



HAL
open science

Effets de la nutrition azotée sur les baies de différentes combinaisons porte-greffe/greffon de vigne : approches agronomique, métabolomique et transcriptomique

Aude Habran

► **To cite this version:**

Aude Habran. Effets de la nutrition azotée sur les baies de différentes combinaisons porte-greffe/greffon de vigne : approches agronomique, métabolomique et transcriptomique. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0325 . tel-01599236

HAL Id: tel-01599236

<https://theses.hal.science/tel-01599236>

Submitted on 2 Oct 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

SPÉCIALITÉ

Biologie Végétale

Par Aude HABRAN

**Effets de la nutrition azotée sur les baies de différentes
combinaisons porte-greffe/greffon de Vigne:
approches agronomique, métabolomique et
transcriptomique**

Sous la direction du Pr. Serge DELROT

Soutenue le 18 décembre 2015

Membres du jury :

Mme.	CHEYNIER, Véronique	Directeur de recherche, INRA MONTPELLIER	Rapporteur
M.	SIRET, René	Enseignant-Chercheur, ESA ANGERS	Rapporteur
Mme.	GUZZO, Flavia	Professeur, Université de VERONE (ITALIE)	Examinatrice
M.	TEISSEDRE, Pierre-Louis	Professeur, Université de BORDEAUX	Examineur
M.	DELROT, Serge	Professeur, Université de BORDEAUX	Examineur
M.	CHARLIER, Laurent	Directeur des Services Techniques, CIVB	Invité

A Claire et Yann BLEIKER

Effets de la nutrition azotée sur les baies de différentes combinaisons porte-greffe/greffon de Vigne: approches agronomique, métabolomique et transcriptomique

La vigne a une importance économique majeure au niveau mondial. La plupart des vignobles sont greffés et comportent une variété (cépage, *Vitis vinifera*) greffée sur des porte-greffes de *Vitis* sauvages (hybrides de *V. berlandieri*, *V. riparia* et *V. rupestris*). Le potentiel qualitatif du raisin à la vendange dépend d'un équilibre subtil entre teneur en sucres, acidité, concentration en polyphénols et en précurseurs d'arômes. Les mécanismes contrôlant l'équilibre sucres/acides/polyphénols sont influencés par différentes contraintes abiotiques auxquelles la vigne est soumise, en particulier l'azote, en interaction avec le matériel végétal (cépage et porte-greffe). Des travaux antérieurs suggèrent par ailleurs qu'une partie des effets de la contrainte hydrique sont en fait liés à une carence azotée entraînée indirectement par la diminution d'absorption d'eau. Le système racinaire (porte-greffe) joue un rôle important dans l'absorption, la réduction, le transport et le stockage de l'azote, et dans l'équilibre hydrique de la plante. Dans ce contexte, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans la régulation de la synthèse des flavonoïdes des baies en réponse à la nutrition azotée, à la nature du porte-greffe et du greffon. Des plants des cépages Cabernet Sauvignon et Pinot Noir cultivés soit en pots en conditions semi-contrôlées soit au vignoble ont été soumis à des niveaux d'alimentation azotée différente. Les analyses agronomiques ont permis de confirmer une augmentation des teneurs en azote des différents organes de la plante (limbes, pétioles et baies) ainsi qu'une augmentation de la surface foliaire et de la masse des bois de taille sous l'effet du traitement azoté. Les analyses métabolomiques des pellicules de baies révèlent une accumulation de métabolites secondaires dont la nature diffère en fonction des différentes combinaisons porte-greffe/greffon. De plus, une augmentation de la synthèse d'anthocyanes et des flavonols a été observée dans les pellicules de baies en réponse à la diminution de la nutrition azotée. L'apport azoté se traduit aussi par une augmentation du degré de polymérisation moyen des tannins, alors que les teneurs en flavan-3-ols et procyanidines des pépins et des pellicules ne sont pas affectées par les différents apports azotés. Les analyses transcriptomiques globales (génomique complète) et ciblées (qPCR) ont mis en évidence des modifications des transcrits de gènes liés au métabolisme des flavonoïdes en réponse à la nutrition azotée. La variation de l'apport azoté influence également l'expression des gènes régulateurs positifs (facteurs de transcription de type MYB) et négatifs (protéine de type Lateral organ Boundary Domain (LBD)) des gènes de la biosynthèse des flavonoïdes chez la Vigne.

Characterizing the effects of nitrogen on grapevines with different scion/rootstock combinations: agronomic, metabolomic and transcriptomic approaches

Grapevine has a major economic importance worldwide. Most vineyards are grafted and include a variety (*Vitis vinifera*) grafted over a wild *Vitis* rootstock (hybrids of *V. berlandieri*, *riparia* and *rupestris*). Grape berry quality at harvest depends on a subtle balance between acidity and the concentrations of sugars, polyphenols and precursors of aroma compounds. The mechanisms controlling the balance of sugars/acids/polyphenols are influenced by the abiotic environment, in particular nitrogen supply, and interact with the genotypes of both the scion variety and the rootstock. Previous work suggests that some of the effects of water stress are in fact linked to a nitrogen deficiency driven indirectly by the reduction of water absorption. The root system (i.e. rootstock) plays an important role in the uptake, reduction, transport and storage of nitrogen, and the water balance of the plant. In this context, we studied the mechanisms involved in the regulation of the synthesis of flavonoids in berries in response to nitrogen nutrition with different scion/rootstock combinations. Two varieties (Cabernet Sauvignon and Pinot Noir) were subjected to different nitrogen supplies in two experimental systems, in pots under semi-controlled conditions and in a vineyard. Agronomic analysis confirmed that high nitrogen supply increased the nitrogen content of different organs (leaf blades, petioles and berries) as well as leaf surface area and cane pruning weight. Metabolomic analyses of berry skins revealed an accumulation of secondary metabolites whose nature depended on the different rootstock/scion combinations studied. In addition, an increase in the synthesis of anthocyanins and flavonols was observed in the berry skins in response to the decrease in nitrogen nutrition. High nitrogen supply also increased the average degree of polymerization of tannins, while the contents of flavan-3-ols and procyanidins in the seeds and skins of the berries were not affected. Global transcriptome (using RNA sequencing) and targeted (qPCR) analyses showed changes in the abundance of transcripts of genes related to the metabolism of flavonoids in response to nitrogen status. Nitrogen supply also influenced the transcript amounts of positive (MYB) and negative (Lateral Boundary Organ Domain) transcription factors controlling of the biosynthesis of flavonoids.

Unité de recherche

[Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la vigne, INRA UMR 1287, ISVV, 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon]

Remerciements

A l'issue de ces trois années, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, monsieur **Serge DELROT**, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour ses conseils et pour le temps qu'il a consacré à diriger cette recherche. J'aimerais également le remercier pour son respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés.

Je remercie madame **Véronique CHEYNIER** de s'être rendue disponible pour mon comité de mi-thèse, de m'avoir prodigué des conseils et d'avoir accepté la fonction de rapporteur. De même, je suis particulièrement reconnaissante envers monsieur **René SIRET** de l'intérêt qu'il a bien voulu accorder à mon travail à l'égard de cette recherche en s'engageant à être rapporteur.

Je tiens particulièrement à remercier **Flavia GUZZO**, pour son accueil si chaleureux au sein de son équipe de Biologie végétale et métabolomique, pour m'avoir tellement appris et pour m'avoir fait découvrir ce magnifique pays qu'est l'Italie. Je la remercie également d'avoir accepté de participer au jury de ma soutenance de thèse.

Je remercie monsieur **Pierre-Louis TEISSEDRE**, pour son soutien vis-à-vis de cette thèse en me permettant de réaliser certaines analyses au sein de son laboratoire et d'avoir accepté de présider le jury de cette soutenance de thèse.

Je tiens également à remercier la **SICAVAC** et l'équipe du **Château Couhins** pour leur aide et leur soutien pour ce travail. Merci à vous tous pour votre efficacité, votre disponibilité et vos remarques pertinentes. Cela a été un véritable plaisir de travailler ensemble.

Je souhaite exprimer ma gratitude à monsieur **Jean CHAUDIERE** pour m'avoir donné envie de poursuivre mes études et de réaliser une thèse. Je le remercie également pour son accueil chaleureux et son oreille attentive à chaque fois que j'ai sollicité son aide, ainsi que pour ses multiples encouragements et conseils.

Mes remerciements vont également à tous mes collègues de l'**EGFV** pour m'avoir accompagné durant ces trois années. Merci à vous tous, vous quitter ne va vraiment pas être facile. Un énorme MERCI à **Ghislaine HILBERT** et **Christel RENAUD**, pour m'avoir encadrée, encouragée, supportée et même sauvée dans les moments les plus difficiles. J'ai vraiment pu m'appuyer sur vos compétences et vos connaissances tout au long de ces années. Merci d'avoir toujours trouvé les mots pour me reconforter quand je baissais les bras. **Bernard DOUENS**, je ne pourrais jamais assez te remercier pour tout le travail que tu as fourni pour cette thèse et pour tous tes conseils. Je te remercie également pour ton amitié et ton soutien sans faille pendant ces trois années, tu as toujours été disponible pour m'aider que ce soit d'un point de vue professionnel ou personnel. Un grand MERCI pour m'avoir accompagnée à Sancerre et pour nous avoir ramenés aussi vite à Bordeaux !!!! Une fois entraînés par les musiques de Nostalgie, rien ne nous arrête !

Nicolas HOCQUARD, merci, merci, merci pour chacune des baies que tu m'as aidée à peller et presque sans râler! Merci pour cette merveilleuse escapade à Bourges pleine de

souvenirs et d'odeurs de sapin! Je te remercie surtout pour ta personnalité hors du commun qui m'a conquise dès le premier jour, tu nous charmes toutes!

Martine DONNART, ma copine !!! MERCI Martine pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton humour qui m'ont accompagnée durant ces trois années. La vie au laboratoire est bien plus joyeuse quand tu es là et il faut bien l'avouer bien plus rigoureuse! **Pierre HELWI**, Merci de m'avoir supportée chaque jour durant cette thèse! Je n'aurais pas pu avoir un meilleur coéquipier pour ce travail. Je tiens aussi à remercier un grand nombre de mes collègues qui ont participé à ce travail en étant à mes côtés. Je remercie donc **Claude BONNET, Catherine CHABIRAND, Sarah COOKSON, Zhanwu DAI, Agnès DESTAC, Sabine GUILLAUMIE, Cyril HEVIN, Maria LAFARGUE, Virginie LAUVERGEAT, Messa MEDDAR, Nathalie OLLAT, Guillaume PACREAU, Jean-Pierre PETIT, Jean-Paul ROBERT, Landry ROSSDEUSTCH, Jean-Pascal TANDONNET, Catherine THIOULOUSE, Claudine TROSSAT, Cornelis Van LEUWEEN** et tout le reste de l'équipe.

Je remercie également tous les étudiants ayant contribué à ce travail. Un grand merci à **Paul ANDRÉ, Manon BARON, Stelina BRILLANT, Maxime DURAND, Jessy FRANCHINI, Louis GOUGEON, Romain LAJONIE, Pauline MURE, Kleopatra NIKOLAOU** et je remercie tout particulièrement **Lilia MECHIRI** pour son implication dans ce travail, son talent à la paillasse et surtout pour son amitié.

Je tiens également à remercier tous mes amis qui ont été à mes côtés pendant tant d'années. Merci à **Amine MEHIDI** pour m'avoir toujours soutenu et ça depuis notre premier jour à l'université. Tu m'as transmis ton ambition de réussir et la force de le faire. Merci à toi **Yohann LELIEVRE** pour ton écoute et tes conseils tout au long de ces années, ainsi que pour avoir lu et relu ce manuscrit et de l'avoir rendu encore meilleur. Merci à toi **Naoufel BENSAOUD** pour ton soutien, tes encouragements et pour ton amitié sans faille. Je crois que je ne serais jamais arrivée aussi loin si tous les trois n'aviez pas fait parti de ma vie, personne ne pourrait rêver d'avoir de meilleurs amis que vous. Merci à **Dursun KORKUT** pour ton optimisme, ton écoute et tes encouragements, j'ai souvent eu l'impression que tu croyais plus en moi que moi-même donc un grand MERCI. Merci à toi **Cécile BONNEY** pour être toujours à mes côtés 15 ans après notre rencontre, je crois qu'on peut dire que tu es ma meilleure amie pour la vie ! Je remercie aussi **Cécile SOLTANE**, ma copine d'amour pour être toujours d'aussi bons conseils que ce soit d'un point de vue scientifique ou personnel. Merci à toi **Guillaume LALANNE-TISNE** de m'avoir écoutée parler de cette thèse tous les jours pendant la dernière année, d'avoir été aussi présent lors de la dernière ligne droite et surtout d'être un aussi bon ami. Je tiens également à remercier **Magali HIRIART, Thomas ETCHEVERRIA, Rémy FORESTIER, Coralie BRUNI, Emilie FACHE, Benjamin SERVAT, Laurent ADUMEAU** et **Remi BEAUVIEUX** pour leur amitié, tous nos moments passés ensemble et pour votre présence à mes côtés lors de cette soutenance (bon certains d'entre vous n'ont pas pu se libérer mais merci pour vos messages et vos encouragements).

Je tiens aussi à remercier ma famille pour leur amour inconditionnel, leur confiance et pour n'avoir jamais douté de moi. Tout ce que je pourrais dire ne pourra jamais suffire à exprimer tout ce que je vous dois et combien vous avez été importants pour faire de moi ce que je suis aujourd'hui. Et je vous remercie surtout de votre présence à cette soutenance, vous n'auriez pas pu me faire un plus beau cadeau.

Je remercie avec une attention particulière **Enric ZEHRAOUI**, pour avoir été présent à mes côtés pour me soutenir durant ces trois années. Je te remercie des sacrifices que tu as dû faire pour que je puisse réaliser cette thèse, ça n'a pas toujours été facile mais ON l'a fait !!!

Valorisation des travaux de recherche

Publications :

Pierre Helwi, Aude Habran, Sabine Guillaumie, Cécile Thibon, Ghislaine Hilbert, Christelle Renault, Eric Gomes, Philippe Darriet, Serge Delrot, Cornelis van Leeuwen. Can wine aromas be manipulated by nitrogen applications in the vineyard? Proceedings Oeno 2015, Bordeaux, France, sous presse.

Pierre Helwi, Aude Habran, Sabine Guillaumie, Cécile Thibon, Ghislaine Hilbert, Eric Gomes, Serge Delrot, Philippe Darriet, Cornelis van Leeuwen. Which impact of nitrogen supply on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and wines: direct or indirect effect? Accepté à Journal of Agricultural and Food Chemistry.

Pierre Helwi, Cécile Thibon, Aude Habran, Ghislaine Hilbert, Sabine Guillaumie, Serge Delrot, Philippe Darriet, Cornelis van Leeuwen. Effect of vine nitrogen status, grapevine variety and rootstock on berry S-glutathionylated and S-cysteinylated precursors of 3-sulfanyhexan-1-ol. Soumis au Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin.

Aude Habran, Ghislaine Hilbert, Pierre Helwi, Cornelis Van Leeuwen, Eric Gomès, Stefano Negri, Mauro Commisso, Flavia Guzzo, Serge Delrot. A metabolomic approach of the effects of scion x rootstock x nitrogen interactions on berry content. En préparation pour Frontiers in Plant Science, à soumettre avant le 11 décembre 2015.

Aude Habran, Pierre Helwi, Sabine Guillaumie, Eric Gomès, Cornelis Van Leeuwen, Serge Delrot. A RNA seq analysis of the effects of nitrogen on gene expression in berries of different rootstock/scion combinations. En préparation pour Plos One.

Aude Habran, Pierre Helwi, Sabine Guillaumie, Céline Keime, Eric Gomès, Cornelis Van Leeuwen, Serge Delrot. Modification of berry metabolism through transcriptome reprogramming of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Sauvignon blanc and Cabernet-Sauvignon) in response of nitrogen supply. En préparation pour BMC Plant Biology.

Communications Orales :

Aude Habran, Ghislaine Hilbert, Pierre Helwi, Cornelis Van Leeuwen, Eric Gomès, Stefano Negri, Mauro Commisso, Flavia Guzzo, Serge Delrot. A metabolomic approach of the effects of scion x rootstock x nitrogen interactions on berry content. Oeno 2015: 10e Symposium International d'Oenologie de Bordeaux, Bordeaux, France, Juillet 2015.

Aude Habran, Ghislaine Hilbert, Pierre Helwi, Cornelis Van Leeuwen, Eric Gomès, Stefano Negri, Mauro Commisso, Flavia Guzzo, Serge Delrot. A metabolomic approach of the effects of scion x rootstock x nitrogen interactions on berry content. 4th Annual Conference of the COST ACTION FA1106, Lisbonne, Portugal, Septembre 2015.

Communications posters :

Aude Habran, Ghislaine Hilbert, Eric Gomès, Michael Jourde, Cornelius Van Leeuwen, Pierre-Louis Teissedre, Serge Delrot. Effect of nitrogen supply on phenylpropanoid metabolism in grape berries. Macromolecules and secondary metabolites of grapevine and wine (MACROWINE), Stellenbosh, Afrique du Sud, Septembre 2014.

Aude Habran, Ghislaine Hilbert, Pierre Helwi, Cornelis Van Leeuwen, Eric Gomès, Stefano Negri, Mauro Commisso, Flavia Guzzo, Serge Delrot. A metabolomic approach of the effects of scion x rootstock x nitrogen interactions on berry content. QualityFruit Workshop, The science behind Feeding the world healthily: the ultimate GxE challenge, COST ACTION FA1106, Vérone, Italie, Juin 2015.

Aude Habran, Ghislaine Hilbert, Pierre Helwi, Cornelis Van Leeuwen, Eric Gomès, Stefano Negri, Mauro Commisso, Flavia Guzzo, Serge Delrot. A metabolomic approach of the effects of scion x rootstock x nitrogen interactions on berry content. 9th Edition of the *In Vino Analytica Scientia Symposium*, Trento, Italie, Juillet 2015.

Table des matières

Chapitre 1

I-	La baie de raisin.....	26
I.1.	Morphologie	26
I.2.	Développement et maturation.....	27
I.3.	L'accumulation des sucres.....	28
I.4.	L'accumulation des acides organiques	29
II-	Les composés phénoliques.....	29
II.1.	Les composés non-flavonoïdes	30
II.1.1.	Les acides phénoliques	30
II.1.2.	Les stilbènes.....	31
II.2.	Les composés flavonoïdes	33
II.2.1.	Les flavonols.....	33
II.2.2.	Les anthocyanes	34
II.2.3.	Les flavan-3-ols et les proanthocyanidines.....	36
II.3.	La biosynthèse des flavonoïdes.....	37
II.3.1.	Les enzymes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes	37
II.3.2.	Les gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	38
II.3.2.	La régulation transcriptionnelle de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	39
III-	Facteurs influençant la biosynthèse des flavonoïdes.....	41
III.1.	Les facteurs environnementaux.....	41
III.2.	Les facteurs trophiques.....	42
IV-	L'azote chez les plantes.....	43
IV.1.	Un peu d'histoire	43
IV.2.	Les ressources azotées.....	43
IV.3.	Le métabolisme de l'azote chez les plantes	44
IV.3.1.	L'absorption du nitrate.....	44
IV.3.2.	L'assimilation du nitrate.....	45
IV.3.3.	Régulation du métabolisme azoté par les plantes.....	47
V-	L'azote chez la vigne	48
V.1.	Phénologie et alimentation azotée de la Vigne.....	48
V.2.	Effets de la nutrition azotée chez la Vigne.....	50
V.3.	Stratégies de régulation de l'azote au vignoble	51

V.3.1. La fertilisation	51
V.3.2. L'enherbement	51
V.4. Relation entre stress azoté et stress hydrique.....	51
VI- Projet de thèse.....	52
Chapitre 2	
I- Expérimentation en conditions semi-contrôlées.....	54
I.1. Stratégie expérimentale	54
I.2. Solutions nutritives.....	55
I.3. Matériel végétal	55
I.4. Prélèvements et préparation des échantillons	56
II- Expérimentations aux vignobles	56
II.1. Stratégie expérimentale	56
II.2. Matériel végétal	58
II.3. Prélèvements et préparation des échantillons	58
III- Méthodes agronomiques	58
III.1. Indicateur de contrainte hydrique.....	58
III.1.1. Mesure du potentiel de tige	58
III.1.2. Mesure du $\delta^{13}\text{C}$	59
III.2. Estimation du statut azoté des vignes.....	59
III.2.1 Azote assimilable du moût.....	59
III.2.2. Azote total des limbes et des pétioles.....	59
III.2.3. Azote total des baies	60
III.2.4. Mesure de l'indice N-tester	60
III.3. Estimation de la vigueur.....	60
III.3.1. Surface foliaire.....	60
III.3.2. Masse des bois de taille	60
IV- Méthodes biochimiques	61
IV.1. Principe d'analyse métabolomique	61
IV.1.1 Techniques analytiques.....	62
IV.1.2. Traitement et analyse des données	65
IV.2. Analyse métabolomique par LC-MS.....	68
IV.2.1. Extraction des métabolites	68
IV.2.2. Détection et identification des métabolites	68
IV.3. Analyse des métabolites primaires de la pellicule et de la pulpe des baies de raisin	69
IV.3.1. Extraction éthanolique.....	69
IV.3.2. Dosage des acides aminés	69

IV.3.3. Dosage des acides organiques	69
IV.3.4. Dosage des sucres réducteurs.....	70
IV.4. Analyse des métabolites secondaires de la pellicule et des pépins des baies de raisin	70
IV.4.1. Dosage des anthocyanes.....	70
IV.4.2. Dosage des flavan-3-ols et procyanidines.....	71
IV.4.3. Estimation du DPm des tannins	71
V- Méthodes de biologie moléculaire et transcriptomique	73
V.1. Principe de l'analyse transcriptomique par RNA-Seq.....	73
V.1.1. Techniques analytiques.....	74
V.1.2. Traitement et analyse des données	76
V.2. Extraction des ARN totaux	76
V.3. Analyse par RNA-Seq	77
V.4. Analyse par RT-qPCR.....	78
V.4.1. La transcription inverse	78
V.4.2. Les couples d'amorces.....	78
V.4.3. Quantification des transcrits par qPCR	80
V.4.4. Calculs des niveaux relatifs d'expressions des gènes	80

Chapitre 3

I- Impact des différents traitements sur le statut hydrique, le statut azoté et la physiologie des plantes.....	82
I.1. Statut hydrique des plantes	82
I.2. Statut azoté des plantes	84
I.2.1. Mesures N-tester	84
I.2.2. Azote total des limbes et des pétioles	86
I.2.3. Mesure de l'azote assimilable du moût.....	88
I.3. Vigueur des plantes	90
I.3.1. Mesures de la surface foliaire.....	90
I.3.2. Mesures de la masse des bois de taille	90
I.4. Conclusions	92
II- Effets de différentes combinaisons porte-greffe/greffon sur le métabolome de la baie de raisin.....	93
II.1. Introduction	93
II.2. Analyses statistiques	93
II.2.1. Analyse en composantes principales	93
II.2.2. Analyse OPLS	95
II.2.3. Identification des métabolites d'intérêts.....	97
II.2.4. Conclusions	99

III- Effets de l'azote sur différentes combinaisons porte-greffe /greffon : analyse du métabolome.....	100
III.1. Introduction.....	100
III.2 Analyses métabolomiques.....	100
III.2.1. Effet de l'azote sur la composition du raisin.....	100
III.2.2. Effet de l'azote en interaction avec différents porte-greffes sur la composition du raisin.....	104
III.3. Conclusions.....	110
IV- Effets de l'azote sur différentes combinaisons porte-greffe/greffon à maturité: analyse des profils transcriptomiques.....	112
IV.1. Analyse par RNA-Seq.....	112
IV.2. Analyse par PCR quantitative.....	118
IV.2.1 Expression de gènes impliqués dans l'assimilation de l'azote	118
IV.2.1. Expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	119
IV.2.3. Expression de gènes impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	120
IV.3. Conclusions.....	122

Chapitre 4

I- Impact des différents traitements sur le statut hydrique, le statut azoté et la physiologie des plantes.....	123
I.1.Statut hydrique des plantes.....	123
I.2. Statut azoté des plantes.....	124
I.2.1. Mesure N-tester.....	124
I.2.2. Azote total des limbes et des pétioles.....	125
I.2.3. Azote assimilable du moût.....	126
I.2.4. Azote total des baies.....	126
I.3. Vigueur des plantes.....	128
I.3.1. Surface foliaire.....	128
I.3.2. Masse des bois de taille.....	129
I.4. Conclusions.....	130
II- Effets de différents traitements azotés sur la teneur en métabolites primaires et secondaires d'intérêts.....	133
II.1. Teneur en sucres et acides organiques des baies.....	133
II.2. Composition en acides aminés des baies.....	136
II.3. Composition en anthocyanes des baies.....	137
II.3. Composition en flavan-3-ols et procyanidines des pépins.....	141
II.4 Conclusions.....	144

Seq	III- Effet de l'azote sur le profil d'expression de gènes : analyse par RNA-Seq	145
-----	---	-----

Chapitre 5

	I. Effets de l'azote sur le statut azoté des vignes	167
	II. Effets de l'azote sur la vigueur des vignes	167
	III. Effets de l'azote sur les métabolites primaires de la baie de raisin	168
	IV. Effets de l'azote sur les métabolites secondaires du raisin	169
	IV.1. Effets de l'azote sur la teneur en anthocyanes et en flavonols	169
	IV.2. Effets de l'azote sur le DPm des tannins et sur les teneurs en flavan-3-ols et procyanidines	170
	IV.3. Effets de l'azote sur la biosynthèse des flavonoïdes	172
	V. Effets de différents porte-greffes sur la composition des baies de raisin	174
	VI. Effets de l'azote sur la biosynthèse des flavonoïdes en interaction avec différents porte-greffes	175
	VII. Relation entre stress hydrique et stress azoté	176
	VIII. Perspectives	178

Table des Figures

FIGURE 1 : STRUCTURE D'UNE BAIE DE RAISIN À MATURITÉ (D'APRÈS KENNEDY, 2002)	26
FIGURE 2 : CROISSANCE ET DÉVELOPPEMENT D'UNE BAIE DE RAISIN (D'APRÈS KENNEDY 2002)	27
FIGURE 3 : STRUCTURES DE BASE ET VUE GÉNÉRALE DE LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DES PRINCIPAUX GROUPES DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES(D'APRÈS IRITI ET FAORO 2009)	30
FIGURE 4 : RÉPARTITION DES VOIES DE BIOSYNTHÈSE DES PRINCIPAUX GROUPES DE COMPOSÉS POLYPHÉNOLIQUES AU SEIN DE LA BAIE (TEIXEIRA ET AL. 2013).	31
FIGURE 5 : STRUCTURE DES PRINCIPAUX STILBÈNES CHEZ V. VINIFERA (D'APRÈS CASTELLARIN ET AL., 2012).	32
FIGURE 6 : SQUELETTE CARBONÉ DES FLAVONOÏDES	33
FIGURE 7: STRUCTURE DES FLAVONOLS MAJORITAIRES CHEZ V. VINIFERA	33
FIGURE 8 : STRUCTURE CHIMIQUE DES ANTHOCYANES DU RAISIN ET DU VIN	35
FIGURE 9 : STRUCTURE CHIMIQUE DES FLAVAN-3-OLS	36
FIGURE 10 : SCHÉMA DE LA VOIE DES FLAVONOÏDES CHEZ LA VIGNE (D'APRÈS JEONG ET AL., 2006)	38
FIGURE 11 : RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DES FLAVONOÏDES	40
FIGURE 12 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX AFFECTANT LA COMPOSITION DU RAISIN (KUHN ET AL., 2013)	41
FIGURE 13 : LOCALISATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES CODANT LES TRANSPORTEURS NRT1, NRT2 ET AMT CHEZ A. THALIANA (MASCLAUX-DAUBRESSE ET AL. 2010).	45
FIGURE 14 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'ASSIMILATION DU NITRATE DANS UNE CELLULE VÉGÉTALE.	45
FIGURE 15 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU CYCLE GS/GOGAT	46
FIGURE 16 : CYCLE DE DÉVELOPPEMENT DE LA VIGNE	48
FIGURE 17 : ABSORPTION DE L'AZOTE ET BIOMASSE DES DIFFÉRENTS COMPARTIMENTS EN FONCTION DU STADE DE DÉVELOPPEMENT DE LA VIGNE (D'APRÈS CONRADIE, 1980).	49
FIGURE 18 : DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL EN CONDITIONS SEMI-CONTRÔLÉES	54
FIGURE 19 : DISPOSITIF DES PARCELLES EXPÉRIMENTALES AUX VIGNOBLES	57
FIGURE 20 : PRINCIPALES ÉTAPES LORS D'UNE ANALYSE MÉTABOLOMIQUE PAR LC-MS (D'APRÈS ROUX, 2011)	62
FIGURE 21 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE SIMPLIFIÉE DU FONCTIONNEMENT D'UNE SOURCE ÉLECTROSPRAY EN MODE POSITIF	63
FIGURE 22 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UN ANALYSEUR ORBITRAP	64
FIGURE 23 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE EN TROIS DIMENSIONS D'UN CHROMATOGRAMME OBTENU EN LC-MS	64
FIGURE 24 : PRINCIPE DE LA LC/ESI-MS ET ORIGINE DE LA REDONDANCE DU SIGNAL	65
FIGURE 25 : PRÉSENTATION DES DONNÉES LORS D'UNE ANALYSE OPLS	67
FIGURE 26 : RÉACTIONS ENZYMATIQUES LIÉS AU DOSAGE DES SUCRES.	70
FIGURE 27 : PRINCIPE DE LA RÉACTION DE PHLOROGLUCINOLYSE : EXEMPLE POUR UN DIMÈRE.	72
FIGURE 28 : PRINCIPALES ÉTAPES DE LA GÉNÉRATION DE LA BANQUE ADNC	74
FIGURE 29 : SCHÉMA DESCRIPTIF DE LA GÉNÉRATION DE CLUSTER	75
FIGURE 30 : SCHÉMAS DESCRIPTIFS DU SÉQUENÇAGE	75
FIGURE 31 : ESTIMATION DU STATUT AZOTÉ DES PLANTES PAR MESURE N-TESTER	85
FIGURE 32 : ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES DES DONNÉES EN MODE NÉGATIF DES ÉCHANTILLONS 2013 ET 2014 DE PELLICULES DE CS ET PN À LA MI-MATURITÉ ET MATURITÉ. LE MODÈLE A ÉTÉ CONSTRUIT APRÈS CENTRAGE-RÉDUCTION DES VARIABLES.	94
FIGURE 33 : ANALYSE OPLS DES DONNÉES LC-MS EN MODE NÉGATIF DE PELLICULES ISSUES DU CS	94

FIGURE 34 : ANALYSE OPLS DES DONNÉES LC-MS EN MODE NÉGATIF DE PELLICULES ISSUES DU PN	96
FIGURE 35 : DIFFÉRENTES CLASSES DE MÉTABOLITES IDENTIFIÉS	97
FIGURE 36 : CARTES DES POIDS FACTORIELS REPRÉSENTÉES SOUS FORME DE « S-PLOT » AVEC APPARITION DES CLASSES DE MÉTABOLITES IDENTIFIÉS	97
FIGURE 37 : ANALYSE OPLS DES DONNÉES LC-MS EN MODE NÉGATIF DE PELLICULES ISSUES DU CS	101
FIGURE 38 : ANALYSE OPLS DES DONNÉES LC-MS EN MODE NÉGATIF DE PELLICULES ISSUES DU PN	102
FIGURE 39 : ANALYSE OPLS DES DONNÉES LC-MS EN MODE NÉGATIF DE PELLICULES ISSUES DU	105
FIGURE 40 : ANALYSE OPLS DES DONNÉES LC-MS EN MODE NÉGATIF DE PELLICULES ISSUES DU	106
FIGURE 41 : ANALYSE OPLS DES DONNÉES LC-MS EN MODE NÉGATIF DE PELLICULES ISSUES DU	108
FIGURE 42 : ANALYSE OPLS DES DONNÉES LC-MS EN MODE NÉGATIF DE PELLICULES ISSUES DU	109
FIGURE 43 : ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES DE L'ENSEMBLE DES VALEURS RPKM OBTENUES LORS DE L'ANALYSE RNA-SEQ	113
FIGURE 44 : DIAGRAMME D'EULER REPRÉSENTANT LES GÈNES SUREXPRIMÉS (EN ROUGE) ET SOUS RÉPRIMÉS (EN BLEU) (P. VALUE AJUSTÉE < 0.05, -1 < NIVEAU D'EXPRESSION (LOGFC) > 1) EN FONCTION DES DIFFÉRENTS TRAITEMENTS AZOTÉE (N+ VS N-)	114
FIGURE 45 : REGROUPEMENT PAR CATÉGORIES FONCTIONNELLES (MAPMAN) DES GÈNES DIFFÉRENTIELLEMENT EXPRIMÉS (P. VALUE AJUSTÉE < 0.05, -1 < NIVEAU D'EXPRESSION (LOGFC) > 1) EN FONCTION DES DIFFÉRENTS TRAITEMENTS AZOTÉS (N+ VS N-)	115
FIGURE 46 : PROFILS D'EXPRESSION DES GÈNES INTERVENANT DANS L'ASSIMILATION DE L'AZOTE.	119
FIGURE 47 : PROFILS D'EXPRESSION DES GÈNES INTERVENANT DANS LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DES FLAVONOÏDES.	120
FIGURE 48 : PROFILS D'EXPRESSION DES GÈNES INTERVENANT DANS LA RÉGULATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DES FLAVONOÏDES.	121
FIGURE 49 : ESTIMATION DU STATUT HYDRIQUE DES PLANTS PAR MESURE DU POTENTIEL DE TIGE	123
FIGURE 50 : ESTIMATION DU STATUT AZOTÉ DES PLANTES PAR MESURE N-TESTER	124
FIGURE 51 : ESTIMATION DE LA TENEUR EN AZOTE ASSIMILABLE DES MOÛTS PAR FTIR	126
FIGURE 52 : MESURE DE LA TENEUR EN AZOTE TOTAL DES BAIES DE RAISIN	127
FIGURE 53 : PROFIL D'ACCUMULATION DES ANTHOCYANES DES PELLICULES DE CABERNET SAUVIGNON ET PINOT NOIR	138
FIGURE 54 : ESTIMATION DU DEGRÉ DE POLYMÉRISATION DES TANNINS DE LA PELLICULE ET DES PÉPINS DES BAIES DE CABERNET SAUVIGNON ET DE PINOT NOIR	141
FIGURE 55 : RÉCAPITULATIF DE L'IMPACT D'UNE FERTILISATION AZOTÉE SUR LA VIGNE	168
FIGURE 56 : SCHÉMA GÉNÉRAL DES EFFETS DE L'AZOTE OBSERVÉS SUR LES PRODUITS DE LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DES FLAVONOÏDES	172
FIGURE 57 : ACCUMULATION DE MÉTABOLITES SECONDAIRES DONT LA NATURE DIFFÈRE EN FONCTION DES DIFFÉRENTES COMBINAISONS PORTE-GREFFE/GREFFON/CONDITION AZOTÉE	175
FIGURE 58 : VOIE SIMPLIFIÉE DE LA BIOSYNTHÈSE DES FLAVONOÏDES ET INFLUENCE D'UNE FAIBLE DISPONIBILITÉ AZOTÉE N- SUR LES ANTHOCYANES ET LES FLAVONOLS SELON DIFFÉRENTES COMBINAISONS PORTE-GREFFE/GREFFON AINSI QUE SUR L'ABONDANCE DES TRANSCRITS DU CS SELON DIFFÉRENTES COMBINAISONS PORTE-GREFFE/ANNÉE D'EXPÉRIMENTATION. LES DONNÉES MÉTABOLOMIQUES SONT PRÉSENTÉES DANS UN CADRE BEIGE ; LES DONNÉES TRANSCRIPTOMIQUES SONT PRÉSENTÉES DANS UN CADRE BLEU.	177

