated precursor.

In *Arabidopsis thaliana*, based on sequence similarity and mechanism, 3 gene families have been shown to transport peptides: (i) the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, (ii) the peptide transporter (PTR) or the proton-dependent oligopeptide transporter (POT) family and (iii) the oligopeptide transporter (OPT) family²⁴⁶. The *Arabidopsis* genome contains 9 members of the OPT family and their homologues have been characterized in other plants and in yeast. In *Vitis vinifera*, 18 OPT genes were identified that possess a conserved OPT domain essential for their transporter activity²⁴⁷. The OPT proteins may be involved in 4 different processes: long-distance metal distribution²⁴⁸, heavy metal sequestration^{249,250}, nitrogen mobilization^{246,250} and glutathione

transport ²⁴⁹⁻²⁵². Subileau *et al.*, (2008) showed that the knockout of the *OPT1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* reduced 3SH precursors accumulation in grape must. They deduced that the majority of Glut-3SH is transported into yeast *via* OPT1. In the absence of this transporter, the precursor uptake limited significantly the production of 3SH ¹⁵⁸. Given this evidence, the identified *VIT_19s0015g00860* which encodes an OPT protein may be a potential candidate gene implicated in the transport of GSH necessary for the genesis of 3SH precursors.

In Bordeaux, a significant positive effect of nitrogen supply on Glut-3SH level was observed in 2013 and 2014 while in Sancerre only a non-significant tendency was noticed. In the Sancerre vineyard in both vintages, vine vigor was increased in soil N100 treatment. The non-significant response of Glut-3SH level to nitrogen nutrition in Sancerre could be due to a decrease in 3SH precursors synthesis in soil N100 treatment in relation to increased vine vigor. Greater leaf areas resulted in modified microclimatic conditions in the bunch zone which decrease the temperature and radiations at the grape level. Moreover, an effect of harvest temperature on the concentration of 3SH precursors was described by Kobayashi *et al.*, (2012) ²⁵³, suggesting that these molecules are dependent on the climatic conditions. Light or radiation may stimulate thiol precursor synthesis or on the contrary enhance their degradation. No studies have been published on the direct effect of temperature and radiation on 3SH precursors and more research is required on this highly relevant subject. So the lack of impact of nitrogen on Glut-3SH in the Sancerre experiment could be explained by the modification of the microclimate at the level of bunch zone.

The positive effect of nitrogen on 3SH content in wine could also be the result of a stabilisation phenomenon of this compound in wine produced from grapes grown on vines with a higher N status. Thiols are very sensible molecules and can be lost due to oxidation reactions in the grape must ^{178,187,188}. The presence of antioxidant molecules in wines from soil N100 modality could explain their stabilization. Among antioxidants, glutathione (GSH) plays an important role in volatile thiol stability in wine. This molecule is very important in oenology, in particular for white wine production. GSH content was shown to respond positively to nitrogen status ^{161,183} and its implication in the biosynthetic pathway of 3SH was recently demonstrated ¹⁴⁹. The role of glutathione on volatile thiol synthesis or on their stability, in particular with regard to 3SH, requires

further research. It needs to be clarified if higher 3SH levels in wine in the presence of high GSH levels results from increased production or greater stability of 3SH.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary table 1. List of all Glutathione-S-transferase (GST) identified in this study at mid-ripening (v+28) and at ripeness (v+35).

C, control; nd, not detected.

ID	(v+28)		(v+35)		Best identity description
	log2(N100/C)	p value	log2(N100/C)	p value	
VIT_00s0153g00050	0.47	3.9E-01	0.40	2.6E-01	ATGSTU8
VIT_00s0153g00070	0.00	1.0E+00	0.15	8.5E-01	ATGSTU8
VIT_00s0240g00020	0.03	9.2E-01	0.03	9.2E-01	ATGSTU23
VIT_00s0240g00050	0.07	9.8E-01	-0.37	5.1E-01	ATGSTU25
VIT_00s0246g00110	-0.26	8.7E-01	-0.28	7.9E-01	GST30, ATGSTU17, GST30B, ERD9
VIT_01s0010g01950	-0.06	9.2E-01	-0.02	9.8E-01	Putative anionic peroxidase
VIT_01s0010g01960	0.03	9.2E-01	-0.04	9.2E-01	Putative anionic peroxidase
VIT_01s0010g01980	nd	nd	0.08	8.7E-01	Putative anionic peroxidase
VIT_01s0010g02000	0.23	9.2E-01	0.12	9.2E-01	Putative anionic peroxidase
VIT_01s0010g02010	0.07	9.6E-01	0.23	7.9E-01	Putative anionic peroxidase
VIT_01s0010g02020	0.11	8.7E-01	0.11	8.5E-01	Putative anionic peroxidase
VIT_01s0011g01890	0.19	9.2E-01	0.13	9.2E-01	Putative GST
VIT_01s0011g01900	0.13	7.1E-01	0.18	4.2E-01	Putative GST
VIT_01s0026g01330	nd	nd	-0.01	9.9E-01	GST30, ATGSTU17, GST30B, ERD9
VIT_01s0026g01340	-0.39	1.5E-01	0.08	9.3E-01	GST30, ATGSTU17, GST30B, ERD9
VIT_01s0026g01380	0.13	9.2E-01	-0.11	9.2E-01	GST30, ATGSTU17, GST30B, ERD9
VIT_01s0026g02370	0.03	9.2E-01	nd	nd	ATGSTU10, GSTU10
VIT_01s0026g02390	0.03	9.2E-01	0.03	9.2E-01	ATGSTU10, GSTU10
VIT_01s0026g02400	0.60	3.1E-01	0.80	3.5E-02	ATGSTU10, GSTU10
VIT_02s0025g03620	0.10	8.9E-01	0.05	9.2E-01	ATGSTT1, GST10, GSTU12
VIT_04s0079g00690	0.002	1.0E+00	-0.30	6.2E-01	ATGSTF11, ATGSTF6
VIT_04s0159g00040	-0.19	5.4E-01	-0.26	2.1E-01	Putative microsomal GST
VIT_05s0049g01070	0.42	6.8E-01	0.10	9.4E-01	ATGSTU1, GST19
VIT_05s0049g01080	-0.01	9.8E-01	-0.01	9.8E-01	ATGSTU1, GST19
VIT_05s0049g01090	0.20	9.2E-01	0.43	5.9E-01	ATGSTU7, GST25
VIT_05s0049g01100	0.10	9.6E-01	0.31	7.8E-01	ATGSTU1, GST19
VIT_05s0049g01120	0.43	4.5E-01	0.21	8.6E-01	ATGSTU7, GST25
VIT_05s0051g00110	-0.07	9.2E-01	0.15	7.5E-01	ATGSTU7, GST25
VIT_05s0051g00130	0.25	8.5E-01	-0.11	9.2E-01	ATGSTU7, GST25
VIT_05s0051g00180	-0.26	6.6E-01	-0.16	8.8E-01	ATGSTU8
VIT_05s0051g00240	0.06	9.2E-01	0.00	1.0E+00	ATGSTU23
VIT_05s0051g00320	-0.01	9.8E-01	nd	nd	ATGSTU1, GST19
VIT_06s0004g03690	0.10	9.0E-01	0.24	3.3E-01	Putative ln2-1 protein
VIT_06s0004g05670	0.40	5.8E-01	-0.01	1.0E+00	ATGSTU7, GST25
VIT_06s0004g05680	0.59	1.3E-01	0.69	4.0E-02	ATGSTU7, GST25
VIT_06s0004g05690	0.05	9.4E-01	0.26	7.9E-01	ATGSTU8
VIT_06s0004g05700	0.39	7.2E-01	-0.25	8.2E-01	ATGSTU8
VIT_06s0004g05710	0.14	9.2E-01	0.18	9.1E-01	ATGSTU7, GST25
VIT_07s0005g00010	0.57	8.7E-03	0.44	7.4E-02	ATGSTF8, ATGSTF5, GST6, GSTF8
VIT_07s0005g00030	0.12	9.1E-01	-0.08	9.2E-01	ATGSTF8, ATGSTF5, GST6, GSTF8
VIT_07s0005g04180	-0.01	9.9E-01	0.12	9.1E-01	GST domain-containing protein
VIT_07s0005g04870	0.32	8.2E-01	-0.39	6.6E-01	ATGSTU8
VIT_07s0005g04880	-0.09	9.6E-01	-0.44	4.6E-01	ATGSTU7, GST25
VIT_07s0005g04890	-0.05	9.8E-01	-0.19	5.6E-01	ATGSTU7, GST25
VIT_07s0104g01800	0.88	2.7E-02	0.56	3.5E-01	ATGSTF13
VIT_07s0104g01810	0.12	9.2E-01	0.03	9.2E-01	ATGSTF13
VIT_07s0104g01820	0.15	8.2E-01	0.00	1.0E+00	ATGSTF7, GST11, ATGSTF8, GSTF7
VIT_07s0104g01830	0.05	9.4E-01	0.12	8.8E-01	ATGSTF8, ATGSTF5, GST6, GSTF8
VIT_08s0007g01400	0.32	6.2E-01	0.71	5.8E-02	ATGSTU8

VIT_08s0007g01410	0.14	9.2E-01	0.36	6.6E-01	ATGSTU8
VIT_08s0007g01420	-0.06	9.8E-01	0.12	9.3E-01	ATGSTU8
VIT_08s0040g00920	0.87	7.6E-02	0.62	2.5E-01	ATGSTU7, GST25
VIT_08s0040g03040	-0.02	9.8E-01	0.12	7.5E-01	Putative In2-1 protein
VIT_08s0040g03100	-0.03	9.8E-01	0.06	9.2E-01	Putative In2-1 protein
VIT_10s0003g04250	nd	nd	-0.01	9.9E-01	ATGSTU22
VIT_12s0028g00920	0.33	4.7E-01	0.03	9.8E-01	ATGSTF9, GLUTTR, ATGSTF7, VviGST3
VIT_12s0028g00930	0.19	8.1E-01	0.01	9.9E-01	ATGSTF9, GLUTTR, ATGSTF7
VIT_12s0035g02040	-0.09	9.2E-01	0.05	9.7E-01	ATGSTZ2
VIT_12s0035g02100	-0.18	9.1E-01	-0.95	1.9E-05	ATGSTZ2
VIT_12s0035g02110	0.15	8.5E-01	0.16	5.3E-01	ATGSTZ2
VIT_13s0067g03470	-0.04	9.5E-01	0.14	5.7E-01	Putative In2-1 protein
VIT_14s0060g02170	0.32	6.0E-01	0.45	4.1E-01	ATGSTU8
VIT_15s0024g01540	-0.26	5.7E-01	-0.41	3.4E-01	ATGSTU8
VIT_15s0024g01630	0.66	1.2E-01	0.71	8.6E-02	ATGSTU8
VIT_15s0024g01650	0.57	3.9E-01	0.62	1.8E-01	ATGSTU8
VIT_15s0048g00950	-0.28	6.1E-01	-0.13	8.5E-01	ATGSTZ2
VIT_16s0039g00970	0.29	6.8E-01	0.49	1.3E-01	ATGSTU7, GST25
VIT_16s0039g00990	0.49	2.0E-01	0.44	1.6E-01	ATGSTU7, GST25
VIT_16s0039g01070	0.79	4.3E-03	0.29	7.5E-01	ATGSTU8
VIT_17s0000g02920	0.12	9.2E-01	0.09	9.5E-01	ATGSTU7, GST25
VIT_17s0000g02930	-0.04	9.8E-01	0.00	1.0E+00	ATGSTU7, GST25
VIT_17s0000g02940	-0.06	9.7E-01	-0.15	9.2E-01	ATGSTU8
VIT_17s0000g02950	-0.17	9.1E-01	0.18	7.8E-01	ATGSTU7, GST25
VIT_17s0000g06110	-0.16	7.6E-01	0.00	1.0E+00	ATGSTU9, GST14, GST14B
VIT_17s0000g06130	0.23	8.6E-01	0.11	9.3E-01	ATGSTU9, GST14, GST14B
VIT_18s0001g00690	-0.18	8.3E-01	0.06	9.3E-01	ATGSTF8, ATGSTF5, GST6, GSTF8
VIT_18s0001g01690	0.02	9.8E-01	0.03	9.6E-01	TeCH reductive dehalogenase-related protein
VIT_18s0001g07010	-0.16	9.2E-01	0.11	9.3E-01	ATGSTU2, GST20
VIT_19s0015g02590	0.29	6.2E-01	0.43	3.0E-02	ATGSTU25
VIT_19s0015g02610	-0.01	9.9E-01	0.13	9.2E-01	ATGSTU25
VIT_19s0015g02680	0.95	1.1E-03	0.45	1.6E-01	ATGSTU25
VIT_19s0015g02690	0.42	2.3E-01	0.79	2.4E-06	ATGSTU25
VIT_19s0015g02700	-0.46	6.0E-01	0.59	3.3E-01	ATGSTU25
VIT_19s0015g02730	0.36	7.4E-01	-0.10	9.2E-01	ATGSTU25
VIT_19s0015g02880	0.25	8.0E-01	0.31	3.2E-01	ATGSTU25
VIT_19s0015g02890	0.19	9.2E-01	0.06	9.4E-01	ATGSTU25
VIT_19s0027g00460	0.38	2.7E-01	0.23	3.3E-01	ATGSTU25
VIT_19s0027g00930	0.04	9.7E-01	nd	nd	ATGSTU8
VIT_19s0093g00110	0.25	8.9E-01	0.09	9.4E-01	ATGSTU25
VIT_19s0093g00150	0.22	9.2E-01	nd	nd	ATGSTU25
VIT_19s0093g00160	0.11	9.2E-01	0.01	9.9E-01	ATGSTU24
VIT_19s0093g00190	-0.07	9.2E-01	0.14	8.5E-01	ATGSTU25
VIT_19s0093g00220	0.51	2.5E-01	0.33	5.2E-01	ATGSTU19, GST8
VIT_19s0093g00310	0.19	9.2E-01	0.10	9.2E-01	ATGSTU19, GST8
VIT_19s0093g00320	0.51	4.5E-01	0.01	1.0E+00	ATGSTU25
VIT_19s0093g00350	-0.12	9.0E-01	0.14	8.7E-01	ATGSTU25
VIT_19s0093g00370	nd	nd	-0.02	9.2E-01	ATGSTU22
VIT_19s0093g00390	nd	nd	0.04	9.2E-01	ATGSTU25
VIT_19s0093g00400	0.13	9.0E-01	0.23	4.3E-01	ATGSTU25

Supplementary table 2. A list of common differentially expressed genes in response to nitrogen supply between mid-ripening (v+28) and ripeness (v+35).
 p value < 0.05 and $|\log_2(\text{Soil N100}/\text{Control})| \geq 0.75$.

Up-regulated gene ID	GO	Best identity description	(v+28)	(v+35)
			p value	p value
VIT_00s0125g00280	Photosystem	PSAF (photosystem I subunit F)	4.6E-03	2.8E-03
VIT_00s0265g00090	Not assigned	Unknown protein	3.3E-03	4.9E-04
VIT_00s2507g00010	Protein	F-box family protein (FBW2)	2.2E-11	3.9E-02
VIT_01s0026g00290	Protein	Mitochondrial ribosomal protein L2 (RPL2)	5.2E-03	1.1E-02
VIT_01s0127g00540	Not assigned	DC1 domain-containing protein	9.8E-09	4.0E-04
VIT_01s0137g00240	Cell wall	Pectate lyase family protein	4.5E-09	3.0E-08
VIT_01s0150g00510	Protein	Protein phosphatase 2C-related (PP2C-related)	8.7E-03	3.0E-06
VIT_02s0025g00990	Transport	Multidrug resistance-associated protein 14 (ATMRP14)	1.2E-02	1.3E-03
VIT_02s0025g04310	Stress	Osmotin 34 (OSM34)	9.6E-04	1.3E-03
VIT_03s0063g01960	Redox	Arabidopsis hemoglobin 1 (AHB1)	1.0E-02	5.1E-03
VIT_03s0091g01290	Protein	Serine carboxypeptidase-like 18 (scpl18)	8.2E-03	2.0E-03
VIT_04s0023g01110	Not assigned	Transmembrane family protein	1.8E-04	1.9E-05
VIT_04s0023g03540	Stress	Pathogenesis-related thaumatin family protein	1.6E-02	3.1E-05
VIT_04s0023g03550	Stress	Thaumatococcus, putative	1.1E-02	2.3E-05
VIT_04s0044g00310	Development	Nodulin MtN21 family protein	4.4E-03	7.5E-04
VIT_04s0044g01410	Photosystem	PSAN (photosystem I subunit)	2.1E-03	2.3E-02
VIT_05s0020g03180	Photosystem	PSAD-2 (photosystem I subunit D-2)	1.4E-03	1.0E-02
VIT_06s0004g05660	Miscellaneous	Glycosyl transferase family 1 protein	5.8E-04	3.4E-04
VIT_06s0004g06830	Amino acid metabolism	Glutamine-dependent asparagine synthase 1 (ASN1)	2.7E-02	2.3E-05
VIT_06s0061g00710	Protein	Zinc finger family protein	1.5E-03	2.3E-04
VIT_06s0061g00730	Transport	Gamma tonoplast intrinsic protein (GAMMA-TIP)	1.8E-04	4.7E-03
VIT_06s0061g01380	Not assigned	Heat stable protein 1 (HS1)	1.5E-02	1.3E-02
VIT_07s0005g00730	Cell wall	Pectinesterase	2.6E-07	8.9E-06
VIT_07s0005g01140	Not assigned	Unknown protein	5.4E-03	4.3E-02
VIT_07s0005g04130	Development	Acid phosphatase class B family protein	1.4E-03	4.3E-02
VIT_07s0005g06620	Not assigned	Unknown protein	5.4E-03	3.0E-02
VIT_07s0104g00410	Miscellaneous	Dienelactone hydrolase family protein	2.9E-03	1.4E-02
VIT_07s0141g00360	Lipid metabolism	Lipase class 3 family protein	4.4E-05	3.1E-08
VIT_08s0007g01040	minor CHO metabolism	Aldo/keto reductase family protein	3.7E-02	3.1E-03
VIT_08s0007g03690	Nucleotide metabolism	Uridine-ribohydrolase 1 (URH1)	3.2E-03	8.7E-05
VIT_08s0007g06040	Miscellaneous	Beta-1,3-glucanase 1 (BG1)	4.1E-03	1.7E-04
VIT_10s0003g05480	Transport	Phosphoglyceride transfer family protein	1.1E-02	7.1E-09
VIT_10s0116g00560	Protein	Zinc finger family protein	2.7E-07	1.2E-19
VIT_11s0016g05520	Miscellaneous	Plastocyanin-like domain-containing protein	5.2E-03	2.1E-02
VIT_13s0019g04660	Transport	Amino acid transporter family protein	4.8E-04	2.6E-05
VIT_13s0074g00110	Not assigned	Phosphorylase family protein	7.6E-05	9.8E-04
VIT_14s0060g01990	Cell	Phloem protein 2-B15 (AtPP2-B15)	2.5E-05	3.9E-05
VIT_14s0060g02000	Cell	Phloem protein 2-B13 (AtPP2-B13)	3.4E-05	6.2E-07
VIT_14s0060g02020	Cell	Phloem protein 2-B15 (AtPP2-B15)	5.8E-03	2.0E-03
VIT_14s0066g00250	Miscellaneous	GDSL-motif lipase	1.3E-04	4.8E-03
VIT_14s0068g00510	Not assigned	Unknown protein	3.2E-04	1.4E-02
VIT_14s0068g02190	Transport	Chloride Channel B (CLC-B)	2.6E-04	9.2E-05
VIT_14s0081g00030	Stress	Pathogenesis-related 4 (PR4)	1.1E-03	8.0E-03
VIT_15s0046g01360	Cell wall	Arabinogalactan protein 20 (AGP20)	6.8E-07	1.9E-02
VIT_15s0046g02030	Protein	Protein kinase family protein	4.1E-04	6.6E-05
VIT_16s0098g00860	Secondary metabolism	Oxidoreductase (DMR6)	3.6E-04	1.4E-02
VIT_18s0001g05840	RNA	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	3.6E-06	1.3E-02
VIT_18s0001g05990	Hormone metabolism	UDP-glycosyltransferase (UGT85A1)	1.2E-03	1.5E-05
VIT_18s0122g00420	Secondary metabolism	Transparent testa 10 (TT10)	8.8E-03	2.2E-02
VIT_19s0014g00460	Not assigned	Unknown protein	3.3E-05	5.7E-03
VIT_19s0014g01370	Miscellaneous	Curculin-like lectin family protein	7.9E-03	2.8E-03
VIT_19s0014g03160	Tetrapyrrole synthesis	Protochlorophyllide reductase (PORA)	7.4E-05	7.3E-03
VIT_19s0014g05090	Redox	Protein disulfide isomerase (CXXS1)	2.1E-02	4.5E-02

Down-regulated gene ID	GO	Best identity description	(v+28)	(v+35)
			<i>p value</i>	<i>p value</i>
VIT_01s0011g03670	DNA	Endonuclease 2 (END02)	5.5E-05	7.6E-08
VIT_07s0005g01430	DNA	Prolifera (PRL)	9.6E-06	8.1E-07
VIT_07s0005g01680	Minor CHO metabolism	Arabidopsis thaliana stachyose synthase (AtSTS)	1.4E-03	6.6E-03
VIT_07s0104g01340	Development	Nodulin MtN3 family protein	1.1E-04	1.9E-03
VIT_08s0040g00960	Lipid metabolism	Hydrolase	6.1E-04	1.1E-05
VIT_16s0022g00870	Miscellaneous	Invertase	9.2E-05	6.2E-07
VIT_19s0015g00860	Transport	Oligopeptide transporter 1 (OPT1)	7.9E-04	5.7E-03

ABBREVIATIONS USED

3SH, 3-sulfanylhexan-1-ol; 6SH, 6-sulfanylhexanol; ABC, ATP-binding cassette; GGT, γ -glutamyltranspeptidase; GO, gene ontology; GSH, glutathione; GST, glutathione-S-transferase; MMSB, 4-methoxy-2-methyl-2-sulfanylbutan; MtN, *Medicago truncatula* nodulin; N, nitrogen; *NiR*, nitrate reductase; OPT, oligopeptide transporter; Cys-3SH, S-3-(hexan-1-ol)-cysteine; Glut-3SH, S-3-(hexan-1-ol)-glutathione; POT, proton-dependent oligopeptide transporter; PTR, peptide transporter; Soil N100, 100 kg per hectare of nitrogen applied to the soil; v-20, bunch closure; v, mid-veraison; v+28, mid-ripening; v+35, ripeness; YAN, Yeast Available Nitrogen

ARTICLE III

**Effet du statut azoté, du cépage et du porte-greffe sur la synthèse
des précurseurs du 3-sulfanylhexan-1-ol**

Afin de déterminer l'effet du statut azoté en interaction avec le greffon et le porte-greffe sur la teneur en métabolites secondaires dans la baie de raisin, une expérimentation sur des plants en pot a été menée. Contrairement à une étude en plein champ, la culture en pots permet de manipuler la supplémentation en nutriments des plantes en conditions strictement contrôlées (conditions climatiques, composition du substrat, doses d'azote apportées, matériel végétal et conduite de la vigne).

L'impact de chaque facteur du terroir viticole sur la composition et la qualité du raisin a été le sujet de nombreuses études ^{10,16,18,50,58,254}. Dans cette expérimentation, l'influence du cépage, du porte-greffe et du statut azoté de la vigne sur la teneur en précurseurs du 3SH a été simultanément examinée. L'étude simultanée de ces facteurs devrait permettre de hiérarchiser leur effet afin de déterminer leur influence sur le comportement de la plante. Ce travail, mené dans des conditions climatiques similaires et sur un substrat homogène, évalue pour la première fois l'effet du cépage, du porte-greffe ainsi que celui du statut azoté de la vigne sur son développement et sur le potentiel qualitatif des baies.

Des expérimentations en pots évaluant l'effet du statut azoté sur le contenu des baies en métabolites secondaires tels que les anthocyanes ont été déjà réalisées au sein de notre unité ⁹⁴. Cependant, l'effet de l'azote sur la teneur en précurseurs du 3SH n'a jamais été étudié sur des vignes plantées en pots et cultivées dans un environnement homogène et contrôlé. Dans l'optique d'une analyse de la composition du raisin, la culture des vignes en pots est un vrai challenge dû à la difficulté de générer du raisin. Ces plants, souvent jeunes et fragiles, doivent être suivis d'une façon permanente afin d'anticiper et de répondre à leurs besoins en termes par exemple d'eau et de nutriments.

Dans ce dispositif, les mêmes cépages sont utilisés que dans l'expérimentation au vignoble à Bordeaux : le Cabernet-Sauvignon et le Sauvignon blanc. Le Pinot noir a également été prévu dans l'expérimentation, mais il a été prélevé et analysé uniquement pour un autre travail de recherche sur l'effet du statut azoté de la vigne sur les composés phénoliques.

Effect of vine nitrogen status, grapevine variety and rootstock on the levels of berry S-glutathionylated and S-cysteinylated precursors of 3-sulfanylhexan-1-ol

Pierre Helwi^{1,2,3}, Cécile Thibon^{4,5}, Aude Habran^{1,3}, Ghislaine Hilbert^{1,3}, Sabine Guillaumie^{1,3}, Serge Delrot^{1,3}, Philippe Darriet^{4,5}, Cornelis van Leeuwen^{*,2}

Accepted for publication in *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*

¹Univ. de Bordeaux, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), Ecophysiology and Functional Genomics of the Vine (EGFV), UMR 1287, 33140 Villenave d'Ornon, France.

²Bordeaux Sciences Agro, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), Ecophysiology and Functional Genomics of the Vine (EGFV), UMR 1287, 33140 Villenave d'Ornon, France.

³INRA, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), Ecophysiology and Functional Genomics of the Vine (EGFV), UMR 1287, 33140 Villenave d'Ornon, France.

⁴Univ. de Bordeaux, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), Unité de recherche Œnologie, EA4577, 33140 Villenave d'Ornon, France.

⁵INRA, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), USC 1366 Œnologie, 33140 Villenave d'Ornon, France.

*(C.v.L)

Phone: +33 05 57 35 07 55

Fax: +33 05 57 35 07 59

E-mail: vanleeuwen@agro-bordeaux.fr

ABSTRACT

Aim: To determine the effect of vine nitrogen status in interaction with grapevine variety and rootstock on vine development and on the synthesis of 3-sulfanylhexasan-1-ol precursors (Glut-3SH and Cys-3SH) in grape berries produced in controlled conditions.

Methods and results: Potted Sauvignon blanc (SB) and Cabernet-Sauvignon (CS) vines, grafted on two different rootstocks (110R and RGM), were irrigated with two nutritive solutions varying only by their nitrogen content (N(-) and N(+)). Vine nitrogen status of N(-) treatment was significantly different from that of N(+) treatment. Secondary leaf area was higher in N(+) treatment and ripening was delayed because of increased vigor. High N status increased Glut-3SH content in berries, while it did not impact Cys-3SH level. Moreover, the concentrations of 3SH precursors were higher in SB berries compared to CS and their synthesis was enhanced in berries produced by vines grafted onto RGM under N(+) treatment.

Conclusion: Glut-3SH content was mainly determined by plant N status. Grapevine variety and rootstock/N treatment interaction also had a significant, although more limited, impact. Cys-3SH level was dependent on berry developmental stage and grapevine variety, but not on vine N status.

Significance and impact of the study: A better understanding of the effect of terroir components on the biosynthesis of the precursors of volatile thiols is gained.

KEYWORDS: 3-sulfanylhexasan-1-ol, 3SH, aroma, precursors, S-glutathionylated, S-cysteinylated, Glut-3SH, Cys-3SH, nitrogen, *Vitis vinifera*, grape berries, variety, rootstock

INTRODUCTION

The concept of terroir in viticulture is defined as an ecosystem in which vine development and grape ripening are influenced by the environment surrounding the vine. The quality of the wine can partly be explained by the terroir effect ^{1,2,4,255}. Terroir factors include the climate, the soil type as well as the grapevine variety and the rootstock (genetic factors). Human factors also play a role through the choice of viticultural and oenological techniques. A harmonious interaction between these components maximize wine quality and typicity ^{2,4}.

The soil is a major terroir factor. It influences vine physiology and grape ripening through its physical structure ^{2,43,44,256}, the water and mineral supply ^{4,21,257,258}, its color ³⁹, its microbiology ⁵⁷ and *via* the temperature at the root zone ^{10,35}.

Among nutriments which vines pick up from the soil, nitrogen (N) has a major impact on vine development, shoot growth, yield and sensitivity to fungal diseases such as *Botrytis cinerea* ⁷⁰. Moreover, this element influences the synthesis of primary metabolites, i.e. sugar and organic acids ^{99,100,259}, as well as that of secondary metabolites, i.e. amino acids, total phenolics, flavonoids ^{94,203} and aroma compounds such as volatile thiols and their precursors ^{161,183}.

Volatile thiols contribute largely to the aromatic potential of wines produced by varieties like Sauvignon blanc, Semillon, Riesling, Pinot gris and Colombard ^{130,135,225}. Their contribution to wine flavor depends on their content and their interaction with other molecules and compounds ²²⁶. Among volatile thiols, 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH) is a major compound that plays an essential role in the aroma of many wines. 3SH is responsible for flavors reminding grapefruit and passion fruit, which are usually appreciated by tasters ^{136,137}. This volatile thiol is not present in the berry and the must; it is liberated during the alcoholic fermentation from odorless and non-volatile precursors synthesized in the berry. It was demonstrated that these precursors are *S*-conjugates to glutathione (*S*-3-(hexan-1-ol)-glutathione; Glut-3SH) and to cysteine (*S*-3-(hexan-1-ol)-cysteine; Cys-3SH) (Figure. 1) ^{136,144,148,149}. The impact of vine N status on the concentration of 3SH precursors has been the subject of numerous studies ^{21,161,183}. However, the influence of vine N status in interaction with other terroir factors on the

content of these compounds was never investigated. This experimentation, which was conducted on potted plants in controlled conditions in 2014, assesses for the first time the effect of N status in interaction with grapevine variety and rootstock on vine development and on the 3SH precursors of berries. The impact of the combination of these factors was determined for *Vitis vinifera* cv. Sauvignon blanc (SB) and Cabernet-Sauvignon (CS) grafted on two different rootstocks (110R and RGM) under two N conditions in order to determine their influence on plant behavior and berry composition.

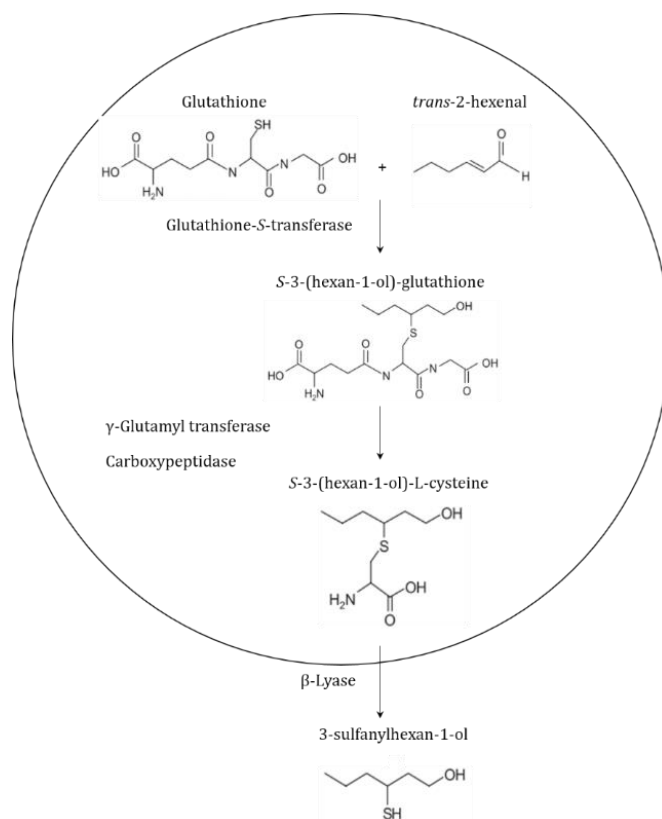


Figure 1. Pathway of the glutathionylated precursor (Glut-3SH) and cysteinylated precursor (Cys-3SH) in grape berries as described by Kobayashi *et al.*, 2010¹⁴⁸ and Thibon *et al.*, 2011¹⁴⁹.

The production of 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH) occurs during the alcoholic fermentation by the yeast.

MATERIALS AND METHODS

Vine material and experimental set-up. The study was conducted in 2014 on Sauvignon blanc (clone 108) and Cabernet-Sauvignon (clone 169) grafted in 2011 onto two contrasted rootstocks: RGM (Riparia Gloire de Montpellier, clone 1) and 110R (110 Richter, clone 152). The experiment was carried out in out-door weather conditions in 10-L pots containing loam, sand, and perlite (50, 30 and 20%, respectively). Vines were irrigated during the whole season. Plants were pruned to two spurs of four eyes (eight buds per vine) and after bud break, only buds 3 and 4 were retained while buds 1 and 2 were removed on each spur. Viticultural practices like basal leaf removal and trimming were close to those commonly implemented in commercial vineyards and were similar among all treatments.

Nutrient solutions (1 to 1.6 L per pot per day depending on evaporative demand) were provided by an irrigation system, three times daily, from bud break to harvest. All plots were supplied with these nutrient solutions varying only by their nitrogen content. Two levels of nitrogen were applied: a strongly limiting nitrogen treatment (N(-); solution containing 11 mg L⁻¹ of nitrogen) and a non limiting nitrogen treatment (N(+); solution containing 50 mg L⁻¹ of nitrogen). Each combination variety/rootstock/N modality consisted of 10 pots randomly distributed within the experimental set-up. In order to have three biological replicates, plants of each combination were divided into three groups of three plants each.