Liste des Tableaux

TABLEAU 1 : COMPOSITION ET CONCENTRATION DES ÉLÉMENTS DES DIFFÉRENTES SOLUTIONS NUTRITIVES	55
TABLEAU 2 : LISTE DES AMORCES UTILISÉES LORS DE L'ÉTUDE	79
TABLEAU 3 : ESTIMATION DU STATUT HYDRIQUE DES PLANTES PAR MESURE DU $\delta^{13}\text{C}$	83
TABLEAU 4 : TENEUR EN AZOTE TOTAL DES LIMBES	86
TABLEAU 5 : TENEUR EN AZOTE TOTAL DES PÉTIOLLES	87
TABLEAU 6 : ESTIMATION DE LA TENEUR EN AZOTE ASSIMILABLE DES MOÛTS PAR FTIR	88
TABLEAU 7 : MESURE DE LA SURFACE FOLIAIRE PRIMAIRE ET SECONDAIRE	89
TABLEAU 8 : MESURES DES MASSES DE BOIS DE TAILLE	91
TABLEAU 9 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES EFFETS D'UNE FORTE DISPONIBILITÉ EN AZOTE (N+) PAR COMPARAISON AVEC UNE FAIBLE DISPONIBILITÉ AZOTÉE (N-)	92
TABLEAU 10 : IDENTIFICATION DES MÉTABOLITES CORRÉLÉS AVEC LA COMBINAISON CS/110R	98
TABLEAU 11 : IDENTIFICATION DES MÉTABOLITES CORRÉLÉS AVEC LA COMBINAISON PN/RGM	98
TABLEAU 12 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES EFFETS D'UNE FAIBLE DISPONIBILITÉ EN AZOTE (N-) PAR RAPPORT AUX MODALITÉS (N+)	103
TABLEAU 13 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES EFFETS D'UNE FAIBLE DISPONIBILITÉ EN AZOTE (N-) PAR RAPPORT AUX MODALITÉS (N+) SUR DIFFÉRENTES COMBINAISONS PORTE-GREFFE/GREFFON.	111
TABLEAU 14 : RENDEMENT DE SÉQUENÇAGE ET STATISTIQUE D'ALIGNEMENT SUR LE GÉNOME DE RÉFÉRENCE	112
TABLEAU 15 : ANALYSE D'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE ENTRE ÉCHANTILLONS PRIS DEUX À DEUX	114
TABLEAU 16 : LISTE DE GÈNES CLASSÉS DANS LES CATÉGORIES « MÉTABOLISME AZOTÉ », « MÉTABOLISME SECONDAIRE » ET « RNA » DIFFÉRENTIELLEMENT EXPRIMÉS DANS LES BAIES DE RAISIN EN FONCTION DES DIFFÉRENTS TRAITEMENTS AZOTÉS (N+ VS N-)	117
TABLEAU 17 : MESURES DE LA TENEUR EN AZOTE TOTAL DES LIMBES ET DES PÉTIOLLES	125
TABLEAU 18 : SURFACES FOLIAIRES PRIMAIRES ET SECONDAIRES	128
TABLEAU 19 : MASSE DES BOIS DE TAILLE	129
TABLEAU 20 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES EFFETS OBSERVÉS LORS D'UN TRAITEMENT AZOTÉ (N100) EN COMPARAISON AVEC LES PLANTES NON TRAITÉES (TÉMOIN)	130
TABLEAU 21 : TENEURS EN SUCRES ET ACIDES ORGANIQUES DES BAIES DE CABERNET SAUVIGNON	131
TABLEAU 22 : TENEURS EN SUCRES ET ACIDES ORGANIQUES DES BAIES DE PINOT NOIR	132
TABLEAU 23 : COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS LIBRES DE LA PELLICULE ET DE LA PULPE DES BAIES DE CABERNET SAUVIGNON	134
TABLEAU 24 : COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS LIBRES DE LA PELLICULE ET DE LA PULPE DES BAIES DE PINOT NOIR	135
TABLEAU 25 : TENEUR EN ANTHOCYANES DES PELLICULES DE BAIES DE CABERNET SAUVIGNON	139
TABLEAU 26 : TENEUR EN ANTHOCYANES DES PELLICULES DE BAIES DE PINOT NOIR	140
TABLEAU 27 : TENEURS EN FLAVAN-3-OLS ET PROCYANIDINES DES PÉPINS DE CABERNET SAUVIGNON	142
TABLEAU 28 : TENEURS EN FLAVAN-3-OLS ET PROCYANIDINES DES PÉPINS DE PINOT NOIR	143
TABLEAU 29 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES EFFETS OBSERVÉS LORS D'UN TRAITEMENT AZOTÉ (N100) PAR RAPPORT AUX PLANTES NON TRAITÉES (TÉMOIN)	144

Abréviations :

110R 110 Richter

4CL 4-coumarate/coenzyme A ligase

° C Degré Celsius

A. thaliana *Arabidopsis thaliana*

AcCoA Acétyl-coenzyme A

AccQ 6-aminoquinolyl-Nhydroxysuccinimidyl carbamate

ACP Analyse en Composante Principale

ADN Acide désoxyribonucléique

ADNc ADN complémentaire

ADNg ADN génomique

ADP Adénosine Diphosphate

ALA Alanine

ANR Anthocyanine réductase

ANS Anthocyanidine synthase

ARG Arginine

ARN Acide ribonucléique

ASN Asparagine

ASP Acide aspartique

ATP Adénosine Triphosphate

bHLH basic Helix-Loop-Helix domain

C Catéchine

C4H Cinnamate-4-hydroxylase

CAGE Cap Analysis of Gene Expression

CHI Chalcone isomérase;

CHS Chalcone synthase

CoA Coenzyme A

CS Cabernet Sauvignon

CPL Chromatographie en phase liquide

CTAB Cetyltriméthylammonium bromide

Cy 3-glc Cyanidine 3-*O*-glucoside

Cy 3 glc-ac Cyanidine 3-*O*-glucoside-acétate

Cy 3 glc-cou Cyanidine 3-*O*-glucoside-coumarate

CYS Cystéine

DEPC Diéthylpyrocarbonate

DFR Dihydroflavonol réductase

Dp 3-glc Delphinidine 3-*O*-glucoside

Dp 3-glc-ac Delphinidine 3-*O*-glucoside-acétate

DPm Degré de polymérisation moyen

E4P Erythrose-4-phosphate

EC Epicatechine
ECG Epicatechine Gallate
EDTA Acide éthylène diamine tétraacétique
ESI Electrospray
EST Expressed Sequence Tags
F3'5'H Flavonoïde 3'5'-hydroxylase
F3'H Flavonoïde 3'-hydroxylase
F3H Flavanone 3-hydroxylase
FLS Flavonol synthase
Fructo HK Héxokinase fructose
FTIR Fourier Transform InfraRed spectroscopy
g Gramme
G6PDH Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GABA Acide γ -aminobutyrique
GABA Acide γ -aminobutyrique
GAPDH Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GDE Gène différentiellement exprimé
GDH Glutamate Déshydrogénase
GLN Glutamine
GLU Acide glutamique
GlucoHK Hexokinase glucose
GLY Glycine
GOGAT Glutamine-2-oxoglutarate aminotransférase
GS Glutamine synthétase
h Heure
HATS High Affinity Transport System
HIS Histidine
HK Hexokinase
HPLC High-performance liquid chromatography
ILE Isoleucine
INAO Institut National des Appellations d'Origine
KNO3 Nitrate de potassium
KOH Hydroxyde de potassium
L Litre
LAR Leucoanthocyanidine réductase
LATS Low Affinity Transport System
LBD Lateral organ Boundaries Domain
LC-DAD Liquid Chromatography With Diode Array Detection
LC-MS Liquid chromatography–mass spectrometry
LDOX Leucoanthocyanidine dioxygenase
LEU Leucine

LYS Lysine
m Mètre
M Maturité
MDH Malate déshydrogénase
MET Méthionine
MF Matière Fraiche
min Minute
MM Mi-maturité
MPSS Massively Parallel Signature Sequencing
MS Spectrométrie de Masse
MV Mi-véraison
Mv 3-glc Malvidine 3-*O*-glucoside
Mv 3-glc-ac Malvidine 3-*O*-glucoside-acétate
Mv 3-glc-cou Malvidine 3-*O*-glucoside-coumarate
n nano
N Nitrogen (azote)
N15 15 kg d'azote/hectare
N50 50 kg d'azote/hectare
N100 100 kg d'azote/hectare
NAD Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NH₄⁺ Ion ammonium
NGS Next Generation Sequencing
NiR Nitrite réductase
NLA Nitrogen Limitation Adaptation
NO₃⁻ Nitrate
NR Nitrate réductase
OIV Organisation Internationale de la Vigne et du Vin
OMT O-methyltransférase
OPLS Orthogonal partial least squares
PAL Phénylalanine ammonia-lyase
pb Paire de bases
PCR Réaction de polymérisation en chaine
PEP Phosphoénolpyruvate
PFK Phosphofructokinase
PGI Phospho glucose isomérase
PGI Glucose-6-phosphate isomérase
PHE Phénylalanine
PK Pyruvate kinase
PN Pinot Noir
Pn 3-glc Péonidine 3-*O*-glucoside

Pn 3-glc-ac Péonidine 3-*O*-glucoside-acetate
Pn 3-glc-cou Péonidine 3-*O*-glucoside-coumarate
PRO Proline
Pt 3-glc Pétunidine 3-*O*-glucoside
Pt 3-glc-ac Pétunidine 3-*O*-glucoside-acétate
Pt 3-glc-cou Pétunidine 3-*O*-glucoside-coumarate
PVPP Polyvinylpolypyrrolidone
RGM Riparia Gloire de Montpellier
RMN Résonance magnétique nucléaire
RNA-Seq RNA sequencing
RPKM Reads per kilobase of exon per million
RT- qPCR PCR quantitative
s Seconde
SAGE Serial analysis of gene expression
SD Shikimate déhydrogénase
SER Sérine
TE Tampon d'extraction
THR Thréonine
Tm melting temperature
TRIS Trishydroxyméthylaminométhane
TRP Tryptophane
TYR Tyrosine
UFGT UDP-glucose: Flavonoïde 3-Oglucosyltransférerase
UHPLC Ultra High Performance Liquid Chromatography
UV Ultraviolet
VAL Valine
V Véraison
V. Vinifera *Vitis Vinifera*
μ Micro

Avant-propos

Les flux financiers mondiaux annuels liés à l'industrie du vin s'élèvent à 25 700 millions €. En 2014, le vignoble mondial occupait une superficie estimée à environ 7,5 million ha et la production annuelle mondiale de vin représentait environ 271 millions hl (Mhl) selon les données de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV). La France est le premier producteur mondial avec près de 46.2 Mhl de vin produit en 2014, suivie par l'Italie avec près de 44.4 Mhl et l'Espagne (37 Mhl). De plus, au cours des dernières décennies, la production de vin dans l'hémisphère sud et aux Etats-Unis a largement augmenté avec près de 22,5 Mhl produit aux Etats Unis, 15,2 Mhl en Argentine, 11 Mhl en Afrique du Sud et 3,2 Mhl en Nouvelle Zélande.

Malgré l'émergence de nombreux pays producteurs, les vins français restent parmi les plus appréciés grâce à leur qualité et à leur typicité. Cependant, la viticulture actuelle doit faire face à de nouvelles exigences environnementales telles que la diminution des intrants phytosanitaires et l'adaptation au changement climatique, tout en maintenant la qualité organoleptique des raisins et des vins.

Le potentiel œnologique du raisin à la vendange dépend d'un équilibre subtil entre teneur en sucres, acidité, concentration en polyphénols et en précurseurs aromatiques. Au cours des dernières décennies, le changement climatique et les pratiques culturales ont conduit à des modifications de la composition des vins produits : augmentation de la teneur en alcool, diminution de l'acidité, quelquefois associées à une maturité phénolique insuffisante. Les mécanismes contrôlant l'équilibre sucres/acides/polyphénols ne sont pas totalement élucidés, bien que leur compréhension soit indispensable pour pouvoir limiter les effets décrits ci-dessus.

L'une des modifications induites par le changement climatique est une augmentation des périodes de sécheresse estivale. Des résultats préliminaires relatifs aux effets du stress hydrique suggèrent qu'ils sont en partie associés à une diminution de l'absorption d'azote concomitante à la baisse d'absorption d'eau accompagnant les épisodes de sécheresse. L'alimentation azotée joue un rôle majeur dans la régulation du métabolisme secondaire et plus particulièrement dans la régulation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.

Dans ce contexte, l'objet de cette thèse est d'étudier les mécanismes impliqués dans la régulation de la synthèse des flavonoïdes des baies notamment en réponse à la nutrition azotée. Pour obtenir une vision globale des processus agronomiques, moléculaires et biochimiques impliqués, plusieurs combinaisons porte-greffe/greffons soumises à différents régimes azotés ont été caractérisées sur le plan agronomique, et des analyses transcriptomiques et métabolomiques des baies ont été effectuées. L'objectif était de mettre en évidence les points clés de la régulation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes en réponse à différents niveaux de disponibilité azotée.

Après un exposé du contexte bibliographique et des méthodes que nous avons utilisées, nous analyserons et discuterons les résultats obtenus au cours de deux séries d'expérimentations menées soit en pots, soit au vignoble.

Chapitre 1 : Introduction et contexte bibliographique

I- La baie de raisin

I.1. Morphologie

Le raisin, fruit charnu à pépins, s'organise en grappe de baies. Les baies sont composées de trois couches: l'exocarpe ou pellicule, le mésocarpe ou pulpe, et l'endocarpe qui entoure la graine (Fig. 1) (Coombe, 1987; Kennedy, 2002; Ribéreau-Gayon et al., 2012).

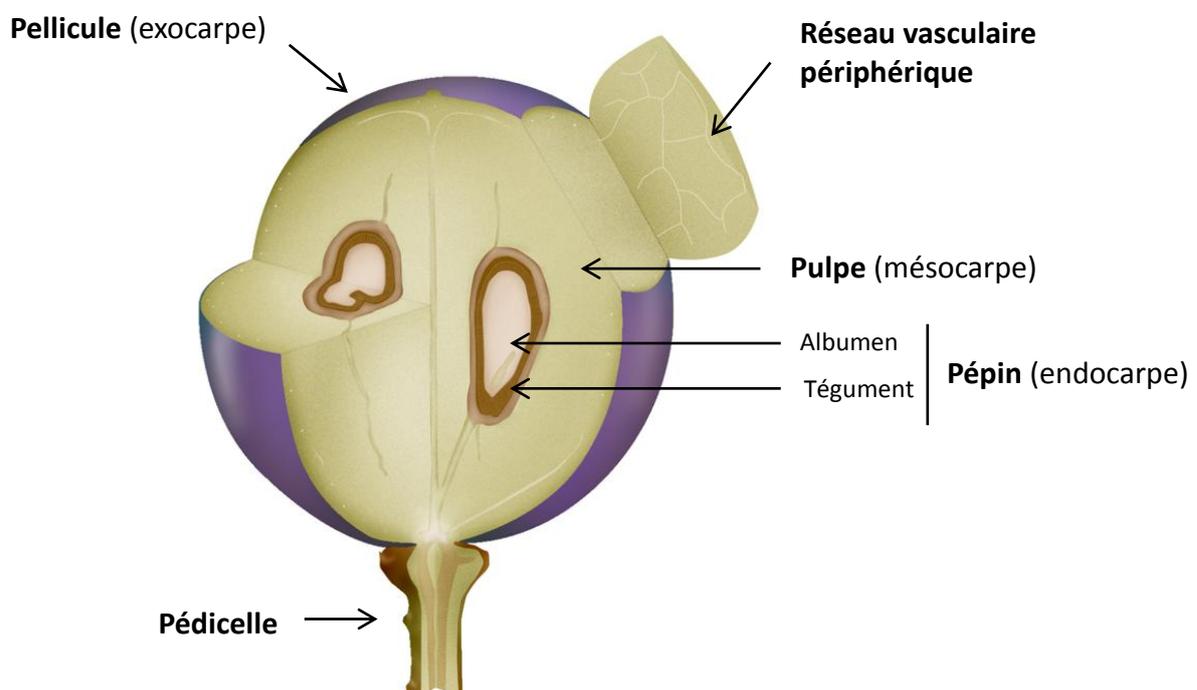


Figure 1 : Structure d'une baie de raisin à maturité (d'après Kennedy, 2002)

La pellicule, qui comprend l'épiderme et l'hypoderme, représente de 8 à 20% de la masse totale de la baie selon les cépages. A maturité, elle contient des sucres en faible quantité, des acides organiques, des acides aminés et de nombreux métabolites secondaires (composés phénoliques et composés aromatiques) (Coombe and Matile, 1980).

Selon les cépages, **la pulpe** représente 75 à 85 % de la masse totale de la baie. Les sucres y sont présents majoritairement, essentiellement sous forme de glucose et de fructose. Son acidité est due principalement à deux acides : tartrique et malique. La plupart des autres acides organiques du métabolisme primaire sont présents à l'état de trace. Le potassium contenu dans la pulpe neutralise en partie l'acidité des acides organiques. La pulpe contient 20 à 25 % de l'azote total du grain (Reynier, 1989; Ribéreau-Gayon et al., 2012).

Les pépins, qui représentent 0 à 6 % de la masse de la baie, se composent de lipides, de substances azotées et de matières minérales. Ils sont riches en composés phénoliques et peuvent contenir jusqu'à 55 % des polyphénols totaux de la baie (Ribéreau-Gayon and Peynaud, 1960; Prieur et al., 1994; Geny et al., 2003).

I.2. Développement et maturation

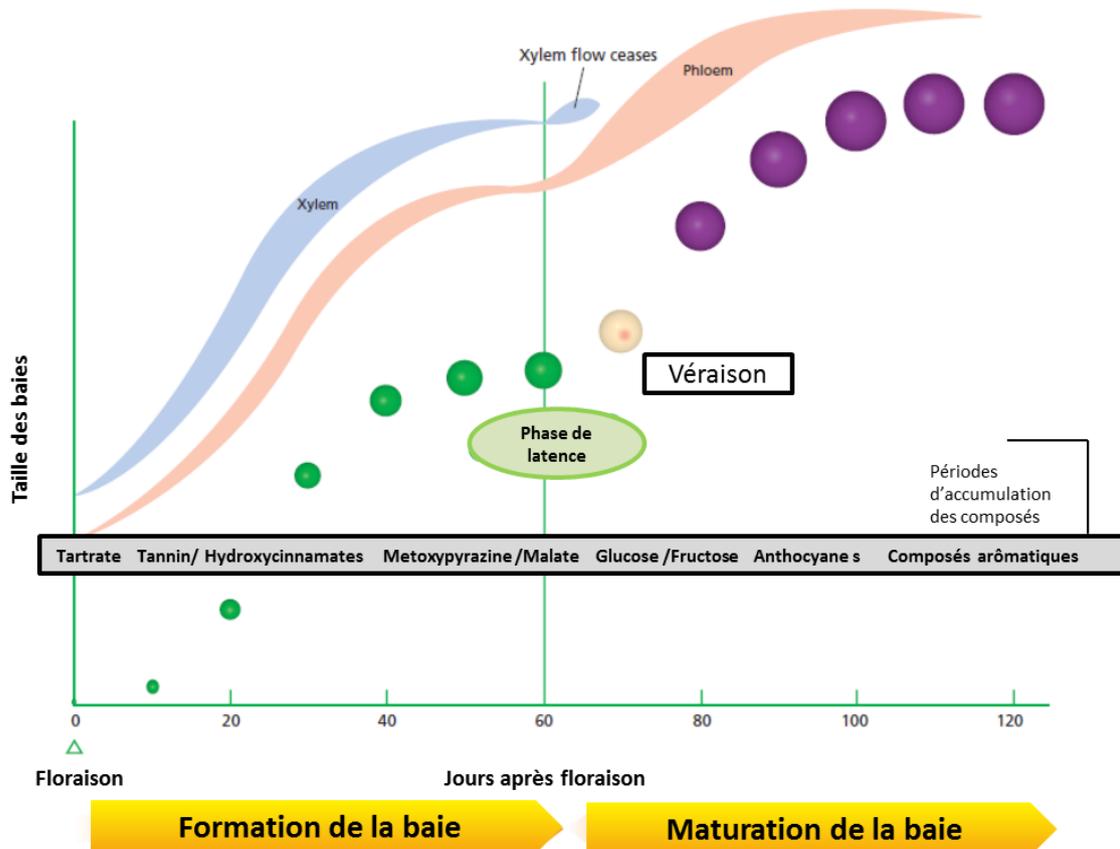


Figure 2 : Croissance et développement d'une baie de raisin (d'après Kennedy 2002)

Le développement du raisin s'accompagne de nombreuses modifications portant sur la taille, la composition, la couleur, la texture, la saveur et la sensibilité aux pathogènes. L'ensemble des processus de maturation conduisent ainsi à la transformation de petites baies vertes, dures et très acides en fruits colorés, souples, sucrés et aromatiques (Conde et al., 2007). Le développement et la maturation de la baie se caractérisent par deux périodes de croissances sigmoïdes séparées par une phase de latence (Fig. 2) (Coombe, 1992; Conde et al., 2007; Coombe and McCarthy, 2000; Kennedy, 2002).

La première période de croissance débute à la floraison et se poursuit pendant environ 60 j. Pendant cette période, les baies se forment et les embryons des graines sont produits. Les premières semaines s'accompagnent d'une phase de divisions cellulaires rapides, et, à la fin de cette période, le nombre total de cellules de la baie est établi. Au cours de cette phase, différents composés sont accumulés dans la baie, dont certains contribuent au grandissement cellulaire pour des raisins osmotiques (Coombe and Bishop, 1980; Ollat et al., 2002). A ce stade, les composés qui s'accumulent majoritairement sont les acides tartrique et malique, et de nombreux composés aromatiques (méthoxy-pyrazines) et phénoliques (acides hydroxycinnamiques et tannins). A la fin de cette période, **une courte phase de latence** caractérisée par un ralentissement de la croissance cellulaire est observée (Coombe, 1992; Hardie et al., 1996; Kennedy, 2002).

La seconde période de croissance débute à la véraison et se caractérise par un changement de couleur de la pellicule et par le doublement de la taille des baies. L'augmentation du volume des baies induit une dilution de la majorité des composés accumulés lors de la première phase (Ojeda et al., 1999; Ollat et al., 2002). En plus de cet effet de dilution, certains de ces composés sont dégradés en partie, c'est le cas de l'acide malique dans la pulpe. Une diminution des composés aromatiques comme les méthoxypyrazines se produit aussi lors de cette seconde période (Gunata et al., 1985; Roujou de Boubée et al., 2000; Guillaumie et al., 2013).

Bien que cette phase s'accompagne de la dégradation de certains composés, elle est surtout caractérisée par une accumulation massive de molécules importantes pour les propriétés organoleptiques des baies : les sucres (glucose et fructose), ainsi que des composés phénoliques et des composés aromatiques (Coombe et Matile, 1980; Kennedy, 2002). Pour les cépages rouges, elle implique la synthèse des anthocyanes, responsables de la couleur rouge des pellicules de raisin (Boss et al., 1996). Pour les cépages blancs, des flavonols donnant leur couleur jaune aux pellicules et des composés volatils aromatiques tels que les terpènes sont synthétisés pendant cette phase. Dans les pépins et la pellicule, les flavanols forment des oligomères et des polymères (Amrani et Mercierz, 1994; Kennedy et al., 2001; Geny et al., 2003). La maturité œnologique de la baie, qui correspond à un équilibre subtil entre différents composés organoleptiques tels que les sucres, les acides, les composés aromatiques et phénoliques, est atteinte à la fin de cette période (Ribéreau-Gayon et al., 2012).

I.3. L'accumulation des sucres

La concentration des sucres joue un rôle important dans les propriétés sensorielles des raisins. Elle détermine par ailleurs la concentration d'alcool dans les vins après fermentation, et fournit des précurseurs pour la synthèse des acides organiques, des composés phénoliques et des composés aromatiques. Les sucres accumulés dans les baies proviennent du transport phloémien du saccharose produit par la photosynthèse dans les feuilles (Hawker, 1969; Davies and Robinson, 1996; Dai et al., 2011) . Pendant la première phase de croissance, le saccharose importé dans les baies est métabolisé pour permettre la croissance et la production d'autres composés. La concentration en sucre reste donc relativement faible à ce stade (environ 150 mM d'hexose) (Coombe and Matile, 1980). A partir de la véraison, les sucres s'accumulent dans les vacuoles des cellules de la pulpe. Les cultivars de *V. vinifera* accumulent principalement du glucose et du fructose avec de faibles traces de saccharose (Liu et al., 2006; Shiraishi et al., 2010; Dai et al., 2011). A maturité, les baies de *V. vinifera* contiennent une concentration de sucre qui peut être supérieure à 1 M glucose et à 1 M fructose (Coombe, 1976). Cependant, il existe une grande variabilité de la composition et de concentration des sucres au sein du genre *Vitis*. Elle est déterminée par le génotype (Liu et al., 2006; Shiraishi et al., 2010), le stade de développement (Coombe, 1992), l'environnement et les pratiques culturales de la vigne (Dai et al., 2011).

I.4. L'accumulation des acides organiques

Les acides tartrique et malique représentent environ 90 % des acides totaux dans les baies de raisin (Kliewer et al., 1967; Conde et al., 2007; Dai et al., 2011). Ces acides organiques sont synthétisés dans la baie et s'accumulent dans les vacuoles des cellules du mésocarpe au cours de la première période de croissance (Coombe, 1987; Ribéreau-Gayon et al., 2012). Au cours de la maturation, la concentration de l'acide tartrique diminue principalement par dilution. La concentration en malate est maximale à la véraison puis décroît au long de la maturation. L'élévation des températures pendant la période de maturation des raisins favoriserait le catabolisme de l'acide malique (Kliewer, 1965; Sweetman et al., 2014). L'acidité du raisin et du vin dépend du rapport des concentrations entre les acides organiques libres et le potassium qui les neutralise en partie. Ce rapport augmente pendant la maturation et constitue un trait important pour la qualité et la longévité des vins car il influe sur le moût et le pH du vin (Kliewer et al., 1967; Ribéreau-Gayon et al., 2012). La concentration des acides organiques dans le raisin est très variable (Kliewer, 1965; Kliewer et al., 1967; Liu et al., 2006; Shiraishi et al., 2010). A maturité, l'acide malique représente environ 30 à 70% et l'acide tartrique environ 5 à 40% des acides totaux (Kliewer et al., 1967). Des concentrations de 4 à 9,4 g/L de tartrate et de 1,5 à 6,8 g/L de malate sont généralement rapportées pour les baies mûres du genre *Vitis* (Kliewer et al., 1967; Dai et al., 2011).

II- Les composés phénoliques

Les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ils font partie de l'arsenal de défense des plantes, et interviennent en renforçant la résistance mécanique des parois cellulaires, ou agissent comme composés toxiques, limitant ainsi la progression des microorganismes pathogènes. De plus, les composés phénoliques contribuent à la couleur et aux caractéristiques sensorielles (Bravo, 1998). Plus récemment, ces composés ont été largement étudiés pour leurs propriétés physiologiques (anti-allergènes, anti-inflammatoires, anti-microbiens, anti-oxydants, anti-thrombotiques, cardioprotecteurs et vasodilatateurs) (El Gharras, 2009). En œnologie, les composés phénoliques jouent un rôle très important. Par exemple, les anthocyanes participent à la couleur des vins rouges alors que les tannins contribuent à l'astringence des vins. La nomenclature des composés phénoliques est fondée sur la distinction entre les composés non-flavonoïdes et flavonoïdes (Fig. 3).

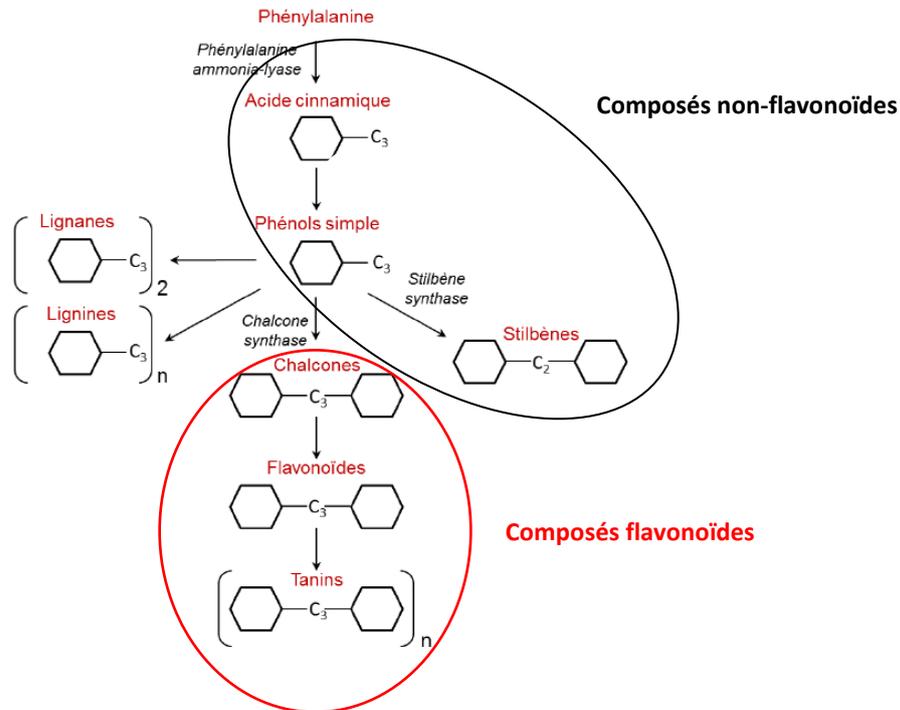


Figure 3 : Structures de base et vue générale de la voie de biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques (Iriti et Faoro 2009)

II.1. Les composés non-flavonoïdes

II.1.1. Les acides phénoliques

Structure

Deux classes d'acides phénoliques sont distinguées : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés d'esters hydroxycinnamiques. Les dérivés de l'acide benzoïque, qui possèdent un squelette carboné en C₆-C₁, sont présents dans les baies sous forme libre ou sous forme estérifiée ou glycosylée. Dans le raisin, l'acide gallique est l'acide benzoïque le plus abondant (Chira et al., 2008). Les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possèdent un squelette carboné en C₆-C₃. Les acides hydroxycinnamiques les plus communs dans le règne végétal sont : l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique. L'acide caftarique (acide cafeoyl tartrique) est l'acide hydroxycinnamique le plus représenté dans le raisin (Singleton et al., 1978; Kennedy et al., 2006; Chira et al., 2008).

Fonctions

Bien que leurs rôles soient encore assez mal connus, les acides phénoliques joueraient un rôle dans la croissance et la reproduction des végétaux. En effet, ces composés pourraient agir comme facteurs de croissance régulant les divisions et l'expansion cellulaires chez les plantes. De plus, ils agiraient comme agents de défense en réponse à des stress environnementaux (lumière, refroidissement, pollution, etc.)(Ghasemzadeh, 2011). L'acide salicylique est un acide phénolique ayant fait l'objet de recherches intensives. En effet, il régule de nombreux processus physiologiques et agirait comme un médiateur indispensable à la mise en place de la résistance systémique acquise contre les pathogènes (Vicente and Plasencia, 2011).

Les acides phénoliques du vin

Les acides phénoliques sont incolores mais ils peuvent jaunir par oxydation et provoquer le brunissement du moût blanc (Ribéreau-Gayon et al., 2012). A notre connaissance, les acides phénoliques n'ont aucune propriété organoleptique directe, mais ils sont des précurseurs de phénols volatils tels que les éthyl-phénols principalement trouvés dans les vins rouges ou les vinyl-phénols trouvés dans les vins blancs.