For each combination variety/rootstock/N modality, fifty fresh berries were randomly sampled from the three plants at two developmental stages: mid-ripening, MR (33 and 30 days after mid-veraison for SB and CS, respectively) and ripeness, R (43 and 48 days after mid-veraison for SB and CS, respectively). Mid-veraison was determined at the time when 50% of the berries were soft and/or red. Berries were collected in liquid nitrogen immediately after being removed from the plants and then stored at -80°C. They were then weighed and ground in liquid nitrogen to a fine powder until analyses.

Vine water status. Vine water status was determined by measuring the $\delta^{13}\text{C}$, which corresponds to the ratio of carbon isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. This measurement is used to assess vine water status during the period between veraison and harvest^{18,260}. The $\delta^{13}\text{C}$ (in ‰) varies between -20 ‰ (severe water stress) and -28 ‰ (no water stress)¹⁹. The $\delta^{13}\text{C}$ was measured on grape sugars at harvest^{19,100}.

Vine and berry nitrogen status. Nitrogen status was determined by analyzing nitrogen content of leaf blades at mid-veraison ^{261,262} and by assessing the yeast available nitrogen (YAN) in grape must at harvest. The analysis of leaf blade nitrogen content was carried on the primary leaf facing the first cluster at mid-veraison ²⁶³. Leaf blades were rinsed with deionized water then dried at 70°C for three days and ground to a fine powder. The determination of leaf blade nitrogen content was carried out using the Dumas method (Buckee, 1994) of the "Plant Interactions Soil Atmosphere laboratory" (ISPA UMR 1391, INRA, Villenave d'Ornon, France).

YAN was assessed in grape juice obtained by pressing of approximately fifty berries collected at ripeness stage ⁷¹. The juice was analyzed with a Fourier Transform Infra-Red spectrometer (FTIR, WineScan FOSS®, Nanterre, France) ^{71,230}.

Vine vigor. Vine vigor was determined by the assessment of primary and secondary leaf areas at shoot growth cessation and by measuring pruning weights. Leaf areas were determined according to the method published by Mabrouk and Carbonneau (1996). A correlation curve was established between the length of the shoots and their corresponding leaf area using a LI-3100 LICOR leaf area meter (Lincoln, Nebraska, USA). Calibration curves were set up separately for primary and secondary leaf area. Subsequently, the length of all primary and secondary shoots of three vines per replicate was measured and primary and secondary leaf areas were deduced from the calibration curves.

Pruning weights were measured for each vine (four primary shoots per vine and the corresponding secondary ramifications) and averaged per biological replicate.

Must composition at harvest. Grape juice was obtained by pressing fifty berries sampled the day before harvest. Sugar level, total acidity, pH, malic acid content and YAN level were determined using an FTIR spectrometer (WineScan FOSS®, Nanterre, France) ²³⁰.

Extraction and quantification of Glut-3SH and Cys-3SH. The method was adapted from Luisier *et al.*, (2008) and performed as described below. A mix of 1 mL of grape juice obtained by defrosting of 2 g of frozen berry powder in the presence of sulfur dioxide (200 mg L⁻¹), 1 mL of water and a final concentration of 50 µg L⁻¹ of the internal standard solution containing a deuterated form of the glutathionylated S-conjugate ((3-S-hexan-1-

ol)-glutathione-d₃) was percolated through a conditioned SPE column (LC-18 500 mg 6 mL, Supelco, Saint Germain-Laye, France). Impurities adsorbed on SPE columns were eliminated by ultrapure water and precursors were then eluted with 3 mL of water/methanol (70/30; v/v) in hemolysis tubes. The flow-through was subsequently evaporated using a RapidVap Vertex Dry Evaporator (Labconco, Kansas City, MO, USA). Residues were dissolved in aqueous formic acid solution (0.1%) and filtered with a 0.45- μm membrane before being analyzed by C18-RP-UHPLC-HRMS (Thermo Scientific, Illkirch, France).

The separation was performed on a Synchronis aQ column (100 \times 2.1 mm i.d., 1.7 μm , Synchronis aQ, Thermo Scientific, Bremen, Germany) with a flow rate of 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ of solvent A (0.1% aqueous formic acid) and solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile). The gradient for solvent B was as follows: 0 min, 9%; 0.8 min, 9%; 5 min, 40%; 5.2 min, 90%. The column was equilibrated with 9% of solvent B for 1 min prior to an injection. The ion source was operated in the positive ion mode at 3.5 kV. The vaporizer temperature of the source was set at 300°C, the capillary temperature at 350°C, the nitrogen sheath gas at 80, and the auxiliary and sweep gas at 5 (arbitrary units). A mass range of 100-500 was acquired in full scan MS mode. The resolution setting was 25000 ($m/\Delta m$, fwhm at m/z 400).

For each combination variety/rootstock/N modality, the analyses were carried out on the three biological replicates.

In order to quantify the metabolites in samples, standards were prepared at the same time as the berries samples, by adding 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ of the internal standard to solutions of the synthesized metabolites (mix of 1 mL water and 1 mL grape juice), with individual 3SH precursors at concentrations of 0, 110, 275, 550, 825 and 1100 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Glut-3SH and 0, 10, 25, 50, 75 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cys-3SH.

Statistical analysis. Statistical analyses were conducted using the statistical package of the XLSTAT software (Addinsoft, Paris, France). All the data are expressed as the arithmetic average \pm standard error (SE) from three biological replicates. Student's t test or a multi-factor analysis of variance followed by Fisher's least-significant difference (LSD) test were carried out at p value ≤ 0.05 .

RESULTS

Vine water status. Despite the fact that vines were irrigated continuously during the whole season, certain treatments faced a moderate water deficit ($-24.5 < \delta^{13}\text{C} < -23$), and others a lesser or small water deficit ($-26 < \delta^{13}\text{C} \leq -24.5$). Most treatments, however, did not face any water deficit ($\delta^{13}\text{C} \leq -26$)²⁶⁴. Vine water status was explained by N modality (59% of total variance explained), the grape variety (25% of total variance explained) and the rootstock (6% of total variance explained; Table 1).

Moderate water deficit was mainly observed for the N(+) treatment and can be related to high secondary leaf area in this treatment. Grapevine variety also affected vine water status (Tables 1 and 2). The $\delta^{13}\text{C}$ of CS must be higher compared to SB. Moreover, water status was affected by the type of rootstock. Significant differences in $\delta^{13}\text{C}$ values were observed between 110R and RGM. Vines grafted onto RGM faced larger water deficits compared to those grafted onto 110R, which is consistent with the literature (Tables 1 and 2)²⁶⁵.

Plant and berry nitrogen status. Vine N status was essentially determined by the N nutrition: it was weakly affected by the grapevine variety and not affected by the rootstock (Table 1).

For SB cultivar, leaf blade N content at mid-veraison of the N(-) modality ranged between 1.45 and 1.48% of dry weight (DW), while it was higher in the N(+) modality (close to 2.4% DW) (Figure. 2A and C). YAN content also allowed clear differentiation between the two nitrogen treatments (Figure. 3A and C).

For CS cultivar, leaf blade N content of N(-) treatment was close to 1.10% DW. It increased in the N(+) treatment (values close to 2% DW), showing significant differences with the N(-) modality (Figure. 2B and D). YAN level also allowed to differentiate vine N status between the two modalities for this variety. It was higher in the N(+) treatment compared to the N(-) treatment (Figure. 3B and D).

Besides N treatment (73% of total variance explained), leaf blade N content also depended on the grapevine variety (7% of total variance explained). SB was characterized by higher leaf blade N content than CS. Moreover, this variable was not influenced by the rootstock (Tables 1 and 2). YAN content was mainly influenced by N treatment (74% of total

variance explained) and less by grape variety (3% of total variance explained) and the scion/rootstock interaction (4% of total variance explained) (Tables 1 and 2).

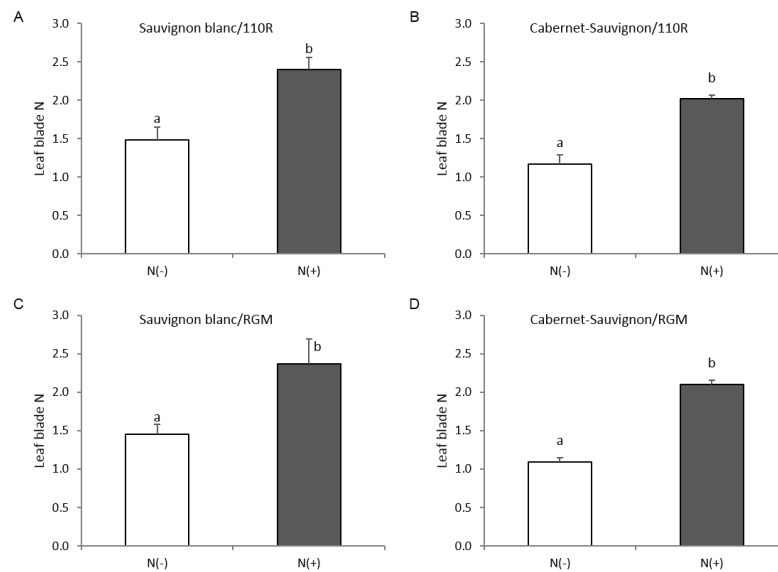


Figure 2. Leaf blade nitrogen content (%) at mid-veraison.

Each histogram is the mean of three replicates. Statistical significance was determined by Student's t test (p value ≤ 0.05). Error bars indicate SE. Different letters indicate significant differences. N, nitrogen.

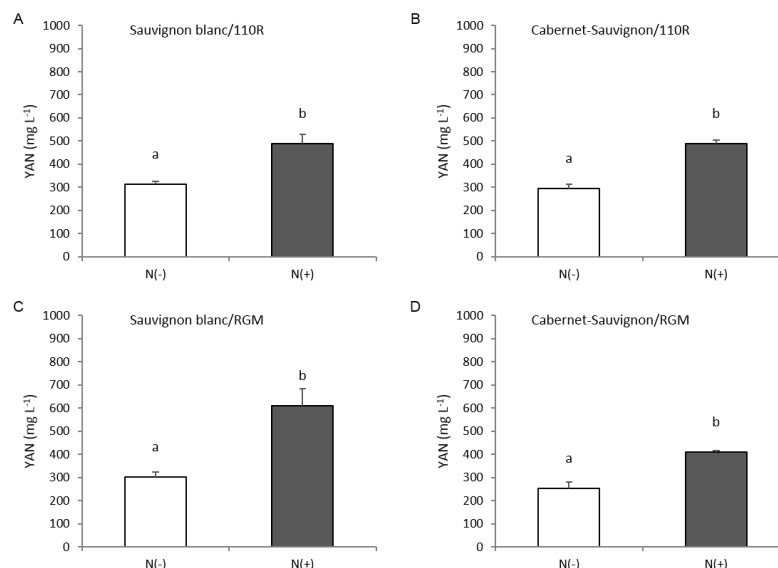


Figure 3. Yeast available nitrogen (YAN) levels in grape must at ripeness.

Each histogram is the mean of three replicates. Statistical significance was determined by Student's t test (p value ≤ 0.05). Error bars indicate SE. Different letters indicate significant differences.

These data show that N status of the N(+) treatment was higher than that of the N(-) treatment (Table 2) and that leaf blade N content and YAN were accurate indicators to account for differences in vine N status.

Vine vigor. Plant vigor was determined by measuring primary and secondary leaf area at shoot growth cessation and pruning weight in winter. Primary leaf area was similar between the two N treatments for all combinations variety/rootstock/N treatment. Primary leaf area of SB ranged between 0.66 m²/vine and 1.30 m²/vine and that of CS between 0.73 m²/vine and 0.95 m²/vine. No significant differences were observed among N treatments for each variety (Table 3). However, this indicator of vine vigor was strongly influenced by the variety/rootstock interaction (30% of total variance explained) (Table 1). It seems that 110R provides a higher primary leaf area for SB than for CS. The opposite effect was observed with RGM under the N(+) treatment, where the combination SB/RGM had a lower primary leaf area than CS/RGM.

Unlike the primary leaf area, secondary leaf area was impacted by N treatment (Tables 1, 2 and 3). For SB grafted onto 110R or RGM, significant differences were observed between the two modalities. For SB/110R, secondary leaf area was 0.54 m²/vine and 1.36 m²/vine for N(-) and N(+) treatments, respectively, and for SB/RGM 0.41 m²/vine and 1.14 m²/vine for N(-) and N(+) treatments, respectively (Table 3). The secondary leaf area of CS/110R/N(+) was 2-fold higher compared to CS/110R/N(-) (0.68 m²/vine *versus* 0.32 m²/vine). Finally, for CS grafted onto RGM, significant differences were also observed between the two treatments (0.19 m²/vine for CS/RGM/N(-) *versus* 0.63 m²/vine for CS/RGM/N(+)) (Table 3).

	Sauvignon blanc			Cabernet-Sauvignon		
	Primary leaf area	Secondary leaf area	Pruning weight	Primary leaf area	Secondary leaf area	Pruning weight
110R						
N(-)	1.30 ^a	0.54 ^a	0.25 ^a	0.77 ^a	0.32 ^a	0.27 ^a
N(+)	1.08 ^a	1.36 ^c	0.24 ^a	0.73 ^a	0.68 ^b	0.27 ^a
RGM						
N(-)	0.85 ^a	0.41 ^a	0.23 ^a	0.86 ^a	0.19 ^a	0.30 ^a
N(+)	0.66 ^a	1.14 ^b	0.23 ^a	0.95 ^a	0.63 ^b	0.26 ^a

Table 3. Effect of vine nitrogen status on primary and secondary leaf area (m²/vine) measured at shoot growth cessation and pruning weight (kg/vine).

Each point is the mean of three replicates. Statistical significance was determined by Student's t test (p value ≤ 0.05). Different letters indicate significant differences.

Secondary leaf area was not only influenced by N treatment, but also by the grape variety (39% of total variance explained) (Tables 1 and 2). SB established a higher secondary leaf area than CS. The rootstock also impacted this variable (1.5% of total variance explained). It was higher for 110R compared to RGM. However, this effect was minor compared to that of N treatment and grapevine variety (Tables 1 and 2).

Pruning weight was not impacted by vine N status, nor by the rootstock (Table 3). However, grapevine variety influenced this parameter (6% of total variance explained). Pruning weight of SB was lower compared to CS (Tables 1 and 2).

	Sauvignon blanc				Cabernet-Sauvignon			
	Sugar	Total acidity	pH	Malic acid	Sugar	Total acidity	pH	Malic acid
110R								
N(-)	170.3 ^a	9.3 ^a	3.29 ^a	5.0 ^a	186.2 ^a	9.0 ^a	3.59 ^a	6.3 ^a
N(+)	146.9 ^a	10.6 ^a	3.31 ^a	6.4 ^a	148.4 ^b	10.9 ^a	3.50 ^a	7.1 ^a
RGM								
N(-)	193.0 ^a	9.7 ^a	3.35 ^a	5.3 ^a	181.4 ^a	11.8 ^a	3.38 ^a	7.4 ^a
N(+)	160.1 ^a	9.3 ^a	3.42 ^a	4.7 ^a	150.9 ^b	12.3 ^a	3.35 ^a	7.8 ^a

Table 4. Effect of vine nitrogen status on sugar content (g L^{-1}), total acidity (g L^{-1} tartaric acid), pH and malic acid content (g L^{-1}) in grape juice.

Each point is the mean of three replicates. Statistical significance was determined by Student's t test (p value ≤ 0.05). Different letters indicate significant differences.

In this experiment, vine vigor increased with higher N status, as shown by a greater secondary leaf area. However, primary leaf area and pruning weight were not impacted by N supply.

Grape juice composition at ripeness. Berry composition was assessed at ripeness by measuring sugar level, total acidity, pH and malic acid content (Table 4).

Sugar levels of the N(-) treatment were higher compared to those of the N(+) treatment for both varieties (Table 4). Though not significant in SB berries due to a high variability among biological replicates, differences between sugar concentrations (approximately 30 g L^{-1}) were relevant from an oenological point of view.

Vine N status did not impact grape juice acidity assessed by total acidity, pH and malic acid content. No significant differences were observed between N treatments. Total acidity levels of SB ranged between 9.3 g L^{-1} tartaric acid and 10.6 g L^{-1} tartaric acid, and

those of CS between 9.0 g L⁻¹ tartaric acid and 12.3 g L⁻¹ tartaric acid (Table 4). For SB, total acidity was slightly higher compared to commercial ripeness, while total acidity for CS was much higher compared to commercial grapes at harvest. pH values were relatively close in SB/110R, SB/RGM and CS/RGM combinations (between 3.29 and 3.42). They were much higher in CS/110R combination (3.50 to 3.59; Table 4). Furthermore, it should be noted that malic acid concentrations in CS (6.3 to 7.8 g L⁻¹) were higher compared to those in SB (4.7 to 6.4 g L⁻¹).

Vine N status altered sugar accumulation without changing the other parameters (total acidity, pH and malic acid content) related to grape ripening. However, these variables were highly dependent on grape variety and grape variety/rootstock combination (Table 1). Total acidity and malic acid content were higher in CS berries compared to SB (11.14 g L⁻¹ tartaric acid *versus* 9.48 g L⁻¹ tartaric acid and 7.10 g L⁻¹ *versus* 5.16 g L⁻¹ for total acidity and malic acid content, respectively). pH was lower in SB berries compared to CS (3.34 *versus* 3.43).

In conclusion, leaf blade N content and YAN level in grape must showed that vine N status of the N(+) treatment was higher compared to that of the N(-) treatment. In addition, vines of the N(+) treatment were characterized by greater vigor (as shown by the higher secondary leaf area) and by delayed ripeness.

Impact of nitrogen nutrition on Glut-3SH and Cys-3SH in the berry. Berry S-glutathionylated and S-cysteinylated precursors of 3SH content was determined at two different stages: mid-ripening (MR: (v+33) for SB and (v+30) for CS) and ripeness (R: (v+43) for SB and (v+48) for CS).

Glut-3SH concentration was stable during ripening in SB berries (Figure. 4A and C). Analysis of variance showed no effect of developmental stage (Table 1). However, a strong effect of N nutrition was observed on Glut-3SH (36% of total variance explained, Table 1). Its concentration in SB berries in the N(+) treatment was 2- to 4-fold higher compared to the N(-) treatment. For example, Glut-3SH content in SB/RGM berries at R was 33 µg L⁻¹ in the N(-) modality *versus* 181 µg L⁻¹ in the N(+) modality (Figure. 4A and C). Grapevine variety also impacted Glut-3SH content (19% of total variance explained). SB berries contained higher levels of this precursor compared to CS (98 µg L⁻¹ *versus* 52 µg L⁻¹) (Table

2). Finally, rootstock/N treatment interaction also influenced Glut-3SH content (10% of total variance explained). Its level in berries of SB grafted onto RGM under N(+) treatment was higher compared to that of SB grafted onto 110R under the same treatment ($181 \mu\text{g L}^{-1}$ versus $110 \mu\text{g L}^{-1}$ at R) (Figure. 4A and C). The rootstock/N treatment interaction also appeared to impact the final Glut-3SH content in CS berries (Figure. 4B and D).

In CS berries, even if differences were not always statistically significant, Glut-3SH concentration was higher in N(+) treatment than in N(-) treatment at both stages and rootstocks, except for the combination CS/110R at MR (Figure. 4B). At the same developmental stage, Glut-3SH content was 6-fold higher in N(+) treatment compared to N(-) treatment for the combination CS/RGM ($119.8 \mu\text{g L}^{-1}$ versus $19.9 \mu\text{g L}^{-1}$ for N(+) and N(-), respectively) (Figure. 4D).

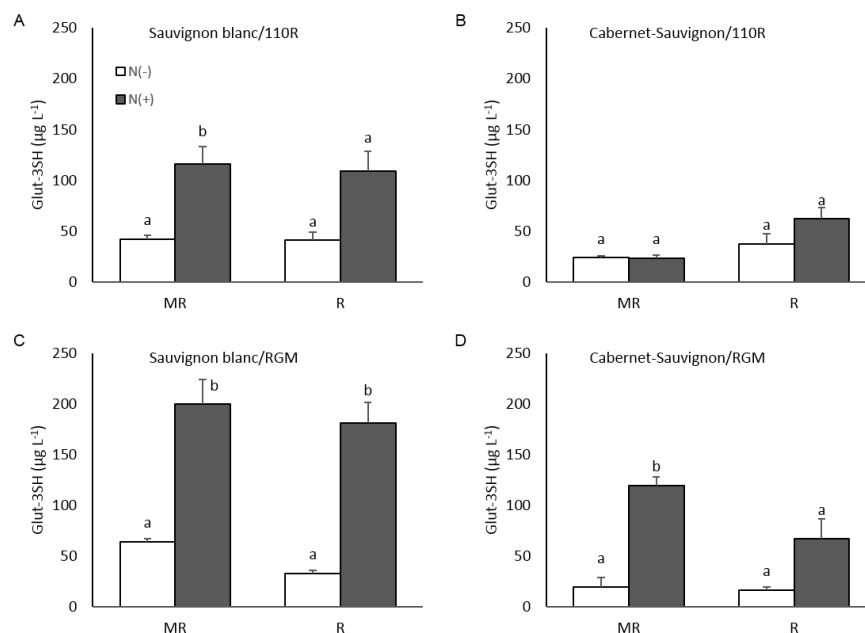


Figure 4. Effect of vine nitrogen status on Glut-3SH level in grape berries at mid-ripening (MR) and ripeness (R).

Each histogram is the mean of three replicates. Statistical significance was determined by Student's t test (p value ≤ 0.05). Error bars indicate SE. Different letters indicate significant differences.

Cys-3SH content was affected by berry developmental stage (18% of total variance explained) and grapevine variety (7% of total variance explained, Table 1). Cys-3SH levels were higher at R compared to MR (11.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ versus 5.3 $\mu\text{g L}^{-1}$, Table 2). SB berries contained more of this compound compared to CS (10.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ versus 6.4 $\mu\text{g L}^{-1}$, Table 2). However, neither rootstock nor N treatment impacted its level in berries. Nevertheless, the interactions between rootstock x N treatment (13% of total variance explained), rootstock x grapevine variety (11% of total variance explained) and grapevine variety x N treatment (11% of total variance explained) had a strong influence on the content of this precursor (Table 1). In SB berries, Cys-3SH content increased with N level on RGM (Figure. 5A and C), while it tends to decrease in CS berries, in particular at R (Figure. 5B and D).

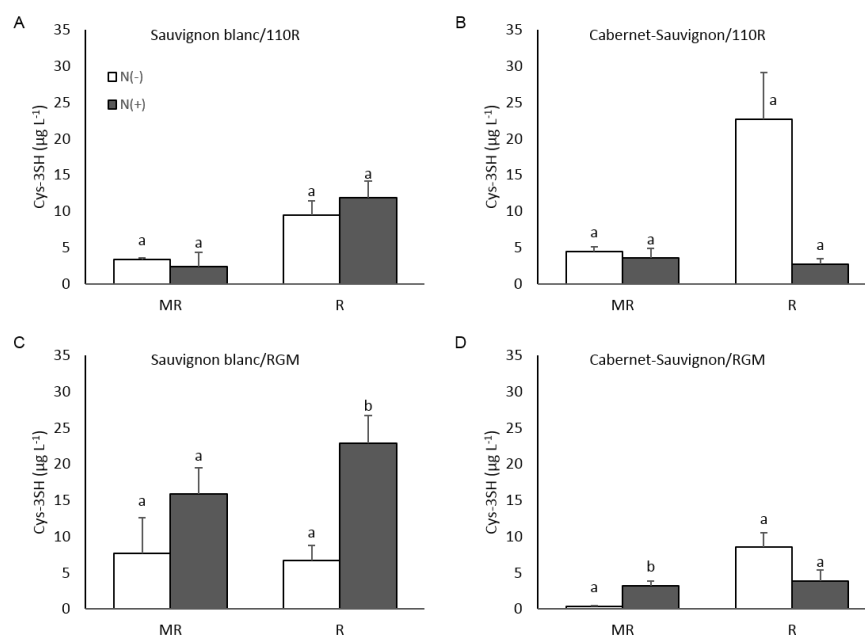


Figure 5. Effect of vine nitrogen status on Cys-3SH level in grape berries at mid-ripening (MR) and ripeness (R).

Each histogram is the mean of three replicates. Statistical significance was determined by Student's t test (p value ≤ 0.05). Error bars indicate SE. Different letters indicate significant differences.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In order to gain a better understanding of the effect of plant material (cultivar and rootstock) and vine N status on the content of the *S*-glutathionylated and *S*-cysteinylated precursors of 3SH in grape berries, an experiment on potted plants in controlled conditions was carried out. Vines were irrigated with nutritive solutions containing different N levels and were supposed not to be water stressed. However, $\delta^{13}\text{C}$ measurements carried out on grapes at ripeness showed that some of the treatments had faced weak to moderate water deficits. Because of the small size of the pots, the root system of these plants was not very much developed. Moreover, the plants were relatively young (3 years old). This can explain why water deficits appeared, despite daily irrigation.

Leaf blade N content and YAN level in grape must were higher in the N(+) treatment compared to the N(-) treatment, showing that the applied N was correctly assimilated by the vines. YAN levels were relatively high in this study compared to commercial vineyards, due to the continuous irrigation of the pots with the nutritive solutions during the season. N status did not influence primary leaf area and pruning weight but modified secondary leaf area. The latter one increased with N content in the applied solutions. Furthermore, a delay in grape ripening was observed in the N(+) treatment compared to the N(-) treatment, as is shown by the lower berry sugar content in the N(+) treatment where values ranged between 147 and 160 g L⁻¹. However, total acidity was not modified.

Glut-3SH content was mainly determined by vine N status, and to a lesser extent by the grapevine variety and rootstock/N treatment interaction. Nitrogen had a positive effect on grape berry Glut-3SH content. This was confirmed on both varieties and both investigated rootstocks. Cys-3SH level was dependent on berry developmental stage and grapevine variety, although the percentage of variance explained by these factors was relatively low (18% and 7%, respectively). Vine N status did not influence the synthesis and the accumulation of this compound: a large variability in the response of this metabolite regarding N fertilization was observed, as evidenced by rootstock x N treatment, rootstock x variety and N treatment x variety interactions. Glut-3SH and Cys-3SH contents in SB berries were higher compared to those of CS, confirming that grapevine variety also impacted their synthesis and accumulation ¹⁶⁰.

In this experiment, the rootstock (RGM or 110R) did not influence 3SH *S*-conjugate concentrations, although interactions between rootstock x N treatment, as well as between grapevine variety x N treatment were shown. RGM seems to enhance their synthesis under N(+) treatment more so than 110R. A possible impact of vine water deficit on Glut-3SH can be hypothesized because RGM under N(+) treatment showed more water deficit compared to all other combinations. However, this point has to be clarified in more specific experiments investigating the effect of vine water status on Glut-3SH, which was beyond the scope of this research.

Cys-3SH increased with the level of ripeness of the grapes, while Glut-3SH did not. Grape berry ripening rate was higher for SB vines grafted onto RGM compared to 110R (higher sugar levels, higher pH). This difference between rootstocks was not observed in this study for CS. Hence, the fact that Cys-3SH was higher in SB/RGM compared to 110R, but not in CS/RGM compared to 110R, might be an indirect effect of an acceleration of the ripening rate in the combination SB/RGM. However, the result of a possible effect of rootstock x grapevine variety interaction on the level of these metabolites needs to be confirmed by additional experiments.

The rootstock 110R confers an important vigor to vines, while RGM has the opposite effect. The differences between the 3SH *S*-conjugate levels between the two rootstocks could be explained by the vigor. A rootstock that confers high vigor (i.e. 110R) could limit directly or indirectly the synthesis of secondary metabolites such as Glut-3SH, while a rootstock that confers low vigor (i.e. RGM) could have the opposite effect. Glut-3SH accumulation seems to be increased in berries produced by vines grafted onto a rootstock that confers low vigor and grown under high nitrogen supply. This hypothesis requires to be verified by additional studies.

In the field, it was demonstrated that 3SH level in Sauvignon blanc wine increased with N supply^{183,257}. Moreover, grapevine variety was shown also to affect their levels. For example, Sauvignon blanc berries contain higher levels of 3SH precursors than Grechetto and Malvasia¹⁶⁰. Studied simultaneously in this work, we showed that vine N status had a greater impact than grapevine variety on the content of these metabolites. In fact, N absorption and/or assimilation is largely determined by the genotype of the plant to which it is related^{60,61}. This observation highlights the importance of terroir and the interaction between its components on the synthesis of 3SH precursors.

In our study, vines were relatively young (3 years old) and since their growth and grape composition depend largely on reserves accumulated over previous years, including N reserves, experiments on older vines will be necessary. Such experiments would allow to (i) study the impact of N reserves on berry composition, (ii) understand the effect of N metabolism on 3SH precursor synthesis and (iii) better understand the response of variety/rootstock interaction regarding N nutrition, taking into account vine water status and vine vigor.

	V	R	N	S	V x R	V x N	R x N	V x R x N	Residual
Water status									
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	24.81 ***	6.49 ***	59.26 ***	NA	0.21 ns	0.07 ns	0.16 ns	1.42 ns	7.58
Nitrogen status									
Leaf blade N (% DW)	6.92 *	0.13 ns	73.07 ***	NA	0.02 ns	1.55 ns	0.19 ns	0.12 ns	18
YAN (mg L ⁻¹)	2.69 *	0.03 ns	74.46 ***	NA	4.27 *	1.71 ns	2.95 ns	0.54 ns	13.36
Vigor									
Primary leaf area (m ² /vine)	8.21 ns	1.04 ns	2.3 ns	NA	30.37 **	3.04 ns	4.92 ns	0.24 ns	49.88
Secondary leaf area (m ² /vine)	39.35 ***	1.48 *	47.00 ***	NA	0.01 ns	1.16 ns	3.3 *	0.43 ns	7.27
Pruning weight (kg/vine)	5.62 *	0.01 ns	0.37 ns	NA	0.16 ns	0.63 ns	0.22 ns	0.38 ns	92.6
Berry composition at ripeness									
Sugar (g L ⁻¹)	0.74 ns	1.07 ns	63.81 ***	NA	3.13 ns	1.22 ns	2.06 ns	1.3 ns	26.67
Total acidity (g L ⁻¹ tartaric acid)	46.57 ***	6.67 ns	9.60 ns	NA	28.21 **	5.67 ns	8.85 ns	0.01 ns	44.41
pH	21.62 ***	3.85 ns	2.52 ns	NA	32.77 ***	5.29 ns	1.83 ns	0.94 ns	31.19
Malic acid (g L ⁻¹)	48.83 ***	0.14 ns	4.84 ns	NA	7.84 *	0.46 ns	3.51 ns	1.29 ns	33.08
3SH precursors									
Glut-3SH (μg L ⁻¹)	19.44 ***	0.95 ns	36.27 ***	0.09 ns	1.00 ns	1.16 ns	9.78 ***	3.77 **	15.97
Cys-3SH (μg L ⁻¹)	7.08 *	0.36 ns	0.01 ns	18.06 ***	11.25 **	10.77 **	13.23 ***	0.05 ns	24.02

Table 1. Multi-factor analysis of variance: percentage (%) of variance explained by the grapevine variety (V), rootstock (R), developmental stage (S), nitrogen treatment (N) and their interactions on vine water status, nitrogen status, vigor, berry composition at ripeness and 3SH precursors in berries.

***, **, * indicate significance at p value < 0.0001, 0.001, 0.05 respectively. ns, not significant (p value > 0.05).

	Variety		Rootstock		Stage		N treatment	
	SB	CS	110R	RGM	MR	R	N(-)	N(+)
Water status								
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-26.60 ^a	-25.60 ^b	-26.35 ^a	-25.85 ^b	NA	NA	-26.61 ^a	-25.01 ^b
Nitrogen status								
Leaf blade N (% DW)	1.79 ^a	1.52 ^b	1.66 ^a	1.65 ^a	NA	NA	1.30 ^a	2.24 ^b
YAN (mg L ⁻¹)	381.1 ^a	335.3 ^b	353 ^a	363.3 ^a	NA	NA	290.9 ^a	500.3 ^b
Vigor								
Primary leaf area (m ² /vine)	0.96 ^a	0.80 ^a	0.91 ^a	0.85 ^a	NA	NA	0.94 ^a	0.85 ^a
Secondary leaf area (m ² /vine)	0.85 ^a	0.41 ^b	0.67 ^a	0.60 ^b	NA	NA	0.36 ^a	0.95 ^b
Pruning weight (kg/vine)	0.23 ^a	0.27 ^b	0.25 ^a	0.25 ^a	NA	NA	0.26 ^a	0.24 ^a
Berry composition at ripeness								
Sugar (g L ⁻¹)	176.2 ^a	172.7 ^a	172.4 ^a	176.6 ^a	NA	NA	182.7 ^a	151.6 ^b
Total acidity (g L ⁻¹ tartaric acid)	9.48 ^a	11.14 ^b	9.99 ^a	10.63 ^a	NA	NA	10.05 ^a	10.84 ^a
pH	3.34 ^a	3.43 ^b	3.40 ^a	3.36 ^a	NA	NA	3.40 ^a	3.39 ^a
Malic acid (g L ⁻¹)	5.16 ^a	7.1 ^b	6.07 ^a	6.18 ^a	NA	NA	6.03 ^a	6.54 ^a
3SH precursors								
Glut-3SH ($\mu\text{g L}^{-1}$)	98.20 ^a	52.14 ^b	62.59 ^a	87.76 ^a	40.60 ^a	74.34 ^a	40.60 ^a	109.74 ^b
Cys-3SH ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10.01 ^a	6.40 ^b	7.55 ^a	8.97 ^a	5.31 ^a	11.06 ^b	8.21 ^a	8.28 ^a

Table 2. Multi-factor analysis of variance of the effect of the grapevine variety, rootstock, developmental stage and nitrogen treatment on vine water status, the nitrogen status, vigor, berry composition at ripeness and berries 3SH precursors. Statistical significance was determined by a multi-factor analysis of variance followed by Fisher's least-significant difference (LSD) test (p value ≤ 0.05). Different letters indicate significant differences. MR, mid-ripening; R, ripeness. NA, not available.