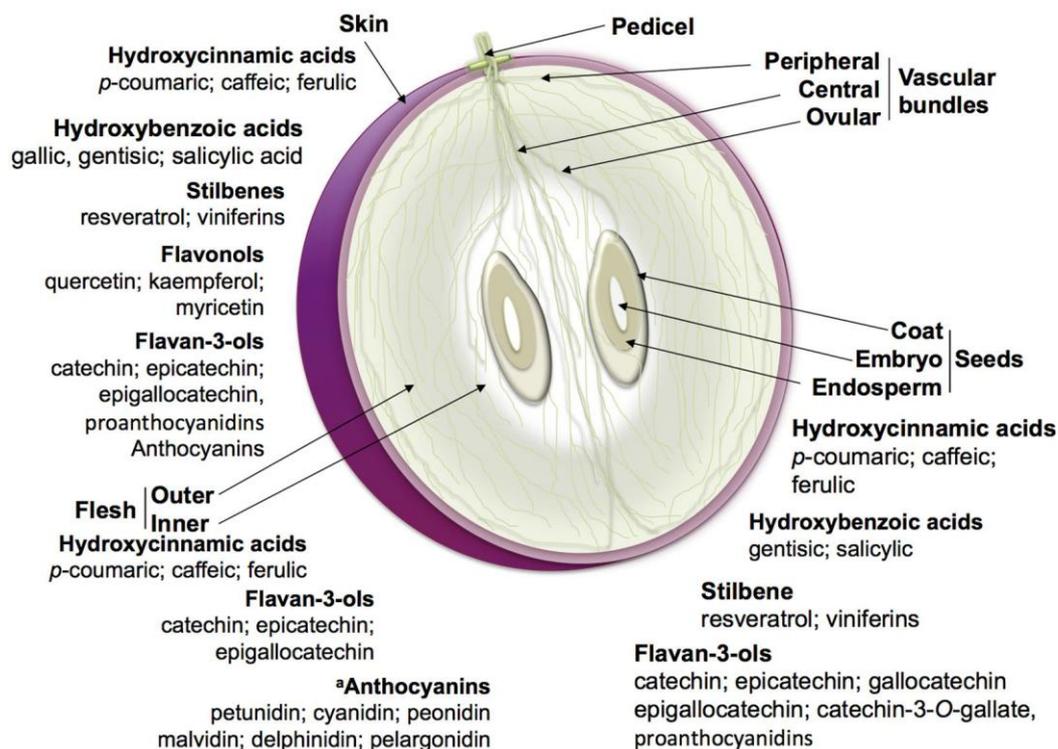


Figure 4 : Répartition des voies de biosynthèse des principaux groupes de composés polyphénoliques au sein de la baie (Teixeira et al. 2013).

II.1.2. Les stilbènes

Structure

Les stilbènes possèdent un squelette carboné en C6-C2-C6 (Fig. 3). Leur nature varie en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles, de la substitution des radicaux, ainsi que par leur conformation isomérique (Fig. 5). Les stilbènes les plus abondants dans le raisin sont le *trans*-resvératrol et son dérivé glucosylé (le picéide) (Waterhouse and Lamuela-Raventós, 1994; Sun et al., 2006). Majoritairement localisés dans la pellicule des baies de raisins, les stilbènes sont aussi présents à plus faible concentration dans les pépins (Fig. 4).

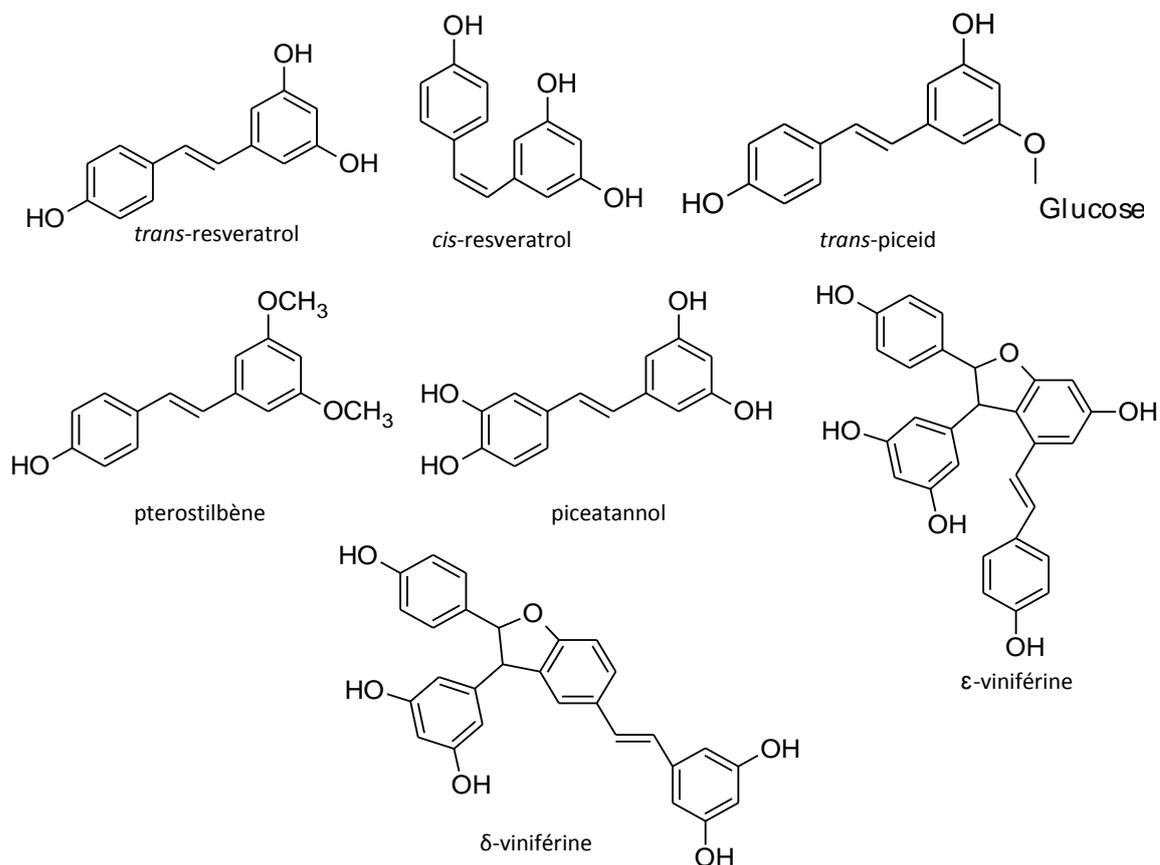


Figure 5 : Structure des principaux stilbènes chez *V. vinifera* (d'après Castellarin et al., 2012).

Fonction

Leur présence dans les tissus végétaux est associée à la résistance des plantes contre des maladies fongiques telles que la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), mais ils peuvent également être produits lors de stress abiotiques comme l'irradiation par les UV. En général, les stilbènes sont considérés comme des phytoalexines, et leur formation dans des feuilles de vigne a été corrélée à la résistance à certaines maladies (Langcake, 1981).

Les stilbènes dans le vin

Leurs propriétés antioxydantes confèreraient aux stilbènes un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires, et des activités chimio-préventives contre le cancer (Landrault et al., 2002). Plus récemment, l'activité biologique des stilbènes présents dans les vins rouges a été précisée. En effet, il a été démontré que le trans-resvératrol inhibe l'oxydation de lipoprotéines de basse densité et l'agrégation plaquettaire chez l'homme (Frankel et al., 1993), ce qui peut expliquer la diminution de maladie coronarienne observée chez les buveurs modérés de vin et permettrait d'expliquer le « French paradox » (Sun et al., 2002; Biagi and Bertelli, 2015). La teneur en resvératrol des vins varie considérablement de 0,09 mg/L à plus de 7 mg/L en fonction de la zone géographique de production, du cépage et des méthodes de vinification employées (Biagi and Bertelli, 2015).

II.2. Les composés flavonoïdes

Les composés flavonoïdes sont caractérisés par un squelette carboné en C6-C3-C6, correspondant à la structure du 2-phényl-benzopyrone : deux cycles benzéniques sont reliés par un hétérocycle oxygéné (Fig. 6). Ce groupe comprend trois familles de composés : les flavonols, les anthocyanes et les flavan-3-ols.

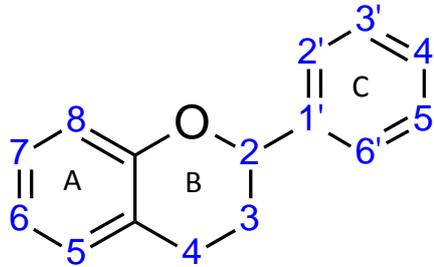


Figure 6 : Squelette carboné des flavonoïdes

II.2.1. Les flavonols

Structure

Les flavonols possèdent une fonction carbonyle (C=O) en C4, une fonction hydroxyle (OH) en C3 et une double liaison en C2,3 du squelette carboné. Leur nature varie en fonction du nombre et du type des substitutions du cycle B (Fig. 6). Quatre flavonols sont majoritaires dans le raisin : le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnétine (Fig. 7). Le kaempférol est monohydroxylé en position 3'; la quercétine est dihydroxylée en positions 3' et 4'; et la myricétine est trihydroxylée en positions 3', 4' et 5'. L'isorhamnétine est une forme méthylée de la quercétine (Cheynier and Rigaud, 1986; Mattivi et al., 2006). Tous les composés ci-dessus sont majoritairement présents sous leur forme osidique. Chez *Vitis Vinifera*, la conjugaison est située en position 3 du noyau aromatique C et les principaux monosaccharides entrant dans leur composition sont le D-glucose, le D-galactose, et l'acide D-glucuronique.

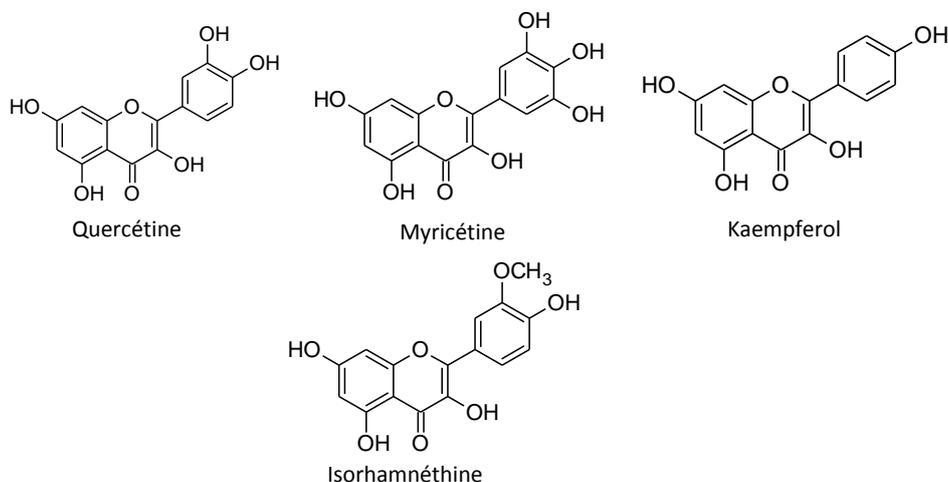


Figure 7: Structure des flavonols majoritaires chez *V. vinifera*

Fonctions

Leur présence dans les tissus végétaux est associée à la résistance des plantes contre les rayons UV (Li et al., 1993). En effet, leur capacité d'absorption dans l'ultraviolet leur confère un rôle photo-protecteur. Les flavonols interviennent aussi comme co-pigments associés aux anthocyanes chez les fleurs et les fruits. Du fait de leurs propriétés anti-oxydantes, les flavonols participent également aux interactions plante-pathogène (Kliebenstein, 2004). Plus récemment, des études ont démontré leurs effets bénéfiques pour la santé humaine. Les flavonols participeraient à la prévention de pathologies comme les maladies cardiovasculaires et certains cancers. (Mosawy et al., 2014) suggèrent notamment qu'une alimentation riche en quercétine retarderait la formation de thrombus chez les rats atteints de diabète.

Les flavonols des raisins et du vin

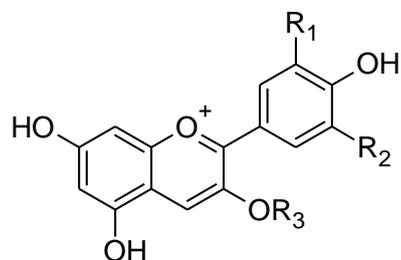
Les flavonols sont des pigments jaunes présents dans la pellicule des raisins blancs et noirs. Ils contribueraient à la couleur des vins blancs. Dans les vins rouges, ils forment des complexes de co-pigmentation avec les anthocyanes et participent donc indirectement à la couleur de ces vins (Boulton, 2001).

Les dérivés de la quercétine (quercétine-3-*O*-glucoside et quercétine-3-*O*-glucuronide) sont les formes prédominantes trouvées dans le vin (Mattivi et al., 2006). La concentration des flavonols est d'environ 100 mg/L dans les vins blancs et d'environ 2 mg/L dans les vins rouges (Chira et al., 2008).

II.2.2. Les anthocyanes

Structure

Les anthocyanes (du grec *anthos* signifiant fleur et *kyanos* signifiant bleu) sont des pigments naturels largement répandus dans le règne végétal. Les anthocyanes ont une structure de base commune, le cation flavylum. L'aglycone de l'anthocyane est appelé anthocyanidine (Fig. 8). Les anthocyanes proviennent de la glycosylation des anthocyanidines. Elles se différencient par la nature et le nombre de sucres liés à la molécule, ainsi que par le nombre de groupements hydroxyles, le degré de méthylation de ces groupements, leur position, et par la nature et le nombre d'acides aliphatiques ou aromatiques liés aux sucres (Kong et al., 2008). Vingt-trois structures d'anthocyanidines et environ 500 anthocyanes ont été identifiées à ce jour.



	R1	R2	R3	R4	R4
Cyanidine	OH	H			
Delphinidine	OH	OH			
Peonidine	OCH ₃	OH			
Pétunidine	OCH ₃	OH			
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃			
			Anthocyanes monoglucosides	Anthocyanes acylées	

Figure 8 : Structure chimique des anthocyanes du raisin et du vin

Fonctions

La fonction la plus importante des anthocyanes est leur capacité à colorer les végétaux dans lesquels elles sont produites, ou leurs produits dérivés. Elles présentent une diversité de couleur allant du bleu au rouge en passant, par le mauve, le rose et l'orange. Cette capacité leur confère un rôle dans l'attraction des animaux pour la pollinisation et la dispersion des graines. Une autre propriété importante des anthocyanes est leur activité antioxydante, qui joue un rôle significatif dans la prévention des maladies neuronales et cardiovasculaires, le cancer et le diabète (Kliebenstein, 2004; Kong et al., 2003).

Les anthocyanes des raisins et du vin

Cinq anthocyanidines sont principalement présentes au sein du genre *Vitis* : la cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine (Harborne and Williams, 2001; Kong et al., 2003). La couleur est l'un des attributs les plus importants des vins rouges, et les principales sources de la couleur rouge dans les vins proviennent des anthocyanes ou de leurs autres dérivés qui sont extraits et/ou formés durant le processus de vinification. Les concentrations typiques des anthocyanes libres dans les jeunes vins rouges avoisinent le plus souvent 500 mg/L, mais peuvent parfois dépasser 2000 mg/L (Castaneda-Ovando et al., 2009). Normalement, les anthocyanes sont principalement concentrées dans la pellicule du raisin, sauf dans les raisins dits «teinturier», où elles sont aussi très abondantes dans la pulpe. Pendant la fermentation, et surtout pendant les deux premières années de maturation, les anthocyanes monomères des vins subissent une grande variété de réactions et d'associations diverses. De nouveaux pigments dérivés des anthocyanes sont ainsi formés, ces derniers étant très importants pour la stabilité de la couleur (He et al., 2012). Contrairement à d'autres flavonoïdes des vins rouges, les anthocyanes ne contribuent pas à l'astringence ou à l'amertume perçue en bouche. Cependant, bien qu'elles soient inodores et presque sans saveur, elles peuvent interagir avec certaines substances aromatiques et contribuer indirectement à la saveur des vins (Dufour et Sauvaitre, 2000).

II.2.3. Les flavan-3-ols et les proanthocyanidines

Structure

Les tannins condensés ou proanthocyanidines sont des polymères d'unité flavan-3-ols reliés par des liaisons interflavanes qui présentent une grande diversité structurale. Cette diversité est due à la nature des unités flavan-3-ols les constituant, à leur nombre (longueur des chaînes polymériques ou degré de polymérisation) et à la position des liaisons qui relient ces unités (liaison interflavane C4/C8 ou C4/C6) (Hemingway, 1982; Quideau et al., 2011). Deux classes de tannins condensés se distinguent selon le degré d'hydroxylation des unités constitutives : les procyanidines qui sont des polymères d'unités catéchine ou épicatechine et les prodelphinidines constituées d'unité gallocatéchine et épigallocatéchine. La dénomination de ces deux classes provient de leur capacité à donner en milieu acide à température élevée leur anthocyanidine correspondante, cyanidine et delphinidine (Fig. 9). Les cinq flavan-3-ols communément retrouvés dans la baie de raisin sont la catéchine, l'épicatechine, la gallocatéchine, l'épigallocatéchine et l'épicatechine-3-O-gallate (Mattivi et al., 2009).

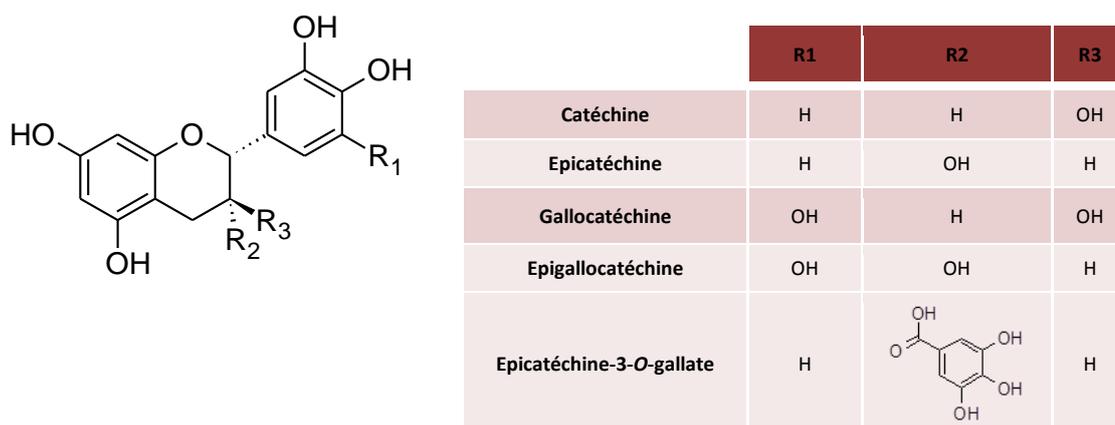


Figure 9 : Structure chimique des flavan-3-ols

Les tannins condensés sont les composés secondaires majoritaires dans le raisin. Présents dans la pellicule et les pépins, ils sont seulement détectables à l'état de traces dans la pulpe. Dans les cellules de la pellicule, les tannins se trouvent sous forme libre dans les vacuoles, mais ils peuvent aussi se lier aux protéines et aux polysaccharides des membranes cellulaires. Les unités principales retrouvées dans la pellicule sont la catéchine, l'épicatechine, l'épigallocatéchine et l'épicatechine gallate. Le degré de polymérisation moyen (ou DPM) peut varier de 3 à 80 (Souquet et al., 1996) . Les pépins contiennent des quantités de tannins plus importantes que les pellicules. Les unités principales retrouvées dans les pépins sont la catéchine, l'épicatechine et l'épicatechine gallate. Le DPM des tannins des pépins est plus faible que dans la pellicule et peut varier de 2 à 20 (Prieur et al., 1994).

L'étude structurale et le fractionnement des tannins condensés sont très délicats. Seuls les monomères et oligomères sont connus, purifiés et caractérisés. Les procyanidines principalement présentes dans les baies de raisins sont les procyanidines B1, B2, B3, B4 et C1.

Fonctions

La fonction principale des proanthocyanidines, des monomères flavan-3-ols et de leurs dérivés chez les plantes est de fournir une protection contre les agents pathogènes microbiens, les insectes ravageurs et les grands herbivores (Dixon et al., 2005).

Plus particulièrement, le monomère (-)-épicatéchine participerait à la résistance des plantes aux attaques fongiques (Ardi et al., 1998). De plus, des flavan-3-ol tels que l'épigallocatechine-3-gallate seraient anti-inflammatoires et agents préventifs contre certains cancers (Ahmad et al., 2000).

Les flavan-3-ols et les procyanidines du vin

Au cours du vieillissement des vins, ces composés réagissent entre eux ou avec d'autres composés phénoliques présents dans le vin, comme les ellagitanins et/ou les anthocyanes. Ces réactions ont une incidence sur la couleur ainsi que sur les caractéristiques organoleptiques des vins. Les procyanidines sont notamment responsables de l'astringence des vins rouges que l'on qualifie de « tanniques ». Ceci est dû aux interactions entre ces composés et les protéines salivaires. Les concentrations de flavan-3-ols et de procyanidines dans les vins rouges avoisinent 550 mg/L alors qu'elles n'atteignent que 20 et 15 mg/L dans les vins rosés et blancs respectivement (Carando and Teissedre, 1999).

II.3. La biosynthèse des flavonoïdes

II.3.1. Les enzymes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes

La voie de biosynthèse des flavonoïdes a été décrite pour la première fois chez la Vigne par Sparvoli et al., (1994). La majorité des composés phénoliques dérivent de la phénylalanine par l'intermédiaire de la voie des phénylpropanoïdes. La première étape de biosynthèse est la production d'acide cinnamique catalysée par la **phénylalanine ammonia-lyase (PAL)**. L'acide cinnamique est ensuite transformé en acide *p*-coumarique par la **cinnamate 4-hydroxylase (C4H)** (Fig. 10). L'ester *p*-coumaroyl CoA est alors formé grâce à la liaison de CoA sur l'acide *p*-coumarique catalysée par l'enzyme **4-coumarate CoA ligase (4CL)**. Par l'action de la **chalcone synthase (CHS)**, trois molécules de malonyl-CoA et une molécule de *p*-coumaroyl-CoA peuvent se condenser et produire de la naringénine chalcone. Après l'action de la **chalcone isomérase (CHI)**, la naringénine chalcone est modifiée en son isomère la naringénine flavanone, ce qui permet la formation de la structure de base des flavonoïdes (C6-C3-C6). Trois voies de bifurcation existent à partir de la naringénine flavanone. Le noyau B de la naringénine flavanone peut être hydroxylé par la **flavonoïde 3'-hydroxylase (F3'H)** ou la **flavonoïde 3'5'-hydroxylase (F3'5'H)** pour produire l'ériodictyol ou la pentahydroxyflavanone, respectivement (Waters et al., 2005). L'ériodictyol et pentahydroxyflavanone peuvent être par la suite modifiés par la **flavanone 3-hydroxylase (F3H)** pour produire les dihydroflavonols correspondants. En outre, la naringénine flavanone peut directement être hydroxylée en dihydrokaempférol par la F3H. Le dihydrokaempférol est aussi le substrat potentiel de la F3'H et la F3'5'H, qui produisent les dihydroflavonols correspondants (dihydroquercétine et dihydromyricétine respectivement). A partir des dihydroflavonols, la **flavonol synthase (FLS)** catalyse la formation de flavonols. Après ces modifications, la **dihydroflavonol 4-réductase (DFR)** peut réduire ces dihydroflavonols en leurs leucoanthocyanidines correspondantes, la leucocyanidine et la leucodelphinidine, précurseurs des anthocyanes et des flavan-3-ols.

L'oxydation des leucoanthocyanidines catalysée par la **leucoanthocyanidine dioxygénase/anthocyanidine synthase (LDOX/ANS)** permet la formation des anthocyanidines, cyanidine, delphinidine et pélargonidine. D'autre part, les leucoanthocyanidines peuvent être réduites par la **leucoanthocyanidine réductase (LAR)** pour former la catéchine et la gallocatéchine. L'épicatéchine et l'épigalocatechine sont pour leur part synthétisées par la réduction de la cyanidine et la delphinidine respectivement grâce à une **anthocyanidine réductase (ANR)**. L'enzyme **UFGT (UDP-glucose: Flavonoïde 3-Oglucosyltransférase)** catalyse l'étape finale de la voie de biosynthèse des anthocyanes.

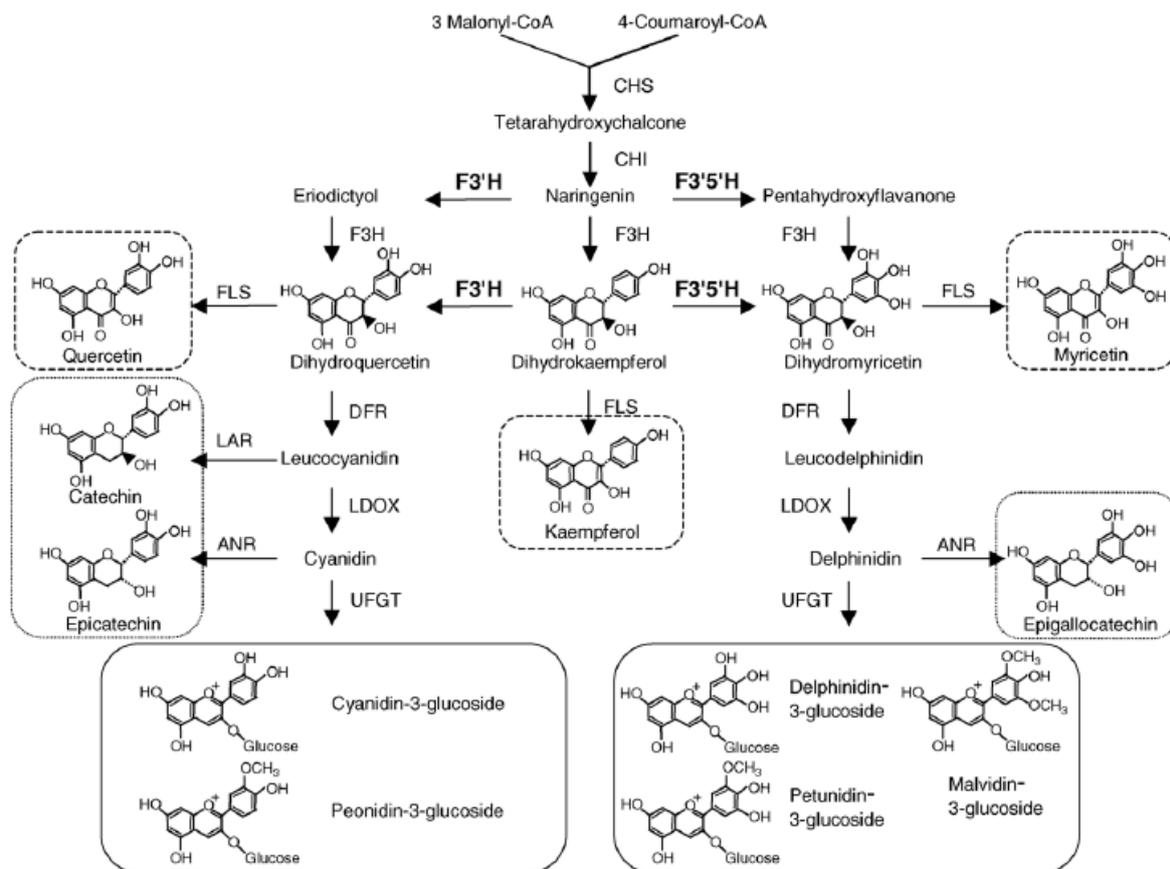


Figure 10 : Schéma de la voie des flavonoïdes chez la Vigne (d'après Jeong et al., 2006)

II.3.2. Les gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes

Des nombreuses études ont permis l'identification de différents gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes chez la Vigne (Bogs et al., 2006; Castellarin et al., 2006). Certains gènes de cette voie sont présents en plusieurs copies et organisés en familles multigéniques, alors que d'autres sont présents en une seule copie (Velasco et al., 2007).

Les familles multigéniques :

La PAL est la première enzyme de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Seize gènes codant pour différentes isoformes de la PAL ont été identifiés à ce jour chez la Vigne (Rawal et al., 2013), mais seulement 4 chez *Arabidopsis thaliana*. Le profil d'expression de chacun

de ces gènes n'a pas été encore élucidé. Cependant, les deux gènes *PAL1* et *PAL2* ont été identifiés comme étant les plus sensibles au stress chez *A. thaliana* (Raes, 2003).

Une autre grande famille multigénique de la voie de biosynthèse des flavonoïdes est celle de la F3'5'H, avec 10 gènes répertoriés dans le génome de la Vigne. Peu d'informations sont actuellement disponibles sur leur profil d'expression détaillé.

Quatre copies du gène codant la CHS ont été identifiées dans le génome de la Vigne (Sparvoli et al., 1994; Goto-Yamamoto et al., 2002) et présentent un profil d'expression spatio-temporelle distinct. Le gène *CHS3* est exprimé principalement dans la pellicule des baies des cépages rouges au stade véraison, tandis que *CHS1* et *CHS2* sont exprimés dans les feuilles et les pellicules des baies des cépages rouges et blancs (Goto-Yamamoto et al., 2002).

Cinq copies du gène *FLS* ont été identifiées dans le génome de la Vigne. *FLS1* est exprimé dans les feuilles, les vrilles, les bourgeons et les baies. Son expression est élevée entre la floraison et la nouaison, puis diminue pour augmenter à nouveau pendant la maturation des baies. *FLS2* est transcrit principalement dans la baie et à un niveau beaucoup plus faible et plus stable que *FLS1* (Fujita et al., 2006).

L'enzyme LAR est codée par les deux gènes *LAR1* et *LAR2*. Ces deux gènes présentent des expressions spatiales différentes dans la baie. *LAR1* est exprimé principalement dans les pépins alors que *LAR2* est transcrit dans la pellicule et les pépins.

Les familles monogéniques :

Jusqu'à présent, un seul gène codant chacune des enzymes C4H, 4CL, CHI, F3'H, DFR, LDOX, ANR et UFGT a été identifié chez la Vigne (Sparvoli et al., 1994; Velasco et al., 2007).

II.3.3. La régulation transcriptionnelle de la voie de biosynthèse des flavonoïdes

La régulation transcriptionnelle de la voie de biosynthèse des flavonoïdes a fait l'objet de nombreuses études chez différentes espèces comme le Pétunia, le Maïs et Arabidopsis... Ces travaux ont permis d'identifier trois familles de protéines intervenant dans la régulation de cette voie: les facteurs de transcription de type Myb, de type bHLH et de type WD40. **Les facteurs Myb** ont été identifiés pour la première fois chez le Maïs (Cone et al., 1986). Ils appartiennent à des familles multigéniques, 279 isoformes ont été répertoriées chez la Vigne. *VvMYBA1*, *VvMYBA2*, *VvMYBA3*, *VvMYBA4*, *VvMYB5a*, *VvMYB5b* contrôlent la transcription des gènes impliqués dans la synthèse des anthocyanes (Deluc et al., 2006; Walker et al., 2007; Deluc et al., 2008). *VvMYBPA1* (Bogs et al., 2007) et *VvMYBF1* (Czemmel et al., 2009) régulent la synthèse des proanthocyanidines et des flavonols respectivement (Fig. 11).

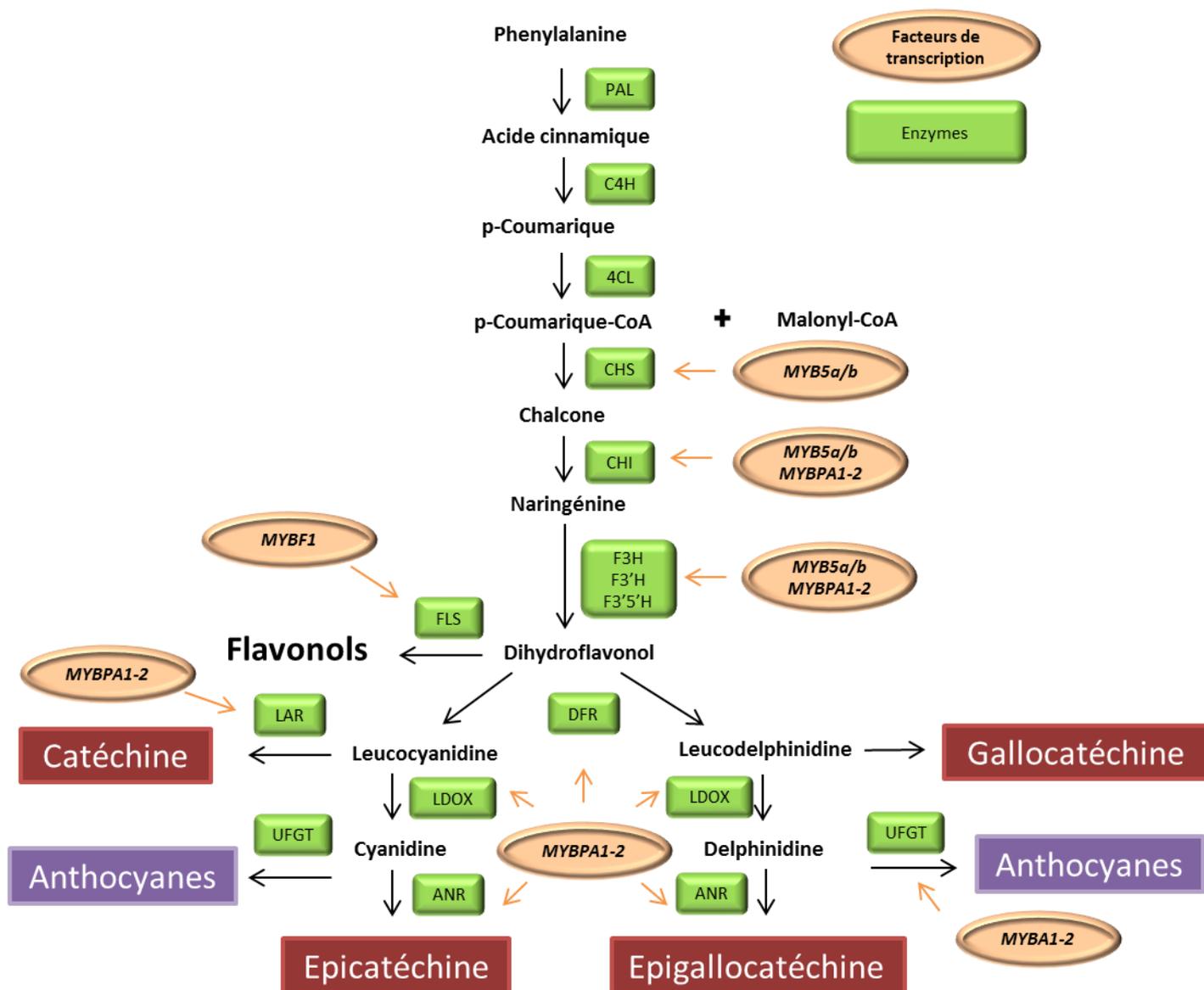


Figure 11 : Régulation transcriptionnelle de la voie de biosynthèse des flavonoïdes

Les facteurs de transcription de type bHLH identifiés pour la première fois chez le Maïs par (Ludwig et al., 1989), appartiennent à des familles multigéniques larges puisque 147 gènes codant pour des protéines possédant un domaine bHLH ont été identifiés chez Arabidopsis. Chez la Vigne, deux facteurs bHLH ont été identifiés : VvMYC1 et VvMYCA1. VvMYC1 régule la synthèse des anthocyanes en s'associant avec les gènes VvMYB5a, VvMYB5b, VvMYBA1, VvMYBA2 et VvMYBPA1. VvMYCA1 interviendrait dans la régulation de la synthèse des procyanidines en régulant l'ANR et l'UFGT (Hichri et al., 2010; Matus et al., 2010).