SUPPLEMENTARY DATA

A.

	Formula	Molecular weight	Concentration (g L ⁻¹)	Quantity for 50 L of nutritive solution
N11 treatment				
Potassium monohydrogen phosphate (g)	K ₂ HPO ₄	174,18	9,80	490
Ammonium sulfate (g)	(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	4,00	200
Sequestrene (g)	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₆ FeNa	435,20	2,50	125
Oligo-elements (L)		5		
Calcium chloride (g)	CaCl ₂ ·2H ₂ O	147,02	2,00	100
Calcium nitrate (g)	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236,15	2,30	115
Calcium sulfate (g)	CaSO ₄ ·2H ₂ O	172,17	2,00	100
N50 treatment				
Diammonium phosphate (g)	(NH ₄) ₂ HPO ₄	132,06	7,39	370
Potassium nitrate (g)	KNO ₃	101,10	11,35	568
Ammonium sulfate (g)	(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	6,55	328
Sequestrene (g)	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₆ FeNa	435,20	2,50	125
Oligo-elements (L)		5		
Calcium chloride (g)	CaCl ₂ ·2H ₂ O	147,02	2,19	110
Calcium nitrate (g)	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236,15	3,82	191

B.

	Element	Atomic weight	Concentration (mg L ⁻¹)
N11 treatment			
	N	14.01	11.00
	P	30.97	17.39
	K	39.10	50.20
	Ca	40.08	42.28
	Mg	24.31	16.39
	S	32.06	27.37
	Cl	35.46	19.29
N50 treatment			
	N	14.01	50.01
	P	30.97	17.33
	K	39.10	50.19
	Ca	40.08	40.80
	Mg	24.31	16.39
	S	32.06	27.37
	Cl	35.46	20.18

Supplementary table 1. (A) Composition of nutrient solutions. (B) Concentration in mg L⁻¹ of each of the nutrients present in the solutions.

ARTICLE IV

Analyse globale du transcriptome de la baie de raisin en réponse à la nutrition azotée

L'azote est considéré comme étant l'une des composantes majeures du terroir viticole indispensable à la croissance de la vigne et à la maturation des baies. Ce nutriment a été évoqué dans plusieurs études pour son rôle majeur dans le développement de la vigne et la composition du raisin.

Concernant la vigne, l'azote peut avoir des conséquences sur la vigueur des ceps, sur l'arrêt de la croissance de la plante, sur le rendement, sur la taille et la couleur des feuilles, sur la maturation des baies, sur la sensibilité aux pathogènes... Quant à la qualité des baies, l'azote agit sur la teneur en sucre réducteurs, sur l'acidité total et sur le contenu en acides aminés considérés comme des précurseurs de nombreux métabolites. Par exemple, la phénylalanine présente dans les voies de la shikimate et du glutamate est l'acide aminé clé dans la synthèse des composés phénoliques. Concernant les composés aromatiques, notamment le 3-sulfanylhéxan-1-ol (3SH), la cystéine, la glycine et le glutamate entrent dans la composition du glutathion, le pro-précurseur du 3SH dans la baie de raisin.

Il a été montré qu'un déficit azoté provoque une augmentation de la teneur en delphinidine-3-O-glucoside (Dp-3-glc) et en pétunidine (glc-Pt-3) tandis que l'effet inverse a été noté sur le contenu en malvidine 3-glucoside (Mv-3-Glc). Au niveau transcriptomique, l'azote influence fortement le profil d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. En effet, un déficit azoté induit l'expression du gène *PAL* (*Phenylalanine Ammonia Lyase*) codant une enzyme essentielle dans la voie des phénylpropanoïdes. Le même effet a été démontré sur l'expression du gène *CHS* (*chalcone synthase*), *F3'5'H* (*Flavonoid 3',5'-hydroxylase*), *DFR* (*dihydroflavonol 4-reductase*) et *LDOX* (*leucoanthocyanidin dioxygenase*) codant respectivement des enzymes qui catalysent la synthèse de la naringénine chalcone, du dihydroflavonol, du leucoanthocyanidine et d'anthocyanidine. Chez *Arabidopsis thaliana*, un déficit azoté induit l'expression de *Myb PAP1* et *Myb PAP2*, gènes clés de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.

L'effet du statut azoté de la vigne sur les composés aromatiques, notamment le 3-sulfanylhéxan-1-ol (3SH), un thiol volatil de la famille des arômes variétaux a été également le sujet de nombreux travaux. Ce thiol à l'odeur de pamplemousse est absent dans la baie de raisin et est libéré au cours de la fermentation alcoolique à partir des précurseurs non volatils (des *S*-conjugués au glutathion et à la cystéine) présents dans la baie et le moût. Il a été montré qu'une fertilisation azotée augmente sa teneur ainsi que

celles de ses précurseurs. La voie de biosynthèse des précurseurs du 3SH n'est pas encore totalement élucidée. L'intervention d'une glutathion-S-transférase (GST) permettant la génération du précurseur glutathionylé (Glut-3SH) par la combinaison du glutathion sur le *trans*-2-hexenal, d'une γ -glutamyltranspeptidase (GGT) et d'une carboxypeptidase permettant la formation respective d'un précurseur intermédiaire, le Cysgly-3SH et le précurseur cystéinylé (Cys-3SH) a été mise en évidence.

L'impact de la nutrition azotée sur l'expression de ces gènes des voies de biosynthèse des polyphénols et des composés aromatiques a été souvent étudié par des méthodes *a priori* (qRT-PCR). Cependant une étude globale du transcriptome de la baie en réponse à l'azote (RNA-seq) n'a pas encore été réalisée. Un tel travail permettra d'identifier de nouvelles familles de gènes susceptibles de répondre à ce nutriment et pouvant être impliqués dans ces voies de biosynthèse et ainsi que dans d'autres voies du métabolisme de la baie.

Dans cette partie, nous avons comparé par un séquençage haut débit à ARN de type RNA-seq le transcriptome de deux modalités : un contrôle où aucune fertilisation n'a été appliquée contre une modalité où 100 kg d'azote par hectare ont été ajoutés au sol. Le profil d'expression des gènes a été examiné à 2 stades différents (à mi-maturité et à maturité) pour 2 cépages, le Sauvignon blanc et le Cabernet-Sauvignon.

Une description des gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote, ceux liés au métabolisme secondaire de la baie ainsi que ceux déjà décrits dans les voies de biosynthèse des polyphénols et des précurseurs du 3SH a été réalisée. De plus, les gènes impliqués dans des processus de transport ont été également décrits dus à leur rôle primordial dans la régulation du métabolisme azoté et secondaire.

Seul le millésime 2013 est présenté dans cette partie. Le millésime 2014 est en cours d'analyse. Ce travail a été fait en collaboration avec Céline Keime de la plateforme de séquençage de l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC) de Strasbourg.

Modification of berry metabolism through transcriptome reprogramming of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Sauvignon blanc and Cabernet-Sauvignon) in response to nitrogen supply

ABSTRACT

Nitrogen (N) which is a major nutriment for the growth and development of the grapevine, also affects the composition and oenological potential of the berries. Nitrogen influences the concentration of several primary metabolites such as sugar, organic acids and amino acids, and that of some secondary metabolites such as polyphenols and aroma compounds i.e. the 3 sulfanylhexas-1-ol (3SH). However the mechanisms underlying these variations are not well understood. The present work describes a transcriptomic analysis of the effect of nitrogen on gene expression in the berries which focuses on secondary metabolism.

RNA-sequencing analysis was conducted on berries collected at mid-ripening (MR) and ripeness (R) from Sauvignon blanc (SB) and Cabernet-Sauvignon (CS) (*Vitis vinifera* L.) vines treated with 100 kg of nitrogen per hectare applied to the soil. The transcriptome of nitrogen treated berries was compared to that of berries collected from control vines. The two varieties responded differentially to N supply and exhibited distinct pattern of changes in gene expression. The number of differentially expressed genes (DEG) was variety dependent: SB showed more DEG at MR than at R while the CS had the opposite behavior. In SB berries, 176 and 127 genes were specific for MR and R respectively while 53 up-regulated genes and 7 down-regulated genes were common between stages. In CS berries, 96 and 358 N-sensitive genes were found at MR and R respectively and only 4 genes common to both stages were up-regulated by N supply. More genes were up-regulated by N than down-regulated. N-sensitive transcripts corresponded to genes from several ontologies. Here, only gene families related to nitrogen metabolism, secondary metabolism, and transport are detailed. Several candidate genes potentially implicated in biosynthetic pathways of targeted metabolites were affected by nitrogen.

KEYWORDS: Nitrogen, secondary metabolism, polyphenols, aroma compounds, 3 sulfanylhexas-1-ol, 3SH, grape, RNA-seq, *Vitis vinifera* L.

INTRODUCTION

During their life cycle, perennial species like grapevines absorb all the mineral elements essential for their growth from the soil. Among these elements, nitrogen is obviously the one that has the strongest effect on vegetative and reproductive development and fruit composition ⁷⁰. For grapevine, nitrogen affects vigor, yield and sensitivity to fungi, particularly *Botrytis cinerea* ⁸⁶. Concerning the berries, it impacts sugar and organic acid contents, amino acid concentration and levels of total phenolics and aroma compounds ^{70,266,267}.

Nitrogen is involved in the synthesis of nucleic acids, enzymes and co-enzymes, and it is essential for the synthesis of amino acids which in turn are precursors for many secondary metabolites such as polyphenols and aroma compounds (i.e. 3 sulfanylhexan-1-ol, 3SH) (Figure 1).

Phenylalanine (Phe) derived from shikimate and glutamate pathways is the precursor of polyphenols compounds ²⁶⁸. Nitrogen availability affects anthocyanin profiles and contents in grape berries skins. At low nitrogen concentration, berries contain higher Dp-3-glc and glc-Pt-3 contents and lower Mv-acylated 3-Glc content ⁹⁴. Furthermore, nitrogen induces significant transcriptional changes in the berry flavonoid pathway. Indeed, nitrogen deficit upregulates the expression patterns of gene encoding phenyl ammonia-lyase (PAL), the major enzyme controlling the pathway as well as those of genes encoding the downstream enzymes chalcone synthase (CHS), flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR) and leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX). In *Arabidopsis*, nitrogen deficit upregulates the expression of the transcription factors genes *Myb PAP1* and *Myb PAP2* ²⁰⁵, which are involved in the regulation of flavonoid biosynthesis ²⁶⁸.

Among aroma compounds, 3 sulfanyl-hexan-1-ol (3SH) is a major volatile thiol responsible for grapefruit flavor, that contributes largely to the quality of wines from Sauvignon blanc and Cabernet-Sauvignon ^{133,135}. This compound, which is not found in grape berries and musts, is released from non-volatile and odorless precursors present originally in the berry during alcoholic fermentation. These precursors are *S*-conjugates to glutathione (*S*-3-(hexan-1-ol)-glutathione, Glut-3SH) or to cysteine (*S*-3-(hexan-1-ol)-

cysteine, Cys-3SH)^{133,136,144}. Therefore, in addition to Phe which is a precursor of phenolic compounds, other amino acids (cysteine, glycine and glutamate) which are involved in the formation of glutathione may affect the oenological potential of berries through the conjugation of aroma precursors to glutathione.

Nitrogen supply increases the 3SH content of wine, as the result of an increased concentration of its precursors in berries and musts^{21,161,183}. In the berry, Glut-3SH is formed by the combination of glutathione to *trans*-2-hexenal, mediated by a glutathione-S-transferase enzyme (VviGST)^{148,149,227,228}. The Cys-3SH derives from the catabolism of the glutathionylated precursor. This reaction requires the presence of two enzymes: a γ -glutamyltranspeptidase (VviGGT) which catalyzes the elimination of glutamic acid, and a carboxypeptidase responsible for the removal of glycine, ending in the production of Cys-3SH. The biosynthetic pathway of 3SH precursors is still poorly known.

At the transcriptional level, the consequences of nitrogen nutrition on gene expression in the berry have mainly been studied by *a priori* targeted methods. However, untargeted transcriptomic approaches such as RNA-seq are essential to identify gene networks involved in the response of berry metabolism to nitrogen supply.

In the present study, genes implicated in nitrogen metabolism were examined. In order to understand the effect of this nutriment on polyphenol and aroma compounds in berry secondary metabolism, gene families related to this metabolism and those already described in their pathways were investigated and their functional properties were described. Moreover, genes involved in transport mechanisms were also identified due to their essential role in nitrogen and secondary metabolism regulation.

3 sulfanylhexan-1-ol

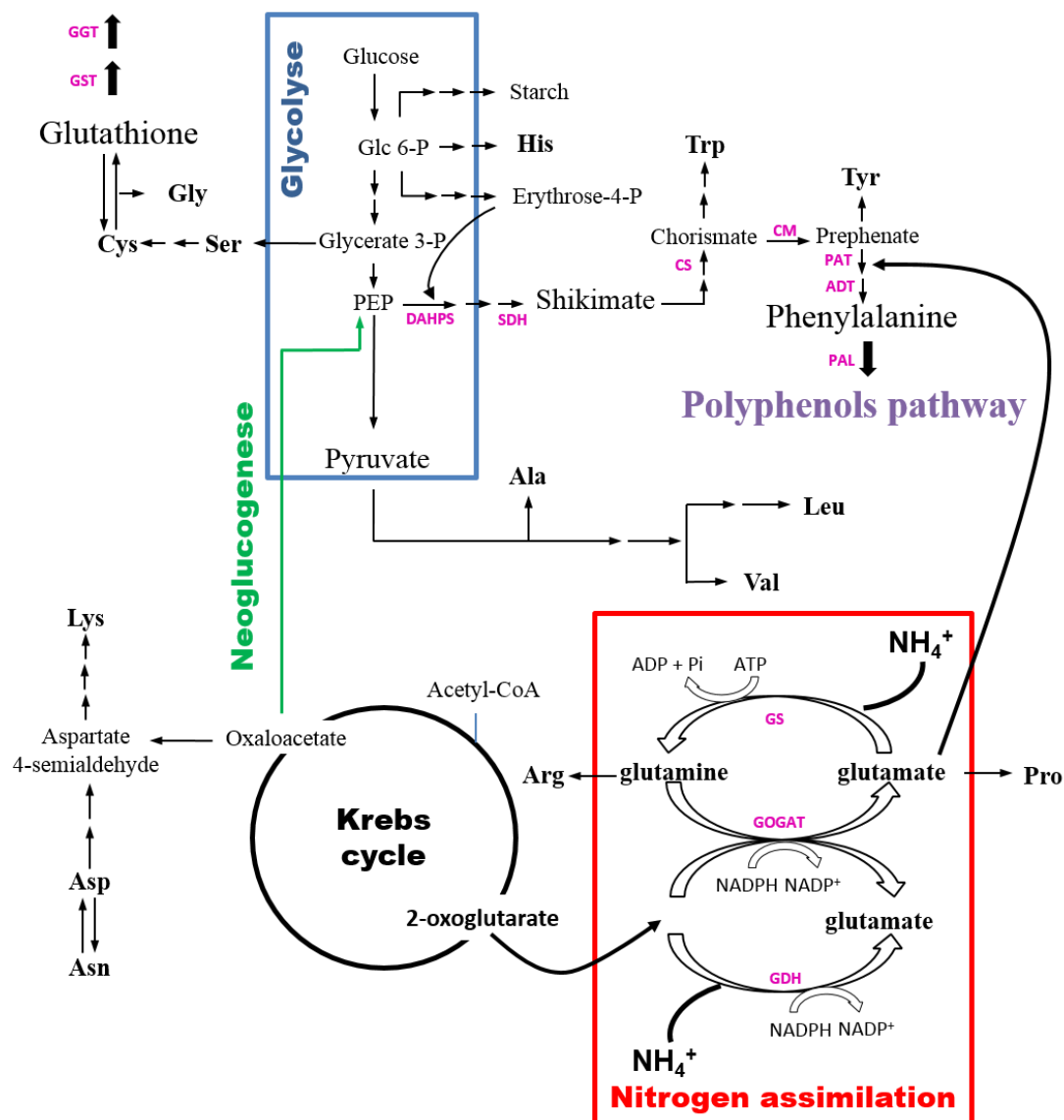


Figure 1. Primary and secondary metabolism pathways related to nitrogen assimilation. ADT, arogenate dehydratase; Ala, alanine; Arg, arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartate; CM, chorismate mutase; CS, chorismate synthase; Cys, cysteine; DAHPS, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase; GDH, glutamate dehydrogenase; GGT, α -glutamyl transpeptidase; Gly, glycerine; GOGAT, glutamine oxoglutarate; aminotransferase; GS, glutamine synthase; GST, glutathione-S-transferase; His, histidine; Leu, leucine; Lys, lysine; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; PAT, prephenate aminotransferase; PEP, phosphoenol pyruvate; P, phosphate; Pro, proline; SDH, shikimate dehydrogenase; Ser, serine; Trp, tryptophan; Tyr, tyrosine; Val, valine.

MATERIALS AND METHODS

Location, vine material and experiment set up. The experiment was conducted in 2013 on a commercial vineyards planted with Sauvignon blanc (SB) and Cabernet-Sauvignon (CS) (*Vitis vinifera* L.) at Château Couhins, Pessac-Léognan. Planting density was 6667 vines/ha for the SB and 7143 vines/ha for the CS. Plots were selected for their low nitrogen status in previous years (Yeast Available Nitrogen (YAN) < 100 mg L⁻¹). On each plot, two treatments were compared: control without fertilization *versus* soil N100: 100 kg per hectare of nitrogen (ammonitrate 33.5% N) applied to the soil in two applications (bud break and flowering). Nitrogen quantities were split to limit possible effects of nitrogen on vine vigor. Vigor was monitored by measuring primary and secondary leaf areas at shoot growth cessation and yield measured at harvest. Each treatment was conducted with four randomized replicates of 10 vines each. Irrigation was managed during the whole season to avoid possible water deficit, and the vine water status was regularly assessed by measuring stem water potential. Similar viticulture practices were adopted during the grape-growing period. For each experimental condition, one hundred fresh berries were randomly collected from each block at mid-ripening and ripeness. Mid-veraison (*v*) was defined as the time when 50% of the berries were soft and/or red, mid-ripening was defined as 28 days after mid-veraison (*v*+28) for both cultivars and ripeness was reached 35 (*v*+35) and 50 (*v*+50) days after mid-veraison for SB and CS respectively. Collected berries were frozen immediately in liquid nitrogen, grounded and stored at -80°C until further analyses.

Berry nitrogen content. For each replicate, Yeast Available Nitrogen (YAN) was assessed in the grape juice obtained by pressing one hundred berries sampled at harvest stage ⁷¹. After centrifugation, the juice was analyzed with a Fourier Transform Infra-Red spectrometer (FTIR, WineScan FOSS®, FRANCE, 92000 Nanterre) ²³⁰.

Berries composition at ripeness. Primary metabolites (glucose, fructose and malic acid) were extracted from aliquots of 250 mg freeze-powdered berry material. First extraction with 80% ethanol at 80°C for 15 min was followed by two additional extractions with respectively 50% ethanol and ultrapure water.

Glucose and fructose were assessed by an enzymatic method (Glucose/Fructose kit from BioSenTec, BioSenTec, Toulouse, France). Malic acid was measured by a colorimetric method using a Bran and Luebbe TRAACS 800 autoanalyzer (Norderstedt, Germany).

RNA extraction. Total RNA was extracted according to Reid *et al.*, (2006)²¹² from 1 g of freeze-ground berries collected at MR and R stages for the two varieties and the different nitrogen treatments. Traces of genomic DNA were removed by a DNase I treatment according to the manufacturer's instructions (Ambion TURBO DNA-free DNase, Life Technologies). RNA were quantified using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific) and their integrity was checked on an 1.8% agarose gel. cDNA was synthesized using 1.5 µg of DNA-free RNA using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

RNA-seq library construction and sequencing. After isolation of total cellular RNA from grape berries samples, libraries of template molecules suitable for high throughput DNA sequencing were created using "TruSeq™ RNA Sample Preparation v2 Kit" (Illumina Inc.). Briefly, mRNA was purified from 2 µg of total RNA using poly-T oligo-attached magnetic beads and fragmented using divalent cations at 94°C for 8 minutes. The cleaved mRNA fragments were reverse transcribed to cDNA using random primers then the second strand of the cDNA was synthesized using DNA polymerase I and RNase H. The double stranded cDNA fragments were blunted using T4 DNA polymerase, Klenow DNA polymerase and T4 PNK. A single 'A' nucleotide was added to the 3' ends of the blunt DNA fragments using a Klenow fragment (3' to 5'exo minus) enzyme. The cDNA fragments were ligated to double stranded adapters using T4 DNA Ligase. The ligated products were enriched by PCR amplification (30 sec at 98°C; [10 sec at 98°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 72°C] x 12 cycles; 5 min at 72°C). Then surplus PCR primers were removed by purification using AMPure XP beads (Agencourt Biosciences Corporation). DNA libraries were checked for quality and quantified using 2100 Bioanalyzer (Agilent). The libraries were loaded in the flow cell at 7pM concentration and clusters were generated in the Cbot and sequenced in the Illumina HiSeq 2500 as single-end 50 base reads. Image analysis and base calling were performed using RTA 1.18.61 and CASAVA 1.8.2.

Analysis of Illumina reads. Reads were mapped onto the 12X assembly of the *Vitis vinifera* genome using Tophat v2.0.10²³² and the bowtie2 v2.1.0 aligner²³³. Gene

expression was quantified from uniquely aligned reads using HTSeq v0.5.4p3²³⁴ with the intersection nonempty mode and CRIBI V1 gene annotations. The gene expression level was calculated by using RPKM (reads per exon kilo base per million mapped sequence reads).

Statistical analysis was performed using the method proposed by Love *et al.*, (2014) implemented in the DESeq2 Bioconductor library (v1.0.19)²³⁶. Adjustment for multiple testing was performed with the Benjamini and Hochberg (1995) method²³⁷. Genes of interest were defined by their gene ontology from Ath_AGI_TAIR9_Jan2010 using MapMan interface²³⁸. Differentially expressed genes with a p value ≤ 0.05 and an absolute value of \log_2 ratio ≥ 0.75 were used as the thresholds to judge the significance of gene expression difference. RNA-seq data were averaged for 3 biological replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

Berries sampling and characterization. Sauvignon blanc (SB) and Cabernet-Sauvignon (CS) berries were sampled at 2 different stages, at mid-ripening (MR) and at ripeness (R). Fifteen and twenty days intervals separated the 2 stages for the white and the red varieties respectively.

As expected, glucose and fructose contents increased in the white and red berries among the season, while malic acid level slightly declined (Table 1). At R, sugar concentrations were lower in CS than in SB berries at the same stage, while malic acid content was 3-fold higher (Table 1).

At MR stage, the levels of primary metabolites were only assessed in SB berries. N supply did not significantly affect the content of sugars and malic acid although the control showed advanced maturity (Table 1). In contrast, a significant impact of nitrogen on the amount of primary metabolites was observed at R stage. N supply decreased the sugar content while it increased the malic acid content. Similar results were obtained for CS berries at R stage, but the effect of N addition was only statistically significant for the fructose content (Table 1). Therefore, N delayed berry ripening for both cultivars.

	Mid-ripening			Ripeness		
	Glucose	Fructose	Malic acid	Glucose	Fructose	Malic acid
Sauvignon blanc						
Control	90.7 ^a	90.9 ^a	4.3 ^a	112.8 ^a	111.0 ^a	4.3 ^a
Soil N100	69.5 ^a	68.8 ^a	5.2 ^a	98.3 ^b	97.2 ^b	5.1 ^b
Cabernet-Sauvignon						
Control	NA	NA	NA	103.6 ^a	106.6 ^a	13.0 ^a
Soil N100	NA	NA	NA	94.9 ^a	94.4 ^b	16.0 ^a

Table 1. Effects of nitrogen supply on sugars (glucose and fructose) and malic acid content (in mg g⁻¹ FW) measured at MR and R stages.

Values are means of four replicates. Different letters within the same parameter indicate statistically significant differences between treatments as determined by Student's t test (p value < 0.05). FW, fresh weight; NA, data not available.

Concerning N status (Figure 2), YAN was 1.7-fold higher in soil N100 treatment than in the control for both cultivars. This demonstrates that the N status of fertilized vines was higher than that of control plants and that N was well assimilated.

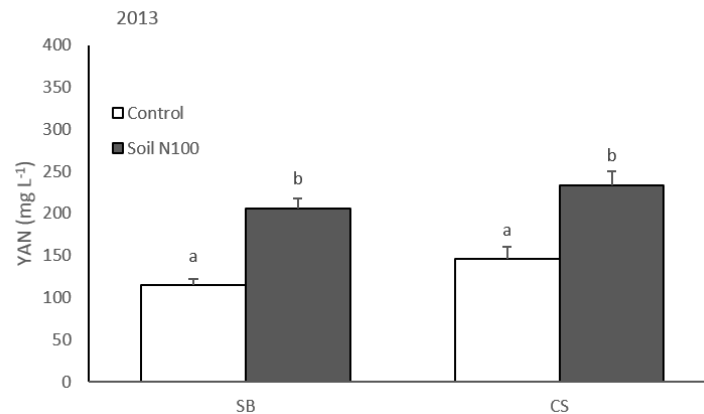


Figure 2. Effect of nitrogen supply on yeast available nitrogen in SB and CS grape berries just prior to harvest.

Values are means of four replicates. Different letters within the same parameter indicate statistically significant differences between treatments as determined by Student's t test (p value < 0.05). NA, data not available. CS, Cabernet-Sauvignon; SB, Sauvignon blanc; YAN, yeast available nitrogen.

Gene expression analysis in response to nitrogen supply. Transcriptomic patterns of gene expression variation in *Vitis vinifera* cv. SB and CS grape berries in response to nitrogen fertilization was quantitatively assessed using the Illumina Hiseq 2500. RNA-seq data were averaged for 3 biological replicates and filtered as described in Material and Methods.

Genes with a significant differential expression among modalities were identified using the filtering criteria. For SB, fewer genes were differentially expressed between control and soil N100 treatment at R compared to MR (Figure 3A) while the opposite observation was noticed for the CS (Figure 3B). Moreover, the number of up-regulated genes by nitrogen supply was always higher than the number of down-regulated genes at both stages for both varieties (Figure 3). Taken together, the number of differentially expressed genes (DEG) between stages was variety dependent and more genes were up-regulated by N than down-regulated. We assessed for each variety the number of genes

that were exclusive or common between MR and R and found that for SB, 176 and 127 genes were specific for MR and R respectively while 60 genes (53 up-regulated genes and 7 down-regulated genes) were shared between stages (Figure 3A). For CS, only 4 genes were commonly up-regulated by N supply, whereas 96 and 358 were specifically differentially expressed at both stages, respectively (Figure 3B).

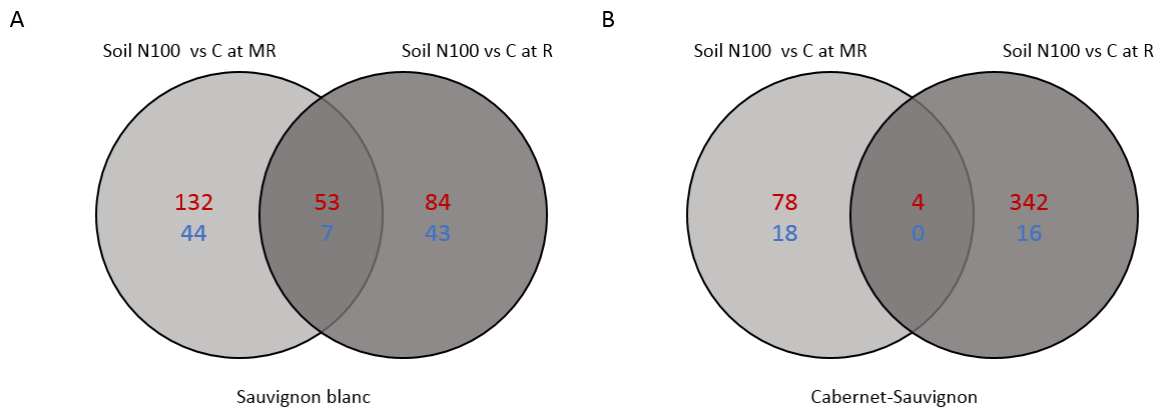


Figure 3. Venn diagrams representing the number of differentially expressed genes between the control and the soil N100 fertilized modality for (A) Sauvignon blanc and (B) Cabernet-Sauvignon at mid-ripening (MR) and ripeness (R).

The numbers of up-regulated genes and down-regulated genes are given in red and in blue, respectively. C, control; Soil N100, fertilized vines with 100 kg nitrogen per hectare.

The DEG responding to N fertilization in SB and CS at the same developmental stages are shown in Figure 4. At MR, more genes were differentially expressed in the SB berries compared to the CS: 185 genes and 51 genes were up and down-regulated respectively by N in SB *versus* 82 and 18 genes in CS (Figure 4A). Among up-regulated genes, 24 were common between the 2 varieties. Only 1 down-regulated gene was shared at the same developmental stage. At R, CS showed more DEG than SB: 345 genes were up-regulated by N in CS *versus* 135 genes in SB (16 genes were shared by both varieties). Concerning the down-regulated genes, 16 genes were found in CS *versus* 50 genes in SB (2 genes were common between the 2 varieties) (Figure 4B). At both stages of ripening, SB showed more down-regulated genes than CS.

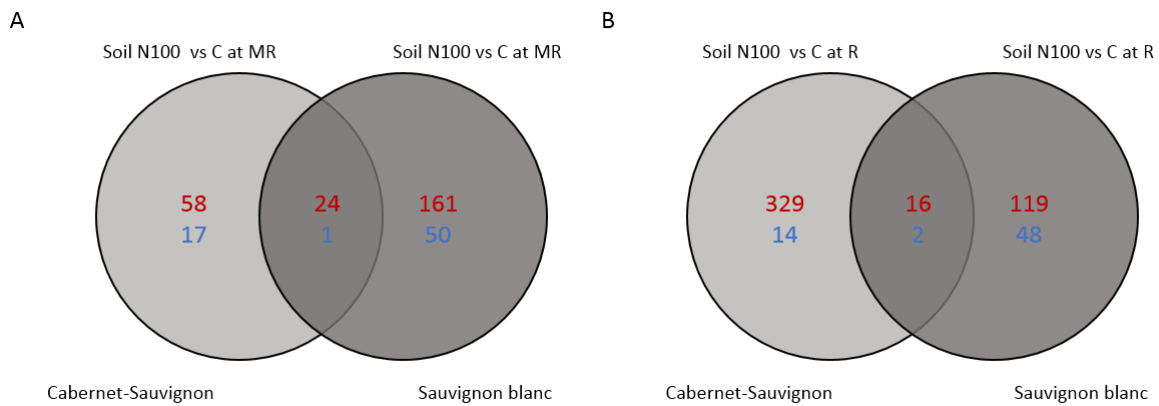


Figure 4. Venn diagrams representing the number of genes differentially expressed in response to nitrogen supply in SB and CS varieties at MR (A) and R (B) stages.

The numbers of up-regulated genes and down-regulated genes are given in red and in blue, respectively. C, control; Soil N100, vines fertilized with 100 kg nitrogen per hectare.

To summarize this general analysis, the DEG responding to N addition depended on the variety and the developmental stage. In general, N supply stimulated gene expression: the number of up-regulated genes was higher than that of down-regulated genes. Moreover, SB showed more DEG at MR than at R while the CS had the opposite behavior (more DEG at R than at MR). At MR, fewer DEG were found in CS compared to SB. However at R, CS showed more DEG than the white variety.

Gene ontologies. To investigate the biological significance of DEG between the control and the soil N100 treatment, we examined the gene ontology (GO) terms first for each cultivar (SB and CS) at both stages (MR and R) and then for both cultivars at each stage. Gene ontology enrichment was performed using Mapman interface in order to describe global biological processes enriched in response to nitrogen supply.

In SB berries at MR, functional annotation and GO term enrichment covered many metabolic pathways and biological processes, including photosystems, minor CHO metabolism, cell wall, nitrogen, lipid, amino acid, hormone and secondary metabolisms, tetrapyrrole synthesis, metal handling, stress, redox, nucleotide metabolism, signaling and regulation of gene expression, DNA, cell, protein, transport and development (Figure 5A). At this stage, the categories represented with the highest number of genes encompassed the cell wall, transport and protein gene families. At R, GO were related to photosystem, minor CHO metabolism, TCA, cell wall, lipid, amino acid, secondary,

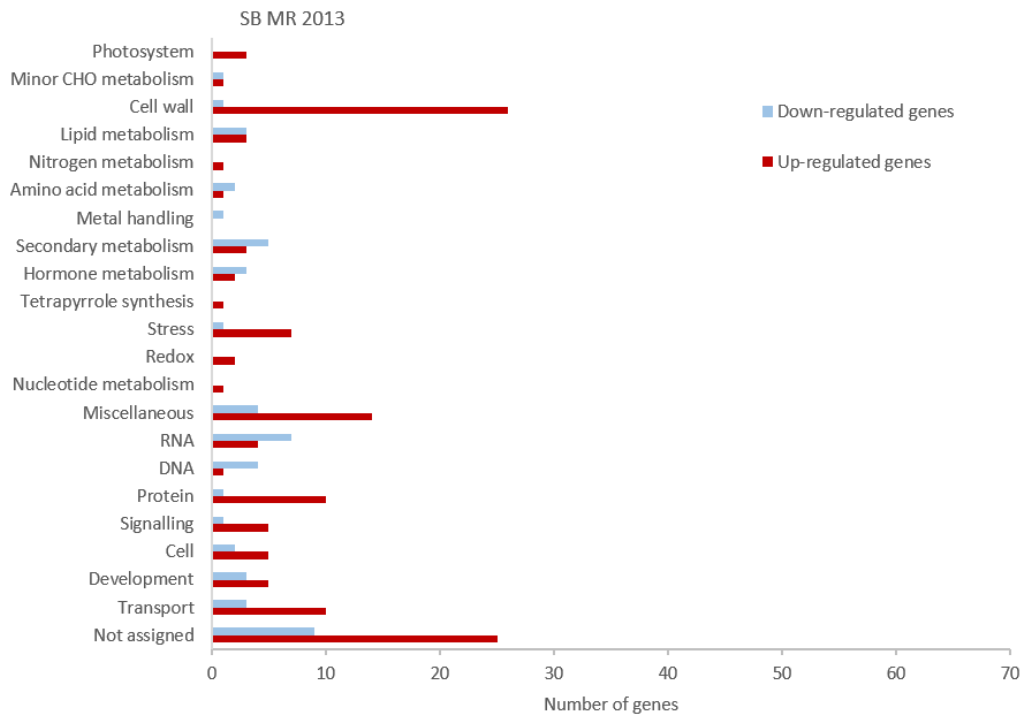
hormone, co-factor and vitamin metabolism, stress, redox, nucleotide metabolism, biodegradation of xenobiotics, RNA, DNA, protein, signaling, cell, development and transport (Figure 5B). Cell wall, protein, photosystem, stress and secondary metabolism categories were the most represented at this stage.