Une troisième famille de facteurs régulant la voie de biosynthèse des flavonoïdes a été identifiée chez différentes espèces, les WD40. Récemment, deux gènes appartenant à cette famille, WDR1 et WDR2 ont été identifiés dans le génome de la Vigne (Matus et al., 2010). Chez Arabidopsis, l'homologue de WDR1 contribuerait à l'accumulation des anthocyanes lorsqu'il est surexprimé (Matus et al., 2010).

III- Facteurs influençant la biosynthèse des flavonoïdes

De nombreuses études se sont intéressées à l'influence de l'environnement sur le potentiel qualitatif des baies. En effet, des facteurs tels que le rayonnement lumineux (Dokoozlian and Kliewer, 1996; Keller and Hrazdina, 1998; Martínez-Lüscher et al., 2014), la température (Mori et al., 2007; Pillet et al., 2012), ou le statut hydrique (Berdeja et al., 2014; Choné et al., 2001; Deluc et al., 2009; Koundouras et al., 2006a) influencent le développement et la composition des baies. D'autres facteurs comme le génotype des porte-greffe affectent aussi la composition des baies (Berdeja et al., 2014; Ollat and Lafontaine, 2001). Des facteurs trophiques comme les nutriments carbonés, phosphatés et azotés influencent aussi la composition des baies et leur développement (Hilbert et al., 2003a; Downey et al., 2006; Soubeyrand et al., 2014).

III.1. Les facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs environnementaux modulent la voie de biosynthèse des flavonoïdes, et notamment des anthocyanes (Fig. 12).

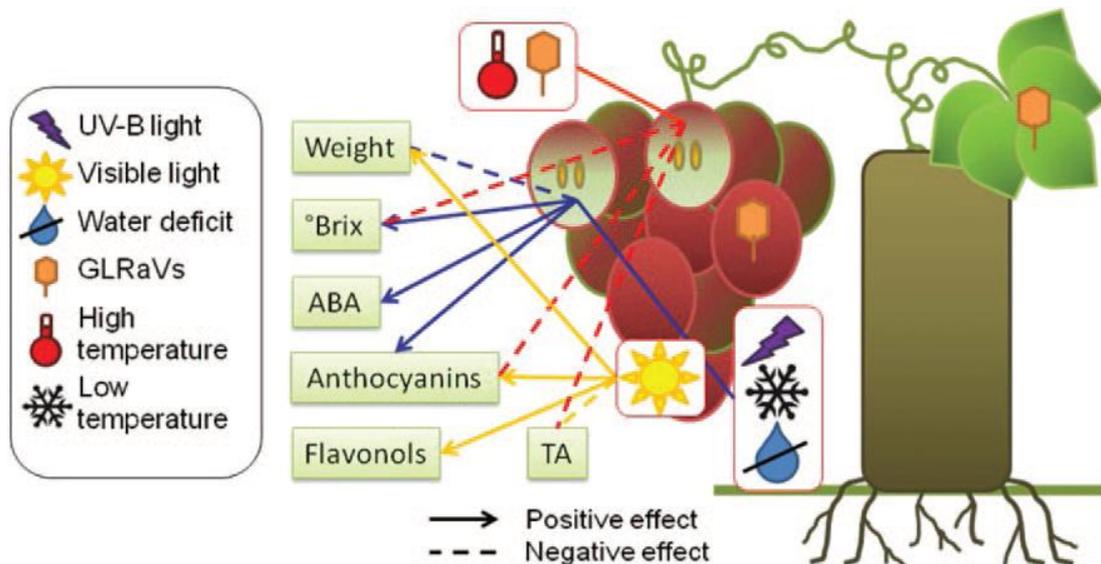


Figure 12 : Représentation schématique de facteurs environnementaux affectant la composition du raisin (Kuhn et al., 2013)

Les rayonnements et la température

Chez la Vigne, une augmentation de l'intensité lumineuse induit une accumulation d'anthocyanes et de flavonols dans les baies (Martínez-Lüscher et al., 2014). À l'inverse, l'ombrage des vignes diminue la teneur et le profil en anthocyanes des pellicules des baies (Downey et al., 2006; Spayd et al., 2002). Cette diminution serait corrélée avec la diminution des transcrits de gènes codant les enzymes de la voie de biosynthèse, telles que CHS, CHI, F3H, DFR, ANS et UFGT (Jeong et al., 2006; Matus et al., 2009). Les températures élevées (de 30-35°C) diminuent la teneur en anthocyanes dans la pellicule des baies (Mori et al., 2007; Tarara et al., 2008). Mori et al. (2015) ont montré que le profil d'accumulation des anthocyanes est modifié à des températures élevées. En effet, les proportions de delphinidine-3-glucoside, de cyanidine-3-glucoside et de pétunidine-3-glucoside par rapport aux anthocyanes totales sont considérablement réduites. À l'inverse, lorsque les plantes sont

exposées à des faibles températures, une accumulation des anthocyanes est observée. L'exposition de la vigne à de faibles températures stimule l'activité de la PAL et augmente la quantité de transcrite *Chs3* dans le raisin (Mori et al., 2005; Pascual-Teresa and Sanchez-Ballesta, 2008).

Le statut hydrique

Les effets de stress hydrique sur la biosynthèse des composés phénoliques dépendent de la période d'application du stress (pré ou post véraison) et de l'intensité du stress appliqué. Un déficit hydrique imposé à un moment précoce, au cours de la période de croissance des vignes, augmente la concentration des composés phénoliques totaux, et notamment des anthocyanes dans la pellicule des baies du cépage Agiorgitiko (Koundouras et al., 2006b).

Chez le Shiraz, l'application d'un fort déficit hydrique avant la véraison diminue la quantité de flavan-3-ols, mais n'affecte pas la teneur en anthocyanes (Ojeda et al., 2002). Une augmentation des anthocyanes et des flavonols est observée uniquement en cas de fort déficit hydrique en post-véraison. Cette étude a aussi montré que le stress hydrique, indépendamment de son intensité et de sa période d'application, augmente le degré de polymérisation des tannins. Chez le Cabernet Sauvignon, l'augmentation de l'accumulation des anthocyanes induite par le stress hydrique est corrélée avec une augmentation des transcrits des gènes *F3H*, *DFR*, *UFGT* et *OMT* (Castellarin et al., 2007a; Deluc et al., 2009). Lors de l'étude de (Castellarin et al., 2007a), aucun changement des profils d'expression des gènes impliqués dans la synthèse des proanthocyanidines et des flavonols n'a été observé. Au contraire, (Deluc et al., 2009) ont observé que le déficit hydrique augmente l'abondance des transcrits *VvFLS4* impliqués dans la synthèse de flavonols. Lors de cette étude, les auteurs ont aussi observé l'augmentation des transcrits codant MYBA1 et MYBA2, qui régulent l'expression de l'enzyme UFGT catalysant l'étape finale de la voie de biosynthèse des anthocyanes.

III.2. Les facteurs trophiques

La nutrition carbonée

Des études réalisées sur la plante modèle *A. thaliana* et sur le raisin ont approfondi les mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes par les sucres. Dans des mutants d' *A. thaliana* accumulant des concentrations élevées en sucres, l'expression des gènes codant pour les enzymes CHS, CHI, F3H, F3'H, FLS, DFR et LDOX est stimulée (Solfanelli et al., 2006). Chez la Vigne, un apport de sucres (glucose, fructose ou sucrose) augmente l'accumulation des anthocyanes et l'expression du gène *F3H* (Dai et al., 2014; Zheng et al., 2009).

La nutrition phosphatée

L'impact du phosphate sur la biosynthèse des anthocyanes a été particulièrement bien étudié sur des cultures de suspensions cellulaires de Vigne. L'ajout de phosphate dans le milieu de culture réduit l'accumulation des anthocyanes et cette réduction est corrélée à la diminution des activités enzymatiques PAL et CHS. A l'inverse, une carence phosphatée augmente la teneur en anthocyanes, et ceci est corrélé avec une augmentation des transcrits *UFGT* et *MYBA1* (Yin et al., 2012).

La nutrition azotée

Notre travail de thèse porte plus particulièrement sur l'impact de la disponibilité en azote sur la qualité du raisin et notamment sur la biosynthèse des flavonoïdes. Une carence azotée favorise la biosynthèse des anthocyanes chez diverses espèces, parmi lesquelles la Vigne. Chez *Arabidopsis*, l'abondance des transcrits *PAL*, *4CL*, *F3H*, *F3'H*, *DFR* et *LDOX* (*ANS*), et celle de gènes impliqués dans la régulation de la voie (*Myb PAP1* et *Myb PAP2*) sont augmentées par la carence azotée ((Scheible, 2004) ; pour revue (Lillo et al., 2008a).

Chez la Vigne, la fertilisation azotée affecte le profil et la teneur en anthocyanes dans les pellicules des baies. En effet, à faible concentration en azote, les teneurs en Dp-3-glc, Pt-3-glc, Mv-3-glc, Cy-3-glc et Pn-3-glc augmentent (Hilbert et al., 2003). De plus, lors d'une limitation en azote, les transcrits *PAL*, *CHS*, *F3'5'H*, *DFR*, et *LDOX* sont plus abondants (Soubeyrand et al., 2014). Toutefois, les gènes impliqués dans la régulation de la voie tels que *VvMybBA1*, *VvMybB5a/b* et *VvMybPA1/2* ne semblent pas affectés (Soubeyrand et al., 2014). Toujours chez la Vigne, une fertilisation azotée modérée favorise l'accumulation de tannins totaux alors qu'une forte fertilisation azotée la diminue (Delgado et al., 2004). Les effets de la fertilisation azotée sur la synthèse des polyphénols peuvent être en partie indirects, en réduisant la vigueur et en favorisant l'ensoleillement des baies (Maigre, 2002). Cependant, les mécanismes moléculaires de la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes en réponse à une fertilisation azotée ne sont pas encore totalement élucidés.

IV- L'azote chez les plantes

IV.1. Un peu d'histoire

Selon Aristote, les plantes se formaient à partir des éléments du sol, c'est-à-dire qu'en quelque sorte, la terre se transformait en matière végétale ! Cette hypothèse n'a pas été remise en question pendant presque 2000 ans. Une de ses premières réfutations connues apparaît suite à une expérience effectuée par Jean Baptiste van Helmont (1577-1644) au début du XVII^e siècle. Ce physicien planta une branche de saule dans un bac rempli de terre sèche soigneusement pesée. Cinq ans plus tard, un saule de plus de 75 kg avait poussé. Par contre, la terre n'avait perdu que quelques milligrammes. La seule chose ajoutée à la terre durant ces 5 années étant l'eau, il conclut à son tour que l'eau se transformait en matière végétale...

Ce ne sera qu'à partir du XIX^{ème} siècle que les éléments nutritifs essentiels au bon développement des plantes sont mis en évidence. En effet, pour se développer, les plantes prélèvent dans le milieu qui les entoure – atmosphère, eau et sol – les éléments nécessaires à la constitution de leurs tissus. Parmi ceux-ci, on trouve un constituant essentiel des tissus végétaux : l'azote.

IV.2. Les ressources azotées

L'azote est présent dans la biosphère sous trois formes : gazeuse, minérale et organique. Bien qu'il soit le constituant majeur de la basse atmosphère, l'azote atmosphérique est très peu utilisable par les plantes. Dans les sols, une grande majorité de l'azote (environ 98%) se trouve sous forme organique. L'azote organique n'est généralement pas directement utilisable par les plantes. Sa mise à disposition pour les végétaux n'est possible qu'après sa transformation en azote minéral : c'est la minéralisation. Le nitrate

(NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+) sont les deux principales formes d'azote minéral assimilées par la majorité des espèces végétales.

L'ion NH_4^+ , en partie adsorbé par les substances du sol chargées négativement (colloïdes...) est présent en quantités très faibles dans la solution du sol, souvent 10 à 1000 fois moins abondant que le NO_3^- , et sa concentration n'excède que rarement 50 μM (Von Wirén et al., 2000). Au contraire, le NO_3^- qui est généralement la source d'azote la plus abondante dans le sol, est présent à des concentrations variant de quelques micromolaires à une dizaine de millimolaires (Marschner, 2012). De plus, il s'agit d'un ion très soluble, ce qui en fait un nutriment minéral très mobile et facilement lessivable. Par ailleurs, le NO_3^- est une source d'azote pour de très nombreux êtres vivants présents dans le sol (bactéries, champignons...), qui peuvent en prélever de grandes quantités. Les activités biologiques aboutissant soit à la synthèse (nitrification), soit à la disparition (dé-nitrification, prélèvement par les plantes, champignons et bactéries) du NO_3^- sont elles-mêmes très sensibles aux caractéristiques du sol (température, pH, humidité). Ainsi, la combinaison complexe des différents facteurs déterminant la concentration de NO_3^- dans la solution du sol, entraîne de fortes variations spatio-temporelles de sa disponibilité auxquelles les plantes doivent faire face (Miller et al., 2007).

IV.3. Le métabolisme de l'azote chez les plantes

L'azote est un des éléments majeurs influençant le développement végétatif et reproducteur des plantes. En effet, il entre dans la formation de nombreux métabolites primaires tels que les acides aminés, les acides nucléiques, la chlorophylle, les vitamines et les hormones, mais aussi dans la formation de divers métabolites secondaires. Il occupe la première place dans la démarche d'optimisation des productions végétales.

IV.3.1. L'absorption du nitrate

Les mécanismes de transport de l'azote ont été particulièrement bien étudiés chez la plante modèle *A. thaliana* (pour revue, Krapp et al., 2014). Les bases moléculaires du transport de l'azote chez la Vigne sont principalement déduites par analogie aux plantes modèles.

Chez la grande majorité des végétaux, le nitrate est la principale forme d'azote minéral utilisée. L'absorption de l'azote du sol implique le franchissement de la membrane plasmique des cellules racinaires. Dans le cas du NO_3^- , le système de transport est actif et nécessite de l'énergie. En effet, le nitrate est pris en charge par des symporteurs protons/ NO_3^- situés sur le plasmalemme des cellules de l'épiderme et du parenchyme cortical de la racine. L'absorption du NO_3^- par les racines est catalysée par deux systèmes de transport spécifiques coexistant : **un système de transport de haute affinité HATS** (High Affinity Transport System) et **un système de transport de faible affinité LATS** (Low Affinity Transport System).

Le système de transport HATS prédomine lorsque la concentration en nitrate du milieu est comprise entre 1 μM et 1 mM, alors que le système LATS, transporte le nitrate lorsque sa concentration est supérieure à 0,5 mM. Les gènes codant pour ces transporteurs de nitrate appartiennent à des familles multigéniques (Orsel et al., 2002).

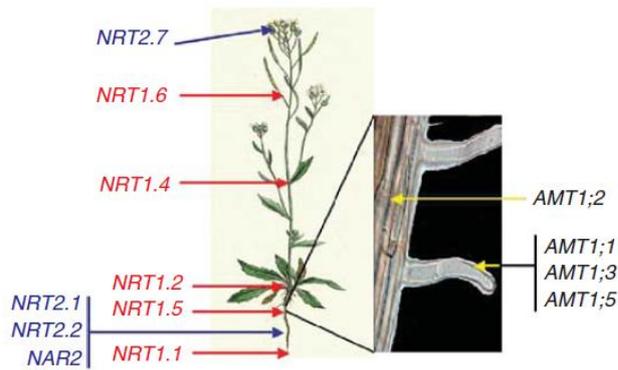


Figure 13 : Localisation de l'expression des gènes codant les transporteurs NRT1, NRT2 et AMT chez *A. thaliana* (Masclaux-Daubresse et al. 2010).

Quatre familles de gènes codant les protéines responsable du transport du nitrate ont été mises en évidence : NRT1 / PTR (53 membres), NRT2 (7 membres), SIC (7 membres), et SLAC1 / Slah (5 membres). Au total, ces quatre familles contiennent 73 gènes, mais seulement 35 ont été caractérisés en détail chez *A. thaliana* et, parmi ceux-ci, 24 codent des transporteurs de nitrate (Krapp et al., 2014) (Fig. 13).

Ces transporteurs ont des localisations, des affinités et des profils d'expression qui diffèrent (Masclaux-Daubresse et al., 2010) .

IV.3.2. L'assimilation du nitrate

L'assimilation du nitrate par les plantes requiert la réduction du NO_3^- en NH_4^+ suivie par l'assimilation du NH_4^+ dans les acides aminés. La réduction du NO_3^- a lieu au niveau des racines et/ou des feuilles, mais elle est séparée spatialement entre le cytoplasme, où la première étape de réduction du nitrate en nitrite a lieu, et les plastes/chloroplastes, où la réduction du nitrite (NO_2^-) en ammonium (NH_4^+) se poursuit (Masclaux-Daubresse et al., 2010). La réduction du NO_3^- en NO_2^- est catalysée par la nitrate réductase (NR) et dépend du pouvoir réducteur fourni par la photosynthèse. Par la suite, le NO_2^- est transporté vers le plaste/chloroplaste où il est réduit en NH_4^+ par la nitrite réductase (NiR).

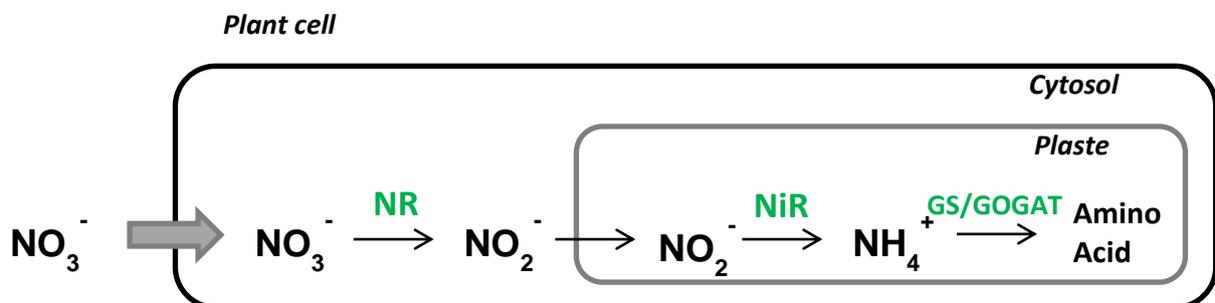


Figure 14 : Représentation schématique de l'assimilation du nitrate dans une cellule végétale. NR, nitrate reductase ; NiR, nitrite réductase ; GS, glutamine synthétase ; GOGAT, glutamate synthase

Le NH_4^+ , issu de la réduction des NO_3^- est essentiellement assimilé au niveau des plastes/chloroplastes. Deux enzymes agissant de façon consécutive sont impliquées dans ce processus: la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT) (Fig. 14). Le cycle porte le nom de ces deux enzymes: le cycle GS/GOGAT. La GS permet la fixation du NH_4^+ sur une molécule de glutamate, formant ainsi la glutamine. La glutamine réagit ensuite avec du 2-oxoglutarate pour former deux molécules de glutamate, cette étape étant catalysée par la seconde enzyme GOGAT. Les squelettes carbonés issus de la photosynthèse sont essentiels à l'incorporation de l'azote inorganique dans les acides aminés. *In fine*, cette assimilation de l'azote du sol consomme jusqu'à 25 % de l'énergie issue de la photosynthèse (Goutouly 2011).

Il existe également une deuxième voie d'assimilation du NH_4^+ catalysée par la glutamate déshydrogénase (GDH) (Fig. 15).

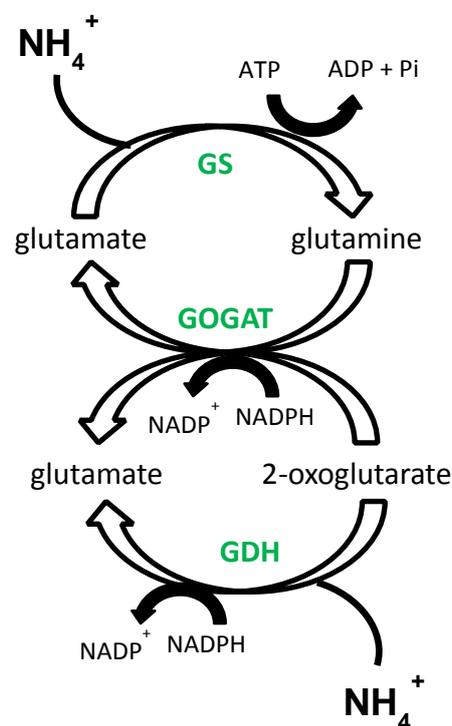


Figure 15 : Représentation schématique du cycle GS/GOGAT
 GS, glutamine synthétase ; GOGAT, glutamate synthase ; GDH, glutamate déshydrogénase

Le devenir du nitrate absorbé au niveau des racines dépend des besoins de la plante en azote. En effet, le NO_3^- absorbé peut être soit réduit en ammonium, soit exporté vers les parties aériennes, ou stocké au niveau des racines et des bois (organes de réserves) afin de reconstituer les réserves de la plante et d'assurer sa pérennité. Le NO_3^- est conservé majoritairement sous forme d'acides aminés dans les vacuoles des cellules des organes de réserve. Ainsi, l'arginine et l'asparagine sont les formes privilégiées de stockage de l'azote (Gaudillère, 1997; Masclaux-Daubresse et al., 2010; Krapp et al., 2011).

L'azote assimilé par les plantes est un élément primordial pour la biosynthèse de nombreux composés, et notamment des acides aminés qui sont des précurseurs de nombreuses voies métaboliques.

IV.3.3. Régulation du métabolisme azoté par les plantes

Pour la majorité des plantes, il est indispensable d'acquérir une quantité d'azote suffisante pour maintenir une croissance optimale. L'absorption est l'étape clé du contrôle par le végétal de son statut azoté, résultat d'un équilibre entre les besoins des parties aériennes et des parties racinaires. Cet équilibre est variable sur l'ensemble du cycle de la Vigne en fonction des dynamiques de croissance des différents organes. Cependant, les disponibilités en azote des sols fluctuent et les plantes s'adaptent pour améliorer leur efficacité d'assimilation dans des situations où l'azote est limitant.

Le nitrate : une molécule signal

Le nitrate, principale forme d'azote minéral utilisée par les plantes, agit également comme une molécule signal qui contrôle de nombreux aspects du métabolisme et du développement (Krouk et al., 2010a). En effet, les plantes ont la capacité d'évaluer les teneurs en NO_3^- présentes dans leur environnement et de déclencher une cascade de signalisation leur permettant de satisfaire à leurs besoins azotés.

Régulation du système racinaire

En cas de carence, la croissance racinaire est stimulée, ce qui favorise l'exploration d'un plus grand volume de sol (Zhang and Forde, 2000). Il a notamment été démontré chez *Arabidopsis* qu'un changement de statut azoté déclenche une voie de signalisation stimulant localement l'allongement des racines latérales. Deux gènes sont particulièrement impliqués dans ce mécanisme : *ANR1*, codant un facteur de transcription de type MADS-box et *NRT1.1* (Remans et al., 2006; Zhang and Forde, 1998). Récemment, il a été démontré que *NRT1.1* faciliterait l'absorption de l'auxine (Krouk et al., 2010). Cette phytohormone stimule entre autres le développement des racines latérales.

Régulation du système de transport

En situation de carence azotée, l'abondance des transcrits de gènes impliqués dans les systèmes de transport HATS augmente. C'est le cas chez *A. thaliana* où les transcrits *NRT2.4* et *NRT2.5* sont plus abondants lors d'une carence azotée (Okamoto et al., 2003; Kiba et al., 2012).

Régulation du système de remobilisation

Dans des conditions de carence azotée, la remobilisation des réserves azotées est accrue. Ainsi, (Peng et al., 2007) ont identifié chez *Arabidopsis* une protéine, NLA (Nitrogen Limitation Adaptation), fortement impliquée dans la remobilisation des ressources azotées en conditions de carence. Dans ces conditions, chez *A. thaliana* les mutants *nla* présentent entre autres, des modifications de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de composés azotés, la dégradation des acides aminés, l'accumulation d'amidon et la sénescence.

V- L'azote chez la vigne

V.1. Phénologie et alimentation azotée de la Vigne

Le cycle de développement de la Vigne peut être divisé en trois grandes phases : une phase de repos hivernal, et deux phases se déroulant de manière simultanée ; la phase de croissance végétative et la phase de développement reproducteur. Il s'étend principalement de mars à novembre dans nos régions (Fig. 16).

La phase de repos hivernal précède la levée de dormance des bourgeons. Chez les plantes pérennes, la levée de dormance nécessite une exposition au froid. Chez la Vigne, ces besoins varient en fonction des variétés (Lavee and May, 1997). Cependant, (Pouget, 1988) indique que les besoins en froid de la Vigne pour la levée de dormance sont d'au moins 7 jours en dessous de 10°C.

La phase de croissance végétative s'étend du débourrement à l'arrêt de croissance. Après la levée de la dormance, le débourrement commence, des bourgeons et des feuilles apparaissent et les pousses se développent. Par la suite, **la phase de développement reproducteur** débute avec l'apparition d'inflorescence à la base des rameaux. La nouaison se caractérise par la transformation des inflorescences en fruits. A ce même stade, la croissance végétative de la vigne continue avec la lignification des rameaux (aoûtement). Par la suite, la taille des baies nouvellement formées augmente jusqu'à la fermeture de la grappe. La véraison marque le commencement de la maturation des baies jusqu'à la maturité. Le cycle végétatif de la Vigne se termine par la chute des feuilles lors des premières gelées et le début du repos hivernal.

Des études réalisées précédemment ont montré qu'une forte disponibilité en azote des sols ou une fertilisation azotée trop importante pouvaient entraîner un retard d'arrêt de croissance de la vigne et un retard dans l'apparition des stades véraison et maturité des baies (Delas, 2000).

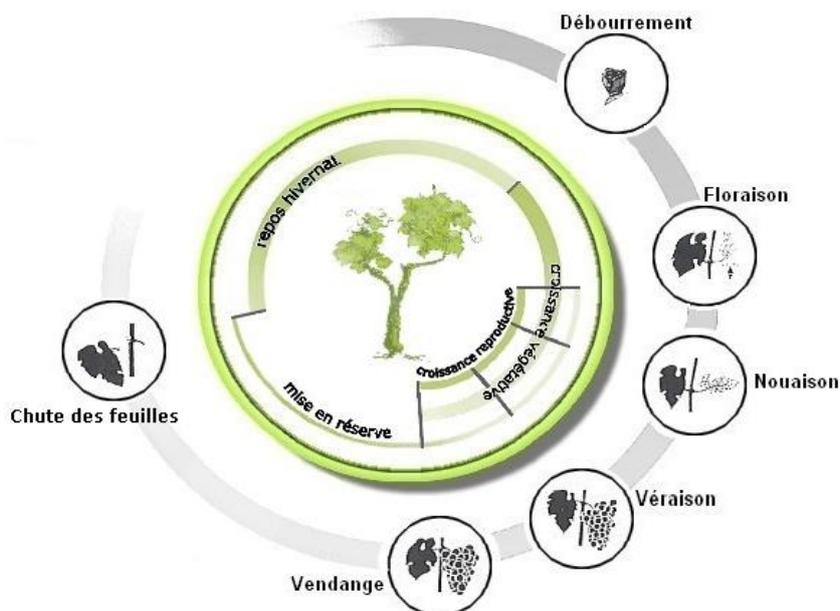


Figure 16 : Cycle de développement de la Vigne

La Vigne, qui consomme entre 20 et 70 kg d'azote/ha/an (Delas, 2010) est l'une des espèces fruitières dont les besoins en azote demeurent les plus faibles (Goutouly, 2011). Une faible partie de ce prélèvement est transportée vers les raisins (une dizaine de kg/ha/an). L'azote nécessaire à la croissance et au développement des organes des plantes pérennes provient d'une part de l'absorption racinaire et d'autre part de la mobilisation de réserves azotées situées dans les organes de stockage tels que les racines et les sarments. Au printemps, au moment de la reprise de croissance, les ressources d'azote et de carbone nécessaires sont principalement issues de la mobilisation des réserves de la Vigne (Conradie, 1980; Wermelinger et al., 1991; Zapata et al., 2004). Cette mobilisation débute au débourrement et atteint un maximum au stade 6-8 feuilles. Lors de cette période, l'absorption de l'azote et du carbone est faible, mais s'accélère progressivement jusqu'à être maximale après la floraison (Zapata et al., 2004). Les réserves d'azote et de carbone peuvent se révéler suffisantes au développement annuel de la surface foliaire d'une Vigne (Glad et al., 1994). De plus, bien que l'alimentation azotée des grappes dépende principalement de l'absorption racinaire pendant la phase de maturation, les formes d'azote stockées dans les organes de réserve peuvent être remobilisées en cas de besoin (Fig. 17). Ce phénomène peut être observé particulièrement au cours de stress environnementaux (Conradie, 1992; Celette, 2007; Keller, 2010) ou lorsque le rapport feuille/fruit est trop faible par rapport à la capacité photosynthétique de la plante (Balasubrahmanyam et al., 1978).

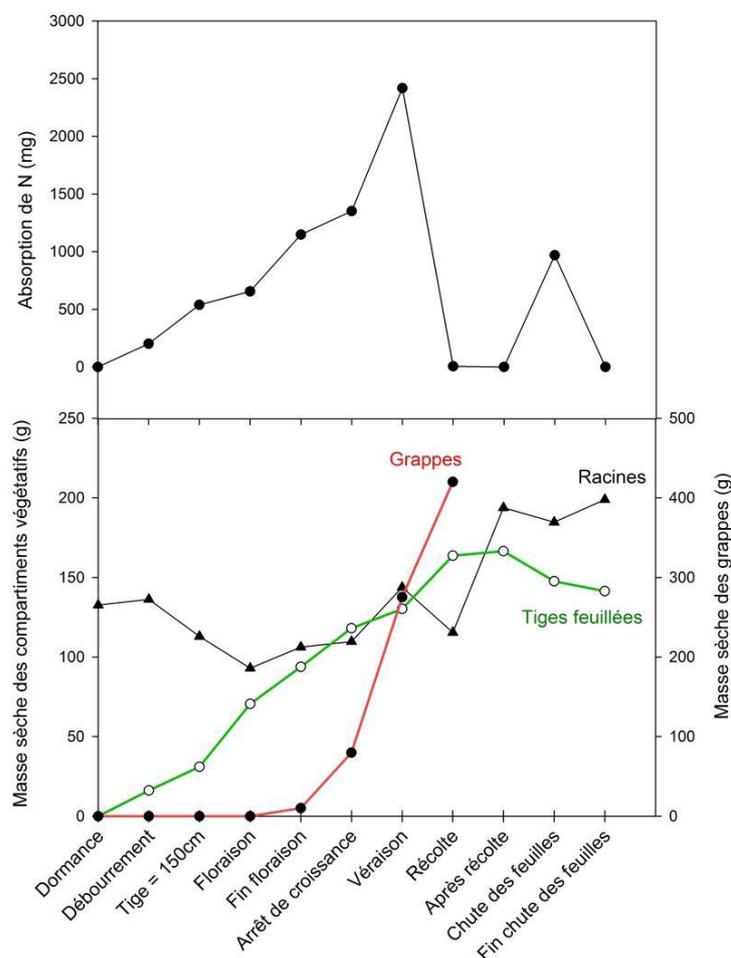


Figure 17 : Absorption de l'azote et biomasse des différents compartiments en fonction du stade de développement de la Vigne (D'après Conradie, 1980).

V.2. Effets de la nutrition azotée chez la Vigne

En fonction du niveau d'alimentation en azote, la constitution du raisin et la qualité du vin peuvent être profondément modifiés (Bell et al. 1979; Spayd et al., 1994; Choné et al., 2001).

Effet d'une carence azotée

Une carence modérée peut s'avérer bénéfique puisqu'elle limite, en premier lieu, la croissance végétative de la vigne, et qu'une vigueur modérée est favorable au potentiel œnologique du raisin. En revanche, une carence trop importante peut entraîner un ralentissement du développement des raisins, une diminution du rendement et de la qualité des fruits. Cela peut notamment affecter la qualité de la vendange en rendant les moûts peu fermentescibles et ralentir la fermentation alcoolique, ce qui entraîne des défauts olfactifs (Ferrari, 2002). Les effets d'une carence azotée chez la plupart des végétaux, dont la Vigne, se caractérisent par un symptôme de jaunissement des feuilles dû à une dégradation de la chlorophylle (Bell et al., 1979; Kliewer, 1991; Bell and Robson, 1999).

Des résultats antérieurs obtenus soit au Laboratoire et dans d'autres équipes démontrent qu'une faible disponibilité en azote modifie la composition des baies. Elle diminue notamment la teneur en acides aminés et des acides organiques (Bell et al., 1979; Spayd et al., 1994a; Hilbert et al., 2003) , et augmente les teneurs des sucres (Barbier, 2004a). De plus, comme décrit précédemment, la carence azotée affecte la teneur en composés phénoliques et notamment la teneur et le profil des anthocyanes.

Effet d'un excès d'azote

Les effets d'un excès d'azote sur la physiologie de la Vigne sont bien connus. Un excès d'azote augmente la vigueur et notamment la longueur des rameaux primaires et secondaires, la surface foliaire et le poids de bois de taille (Keller, 2010a; Schreiner et al., 2013a). De plus, une forte disponibilité en azote ralentit la dégradation de la chlorophylle et la sénescence des feuilles des vignes (Keller and Hrazdina, 1998). Cependant, une alimentation azotée trop importante peut favoriser le développement du champignon *Botrytis cinerea* à l'origine de la pourriture grise (Keller et al., 2001).

Lors d'un excès d'azote, la taille et la masse des baies augmentent, ce qui accroît les rendements (Conradie, 1986; Keller et al., 2001). La composition des baies est elle aussi modifiée lors d'un apport d'azote. En effet, différentes études ont montré une augmentation de la teneur en acides aminés (Hilbert et al., 2003a), et organiques (Conradie, 1986; Ruhl et al., 1992) et une diminution de la teneur en sucres dans la baie (Ruhl et al., 1992; Keller and Hrazdina, 1998; Conradie, 2001; Hilbert et al., 2003). En outre, un excès d'azote retarde l'arrêt de croissance des baies au détriment de la synthèse des composés phénoliques (Delas, 2000).

Une gestion optimale des ressources azotées est donc nécessaire afin de ne pas favoriser un développement végétatif excessif au détriment de la qualité des fruits tout en maintenant une teneur en azote suffisante dans les raisins et les moûts pour maintenir une fermentescibilité optimale.