In CS berries at MR, GO related to photosystem, mitochondrial electron transport, ATP synthesis, cell wall, lipid, nitrogen, hormone and secondary metabolism, tetrapyrrole synthesis, stress, RNA, DNA, protein, signaling, cell, development and transport were annotated. Cell wall, transport and signaling were the categories the most represented at this stage (Figure 5C).

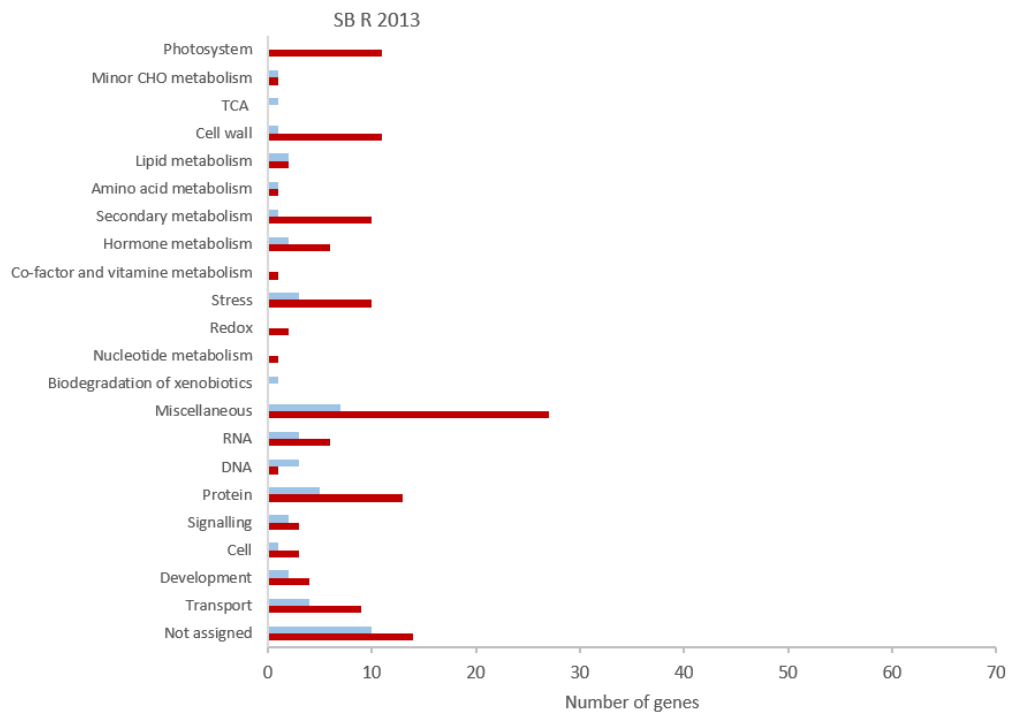
At R, GO term enrichment included families related to photosystems, minor CHO metabolism, glycolysis, fermentation, TCA, cell wall, lipid, amino acid, hormone, co-factor and vitamin metabolism, tetrapyrrole synthesis, stress, RNA, secondary metabolism, cell, development, redox, protein, signaling, transport and nucleotide metabolism. At this stage, secondary metabolism category was represented by 61 genes, protein and RNA categories with 29 genes each and signaling by 28 genes (Figure 5D).

In the following sections, we focus on genes related to (i) nitrogen metabolism, (ii) secondary metabolism, (iii) the synthesis of metabolites of interest (3SH precursors) and (iv) transport processes.

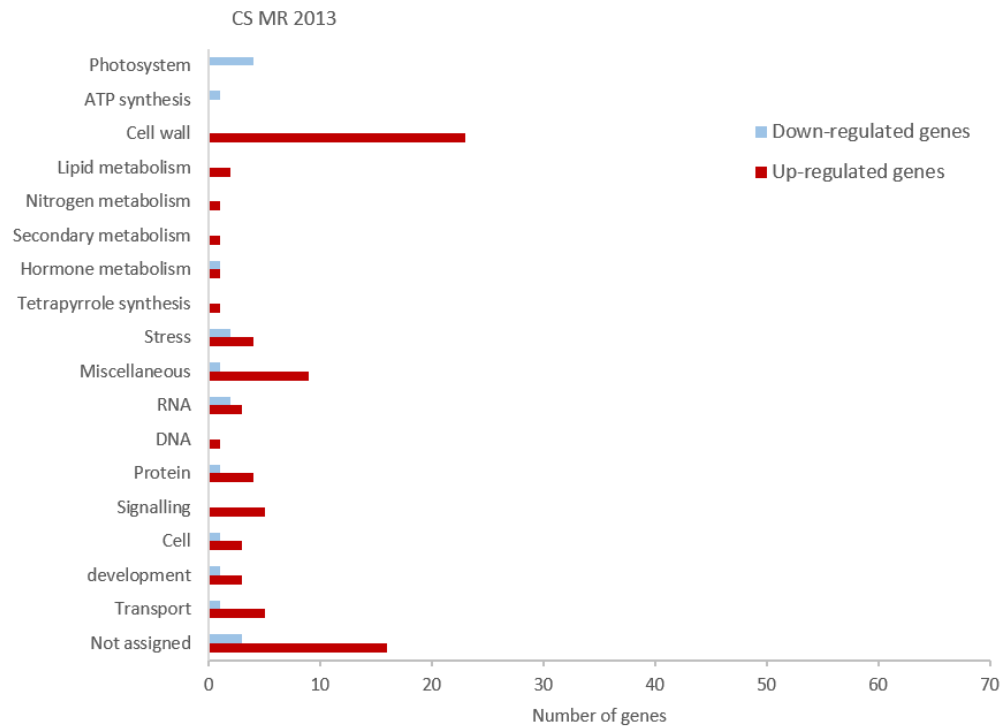
A



B



C



D

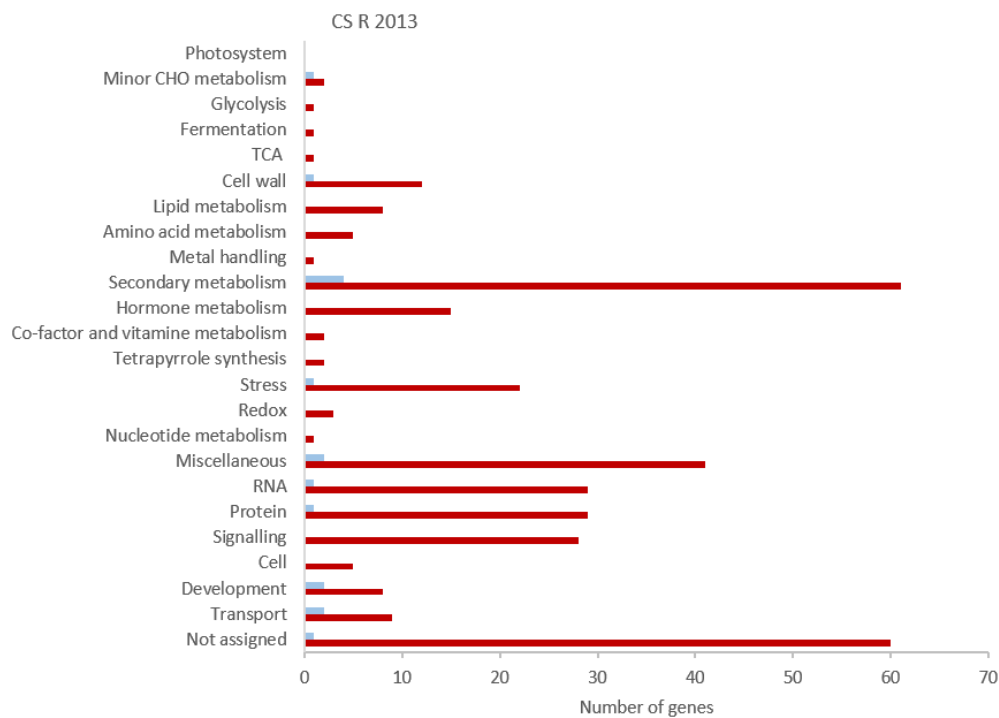


Figure 5. Analysis of functional categories of all genes differentially expressed between the control and the soil N100 treatment for (A) SB at MR, (B) SB at R, (C) CS at MR and (D) CS at R.

CHO, carbohydrate; CS, Cabernet-Sauvignon; MR, mid-ripening; SB, Sauvignon blanc; R, ripeness; TCA, organic acids metabolism.

Genes responding to N supply in Sauvignon blanc berries at mid-ripening

Genes up-regulated by N supply and specific to SB at MR. Two genes belonging to nitrogen metabolism (*VIT_03s0063g00370*, homologous to *NIR1*, and *VIT_16s0098g00290*) were up-regulated by nitrogen supply. In *Arabidopsis*, the *NIR1* homologue encodes a nitrate reductase 1 (NiR1) induced by nitrate and by light ²⁶⁹. The *Arabidopsis* homologue of *VIT_16s0098g00290* encodes a NADH-dependent glutamate synthase 1 (GLT1) that synthesizes L-glutamate from 2-oxoglutarate and L-glutamine ²⁷⁰.

Two genes related to secondary metabolism, and more precisely to dihydroflavonols were up-regulated by nitrogen supply (*VIT_13s0047g00210* and *VIT_15s0046g01170*). *VIT_13s0047g00210* *Arabidopsis* homologue (Downy mildew resistance 6, DMR6) encodes an oxidoreductase from the 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily. Based on its structural annotation, *VIT_15s0046g01170* would encode a protein with a dihydroflavonol-4-reductase activity.

Of particular interest were two genes (*VIT_02s0012g02340*, and *VIT_03s0063g01480*) associated to cytochrome P450 with a putative isoflavone 2'-hydroxylase activity.

Three genes belonging to glutathione-S-transferase family were upregulated by nitrogen: *VIT_19s0015g02680*, *VIT_16s0039g01070* and *VIT_07s0104g01800*. The homologue of *VIT_19s0015g02680* (*GSTU19*) in *Arabidopsis* (*AtGSTU25*) encodes an enzyme that may be involved in the conjugation of reduced glutathione to a wide number of exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles. It was demonstrated that *AtGSTU25* binds to S-hexanol-glutathione which can be the product of the addition of glutathione to *trans*-2-hexenal ²⁴³⁻²⁴⁵. These compounds serve as precursors of 3SH, the volatile thiol responsible for the grapefruit aroma in wines. *VIT_16s0039g01070* and *VIT_07s0104g01800* encode for others GSTs: GSTU8 relatively close to GST23 in *Zea mays* (involved in multiple disease resistance (MDR)) and a phi GST close to *AtGSTF13* in *Arabidopsis thaliana*.

Finally in this category, two genes code for transport proteins. They encode an aquaporin gamma-tonoplast intrinsic protein mediating the diffusion of amino acids and/or peptides

from the vacuole to the cytoplasm (*VIT_08s0007g04780*) and for an amino acid transporter (*VIT_14s0108g00630*).

Genes down-regulated by N supply and specific to SB at MR. Based on its structural annotation, *VIT_13s0067g00050* may encode a protein with a putative ocimene synthase activity. In *Arabidopsis*, an (*E*)- β -ocimene synthase (*AtTPS03*), was identified as a member of terpene synthase family which produces mainly (*E*)- β -ocimene from the monoterpene family ²⁷¹.

A β -ketoacyl reductase homologue (*VIT_01s0137g00070*) is also down-regulated by nitrogen supply in SB berries at MR. Two genes encoding a β -ketoacyl reductase have been identified in *Arabidopsis* (*AtKCR1* and *AtKCR2*). Their homologue in *S. cerevisiae* (*YBR159w*) encodes a β -ketoacyl reductase (KCR) involved in fatty acid elongation ²⁷². Finally, *VIT_18s0001g03470* encoding a flavonols synthase was identified. In *A. thaliana*, this light-induced synthase catalyzes the formation of flavonols from dihydroflavonols and it can also act on dihydrokaempferol, dihydroquercetin, and dihydromyricetin to produce kaempferol, quercetin and myricetin respectively ²⁷³⁻²⁷⁶. The corresponding *Arabidopsis* mutants accumulate high amounts of anthocyanins and glycosylated forms of dihydroflavonols ^{273,275,277}.

The group of genes down-regulated by nitrogen supply in SB berries at MR also include *VIT_04s0023g01480*, a Flavine-containing monooxygenase homologue and two genes coding transporters: a mitochondrial phosphate carrier protein 1, MPT1 (*VIT_03s0038g03950*) and an integral membrane transporter protein (*VIT_05s0049g02310*). In *Arabidopsis*, three MPT were identified that play an essential role in development and signaling mechanisms, especially the ATP synthesis. They also allow the transport of phosphate groups from the cytosol to the mitochondrial matrix and mediate salt stress tolerance through an ATP-dependent pathway and *via* modulation of the gibberellin metabolism ²⁷⁸. MPT3 affects plant metabolism and leaf and flower development ²⁷⁹. The *Arabidopsis* homologue of *VIT_05s0049g02310* is a probable folate-biopterin transporter. To date the putative functions of these two genes in response to nitrogen fertilization are still unknown.

Genes responding to N supply and specific to Sauvignon blanc berries at R stage

Genes up-regulated by N supply and specific to SB at R. Among the genes involved in secondary metabolism, we identified a gene coding a protein with a putative *O*-methyltransferase activity (*VIT_12s0028g02810*) and two genes encoding enzymes involved in the metabolism of sulfur-containing compounds, namely nitrilase 4 (*VIT_02s0033g00670* and *VIT_02s0033g00770*). In *Arabidopsis*, four nitrilase (AtNIT1, AtNIT2, AtNIT3 and AtNIT4) participating in the generation of indole-3-acetic acid have been characterized. The major role of AtNIT1, AtNIT2 and AtNIT3 appears to be in the metabolism of nitriles released by breakdown of glucosinolates. These enzymes can also convert indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid (IAA), the plant growth hormone ²⁸⁰. Nitrilases belonging to the NIT4 family thus may have a different and more general function and will likely not be associated with auxin production ²⁸⁰.

Among the genes involved in secondary metabolism up-regulated by N supply, a gene coding a protein from the allinase family was identified (*VIT_18s0157g00140*). Its *Arabidopsis* homologue (*AtTAR3*) encodes a tryptophan aminotransferase-related protein 3 involved in auxin biosynthesis, the hormone related to nitrate signaling ^{281,282}. Moreover, four genes from simple phenols metabolism were identified and specifically induced in SB at R, including those coding for laccase-7 (*VIT_08s0007g01550*) and laccase-14 (*VIT_18s0075g00540*, *VIT_18s0075g00780*, and *VIT_18s0117g00590*). Laccase-7 in *Arabidopsis* are implicated in lignin degradation and detoxification of lignin-derived products. Finally, this group also includes *VIT_10s0116g01780* (PRXR1) which is homologous to an *Arabidopsis* peroxidase 42 (AtPER42) responding to wounding, pathogen attack and oxidative stress. PER42 is the closest *A. thaliana* relative to a peroxidase from *Nicotiana tabacum* implicated in lignin biosynthesis ²⁸³.

Finally, worth mentioning are two genes coding for glutathione-*S*-transferase, namely a glutathione-*S*-transferase tau 19, *VviGSTU19* (*VIT_19s0015g02690*) an homologue of *VviGSTU19* annotated at MR and another glutathione-*S*-transferase (*VIT_01s0026g02400*) homologous to the *Arabidopsis* tau GST, *AtGSTU10*.

Four transport genes were also up-regulated by nitrogen addition, including those coding for a nitrate transporter homologue (*VIT_01s0026g01570*) and a sulfate transporter (*VIT_07s0151g00340*). In *Arabidopsis*, the homologue of *VIT_01s0026g01570*, *ATNRT1:2* is implicated in nitrate and abscisic acid (ABA) uptake ²⁸⁴. The sulfate transporter can be induced by nitrogen starvation and is involved in the regulation of sulfate assimilation. Furthermore, within the category of transporters genes, we identified *VIT_18s0041g00590* and *VIT_00s0259g00140* which encode a proton-dependent oligopeptide transport protein and an oligopeptide transporter respectively. It was demonstrated that the homologue of *VIT_00s0259g00140* in *Arabidopsis* encodes for an oligopeptide transporter 3 (OPT3) implicated in the translocation of small peptides and some metals ²⁸⁵. OPT gene family was also demonstrated to be implicate in nitrogen remobilization ^{246,250}. Moreover, the expression of this gene can be induced by copper, iron or manganese deficiencies ²⁸⁵.

Genes down-regulated by N supply and specific to SB at R. The only gene related to secondary metabolism, whose expression was down-regulated by N fertilization (*VIT_13s0047g01230*) codes for a protein with an UDP-glucosyl transferase activity which may be involved in anthocyanin metabolism.

Genes down-regulated by nitrogen supply and specific to SB at R stage also include *VIT_03s0063g00380* and *VIT_16s0039g00880* which are related to cytochrome P450. The *Arabidopsis* orthologue of *VIT_03s0063g00380* encodes an abscisic acid 8'-hydroxylase 4 that mediates the oxidative degradation of ABA. Its activity responds to the water status of the plant and is induced by ABA ²⁸⁶.

While we identified several GST that were up-regulated by N addition in SB at both MR and R stage, another GST was down regulated by N at the R stage. This gene (*VIT_12s0035g02100*) is homologous to a glutathione-S-transferase from the zeta family.

Several transporters (*VIT_03s0063g02250*, *VIT_03s0038g02140* and *VIT_10s0003g02540*) were also down-regulated by N in SB berries at R stage. *VIT_03s0063g02250* codes a sugar transmembrane transporter whose *Arabidopsis* homologue (Polyol transporter 5, *AtPLT5*) is a plasma membrane broad-spectrum polyol-proton symporter ^{287,288}. Based on its structural

annotation *VIT_03s0038g02140*, is an auxin transporter-like protein. Finally *VIT_10s0003g02540* codes an ABC transporter B family involved in the transport of glutathione and glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite ²⁸⁹. As already mentioned, glutathione is a pro-precursor of the 3SH precursors, metabolites responsible for the formation of the 3SH ^{148,149}. The *Arabidopsis* best match of *VIT_10s0003g02540* is AtPGP9 (P-Glycoprotein 9).

Genes differentially expressed by N in SB berries at both MR and R stages

Genes up-regulated by N supply in SB berries at both MR and R stages. This category includes two genes (*VIT_16s0098g00860* and *VIT_18s0122g00420*) related to secondary metabolism, and five genes coding transport proteins. *VIT_16s0098g00860* is the homologue of *VIT_13s0047g00210* expressed at MR and orthologue of *AtDMR6* in *Arabidopsis* which encodes for an oxidoreductase from 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily. The homologue of *VIT_18s0122g00420* in *Arabidopsis* (*AtTT10*) codes a Laccase-15 involved in lignin metabolism. Moreover, this laccase mediates the polymerization of proanthocyanidin (tannin) from its monomer precursor epicatechin ^{290,291}.

The transporters found in this category include a transmembrane amino acid transporter (*VIT_13s0019g04660*), an ABC transmembrane transporter (*VIT_02s0025g00990*), a gamma-tonoplast intrinsic protein (*VIT_06s0061g00730*), relatively close to the *Zea mays* aquaporin TIP1-2. In *Arabidopsis*, some TIP proteins play a crucial role in urea transport ²⁹².

Genes down-regulated by N supply in SB berries at both MR and R stages. Within this category, one gene (*VIT_19s0015g00860*, homologous to an oligopeptide transporter (OPT)) was found. The *Arabidopsis* genome contains 9 members of the OPT family and their homologues have been characterized in other plants and in yeast. In *Vitis vinifera*, 18 OPT genes were identified that possess a conserved OPT domain essential for transport activity ²⁴⁷. The OPT proteins may be involved in 4 different processes: long-distance metal transport ²⁴⁸, heavy metal sequestration ^{249,250}, nitrogen mobilization ^{246,250} and glutathione transport ²⁴⁹⁻²⁵². The best *Arabidopsis* match for the OPT gene is *AtOPT1* involved in the translocation of small peptides across the cellular membrane in an energy-dependent

manner ²⁴⁶. Subileau *et al.*, in 2008 showed that the knockout of the *OPT1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* reduced the accumulation of 3SH precursors in grape must. They deduced that most glutathionylated precursors of 3SH are transported into yeast *via* OPT1, and that in the absence of this transporter, the precursor uptake limited significantly the production of 3SH ¹⁵⁸.

Genes responding to N supply and specific to Cabernet-Sauvignon berries at MR stage

Genes up-regulated by N supply and specific to CS at MR. The only DEG related to nitrogen metabolism encodes a nitrite reductase (*NIR1*, *VIT_03s0063g00370*). The same gene responded to nitrogen in SB berries at the same developmental stage (Supplementary table 1).

Concerning secondary metabolism, the gene (*VIT_12s0028g02810*) already identified in our study in SB berries at R and encoding for a putative *O*-methyltransferase was up-regulated specifically in CS berries at MR stage, as was *VIT_06s0004g07770* which encodes a peroxidase 4 involved in lignin metabolism.

Three genes specifically up-regulate in CS berries at MR stage belonged to the transport category: *VIT_13s0019g04660* encoding an amino acid transporter homologue, *VIT_06s0061g00730* which is homologous to a gamma-tonoplast intrinsic protein (TIP), already described in SB berries at both developmental stages, and *VIT_17s0000g02970* which encodes a MATE efflux related protein. The later one belongs to the multidrug and toxin extrusion type transporter family implicated in the compartmentation and translocation of alkaloids, terpenoids and phenolic compounds ²⁹³.

Genes down-regulated by N supply and specific to CS at MR. Within this category, a gene related to a serine/threonine phosphatase (*VIT_00s0505g00040*) and a gene coding a sugar transporter (*VIT_03s0063g02250*) were found. The latter was already described in SB berries at R stage (Supplementary table 1).

Genes responding to N supply and specific to Cabernet-Sauvignon berries at R stage

Genes up-regulated by N supply and specific to CS at R. The exhaustive list of genes involved in secondary metabolism up-regulated in CS berries at R stage is given in supplementary table 1. This list includes 8 genes related to phenylpropanoid metabolism: *O*-methyltransferase (*VIT_10s0003g00470*), phenylalanine ammonia-lyase (*PAL1*, *VIT_16s0039g01100*, *VIT_16s0039g01280*, *VIT_16s0039g01130*, *VIT_16s0039g01110*, and *VIT_16s0039g01360*) and cinnamoyl-CoA reductase (*VIT_14s0066g01150*). PAL1 is a key enzyme of plant metabolism catalyzing the first reaction of the biosynthesis of a wide variety of compounds such as flavonoids ²⁶⁸, and cinnamoyl-CoA reductase is involved in lignin branch biosynthetic pathway ²⁹⁴.

Two genes associated to anthocyanins metabolism also belong to this group (*VIT_15s0046g01970* and *VIT_13s0067g01020*). *VIT_15s0046g01970* encodes a glycosyl transferase and *VIT_13s0067g01020* encodes a 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase.

Furthermore, the list encompasses 35 genes implicated in flavonoid metabolism. All these genes encode proteins related to the naringenin-chalcone synthase (Transparent Testa 4). Naringenin-chalcone synthase mediates the synthesis of flavonoids *via* the phenylpropanoid and polyketide pathway, which starts with the condensation of one molecule of CoA-ester of cinnamic acid or coumaric or ferulic acid, and three molecules of malonyl-CoA. The resulting product, naringenin chalcone, is a key molecule for the genesis of different class of flavonoids ²⁹⁵.

Ten genes related to simple phenols gene ontology were also up-regulated. These genes encode laccases, which are involved in lignin metabolism (9 related to laccase 14 (LAC14) and 1 related to laccase 15 (LAC15)).

Equally worth mentioning are two genes associated to terpenoid metabolism: a terpene synthase (*VIT_18s0001g04280* and *VIT_18s0001g05230*), and a gene encoding a 3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase (*ALDH10A8*, *VIT_17s0000g07670*) whose best *Arabidopsis* match is a betaine aldehyde dehydrogenase 2. The genes up-regulated in CS berries at R stage also

include a gene encoding a nitrilase already identified in SB berries at (*NIT4*, *VIT_02s0033g00770*), and a senescence-related gene (*SRG1*, *VIT_10s0003g02280*) encoding an oxidoreductase active on diphenols and related substances.

Two different genes encoding enzymes involved in several pathways, namely, UDP-glucose flavonoid 3-o-glucosyltransferase 6-like (*HYR1*, *VIT_03s0017g02000*), and an oxidoreductase from the 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily (*VIT_00s0250g00090*) also belong to this group. The list also includes genes encoding a glutathione-S-transferases: *GSTU7* (*VIT_08s0040g00920*) and *GSTF9* (*VIT_12s0028g00920*).

Among the transporters, we identified a proton/hexose transporter (*MSS1*, *VIT_05s0020g03140*), an amino acid transporter (*VIT_14s0108g00630*) and an ammonium transmembrane transporter (*AMT2*, *VIT_08s0058g00150*).

Among ABC transporters that were differentially expressed, the ABC transporter and multidrug resistance systems genes included *PDR6* and *MRP3* (*VIT_06s0061g01490* and *VIT_01s0010g02440*). The *Arabidopsis* homologue of *MRP3* is a pump for glutathione-S-conjugates, chlorophyll catabolites or heavy metals such as cadmium ²⁸⁹. Finally a MATE efflux protein gene was also found in this category (*VIT_10s0116g01860*). As mentioned below, MATE efflux proteins mediate the transport of secondary metabolites ²⁹³.

Genes down-regulated by N supply and specific to CS at R. The genes involved in secondary metabolism that are differentially expressed in CS berries at R stage include putative myrcene/ocimene synthase (*VIT_13s0067g00050*) (repressed by nitrogen in SB berries at MR, supplementary table 1), 1,8-cineole synthase (*AtTPS27-like*, *VIT_12s0134g00030*), and a terpene synthase 21 (*AtTPS21-like*, *VIT_19s0014g04920*). In *Arabidopsis*, *AtTPS27* is implicated in monoterpene (C10) biosynthesis, while *AtTPS21* mediates sesquiterpene (C15) biosynthesis ^{296,297}.

Two genes coding transporters (*VIT_03s0038g02140* and *VIT_19s0015g00860*) belong to this category. The *Arabidopsis* homologue of *VIT_03s0038g02140* is *AtLAX2* (Auxin transporter-like protein 2) involved in proton-driven auxin influx. The second transporter gene relates to the *AtOPT1* oligopeptide transporter, also differentially expressed in SB berries.

Genes up-regulated by N supply in CS berries at both MR and R stages Four genes are up-regulated by N fertilization at both developmental stages. Among these genes, only one belongs to the families on which our work focuses. This gene (*VIT_09s0002g02450*) encodes a protein homologous to the AtPS2 inorganic pyrophosphatase 1 which catalyzes the specific cleavage of pyrophosphate ²⁹⁸.

We did not find any gene common to MR and R in CS berries that was down-regulated by N supply.

CONCLUSION

In the present study, we compared the transcript abundances of two grapevine varieties *V. vinifera* (cv. Sauvignon blanc and Cabernet-Sauvignon) at two developmental stages (MR and R) under two N modalities (control *versus* soil N100). This analysis has allowed to obtain a comprehensive description of the transcriptomic response of each variety to N supply. Gene response was variety and stage dependent and the comparative transcriptome analysis highlighted significant differences between the N treatments. At MR, more genes were differentially expressed in the SB berries compared to the CS while at R, CS showed more differentially expressed genes (DEG) than SB. More genes were up-regulated by N than down-regulated and at both stages, SB showed more down-regulated genes than CS.

Using the enrichment of Gene Ontology terms, we provided a description of the biological processes that were regulated by vine N status. The responsive genes identified in this study belong to a large number of biological pathways. Gene families related to nitrogen metabolism, secondary metabolism, transport mechanisms and to polyphenols and 3-sulfanyhexan-1-ol (3SH) synthesis were detailed.

These results provide novel insight on the effect of N nutrition on the regulation of gene expression related to the families on which this work focuses. Moreover, the description of candidate genes potentially implicated in the biosynthetic pathways of polyphenols and 3SH could be useful for a better understanding of their genesis. However, the data requires another season to be confirmed.

SUPPLEMENTARY DATA

A.

Sauvignon blanc					
Identity	Best identity description (<i>Organism</i>)	Mid-ripening		Ripeness	
		Log2	p value	Log2	p value
Nitrogen metabolism					
VIT_03s0063g00370	Nitrite reductase 1, Nir1 (<i>V. vinifera</i>)	7.82E-01	1.59E-04	NS	NS
VIT_16s0098g00290	Glutamate synthase, GLT1 (<i>A. thaliana</i>)	7.63E-01	3.43E-03	NS	NS
Secondary metabolism					
VIT_01s0137g00070	β -ketolacyl reductase (<i>A. thaliana</i>)	-8.83E-01	1.76E-02	NS	NS
VIT_02s0033g00670	Nitrilase 4 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	9.27E-01	3.05E-02
VIT_02s0033g00770	Nitrilase 4 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	9.72E-01	1.58E-02
VIT_08s0007g01550	Laccase-7	NS	NS	9.74E-01	1.21E-02
VIT_12s0028g02810	O-methyltransferase	NS	NS	8.93E-01	4.34E-02
VIT_13s0047g00210	Downy mildew resistance 6, DMR6 (<i>A. thaliana</i>)	1.06E+00	2.97E-04	NS	NS
VIT_13s0047g01230	UDP-glucosyl transferase	NS	NS	-7.94E-01	3.10E-04
VIT_13s0067g00050	(<i>E</i>)- β -ocimene synthase, TPS03 (<i>A. thaliana</i>)	-9.18E-01	1.80E-02	NS	NS
VIT_15s0046g01170	Dihydroflavonol-4-reductase (<i>A. thaliana</i>)	1.44E+00	2.62E-04	NS	NS
VIT_16s0098g00860	Downy mildew resistance 6, DMR6 (<i>A. thaliana</i>)	1.19E+00	3.56E-04	8.44E-01	1.38E-02
VIT_18s0001g03470	Flavonols synthase (<i>A. thaliana</i>)	-9.38E-01	1.20E-03	NS	NS
VIT_18s0075g00540	Laccase-14	NS	NS	1.00E+00	7.40E-03
VIT_18s0075g00780	Laccase-14	NS	NS	9.04E-01	2.34E-02
VIT_18s0117g00590	Laccase-14	NS	NS	1.11E+00	4.67E-03
VIT_18s0122g00420	Laccase-15, TT10 (<i>A. thaliana</i>)	1.02E+00	8.85E-03	8.41E-01	2.22E-02
VIT_18s0157g00140	Tryptophan aminotransferase-related protein 3, TAR3 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	1.40E+00	4.70E-05
Transport					
VIT_00s0259g00140	Oligopeptide transporter, OPT3 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	8.39E-01	2.86E-02
VIT_01s0026g01570	Nitrate transporter, NRT1 :2 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	9.21E-01	2.74E-03
VIT_02s0025g00990	ABC transmembrane transporter	8.22E-01	1.25E-02	1.12E+00	1.31E-03
VIT_03s0038g02140	Auxin transporter-like protein	NS	NS	-8.02E-01	1.62E-03
VIT_03s0038g03950	Mitochondrial phosphate carrier protein 1, MPT1 (<i>A. thaliana</i>)	-8.46E-01	2.05E-07	NS	NS
VIT_03s0063g02250	Polyol transporter 5, PLT5 transporter (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	-8.36E-01	4.26E-02
VIT_05s0049g02310	Integral membrane transporter (<i>A. thaliana</i>)	-9.11E-01	3.00E-02	NS	NS
VIT_06s0061g00730	Aquaporin gamma-tonoplast intrinsic protein, TIP1-2 (<i>Z. mays</i>)	1.33E+00	1.80E-04	1.01E+00	4.68E-03
VIT_07s0151g00340	Sulfate transporter	NS	NS	1.08E+00	2.66E-05
VIT_08s0007g04780	Aquaporin gamma-tonoplast intrinsic protein	7.73E-01	3.02E-06	NS	NS
VIT_10s0003g02540	ABC transporter B	NS	NS	-7.76E-01	2.30E-03
VIT_13s0019g04660	Transmembrane amino acid transporter	1.22E+00	4.76E-04	1.14E+00	2.60E-05
VIT_14s0108g00630	Transmembrane amino acid transporter	1.30E+00	2.22E-04	NS	NS
VIT_18s0041g00590	Proton-dependent oligopeptide transporter	NS	NS	8.70E-01	1.15E-02
VIT_19s0015g00860	Oligopeptide transporter 1, OPT1 (<i>A. thaliana</i>)	-1.12E+00	7.90E-04	-9.67E-01	5.71E-03
Miscellaneous					
VIT_01s0026g02400	Glutathione-S-transferase Tau 10, GSTU10 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	7.96E-01	3.45E-02
VIT_02s0012g02340	Isoflavone 2'-hydroxylase (<i>A. thaliana</i>)	7.81E-01	2.61E-02	NS	NS
VIT_03s0063g00380	Abscisic acid 8'-hydroxylase 4 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	-8.25E-01	2.00E-02
VIT_03s0063g01480	Isoflavone 2'-hydroxylase (<i>A. thaliana</i>)	1.25E+00	4.58E-05	NS	NS
VIT_04s0023g01480	Falvine-containing monooxygenase (<i>A. thaliana</i>)	-1.30E+00	1.27E-07	NS	NS
VIT_07s0104g01800	Glutathione-S-transferase phi 13, GSTF13 (<i>A. thaliana</i>)	8.77E-01	2.69E-02	NS	NS
VIT_10s0116g01780	Peroxidase 42, PER42 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	7.65E-01	8.42E-03
VIT_12s0035g02100	Glutathione-S-transferase zeta 2, GSTZ2 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	-9.49E-01	1.86E-05
VIT_16s0039g00880	Cytochrome P450 related protein	NS	NS	-7.62E-01	1.58E-02
VIT_16s0039g01070	Glutathione-S-transferase 23, GSTZ3 (<i>Z. mays</i>)	7.92E-01	4.30E-03	NS	NS
VIT_19s0015g02680	Glutathione-S-transferase Tau 25, GSTU25 (<i>A. thaliana</i>)	9.47E-01	1.09E-03	NS	NS
VIT_19s0015g02690	Glutathione-S-transferase Tau 25, GSTU25 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	7.94E-01	2.41E-06

B.