V.3. Stratégies de régulation de l'azote au vignoble

V.3.1. La fertilisation

Les apports d'azote minéral et organique sur la vigne sont raisonnés en fonction des objectifs de rendement et de qualité, du comportement végétatif de la vigne (vigueur, production..), du mode d'entretien des sols et de la sensibilité aux maladies. Deux types d'apports existent, les apports par pulvérisations foliaires, et les apports au sol d'engrais azoté minéral. **Les fertilisations foliaires** ont l'avantage d'agir plus rapidement que les applications au sol, mais leurs effets ne sont que temporaires. L'azote foliaire est fréquemment appliqué sous forme d'urée et est rapidement absorbé par le feuillage, permettant ainsi de redonner de la couleur et de la vigueur aux cultures carencées. **Les applications au sol** permettent un enrichissement des sols et un effet à long terme. Cependant, la fertilisation azotée du sol doit prendre en compte les phases du développement et le besoin en azote de la Vigne. Afin que la fertilisation soit efficace, l'apport d'azote est généralement prodigué lors du stade 3-5 feuilles. De plus, il est généralement conseillé de fractionner les apports d'engrais, pour permettre une utilisation optimale de l'azote par les plantes et éviter un effet de coulure généralement observé lors d'un apport trop important. De manière officielle, l'INAO (2000) conseille de limiter la fertilisation azotée au sol à 50 unités/ha/an.

V.3.2. L'enherbement

L'enherbement consiste à associer une culture intercalaire herbacée à la vigne. Lors d'un enherbement, seule la production des vignes est valorisée par le viticulteur. Par conséquent, la gestion de l'enherbement vise, en premier lieu, à optimiser la production de la vigne et sa qualité. Différentes formes d'enherbement sont utilisées, mais le gazon est le plus utilisé lors d'enherbement au vignoble.

L'un des problèmes actuels récurrents de la viticulture est la trop grande vigueur végétative de la vigne. L'enherbement est alors utilisé pour diminuer la vigueur et le rendement des vignes (Rodriguez-Lovelle et al., 1997; Dry and Loveys, 1998). La concurrence pour l'eau a souvent été mise en avant pour expliquer cette diminution de vigueur et de production (Morlat et al., 1987), mais la compétition pour les ressources minérales du sol et notamment pour l'azote est aujourd'hui envisagée. En effet, l'enherbement consomme l'azote minéral et l'eau présents dans la zone de sol explorée par son système racinaire et diminue donc la disponibilité de l'azote minéral du sol pour la Vigne (Maigre and Murisier, 1992; Thiebeau et al., 2005).

Dans la région aquitaine, la chambre d'Agriculture de Gironde estime que 20 à 30% de la superficie du vignoble est enherbée, soit 20-30 000 ha.

V.4. Relation entre stress azoté et stress hydrique

L'eau prélevée dans le sol par les racines permet l'absorption de nombreux éléments minéraux. Notre hypothèse est qu'une partie des effets entraînés par le déficit hydrique est en fait due à un déficit d'absorption et d'assimilation de l'azote. En effet, les effets du statut hydrique relatés dans la littérature, notamment sur la biosynthèse des composés phénoliques (augmentation de la teneur en anthocyanes et en flavonols) sont similaires aux

effets observés lors d'un déficit azoté. Comme décrit précédemment, chez le Cabernet Sauvignon, l'augmentation de l'accumulation des anthocyanes induite par le stress hydrique est corrélée avec une augmentation de l'expression des gènes codant les enzymes F3H, DFR, UFGT et OMT et l'augmentation de la quantité des transcrits des facteurs de transcription *MYBA1* et *MYBA2* (Castellarin et al. 2007; Deluc et al., 2009). Des observations similaires ont été faites lors d'un déficit azoté (Soubeyrand et al., 2014). De plus, sur boutures non greffées de Cabernet Sauvignon, de nombreux gènes impliqués dans l'assimilation et le métabolisme de l'azote, tels que *GLU1*, *NTL1*, *NIA2* et *GS1* sont différenciellement exprimés dans les racines lors d'un déficit hydrique (Cramer et al., 2006).

VI- Projet de thèse

L'objet de cette thèse est d'étudier les mécanismes impliqués dans la régulation de la synthèse des flavonoïdes des baies notamment en réponse à la nutrition azotée. Des plantes de différents cépages importants pour le vignoble français ont donc été soumises à des niveaux d'alimentation azotée différente et deux dispositifs expérimentaux complémentaires ont été utilisés.

Le système racinaire jouant une importance majeure dans l'absorption, la réduction, le transport et le stockage de l'azote, une première expérimentation de plantes en pots en conditions semi-controlées composée de différentes combinaisons porte-greffe/greffon a été mise en place.

Puis, afin de mettre en évidence les mécanismes de régulation de l'azote sur la composition de la baie dans des conditions normales de viticulture, une seconde expérimentation menée au vignoble a été mise en place.

La caractérisation physiologique et agronomique des plantes a été accompagnée d'une analyse détaillée du contenu des baies au cours de leur développement, soit par des analyses ciblées, soit par des analyses non ciblées permettant d'avoir une vision plus globale des réponses métaboliques. Dans la même perspective, ce travail a été complété par une analyse transcriptomique non ciblée (RNA-Seq) de l'expression du génome dans les baies.

Les résultats sont analysés en termes des effets des interactions porte-greffe/variété/azote sur la réponse des baies, et comparés aux données de la littérature disponibles sur le stress hydrique.

Avant de les décrire et de les discuter, le chapitre suivant détaille d'abord les principaux dispositifs et méthodes expérimentales que nous avons utilisés.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

I- Expérimentation en conditions semi-contrôlées

I.1. Stratégie expérimentale

Afin d'étudier l'impact de l'azote sur différentes combinaisons porte-greffe/greffon, une expérimentation en conditions semi-contrôlées a été menée en 2013 et 2014. Deux cépages (Cabernet Sauvignon, CS et Pinot noir, PN) ont été greffés en 2011 sur deux génotypes de porte-greffe (110R et RGM). Les 120 plantes ont été cultivées à l'extérieur afin d'éviter le biais climatique apporté par une culture sous serre, et placées en chambre froide pendant la saison hivernale. Les plantes ont été cultivées dans des pots de 10 L sur un mélange de terreau, perlite et sable (50/20/30 v/v). Les quatre combinaisons porte-greffe/greffon ont été fertirriguées avec trois solutions nutritives différant exclusivement par leur concentration en azote (0.8 mM ; 1.4 mM ; 3.6 mM). Ces niveaux d'apport d'azote ont été choisis en fonction d'expérimentations précédemment réalisées au sein de notre laboratoire (Hilbert et al., 2003; Lecourt, 2013) afin d'atteindre des teneurs habituellement observées au vignoble dans le cas respectivement de carence en N, de nutrition non limitante en N et d'excès en N. Quatre phases d'irrigation ont été appliquées. A la sortie de la chambre froide, une première phase d'irrigation à l'eau a été appliquée pendant 15 j. Puis, toutes les plantes ont été irriguées avec la même solution nutritive (solution N : 1.4 mM d'azote) jusqu'à la nouaison. Les plantes ont ensuite été irriguées pendant 4 j avec de l'eau, puis avec les différentes solutions nutritives particulières à chaque modalité azotée (N- : 0.8 mM ; N : 1.4 mM ; N+ : 3.6mM). Chaque combinaison porte-greffe/greffon/nutrition azotée comporte 10 plantes. La vigueur des plantes a été estimée par détermination de la surface foliaire et par la masse des bois de taille. Le statut azoté des plantes a été évalué par le dosage de l'azote contenu dans les limbes et les pétioles à la mi-véraison, par N-tester au cours de la maturation, et par le dosage de l'azote dans les moûts. Le statut hydrique des plants a été évalué par la méthode du δC^{13} .

Les plantes ont été traitées avec des pesticides, des insecticides et des fongicides à partir du mois de mai et toutes les deux semaines jusqu'aux vendanges. A partir du stade petit pois, un filet a été placé au-dessus de l'expérimentation pour empêcher les dégâts éventuels causés par les oiseaux. Les baies ont été prélevées à la mi-maturité et à maturité afin d'être analysées (étude métabolomique et transcriptomique).



Figure 18 : Dispositif expérimental en conditions semi-contrôlées

I.2. Solutions nutritives

L'azote des solutions nutritives est présent sous forme de nitrate et d'ammonium (Tableau 1). Les ajouts de sels de nitrate ou d'ammonium sous leurs différentes formes (KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) apportent la concentration d'azote souhaitée mais pourraient altérer les concentrations des autres éléments (Ca^{2+} , K^+ ou P). Les concentrations des autres sels de macronutriments ont donc été adaptées afin que seules les concentrations en azote varient entre les différentes solutions nutritives. Les plantes ont été irriguées avec 1.2 L de solution / jour.

Tableau 1 : Composition et concentration des éléments des différentes solutions nutritives

	Eléments		Concentration (mM)		Macroéléments
Solution carencée N- (0,8 mM N)	N		0.915	Carence N- 0,8 mM N	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄ CaCl ₂ .2H ₂ O Sequestrène K ₂ HPO ₄ CaSO ₄
	P		0.565		
	K		1.125		
	Ca		0.387		
	Mg		0.007		
	S		0.453		
Solution témoin N (1,4 mM N)	N		1.529	Témoin N 1,4 mM N	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄ CaCl ₂ .2H ₂ O Sequestrène K ₂ HPO ₄
	P		0.565		
	K		1.125		
	Ca		0.355		
	Mg		0.007		
	S		0.499		
Solution en Excès N + (3,6 mM N)	N		3.672	Excès N+ 3,6 mM N	(NH ₄) ₂ HPO ₄ KNO ₃ Sequestrène Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄ CaCl ₂ .2H ₂ O
	P		0.563		
	K		1.124		
	Ca		0.318		
	Mg		0.007		
	S		0.499		
	Cl		0.300		

I.3. Matériel végétal

Quatre combinaisons porte-greffe/greffon ont été utilisées lors de cette expérimentation. Les deux cépages *Vitis vinifera* L. Cabernet Sauvignon (clone 169) et *Vitis vinifera* L. Pinot Noir (clone 777) ont été greffés sur *V.berlandieri* X *V. rupestris* cv. 110 Richter (clone 152) ou *V. riparia* cv. Gloire de Montpellier (clone 1). Des plantes âgées d'une année ont été commandées auprès de pépiniéristes (Mercier pour le Cabernet -Sauvignon, et Guillaume pour le Pinot noir). Les deux génotypes de porte-greffe confèrent des vigueur contrastées à leur greffon. Les porte-greffes 110 Richter (110R) et Riparia Gloire de Montpellier (RGM) confèrent respectivement une vigueur forte et une vigueur faible à leur greffon (Tandonnet et al., 2010). A leur réception au laboratoire, les plantes ont été réhydratées 24h dans l'eau, puis plantées dans des pots de 10 L remplis de sable. Elles ont été cultivées à l'extérieur puis placées en chambre froide durant les saisons hivernales (décembre à Mars 2012 et 2013).

I.4. Prélèvements et préparation des échantillons

Pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon/nutrition azotée, les plantes ont été réparties en trois groupes correspondant à trois répétitions biologiques. Pour chaque répétition (10 plants), 25 baies ont été prélevées au stade mi-maturité (10 jours après la véraison) et maturité ($S/AT > 45$) et plongées immédiatement dans l'azote liquide. Les baies ont ensuite été conservées à -80°C . Pour les analyses métabolomiques, la pellicule, la pulpe et les pépins ont été séparés, broyés et lyophilisés. La suite des analyses a été effectuée à partir des poudres lyophilisées. Pour les analyses transcriptomiques, les baies entières ont été broyées sous azote et conservées à -80°C . La suite des analyses a été effectuée sur poudre congelée.

II- Expérimentations aux vignobles

II.1. Stratégie expérimentale

Afin d'étudier l'impact d'une fertilisation azotée sur la composition des baies, deux expérimentations ont été menées au vignoble en 2013 et 2014. Pour limiter les effets de l'azote apporté l'année précédente, les expériences conduites en 2014 ont été réalisées sur des parcelles différentes de celle utilisées en 2013. Les parcelles choisies en 2014 ont les mêmes caractéristiques que celles de l'année précédente. Deux cépages et trois régimes azotés ont été comparés à une modalité témoin (sans apport), en absence de contrainte hydrique: deux fertilisations azotées ajoutées au sol (50 unités d'azote par hectare (U/ha) et 100 U/ha) et une pulvérisation foliaire (15 U/ha). Les vignes ont été conduites selon les pratiques habituellement utilisées par les viticulteurs. Les baies ont été récoltées à mi-véraison, véraison, et maturité. Chaque parcelle est constituée de 16 rangs de 45 plants. Chacune des modalités est appliquée sur des placettes de 10 ceps et est répétée quatre fois (Fig. 20). Les différentes modalités sont séparées par des rangs de garde. Ces parcelles ont été choisies en fonction de leur faible teneur en azote assimilable dans le moût ($< 150 \text{ mg/L}$) de l'année précédant l'expérimentation. L'apport d'azote au sol est effectué en deux fois afin d'éviter un effet de coulure souvent observé lors d'un ajout trop important d'azote. Pour les fertilisations de 50 et 100 U/ha ajoutées au sol, une première application respectivement de 25 kg et de 50 kg d'azote/ha (sous forme de nitrate d'ammonium 33%) a été effectuée après le débourrement. La deuxième fertilisation a été appliquée après la floraison. La fertilisation foliaire a été effectuée en trois passages: à la nouaison, à la fermeture de la grappe et à la mi-véraison (5 U/ha/passage). L'engrais foliaire liquide (Folur™, NutriPerformance, Tradecorp, France) utilisé est une solution uréique (urée à 222 g/L) à faible teneur en Biuret ($< 0.55 \text{ g/L}$).

	Rang de garde															
	Pieds de garde															
	Témoin															
	N sol 50 U/ha															
	N sol 100 U/ha															
	N foliaire 15 U/ha															

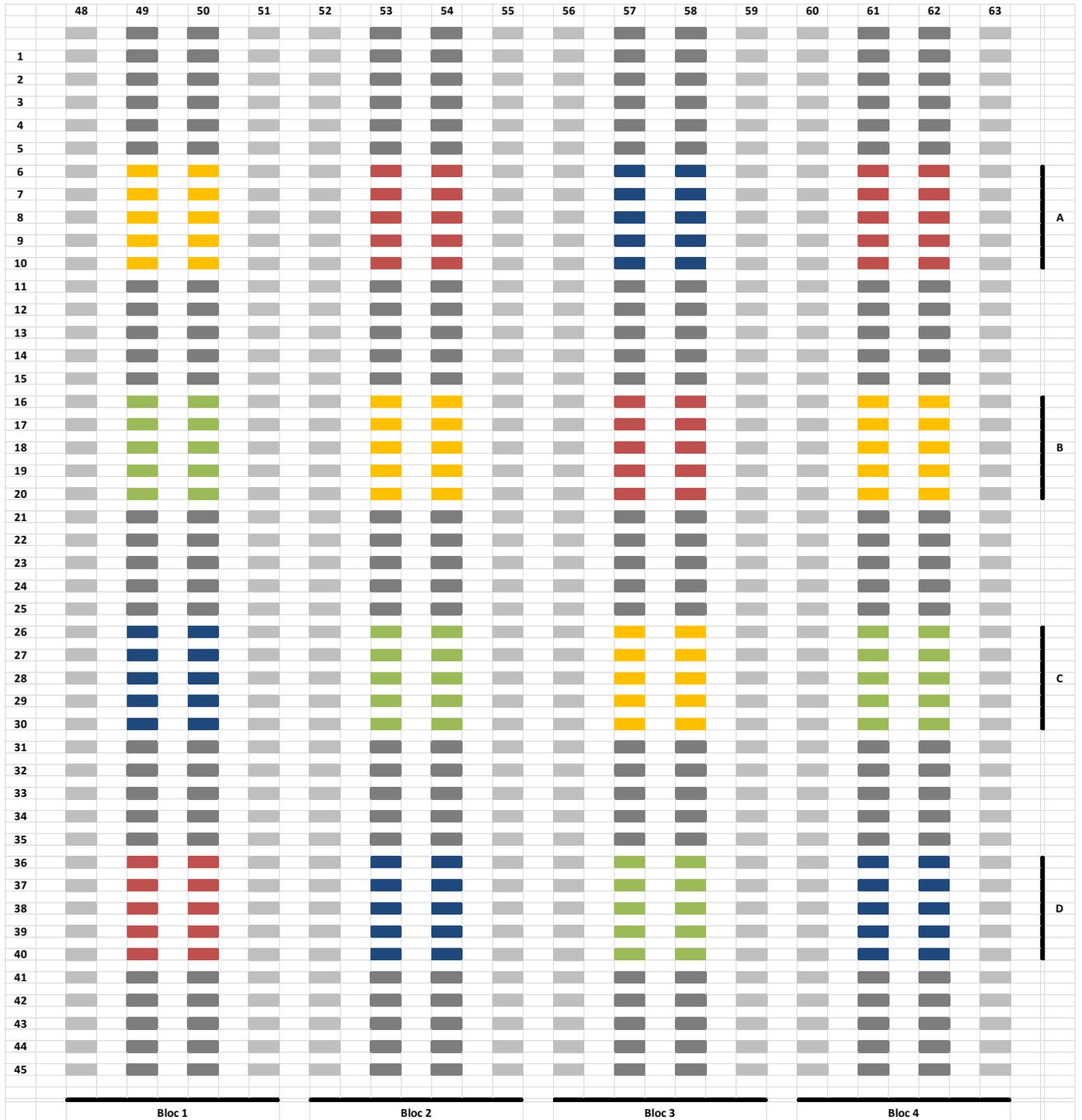


Figure 19 : Dispositif des parcelles expérimentales aux vignobles

II.2. Matériel végétal

Les deux cépages *V. vinifera* L. Cabernet Sauvignon (CS, clone 169) greffé sur *V. riparia* X *V. rupestris* cv. 101-14 Millardet et de Grasset et *V. vinifera* L. Pinot Noir (PN, clone 374) greffé sur *V. riparia* X *V. rupestris* cv. 3309 Couderc ont été utilisés. Les expérimentations sur le CS ont été réalisées à Bordeaux au Château Couhins INRA, et celles sur le PN ont été réalisées à Sancerre au Domaine Henri Bourgeois.

À Bordeaux, le CS a été cultivé sur une parcelle à sol graveleux plantée en 2006, et le moût à maturité était caractérisé en 2012 par une teneur en azote assimilable comprise entre 100 à 110 mg/L.

À Sancerre, la parcelle de PN utilisée a été plantée en 1990 sur un sol de silex, et le moût qui en est issu contenait des teneurs en azote assimilable comprises entre 75 et 95 mg/L en 2012. Ces deux cépages ont été choisis en fonction de leur profil d'accumulation des anthocyanes, le CS ayant des formes d'anthocyanes acylées absentes chez le PN (Fong et al., 1971). Pour éliminer toute interférence potentielle d'un déficit hydrique, chacune des parcelles expérimentales a été irriguée tout au long de la saison (8 L/jour/plant).

II.3. Prélèvements et préparation des échantillons

Pour chacune des parcelles expérimentales, les différentes modalités azotées ont été répétées quatre fois, chaque répétition correspondant à un ensemble de 10 pieds. Pour chaque répétition, 25 baies ont été prélevées au stade mi-véraison (50 % de baies vérées), véraison (100 % de baies vérées) et maturité (S/AT>45) et plongées immédiatement dans de l'azote liquide. Les baies ont ensuite été conservées à -80°C. Pour les analyses des différents métabolites, la pellicule, la pulpe et les pépins ont été séparés et broyés. La suite des analyses a été effectuée à partir des poudres congelées ou lyophilisées. Pour les analyses transcriptomiques, les baies entières ont été broyées sous azote et conservées à -80 °C. La suite des analyses a été effectuée sur poudre congelée.

III- Méthodes agronomiques

III.1. Indicateur de contrainte hydrique

Afin de vérifier l'existence éventuelle d'une contrainte hydrique, des mesures de potentiel de tige ont été effectuées sur les expérimentations aux vignobles et des mesures du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ont été effectuées sur l'expérimentation plantes en pots.

III.1.1. Mesure du potentiel de tige

Le potentiel hydrique de tige d'une dizaine de pieds répartis aléatoirement dans les parcelles expérimentales aux vignobles a été mesuré de la nouaison à la récolte. Le potentiel hydrique de tige est mesuré au cours de la journée, sur des feuilles recouvertes 3 h avant la mesure par un sachet étanche et opaque. À l'obscurité, les stomates de la feuille sont fermés et le potentiel hydrique de la feuille s'équilibre avec le potentiel hydrique du rameau. Cette mesure permet d'estimer l'état hydrique de la plante entière en cours de journée (Choné et al., 2000). Le potentiel hydrique est alors mesuré en plaçant chaque feuille dans une

chambre à pression, reliée à une bouteille d'azote sous pression. Seul le pétiole sort à l'extérieur de la chambre par un petit orifice. La pression dans la chambre est augmentée progressivement, jusqu'à l'apparition de sève sur la section du pétiole. La pression exercée nécessaire est alors notée et correspond au potentiel hydrique (Choné et al., 2000).

III.1.2. Mesure du $\delta_{13}\text{C}$

Le rapport des isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (appelé $\delta_{13}\text{C}$) de chacune des combinaisons porte-greffe/greffon/modalité azotée a été mesuré. La mesure du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ sur les sucres du moût à maturité constitue un indicateur global de la contrainte hydrique subie par la vigne au cours de la période de maturation (Van Leeuwen et al., 2001). La mesure isotopique du carbone 13 est un indicateur physiologique du régime hydrique des plantes. L'isotope ^{13}C représente environ 1 % du carbone dans le CO_2 atmosphérique. L'isotope ^{12}C est préférentiellement utilisé lors de la photosynthèse. La contrainte hydrique, en provoquant la fermeture des stomates pendant une partie de la journée, ralentit les échanges de CO_2 entre la feuille et l'atmosphère et limite ainsi la différenciation isotopique. Autrement dit, une plante qui subit une contrainte hydrique absorbe proportionnellement plus de ^{13}C . Le contenu isotopique du carbone de chaque échantillon a été déterminé à l'aide d'un spectromètre de masse à flux continu par un laboratoire prestataire. Les résultats sont exprimés relativement par comparaison à la référence PDB (Pee Dee Belemite) comme décrit par (Farquhar et al., 1989).

III.2. Estimation du statut azoté des vignes

Différents indicateurs existent pour estimer le statut azoté de la Vigne. Pendant ma thèse, trois approches principales ont été utilisées : l'analyse de l'azote assimilable par les levures dans le moût par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ou spectroscopie IRTF, l'analyse de l'azote total présent dans différents organes (limbes, pétioles et baies) et utilisation de l'indice N-tester dans les feuilles. Chacune de ces méthodes est décrite ci-dessous.

III.2.1 Azote assimilable du moût

Pour l'expérimentation sur plantes en pots, une centaine de baies a été prélevée à maturité. Les baies ont été prélevées sur l'ensemble des grappes pour chaque combinaison porte-greffe/greffon/modalité azotée. Pour les expérimentations aux vignobles, pour chacune des combinaisons azotées, une centaine de baies a été prélevée à différents stades de maturation. Les jus ont été extraits à l'aide de deux lames en métal (Bagmixer 400W-interscience, France) et filtrés (Lateral BagFilter- interscience, France) avant d'être centrifugés 10 min à 5000 g à température ambiante. Le surnageant obtenu est ensuite analysé à l'aide d'un WineScan® Auto analyser (FOSS France) en suivant la méthode recommandée par le fabricant.

III.2.2. Azote total des limbes et des pétioles

Pour chaque combinaison de chacune des expérimentations, dix limbes et pétioles, opposés à une grappe, ont été prélevés à la mi-véraison, séchés et broyés. La teneur en azote total des poudres a été déterminée par la méthode de DUMAS (1831) (Bremner et al., 1996). Cette méthode consiste en une combustion totale des échantillons sous oxygène. Les gaz produits sont réduits par du cuivre puis desséchés. L'azote est ensuite quantifié à l'aide d'un auto-analyser (Flash EA 1112 series, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Ces analyses ont été réalisées par le Laboratoire Interaction Sol Plante Atmosphère (ISPA, UMR INRA 1391, INRA Villenave d'Ornon).

III.2.3. Azote total des baies

Pour les expérimentations aux vignobles, 5 baies ont été prélevées à la fermeture de la grappe, mi-véraison, véraison, mi-maturité et maturité pour chacune des combinaisons azotées. Après séchage et broyage, la teneur en azote total des poudres a été déterminée par la méthode de DUMAS (1831) comme décrit auparavant (Bremner et al., 1996). Ces analyses ont été réalisées par l'Unité de Services et de Recherche en Analyses Végétales et Environnementales (USRAVE, Département Environnement et Agronomie, INRA Villenave d'Ornon, France).

III.2.4. Mesure de l'indice N-tester

Le N-Tester (Norsk-hydro, Nanterre, France) mesure optiquement la teneur en chlorophylle des feuilles, qui est fortement corrélée à l'état de nutrition azotée de la plante. Cette mesure permet donc de réaliser un diagnostic rapide du statut azoté des plantes. Des mesures ont été effectuées au cours de la maturation sur chacune des expérimentations sur 30 feuilles primaires des différentes combinaisons.

III.3. Estimation de la vigueur

III.3.1. Surface foliaire

La mesure de la surface foliaire en fin de croissance végétative constitue un bon moyen d'évaluation de la vigueur de la vigne. Elle est fondée sur la corrélation entre la longueur d'un rameau et la somme des surfaces de chaque feuille de ce rameau (Mabrouk et al., 1997). Pour chaque cépage, les surfaces foliaires de dix rameaux primaires et dix rameaux secondaires ont été mesurées à l'aide d'un planimètre. Des courbes étalons de la surface foliaire en fonction de la longueur des rameaux pour chaque cépage ont été réalisées. Par la suite, les longueurs des rameaux primaires et secondaires de trois ceps par modalité d'azote ont été mesurées et ont permis de déterminer la surface foliaire de chaque pied.

III.3.2. Masse des bois de taille

La vigueur de la vigne peut aussi être estimée par la mesure de la masse des bois de taille. Concernant l'expérimentation des plantes en pots, la masse des bois de taille de chaque plante a été mesurée. Sur les expérimentations aux vignobles, des fagots de bois de tailles ont été réalisés pour chaque placette et pesés.

IV- Méthodes biochimiques

IV.1. Principe d'analyse métabolomique

La métabolomique est la caractérisation de molécules organiques de petite taille (< 1500 Da) (les métabolites) dans un système biologique. Les métabolites représentent les produits intermédiaires et finaux du métabolisme incluant les métabolites primaires (comme par exemple, les sucres, les acides aminés, les acides organiques et les acides gras) et les métabolites secondaires (par exemple, les phénylpropanoïdes et les alcaloïdes). Cet ensemble de métabolites est nommé métabolome.

Deux types d'approches existent en métabolomique, ciblée et non ciblée. L'approche ciblée permet l'analyse de familles de métabolites dont la connaissance préalable est requise, ce qui constitue une limite. Des stratégies non ciblées ont donc été développées. L'approche métabolomique non ciblée permet d'analyser sans *a priori* et de manière quasi exhaustive le profil métabolique global d'une matrice biologique. Le choix de l'utilisation d'une de ces deux approches dépend de la question scientifique posée et de la sensibilité voulue. Lors de ce projet, nous avons choisi d'utiliser une approche métabolomique non ciblée afin de bénéficier d'une information globale de l'impact de l'azote sur le métabolome de la baie de raisin.

Les méthodes analytiques les plus couramment utilisées en métabolomique non ciblée sont la spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la Spectrométrie de Masse (MS). Ces deux méthodes sont des techniques d'analyses à haut débit. La RMN permet l'analyse non destructive et spécifique d'extraits biologiques ainsi que la détection quantitative de différents groupes de métabolites (Kim et al., 2010, 2011), en fournissant également des informations structurales, y compris les détails stéréochimiques (Seger and Sturm, 2007). Cependant, la RMN est une méthode peu sensible comparée aux approches fondées sur la spectrométrie de masse. En effet, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est l'une des techniques les plus sensibles et résolutive (Combourieu, 2007)(Fig. 20). Pour notre travail, nous avons donc choisi d'utiliser cette méthode d'analyse afin de détecter un plus grand nombre de biomarqueurs.

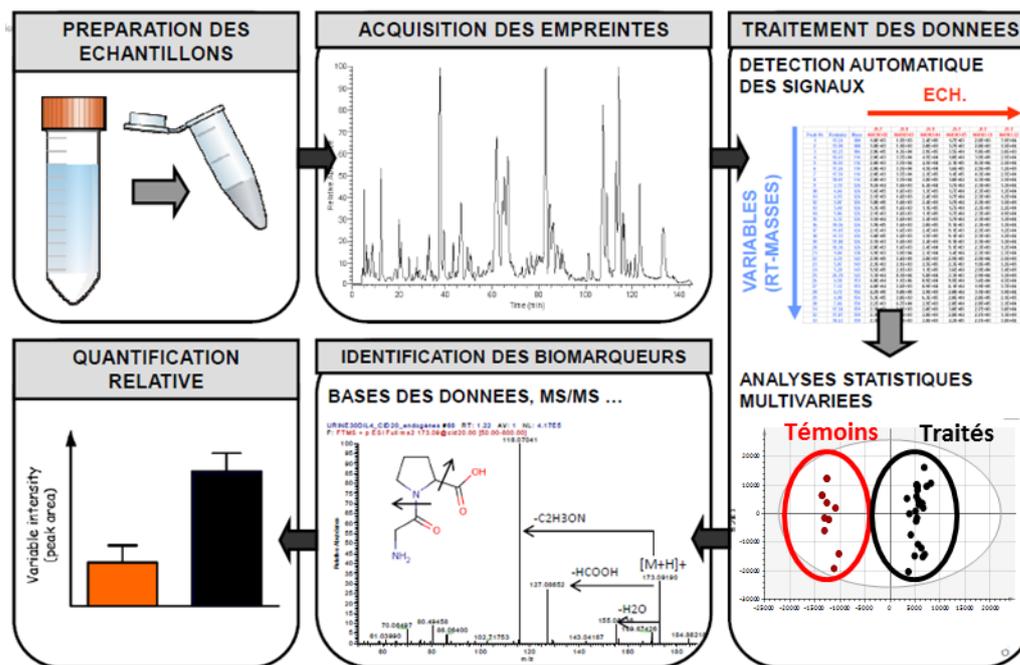


Figure 20 : Principales étapes lors d'une analyse métabolomique par LC-MS (d'après Roux, 2011)

IV.1.1 Techniques analytiques

IV.1.1.1. La Chromatographie Haute Performance

La chromatographie en phase liquide (CPL) est une méthode de séparation de constituants d'un mélange. Elle utilise une phase dite « stationnaire » immobilisée dans une colonne et une phase « mobile » qui se déplace à travers la phase stationnaire. Les composés sont injectés en tête de colonne ; ils interagissent alors avec les phases stationnaire et mobile, et chaque composé à séparer présente un coefficient de distribution différent entre les deux phases. Ils sont donc plus ou moins retenus par la phase stationnaire de la colonne et plus ou moins élués rapidement par la phase mobile. L'efficacité obtenue en CPL est généralement plutôt faible, mais l'utilisation d'une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (jusqu'à 1.8 μm) peut en partie pallier cet inconvénient. En effet, dans ce cas l'efficacité de la méthode est améliorée, mais le débit de la phase mobile percolant à travers la phase stationnaire génère une pression qui peut être très élevée. On parle alors de chromatographie liquide à haute pression ou haute performance. Le système HPLC est composé d'un injecteur permettant l'introduction du mélange à séparer, d'une pompe distribuant à débit constant la phase mobile à travers la phase stationnaire, d'un détecteur traversé par l'éluât et d'un système d'acquisition.

IV.1.1.2. La source d'ionisation (ESI)

La source d'ionisation du spectromètre de masse permet l'évaporation et l'ionisation des analytes contenus dans un échantillon. Plusieurs méthodes d'ionisation sont disponibles et leur choix d'utilisation dépend des propriétés physicochimiques des molécules à étudier ainsi que des renseignements voulus. La source d'ionisation utilisée lors de cette étude est l'ionisation par électrospray (ESI). Cette ionisation consiste à pulvériser une solution, à ioniser les espèces présentes et à en assurer l'évaporation en appliquant un champ électrique à pression atmosphérique. Plus exactement, une différence de potentiel est appliquée entre un fin capillaire (le nébuliseur) et une contre-électrode. En mode d'ionisation positive par exemple, les ions chargés positivement présents dans l'électrolyte migrent et se séparent à l'extrémité du capillaire. Les répulsions entre les charges positives étirent le ménisque et forment un « cône de Taylor » qui se transforme en fines gouttelettes au fur et à mesure que le champ électrique augmente. Le solvant contenu dans les gouttelettes est alors évaporé. Cette évaporation provoque le rétrécissement des gouttelettes et leur fission. A l'issue de ce processus, de petites gouttelettes ne contenant qu'un seul ion sont formées et évaporées. Cet ion entre ensuite dans le spectromètre de masse (Fig. 21).

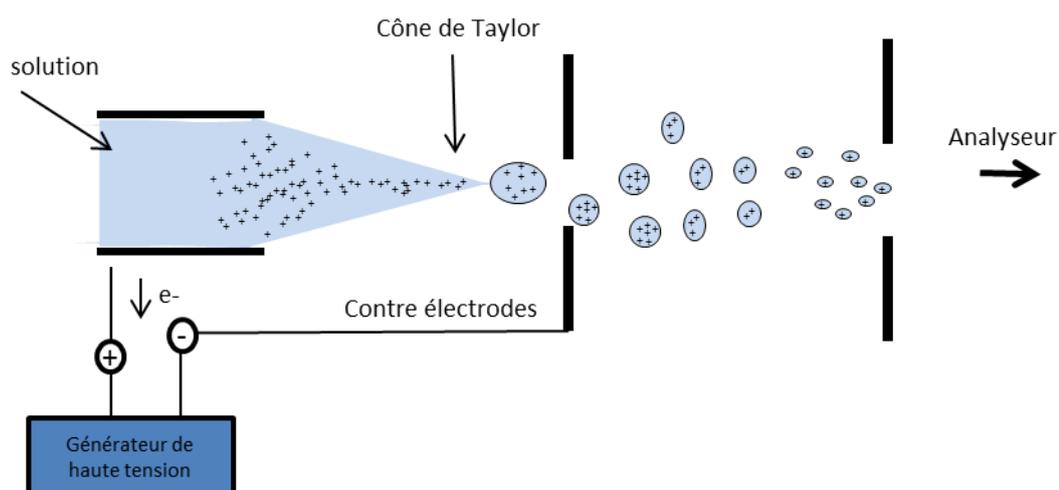


Figure 21 : Représentation schématique simplifiée du fonctionnement d'une source électrospray en mode positif

IV.1.1.3. Le spectromètre de Masse, trappe à ions

L'analyseur piège à ions permet l'identification, la caractérisation et la quantification de composants. Les ions formés par électrospray entrent dans l'analyseur et sont séparés selon leur rapport masse/charge. Les trappes à ions se composent de deux électrodes; une électrode annulaire recouverte de part et d'autre de l'espace central par une électrode extérieure de géométrie hyperbolique (Fig. 22).