Cabernet-Sauvignon					
Identity	Best identity description (<i>Organism</i>)	Mid-ripening		Ripeness	
		Log2	p value	Log2	p value
Nitrogen metabolism					
VIT_03s0063g00370	Nitrite reductase ,NIR1 (<i>V. vinifera</i>)	7.67E-01	4.60E-14	NS	NS
Secondary metabolism					
VIT_00s0444g00010	Laccase-14	NS	NS	7.98E-01	8.65E-03
VIT_00s0731g00010	Laccase-14	NS	NS	8.11E-01	2.10E-02
VIT_00s2280g00010	Laccase-14	NS	NS	9.59E-01	9.49E-04
VIT_02s0033g00770	Nitrilase 4	NS	NS	8.35E-01	2.26E-02
VIT_10s0003g00470	O-methyltransferase	NS	NS	7.57E-01	6.43E-03
VIT_10s0003g02280	Senescence-related protein	NS	NS	9.76E-01	3.30E-03
VIT_10s0042g00840	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.34E-01	3.42E-04
VIT_10s0042g00870	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.12E-01	6.26E-04
VIT_10s0042g00890	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.82E-01	3.60E-07
VIT_12s0028g02810	Putative O-methyltransferase	9.10E-01	3.70E-03	NS	NS
VIT_12s0134g00030	1,8-cineole synthase-like, TPS27-like (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	-7.77E-01	4.13E-02
VIT_13s0067g00050	Putative myrcene/ocimene synthase	NS	NS	-1.07E+00	5.55E-03
VIT_13s0067g01020	2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase	NS	NS	9.52E-01	2.15E-06
VIT_14s0066g01150	Cinnamoyl-Coa reductase	NS	NS	7.99E-01	2.05E-02
VIT_15s0046g01970	Transferase of glycosyl groups	NS	NS	8.15E-01	3.49E-02
VIT_16s0039g01100	Phenylalanine ammonia-lyase, PAL	NS	NS	8.63E-01	2.93E-03
VIT_16s0039g01110	Phenylalanine ammonia-lyase, PAL	NS	NS	7.73E-01	5.03E-03
VIT_16s0039g01130	Phenylalanine ammonia-lyase, PAL	NS	NS	8.29E-01	1.25E-03
VIT_16s0039g01280	Phenylalanine ammonia-lyase, PAL	NS	NS	8.09E-01	2.30E-04
VIT_16s0039g01360	Phenylalanine ammonia-lyase, PAL	NS	NS	1.10E+00	5.53E-08
VIT_16s0100g00750	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.27E-01	9.99E-04
VIT_16s0100g00760	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.38E-01	8.34E-04
VIT_16s0100g00770	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.71E-01	3.59E-03
VIT_16s0100g00780	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	9.09E-01	1.20E-04
VIT_16s0100g00800	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.58E-01	7.73E-05
VIT_16s0100g00810	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.39E-01	4.00E-05
VIT_16s0100g00830	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.87E-01	5.44E-04
VIT_16s0100g00840	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.44E-01	7.18E-04
VIT_16s0100g00850	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	9.97E-01	7.71E-08
VIT_16s0100g00860	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.36E-01	1.25E-05
VIT_16s0100g00880	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.96E-01	2.53E-06
VIT_16s0100g00900	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.65E-01	2.20E-04
VIT_16s0100g00910	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.46E-01	1.53E-03
VIT_16s0100g00920	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.32E-01	3.11E-04
VIT_16s0100g00930	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	9.22E-01	1.46E-06
VIT_16s0100g00940	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	7.98E-01	1.61E-04
VIT_16s0100g00950	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	7.53E-01	1.20E-03
VIT_16s0100g01000	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.28E-01	4.62E-06
VIT_16s0100g01010	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	7.75E-01	1.31E-03
VIT_16s0100g01020	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.78E-01	2.82E-06
VIT_16s0100g01040	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.43E-01	4.99E-04
VIT_16s0100g01070	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.18E-01	5.18E-03
VIT_16s0100g01100	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	7.76E-01	8.02E-03
VIT_16s0100g01110	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.29E-01	1.45E-03
VIT_16s0100g01120	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.67E-01	3.13E-04
VIT_16s0100g01130	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	7.82E-01	3.65E-03
VIT_16s0100g01140	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.29E-01	9.94E-04
VIT_16s0100g01150	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	1.02E+00	1.87E-06
VIT_16s0100g01160	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.11E-01	2.71E-03
VIT_16s0100g01170	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.55E-01	1.15E-03
VIT_16s0100g01190	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	7.86E-01	5.01E-03
VIT_16s0100g01200	Naringenin-chalcone synthase	NS	NS	8.45E-01	5.08E-03
VIT_17s0000g07670	3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase , ALDH10A8	NS	NS	8.48E-01	5.08E-03
VIT_18s0001g04280	Terpene synthase	NS	NS	8.56E-01	6.19E-07
VIT_18s0001g05230	Terpene synthase	NS	NS	1.15E+00	1.33E-03
VIT_18s0075g00530	Laccase-14	NS	NS	8.37E-01	4.61E-02
VIT_18s0075g00590	Laccase-14	NS	NS	8.77E-01	1.90E-02
VIT_18s0075g00620	Laccase-14	NS	NS	8.68E-01	7.17E-03
VIT_18s0075g00780	Laccase-14	NS	NS	7.59E-01	4.98E-02
VIT_18s0122g00170	Laccase-14	NS	NS	1.50E+00	4.62E-06
VIT_18s0122g00690	Laccase-14	NS	NS	9.51E-01	1.30E-04
VIT_18s0122g01150	Laccase-15	NS	NS	9.47E-01	9.35E-03
VIT_19s0014g04920	Terpene synthase, TPS21 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	-8.44E-01	4.68E-02

Transport					
VIT_01s0010g02440	ABC transporter C,MRP3 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	8.34E-01	2.11E-02
VIT_03s0038g02140	Auxin transporter-like protein, LAX2 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	-8.43E-01	7.73E-03
VIT_03s0063g02250	Sugar transmembrane transport	-9.41E-01	1.84E-02	NS	NS
VIT_05s0020g03140	Carbohydrate transmembrane transporter, MSS1	NS	NS	7.53E-01	2.31E-02
VIT_06s0061g00730	Gamma-tonoplast intrinsic protein, TIP	9.22E-01	3.36E-04	NS	NS
VIT_06s0061g01490	ABC transporter, PDR6	NS	NS	1.05E+00	1.62E-03
VIT_08s0058g00150	Ammonium transmembrane transporter, AMT2	NS	NS	8.03E-01	4.68E-03
VIT_10s0116g01860	MATE efflux protein	NS	NS	1.02E+00	1.25E-03
VIT_13s0019g04660	Amino acid transporter	7.55E-01	1.25E-03	NS	NS
VIT_14s0108g00630	Amino acid transporter	NS	NS	9.19E-01	2.89E-03
VIT_17s0000g02970	MATE efflux related protein	7.88E-01	1.89E-02	NS	NS
VIT_19s0015g00860	Oligopeptide transporter, OPT1 (<i>A. thaliana</i>)	NS	NS	-8.64E-01	1.36E-02
Miscellaneous					
VIT_00s0250g00090	2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase	NS	NS	1.33E+00	2.00E-05
VIT_00s0505g00040	Serine/threonine phosphatase	-7.70E-01	2.96E-02	NS	NS
VIT_02s0033g00770	Nitrilase 4	NS	NS	8.35E-01	2.26E-02
VIT_03s0017g02000	UDP-glucose flavonoid 3-o-glucosyltransferase 6-like	NS	NS	8.74E-01	7.17E-03
VIT_06s0004g07770	Peroxidase 4	7.71E-01	4.90E-02	NS	NS
VIT_08s0040g00920	Glutathione-S-transferase, GSTU7	NS	NS	8.21E-01	4.64E-02
VIT_09s0002g02450	Phosphatase activity, AtPS2 (<i>A. thaliana</i>)	9.25E-01	7.34E-05	1.04E+00	6.93E-04
VIT_12s0028g00920	Glutathione-S-transferase, GSTF9	NS	NS	9.72E-01	5.90E-07

Supplementary table 1. A selection of key transcript in (A) SB and (B) CS berries involved in nitrogen metabolism, secondary metabolism, transport metabolism and gene families already described to be involved in polyphenols and 3 sulfanyhexan-1-ol that showed significantly increased or decreased abundance by nitrogen supply at mid-ripening and ripeness. CS, Cabernet-Sauvignon; SB, Sauvignon blanc; NS, not-significant.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail consistait à déterminer l'effet du statut azoté de la vigne sur la biosynthèse de deux marqueurs à forte contribution organoleptique sur l'arôme variétal des vins ²¹⁷, l'IBMP et le 3SH, en l'absence d'un déficit hydrique et d'une variation de la vigueur des ceps.

Une des originalités de l'approche a consisté de conduire cette étude à la fois en conditions contrôlées (plants en pots) et au champ. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à plusieurs échelles, de la parcelle de vigne à l'expression des gènes, en passant par la biochimie fine au métabolisme du raisin. Ce type d'approche transversale est indispensable pour mieux comprendre les phénomènes impliqués. En effet, trop d'études transcriptomiques s'appuient sur des dispositifs rudimentaires et insuffisamment caractérisés et trop d'études agronomiques classiques se contentent d'observer les phénomènes sans se donner les moyens de pousser l'investigation suffisamment loin pour espérer les expliquer.

Pour rappel, concernant l'IBMP, il avait été montré qu'une irrigation des vignes accompagnée d'une fertilisation azotée augmente la teneur en IBMP dans les baies au cours de la maturation. Toutefois, aucune différence n'a été observée dans le contenu en cette méthoxy-pyrazine entre les baies issues des ceps irrigués et ceux irrigués et fertilisés avec de l'azote ¹²⁶. Aussi, il a été démontré que la teneur en IBMP des baies produites sur un sol sableux est plus élevée que celle produite sur un sol graveleux ¹¹¹. Ces observations pourraient s'expliquer par la fertilité minérale du sol mais aussi par sa capacité à retenir l'eau. L'effet pourrait être direct ou indirect à travers une modification de la vigueur de la vigne. A ce jour, aucun travail publié ne sépare ou n'a cherché à séparer l'effet de la nutrition azotée de la vigne, de son alimentation en eau et de sa vigueur sur la teneur en IBMP dans le raisin et le vin.

Concernant le 3SH et ses précurseurs, il avait été montré que sur un sol riche en azote, la teneur en précurseurs dans le moût du Sauvignon blanc est plus élevée que sur un sol pauvre en ce nutriment ²¹. Ainsi, un effet positif de la fertilisation azotée sur le contenu en précurseur cystéinylé du 3SH dans le moût et sur la teneur en 3SH dans le vin a bien été observé ^{183,257}.

En l'absence d'un déficit hydrique et d'une variation de la vigueur des ceps, l'influence du statut azoté de la vigne sur la concentration des deux précurseurs du 3SH (Glut-3SH et Cys-3SH) dans la baie et le moût ainsi que sur la teneur en 3SH dans le vin correspondant n'avait pas encore été réalisée.

Ainsi, l'effet de l'azote sur les voies de biosynthèse de ces arômes, en particulier sur les composés intermédiaires et les transcrits dans la baie, n'avait jamais été réellement précisé dans la littérature.

Dans ce travail, nous nous sommes efforcés de répondre le plus précisément possible à ces problématiques.

Pour ce faire, des vignes cultivées sur des sols naturellement carencés en azote ont été fertilisées avec différentes quantités d'azote. L'analyse du statut azoté de la plante (mesures N-tester et YAN) au cours de la saison a validé le dispositif expérimental utilisé. Afin de s'affranchir d'une contrainte hydrique pouvant influencer la teneur en composés d'arôme et interagir avec le statut azoté de la vigne, les ceps ont été irrigués pendant toute l'expérimentation. De plus, pour ne pas impacter la vigueur générale de la plante, les vignes ont été fertilisées tard dans la saison et l'apport de l'azote a été fractionné en plusieurs passages. Pour s'affranchir de l'effet du sol et du génotype de la plante, l'expérimentation a été conduite dans deux régions, sur deux millésimes et sur trois variétés. Les teneurs en IBMP, en Glut-3SH et en Cys-3SH ont été déterminées sur baies, récoltées à différents stades au cours de la maturation, et dans le moût à la récolte. L'IBMP et le 3SH ont aussi été quantifiés dans les vins correspondants. De plus, le profil d'expression de certains gènes de leurs voies de biosynthèse respectives a été déterminé dans les baies de raisin issues de deux modalités (contrôle *versus* N100) aux stades fermeture de la grappe, mi-maturité et maturité.

Nous démontrons dans ce travail que **le statut azoté de la vigne n'influence pas directement la teneur en IBMP**. En effet, son contenu dans la baie, le moût et le vin a été similaire entre les différents traitements azotés. Ce résultat a été confirmé par une expérimentation complémentaire au dispositif principal menée en Nouvelle-Zélande en 2014. Ainsi, le postulat d'un effet direct de la nutrition azotée sur la biosynthèse de l'IBMP ne peut être retenu. Pourtant jusqu'à ce jour, il était convenu qu'un statut azoté élevé de la vigne

impacte positivement la teneur en cette molécule. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette observation.

Le contenu en IBMP dans la baie de raisin semble plutôt dépendant de la vigueur de la vigne que de sa nutrition azotée bien qu'en viticulture ces deux paramètres sont intimement liés. D'une part, de nombreuses études ont montré que l'IBMP est un composé photosensible qui se dégrade en présence d'un fort taux de rayonnements. En cas d'une fertilisation azotée et d'une disponibilité en eau importante, la croissance végétative de la vigne est stimulée conduisant à une augmentation de la surface foliaire et une diminution de l'exposition des grappes à la lumière créant ainsi un micro-climat favorisant l'accumulation de cette méthoxypyrazine. D'autre part, la fertilisation azotée confère à la vigne une vigueur excessive augmentant ainsi le nombre et la surface des feuilles, lieu de biosynthèse potentiel de l'IBMP. En effet, un flux de l'IBMP entre les feuilles et la grappe a été démontré, donc une teneur élevée en ce composé dans les baies pourrait être la conséquence d'une augmentation de son lieu de genèse ²⁹⁹.

Il sera intéressant de déterminer si le contenu en IBMP dans la baie est plutôt dépendant du micro-climat au niveau de la grappe (notamment les rayonnements) ou de son lieu de biosynthèse. Une expérimentation sur des vignes ayant un rapport feuilles/fruits différents et qui reçoivent la même quantité de rayonnement pourrait répondre à cette question.

Dans cette étude, **la nutrition azotée n'influence pas le profil d'expression de *VviOMT3* et *VviOMT4*, deux gènes clés de la voie de biosynthèse de l'IBMP.** Leur niveau d'expression est similaire entre les différentes modalités. Par ailleurs, dans ce travail, la teneur en leucine, l'acide aminé précurseur de l'IBMP, est similaire entre les traitements azotés. Ceci démontre que la voie entière de synthèse de cette méthoxypyrazine n'est pas directement impactée par l'azote confirmant ainsi nos résultats.

Concernant le 3SH et ses précurseurs, nous montrons qu'**un statut azoté élevé de la vigne conduit à une augmentation du contenu en Glut-3SH dans la baie et dans le moût, ainsi que de la teneur en 3SH dans le vin. En revanche, aucun effet n'est observé sur le contenu en Cys-3SH.** En effet, la concentration du Glut-3SH dans la baie et dans le moût est plus importante dans la modalité fortement fertilisée comparée au témoin non-fertilisé alors

que celle du Cys-3SH ne semble pas dépendante de l'azote. Dans le vin, un effet positif de l'azote est observé sur la teneur en 3SH. Ces observations ont été confirmées dans trois essais indépendants (expérimentations menées à Bordeaux, à Sancerre et sur des plants en pots) pendant deux millésimes (2013 et 2014).

L'effet de l'azote sur la synthèse et l'accumulation du Glut-3SH est confirmé dans notre expérimentation en pots. La teneur en ce composé dans les baies du SB et du CS greffés sur 110R ou RGM est plus élevée dans la modalité fortement azotée. Quant au Cys-3SH, une grande variabilité de sa réponse à la fertilisation azotée a été observée.

Jusqu'à récemment, le Cys-3SH était considéré comme étant le précurseur principalement utilisé par la levure pour libérer le 3SH. Dans notre essai, l'azote n'a pas d'incidence sur le niveau de Cys-3SH alors qu'un impact est signalé sur le contenu en Glut-3SH et par conséquent sur la teneur en 3SH. Cette observation semble indiquer qu'en réponse à l'azote, la formation du 3SH se fait probablement à partir du Glut-3SH indépendamment du Cys-3SH. D'autres voies sont possibles pour la libération de ce thiol mais les mécanismes mis en jeu sont loin d'être complètement élucidés.

L'expression de *VviGST3*, *VviGST4* et *VviGGT*, jusqu'à présent considérés comme gènes clés dans la voie de biosynthèse des précurseurs du 3SH n'est pas impactée par le statut azoté de la vigne. En effet, le profil d'expression de *VviGST3* et de *VviGST4* au cours de la maturation de la baie est similaire entre les deux traitements et il n'est pas corrélé avec le contenu en Glut-3SH qui est fortement influencé par la fertilisation. Par conséquent, on suppose que l'expression de ces deux gènes n'est pas responsable des variations observées aux niveaux du contenu en Glut-3SH.

Chez les plantes, les glutathion-S-transférases constituent une large famille multigénique. Il est possible que la réponse des GSTs soit spécifique d'une modalité donnée³⁰⁰⁻³⁰² et que pour chaque modalité réponde des GSTs différentes.

Comme pour les *VviGSTs*, le profil d'expression de *VviGGT* est similaire entre le contrôle et la modalité fertilisée, ceci pourrait expliquer l'absence d'un effet de l'azote sur le Cys-3SH, le métabolite censé être produit en réponse à son activité enzymatique.

En absence d'azote, la synthèse des précurseurs du 3SH est identique pour les deux porte-greffes. En présence d'azote, la synthèse de ces précurseurs est dépendante du porte-greffe. En effet, **le RGM, en réponse à une nutrition azotée élevée, favorise la production et l'accumulation du Glut-3SH**. Cette interaction entre le porte-greffe et l'azote vis-à-vis de la synthèse des précurseurs du 3SH est mise en évidence pour la première fois.

Outre le statut azoté de la vigne et la combinaison porte-greffe/modalité, la nature du cépage et du porte-greffe influencent également la teneur en précurseurs du 3SH dans la baie de raisin. Celle-ci est plus élevée dans les baies de SB comparée au CS et dans les baies de RGM comparée au 110R. Ces résultats mettent en avance l'importance du matériel végétal dans l'effet terroir et son interaction avec les autres facteurs (climat, sol et pratiques culturales) dans l'élaboration de vins de qualité.

Les voies de biosynthèse de l'IBMP et des précurseurs du 3SH ne sont pas complètement élucidées et la recherche de nouveaux gènes est un vrai challenge. Dans cette optique, une étude de transcriptomique à haut débit de type RNA-seq a été menée dans laquelle le transcriptome du SB et du CS de la modalité témoin est comparé à celui de la modalité N100. Ceci a été réalisé à trois stades : fermeture de la grappe, mi-maturité et maturité.

L'IBMP n'a pas répondu à la fertilisation azotée donc au niveau transcriptomique, la voie de biosynthèse de ce composé devrait réagir de la même manière en cas de présence ou d'absence de ce nutriment. La comparaison de deux transcriptomes soumis à deux traitements azotés différents n'est pas donc la meilleure stratégie pour la recherche de nouveaux gènes de la voie de biosynthèse de cette méthoxypyrazine. Cependant, la comparaison du transcriptome de deux cépages, un fort producteur contre un faible producteur de l'IBMP permettrait l'identification de nouveaux gènes clés. Il serait par ailleurs également intéressant de vérifier si la nutrition azotée influence la teneur en IBHP, le substrat de l'IBMP et si dans ce cas-là, des mécanismes post-transcriptionnels régulent l'expression des gènes *VviOMT* et par conséquent agissent sur la synthèse et/ou la dégradation de ce composé d'arôme.

En revanche, comme le contenu en Glut-3SH est dépendant du statut azoté, la comparaison entre le transcriptome de la modalité contrôle et celui de la modalité N100 semble être une

stratégie pertinente pour l'identification des nouveaux gènes de la voie de biosynthèse des précurseurs du 3SH.

Dans les baies de SB à mi-maturité et maturité, deux gènes codant des GSTs ont pu être identifiés comme candidats potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse des précurseurs du 3SH (*VIT_19s0015g02680* et *VIT_19s0015g02690*). Les séquences protéiques de ces deux GSTs ne partagent que 39% de similarité. Ainsi, leurs séquences protéiques ont montré respectivement une similarité de 69% et 35% par rapport à la séquence d'AtGSTU25 chez *Arabidopsis thaliana*. AtGSTU25 pourrait interagir avec le S-glutathion-hexanol²⁴³⁻²⁴⁵, produit de la réaction d'addition du glutathion au *trans*-2-hexenal, précurseurs du 3SH^{148,149}. La faible homologie de séquence observée pour *VIT_19s0015g02690* pourrait être expliquée par le fait que cette GST (163 acides aminés) est beaucoup plus courte qu'AtGSTU25 (218 acides aminés). Cependant, sur la partie présentant un alignement de séquence, une similarité de 79% est notée entre les deux protéines.

De plus, par une recherche sans *a priori*, **un autre gène (*VIT_19s0015g00860*) codant un transporteur de type OPT a été identifié comme impliqué dans le transport du GSH indispensable pour la synthèse des précurseurs du 3SH.** L'expression de ce gène est fortement réprimée par la nutrition azotée à mi-maturité et maturité, les deux stades où un effet de l'azote a été observé sur la teneur en Glut-3SH dans la baie. Les OPTs peuvent être impliqués dans quatre processus différents: (i) distribution des métaux à longue distance, (ii) séquestration des métaux lourds, (iii) mobilisation de l'azote et (iv) transport du glutathion. Chez *Vitis vinifera*, 18 gènes OPT ont été identifiés possédant un domaine OPT essentiel pour leur activité de transporteur. Le génome d'*Arabidopsis thaliana* en contient 9 et leurs homologues ont été caractérisés chez d'autres plantes et chez la levure. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la majorité du Glut-3SH est transporté par l'intermédiaire du transporteur OPT1. La délétion du gène *OPT1* provoque une diminution de l'accumulation des précurseurs du 3SH dans le moût de raisins, réduisant ainsi la production du 3SH¹⁵⁸.

Les données RNA-seq de l'année 2014 sont en cours d'analyse. Il sera primordial de vérifier l'expression de ces 2 GSTs et du transporteur OPT au sein de ces données afin de confirmer les résultats obtenus en 2013. La caractérisation fonctionnelle des 2 GST et de l'OPT n'a pas été réalisée au cours de ce projet de thèse mais elle est envisagée par l'UMR 1287 EGFV.

La qualité d'un vin dépend d'un équilibre subtil entre les sucres, les acides organiques, les polyphénols et les composés d'arôme. Néanmoins, la teneur en alcool des vins a augmenté considérablement depuis 2 à 3 décennies dans les différents vignobles français. Cette observation pourrait en partie s'expliquer par le changement climatique, qui accentuerait l'accumulation des sucres dans les baies sous l'effet combiné d'une augmentation de la température et de la contrainte hydrique. En outre, la teneur en composés aromatiques est largement influencée par la température. En effet, celle-ci diminue avec des températures élevées.

Le déclin de la majeure partie du vignoble européen actuel d'ici à quelques décennies a récemment été prédit, du fait du changement climatique³⁰³. Cette prédiction peut être battue en brèche pour de nombreuses raisons³⁰⁴, parmi lesquelles le fait que l'adaptation des techniques viticoles a été totalement négligée dans la première étude.

De nombreux travaux suggèrent que la fertilisation azotée de la vigne, une pratique culturelle couramment utilisée, joue un rôle majeur dans la balance sucre/métabolites secondaires. Ainsi, il a été montré que l'alimentation en azote influence la richesse en précurseurs d'arômes, éventuellement en interaction avec les composés phénoliques. Dans ce travail, nous démontrons que la fertilisation azotée augmente la teneur en 3SH, arôme variétal majeur du Sauvignon blanc et souvent apprécié par les dégustateurs alors que celle-ci n'influence pas le contenu en IBMP apportant à ces vins leur caractère végétal. De plus, il a été montré, dans un projet parallèle au mien mené sur les mêmes parcelles expérimentales (thèse d'Aude Habran), que la nutrition azotée de la vigne n'impacte pas la teneur en composés phénoliques de la baie de raisin et du vin (Habran *et al.*, communication personnelle). La fertilisation azotée se présente donc comme une pratique culturale qui pourrait améliorer le potentiel aromatique du vin ainsi que sa qualité, sans altérer l'équilibre sucre/polyphénols.

Une fertilisation azotée tardive et fractionnée conduit à l'obtention des baies plus aromatiques en limitant fortement un possible impact sur la vigueur et le rendement.

Cependant, dans le cas d'une fertilisation tardive au sol (après le débourrement), l'assimilation de l'azote par la vigne peut être affectée à cause de faibles précipitations à ce moment de la saison. La pulvérisation foliaire se présente comme une alternative mais son

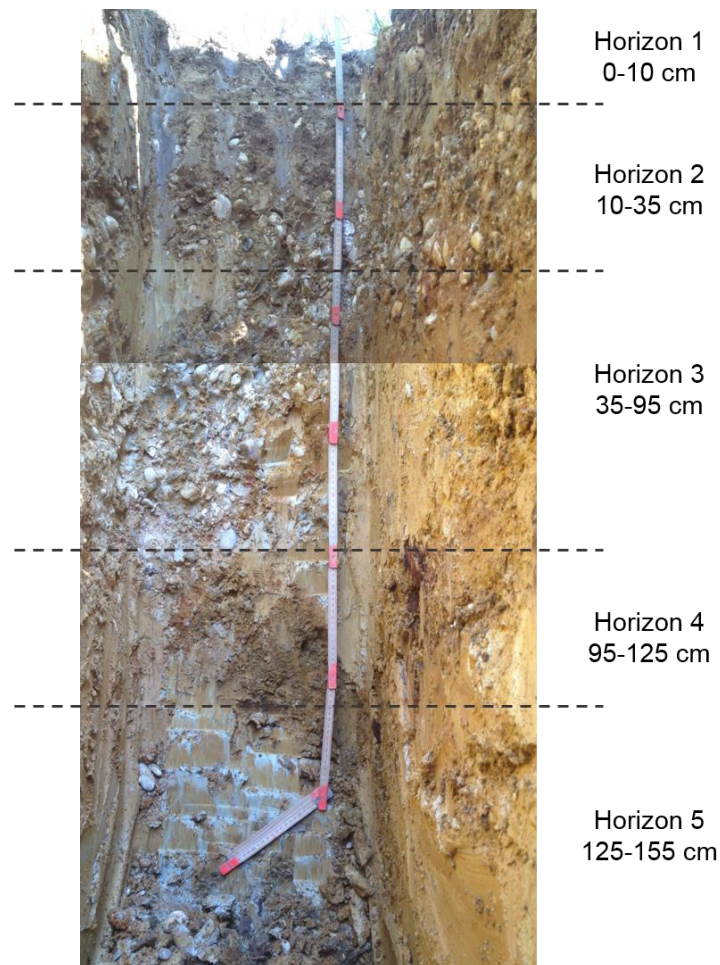
application doit être contrôlée et automatisée pour que la vigne reçoive les quantités prévues de ce nutriment d'une part et pour diminuer les pertes d'azote dans l'atmosphère et sur le sol d'autre part. L'automatisation de la pulvérisation foliaire, son mode d'application ainsi que les quantités à appliquer exigent des expérimentations supplémentaires afin d'optimiser ce mode de fertilisation. Les résultats obtenus pourront être exploités dans la pratique viticole après validation en parcelle expérimentale dans un contexte climatique en cours d'évolution.

Au-delà de ces observations, ce travail de thèse a permis une nouvelle ouverture vers une meilleure compréhension de l'effet du statut azoté de la vigne sur la biosynthèse de certains composés aromatiques.

ANNEXES

Fosses pédologiques

Parcelles du Sauvignon blanc – Château Couhins 2013/2014: III-7/8 (SB2013/2014)



Description

Horizon n°1 : 0-10 cm

Texture : sablo-argileuse

Eléments grossiers : 10%

Couleur : 10YR43 brun

Humidité : sec

Structure polyédrique anguleuse ; horizon assez compact

Absence de racines

Effervescence moyenne

Horizon n°2 : 10-35 cm

Texture : sablo-argileuse

Eléments grossiers : 20%

Couleur : 10YR36 brun jaunâtre foncé

Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon très compact
Humidité : frais
Racines nombreuses de toutes tailles ; orientation horizontale et oblique
Effervescence moyenne

Horizon n°3 : 35-95 cm

Texture : argilo-sableux
Eléments grossiers : 60%
Couleur : 10YR68 jaune brunâtre ; 8/5GY gris verdâtre claire
Humidité : frais
Structure continue ; horizon très compact
Racines fines et peu nombreuses
Absence d'effervescence

Horizon n°4 : 95-125 cm

Texture : sablo-argilo-limoneux
Eléments grossiers : 10%
Couleur : 7YR5/8 brun jaunâtre. Présence de tâches grises peu nombreuses
Humidité : frais
Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon compact
Racines fines et peu nombreuses
Absence d'effervescence

Horizon n°5 : 125-155 cm

Texture : argile
Eléments grossiers : absence
Couleur : 10YR68 jaune brunâtre ; 8/5GY gris verdâtre claire
Humidité : frais
Structure continue ; horizon très compact
Racines fines et peu nombreuses en majorité nécrosées
Absence d'effervescence

Résultats des analyses

Fosse SB2013/2014	Horizon 1	Horizon 2	Horizon 3	Horizon 4	Horizon 5
Profondeur (cm)	0-10	10-35	35-95	95-125	125-155
Éléments grossiers (%)	10	20	60	10	0
Texture (déterminée au toucher)	Sablo-argileuse	Sablo-argileuse	Argilo-sableuse	sablo-argilo-limoneuse	Argileuse
Matière organique (%)	2,27	1,14	0,76	0,76	0,83
Carbone organique (%)	1,31	0,66	0,44	0,44	0,48
Azote total (%)	0,120	0,076	0,027	0,020	0,020
C/N	11,0	8,7	16,3	22,0	24,0
pH eau	8,0	8,7	7,4	8,4	8,2
Complexe adsorbant					
K ⁺ cmol+/Kg	0,50	0,30	0,17	0,25	0,46
Mg ²⁺ cmol+/Kg	0,81	0,55	0,77	2,29	5,4
Ca ²⁺ cmol+/Kg	++	++	11,88	++	++
Na ⁺ cmol+/Kg	0,06	0,08	0,14	0,51	1,07
S somme des cations	++	++	++	++	++
V taux de saturation	SAT	SAT	SAT	SAT	SAT
C.E.C cmol+/Kg	13,4	9,8	12,7	16,5	30,3
Ac. phosphorique P ₂ O ₅ (%) <i>Joret Hébert</i>	0,0072	0,0043	0,0020	0,0020	0,0020

Interprétation des analyses de la fosse SB2013/2014

La terre fine du sol de la fosse SB2013/2014 est composée de sable et d'argile. L'horizon 5 est très argileux. La proportion d'éléments grossiers est très hétérogène entre les horizons. Les horizons 1, 2, 4 et 5 ont montré des proportions faibles alors que l'horizon 3 qui est assez épais (60 cm) en contient un pourcentage élevé.

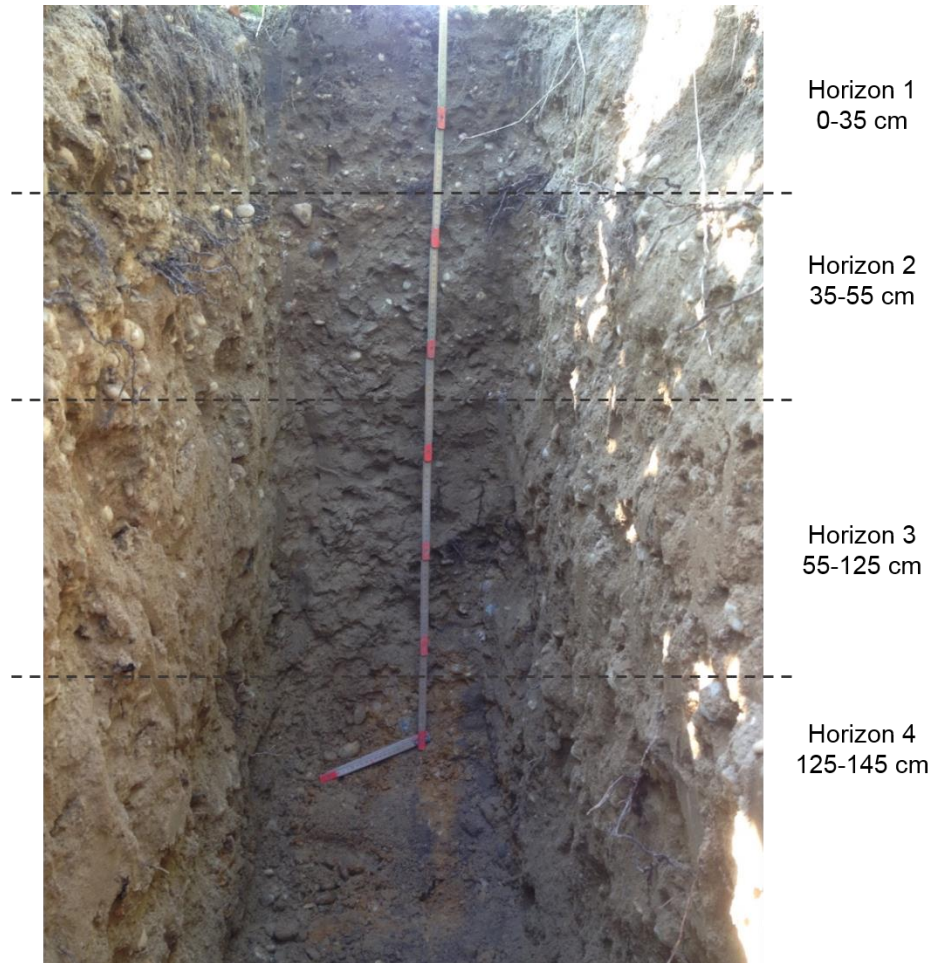
La teneur en matière organique est relativement faible.

Le % en N total est faible surtout en profondeur. Sur cette parcelle, la vigne doit recevoir des apports réguliers d'azote sous forme minérale ou organique.

Les valeurs de la CEC sont un relativement élevées notamment en profondeur et la répartition des cations sur le complexe adsorbant est équilibrée.

L'expérience montre cependant que l'absorption du potassium à partir de substrats argileux peut être difficile. Par conséquent, le statut potassique de la vigne doit être surveillé par des analyses pétiolaires régulières.

Parcelle du Cabernet-Sauvignon – Château Couhins 2013 : I-1 (CS2013)



Description

Horizon n°1 : 0-35 cm

Texture : sable

Eléments grossiers : 40%

Couleur : 10YR42 brun grisâtre foncé

Humidité : frais

Structure polyédrique; horizon assez compact

Nombreux racines à la base de l'horizon de toutes tailles ; orientation horizontale prédominante

Horizon n°2: 35-55 cm

Texture : sable

Eléments grossiers : 60%

Couleur : 10YR44 brun jaunâtre foncé

Structure particulière ; horizon meuble

Humidité : frais

Racines peu nombreuses, moyennes et fines ; orientation oblique

Horizon n°3 : 55-125 cm

Texture : sable

Éléments grossiers : 40%

Couleur : 10YR5/4 brun jaunâtre

Humidité : frais

Structure particulière ; horizon meuble

Racines nombreuses de taille moyenne et fine ; orientation horizontale et oblique

Horizon n°4 : 125-145 cm

Texture : sablo-argileux

Éléments grossiers : 50%

Couleur : 7YR5/8 brun franc

Humidité : frais

Structure continue ; horizon très compact

Racines peu nombreuses au sommet de l'horizon

Résultats des analyses

Fosse CS2013	Horizon 1	Horizon 2	Horizon 3	Horizon 4
Profondeur (cm)	0-35	35-55	55-125	125-145
Eléments grossiers (%)	40	60	40	50
Texture (déterminée au toucher)	Sableuse	Sableuse	Sableuse	Sablo-argileuse
Matière organique (%)	1,81	0,76	0,60	0,71
Carbone organique (%)	1,05	0,44	0,34	0,41
Azote total (%)	0,076	0,020	0,020	0,020
C/N	13,8	22,0	17,5	20,5
pH eau	7,4	7,4	7,4	6,8
Complexe absorbant				
K ⁺ cmol+/Kg	0,15	0,08	0,13	0,42
Mg ²⁺ cmol+/Kg	0,42	0,13	0,16	0,78
Ca ²⁺ cmol+/Kg	++	1,82	0,35	4,8
Na ⁺ cmol+/Kg	0,04	0,03	0,03	0,03
S somme des cations	++	2,06	0,67	6,03
V taux de saturation (%)	13	71	31	91
C.E.C cmol+/Kg	4,5	2,9	2,1	6,6
Ac. phosphorique P ₂ O ₅ (%) <i>Joret Hébert</i>	0,0131	0,0060	0,0061	0,0020

Interprétation des analyses de la fosse CS2013

La terre fine du sol de la fosse CS2013 est dominante sableuse. La proportion d'éléments grossiers est élevée, entre 40 et 60%.

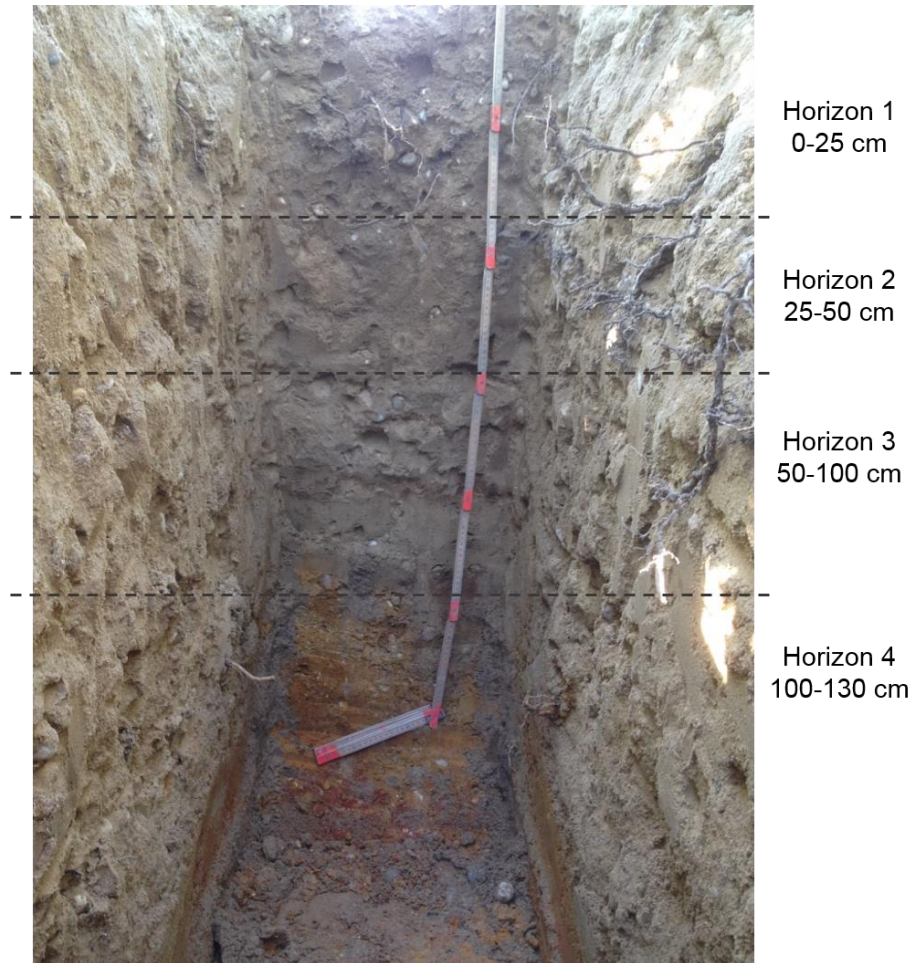
La teneur en matière organique est élevée dans l'horizon de surface, mais elle devient faible au-delà de 35 cm de profondeur.

Le % en N total montre que l'horizon 1 est moyennement pourvu en ce nutriment.

Les valeurs de la CEC sont un peu faibles mais la répartition des cations sur le complexe indique une absence d'antagonisme entre les éléments majeurs.

Dans ce milieu peu tamponné, la vigne peut être facilement le sujet, soit à des carences en potassium, soit à des carences en magnésium. Par conséquent, il est recommandé de suivre l'absorption de ces deux éléments par la vigne à l'aide d'analyses pétiolaires.

Parcelle du Cabernet-Sauvignon – Château Couhins 2014 : I-2 (CS2014)



Description

Horizon n°1 : 0-25 cm

Texture : sableuse

Éléments grossiers : 30%

Couleur : 10YR44 brun jaunâtre foncé

Humidité : frais

Structure particulière ; horizon meuble

Nombreuses racines de toutes tailles ; orientation horizontale et oblique

Horizon n°2: 25-50 cm

Texture : sableuse

Éléments grossiers : 20%

Couleur : 10YR56 brun jaunâtre

Structure particulière ; horizon meuble

Humidité : frais

Nombreuses racines de toutes tailles ; orientation horizontale et oblique

Horizon n°3 : 50-100 cm

Texture : sableuse

Éléments grossiers : 20%

Couleur : 10YR6/4 brun jaunâtre clair (beige)

Humidité : frais

Structure particulière ; horizon meuble

Racines faibles et moyennes ; nombreuses localisées à la base de l'horizon

Horizon n°4 : 100-130 cm

Texture : sablo-argileuse

Éléments grossiers : 20%

Couleur : 7YR5/8 brun franc (strong brown)

Humidité : frais

Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon très compact

Racines peu nombreuses et fines

Résultats des analyses

Fosse CS2014	Horizon 1	Horizon 2	Horizon 3	Horizon 4
Profondeur (cm)	0-25	25-50	50-100	100-130
Éléments grossiers (%)	30	20	20	20
Texture (déterminée au toucher)	Sableuse	Sableuse	Sableuse	Sablo-argileuse
Matière organique (%)	0,89	0,64	0,58	0,84
Carbone organique (%)	0,51	0,37	0,33	0,48
Azote total (%)	0,045	0,020	0,020	0,020
C/N	11,6	18,5	17,0	24,5
pH eau	7,4	7,1	7,8	5,8
Complexe adsorbant				
K ⁺ cmol+/Kg	0,16	0,05	0,08	0,43
Mg ²⁺ cmol+/Kg	0,30	0,19	0,17	0,97
Ca ²⁺ cmol+/Kg	++	1,78	0,35	5,56
Na ⁺ cmol+/Kg	0,03	0,03	0,03	0,04
S somme des cations	++	++	0,63	7,0
V taux de saturation (%)	SAT	SAT	33	79
C.E.C cmol+/Kg	1,9	1,9	1,7	8,8
Ac. phosphorique P₂O₅ (%) <i>Joret Hébert</i>	0,0068	0,0067	0,0033	0,0020

Interprétation des analyses de la fosse CS2014

La terre fine du sol de la fosse CS2014 est à majorité sableuse. L'horizon 4 est sablo-argileux. La proportion d'éléments grossiers n'est pas très élevée, entre 20 et 30%, suivant les horizons.

La teneur en matière organique est très faible dans tous les horizons.

Le % en N total montre une carence azotée du sol.

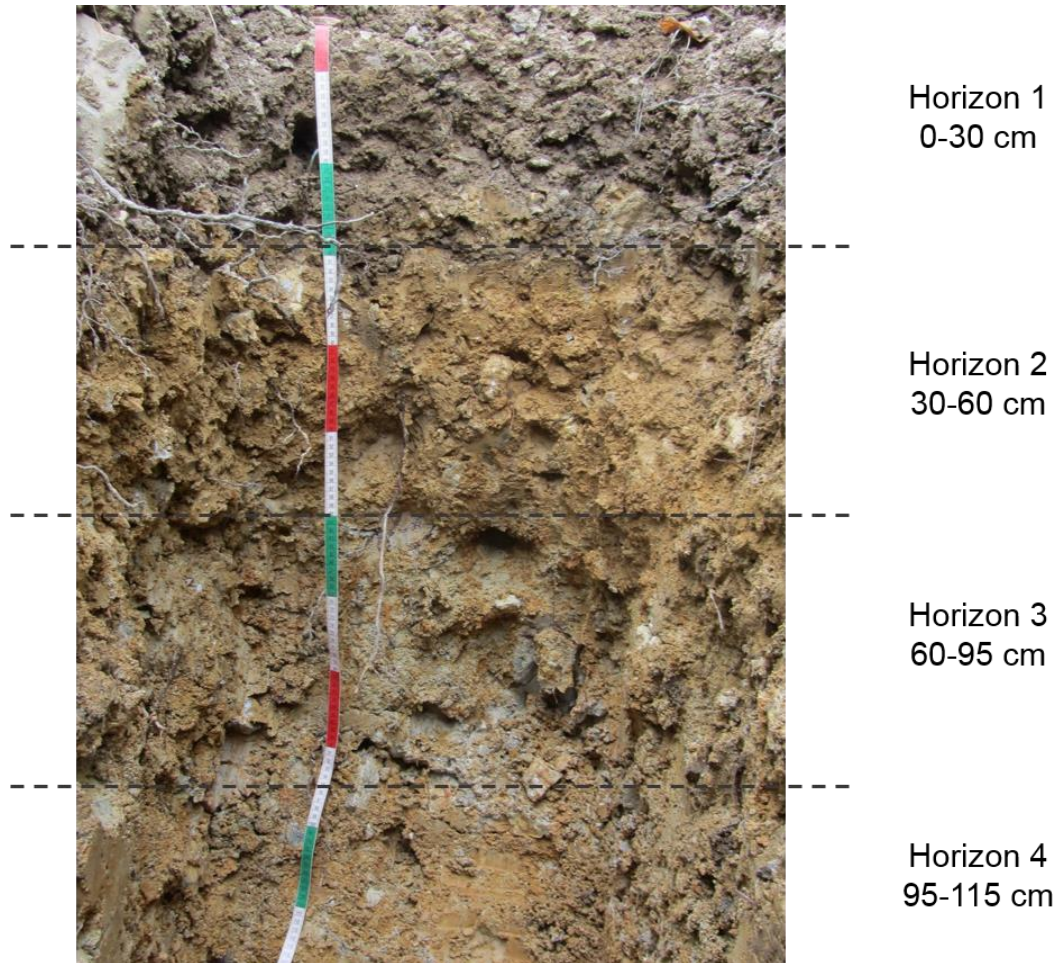
Les valeurs en CEC sont très faibles mais la répartition des cations sur le complexe adsorbant est équilibrée.

Ce sol est très pauvre : une faible capacité d'échange cationique s'ajoute de faibles teneurs en potassium, en magnésium et en azote.

L'assimilation de ces éléments doit être régulièrement surveillée par des analyses pétiolaires.

Les apports doivent être fractionnés.

Parcelle du Sauvignon blanc – Domaine Fontaine d’Audon 2013: Blanc de Gy (BG13)



Description

La fosse se situe en haut de la pente (15% d’inclinaison de la pente) et elle est exposée sud. La parcelle est peu désherbée sous les rangs et l’enherbement est bien fourni entre les rangs.

Horizon n°1 : 0-30 cm

Texture : limono-argileuse

Éléments grossiers : 15%

Couleur : 10YR5/4 brun jaunâtre

Humidité : frais

Structure polyédrique sub-anguleuse; horizon compact

Nombreuses racines de toutes tailles et vivantes (bon état sanitaire) ; orientation oblique et horizontale

Absence d’effervescence (Absence de calcaire)

Horizon n°2: 30-60 cm

Texture : limono-argileuse

Eléments grossiers : 20%

Couleur : 10YR6/6 brownish yellow

Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon assez compacte

Humidité : frais

Racines assez nombreuses, moyennes et fines avec quelques racines fines mortes ; toute orientation

Absence d'effervescence

Horizon n°3 : 60-95 cm

Texture : limono-argileuse

Eléments grossiers : 20% (gros silex)

Couleur : 10YR7/2 gris clair ; 7,5YR4/6 (strong brown)

Humidité : frais

Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon assez compact

Racines assez nombreuses de taille moyenne et fine, vivante en grande majorité (avec quelques racines mortes) ; orientation verticale et oblique

Absence d'effervescence

Nombreuses tâches d'oxydo-réduction

Horizon n°4 : 95-115 cm

Texture : limono-argileuse

Eléments grossiers : 15%

Couleur : 7YR6/8 jaune brunâtre

Humidité : frais

Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon très compact

Peu de racines mortes

Absence d'effervescence

Quelques tâches d'oxydo-réduction

Résultats des analyses

Fosse BG13	Horizon 1	Horizon 2	Horizon 3	Horizon 4
Profondeur (cm)	0-30	30-60	60-95	95-115
Eléments grossiers (%)	15	20	20	15
Texture (déterminée au toucher)	Limono-argileuse	Limono-argileuse	Limono-argileuse	Limono-argileuse
Matière organique (%)	1,69	1,77	0,76	0,84
Carbone organique (%)	0,98	1,02	0,44	0,48
Azote total (%)	0,082	0,099	0,045	0,020
C/N	12,0	10,4	9,8	24,5
pH eau	6,8	4,9	4,6	4,7
Complexe adsorbant				
K ⁺ cmol+/Kg	0,51	0,59	0,40	0,28
Mg ²⁺ cmol+/Kg	1,86	2,67	3,46	3,22
Ca ²⁺ cmol+/Kg	11,38	10,24	14,49	14,63
Na ⁺ cmol+/Kg	0,04	0,05	0,14	0,26
S somme des cations	++	13,56	18,50	18,41
V taux de saturation (%)	SAT	61	70	77
C.E.C cmol+/Kg	12,3	21,9	26,4	23,9
Ac. phosphorique P ₂ O ₅ (%) <i>Joret Hébert</i>	0,0066	0,0020	0,0020	0,0020

Interprétation des analyses de la fosse BG13

La terre fine du sol de la fosse BG13 est limono-argileuse. La proportion d'éléments grossiers n'est pas très élevée, entre 15 et 20%.

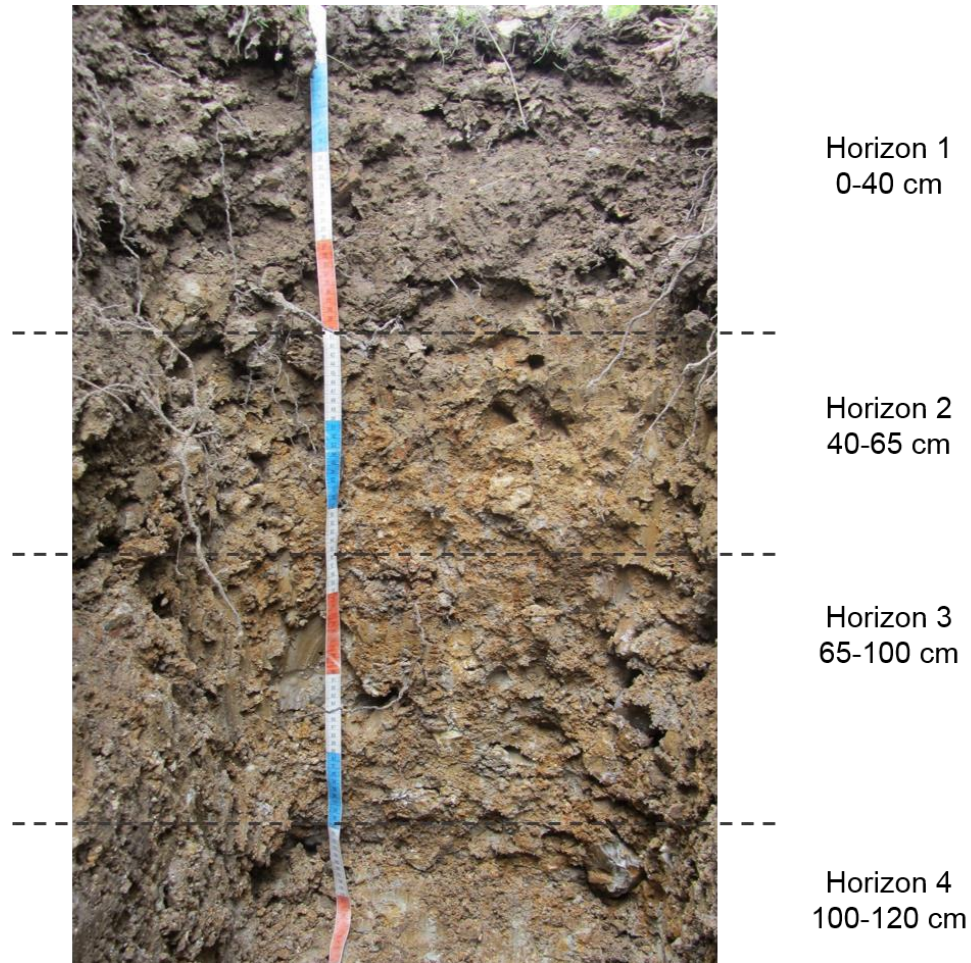
La teneur en matière organique est élevée dans les horizons de surface (jusqu'à 60 cm de profondeur).

Le % en N total montre que les 2 horizons 1 et 2 sont relativement pourvus en ce nutriment alors que ce même % indique une carence azotée en profondeur (horizon 3 et 4).

Les valeurs de la CEC sont assez élevées notamment pour les horizons, 3 et 4 et la répartition des cations sur le complexe adsorbant est favorable à une bonne assimilation des éléments majeurs. Ce sol est bien pourvu en magnésium. L'absorption du potassium doit être surveillée par des analyses pétiolaires.

Le pH du sol est inférieur à 5 au-delà de 30 cm de profondeur, ce qui peut provoquer des toxicités de métaux lourds et d'aluminium. Un apport régulier de chaux permettrait d'augmenter progressivement le pH de ce sol, même si la migration du calcium en profondeur prendra de longues années.

Parcelle du Sauvignon blanc – Domaine Fontaine d’Audon 2014 : Blanc de Gy (BG14)



Description

La fosse se situe en milieu de la pente (12% d’inclination de la pente) et elle est exposée au sud.

Horizon n°1 : 0-40 cm

Texture : limono-argileuse

Eléments grossiers : 20%

Couleur : 10YR4/4 brun jaunatre foncé

Humidité : frais

Structure polyédrique sub-anguleuse; horizon assez compact

Nombreuses racines de toutes tailles et vivantes (bon état sanitaire); orientation oblique

Absence d’effervescence (absence de calcaire)

Horizon n°2: 40-65 cm

Texture : Limono-argileuse

Eléments grossiers : 15%

Couleur : 10YR5/4 beige. Présence de tâches : 7,5YR5/6 brun franc et 10YR7/2 gris clair

Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon compacte

Humidité : frais

Racines assez nombreuses, moyennes et fines avec quelques racines fines mortes ; toute orientation

Absence d'effervescence

Nombreuses tâches d'oxydo-réduction

Horizon n°3 : 65-100 cm

Texture : argilo-limoneuse

Eléments grossiers : 20% (avec du silex fin)

Couleur : 10YR5/8 brun franc ; 10YR7/2 gris

Humidité : frais

Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon assez compact

Racines assez nombreuses de taille moyenne et fine, vivantes en grande majorité ; toute orientation

Absence d'effervescence

Nombreuses tâches d'oxydo-réduction

Horizon n°4 : 100-120 cm

Texture: argile

Eléments grossiers : 25%

Couleur : 7YR5/8 brun franc ; 10YR7/2

Humidité : frais

Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon compact

Racines fines assez nombreuses vivantes et mortes de toute orientation

Absence d'effervescence

Nombreuses tâches d'oxydo-réduction

Résultats des analyses

Fosse BG14	Horizon 1	Horizon 2	Horizon 3	Horizon 4
Profondeur (cm)	0-40	40-65	65-100	100-120
Eléments grossiers (%)	20	15	20	25
Texture (déterminée au toucher)	Limono-argileuse	Limono-argileuse	Argilo-limoneuse	Argileuse
Matière organique (%)	2,05	0,77	0,98	0,81
Carbone organique (%)	1,19	0,44	0,56	0,47
Azote total (%)	0,100	0,037	0,065	0,039
C/N	11,9	12,2	8,8	12,1
pH eau	7,4	5,7	5,4	5,0
Complexe absorbant				
K ⁺ cmol+/Kg	0,42	0,33	0,41	0,37
Mg ²⁺ cmol+/Kg	1,60	2,23	3,70	3,73
Ca ²⁺ cmol+/Kg	9,88	11,88	21,02	18,67
Na ⁺ cmol+/Kg	0,03	0,09	0,28	0,49
S somme des cations	++	++	++	23,27
V taux de saturation (%)	SAT	SAT	SAT	0,86
C.E.C cmol+/Kg	10,7	13,7	24,1	26,9
Ac. phosphorique P ₂ O ₅ (%) <i>Joret Hébert</i>	0,0133	0,0020	0,0020	0,0020

Interprétation des analyses de la fosse BG14

La terre fine du sol de la fosse BG14 est à majorité limono-argileuse avec en profondeur un horizon très argileux. La proportion d'éléments grossiers n'est pas très élevée, entre 15 et 25% suivant les horizons.

La teneur en matière organique est élevée dans l'horizon de surface, mais elle devient très faible à partir de 40 cm de profondeur.

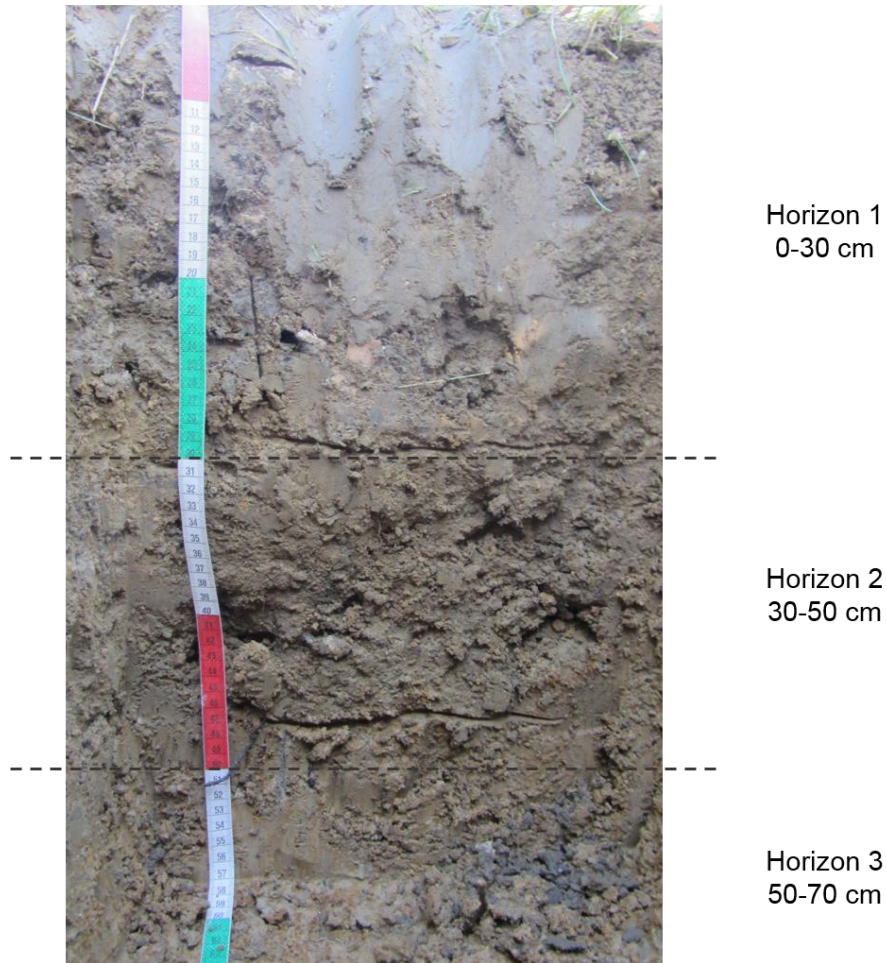
Le % en N total montre que l'horizon 1 est moyennement pourvu en ce nutriment alors que ce même % indique une très faible teneur en profondeur.

Les valeurs en CEC sont assez élevées et la répartition des cations sur le complexe adsorbant est favorable à une bonne assimilation des éléments majeurs.

L'horizon 4 est riche en magnésium et en sodium, ce qui indique que cet horizon n'est peu ou pas percolé par les eaux de pluies excédentaires en période hivernale.

La vigne ne devrait pas avoir de difficultés dans l'absorption des éléments majeurs mais l'assimilation du potassium devra être surveillée par des analyses pétiolaires régulières.

Parcelle du Pinot noir – Domaine Henri Bourgeois 2013 : Les Pierres (LP13)



Description

La fosse se situe en bas de pente qui présente une forme concave (7% d'inclination de la pente) et elle est exposée est. La parcelle est désherbée sous les rangs et l'enherbement est bien fourni entre les rangs.

Horizon n°1 : 0-30 cm

Texture : limono-sableuse

Eléments grossiers : 10%

Couleur : 10YR3/4 brun jaunâtre foncé

Humidité : frais

Structure polyédrique sub-anguleuse; horizon compact

Nombreuses racines de toutes tailles et vivantes : orientation horizontale et oblique

Absence d'effervescence

Horizon n°2: 30-50 cm

Texture : sablo-limoneux

Éléments grossiers : 10%

Couleur : 10YR5/3 brown

Structure polyédrique peu stable ; horizon peu compacte

Humidité : frais

Racines assez nombreuses, vivantes, de tailles moyennes et fines, vivantes et de toute orientation

Absence d'effervescence

Horizon n°3: 50-70 cm

Texture : limono-argileuse

Éléments grossiers : 10%

Couleur: 10YR5/4 yellowish brown

Humidité : frais

Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon peu compact

Racines assez nombreuses, vivantes, de tailles moyennes et fines, vivantes et de toute orientation

Absence d'effervescence

Présence de tâches rouille et noire d'oxydes de manganèse

Résultats des analyses

Fosse LP14	Horizon 1	Horizon 2	Horizon 3
Profondeur (cm)	0-30	30-50	50-70
Éléments grossiers (%)	10	10	10
Texture (déterminée au toucher)	Limono-sableuse	Sablo-limoneuse	Limono-argileuse
Matière organique (%)	1,69	0,77	0,71
Carbone organique (%)	0,98	0,44	0,41
Azote total (%)	0,086	0,043	0,034
C/N	11,4	10,5	12,1
pH eau	7,8	7,1	7,3
Complexe adsorbant			
K ⁺ cmol+/Kg	0,35	0,25	0,33
Mg ²⁺ cmol+/Kg	1,39	0,83	1,66
Ca ²⁺ cmol+/Kg	++	++	++
Na ⁺ cmol+/Kg	0,06	0,06	0,11
S somme des cations	++	++	++
V taux de saturation (%)	SAT	SAT	SAT
C.E.C cmol+/Kg	9,6	8,5	15,7
Ac. phosphorique P ₂ O ₅ (%) <i>Joret Hébert</i>	0,0112	0,0051	0,0020

Interprétation des analyses de la fosse LP13

La terre fine du sol de la fosse LP14 est hétérogène et varie entre limono-sableuse, sablo-limoneuse et limono-argileuse. La proportion d'éléments grossiers est faible (10%).

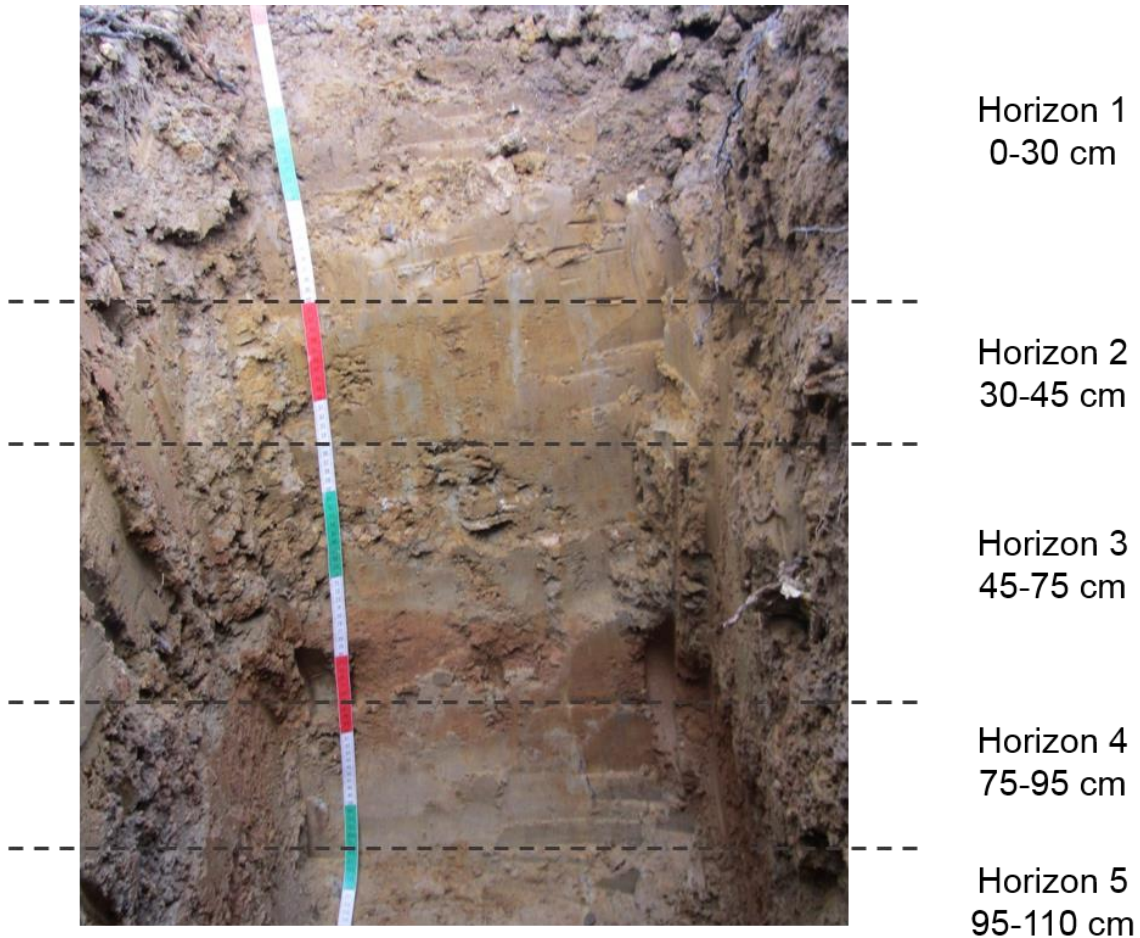
La teneur en matière organique est importante dans l'horizon de surface (horizon 1) et elle devient faible au-delà de 30 cm de profondeur.