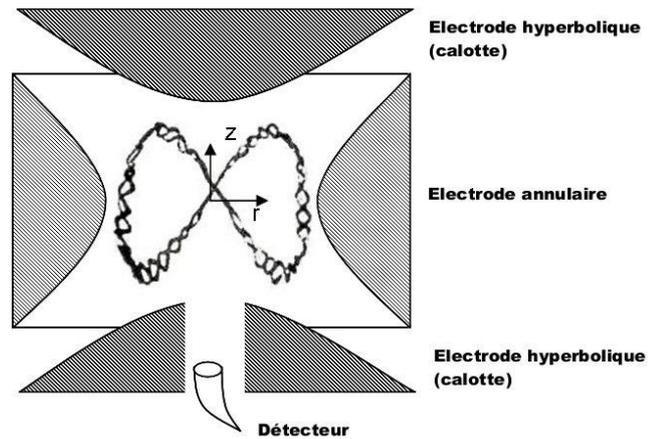


Figure 22 : Représentation schématique d'un analyseur

Un champ électrostatique continu est appliqué aux électrodes. Les ions injectés tangentiellement à l'électrode centrale sont piégés autour d'elle par la force électrostatique. Le mouvement des ions est alors circulaire autour de l'électrode centrale dans le plan (xy) et oscillatoire selon l'axe z. La fréquence oscillatoire de chaque ion est spécifique et liée à leur rapport m/z . Les ions de différent rapport m/z sont simultanément présents dans la trappe. Les ions sont ensuite sélectivement expulsés du piège selon leur rapport m/z vers le détecteur par déstabilisation de leur trajectoire. Ce type d'analyseur peut être utilisé en mode tandem. L'ion parent est sélectionné par expulsion de tous les autres ions, et fragmenté par collision ou transfert électronique. Après fragmentation, les ions fils formés sont piégés au centre de la trappe, puis expulsés du piège en fonction de leur rapport m/z . Le courant électrique alternatif généré par ces ions en mouvement est mesuré. Cette mesure est ensuite décomposée en utilisant la loi de Fourier et permet d'obtenir le spectre de masse en fonction du temps de rétention (Fig. 23). Cette donnée brute en 3D doit donc faire l'objet d'un traitement et d'une analyse statistique afin d'être exploitée.

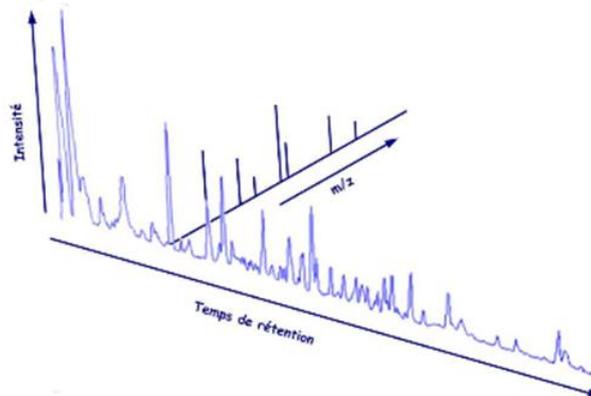


Figure 23 : Représentation schématique en trois dimensions d'un chromatogramme obtenu en LC-MS

IV.1.2. Traitement et analyse des données

Toutes les approches dites « omiques » sont fondées sur l'utilisation de l'informatique aussi bien en termes d'acquisition, de stockage, que d'analyse des données. Les données à traiter correspondent aux spectres de masse de chaque échantillon. A l'instar de la transcriptomique, ces données sont particulièrement abondantes et nécessitent un traitement préalable à leur analyse statistique.

IV.1.2.1. Traitement du signal

Le traitement de données permet d'éliminer le bruit de fond, de sélectionner les signaux pertinents présents dans les données brutes, d'aligner les spectres des différents échantillons, de présenter les données extraites sous un format matriciel, de normaliser ces données et enfin de supprimer les doublons.

L'élimination du bruit de fond améliore sensiblement les résultats statistiques. Cette élimination est réalisée le plus souvent par un filtre d'intensité passe-haut. L'intensité seuil est déterminée en fonction de la qualité des spectres obtenus.

La sélection des signaux pertinents, c'est-à-dire des pics, se base sur les algorithmes de déconvolution. Ces algorithmes, fondés sur l'évaluation de l'environnement proche, permettent d'identifier et d'évaluer la valeur d'intensité des pics associés aux ions.

L'alignement des spectres est crucial car une espèce ionique est identifiée par son rapport m/z , mais aussi par son temps de rétention. Il est donc nécessaire que les temps de rétention de chaque échantillon soient synchrones. Cet alignement est fondé sur la correspondance de la survenue des pics des spectres (indépendamment de leur intensité).

La normalisation des données permet de supprimer les biais expérimentaux entre les différents échantillons, tout en conservant les variations liées aux effets biologiques. Elle peut être réalisée selon deux approches : celle fondée sur un composé de référence dans chaque échantillon, et celle fondée sur le modèle statistique de l'ensemble des données. Dans la première approche, chaque échantillon est normalisé de telle sorte que les intensités du composé de référence soient identiques pour tous les échantillons. Dans la deuxième approche, la moyenne et l'écart type de l'ensemble des données sont calculés. Ces valeurs calculées permettent par la suite de normaliser les valeurs d'intensité de chaque échantillon (valeurs centrées/réduites).

La suppression des doublons permet de réduire considérablement le nombre de variables à traiter lors de l'analyse statistique. Ce traitement consiste à identifier et supprimer les différentes combinaisons ioniques d'une même molécule (Fig. 24). Les différentes signatures moléculaires sont identifiées à partir de base de données de référence.

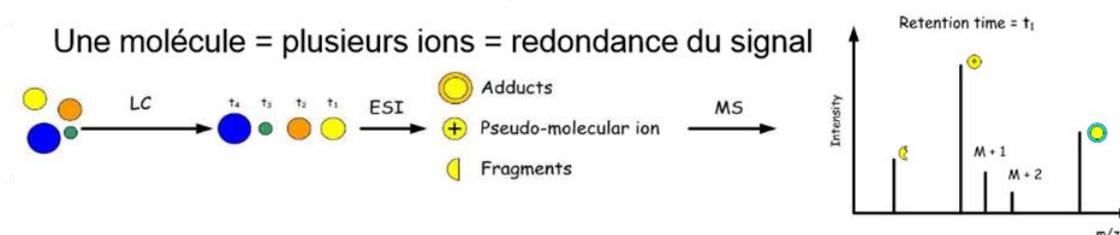


Figure 24 : Principe de la LC/ESI-MS et origine de la redondance du signal

IV.1.2.2. Analyses statistiques

Dans le cadre d'approches métabolomiques, les données sont organisées sous forme de matrices. Chaque échantillon est décrit par un certain nombre de **variables expérimentales X** (rapport m/z, RT...), et de **variables descriptives Y** (traitement, porte-greffe...).

Analyses statistiques univariées

Tous les tests statistiques ont été réalisés avec la version 2.13.1 du logiciel R. Un test de normalité (test de Shapiro) ainsi qu'un test d'homogénéité (Test de Levene) ont été systématiquement réalisés sur chacun des jeux de données. Des comparaisons de moyenne ont été faites (tests de Student) avec un seuil de risque alpha fixé à 5%.

Analyses multivariées

Deux types d'analyses statistiques multivariées ont été utilisés dans le cadre de cette étude:

Les analyses statistiques descriptives, telles que les analyses en composante principale (ACP), qui ne tiennent pas compte des informations sur la nature des échantillons.

Les analyses statistiques explicatives, telles que la projection orthogonale des moindres carrés partiels (OPLS), qui visent à expliquer une ou plusieurs variables Y en prenant en compte les informations sur la nature des échantillons.

Ces deux analyses statistiques sont complémentaires et permettent de décrire l'information contenue dans une matrice et de visualiser la répartition des échantillons dans des espaces à deux ou trois dimensions.

L'Analyse en Composante Principale (ACP) permet de représenter les données initiales obtenues dans un espace réduit, tout en limitant la perte d'information. Un changement de coordonnées est effectué afin de définir de nouveaux axes, appelés composantes principales. Les composantes principales correspondent à des combinaisons linéaires des variables initiales calculées afin d'extraire la plus grande partie de la variabilité des échantillons. Les composantes principales sont classées en fonction de l'importance de la variabilité des données qu'elles expliquent. La première composante permet de visualiser la plus grande source de variance du jeu de données, la seconde composante, orthogonale à la première, extrait la plus grande source de variance restante, et ainsi de suite. Les dernières composantes contiennent surtout le bruit aléatoire.

L'ACP est souvent la première méthode employée pour l'analyse des données. Des analyses explicatives sont ensuite réalisées afin de permettre l'interprétation des données en fonction des variables descriptives Y.

La projection orthogonale des moindres carrés partiels (OPLS) consiste à diviser la variation des X en deux parties, l'une linéairement reliée à une variable descriptive Y (traitement, porte-greffe...) et la seconde est indépendante (orthogonale) à Y. Ainsi, l'information prédictive Y à partir des variables expérimentales X est observée sur la première composante. La variation en X indépendante de Y est observée sur la deuxième composante. Ce fractionnement des données de la matrice des X facilite l'interprétation et l'application du modèle à de nouveaux échantillons (Fig. 25).

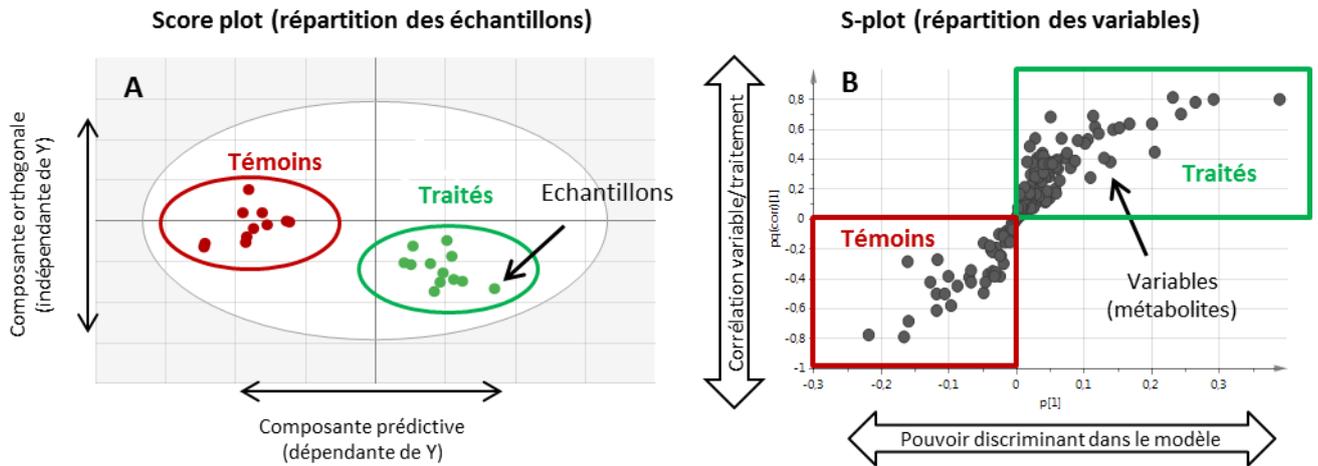


Figure 25 : Présentation des données lors d'une analyse OPLS

(A) La carte factorielle du poids des individus («score plot» en anglais) permet de visualiser la répartition des échantillons dans un espace à 2 dimensions. Les axes du graphique, appelés composantes principales, correspondent à des combinaisons linéaires des variables d'origine (signaux issus de la LC/MS). Ces combinaisons sont calculées de façon à visualiser la séparation des deux groupes en fonction de Y sur la première composante. (B) La représentation en S (S-plot en anglais) met sélectivement en évidence les variables discriminantes de la matrice X liées au facteur à étudier (Y). En l'abscisse, on retrouve le pouvoir discriminant de la variable dans le modèle qui dépend directement de son abondance dans l'échantillon. Plus elle est éloignée du centre, plus son intensité subit une forte variation entre les deux groupes. En ordonnée, on observe la corrélation entre l'intensité de la variable et le groupe de l'échantillon. Ainsi, plus on s'éloigne du centre, plus la variable est corrélée à l'un ou l'autre des traitements.

La validation des modèles statistiques issus d'une analyse OPLS a été réalisée par des tests de permutation et par CV-Anova (Cross Validation-ANalysis Of VAriance). En effet, la validité d'un modèle est évaluée grâce à deux coefficients R^2 (variable explicative) et Q^2 (variable prédictive) dont les valeurs se situent dans l'intervalle [0-1]. Le coefficient R^2 indique la proportion de la variance des données qui peut être expliquée par le modèle et le coefficient Q^2 indique la proportion de la variance des données qui peut être prédite par le modèle utilisé. **Un test de permutation** consiste à réaffecter aléatoirement les individus pour vérifier que le modèle n'est pas dû au hasard. En effet, le nombre de variables expérimentales est souvent largement supérieur au nombre d'individus lors des analyses métabolomiques, et il est donc important de s'assurer que la discrimination des groupes selon la variable Y n'est pas le fruit du hasard. Après permutation, le coefficient R^2 (variable explicative) doit être inférieur à 0.5 et le coefficient Q^2 (variable prédictive) doit être inférieur à 0. **La CV-Anova** est basée sur un test de Fisher dont l'hypothèse H_0 est que les résidus de deux modèles sont identiques. Dans le cas d'une analyse OPLS, la matrice X peut être décomposée de la manière suivante :

$X = T_p P_p + T_o P_o + E$ avec :

T_p = Matrice score prédictive (corrélée à Y)

T_o = Matrice score orthogonale à Y

P_p = Poids de la matrice liée à la composante Y

P_o = Poids de la matrice orthogonale à la composante Y

E = Résidus

Lors des tests de permutation réalisés précédemment, de nouvelles valeurs de résidus E sont calculées pour les modèles fictifs créés. Une Anova est ensuite réalisée afin de comparer la valeur E du modèle de base et les valeurs E des modèles fictifs créés lors de permutation. Le seuil de risque alpha est fixé à 5%.

IV.2. Analyse métabolomique par LC-MS

IV.2.1. Extraction des métabolites

Les poudres de pellicules issues des plantes en pots ont été extraites avec quarante volumes de méthanol contenant 10% d'eau et 0,1% d'acide formique. Les poudres de pulpe ont été extraites avec dix volumes de méthanol contenant 10% d'eau.

Les extraits ont été exposés à des ultrasons à 40 kHz pendant 20 min dans un bain à ultrasons (Falc Instruments, Bergame, Italie) à température ambiante, puis centrifugés pendant 15 min à 16 000 g à 4 °C et enfin stockés à -20°C ou immédiatement dilués pour les analyses LC-MS et/ou LC-DAD. Les extraits ont été filtrés avec des filtres de porosité 0,2 µm avant l'injection.

IV.2.2. Détection et identification des métabolites

Les analyses chromatographiques ont été réalisées avec deux systèmes HPLC Beckman Coulter (Beckman Coulter, Fullerton, CA) équipés d'une colonne de garde-C18 (7,5 x 2,1 mm) et d'une colonne analytique Alltima HP C18 (150 x 2.1 mm, taille des particules 3 µm) (Alltech Associates Inc, Deerfield, IL), couplée à un spectromètre de masse Bruker Esquire 6000 ou un DAD Gold System 168 (Beckman Coulter). Le système HPLC est relié à un système d'échantillonneur automatique Beckman Coulter 508 dans lequel les échantillons ont été maintenus à 4 °C. Deux solvants ont été utilisés, un premier contenant 5% d'acétonitrile (v/v), 0,5% d'acide formique (v/v) dans de l'eau (solvant A) et un second contenant 100% d'acétonitrile (solvant B). Un gradient de solvant a été établi de 0 à 10% de B en 2 min, de 10 à 20% de B en 10 min, de 20 au 25% de B en 2 min, de 25 à 70% de B en 7 min, un débit isocratique pendant 5 min, de 70 à 90% de B en 1 min, et enfin de 90% à 0% de B en 1 min. La colonne a été équilibrée pendant 20 min à 100% de solvant A. Le volume d'injection était de 20 µL pour tous les échantillons. Le piège à ions Bruker Esquire 6000 a été équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI). Les analyses ont été effectuées à la fois en modes positif et négatif avec un réglage du balayage entre 50 à 3000 Da et d'une masse cible de 400 m/z. Les spectres de masse ont été enregistrés en utilisant des moyennes de 5 spectres et avec un temps d'acquisition maximum de 100 ms. La fragmentation des molécules a été réalisée jusqu'à trois fois.

Les données recueillies ont été soumises au logiciel MZmine 2.10 (<http://mzmine.sourceforge.net>) afin d'obtenir une matrice de données, qui ensuite a été exportée dans le logiciel Simca 14 (Umetrix, Suède) pour effectuer les analyses statistiques. L'identification des métabolites a été réalisée en comparant les temps de rétention, les m/z et les fragments obtenus, à ceux de standards commerciaux. Lorsqu'aucune correspondance n'a été observée, le m/z et les fragments de la molécule ont été comparés avec ceux rapportés dans la littérature ou dans des bases de données en ligne (massbank.jp;hmdb.ca).

IV.3. Analyse des métabolites primaires de la pellicule et de la pulpe des baies de raisin

IV.3.1. Extraction éthanolique

Les extractions ont été réalisées à partir de 250 mg de pulpe ou de pellicule fraîche broyée à l'aide de l'azote liquide. Deux mL d'éthanol à 80% ont été ajoutés à chaque échantillon avant d'être chauffés au bain marie 15 min à 80°C. Après centrifugation 10 min à 5000 g, les surnageants ont été récupérés, puis ces étapes ont été répétées avec de l'éthanol à 50 %, et à l'eau ultra pure (résistivité 18 MΩ), en cumulant les surnageants au fur et à mesure. Les extraits cumulés ont ensuite été séchés à l'évaporateur rotatif sous vide, et les extraits secs ont été repris dans 2 mL d'eau ultra pure. Les extraits obtenus ont été utilisés pour le dosage des acides aminés, des acides organiques (acides malique et tartrique), et des sucres (glucose et fructose).

IV.3.2. Dosage des acides aminés

La teneur en acides aminés des extraits a été déterminée selon la méthode modifiée de Cohen and Michaud (1993) en utilisant des kit AccQ-Tag® (Waters, Milford, MA, USA). Deux µL d'échantillon ont été mélangés à 14 µL de tampon borate 0,2 M, pH 8,8 et 4 µL de réactif AccQ (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate). L'ensemble a été chauffé pendant 10 min à 55°C, puis 80 µL d'eau ultra pure ont été ajoutés. Par la suite, 3µL du mélange ont été injectés dans un système UHPLC dual gradient équipé d'un détecteur de fluorescence Ultimate 3000 RS-FLD (ThermoScientific, Sunnyvale, CA, USA). La séparation a été réalisée sur une colonne AccQ-Tag ultra C18 (10 cm x 2,1 mm, de 1,7 µm de taille de particules) (Waters, Milford, USA).. La colonne a été placée à 37° C. L'élution a été faite à un débit de 0,5 mL.min⁻¹ avec un gradient ternaire de 17 min (éluant A : tampon d'acétate de sodium à 140 mM ajusté à pH 5,7 ; éluant B : acétonitrile, éluant C : eau). Le gradient utilisé a été adapté de celui décrit par Hilbert et al., (2003). La détection des acides aminés a été réalisée par fluorimétrie avec des longueurs d'onde d'excitation de 250 nm et d'émission de 395 nm. Les différents acides aminés ont été identifiés par leur temps de rétention et quantifiés par l'aire de leurs pics en utilisant le logiciel Chromeleon (ThermoScientific, Sunnyvale, CA, USA) et une calibration externe (solution standard, Sigma, St Louis, MO, USA).

IV.3.3. Dosage des acides organiques

Les dosages de l'acide malique et de l'acide tartrique ont été réalisés par une méthode de colorimétrie automatisée au moyen d'un analyseur en flux continu TRAACS 800 et d'un passeur d'échantillon (Bran & Luebbe, Plaisir, France).

La concentration en acide malique des extraits a été déterminée par la mesure à 340 nm du NADH produit lors de la réaction catalysée par la malate déshydrogénase (MDH) figure X). La réaction a été réalisée dans un tampon glycine (1 M) pH 9,5 contenant de l'EDTA (2 g/L). 25 U/mL de MDH ont été utilisés en présence de 8 mg/L de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD).

La concentration en acide tartrique des extraits a été déterminée par la mesure à 520 nm du complexe métapervanadyl tartrate formé lors de la réaction de l'acide tartrique avec du métavanadate d'ammonium. 0,5 g/L de métavanadate d'ammonium ont été utilisés en présence de 2 g/L de NaOH.

La détermination des pics est faite avec le logiciel AACE (Bran & Luebbe, Plaisir, France) qui permet de calculer la hauteur des pics et ainsi de déterminer les concentrations en acides respectifs à l'aide d'une courbe de calibration établie pour chacun des acides.

IV.3.4. Dosage des sucres réducteurs

La concentration en sucres (glucose et fructose) a été déterminée par dosage enzymatique à l'aide de kits enzymatiques (BioSenTec, Toulouse, France), de gammes étalons de glucose et fructose (Sigma, St Louis, MO, USA), d'un préparateur de plaques et d'un lecteur de micro plaques (respectivement Précision 2000 et ELx800UV, BioTek Instruments Inc.). Cette méthode se fonde sur des mesures de variation d'absorbance à 340 nm provoquée par la réduction du NAD⁺ en NADH. Ces changements sont liés de façon stœchiométrique aux concentrations des produits d'intérêt lors d'une cascade de réactions enzymatiques couplées (Fig. 26).

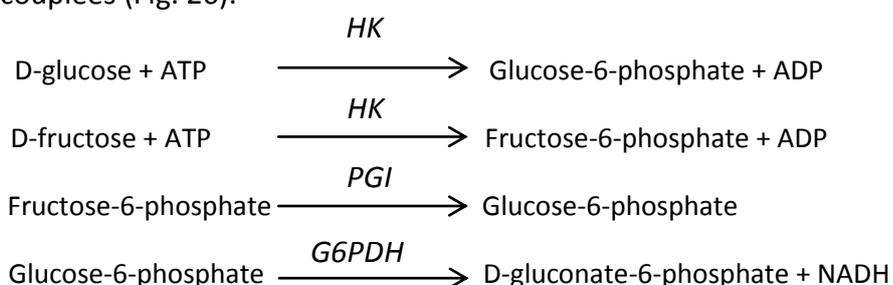


Figure 26 : Réactions enzymatiques liées au dosage des sucres.

ATP, Adénosine triphosphate ; ADP, Adénosine diphosphate ; NADH, Nicotinamide adénine dinucléotide réduit ; NAD, Nicotaminide adénine dinucléotide ; HK, Hexokinase ; PGI, Phosphoglucose isomérase ; G6PDH, Glucose-6-phosphate déshydrogénase.

IV.4. Analyse des métabolites secondaires de la pellicule et des pépins des baies de raisin

IV.4.1. Dosage des anthocyanes

Cinquante mg de pellicules broyées et lyophilisées ont été extraits avec 1 mL de méthanol acidifié à 0,1% HCl. Les extraits sont ensuite centrifugés puis filtrés à l'aide de filtres seringue de porosité 0,45 µm (filtre GHP, Pall Gelman,...). Trois µL d'extraits ont été injectés sur le système UHPLC dual gradient équipé d'un détecteur DAD Ultimate 3000 RS-DAD. La séparation est réalisée sur une colonne Synchronis C18 (2,1 x 100 mm, taille de particule 1,7 µm) placée dans une enceinte thermostatée à 25°C. L'élution a été faite à un débit de 0,368 mL min⁻¹ avec un gradient binaire de 17 min (éluant A : eau acidifiée à 10% HCOOH ; éluant B : 100% acétonitrile). Le gradient utilisé a été adapté de celui décrit par Acavedo *et al.* (2011). La détection des anthocyanes est réalisée à 520 nm. Les différentes anthocyanes sont identifiées par leur temps de rétention et leur spectre en utilisant le logiciel Chromeleon version 7.1 (ThermoScientific, Sunnyvale, USA).

IV.4.2. Dosage des flavan-3-ols et procyanidines

L'extraction des flavan-3-ols a été effectuée à partir de 500 mg de poudre de pellicules ou de pépins préalablement broyés et lyophilisés. La première extraction a été réalisée dans 8 mL d'acétone 70%, puis les échantillons ont été agités pendant 3 h à l'agitateur rotatif avant d'être centrifugés 10 min à 5000 g. Le surnageant a été récupéré puis une seconde extraction a été effectuée sur le culot avec 8 mL de méthanol 60%. Après 2 h d'agitation et 10 min de centrifugation, les surnageants ont été rassemblés. Les solvants ont ensuite été évaporés à l'évaporateur rotatif, et les extraits secs ont été repris avec une solution d'éthanol 5%. Enfin, trois lavages successifs au chloroforme ont été réalisés pour éliminer les impuretés restantes. Après filtration des extraits, 20 µL sont injectés sur un système HPLC Summit (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) équipé d'un détecteur DAD UV340U (Dionex) couplé à un détecteur de fluorescence Waters 474 (Waters, Milford, MA, USA). La séparation a été réalisée sur une colonne Synchronis C18 (4,6 x 150 mm, taille de particule 3 µm). L'élution est faite à un débit de 0,6 mL/min avec un gradient binaire de 40 min (éluant A : eau acidifiée à 0,5% HCOOH ; éluant B : acétonitrile acidifié à 0,5% HCOOH). Le gradient utilisé a été adapté de celui décrit par Chira (2009). La détection est réalisée à 280 nm sur le détecteur DAD et par fluorimétrie avec des longueurs d'onde d'excitation de 280 nm et d'émission de 320 nm. Les flavan-3-ols sont identifiés par leurs temps de rétention et quantifiés par la surface des pics à l'aide du logiciel Chromeleon version 6.6 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) en référence à des standards externes (TransMIT PlantMetaChem, Gießen, Germany).

IV.4.3. Estimation du DPm des tannins

L'approche utilisée pour déterminer la composition des polymères est fondée sur la dépolymérisation des tannins par rupture des liaisons interflavanes en milieu acide et à chaud en présence d'un agent nucléophile, le phloroglucinol. Elle permet de récupérer l'unité terminale et de bloquer l'unité d'extension sous la forme d'un monomère substitué par l'agent nucléophile en position C du flavan-3-ol. Le mécanisme de la phloroglucinyse est décrit en Fig. 27. Pour les procyanidines, les unités terminales libérées sont la catéchine (C), l'épicatéchine (EC) et l'épicatéchine gallate (ECG). Les unités d'extension sont sous la forme d'adduit de phloroglucinol: adduits catéchine-phloroglucinol, épicatéchine phloroglucinol et épicatéchine gallate phloroglucinol. Les prodelphinidines libèrent l'épigallocatechine et la gallocatechine avec leur adduit respectif. Il est ainsi possible, dans la mesure où la dépolymérisation est totale, de déterminer la composition en monomères et le degré de polymérisation moyen (DPm).

Pour la réaction de dépolymérisation, le mélange réactionnel est composé de 100 µL d'échantillon et 100 µL de réactif de phloroglucinyse. Ce réactif est un mélange de phloroglucinol (50 g/L) et d'acide ascorbique (10 g/L) dissous dans du méthanol acidifié à 0,1 N d'acide chlorhydrique. Le mélange a été chauffé à 50°C pendant 20 min. Cinq volumes de solution aqueuse d'acétate de sodium (40 mM) sont ajoutés pour arrêter la réaction.

Les produits de la réaction ont été analysés au moyen d'un système de chromatographie Hewlett-Packard série 1100. La colonne est une phase inverse Xterra RP18 (100 x 4,6 mm, 3,5 µm) équipée d'une pré-colonne de la même phase. Le débit est fixé à 1mL/min, le volume d'injection est de 20 µL et la longueur d'onde de détection est de 280 nm. Le solvant A était un mélange eau-acide acétique (99:1, v/v) et le solvant B du méthanol.

Le dosage par HPLC des produits de dégradation permet le calcul du degré moyen de polymérisation (DPM).

$$DPM = \frac{\sum \text{Concentrations en unités terminales (flavan-3-ols)} + \sum \text{Concentrations en unités d'extension}}{\sum \text{Concentrations en unités terminales libérées (flavan-3-ols)}}$$

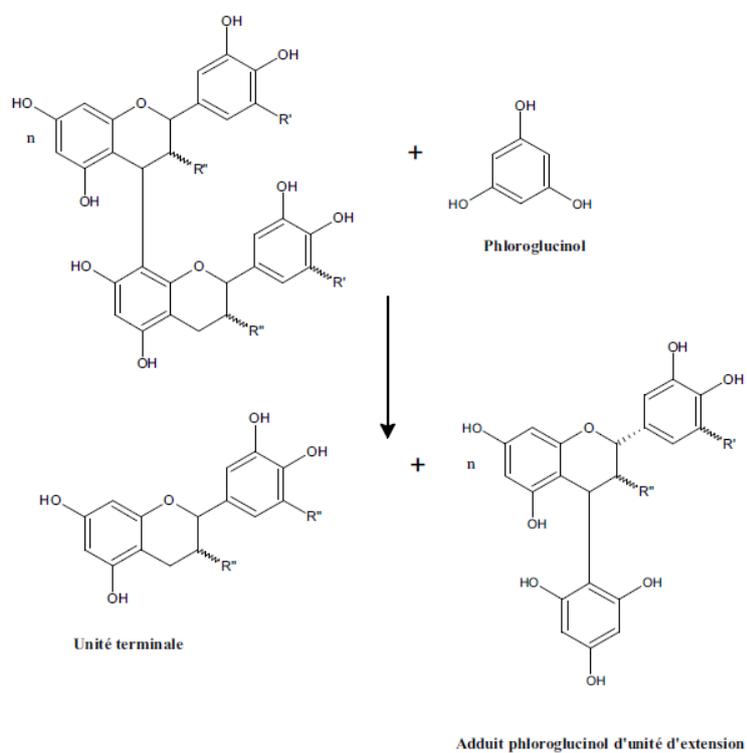


Figure 27 : Principe de la réaction de phloroglucinolyse : exemple pour un dimère.

V- Méthodes de biologie moléculaire et transcriptomique

V.1. Principe de l'analyse transcriptomique par RNA-Seq

Le transcriptome est défini comme l'ensemble des molécules d'ARN présentes dans un échantillon biologique. Il varie avec les conditions environnementales externes et reflète l'expression des gènes actifs à un moment donné (en supposant que la vitesse de dégradation des transcrits est négligeable et non affectée par les traitements). Ainsi l'expression d'un gène est estimée par la quantité de ses transcrits. L'approche transcriptomique permet l'analyse exhaustive et (semi)-quantitative des transcrits de l'échantillon. Elle permet d'accéder au niveau d'expression de milliers de gènes simultanément, et notamment de donner des indications sur leur fonction, leur co-régulation ou leur implication dans des processus biologiques. Le nombre de séquences lues (appelées aussi « reads ») est aligné sur une région d'intérêt (un gène par exemple) et est considéré comme proportionnel au niveau d'expression de cette région. En effet, plus un gène est exprimé, plus ses transcrits sont fréquents.

L'analyse transcriptomique par RNA-Seq (transcriptome sequencing) est une méthode de Séquençage Nouvelle Génération (NGS, Next Generation Sequencing) à très haut débit qui permet la génération et la lecture d'un très grand nombre de séquences simultanément. Contrairement aux méthodes de microarray (puces à ADN), les approches NGS permettent de déterminer directement la séquence des ADNc. Dans un premier temps, le séquençage de Sanger ou de banques d'ADNc ou d'EST ont été utilisés, mais ces approches ont un débit relativement faible, sont coûteuses et généralement non quantitatives. D'autres méthodes ont été élaborées pour surmonter ces limitations, comme les méthodes SAGE (serial analysis of gene expression), CAGE (cap analysis of gene expression) et MPSS (Massively parallel signature sequencing). Ces approches peuvent fournir des niveaux d'expression précis des gènes, mais la plupart sont fondées sur la technologie de séquençage Sanger, très coûteuse, et seule une partie des transcrits est analysée. Les isoformes sont généralement impossibles à distinguer l'une de l'autre. Ces inconvénients limitent donc l'utilisation de ces technologies de séquençage traditionnelles.

Récemment, le développement des méthodes de Séquençage Nouvelle Génération à haut-débit a fourni une nouvelle approche pour la cartographie et la quantification du transcriptome à un coût nettement moindre qu'avec la méthode de Sanger. Les méthodes dites RNA-Seq présentent des avantages évidents par rapport aux approches existantes. Ces analyses permettent la génération d'un très grand nombre de séquences d'ARN simultanément via le séquençage de leur ADN complémentaire. Les méthodes RNA-Seq n'ont pas de limite supérieure de quantification, cette dernière étant corrélée avec le nombre de séquences obtenues. Par conséquent, ces méthodes présentent une large gamme dynamique des niveaux d'expression sur laquelle les transcrits peuvent être détectés. Elles permettent également de quantifier précisément les niveaux d'expression. En effet, des analyses d'expression par PCR quantitative (qPCR) ont confirmé la précision de quantification des méthodes RNA-seq. Les résultats présentent des niveaux élevés de reproductibilité, tant pour les répétitions techniques que biologiques. Ce séquençage permet donc par la suite l'annotation de génome, la réalisation de catalogues de gènes exprimés, l'identification des nouveaux gènes, la mise en évidence de sites d'épissage alternatif, la quantification de l'expression de gènes (comparaisons entre différentes conditions expérimentales)... Pour le séquençage des transcrits dans le cadre d'analyses

RNA-Seq, différentes technologies ont été développées. Les deux technologies Roche 454 et Illumina sequencing sont les plus couramment utilisées aujourd'hui, mais d'autres technologies telle que la technologie Pacific Bioscienc (PacBio) et the Ion Torrent Personal Genome Machine ont été développées ces dernières années. La méthode décrite ci-dessous est celle utilisée par la technologie Illumina sequencing.