Le % en N total montre que l'horizon 1 est relativement bien pourvu en ce nutriment.

Les valeurs de la CEC sont moyennement élevées et la répartition des cations sur le complexe adsorbant est favorable à une bonne assimilation des éléments majeurs.

La vigne devrait s'alimenter sans problème en magnésium. L'assimilation du potassium devra être surveillée par des analyses pétiolaires.

Parcelle du Pinot noir – Domaine Henri Bourgeois 2014 : Les Pierres (LP14)



Description

La fosse se situe en haut de versant (10% d'inclination de la pente) et elle est exposée est. La vigne est désherbée sous les rangs et enherbée entre les rangs.

Horizon n°1 : 0-30 cm

Texture : limono-sableuse

Éléments grossiers : 15%

Couleur : 10YR4/3 brun

Humidité : frais

Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon assez compact

Nombreuses racines de toutes tailles et vivantes; orientation horizontale

Absence d'effervescence

Horizon n°2: 30-45 cm

Texture : argilo-limoneuse

Éléments grossiers : 10%

Couleur : 10YR5/6 brun jaunâtre

Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon compacte

Humidité : frais

Racines assez nombreuses, moyennes et fines avec à majorité vivantes (avec quelques racines mortes) ; orientation verticale et oblique

Absence d'effervescence

Présence de quelques tâches grises claires (10YR7/2)

Horizon n°3: 45-75 cm

Texture : limono-sableuse

Éléments grossiers : 5%

Couleur: 10YR5/8 brun jaunâtre

Humidité : frais

Structure polyédrique sub-anguleuse ; horizon assez compact

Racines peu nombreuses de grosse taille

Absence d'effervescence

Présence de tâches d'oxydo-réduction grise 2,5Y6/2 (clair gris brunâtre)

Horizon n°4 : 75-95 cm

Texture: sablo-limoneuse

Éléments grossiers : absence

Couleur : 7,5YR4/4 brun

Humidité : frais

Structure particulière ; horizon assez compact

Racines peu nombreuses fines et moyennes, vivantes et mortes ; orientation verticale

Absence d'effervescence

Horizon n°5 : 95-110 cm

Texture : sableuse

Éléments grossiers : absence

Couleur : 10YR5/8 brun jaunâtre

Humidité : frais

Structure particulière ; horizon assez compact

Pas de racines visibles

Absence d'effervescence

Résultats des analyses

Fosse LP14	Horizon 1	Horizon 2	Horizon 3	Horizon 4	Horizon 5
Profondeur (cm)	0-30	30-45	45-75	75-95	95-110
Éléments grossiers (%)	15	10	5	0	0
Texture 'déterminée au toucher)	Limono-sableuse	Argilo-limoneuse	Limono-sableuse	Sablo-limoneuse	Sableuse
Matière organique (%)	1,46	0,77	0,69	0,69	0,60
Carbone organique (%)	0,84	0,44	0,40	0,40	0,34
Azote total (%)	0,082	0,038	0,021	0,020	0,020
C/N	10,4	11,8	19,0	20,0	17,5
pH eau	7,4	7,1	6,9	5,6	5,0
Complexe adsorbant					
K ⁺ cmol+/Kg	0,36	0,36	0,26	0,18	0,22
Mg ²⁺ cmol+/Kg	1,32	1,47	1,22	0,93	1,08
Ca ²⁺ cmol+/Kg	11,10	++	++	7,38	6,46
Na ⁺ cmol+/Kg	0,04	0,09	0,06	0,20	0,04
S somme des cations	++	++	++	8,71	7,81
V taux de saturation (%)	SAT	SAT	SAT	97	85
C.E.C cmol+/Kg	11,8	14,9	12,5	8,9	9,1
Ac. phosphorique P ₂ O ₅ (%) <i>Joret Hébert</i>	0,0060	0,0020	0,0020	0,0020	0,0020

Interprétation des analyses de la fosse LP14

La terre fine du sol de la fosse LP14 varie entre une texture sableuse, sablo-limoneuse à argilo-limoneuse. La proportion d'éléments grossiers n'est pas élevée, entre 0 et 15%, suivant les horizons.

La teneur en matière organique est moyennement faible dans l'horizon de surface (horizon 1) et elle devient très faible en profondeur.

Le % en N total montre que l'horizon 1 est relativement bien pourvu en ce nutriment alors que ce même % est très faible en profondeur.

Les valeurs de la CEC sont moyennement élevées et la répartition des cations sur le complexe adsorbant est favorable à une bonne assimilation des éléments majeurs.

La teneur en potassium e en azote est néanmoins assez faible et l'assimilation de ces éléments doit être surveillée par des analyses pétiolaires régulières.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Vaudour, E. *Les terroirs viticoles: Définitions, caractérisation et protection*. Dunod/La vigne. **2003**, pp 312.
- (2) van Leeuwen, C.; Seguin, G. The concept of terroir in viticulture. *J. Wine Res.* **2006**, *17*, 1–10.
- (3) Vaudour, E. Diversity of notions of terroir: towards an operational concept of terroir. *Rev. des oenologues des Tech. Vitivinic. oenologique* **2002**, No. 101, 39–41.
- (4) Seguin, G. Terroirs and pedology of wine growing. *Experientia* **1986**, *42*, 861–873.
- (5) Blouin, J.; Guimberteau, G. *Maturation et maturité des raisins*. Éditions Féret; **2000**, pp 168.
- (6) Jackson, D. I.; Lombard, P. B. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality - A review. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 409–430.
- (7) Tonietto, J.; Carbonneau, A. A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. *Agric. For. Meteorol.* **2004**, *124*, 81–97.
- (8) Coombe, B. G. Influence of temperature on composition and quality of grapes. *Acta Hortic. International Soc. Hortic. Sci.* **1987**, *206*, 23–36.
- (9) Jones, G. V.; White, M. A.; Cooper, O. R.; Storchmann, K. Climate change and global wine quality. *Clim. Change* **2005**, *73*, 319–343.
- (10) Gladstones, J. *Viticulture and environment*. *Winetitles*; **1992**, pp 310.
- (11) Pirie, A.; Mullins, M. G. Interrelationships of sugars, anthocyanins, total phenols and dry weight in the skin of grape berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* **1977**, *28*, 204–209.
- (12) Spayd, S. E.; Tarara, J. M.; Mee, D. L.; Ferguson, J. C. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 171–182.
- (13) Mori, K.; Goto-Yamamoto, N.; Kitayama, M.; Hashizume, K. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 1935–1945.
- (14) Tarara, J. M.; Lee, J.; Spayd, S. E.; Scagel, C. F. Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **2008**, *59*, 235–247.
- (15) Seguin, G. Alimentation en eau de la vigne dans des sols du Haut-Médoc. *Conn. Vigne Vin* **1969**, *2*, 93–141.

- (16) van Leeuwen, C.; Seguin, G. Incidences de l'alimentation en eau de la vigne, appréciée par l'état hydrique du feuillage, sur le développement de l'appareil végétatif et la maturation du raisin (*Vitis vinifera* variété Cabernet franc, Saint-Emilion, 1990). *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* **1994**, *28*, 81–110,181–182.
- (17) Seguin, G. Les sols de vignobles du Haut-Médoc. Influence sur l'alimentation en eau de la vigne et sur la maturation du raisin (Doctoral dissertation, University of Bordeaux), **1970**, pp 141.
- (18) Tregoat, O.; van Leeuwen, C.; Choné, X.; Gaudillère, J.-P. The assessment of vine water and nitrogen uptake by means of physiological indicators influence on vine development and berry potential (*Vitis vinifera* L. cv Merlot, 2000, Bordeaux). *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* **2002**, *36*, 133–142.
- (19) van Leeuwen, C.; Gaudillère, J.-P.; Tregoat, O. Evaluation du régime hydrique de la vigne à partir du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2001**, *35*, 195–205.
- (20) Choné, X.; van Leeuwen, C.; Gaudillère, J. P. Stem water potential is a sensitive indicator of grapevine water status. *Ann. Bot.* **2001**, *87*, 477–483.
- (21) Peyrot des Gachons, C.; van Leeuwen, C.; Tominaga, T.; Soyer, J.-P.; Gaudillère, J.-P.; Dubourdiou, D. Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc in field conditions. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 73–85.
- (22) Kramer, P. J.; Boyer, J. S. *Water relations of plants and soils. Academic press;* **1995**, pp 482.
- (23) Chaves, M. M.; Zarrouk, O.; Francisco, R.; Costa, J. M.; Santos, T.; Regalado, A. P.; Rodrigues, M. L.; Lopes, C. M. Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Ann. Bot.* **2010**, *105*, 661–676.
- (24) Schultz, H.; Matthews, M. Vegetative growth distribution during water deficits. *J. Plant Physiol.* **1988**, *15*, 641–656.
- (25) Matthews, M.; Anderson, M. Reproductive development in grape (*Vitis vinifera* L.): responses to seasonal water deficits. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40*, 52–60.
- (26) Castellarin, S. D.; Matthews, M. A.; Di Gaspero, G.; Gambetta, G. A. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta* **2007**, *227*, 101–112.
- (27) Owen, S. J.; Lafond, M. D.; Bowen, P.; Bogdanoff, C.; Usher, K.; Abrams, S. R. Profiles of abscisic acid and its catabolites in developing Merlot grape (*Vitis vinifera*) berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2009**, *60*, 277–284.

- (28) Gambetta, G. A.; Matthews, M. A.; Shaghasi, T. H.; McElrone, A. J.; Castellarin, S. D. Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape. *Planta* **2010**, *232*, 219–234.
- (29) Goodwin, I.; Macrae, I. Regulated deficit irrigation of Cabernet-Sauvignon grapevines. *Aust. New Zeal. Wine Ind. J.* **1990**, *5*, 131–133.
- (30) McCarthy, M. G. The effect of transient water deficit on berry development of cv. Shiraz (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* **1997**, *3*, 2–8.
- (31) Esteban, M. A.; Villanueva, M. J.; Lissarrague, J. R. Effect of irrigation on changes in berry composition of Tempranillo during maturation. Sugars, organic acids, and mineral elements. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 418–434.
- (32) Ojeda, H.; Deloire, A.; Carbonneau, A. Influence of water deficits on grape berry growth. *Vitis* **2001**, *40*, 141–145.
- (33) Fregoni, M. Irrigation des vignobles. Problèmes de physiologie, de biochimie, de génétique, d'agronomie, de technologie et d'économie. In *Bulletin de l'OIV* **551**; **1977**; pp 1–17.
- (34) Verbrugghe, M.; Guyot, G.; Hanocq, J. F.; Ripoche, D. Influence of different soils types of the low Rhone valley on surface temperatures of grapes and leaves of *Vitis vinifera*. *leaves Vitis vinifera. Rev. Fr. d'Oenologie* **1991**, *128*, 14–19.
- (35) Carey, V. A. Spatial characterisation of natural terroir units for viticulture in the Bottelaryberg-Simonsberg-Helderberg winegrowing area (Doctoral dissertation, Stellenbosch University), **2001**, pp 180.
- (36) Tesic, D.; Woolley, D. J.; Hewett, E. W.; Martin, D. J. Environmental effects on cv Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) grown in Hawke's Bay , New Zealand. 1. Phenology and characterisation of viticultural environments. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2001**, *8*, 15–26.
- (37) Morlat, R.; Bodin, F. Characterization of viticultural terroirs using a simple field model based on soil depth - II. Validation of the grape yield and berry quality in the Anjou vineyard (France). *Plant Soil* **2006**, *281*, 55–69.
- (38) Asfaw, Z.; Kliewer, W. M. Influence of root temperature and rootstock on budbreak, shoot growth, and fruit composition of Cabernet-Sauvignon grapevines grown under controlled conditions. *Am. J. Enol. Vitic* **1979**, *30*, 312–317.
- (39) Witbooi, E. H. The ecophysiological characterisation of terroirs in Stellenbosch: the contribution of soil surface colour (Doctoral dissertation, Stellenbosch University), **2008**, pp 144.

- (40) Stoll, M.; Stuebinger, M.; Lafontaine, M.; Schultz, H. Radiative and thermal effects on fruit ripening induced by differences in soil colour. In *Proc. VIIth Int. Terroir Congress, Murisier F. Ed., Nyon, Switzerland; 2008*; pp 52–57.
- (41) Wilson, J. E. *Terroir: the role of geology, climate and culture in the making of French wines. Wine Appreciation Guild, Limited; 1999*, pp 336.
- (42) Löhnertz, O.; Böhm, P.; Muskat, S. Terroir Hesse: Soil determines wine style. In *8th International Terroir Congress, Nyon, Switzerland; 2008*; pp 19–23.
- (43) White, R.; Balachandra, L.; Edis, R.; Chen, D. The soil component of terroir. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* **2007**, *41*, 9–18.
- (44) Dry, P. R.; Coombe, B. G. *Viticulture Volume 1-Resources. Winetitles, Adelaide, Australia; 2005*, pp 211.
- (45) Reynolds, A. G.; Senchuk, I. V.; van Reest, C.; De Savigny, C. Use of GPS and GIS for elucidation of the basis for terroir: spatial variation in an Ontario Riesling vineyard. *Am. J. Enol. Vitic* **2007**, *58*, 145–162.
- (46) Noble, A. C. Evaluation of Chardonnay wines obtained from sites with different soil compositions. *Am. J. Enol. Vitic.* **1979**, *30*, 214–217.
- (47) Renouf, V.; Tregoat, O.; Roby, J.-P.; van Leeuwen, C. Soils, rootstocks and grapevine varieties in prestigious Bordeaux vineyards and their impact on yield and quality. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* **2010**, *44*, 1–8.
- (48) Cocks, C.; Feret, E.; Boidron, B. *Bordeaux et ses vins: classés par ordre de mérite dans chaque commune. Féret; 2014*; pp 1952.
- (49) Maltman, A. The Role of vineyard geology in wine typicity. *J. Wine Res.* **2008**, *19*, 1–17.
- (50) Choné, X.; van Leeuwen, C.; Chéry, P. Terroir influence on water status and nitrogen status of non-irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). Vegetative development, must and wine composition (Example of a Medoc top estate vineyard, Saint Julien area, Bordeaux, 1997). *S. Afr. J. Enol. Vitic* **2001**, *22*, 8–15.
- (51) Mpelakosa, B. S.; Schachtman, D. P.; Treeby, M. T.; Thomas, M. R. A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2003**, *9*, 154–168.
- (52) Carbonneau, A.; Deloire, A.; Torregrosa, L.; Pellegrino, A.; Jaillard, B.; Métay, A.; Ojeda, H.; Lebon, E.; Abbal, P. *Traité de la vigne Physiologie, terroir, culture. 2ème édition. Dunod; 2015*; pp 592.

- (53) Mastretta, C.; Barac, T.; Vangronsveld, J.; Newman, L.; Taghavi, S.; van Der Lelie, D. Endophytic bacteria and their potential application to improve the phytoremediation of contaminated environments. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **2006**, *23*, 175–188.
- (54) Compant, S.; Mitter, B.; Colli-Mull, J. G.; Gangl, H.; Sessitsch, A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb. Ecol.* **2011**, *62*, 188–197.
- (55) Hirschfeld, D. J. Soil fertility and vine nutrition. In *Cropping in Vineyards. A Grower's Handbook*. UCANR Publications; **1998**; pp 61–68.
- (56) Bokulich, N. A.; Thorngate, J. H.; Richardson, P. M.; Mills, D. A. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 139–148.
- (57) Bourguignon, C. *Le sol, la terre et les champs. Sang de la Terre*; **1995**; pp 221.
- (58) Huglin, P.; Schneider, C. *Biologie et écologie de la vigne. Lavoisier Tec et Doc, Paris*; **1998**; pp 371.
- (59) Cordeau, J. L'influence du porte-greffe sur le comportement de la vigne. Feret, Bordeaux. In *Création d'un vignoble : greffage de la vigne et porte-greffes, élimination des maladies à virus*; **1998**; pp 83–90.
- (60) Stines, P.; Grubb, J.; Gockowiak, H.; Henschke, P. A.; Hoj, P. B.; Heeswijck, R. Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 150–158.
- (61) Tomasi, N.; Monte, R.; Varanini, Z.; Cesco, S.; Pinton, R. Induction of nitrate uptake in Sauvignon blanc and Chardonnay grapevines depends on the scion and is affected by the rootstock. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, *21*, 331–338.
- (62) Peyrot Des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc grapes by assaying S-cysteine conjugates, precursors of the volatile thiols responsible for their varietal aroma. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3387–3391.
- (63) Mateo, J. J.; Jiménez, M. Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 557–567.
- (64) Luan, F.; Hampel, D.; Mosandl, A.; Wüst, M. Enantioselective analysis of free and glycosidically bound monoterpene polyols in *Vitis vinifera* L. C. vs Morio Muscat and Muscat Ottonel: evidence for an oxidative monoterpene metabolism in grapes. *J. Agric.*

Food Chem. **2004**, *52*, 2036–2041.

- (65) Guillaumie, S.; Ilg, A.; Réty, S.; Brette, M.; Trossat-Magnin, C.; Decroocq, S.; Léon, C.; Keime, C.; Ye, T.; Baltenweck-Guyot, R.; Claudel, P.; Bordenave, L.; Vanbrabant, S.; Duchêne, E.; Delrot, S.; Darriet, P.; Hugueney, P.; Gomès, E. Genetic analysis of the biosynthesis of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, a major grape-derived aroma compound impacting wine quality. *Plant Physiol.* **2013**, *162*, 604–615.
- (66) Ribéreau-Gayon, J.; Peynaud, E. *Traité d'oenologie. Paris et Liège*; **1960**; pp 753.
- (67) Ryona, I.; Pan, B. S.; Intrigliolo, D. S.; Lakso, A. N.; Sacks, G. L. Effects of cluster light exposure on 3-isobutyl-2-methoxypyrazine accumulation and degradation patterns in red wine grapes (*Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Franc). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10838–10846.
- (68) Gregan, S. M.; Wargent, J. J.; Liu, L.; Shinkle, J.; Hofmann, R.; Winefield, C.; Trought, M.; Jordan, B. Effects of solar ultraviolet radiation and canopy manipulation on the biochemical composition of Sauvignon blanc grapes. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2012**, *18*, 227–238.
- (69) Šuklje, K.; Lisjak, K.; Baša Česnik, H.; Janeš, L.; Du Toit, W.; Coetzee, Z.; Vanzo, A.; Deloire, A. Classification of grape berries according to diameter and total soluble solids to study the effect of light and temperature on methoxypyrazine, glutathione, and hydroxycinnamate evolution during ripening of Sauvignon blanc (*Vitis vinifera* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 9454–9461.
- (70) Bell, S. J.; Henschke, P. A. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 242–295.
- (71) van Leeuwen, C.; Friant, P.; Soyer, J. P.; Molot, C.; Choné, X.; Dubourdieu, D. L'intérêt du dosage de l'azote total et de l'azote assimilable dans le mût comme indicateur de la nutrition azotée de la vigne. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2000**, *34*, 75–82.
- (72) Reynard, J. S.; Zufferey, V.; Nicol, G. C.; Murisier, F. Soil parameters impact the vine-fruit-wine continuum by altering vine nitrogen status. *J. Int. Des Sci. La Vigne Du Vin* **2012**, *45*, 211–221.
- (73) Schreiner, R. P.; Lee, J.; Skinkis, P. A. N, P, and K supply to Pinot noir grapevines: impact on vine nutrient status, growth, physiology, and yield. *Am. J. Enol. Vitic.* **2012**, *64*, 26–38.
- (74) Schreiner, R. P.; Scagel, C. F.; Baham, J. Nutrient uptake and distribution in a mature "Pinot noir" vineyard. *HortScience* **2006**, *41*, 336–345.
- (75) Delas, J. *Fertilisation de la vigne (2ème édition). Feret, Bordeaux*; **2010**; pp 166.

- (76) Stevenson, F. J.; Cole, M. A. *Cycles of soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*. Wiley; **1999**; pp 448.
- (77) Chaussod, R. La qualité biologique des sols : évaluation et implications. *Etude Gest. des Sols* **1996**, *3*, 261–278.
- (78) Spring, J.-L. Influence du type d'enherbement sur le comportement de la vigne et la qualité des vins. Résultats d'un essai sur Chasselas dans le bassin lemanique. 1. Résultats agronomiques. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic.* **2001**, *33*, 253–262.
- (79) van Leeuwen, C.; Friant, P. Les méthodes d'estimation de l'alimentation azotée de la vigne et des raisins au vignoble : État de l'art. *Colloq. IFV Sud-Ouest* **2011**, 18–23.
- (80) Zapataa, C.; Deléensb, E.; Chaillouc, S.; Magnéd, C. Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J. Plant Physiol.* **2004**, *161*, 1031–1040.
- (81) Masclaux-Daubresse, C.; Daniel-Vedele, F.; Dechorgnat, J.; Chardon, F.; Gaufichon, L.; Suzuki, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* **2010**, *105*, 1141–1157.
- (82) Wermelinger, B. Nitrogen dynamics in grapevine: physiology and modeling. *Proceeding International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*. **1991**, pp 23–31.
- (83) Conradie, W. J. Seasonal uptake of nutrients by Chenin blanc in sand culture : I. Nitrogen. *South African J. Enol. Vitic.* **1980**, *1*, 59–65.
- (84) Schreiner, R. P. Spatial and temporal variation of roots, arbuscular mycorrhizal fungi, and plant and soil nutrients in a mature Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) vineyard in Oregon, USA. *Plant Soil* **2005**, *276*, 219–234.
- (85) Goutouly, J.-P. L'azote chez la vigne : dynamique des besoins, de l'assimilation, du stockage et de la redistribution vers les fruits. *Colloq. IFV Sud-Ouest* **2011**, 4–8.
- (86) Keller, M.; Kummer, M.; Vasconcelos, M. C. Reproductive growth of grapevines in response to nitrogen supply and rootstock. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2001**, *7*, 12–18.
- (87) Loulakakis, K. A.; Morot-Gaudry, J. F.; Velanis, C. N.; Skopelitis, D. S.; Moschou, P. N.; Hirel, B.; Roubelakis-Angelakis, K. A. Advancements in nitrogen metabolism in grapevine. In *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Springer; **2009**; pp 161–205.
- (88) Keller, M. The science of grapevines: anatomy and physiology. *Academic Press/Elsevier*. **2010**, pp 1–491.

- (89) Masclaux-Daubresse, C.; Valadier, M. H.; Carrayol, E.; Reisdorf-Cren, M.; Hirel, B. Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. *Plant, Cell Environ.* **2002**, *25*, 1451–1462.
- (90) Ortiz-Ramirez, C.; Mora, S. I.; Trejo, J.; Pantoja, O. PvAMT1;1, a highly selective ammonium transporter that functions as H⁺/NH₄⁺ symporter. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 31113–31122.
- (91) Lea, P.; Ireland, R. Nitrogen metabolism in higher plants. In *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. B. Singh; **1999**; pp 1–47.
- (92) Kliewer, W. M. Annual cyclic changes in the concentration of free amino acids in grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1967**, *18*, 126–137.
- (93) Conradie, W. J. Timing of nitrogen fertilisation and the effect of poultry manure on the performance of grapevines on sandy soil. I. Soil analysis , grape yield and vegetative growth. *S. Afr. J. Enol. Vitic* **2001**, *22*, 53–59.
- (94) Hilbert, G.; Soyer, J. P.; Molot, C.; Giraudon, J.; Milin, S.; Gaudillere, J. P. Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot. *Vitis* **2003**, *42*, 69–76.
- (95) Zerihun, A.; Treeby, M. T. Biomass distribution and nitrate assimilation in response to N supply for *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon on five *Vitis* rootstock genotypes. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2002**, *8*, 157–162.
- (96) Peacock, B.; Christensen, P.; Hirschfeldt, D. *Best management practices for nitrogen fertilization of grapevines. Tulare County UCCE, Pub NG4-96*; **1991**, *20*, 1-6.
- (97) Conradie, W. J. Partitioning of mineral nutrients and timing of fertilizer applications for optimum efficiency. In *Proceedings of the soil environment and vine mineral nutrition symposium, San Diego, California, USA*; **2004**; pp 69–81.
- (98) Martínez-Lüscher, J.; Torres, N.; Hilbert, G.; Richard, T.; Sánchez-Díaz, M.; Delrot, S.; Aguirreola, J.; Pascual, I.; Gomès, E. Ultraviolet-B radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries. *Phytochemistry* **2014**, *102*, 106–114.
- (99) Keller, M.; Hrazdina, G. Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 341–349.
- (100) Rodriguez-Lovelle, B. G.; Gaudillere, J. P. Carbon and nitrogen partitioning in either fruiting or non fruiting grapevines: effects of nitrogen limitation before and after

- veraison. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2002**, *8*, 86–94.
- (101) Lasa, B.; Menendez, S.; Sagastizabal, K.; Cervantes, M. E. C.; Irigoyen, I.; Muro, J.; Aparicio-Tejo, P. M.; Ariz, I. Foliar application of urea to “Sauvignon blanc” and “Merlot” vines: doses and time of application. *Plant Growth Regul.* **2012**, *67*, 73–81.
- (102) Berdin, G. *Autour d'une bouteille avec Denis Dubourdieu: L'oenologie dans tous ses états.*; **2012**; pp 128.
- (103) Swiegers, J. H.; Pretorius, I. S. Yeast modulation of wine flavor. *Adv. Appl. Microbiol.* **2005**, *57*, 131–175.
- (104) Bayonove, C.; Cordonnier, R.; Dubois, P. Study of an aromatic characteristic fraction of Cabernet-Sauvignon grape variety, identification of 2-methoxy-3-isobutyl-pyrazine. *Comptes rendus Hebd. des séances l'académie des Sci. série D.* **1975**, *281*, 75–78.
- (105) Siebert, T. E.; Wood, C.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P. Determination of rotundone, the pepper aroma impact compound, in grapes and wine. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3745–3748.
- (106) Buttery, R. G.; Seifert, R. M.; Guadagni, D. G.; Ling, L. C. Characterization of some volatile constituents of bell peppers. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *17*, 1322–1327.
- (107) Murray, K. E.; Whitfield, F. B. The occurrence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **1975**, *26*, 973–986.
- (108) Calo, A.; Di Stefano, R.; Costacurta, A.; Calo, G. Caratterizzazione di “Cabernet franc” e “Carmenère” (*Vitis* sp.) e chiarimenti sulla loro coltura in Italia. *Riv. Vitic. Enol* **1991**, *3*, 3–25.
- (109) Hashizume, K.; Tozawa, K.; Endo, M.; Aramaki, I. S-Adenosyl-L-methionine-dependent O-methylation of 2-hydroxy-3-alkylpyrazine in wine grapes: a putative final step of methoxypyrazine biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 795–801.
- (110) Belancic, A.; Agosin, E. Methoxypyrazines in grapes and wines of *Vitis vinifera* cv. Carmenere. *Am. J. Enol. Vitic.* **2007**, *58*, 462–469.
- (111) Roujou de Boubée, D.; van Leeuwen, C.; Dubourdieu, D. Organoleptic impact of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine on red bordeaux and loire wines. Effect of environmental conditions on concentrations in grapes during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4830–4834.
- (112) Sidhu, D.; Lund, J.; Kotseridis, Y.; Saucier, C. Methoxypyrazine analysis and influence of viticultural and enological procedures on their levels in grapes, musts, and wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**, *55*, 485–502.

- (113) Lacey, M. J.; Allen, M. S.; Harris, R. L. N.; Brown, W. V. Methoxypyrazines in Sauvignon blanc grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 103–108.
- (114) Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Boyd, S. Determination of methoxypyrazines in red wines by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1734–1738.
- (115) Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Harris, R. L. N.; Vance, B. W. Contribution of methoxypyrazines to Sauvignon blanc wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 109–112.
- (116) Parr, W. V.; Green, J. A.; White, K. G.; Sherlock, R. R. The distinctive flavour of New Zealand Sauvignon blanc: sensory characterisation by wine professionals. *Food Qual. Prefer.* **2007**, *18*, 849–861.
- (117) Seifert, R. M.; Buttery, R. G.; Guadagni, D. G.; Black, D. R.; Harris, J. G. Synthesis of some 2-methoxy-3-alkylpyrazines with strong bell pepper-like odors. *J. Agric. Food Chem.* **1970**, *18*, 246–249.
- (118) Harris, S. A.; Ryona, I.; Sacks, G. L. Behavior of 3-isobutyl-2-hydroxypyrazine (IBHP), a key intermediate in 3-isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP) metabolism, in ripening wine grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11901–11908.
- (119) Murray, K. E.; Shipton, J.; Whitfield, F. B. 2-methoxypyrazines and the flavour of green peas (*Pisum sativum*). *Chem. Ind.* **1970**, *27*, 897–898.
- (120) Gallois, A.; Kergomard, A.; Adda, J. Study of the biosynthesis of 3-isopropyl-2-methoxypyrazine produced by *Pseudomonas taetrolens*. *Food Chem.* **1988**, *28*, 299–309.
- (121) Leete, E.; Bjorklund, J.; Reineccuis, G.; Cheny, T. Biosynthesis of 3-isopropyl-2-methoxypyrazine and other alkyl pyrazines: widely distributed flavour compounds. In *Patterson RLS, Charlwood BV, MacLeod G, Williams AA (eds) Bioformation of flavours. The Royal Society of Chemistry, Cambridge; 1992*; pp 75–95.
- (122) Hashizume, K.; Tozawa, K.; Hiraga, Y.; Aramaki, I. Purification and characterization of a *O*-methyltransferase capable of methylating 2-hydroxy-3-alkylpyrazine from *Vitis vinifera* L. (cv. Cabernet-Sauvignon). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 2213–2219.
- (123) Ryona, I.; Leclerc, S.; Sacks, G. L. Correlation of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine to 3-isobutyl-2-hydroxypyrazine during maturation of bell pepper (*Capsicum annuum*) and wine grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9723–9730.
- (124) Noble, A. C.; Eliotte, D. F.; Allen, M. S. Vegetative flavor and methoxypyrazines in Cabernet-Sauvignon. *Fruit Flavors* **1995**, *596*, 226.

- (125) Ryona, I.; Bruce, S. P.; Gavin, L. S. Rapid measurement of 3-alkyl-2-methoxypyrazine content of winegrapes to predict levels in resultant wines. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8250–8257.
- (126) Mendez-Costabel, M. P.; Wilkinson, K. L.; Bastian, S. E. P.; Jordans, C.; McCarthy, M.; Ford, C. M.; Dokoozlian, N. K. Effect of increased irrigation and additional nitrogen fertilisation on the concentration of green aroma compounds in *Vitis vinifera* L. Merlot fruit and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2014**, *20*, 80–90.
- (127) Roujou de Boubée, D.; Cumsille, A. M.; Pons, M.; Dubourdieu, D. Location of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet-Sauvignon grape bunches and its extractability during vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 1–5.
- (128) Koch, A.; Doyle, C. L.; Matthews, M. A.; Williams, L. E.; Ebeler, S. E. 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and its dependence on genotype. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 2190–2198.
- (129) Lund, S. T.; Bohlmann, J. The molecular basis for wine grape quality—a volatile subject. *Science (80)*. **2006**, *311*, 804–805.
- (130) Moreira, N.; Mendes, F.; Pereira, O.; Guedes de Pinho, P.; Hogg, T.; Vasconcelos, I. Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 157–167.
- (131) Coetzee, C.; Du Toit, W. J. A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Res. Int.* **2012**, *45*, 287–298.
- (132) Darriet, P.; Tominaga, T.; Demole, E.; Dubourdieu, D. Mise en évidence dans le raisin de *Vitis Vinifera* J. (var. Sauvignon) d'un précurseur de la 4-méthyl-4-mercaptopentan-2-one. *Comptes rendus l'Académie des Sci. Série 3, Sci. la vie* **1993**, *316*, 1332–1335.
- (133) Darriet, P.; Tominaga, T.; Lavigne, V.; Boidron, J.-N.; Dubourdieu, D. Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragr. J.* **1995**, *10*, 385–392.
- (134) Tominaga, T.; Dubourdieu, D. Identification of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one from the box tree (*Buxus sempervirens* L.) and broom (*Sarothamnus scoparius* (L.) Koch.). *Flavour Fragr. J.* **1997**, *12*, 373–376.
- (135) Tominaga, T.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. Identification de l'acetate de 3-mercaptohexanol, composé à forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon. *Vitis* **1996**, *35*, 207–210.
- (136) Peyrot Des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must

- from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4076–4079.
- (137) Tominaga, T.; Furrer, A.; Henry, R.; Dubourdieu, D. Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour Fragr. J.* **1998**, *13*, 159–162.
- (138) Sarrazin, E.; Shinkaruk, S.; Tominaga, T.; Bennetau, B.; Frérot, E.; Dubourdieu, D. Odorous impact of volatile thiols on the aroma of young botrytized sweet wines: Identification and quantification of new sulfanyl alcohols. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1437–1444.
- (139) Tominaga, T.; Baltenweck-Guyot, R.; Peyrot Des Gachons, C.; Dubourdieu, D. Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 178–181.
- (140) Murat, M. L.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. Assessing the aromatic potential of Cabernet-Sauvignon and Merlot musts used to produce rose wine by assaying the cysteinylated precursor of 3-mercaptohexan-1-ol. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5412–5417.
- (141) Blanchard, L.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine: Impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, *55*, 115–120.
- (142) Tominaga, T.; Niclass, Y.; Frérot, E.; Dubourdieu, D. Stereoisomeric distribution of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in dry and sweet white wines made from *Vitis vinifera* (var. Sauvignon blanc and Semillon). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7251–7255.
- (143) Peynaud, É. *Le goût du vin. Paris, France: Dunod; 1989*; pp 239.
- (144) Tominaga, T.; Peyrot Des Gachons, C.; Dubourdieu, D. A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc: *S*-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5215–5219.
- (145) Thibon, C.; Shinkaruk, S.; Jourdes, M.; Bennetau, B.; Dubourdieu, D.; Tominaga, T. Aromatic potential of botrytized white wine grapes: identification and quantification of new cysteine-*S*-conjugate flavor precursors. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *660*, 190–196.
- (146) Fedrizzi, B.; Pardon, K. H.; Sefton, M. A.; Elsey, G. M.; Jeffery, D. W. First identification of 4-*S*-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon blanc juice. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 991–995.
- (147) Roland, A. Influence des phénomènes d'oxydation lors de l'élaboration des moûts sur la qualité aromatique des vins de Melon B. et de Sauvignon blanc en Val de Loire

(Doctoral dissertation, Montpellier, SupAgro), **2010**, pp 219.