Le processus de séquençage à haut débit Illumina HiSeq peut être divisé en quatre grandes étapes: la préparation de librairies, la génération de clusters, le séquençage Illumina et l'analyse des données.

V.1.1. Techniques analytiques

V.1.1.1. Préparation des banques

A partir des ARN totaux, les ARNm sont purifiés grâce à la présence de leur queue Poly-A. Afin de minimiser la formation de structures secondaires, les ARNm sont fragmentés et forment alors de petites séquences de 200 à 500 pb. Les fragments d'ARN sont ensuite convertis en ADNc et leurs extrémités sont réparées pour obtenir des bouts francs et permettre la ligation des adaptateurs nécessaire au séquençage. Les fragments d'ADNc obtenus sont ensuite amplifiés par PCR (Fig. 28).

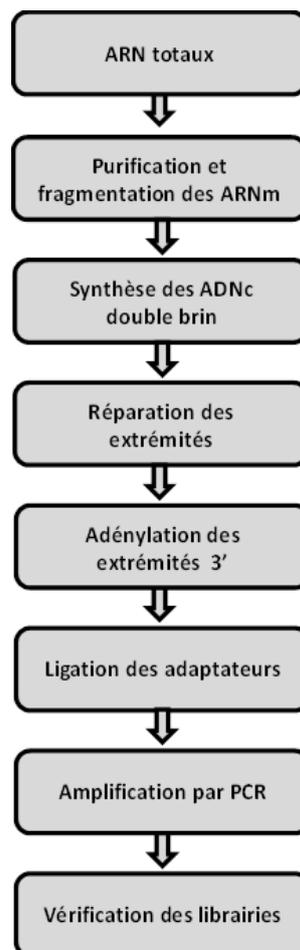


Figure 28 : Principales étapes de la génération de la banque ADNc

V.1.1.2. Génération de clusters

Pour la génération des clusters, les fragments d'ADNc sont transférés sur la cellule « flowcell ». Les adaptateurs ligaturés s'hybrident alors aux chaînes d'oligonucléotides complémentaires présentes à la surface de la cellule. Le brin complémentaire aux fragments hybridés est synthétisé et les fragments originaux sont élués. Les fragments complémentaires forment ensuite des ponts et peuvent être amplifiés. Ce processus permet de générer une centaine de millions de clusters uniques. Les brins inverses sont ensuite clivés et éliminés, et l'amorce de séquençage est hybridée (Fig. 29).

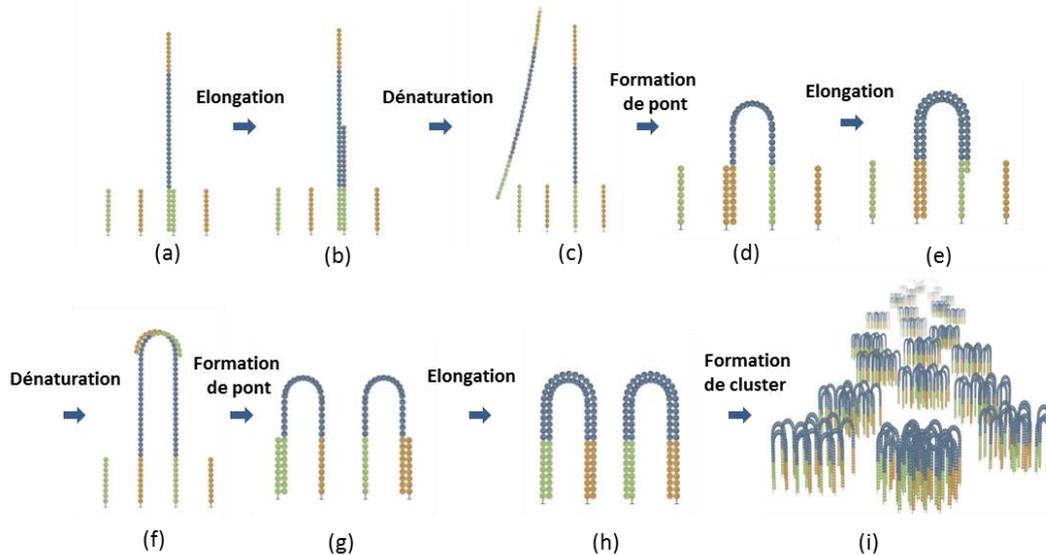


Figure 29 : Schéma descriptif de la génération de cluster

V.1.1.3. Le séquençage Illumina

Lors du séquençage, les clusters précédemment générés sont séquençés simultanément. Les ADNc sont copiés base par base en utilisant les quatre nucléotides (A, C, G et T), marqués par des sondes fluorescentes. Pour chaque nucléotide, une sonde fluorescente de différente couleur est utilisée. A chaque cycle, une base est incorporée et une émission de fluorescence est détectée. Après un grand nombre de cycles, la séquence du brin d'ADNc est déterminée. Après cette étape, une grande quantité de données est accumulée (Fig. 30).

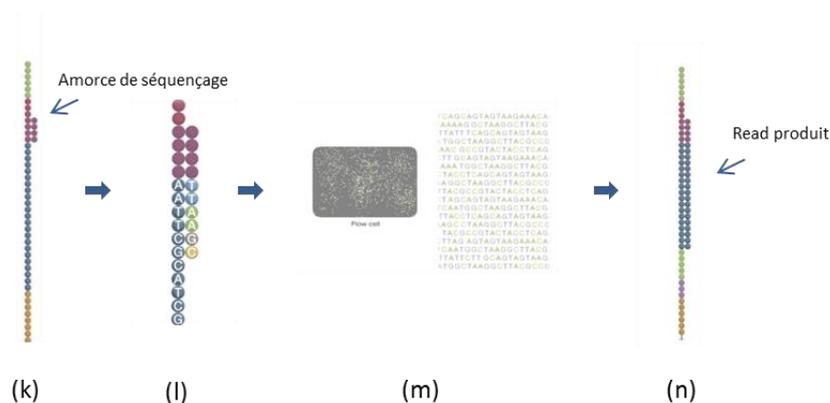


Figure 30 : Schémas descriptifs du séquençage

V.1.2. Traitement et analyse des données

Les données brutes issues du séquençage à haut débit correspondent à l'enchaînement des nucléotides des « reads » sous forme de texte.

V.1.2.1. Alignement

Ces données brutes sont transformées en tableau de comptage, afin de pouvoir comparer les niveaux d'expression des gènes selon les conditions biologiques. Pour ce faire, les « reads » sont alignés sur le génome de référence de l'organisme étudié afin de les faire correspondre à des régions d'intérêt. Le nombre de « reads » est ainsi comptabilisé pour chaque région d'intérêt.

V.1.2.2. Normalisation

À l'issue de l'alignement, les données sont normalisées pour permettre leur comparaison. En effet, il existe plusieurs biais, notamment le biais de profondeur de séquençage (nombre de « reads » alignés dans l'échantillon) qui empêchent de passer directement à l'analyse statistique pour la recherche de gènes différentiellement exprimés. La méthode généralement utilisée est celle développée par (Anders and Huber, 2010) nommée « Relative Log Expression ».

V.1.2.3. Analyse différentielle

L'analyse différentielle permet de déterminer pour chaque gène si son niveau moyen d'expression diffère d'une condition à une autre. Plusieurs lois statistiques peuvent être utilisées afin de calculer la significativité de ces différences d'expression telles que la distribution de Poisson ou encore la distribution Binomiale Négative. Lors de ce projet, les comparaisons ont été réalisées selon la méthode DESeq2 proposée par Love et al. (2014) (Binomial Négative). Les p-values résultantes ont ensuite été ajustées avec la méthode de Benjamini et Hochberg (1995) (Bonferroni Séquentiel) afin de contrôler le taux de faux positif.

V.2. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux des poudres congelées de raisin ont été extraits selon le protocole modifié de Reid et al. (2006). Vingt mL de tampon d'extraction préchauffé à 65°C [Tris HCl 300 mM pH 8,0; EDTA 25 mM ; NaCl 2 M; CTAB 2% (p/v) ; PVPP 2% (p/v) ; spermidine trihydrochloride 0,05% (p/v) et β -mercaptoéthanol 2% (v/v)] sont ajoutés à 1 g de poudre. Le mélange est incubé 10 min à 65°C et agité au vortex toutes les 2 min. Après incubation, le mélange est extrait avec un volume de chloroforme-alcool isoamylique (24:1 v/v) puis centrifugé (4200 g, 15 min, 4°C), et cette opération est répétée une fois. Après centrifugation, la phase aqueuse est récupérée et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et 0,6 volume d'isopropanol sont ajoutés. Le mélange est alors placé 30 min à -80°C pour optimiser la précipitation des acides nucléiques, puis centrifugé (5000 g, 30 min, 4° C). Le surnageant est éliminé et le culot est repris avec 1 mL de solution TE pH 7.5 [TrisHCl 10

mM ; EDTA 1 mM]. Du LiCl 10 mM (0,3 volume) est ajouté et les extraits sont placés une nuit à 4 °C. Le lendemain, les extraits sont centrifugés (16 000 g, 30 min, 4°C) et le surnageant est éliminé. Cinq cents µL d'éthanol 70% sont ajoutés, puis le mélange est centrifugé (16 000 g, 20 min, 4°C) et le surnageant est éliminé. Les culots sont ensuite dissous dans 50 µL d'H₂O RNase Free. La concentration et la qualité des ARN totaux sont déterminées au Nanodrop™. L'absence de dégradation des ARN ainsi que la contamination par de l'ADN génomique sont contrôlées par migration sur gel d'agarose 1% en déposant 500 ng d'échantillon. L'ADNg contaminant les échantillons d'ARN totaux est éliminé par un traitement à la DNase RQ1 (Promega, France). Cette réaction est réalisée en présence de 15 µg d'ARN totaux, 40 µL de tampon « 5X DNase Buffer Free RNase », 10 U d'enzyme « RQ1 DNase » et 40 U de « RNasin® » (Ribonuclease inhibitor, Promega, France) dans un volume final de 200 µL. Le mélange est incubé 30 min à 37°C puis la réaction est arrêtée par l'ajout de 50 µL de solution DNase Stop Mix. Les ARN totaux sont ensuite purifiés par extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 v/v/v) suivi d'une extraction chloroforme. Les ARN sont précipités une nuit à -20°C en présence de 2,5 volumes d'éthanol absolu froid et 0,1 volume d'acétate de sodium 2 M pH 5,8. Après centrifugation (16 000 g, 30 min à 4°C), le culot d'ARN est lavé à l'éthanol 70%, séché et repris dans 20 µL d'eau DEPC et quantifié au Nanodrop™.

V.3. Analyse par RNA-Seq

Après extraction des ARN totaux, les banques ADN nécessaires pour le séquençage haut débit ont été générées à l'aide du kit " TruSeq™ RNA Sample Preparation v2 Kit " (Illumina Inc.). Les ARNm ont été purifiés à partir de 2 pg d'ARN total en utilisant des billes magnétiques poly-T oligo-attachées et fragmentés à l'aide de cations divalents à 94 °C pendant 8 minutes. Une transcription inverse des fragments d'ARNm en ADNc a été effectuée grâce à l'utilisation d'amorces aléatoires. Le second brin d'ADNc a été synthétisé par l'action de la DNA Polymerase I et d'une RNase H. Les brins ADNc ont été rendus francs à l'aide de la T4 DNA polymerase, de la Klenow DNA polymerase et la T4 PNK. Un unique nucléotide 'A' a été ajouté à l'extrémité 3' des fragments d'ADN en utilisant une Klenow enzyme. Des adaptateurs double brin ont été liés de part et d'autres des séquences d'ADNc en utilisant une ADN ligase T4. Ces séquences ont été amplifiées par PCR avec des amorces spécifiques aux adaptateurs (30 s à 98 °C; [10 s à 98 °C, 30 s à 60 °C, 30 s à 72 °C] x 12 cycles; 5 min à 72 °C). Les amorces de PCR excédentaires ont été éliminées par purification grâce à l'utilisation de billes AMPure XP (Agencourt Biosciences Corporation). La qualité des banques ADN a été contrôlée à l'aide du Bioanalyseur 2100 (Agilent). Les banques ont été incorporées dans la « flow cell » à une concentration de 7 pM et les clusters ont été générés par le CBOT et séquencés avec la technique Illumina HiSeq 2500 (séquences simples de 50 paires de bases). L'analyse d'image et l'identification des bases ont été effectuées en utilisant RTA 1.18.61 and CASAVA 1.8.2. Ces analyses ont été réalisées par l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC, Illkirch, France).

V.4. Analyse par RT-qPCR

V.4.1. La transcription inverse

La synthèse des ADNc a été réalisée selon le protocole du fournisseur Promega. Suite à l'extraction, 2 µg d'ARN sont incubés pendant 10 min à 75°C en présence de 3 µL d'Oligo(dT) (10 µM) dans un volume finale de 15µL. Les ARN sont ensuite placés sur glace, et la réaction de transcription inverse est initiée. Le mélange suivant : 15 µL d'ARN-oligo(dT), 5 µL de M-MLV reverse transcriptase buffer 5X, 2 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de DTT 100 mM, 40 U de RNasin (RNasin® Ribonuclease Inhibitor, Promega) et 200 U de MMLV reverse transcriptase (Promega) est incubé 60 min à 42°C. L'enzyme est ensuite inactivée par une incubation supplémentaire de 10 min à 95°C. Les ADNc ainsi obtenus sont dilués et stockés à -20°C.

V.4.2. Les couples d'amorces

Les couples d'amorces utilisées sont répertoriés dans le tableau 2. Toutes les amorces ont été choisies à partir de travaux antérieurs réalisés au sein du Laboratoire, ou de publications scientifiques. Elles ont été définies pour amplifier un fragment compris entre 100 et 200 pb du gène cible et pour ne pas former de structures secondaires. La T_m est fixée à 60°C ±1°C. Toutes les amorces ont été synthétisées par la société Eurofins MWG Opéron (Ebersberg, Germany). Leur efficacité d'amplification a été déterminée d'après le protocole de Bio-Rad avec le logiciel CFX™ Manager.

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées lors de l'étude

Numéro d'accension	Nom de l'enzyme	Amorces	Séquences (5'-3')	Source
X75967	VvPAL1	Sens	TGCTGACTGGTGAAAAGGTG	Belhadj et al., 2008
		Anti-sens	CGTTCCAAGCACTGAGACAA	
AB015871.1	VvPAL2	Sens	CTCCTCCCCTCCATTTCCCTTAC	Pillet, 2011
		Anti-sens	TGTGTGGCAGTGGTTCCATTTG	
AB066275	VvCHS2	Sens	GTTCTGTTTGGATTTGGACCAG	Belhadj et al., 2008
		Anti-sens	GTGAGTCGATTGTGTAGCAAGG	
DQ129684	VvANR	Sens	CAATACCAGTGTTCCCTGAGC	Bogs et al., 2005
		Anti-sens	AAACTGAACCCCTCTTTCAC	
DQ129686	VvLAR2	Sens	TAAACGAGCTGGCATCAC	Gagné et al., 2009
		Anti-sens	GCAGCGGCTAGTAGGTCA	
FN596006.1	VvNir	Sens	CTTGCCGAGGAAGTGGAAATGTG	Soubeyrand, 2013
		Anti-sens	GCATGTACGCCAGATCATTGATGT	
FN595749.1	VvGS	Sens	CTGTCTCCCTTGCTCCCTCTC	Soubeyrand, 2013
		Anti-sens	GGAGTCACTGGAAATGGGTTGAAC	
AY55190	VvMyb5a	Sens	GTGCAGCAGCCATCTAATGTG	Matus et al., 2008
		Anti-sens	GCAGCAGTTCCCAGACAGT	
AY899404	VvMYB5b	Sens	GGTGTCTTTAATTTGGCTTCA	Deluc et al., 2008
		Anti-sens	CACAACAACACAACCACATACA	
AM259485	VvMYBPA1	Sens	AGATCAACTGGTTATGCTTGCT	Bogs et al., 2007
		Anti-sens	AACACAAATGTACATCGCACAC	
EU919682	VvMYBPA2	Sens	GACATTGGCGACCTCCTTAC	Terrier et al., 2009
		Anti-sens	CGAGAAAATCGGAACAAGGA	
AB097923	VvMYBA1	Sens	CACCCTCACCTCCCTGGATTG	Pillet, 2011
		Anti-sens	CCACTTACCACAACCGAATGATG	
FQ387674	VvLBD39	Sens	CAGAGACCTGCTTTGTTTCG	Soubeyrand, 2013
		Anti-sens	GAAACTCCGTTAAGAAGTTCCG	
GU585870	VvGAPDH	Sens	TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA	Reid et al., 2006
		Anti-sens	CCACAGACTTCATCGGTGACA	
EC969944	VvActin	Sens	CTTGCATCCCTCAGCACCTT	Reid et al., 2006
		Anti-sens	TCCTGTGGACAATGGATGGA	

V.4.3. Quantification des transcrits par qPCR

Les profils d'expressions des gènes d'intérêts ont été obtenus par l'utilisation du fluorophore SYBR Green et du thermocycleur CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad). Chaque réaction a été réalisée dans un volume final de 10 µL contenant 2 µL d'ADNc, 5 µL de iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 0,25 µL de chacune de deux amorces sens et antisens (10 µM chacune) et 2,5 µL d'H₂O (DNase/RNase free). Chaque amplification a été réalisée en duplicat. Le programme PCR est le suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 3 min, suivi de 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 10 s, hybridation/élongation à 60°C pendant 10 s. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle. Afin de s'assurer de la spécificité des amorces, chaque amplification a été suivie d'une analyse de la courbe de fusion avec une mesure continue de la fluorescence lors d'une augmentation progressive de la température de 65 à 95°C (avec un pas de 0,05°C).

V.4.4. Calculs des niveaux relatifs d'expressions des gènes

Les niveaux relatifs d'expression de chaque gène ont été déterminés par rapport à la plus faible expression du gène testé dans une condition donnée (qui prend la valeur arbitraire de 1). Ils sont exprimés en utilisant la méthode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen and Livak, 2008). L'efficacité de chaque couple d'amorces a été mesurée, à l'aide d'une gamme standard issue d'une dilution sérielle d'une solution initiale d'ADNc de concentration connue. Les niveaux relatifs d'expression ont été normalisés par rapport au niveau d'expression de deux gènes de référence : *Actin* (EC969944) et *GAPDH* (GU585870). La stabilité de leur expression a été évaluée grâce au logiciel GeNorm®.

Chapitre 3 : Effets de la nutrition azotée sur les baies de plants de vigne cultivés en pots

Les effets de l'azote sur les baies sont étroitement liés à la physiologie de la plante entière, depuis le porte-greffe jusqu'au feuillage et au système reproducteur. Depuis la fin du XIXe siècle, de nombreux vignobles à travers le monde ont été greffés sur des porte-greffes tolérants au phylloxéra. La majorité des porte-greffes sont des hybrides de trois espèces : *Vitis cinerea* var. *helleri* (anciennement appelé *V. berlandieri*), *V. riparia* et *V. rupestris* (Whiting, 2010; Serra et al., 2014). Les porte-greffes sont également utilisés pour leur résistance aux nématodes (Nicol et al., 1999; Reisch et al., 2012), et pour leur capacité d'adaptation lorsque les conditions des sols sont défavorables (Whiting, 2010). Les porte-greffes affectent la surface foliaire, le développement racinaire (Ollat, 2003), la vigueur végétative (Stevens et al., 2008), le rendement (Stevens et al., 2010) et la qualité du vin (Ollat et Lafontaine, 2003; Tandonnet et al., 2010). Le porte-greffe est donc une composante importante à prendre en compte pour comprendre les effets de l'azote. Cependant, les effets de la disponibilité en azote sur le potentiel qualitatif des baies en interaction avec différentes combinaisons porte-greffe/greffe sont encore mal connus. Afin de mieux comprendre ces effets, une expérimentation en conditions semi-contrôlées a été mise en place, et le métabolome et le transcriptome des baies ont été analysés par des approches de métabolomique et transcriptomique non ciblée.

I- Impact des différents traitements sur le statut hydrique, le statut azoté et la physiologie des plantes

Dans un premier temps, des analyses agronomiques (contenu en azote, statut hydrique et vigueur des plantes) ont été réalisées pour vérifier la robustesse de l'expérimentation. Les effets de la disponibilité en azote sur les plantes pourraient être indirectement liés au changement de vigueur et/ou de statut hydrique. Il est donc primordial de contrôler ces paramètres pour mieux interpréter les effets de l'azote.

I.1. Statut hydrique des plantes

Une analyse du $\delta^{13}\text{C}$ a été réalisée pour estimer le degré de contrainte hydrique auquel ont été soumises les plantes pendant l'expérimentation (tableau 3). Chacune des combinaisons porte-greffe/greffe a reçu la même quantité de solution nutritive par jour (1.2 L /jour/plant), seules les teneurs en azote des solutions variaient. Le $\delta^{13}\text{C}$ s'exprime en p. mille par rapport à un standard. Les valeurs s'échelonnent entre -21 et -26 p. mille, où -21 p. mille indique une forte contrainte hydrique et -26 p. mille une absence totale de contrainte hydrique. Les valeurs comprises entre -26 et -24 p. mille indiquent une très faible contrainte hydrique (Gaudillère et al., 2002). Les valeurs obtenues (tableau 3) indiquent une contrainte hydrique très faible ou absente au cours de la saison. Une première analyse a été réalisée pour comparer les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ pour les années 2013 et 2014 et aucune différence significative n'a été observée ($p = 0.1513$). Une seconde analyse comparant les deux cépages montre une différence significative ($p = 0.02055$) entre le CS et le PN. Les analyses suivantes ont donc été faites séparément pour les deux cépages.

Tableau 3 : Estimation du statut hydrique des plantes par mesure du $\delta^{13}C$

	Cabernet Sauvignon		Pinot Noir	
	RGM	110R	RGM	110R
2013				
N-	-25.12 ± 0.22 a	-26.26 ± 0.13 a	-25.95 ± 0.09 a	-25.86 ± 0.05 a
N	-25.26 ± 0.21 a	-25.75 ± 0.17 b	-25.25 ± 0.05 b	-25.99 ± 0.16 a
N+	-24.04 ± 0.30 b	-24.01 ± 0.06 c	-25.12 ± 0.09 b	-25.03 ± 0.10 b
2014				
N-	-25.72 ± 0.26 a	-26.55 ± 0.23 a	-26.3 ± 0.010 a	-26.11 ± 0.29 a
N	-25.99 ± 0.39 a	-26.42 ± 0.26 a	-26.18 ± 0.21 a	-25.96 ± 0.18 a
N+	-24.22 ± 0.41 b	-24.76 ± 0.19 b	-25.73 ± 0.68 a	-25.48 ± 0.27 a

Valeurs $\delta^{13}C$ (p. mille)

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques; \pm écart type à la moyenne; l'unité correspond à la valeur du rapport des isotopes $^{13}C/^{12}C$ exprimé en p. mille; pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon/année des tests Anova à un facteur (traitement azoté) ainsi que des tests de Tukey ont été effectués; pour chaque combinaison a, b et c indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

Tests statistiques (Anova à un facteur)			
	Ensemble des données	CS	PN
Variétés	*	-	-
Année	NS	NS	NS
Porte-greffe	NS	NS	NS

Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents facteurs (variétés, année et porte-greffe) sur l'ensemble des données ainsi que sur les données obtenue chez le CS et le PN; les étoiles indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$); NS signifie Non Significatif

Concernant le CS, aucune différence significative n'a été observée entre les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ en fonction des porte-greffes ($p = 0.06268$). La comparaison des valeurs obtenues en fonction du facteur azote est décrite dans le tableau 1. Pour les deux années, une différence significative existe entre les modalités N- et N+. En effet, les plantes N+ présentent des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ supérieures à celles des plantes N-, ce qui suggère qu'elles subissent une contrainte hydrique un peu plus forte.

Les analyses réalisées chez le PN ne montrent aucune différence en fonction des deux porte-greffes ($p = 0.191$). En 2013, les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ sont affectées significativement en fonction de la nutrition azotée. Comme pour le CS, chez le PN, les plantes soumises à une forte disponibilité en azote présentent des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ supérieures à celles des plantes ayant reçu moins d'azote. Cependant, même si cette tendance se retrouve en 2014, elle ne conduit pas à des différences de statut hydrique statistiquement significatives sous l'effet de l'azote pour cette seconde année d'expérimentation.

I.2. Statut azoté des plantes

I.2.1. Mesures N-tester

Lors de l'expérimentation, trois solutions nutritives (N- : 0.8 mM ; N : 1.4 mM ; N+ : 3.6mM) ne différant que par leur concentration en azote ont été appliquées. Le statut azoté des plantes a été estimé à l'aide de différents indicateurs. Au cours de la saison, des mesures au N-tester ont été réalisées (Fig. 31). En effet, contrairement aux autres analyses, cet appareil permet d'effectuer un diagnostic précoce au cours du développement et l'obtention des résultats est immédiate. Cependant, si le N-tester est assez performant pour estimer le statut azoté d'un cépage donné à un moment donné, il est difficile d'établir des comparaisons au-delà de ce contexte. En effet, les valeurs de N-tester mesurées évoluent au cours de la saison et peuvent varier en fonction du cépage (les valeurs sont sans unité).

En 2013, trois mesures ont été effectuées : à la floraison, à la mi-véraison et à la maturité. A la floraison, le statut azoté des plants n'est pas différencié en fonction des différents traitements pour aucun des deux cépages. A la mi-véraison, la modalité N+ se différencie des deux autres modalités N- et N chez le CS et le PN. A la maturité, les trois modalités se différencient, la modalité N+ ayant la valeur de N-tester la plus élevée et la modalité N- la valeur la plus faible pour les deux cépages.

En 2014, deux mesures ont été réalisées : à la floraison et à la mi-véraison. A la floraison, comme pour la saison précédente, les différentes modalités ne se différencient pas en fonction des différents traitements. A la mi-véraison, la modalité N+ présente une valeur de N-tester plus élevée que les modalités N- et N pour chacune des combinaisons. Comme attendu, le traitement N+ semble donc se traduire par une accumulation d'azote plus importante au cours du développement de la baie, et ceci indépendamment du cépage et du porte-greffe étudiés. Toutefois, ces effets ne sont pas visibles pour le traitement azoté intermédiaire N. Des analyses complémentaires et plus détaillées ont été réalisées pour valider ces résultats.

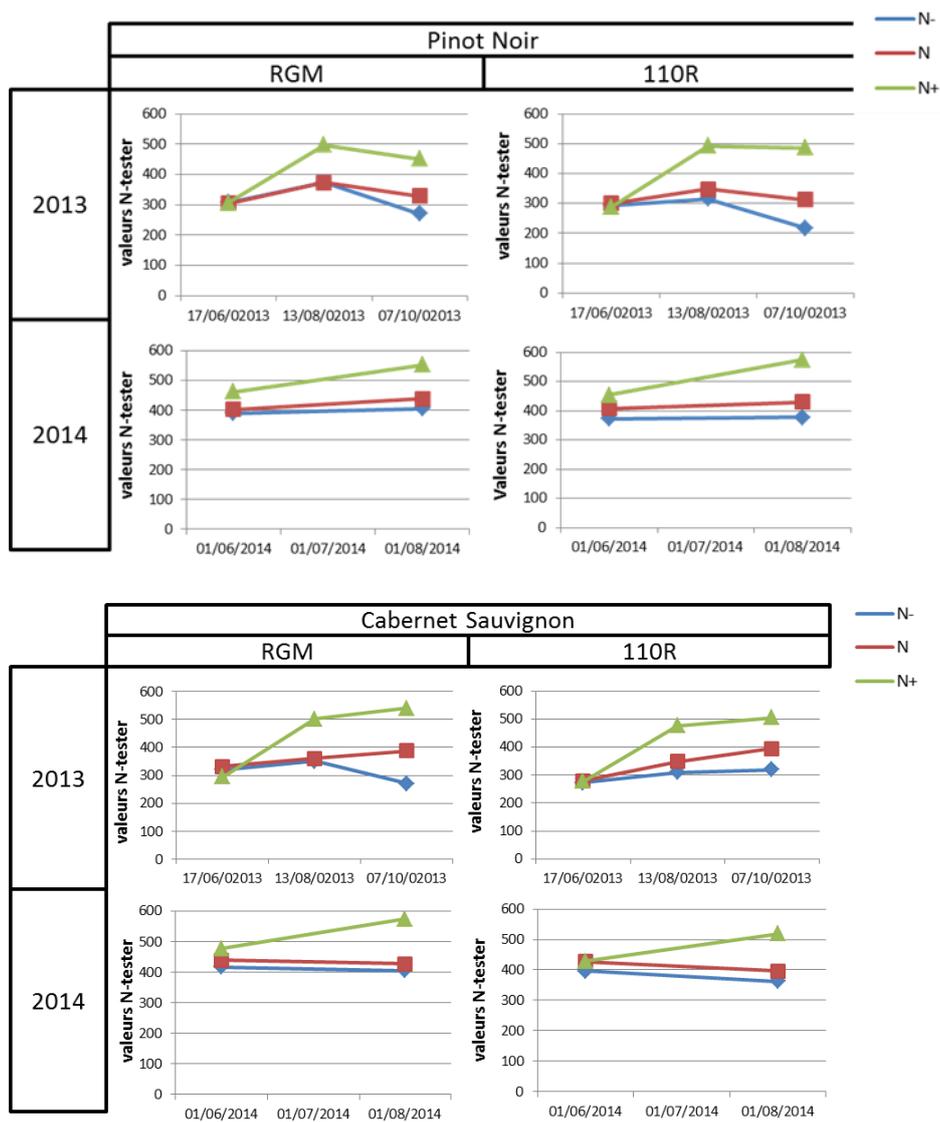


Figure 31 : Estimation du statut azoté des plantes par mesure N-tester
 Les mesures représentent des valeurs uniques avec en bleu la modalités N- (0.8 mM),
 en rouge la modalité N (1.4 mM) et en vert la modalité N+ (3.6 mM)

I.2.2. Azote total des limbes et des pétioles

A la mi-véraison, des pétioles et des limbes ont été prélevés pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon/modalité d'azote, et leur teneur en azote total a été déterminée (Tableau 4 et 5). Les analyses réalisées en 2013 sur les pétioles et limbes du PN sont des valeurs uniques, aucune analyse statistique n'a donc été possible sur ces données. Cependant, aucune différence significative n'a été observée pour les teneurs en azote des limbes ($p=0.2329$) et des pétioles ($p=0.8973$) entre les années 2013 et 2014 chez le CS. Une seconde analyse comparant les deux cépages a été réalisée en 2014 et ne montre aucune différence ($p=0.1509$) entre les valeurs obtenues chez le CS et le PN. Chez le CS, la nature du porte-greffe n'affecte pas la teneur en azote des limbes ($p=0.2329$) et des pétioles ($p=0.8973$).

Tableau 4 : Teneur en azote total des limbes

	Cabernet Sauvignon		Pinot Noir	
	RGM	110R	RGM	110R
2013				
N-	1.00 ± 0.10 a	1.14 ± 0.17 a	1.10*	1.12*
N	1.07 ± 0.15 a	1.37 ± 0.10 ab	1.09*	1.17*
N+	1.77 ± 0.41 b	1.79 ± 0.30 b	1.76*	1.87*
2014				
N-	1.10 ± 0.08 a	1.17 ± 0.20 a	1.43 ± 0.08 a	1.36 ± 0.04 a
N	1.43 ± 0.25 a	1.48 ± 0.08 a	1.42 ± 0.10 a	1.54 ± 0.13 a
N+	2.10 ± 0.09 b	2.02 ± 0.07 b	2.22 ± 0.09 b	2.43 ± 0.02 b
Teneur en azote des limbes (% matière sèche)				

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques; \pm écart type à la moyenne; les valeurs annotées de * correspondent à des valeurs uniques ; unités teneur en azote en % de matière sèche, pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon/année des tests Anova à un facteur (traitement azoté) ainsi que des tests de Tukey ont été effectués; a et b pour chaque combinaison indiquent des différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

Test statistique (Anova)			
	Ensemble des données	CS	PN
Variétés	NS	-	-
Année	NS	NS	-
Porte-greffe	NS	NS	NS

Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents facteurs (variétés, année et porte-greffe) sur l'ensemble des données obtenues chez le CS et le PN ; les étoiles indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$) ; NS signifie Non Significatif

Les comparaisons des moyennes des teneurs en azote des limbes et des pétioles de chacune des combinaisons porte-greffe/greffon/année sont décrites respectivement dans les tableaux 4 et 5. En 2013, une différence significative entre les teneurs en azote des limbes existe entre les modalités N- et N+. Cependant aucune différence n'a été observée pour les pétioles. En 2014, pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon, les teneurs en azote totale des limbes et des pétioles sont significativement différentes entre les modalités N- et N+.

Tableau 5 : Teneur en azote total des pétioles

	Cabernet Sauvignon		Pinot Noir	
	RGM	110R	RGM	110R
2013				
N-	0.23 ± 0.01 a	0.25 ± 0.05 a	0.28*	0.21*
N	0.31 ± 0.02 a	0.31 ± 0.05 a	0.30*	0.21*
N+	0.37 ± 0.12 a	0.48 ± 0.18 a	0.37*	0.37*
2014				
N-	0.38 ± 0.10 a	0.39 ± 0.04 a	0.33 ± 0.01 a	0.30 ± 0.02 a
N	0.62 ± 0.02 b	0.47 ± 0.04 ab	0.35 ± 0.03 a	0.37 ± 0.01 a
N+	0.66 ± 0.10 b	0.55 ± 0.12 b	0.63 ± 0.12 b	0.60 ± 0.08 b

Teneur en azote des pétioles (% matière sèche)

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques; ± écart type à la moyenne; les valeurs annotées de * correspondent à des valeurs uniques; unités teneur en azote en % de matière sèche, pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon/année des tests Anova à un facteur (traitement azoté) ainsi que des tests de Tukey ont été effectués; a et b pour chaque combinaison indique les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

Test statistique (Anova)			
	Ensemble des données	CS	PN
Variétés	NS	-	-
Année	NS	NS	-
Porte-greffe	NS	NS	NS

Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents facteurs (variétés, année et porte-greffe) sur l'ensemble des données obtenues chez le CS et le PN; les étoiles indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$); NS signifie Non Significatif

I.2.3. Mesure de l'azote assimilable du moût

L'azote assimilable du moût est également un très bon indicateur du statut azoté de la vigne et se mesure généralement à la maturité. Cette analyse a été réalisée par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (Tableau 6). En 2013, aucune répétition biologique n'a pas été faite, du fait de la faible quantité de raisin disponible. Cependant, pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon, les valeurs obtenues pour la modalité N+ sont supérieures aux valeurs de la modalité N-. De plus, les valeurs obtenues en 2014 pour chacune des modalités sont supérieures à celles de 2013 (facteur 1.5). En 2014, aucune différence n'apparaît entre les deux porte-greffes RGM et 110R pour le CS ($p = 0.5959$) ou pour le PN ($p = 0.9292$). La comparaison des valeurs obtenues en fonction du facteur azote est décrite dans le tableau 6. En 2014, une différence significative existe entre les modalités N- et N+. En effet, quel que soit le cépage CS ou PN, les valeurs d'azote assimilable des moûts sont supérieures dans les plantes N+ par rapport aux plantes N-.