- (148) Kobayashi, H.; Takase, H.; Kaneko, K.; Tanzawa, F.; Takata, R.; Suzuki, S.; Konno, T. Analysis of *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathione and *S*-3-(hexan-1-ol)-l-cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, *2*, 176–185.
- (149) Thibon, C.; Cluzet, S.; Mérillon, J. M.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. 3-Sulfanylhexanol precursor biogenesis in grapevine cells: the stimulating effect of *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1344–1351.
- (150) Capone, D. L.; Pardon, K. H.; Cordente, A. G.; Jeffery, D. W. Identification and quantitation of 3-*S*-cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3MH) in Sauvignon blanc grape juice by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 11204–11210.
- (151) Kobayashi, H.; Takase, H.; Suzuki, Y.; Tanzawa, F.; Takata, R.; Fujita, K.; Kohno, M.; Mochizuki, M.; Suzuki, S.; Konno, T. Environmental stress enhances biosynthesis of flavor precursors, *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathione and *S*-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine, in grapevine through glutathione *S*-transferase activation. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 1325–1336.
- (152) Tominaga, T.; Masneuf, I.; Dubourdieu, D. Mise en évidence d'un *S*-conjugué de la cysteine, précurseur d'arôme du Sauvignon [4-méthyl-4-mercaptopentan-2-one; beta-lyase]. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1995**.
- (153) Howell, K. S.; Swiegers, J. H.; Elsey, G. M.; Siebert, T. E.; Bartowsky, E. J.; Fleet, G. H.; Pretorius, I. S.; De Barros Lopes, M. A. Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *240*, 125–129.
- (154) Capone, D. L.; Sefton, M. A.; Hayasaka, Y.; Jeffery, D. W. Analysis of precursors to wine odorant 3-mercaptohexan-1-ol using HPLC-MS/MS: resolution and quantitation of diastereomers of 3-*S*-cysteinylhexan-1-ol and 3-*S*-glutathionylhexan-1-ol. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1390–1395.
- (155) Grant-Preece, P. A.; Pardon, K. H.; Capone, D. L.; Cordente, A. G.; Sefton, M. A.; Jeffery, D. W.; Elsey, G. M. Synthesis of wine thiol conjugates and labeled analogues: fermentation of the glutathione conjugate of 3-mercaptohexan-1-ol yields the corresponding cysteine conjugate and free thiol. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1383–1389.
- (156) Roland, A.; Vialaret, J.; Razungles, A.; Rigou, P.; Schneider, R. Evolution of *S*-cysteinylated and *S*-glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4406–4413.
- (157) Winter, G.; van Der Westhuizen, T.; Higgins, V. J.; Curtin, C.; Ugliano, M. Contribution of cysteine and glutathione conjugates to the formation of the volatile thiols 3-

- mercaptohexan-1-ol (3MH) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2011**, *17*, 285–290.
- (158) Subileau, M.; Schneider, R.; Salmon, J.-M.; Degryse, E. New insights on 3-mercaptohexanol (3MH) biogenesis in Sauvignon blanc wines: Cys-3MH and (E)-hexen-2-al are not the major precursors. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9230–9235.
- (159) Ganguli, D.; Kumar, C.; Bachhawat, A. K. The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **2007**, *175*, 1137–1151.
- (160) Cerreti, M.; Esti, M.; Benucci, I.; Liburdi, K.; De Simone, C.; Ferranti, P. Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during grape ripening of *Vitis vinifera* L. cvs Grechetto, Malvasia del Lazio and Sauvignon blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, *21*, 411–416.
- (161) Choné, X.; Lavigne-Cruège, V.; Tominaga, T.; van Leeuwen, C.; Castagnède, C.; Saucier, C.; Dubourdieu, D. Effect of vine nitrogen status on grape aromatic potential: flavor precursors (S-cysteine conjugates), glutathione and phenolic content in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc grape juice. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2006**, *40*, 1–6.
- (162) Dagan, L. Potentiel aromatique des raisins de *Vitis Vinifera* L. cv. Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne. Thèse de doctorat. Université Montpellier II, **2006**, pp 238.
- (163) Thibon, C.; Shinkaruk, S.; Tominaga, T.; Bennetau, B.; Dubourdieu, D. Analysis of the diastereoisomers of the cysteinylated aroma precursor of 3-sulfanylhexanol in *Vitis vinifera* grape must by gas chromatography coupled with ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1183*, 150–157.
- (164) Ugliano, M.; Kwiatkowski, M.; Vidal, S.; Capone, D.; Siebert, T.; Dieval, J. B.; Aagaard, O.; Waters, E. J. Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2564–2572.
- (165) Schüttler, A. Influencing factors on aromatic typicality of wines from *Vitis vinifera* L. cv. Riesling—sensory, chemical and viticultural insights. Doctoral dissertation, Bordeaux 2, **2012**, pp 262.
- (166) Capone, D. L.; Black, C. A.; Jeffery, D. W. Effects on 3-mercaptohexan-1-ol precursor concentrations from prolonged storage of Sauvignon blanc grapes prior to crushing and pressing. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 3515–3523.
- (167) Singleton, V. L.; Zaya, J.; Trousdale, E. White table wine quality and polyphenol composition as affected by must SO₂ content and pomace contact time. *Am. J. Enol.*

- Vitic.* **1980**, *31*, 14–20.
- (168) Marais, J. Effect of grape temperature, oxidation and skin contact on Sauvignon blanc juice and wine composition and wine quality. *South African J. Enol. Vitic. Stellenbosch* **1998**, *19*, 10–16.
- (169) Schneider, V. Must Hyperoxidation: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 65–73.
- (170) Dubernet, M.; Ribéreau-Gayon, P. Présence et signification dans les moûts et les vins de la tyrosinase du raisin. *Conn. Vigne Vin* **1973**, *7*, 283–302.
- (171) Singleton, V. L. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, *38*, 69–77.
- (172) Ribéreau-Gayon, J.; Dubourdieu, D.; Domèche, B.; Lonvaud, A. *Traité d'oenologie-Tome 1 Microbiologie du vin Vinification*. Dunod; **2004**; pp 617.
- (173) Nikolantonaki, M.; Chichuc, I.; Teissedre, P. L.; Darriet, P. Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *660*, 102–109.
- (174) Nikolantonaki, M.; Waterhouse, A. L. A method to quantify quinone reaction rates with wine relevant. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 8484–8491.
- (175) Haisman, D. R. The effect of sulphur dioxide on oxidising enzyme systems in plant tissues. *J. Sci. Food Agric.* **1974**, *25*, 803–810.
- (176) Amano, Y.; Kubota, M.; Kagami, M. Oxygen uptake of Koshu grape must and its control. *Akkokogaku Kaishi-Journal Soc. Ferment. Technol.* **1979**, *57*, 92–101.
- (177) Sayavedra-Soto, L. A.; Montgomery, M. W. Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. *J. Food Sci.* **1986**, *51*, 1531–1536.
- (178) Anderson, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* **1998**, *111-112*, 1–14.
- (179) Li, Y.; Wei, G.; Chen, J. Glutathione: a review on biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *66*, 233–242.
- (180) Du Toit, W. J.; Marais, J.; Pretorius, I. S.; Du Toit, M. Oxygen in must and wine: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic* **2006**, *27*, 76.
- (181) Papadopoulou, D.; Roussis, I. G. Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetylcysteine. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, *43*, 1053–1057.

- (182) Cheynier, V.; Souquet, J. M.; Moutounet, M. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40*, 320–324.
- (183) Lacroux, F.; Tregoat, O.; van Leeuwen, C.; Pons, A.; Tominaga, T.; Lavigne-Cruège, V.; Dubourdieu, D. Effect of foliar nitrogen and sulphur application on aromatic expression of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* **2008**, *42*, 125–132.
- (184) Liyanage, C.; Adams, D. O. Glutathione content of grape leaves and berries at the onset of ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* **1992**, *43*, 304.
- (185) Du Toit, W. J.; Lisjak, K.; Stander, M.; Prevoo, D. Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2765–2769.
- (186) Maggu, M.; Winz, R.; Kilmartin, P. A.; Trought, M. C. T.; Nicolau, L. Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon blanc must. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10281–10288.
- (187) Lavigne, V.; Pons, A.; Dubourdieu, D. Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1139*, 130–135.
- (188) Kritzinger, E. C.; Bauer, F. F.; Du Toit, W. J. Role of glutathione in winemaking: a review. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 269–277.
- (189) Hashizume, K.; Samuta, T. Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 194–198.
- (190) Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J.; Zamora, F. Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from the *Vitis vinifera* variety Cabernet-Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3492–3497.
- (191) Koch, A.; Ebeler, S. E.; Williams, L. E.; Matthews, M. A. Fruit ripening in *Vitis vinifera*: light intensity before and not during ripening determines the concentration of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet-Sauvignon berries. *Physiol. Plant.* **2012**, *145*, 275–285.
- (192) Kotseridis, Y.; Anocibar Beloqui, A.; Bayonove, C.; Baumes, R. L.; Bertrand, A. Effects of selected viticultural and enological factors on levels of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in wines. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1999**, *33*, 19–24.
- (193) Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J.; Zamora, F. Contents of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts and wines from *Vitis vinifera* variety Cabernet-Sauvignon: influence of irrigation

- and plantation density. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 1131–1136.
- (194) Šuklje, K.; Antalick, G.; Coetzee, Z.; Schmidtke, L. M.; Baša Česnik, H.; Brandt, J.; Du Toit, W. J.; Lisjak, K.; Deloire, A. Effect of leaf removal and ultraviolet radiation on the composition and sensory perception of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2014**, *20*, 223–233.
- (195) Maga, J. A.; Katzb, I. Pyrazines in foods: an update. *Food Sci. Nutr.* **1982**, *16*, 1–48.
- (196) Ebeler, S. E.; Thorngate, J. H. Wine chemistry and flavor: looking into the crystal glass. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8098–8108.
- (197) Mihara, S.; Masuda, H.; Tateba, H.; Tuda, T. Olfactive properties of 3-substituted 5-alkyl-2-methylpyrazines. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1262–1264.
- (198) Dunlevy, J. D.; Soole, K. L.; Perkins, M. V; Dennis, E. G.; Keyzers, R. A.; Kalua, C. M.; Boss, P. K. Two *O*-methyltransferases involved in the biosynthesis of methoxypyrazines: grape-derived aroma compounds important to wine flavour. *Plant Mol. Biol.* **2010**, *74*, 77–89.
- (199) Dunlevy, J. D.; Dennis, E. G.; Soole, K. L.; Perkins, M. V; Davies, C.; Boss, P. K. A methyltransferase essential for the methoxypyrazine-derived flavour of wine. *Plant J.* **2013**, *75*, 606–617.
- (200) van Leeuwen, C.; Friant, P.; Choné, X.; Tregoat, O.; Koundouras, S.; Dubourdieu, D. Influence of climate, soil, and cultivar on terroir. *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, *55*, 207–217.
- (201) Sala, C.; Busto, O.; Guascha, J.; Zamora, F. Factors affecting the presence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grapes and wines: A review. *red* **2004**, *57*, 1–8.
- (202) Scheiner, J. J.; Sacks, G. L.; Pan, B.; Ennahli, S.; Tarlton, L.; Wise, A.; Lerch, S. D.; Heuvel, J. E. V. Impact of severity and timing of basal leaf removal on 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine concentrations in red winegrapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, *61*, 358–364.
- (203) Soubeyrand, E.; Basteau, C.; Hilbert, G.; van Leeuwen, C.; Delrot, S.; Gomès, E. Nitrogen supply affects anthocyanin biosynthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet-Sauvignon berries. *Phytochemistry* **2014**, *103*, 38–49.
- (204) Vidal, E. A.; Gutiérrez, R. A. A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2008**, *11*, 521–529.
- (205) Scheible, W.; Morcuende, R.; Czechowski, T.; Fritz, C.; Osuna, D.; Palacios-rojas, N.; Schindelasch, D.; Thimm, O.; Udvardi, M. K.; Stitt, M.; et al. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular

- growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol.* **2004**, *136*, 2483–2499.
- (206) Hoffman, M.; Xing, X.; Wang, R.; Tischner, R.; Gutie, R. A.; Chen, M.; Coruzzi, G.; Crawford, N. M. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2004**, *136*, 2512–2522.
- (207) Scholander, P. F.; Hammel, H. T.; Hemmingsen, E. A.; Bradstreet, E. D. Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1964**, *52*, 119–125.
- (208) Scholander, P. F.; Bradstreet, E. D.; Hemmingsen, E. A.; Hammel, H. T. Sap pressure in vascular plants. *Science (80)*. **1965**, *149*, 339–346.
- (209) Mabrouk, H.; Carbonneau, A. Une méthode simple de détermination de la surface foliaire de la vigne (*Vitis vinifera* L.). *Progrès Agric. Vitic.* **1996**, *113*, 392–398.
- (210) Larson-Powers, N.; Pangborn, R. M. Descriptive analysis of the sensory properties of beverages and gelatins containing sucrose or synthetic sweeteners. *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 47–51.
- (211) Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M. P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres. *J. Chromatogr. A* **2000**, *880*, 93–99.
- (212) Reid, K. E.; Olsson, N.; Schlosser, J.; Peng, F.; Lund, S. T. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* **2006**, *6*, 27.
- (213) Nielsen, G. H.; Nielsen, D.; Bowen, P.; Bogdanoff, C.; Usher, K. Effect of timing, rate, and form of N fertilization on nutrition, vigor, yield, and berry yeast-assimilable N of grape. *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, *61*, 327–336.
- (214) Portu, J.; López-Alfaro, I.; Gómez-Alonso, S.; López, R.; Garde-Cerdán, T. Changes on grape phenolic composition induced by grapevine foliar applications of phenylalanine and urea. *Food Chem.* **2015**, *180*, 171–180.
- (215) Garde-Cerdán, T.; Santamaría, P.; Rubio-Bretón, P.; González-Arenzana, L.; López-Alfaro, I.; López, R. Foliar application of proline, phenylalanine, and urea to Tempranillo vines: effect on grape volatile composition and comparison with the use of commercial nitrogen fertilizers. *LWT - Food Sci. Technol.* **2015**, *60*, 684–689.
- (216) Peña-Gallego, A.; Hernández-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V. S-Cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors in grapes. A review. *Food Chem.* **2012**, *131*, 1–13.

- (217) Coetzee, C.; Brand, J.; Emerton, G.; Jacobson, D.; Silva Ferreira, A. C.; Du Toit, W. J. Sensory interaction between 3-mercaptohexan-1-ol, 3-isobutyl-2-methoxypyrazine and oxidation-related compounds. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, *21*, 179–188.
- (218) Park, S. K.; Morrison, J. C.; Adams, D. O.; Noble, A. C. Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes in the skin and mesocarp of Muscat of Alexandria grapes during development. *J. Agric. Food Chem* **1991**, *39*, 514–518.
- (219) Williams, P. J.; Strauss, C. R.; Wilson, B.; Massy-Westropp, R. A. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2013–2020.
- (220) Williams, P. J.; Strauss, C. R.; Wilson, B.; Massy-Westropp, R. a. Use of C18 reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoid precursors from grape juice and wines. *J. Chromatogr.* **1982**, *235*, 471–480.
- (221) Dimitriadis, E.; Williams, P. J. The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavorants of grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1984**, *35*, 66–71.
- (222) Gunata, Y. Z.; Bayonove, C. L.; Baumes, R. L.; Cordonnier, R. E. The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr. A* **1985**, *331*, 83–90.
- (223) Goniak, J.; Noble, A. C. Sensory study of selected volatile sulfur compounds in white wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, *38*, 223–227.
- (224) González-Barreiro, C.; Rial-Otero, R.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. Wine aroma compounds in grapes: a critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**, *55*, 202–218.
- (225) Swiegers, J. H.; Pretorius, I. S. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 954–960.
- (226) Francis, I. L.; Newton, J. L. Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 114–126.
- (227) Mueller, M. J. Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2004**, *7*, 441–448.
- (228) Kishimoto, K.; Matsui, K.; Ozawa, R.; Takabayashi, J. Volatile C6-aldehydes and allo-cimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **2005**, *46*, 1093–1102.
- (229) Peyrot Des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. Localization of S-cysteine conjugates in the berry: effect of skin contact on aromatic potential of *Vitis vinifera* L.

- cv. Sauvignon blanc must. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 144–146.
- (230) Destrac, A.; Flutre, T.; Renaud, C.; Morin, E.; Durand, L.; Delrot, S.; van Leeuwen, C. The use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy in phenotyping berries from the grapevine *Vitis vinifera* L. In *XIXth International Giesco meeting, Pech Rouge - Montpellier, France*; **2015**; pp 641–645.
- (231) Tominaga, T.; Murat, M.-L.; Dubourdieu, D. Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1044–1048.
- (232) Kim, D.; Pertea, G.; Trapnell, C.; Pimentel, H.; Kelley, R.; Salzberg, S. L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **2013**, *14*, 36.
- (233) Langmead, B.; Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–359.
- (234) Anders, S.; Pyl, P.; Huber, W. HTSeq - A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 166–169.
- (235) Anders, S.; Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **2010**, *11*, 106.
- (236) Love, M. I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2. *Genome Biol* **2014**, *15*, 550.
- (237) Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society.* **1995**, pp 289–300.
- (238) Thimm, O.; Bläsing, O.; Gibon, Y.; Nagel, A.; Meyer, S.; Krüger, P.; Selbig, J.; Müller, L. A.; Rhee, S. Y.; Stitt, M. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* **2004**, *37*, 914–939.
- (239) Roland, A.; Schneider, R.; Le Guernevé, C.; Razungles, A.; Cavelier, F. Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chem.* **2010**, *121*, 847–855.
- (240) Schneider, R.; Charrier, F.; Razungles, A.; Baumes, R. Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 58–64.

- (241) Harsch, M. J.; Gardner, R. C. Yeast genes involved in sulfur and nitrogen metabolism affect the production of volatile thiols from Sauvignon blanc musts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 223–235.
- (242) Jiang, H.-W.; Liu, M.-J.; Chen, I.-C.; Huang, C.-H.; Chao, L.-Y.; Hsieh, H.-L. A glutathione S-transferase regulated by light and hormones participates in the modulation of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 1646–1658.
- (243) Feussner, I.; Wasternack, C. The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53*, 275–297.
- (244) Davoine, C.; Falletti, O.; Douki, T.; Iacazio, G.; Ennar, N.; Montillet, J.-L.; Triantaphylidès, C. Adducts of oxylipin electrophiles to glutathione reflect a 13 specificity of the downstream lipoxygenase pathway in the tobacco hypersensitive response. *Plant Physiol.* **2006**, *140*, 1484–1493.
- (245) Dixon, D. P.; Edwards, R. Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 21249–21256.
- (246) Koh, S.; Wiles, A. M.; Sharp, J. S.; Naider, F. R.; Becker, J. M.; Stacey, G. An oligopeptide transporter gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2002**, *128*, 21–29.
- (247) Cao, J.; Huang, J.; Yang, Y.; Hu, X. Analyses of the oligopeptide transporter gene family in poplar and grape. *BMC Genomics* **2011**, *12*, 465.
- (248) Stacey, M. G.; Patel, A.; McClain, W. E.; Mathieu, M.; Remley, M.; Rogers, E. E.; Gassmann, W.; Blevins, D. G.; Stacey, G. The *Arabidopsis* AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. *Plant Physiol.* **2008**, *146*, 589–601.
- (249) Cagnac, O.; Bourbonloux, A.; Chakrabarty, D.; Zhang, M.-Y.; Delrot, S. AtOPT6 transports glutathione derivatives and is induced by primisulfuron. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1378–1387.
- (250) Pike, S.; Patel, A.; Stacey, G.; Gassmann, W. *Arabidopsis* OPT6 is an oligopeptide transporter with exceptionally broad substrate specificity. *Plant Cell Physiol.* **2009**, *50*, 1923–1932.
- (251) Bogs, J.; Bourbonloux, A.; Cagnac, O.; Wachter, A.; Rausch, T.; Delrot, S. Functional characterization and expression analysis of a glutathione transporter, BjGT1, from *Brassica juncea*: evidence for regulation by heavy metal exposure. *Plant, Cell Environ.* **2003**, *26*, 1703–1711.
- (252) Zhang, M.-Y.; Bourbonloux, A.; Cagnac, O.; Srikanth, C. V.; Rentsch, D.; Bachhawat, A. K.; Delrot, S. A novel family of transporters mediating the transport of glutathione

- derivatives in plants. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 482–491.
- (253) Kobayashi, H.; Matsuyama, S.; Takase, H.; Sasaki, K.; Suzuki, S.; Takata, R.; Saito, H. Impact of harvest timing on the concentration of 3-mercaptohexan-1-ol precursors in *Vitis vinifera* berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2012**, *63*, 544–548.
- (254) Seguin, G. Alimentation en eau de la vigne et composition chimique des moûts dans les Grands Crus du Médoc. Phénomènes de régulation. *Conn. Vigne Vin* **1975**, *1*, 23–34.
- (255) Falcetti, M. Le Terroir. Qu'est-ce qu'un Terroir? Pourquoi l'étudier? Pourquoi l'enseigner? *Bull. OIV 67 (757-758)*. **1994**, pp 246–275.
- (256) Reynolds, A. G.; Lowrey, W. D.; Tomek, L.; Hakimi, J.; De Savigny, C. Influence of irrigation on vine performance, fruit composition, and wine quality of Chardonnay in a cool, humid climate. *Am. J. Enol. Vitic.* **2007**, *58*, 217–228.
- (257) Choné, X.; van Leeuwen, C.; Chéry, P.; Ribéreau-Gayon, P. Terroir influence on water status and nitrogen status of non-irrigated Cabernet-Sauvignon (*Vitis vinifera*). vegetative development, must and wine composition (example of a Medoc top estate vineyard, Saint Julien area, Bordeaux, 1997). *South African J. Enol. Vitic.* **2001**, *22*, 8–15.
- (258) Cahurel, J.-Y. Influence de la fumure potassique sur le sol, la vigne et le vin en sol granitique. In *Proceedings of the XVth International GESCO meeting*; **2007**; pp 310–321.
- (259) Maigre, D. Comportement du Pinot noir en présence d'enherbement permanent et influence de la fumure azotée. 2. Résultats analytiques et organoleptiques. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic.* **2002**, *34*, 239–244.
- (260) Gaudillère, J.-P.; van Leeuwen, C.; Ollat, N. Carbon isotope composition of sugars in grapevine, an integrated indicator of vineyard water status. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 757–763.
- (261) Navarro, S.; León, M.; Roca-Pérez, L.; Boluda, R.; García-Ferriz, L.; Pérez-Bermúdez, P.; Gavidia, I. Characterisation of Bobal and Crujidera grape cultivars, in comparison with Tempranillo and Cabernet-Sauvignon: evolution of leaf macronutrients and berry composition during grape ripening. *Food Chem.* **2008**, *108*, 182–190.
- (262) Romero, I.; García-Escudero, E.; Martín, I. Leaf blade versus petiole analysis for nutritional diagnosis of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo. *Am. J. Enol. Vitic.* **2013**, *64*, 50–64.
- (263) Romero, I.; Garcia-Escudero, E.; Martin, I. Effects of leaf position on blade and petiole mineral nutrient concentration of Tempranillo grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, *61*, 544–550.

- (264) van Leeuwen, C.; Tregoat, O.; Choné, X.; Bois, B.; Pernet, D.; Gaudillère, J. P. Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* **2009**, *43*, 121–134.
- (265) Ollat, N.; Peccoux, A.; Papura, D.; Esmenjaud, D.; Marguerit, E.; Tandonnet, J.-P.; Bordenave, L.; Cookson, S.; Barrieu, F.; Rossdeutch, L.; et al. Rootstock as a component of adaptation to environment. In *Grapevine in a changing environment: a molecular and ecophysiological perspective*. Eds. Geros H., Chaves M., Medrzno H. and Delrot S., Wiley-Blackwell perspective, in press.; **2015**.
- (266) Spayd, S. E.; Wample, R. L.; Evans, R. G.; Stevens, R. G.; Seymour, B. J.; Nagel, C. W. Nitrogen fertilization of white Riesling grapes in Washington. Must and Wine Composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, *45*, 34–42.
- (267) Barbier, H. Recherche de marqueurs associés à la contrainte en azote et en carbone chez la vigne (*Vitis vinifera* var. Cabernet-Sauvignon). Doctoral dissertation, Bordeaux **2**, **2004**.
- (268) Lillo, C.; Lea, U. S.; Ruoff, P. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant. Cell Environ.* **2008**, *31*, 587–601.
- (269) Crété, P.; Caboche, M.; Meye, C. Nitrite reductase expression regulated at the post-transcriptional level by nitrogen source in nicotiana and *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **1997**, *11*, 625–634.
- (270) Lancien, M.; Martin, M.; Hsieh, M. H.; Leustek, T.; Goodman, H.; Coruzzi, G. M. *Arabidopsis* glt1-T mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *Plant J.* **2002**, *29*, 347–358.
- (271) Fäldt, J.; Arimura, G.; Gershenzon, J.; Takabayashi, J.; Bohlmann, J. Functional identification of AtTPS03 as (E)-beta-ocimene synthase: a monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **2003**, *216*, 745–751.
- (272) Beaudoin, F.; Wu, X.; Li, F.; Haslam, R. P.; Markham, J. E.; Zheng, H.; Napier, J. A; Kunst, L. Functional characterization of the *Arabidopsis* beta-ketoacyl-coenzyme A reductase candidates of the fatty acid elongase. *Plant Physiol.* **2009**, *150*, 1174–1191.
- (273) Owens, D. K.; Alerding, A. B.; Crosby, K. C.; Bandara, A. B.; Westwood, J. H.; Winkel, B. S. J. Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2008**, *147*, 1046–1061.
- (274) Preuß, A.; Stracke, R.; Weisshaar, B.; Hillebrecht, A.; Matern, U.; Martens, S. *Arabidopsis*

- thaliana* expresses a second functional flavonol synthase. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1981–1986.
- (275) Stracke, R.; De Vos, R. C. H.; Bartelniewoehner, L.; Ishihara, H.; Sagasser, M.; Martens, S.; Weisshaar, B. Metabolomic and genetic analyses of flavonol synthesis in *Arabidopsis thaliana* support the *in vivo* involvement of leucoanthocyanidin dioxygenase. *Planta* **2009**, *229*, 427–445.
- (276) Kuhn, B. M.; Geisler, M.; Bigler, L.; Ringli, C. Flavonols accumulate asymmetrically and affect auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2011**, *156*, 585–595.
- (277) Wisman, E.; Hartmann, U.; Sagasser, M.; Baumann, E.; Palme, K.; Hahlbrock, K.; Saedler, H.; Weisshaar, B. Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 12432–12437.
- (278) Zhu, W.; Miao, Q.; Sun, D.; Yang, G.; Wu, C.; Huang, J.; Zheng, C. The mitochondrial phosphate transporters modulate plant responses to salt stress via affecting ATP and gibberellin metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–10.
- (279) Jia, F.; Wan, X.; Zhu, W.; Sun, D.; Zheng, C.; Liu, P.; Huang, J. Overexpression of mitochondrial phosphate transporter 3 severely hampers plant development through regulating mitochondrial function in *Arabidopsis*. *PLoS One* **2015**, *10*.
- (280) Piotrowski, M.; Schönfelder, S.; Weiler, E. W. The *Arabidopsis thaliana* isogene *NIT4* and its orthologs in Tobacco encode β -Cyano-L-alanine Hydratase/Nitrilase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2616–2621.
- (281) Krouk, G.; Lacombe, B.; Bielach, A.; Perrine-Walker, F.; Malinska, K.; Mounier, E.; Hoyerova, K.; Tillard, P.; Leon, S.; Ljung, K.; et al. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev. Cell* **2010**, *18*, 927–937.
- (282) Won, C.; Shen, X.; Mashiguchi, K.; Zheng, Z.; Dai, X.; Cheng, Y.; Kasahara, H.; Kamiya, Y.; Chory, J.; Zhao, Y. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 18518–18523.
- (283) Blee, K. A.; Choi, J. W.; O'Connell, A. P.; Schuch, W.; Lewis, N. G.; Bolwell, G. P. A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 163–176.
- (284) Kanno, Y.; Hanada, A.; Chiba, Y.; Ichikawa, T.; Nakazawa, M.; Matsui, M.; Koshiha, T.; Kamiya, Y.; Seo, M. Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 9653–9658.

- (285) Wintz, H.; Fox, T.; Wu, Y. Y.; Feng, V.; Chen, W.; Chang, H. S.; Zhu, T.; Vulpe, C. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47644–47653.
- (286) Kushiro, T.; Okamoto, M.; Nakabayashi, K.; Yamagishi, K.; Kitamura, S.; Asami, T.; Hirai, N.; Koshiba, T.; Kamiya, Y.; Nambara, E. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J.* **2004**, *23*, 1647–1656.
- (287) Klepek, Y.-S.; Geiger, D.; Stadler, R.; Klebl, F.; Landouar-Arsivaud, L.; Lemoine, R.; Hedrich, R.; Sauer, N. *Arabidopsis* POLYOL TRANSPORTER 5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺-Symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *Plant Cell* **2005**, *17*, 204–218.
- (288) Reinders, A.; Panshyshyn, J. A.; Ward, J. M. Analysis of transport activity of *Arabidopsis* sugar alcohol permease homolog AtPLT5. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 1594–1602.
- (289) Tommasini, R.; Vogt, E.; Fromenteau, M.; Hörtensteiner, S.; Matile, P.; Amrhein, N.; Martinoia, E. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J.* **1998**, *13*, 773–780.
- (290) Pourcel, L.; Routaboul, J.-M.; Kerhoas, L.; Caboche, M.; Lepiniec, L.; Debeaujon, I. TRANSPARENT TESTA 10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell* **2005**, *17*, 2966–2980.
- (291) Liang, M.; Davis, E.; Gardner, D.; Cai, X.; Wu, Y. Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of *Arabidopsis*. *Planta* **2006**, *224*, 1185–1196.
- (292) Liu, L.-H.; Ludewig, U.; Gassert, B.; Frommer, W. B.; von Wirén, N. Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2003**, *133*, 1220–1228.
- (293) Yazaki, K.; Sugiyama, A.; Morita, M.; Shitan, N. Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 513–524.
- (294) Lacombe, E.; Hawkins, S.; Van Doorselaere, J.; Piquemal, J.; Goffner, D.; Poeydomenge, O.; Boudet, A. M.; Grima-Pettenati, J. Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J.* **1997**, *11*, 429–441.
- (295) Dao, T. T. H.; Linthorst, H. J. M.; Verpoorte, R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem. Rev.* **2011**, *10*, 397–412.
- (296) Chen, F.; Ro, D.; Petri, J.; Gershenzon, J.; Pichersky, E.; Tholl, D. Characterization of a

- root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1956–1966.
- (297) Tholl, D.; Chen, F.; Petri, J.; Gershenzon, J.; Pichersky, E. Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant J.* **2005**, *42*, 757–771.
- (298) May, A.; Berger, S.; Hertel, T.; Köck, M. The *Arabidopsis thaliana* phosphate starvation responsive gene *AtPPsPase1* encodes a novel type of inorganic pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2011**, *1810*, 178–185.
- (299) Roujou de Boubée, D. Recherches sur la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine dans les raisins et les vins : approches analytique, biologique et agronomique (Doctoral dissertation, Bordeaux 2), **2000**.
- (300) Mauch, F.; Dudler, R. Differential induction of distinct glutathione-*S*-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* **1993**, *102*, 1193–1201.
- (301) Wagner, U.; Edwards, R.; Dixon, D. P.; Mauch, F. Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione-*S*-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *49*, 515–532.
- (302) Edwards, R.; Dixon, D. P. Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol.* **2005**, *401*, 169–186.
- (303) Hannah, L.; Roehrdanz, P. R.; Ikegami, M.; Shepard, A. V.; Shaw, M. R.; Tabor, G.; Zhi, L.; Marquet, P. A.; Hijmans, R. J. Climate change, wine, and conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 6907–6912.
- (304) van Leeuwen, C.; Schultz, H. R.; Garcia de Cortazar-Atauri, I.; Duchêne, E.; Ollat, N.; Pieri, P.; Bois, B.; Goutouly, J.-P.; Quérol, H.; Touzard, J.-M.; et al. Why climate change will not dramatically decrease viticultural suitability in main wine-producing areas by 2050. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, E3051–E3052.