Tableau 6 : Estimation de la teneur en azote assimilable des moûts par FTIR

	Cabernet Sauvignon		Pinot Noir	
	RGM	110R	RGM	110R
2013				
N-	120.00*	180.00*	180.00*	164.00*
N	147.00*	255.00*	187.00*	180.00*
N+	241.00*	252.00*	215.00*	223.00*
2014				
N-	252.67 ± 45.79 a	295.67 ± 30.83 a	268.00 ± 07.21 a	260.33 ± 47.35 a
N	283.00 ± 24.98 b	280.00 ± 24.64 a	233.00 ± 14.18 a	214.33 ± 15.57 a
N+	410.33 ± 11.68 c	490.00 ± 26.00 b	518.00 ± 25.87 b	568.00 ± 47.29 b
Teneur en azote assimilable à maturité (mg N/L)				

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques; \pm écart type à la moyenne ; les valeurs annotées de * correspondent à des valeurs uniques ; l'unité correspond à la teneur en azote assimilable en mg/L. Pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon/année des tests Anova à un facteur (traitement azoté) ainsi que des tests de Tukey ont été effectués; a, b et c pour chaque combinaison indique les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

Tableau 7 : Mesure de la surface foliaire primaire et secondaire

	Surface foliaire primaire (m ²)		Surface foliaire secondaire (m ²)	
	RGM	110R	RGM	110R
Cabernet Sauvignon				
2013				
N-	0.68 ± 0.14 a	0.64 ± 0.16 a	0.40 ± 0.20 a	0.34 ± 0.09 a
N	0.68 ± 0.15 a	0.63 ± 0.15 a	0.33 ± 0.13 a	0.47 ± 0.20 a
N+	0.72 ± 0.28 a	0.97 ± 0.19 a	0.53 ± 0.11 a	0.50 ± 0.19 a
2014				
N-	0.86 ± 0.23 a	0.77 ± 0.06 a	0.19 ± 0.07 a	0.32 ± 0.11 a
N	0.99 ± 0.30 a	0.55 ± 0.25 a	0.36 ± 0.04 b	0.32 ± 0.03 a
N+	0.95 ± 0.14 a	0.73 ± 0.28 a	0.63 ± 0.05 c	0.68 ± 0.13 b
Pinot Noir				
	RGM	110R	RGM	110R
2013				
N-	0.90 ± 0.23 a	0.86 ± 0.14 a	0.34 ± 0.14 a	0.39 ± 0.09 a
N	0.91 ± 0.12 a	0.79 ± 0.18 a	0.36 ± 0.05 a	0.40 ± 0.08 a
N+	0.98 ± 0.08 a	0.89 ± 0.11 a	0.58 ± 0.09 b	0.42 ± 0.06 a
2014				
N-	1.71 ± 0.11 a	1.48 ± 0.53 a	0.33 ± 0.01 a	0.22 ± 0.09 a
N	2.06 ± 0.61 a	2.09 ± 0.23 a	0.35 ± 0.03 a	0.32 ± 0.10 a
N+	1.47 ± 0.72 a	2.47 ± 0.73 a	0.63 ± 0.12 b	0.57 ± 0.11 b

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques (unités surface en m²) ± écart type de la moyenne. Pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon/année des tests Anova à un facteur (traitement azoté) ainsi que des tests de Tukey ont été effectués; a, b et c pour chaque combinaison indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

	Surface foliaire primaire			Surface foliaire secondaire		
	Ensemble des données	CS	PN	Ensemble des données	CS	PN
Variétés	***	-	-	***	-	-
Année	***	*	***	***	NS	***
Porte-greffe	NS	*	NS	NS	NS	NS

Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents facteurs (variétés, année et porte-greffe) sur l'ensemble des données obtenues chez le CS et le PN ; les étoiles indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$) ; NS signifie Non Significatif.

I.3. Vigueur des plantes

Afin d'estimer la vigueur des plants, deux indicateurs ont été utilisés : la mesure de la surface foliaire en fin de croissance et la mesure de la masse des bois de taille.

I.3.1. Mesures de la surface foliaire

Les résultats des mesures de surface foliaire du CS et PN sont présentés dans le tableau 7. La comparaison des valeurs des surfaces foliaires primaire et secondaire en fonction des deux années montre une différence significative ($p < 0.001$). En effet, quelque soit le cépage considéré, les surfaces foliaires primaires mesurées en 2013 sont inférieures à celles mesurées en 2014. De plus, les surfaces primaires mesurées sur le PN sont supérieures à celle du CS ($p < 0.001$). Les surfaces primaires des feuilles du CS diffèrent significativement selon le porte-greffe ($p = 0.03912$), mais aucune différence n'est observée pour les surfaces foliaires secondaires. Pour le PN, les différents porte-greffes n'affectent pas les surfaces foliaires primaires et secondaires. De même, les différentes conditions de disponibilité en azote ne semblent pas avoir d'impact sur les surfaces primaires du CS ($p = 0.7701$) et du PN ($p = 0.9265$). Cependant, les valeurs des surfaces foliaires secondaires obtenues en 2014 sont significativement supérieures pour les plantes N+ quelle que soit la variété considérée. En 2013, seule la combinaison PN/RGM suit cette tendance, aucune différence n'étant remarquable en fonction de la nutrition azotée pour les autres combinaisons porte-greffe/greffon.

I.3.2. Mesures de la masse des bois de taille

La mesure de la masse des bois de taille a été réalisée sur chacun des plants en saison hivernale (tableau 8). Les valeurs obtenues en 2014 sont supérieures à celles mesurées en 2013 ($p < 0.001$). De plus, une différence existe entre les données obtenues en fonction des deux variétés ($p < 0.001$). Concernant le CS, une différence significative est observée pour les masses de bois de tailles selon le porte-greffe ($p = 0.009641$). Pour le PN, le génotype du porte-greffe ne semble pas affecter la masse des bois de taille. En 2013, pour chacune des variétés CS et PN, la disponibilité en azote a un impact significatif sur la masse des bois de taille. En effet, les valeurs obtenues pour les plantes N+ sont supérieures à celles obtenues pour les plantes N-. En 2014, seule la combinaison PN/RGM suit cette tendance, aucune différence liée à la nutrition azotée pour les autres combinaisons porte-greffe/greffon.

Tableau 8 : Mesures des masses de bois de taille

	Cabernet Sauvignon		Pinot Noir	
	RGM	110R	RGM	110R
2013				
N-	187.50 ± 34.18 a	164.50 ± 20.20 a	155.00 ± 21.47 a	158.00 ± 15.31 a
N	202.00 ± 31.29 a	167.50 ± 30.93 a	186.00 ± 15.06 b	163.00 ± 14.38 a
N+	242.50 ± 32.68 b	208.00 ± 14.94 b	190.50 ± 10.92 b	183.50 ± 11.07 b
2014				
N-	298.00 ± 66.22 a	266.00 ± 60.45 a	179.00 ± 28.07 a	203.00 ± 44.11 a
N	285.00 ± 67.58 a	217.50 ± 46.68 a	214.00 ± 24.36 a	214.50 ± 56.98 a
N+	255.50 ± 60.23 a	266.11 ± 94.30 a	217.00 ± 26.10 b	197.50 ± 50.84 a

Masse bois de taille (g)

Les valeurs sont des moyennes de dix répétitions biologiques (unités masse en g) ± écart type de la moyenne, pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon/année des tests Anova à un facteur (traitement azoté) ainsi que des tests de Tukey ont été effectués; a et b pour chaque combinaison indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

	Tests statistiques (Anova à un facteur)		
	Ensemble des données	CS	PN
Variétés	***	-	-
Année	***	***	***
Porte-greffe	*	**	NS

Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents facteurs (variétés, année et porte-greffe) sur l'ensemble des données ainsi que sur les données obtenues chez le CS et le PN ; les étoiles indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$) ; NS signifie Non Significatif.

I.4. Conclusions

Des analyses agronomiques, résumées dans le tableau 9, ont été réalisées pour vérifier la robustesse de l'expérimentation mise en place. Les analyses de $\delta^{13}\text{C}$ montrent que la plupart des plantes soumises à une forte disponibilité en azote (N+) ont subi une faible contrainte hydrique au cours des deux années, bien que tous les traitements aient reçu la même quantité d'eau.

Plusieurs indicateurs ont été utilisés pour estimer le statut azoté des plantes. Quelle que soit la combinaison considérée, les valeurs de N-tester mesurées pour les plantes N+ étaient supérieures à celles des plantes N-. Pour les deux variétés étudiées, les valeurs d'azote total des limbes sont supérieures en conditions de forte disponibilité azotée, quelles que soient l'année et le génotype du porte-greffe considérés. Pour le CS, le dosage de l'azote total des pétioles en 2013 ne montre aucune différence entre les deux modalités N+ et N-. Cependant en 2014, les valeurs d'azote total issues de la modalité N+ sont supérieures à celles issues de la modalité N-.

Pour vérifier que les effets biologiques observés sont directement liés aux différences de disponibilité en azote et non indirectement liés à une modification de vigueur, différents indicateurs de la vigueur des plantes ont été mesurés. Quels que soient l'année ou le porte-greffe considérés, les surfaces foliaires primaires ne diffèrent pas. Cependant, une augmentation des surfaces foliaires secondaires et une augmentation de la masse des bois de taille ont été observés.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des effets d'une forte disponibilité en azote (N+) par comparaison avec une faible disponibilité azotée (N-)

	Cabernet Sauvignon				Pinot Noir			
	RGM		110R		RGM		110R	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
Statut hydrique								
Valeur δC^{13}	↗	↗	↗	↗	↗	=	↗	=
Statut azoté								
Valeur N-tester	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
Valeur azote total des limbes	↗	↗	↗	↗	-	↗	-	↗
Valeur azote total des pétioles	=	↗	=	↗	-	↗	-	↗
Vigueur								
Surface foliaire primaire	=	=	=	=	=	=	=	=
Surface foliaire secondaire	=	↗	=	↗	↗	↗	=	↗
Valeur masse de bois de taille	↗	=	↗	=	↗	↗	↗	=

II- Effets de différentes combinaisons porte-greffe/greffon sur le métabolome de la baie de raisin

II.1. Introduction

Les porte-greffes jouent un rôle important dans l'adaptation de la vigne à certains facteurs environnementaux. Les porte-greffes peuvent influencer le rendement et la composition des fruits en affectant la croissance végétative du greffon, les échanges gazeux, le statut hydrique et l'absorption des éléments minéraux. Dans des conditions environnementales particulières, la sélection de la meilleure combinaison porte-greffe/greffon permet d'optimiser la qualité du fruit. Cependant, peu d'études ont établi l'impact de différents porte-greffes sur le métabolome global des baies. Une meilleure connaissance du profil métabolomique des baies de raisin en fonction des porte-greffes permettrait de mieux comprendre les mécanismes intervenant entre les deux génotypes en interaction.

Des analyses métabolomiques par LC-MS en mode négatif ont été réalisées sur les pellicules de baies de raisin issues de quatre combinaisons porte-greffe/greffon à deux stades de prélèvement (mi-maturité et maturité). Les données obtenues ont été traitées à l'aide du logiciel MZmine pour obtenir des matrices de données qui ont ensuite été exportées dans le logiciel Simca 14. L'analyse différentielle des profils métaboliques des pellicules de baie de raisin a été réalisée à l'aide d'analyses statistiques multivariées.

En première approche, une analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée pour visualiser l'organisation des échantillons dans un espace à deux dimensions. Dans un deuxième temps, une méthode descriptive l'OPLS a été appliquée afin d'identifier les ions discriminants.

II.2. Analyses statistiques

II.2.1. Analyse en composantes principales

Une analyse en Composantes Principales a été réalisée sur 144 échantillons de pellicules de baie de raisin (2 variétés x 2 porte-greffes x 3 nutritions azotées x 2 stades de prélèvement x 2 années x 3 réplicats). L'analyse réalisée sur les échantillons de pellicules est présentée dans la figure 32. La composante 1 de l'ACP représentant 45.8% de la variance totale observée permet de discriminer les deux variétés, tandis que la composante 2 représentant 7.25% de la variance discrimine les deux années 2013 et 2014. Les deux variétés ont été par la suite analysées séparément.

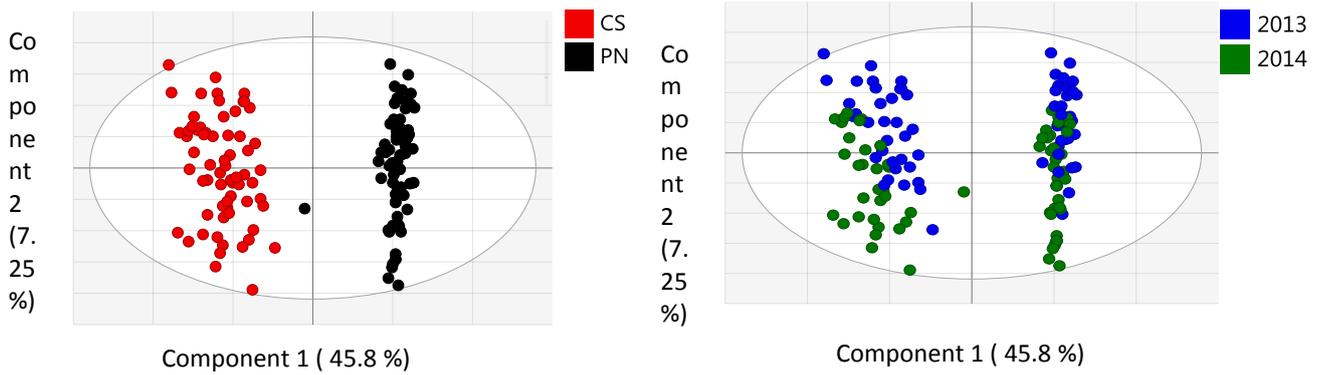


Figure 32 : Analyse en Composantes Principales des données d'intensités en mode négatif des échantillons 2013 et 2014 de pellicules de CS et PN à la mi-maturité et maturité. Le modèle a été construit après centrage-réduction des variables.

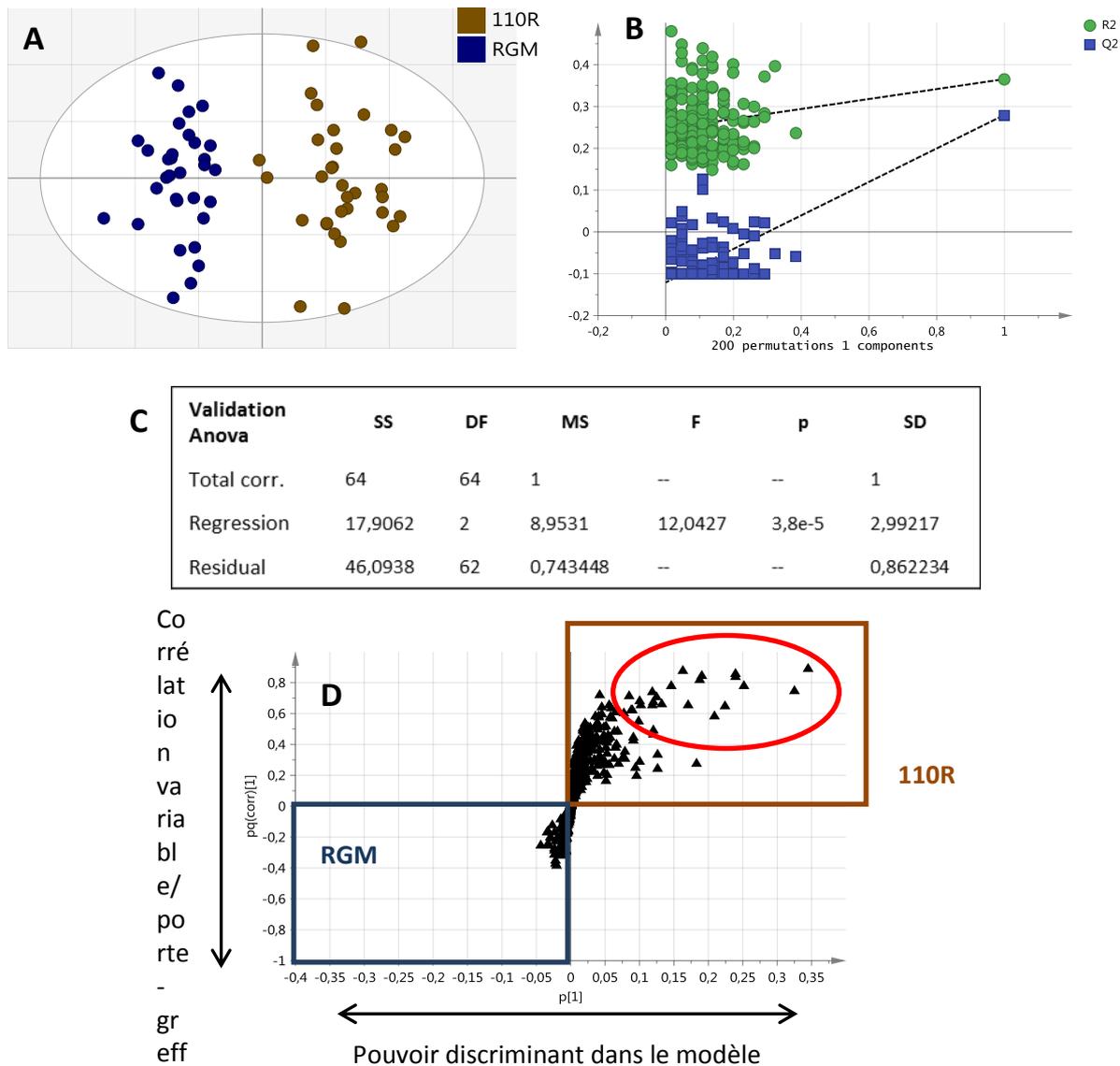


Figure 33 : Analyse OPLS des données LC-MS en mode négatif de pellicules issues du CS
 A : Score plot des individus après normalisation par centrage-réduction. B : validation du modèle OPLS par un test de permutation (200 permutations). C : Table de validation Anova du modèle. D : Représentation de la carte des poids factoriels sous forme de S-plot, chaque point représente un ion détecté en LC-MS.

II.2.2. Analyse OPLS

L'analyse des données a ensuite été approfondie par des analyses OPLS en choisissant l'effet porte-greffe comme variable explicative (Y).

Les résultats obtenus pour le CS sont présentés dans la figure 33. La figure 33 A présente le score plot réalisé à partir des données obtenues dans la pellicule de CS, et comme attendu, la séparation selon les porte-greffes (Y) est observée sur la première composante, la seconde composante orthogonale étant indépendante de Y. La figure 33 B, quant à elle, correspond à la validation du modèle par un test de Permutation (R^2 (variable explicative) < 0.5 ; Q^2 (variable prédictive) < 0). La validation du modèle par un test CV-Anova est présentée dans la figure 33 C, la p-value ($3.8e^{-5}$) traduit la validité du modèle.

La carte des poids factoriels est représentée sous forme de « S-plot » qui permet de visualiser les variables selon leur pouvoir discriminant dans le modèle en abscisse (p) et selon la corrélation de ses valeurs avec le descripteur (porte-greffe) en ordonnées (pq(corr)) (Fig. 33 D). En abscisse, plus une variable (métabolite) s'éloigne de l'axe central vertical, plus son pouvoir discriminant est important, dans le cas présent, plus elle s'éloigne vers la droite plus elle est élevée chez les individus greffés sur 110R, et plus elle s'éloigne vers la gauche, plus elle est élevée chez les individus greffés sur RGM et donc diminuée chez les plantes greffées sur 110R. En ordonnée, plus une variable s'éloigne de l'axe central horizontal, plus ses valeurs sont corrélées avec l'un ou l'autre des descripteurs. Les ions sélectionnés comme les plus discriminants représentent les points du S-plot possédant des valeurs de corrélation en ordonnée supérieures à 0.5. Chez le CS, le profil d'accumulation des ions en fonction des deux porte-greffes est très différent. En effet, aucun ion ne semble corrélérer positivement avec le porte-greffe RGM, tandis que plusieurs métabolites corréleraient positivement avec le porte-greffe 110R.

Les résultats obtenus chez le PN sont présentés dans la figure 34. Le score plot des données obtenues à partir de pellicules de PN présente la séparation des échantillons selon les porte-greffes (Y) en première composante. La figure 34 B confirme la validité du modèle à l'aide d'un test de Permutation (R^2 (variable explicative) < 0.5 ; Q^2 (variable prédictive) < 0). La validation du modèle par un test CV-Anova est présentée dans la figure 34 C, la p-value (0.001019) traduit la significativité du modèle. La carte des poids factoriels représentée sous forme de « S-plot » est donnée dans la figure 34 D. Le profil d'accumulation des ions diffère selon les porte-greffes. En effet, contrairement à ce qui est observé pour le CS, l'accumulation de certains ions chez le PN semble corrélérer avec le porte-greffe RGM.

Une fois les variables d'intérêt isolées, il faut les identifier afin de leur donner une signification biologique. Cette identification repose sur l'obtention de la formule brute du composé à l'origine du signal détecté. Elle s'appuie, en fonction des appareils, sur la mesure de masse précise et/ou l'obtention de spectres de fragmentation.

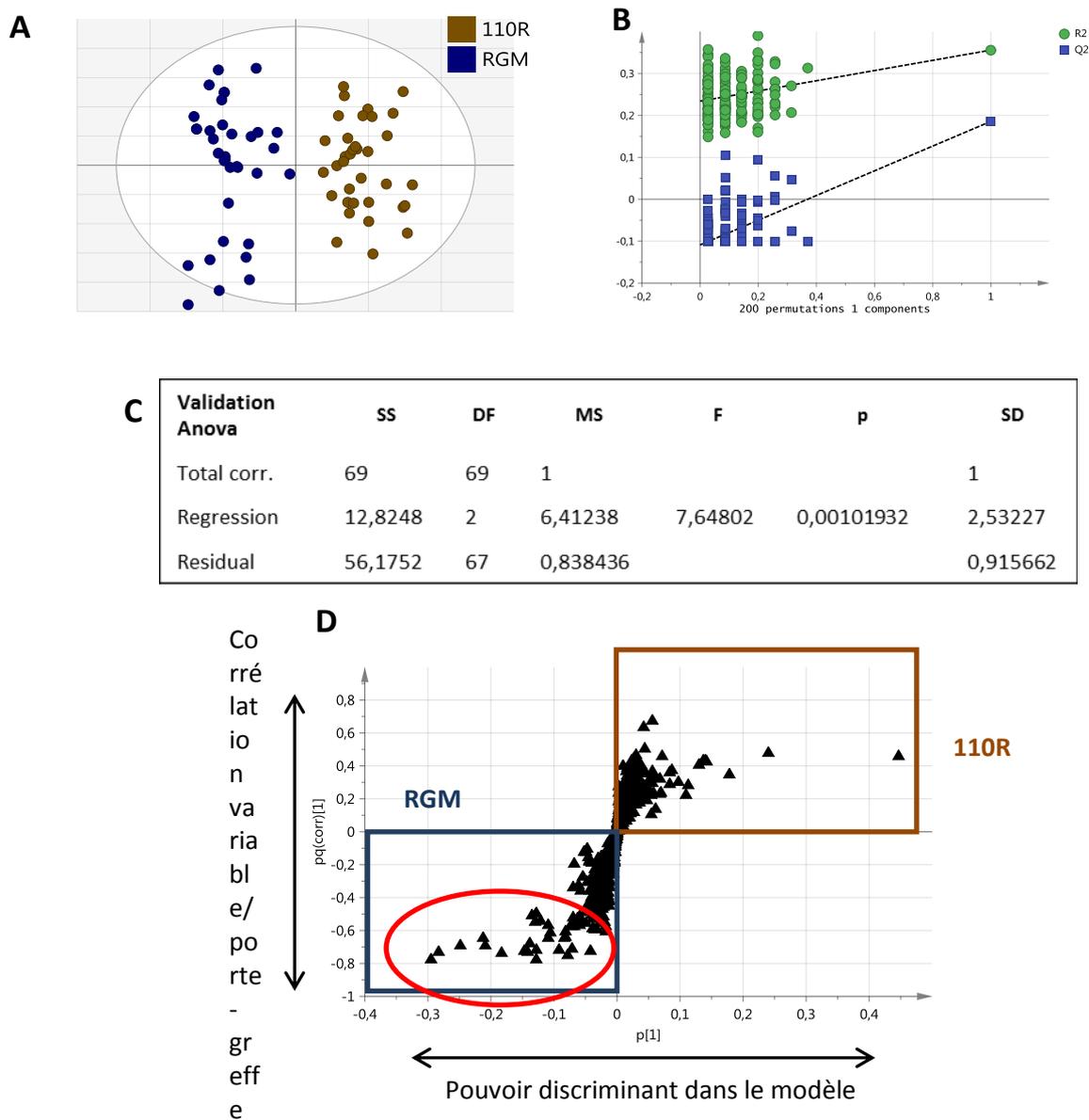


Figure 34 : Analyse OPLS des données LC-MS en mode négatif de pellicules issues du PN
 A : Score plot des individus après normalisation par centrage-réduction. B : validation du modèle OPLS par un test de permutation (200 permutations). C : Table de validation Anova du modèle. D : Représentation de la carte des poids factoriels sous forme de S-plot, chaque point représente un ion détecté en LC-MS.

II.2.3. Identification des métabolites d'intérêts

L'identification des métabolites a été réalisée en comparant les temps de rétention, les m/z et les fragments obtenus, à ceux de standards commerciaux. Lorsqu'aucune correspondance n'a été observée, le m/z et les fragments de la molécule ont été comparés avec ceux rapportés dans la littérature ou dans des bases de données en ligne.

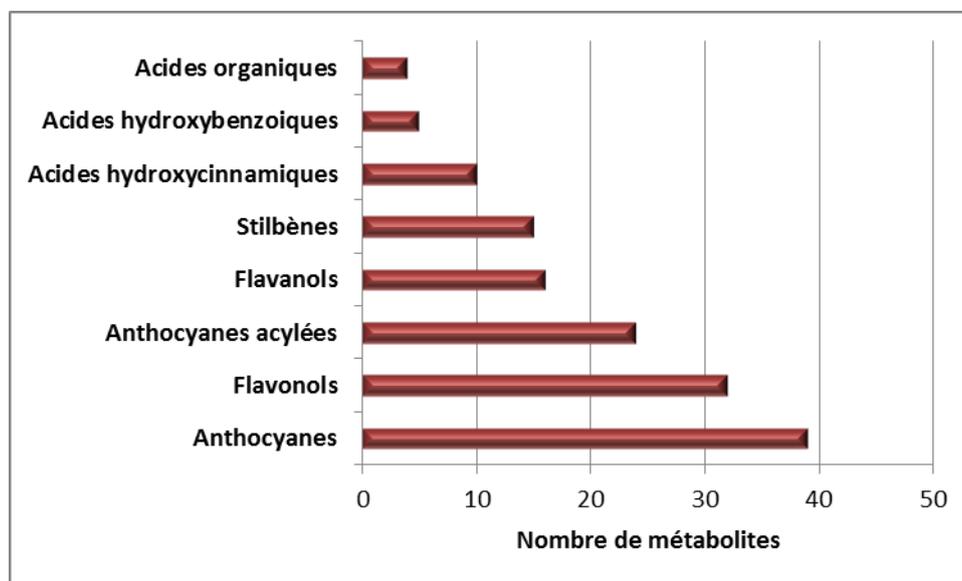


Figure 35 : Différentes classes de métabolites identifiés

Les 146 métabolites identifiés se répartissent dans les différentes classes présentées dans la figure 35. Ils correspondent principalement aux différentes familles de flavonoïdes (anthocyanes, flavonols et flavanols), aux stilbènes, aux acides phénoliques ainsi qu'aux acides organiques (et dérivés).

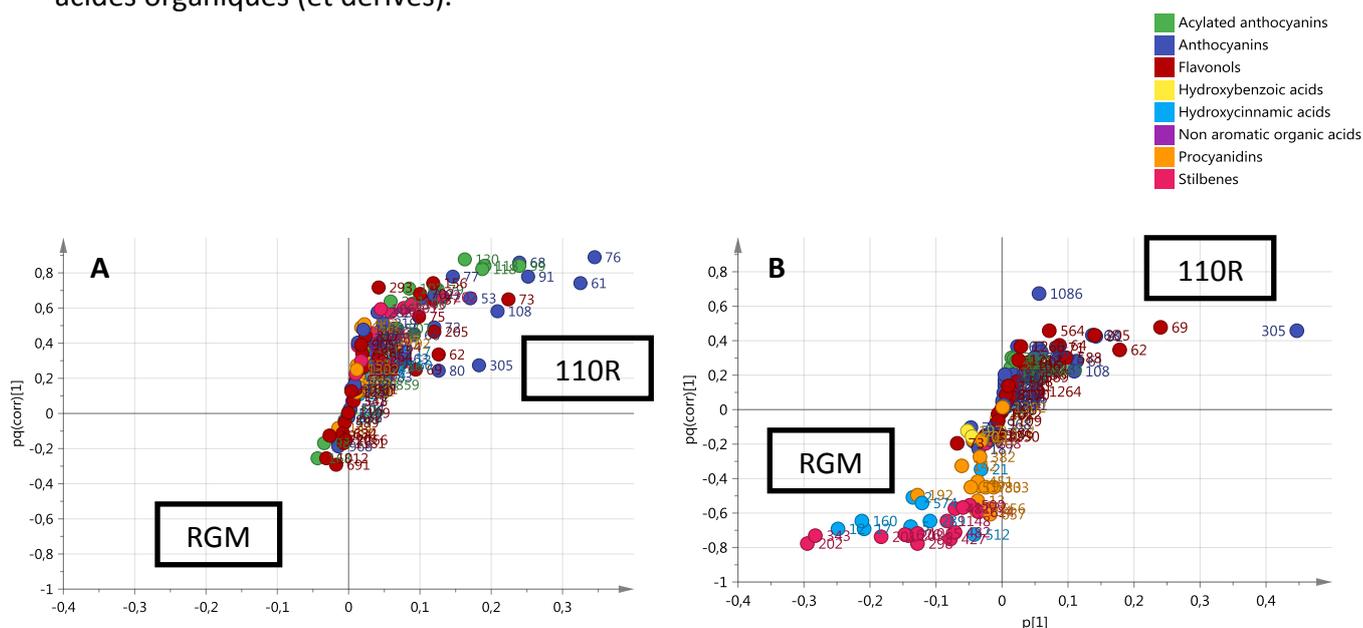


Figure 36 : Cartes des poids factoriels représentées sous forme de « S-plot » avec apparition des classes de métabolites identifiés

A : S-plot obtenue à partie des données de CS, B : S-plot obtenue à partie des données de PN.

La comparaison des cartes des poids factoriels du CS et du PN (Fig. 36) montre que le profil d'accumulation des métabolites des deux variétés dépend de combinaison spécifique porte-greffe/greffon. En effet, les baies issues de CS greffé sur le porte-greffe 110R semblent accumuler plus d'anthocyanes et d'anthocyanes acétylées alors que pour le PN greffé sur le porte-greffe RGM les baies sont plus riches en stilbènes et en acide hydroxycinnamique.

Tableau 10 : Identification des métabolites corrélés avec la combinaison CS/110R

iD	M/Z	RT	identification	pq(corr)	T_test (p=) (porte-greffe)
76	480,867	13,4403	delphinidine-3-O-glucoside hydrate	0,891086	1.84E-03
91	494,88	15,0474	pétunidine-3-O-glucoside hydrate	0,78104	9.77E-04
99	504,902	17,4956	delphinidine 3-O- acétyl glucoside	0,837361	9.40E-03
68	476,897	15,0316	pétunidine-3-O-glucoside	0,855847	2.93E-03
73	478,89	18,0871	myricétine-O-hexoside	0,646439	4.44E-02
113	518,909	18,9643	pétunidine 3-O- acétyl glucoside	0,842594	1.19E-02
61	462,889	13,461	delphinidine-3-O-glucoside	0,744508	1.93E-04
53	446,914	14,6013	cyanidine-3-O-glucoside	0,655975	2.95E-02

L'identification des ions sélectionnés comme étant les plus discriminants révèle une corrélation positive entre le greffage du CS sur le porte-greffe 110R et l'accumulation d'anthocyane-3-O-glucosides (pétunidine, delphinidine et cyanidine), d'anthocyanes (acétyl)-3-O-glucoside (delphinidine et pétunidine) et de myricétine-O-hexoside et (Tableau 10).

Tableau 11 : Identification des métabolites corrélés avec la combinaison PN/RGM

iD	M/Z	RT	identification	pq(corr)	T_test (p=) (porte-greffe)
343	388,919	22,9618	resvératrol-O-glucoside	-0,732441	1.25E-02
12	294,844	14,5047	Acide coumaroyl tartrique	-0,691484	3.69E-02
17	310,824	11,4533	Acide cafféoyl tartrique	-0,691965	3.26E-03
201	388,93	19,6519	resvératrol-O-glucoside	-0,735416	2.28E-02

La combinaison PN/110R montre une faible corrélation positive avec l'accumulation d'un seul métabolite, la quercétine 3-O-acétylglucoside (pq(corr)=0,676602). Cependant, une corrélation positive est observée entre le PN greffé sur RGM et l'accumulation de deux resvératrol-O-glucosides (isomères ?) et de dérivés d'acide hydroxycinnamique (acide coumaroyl tartrique et acide cafféoyl tartrique) (Tableau 11).

II.2.4. Conclusions

Le métabolome des pellicules de baies de raisin de différentes combinaisons porte-greffe/greffon a été analysé. Cette étude révèle que l'utilisation d'analyse multivariée telle que l'analyse OPLS peut être un outil très utile dans l'analyse de données métabolomiques. En effet, cette technique nous a permis d'identifier des métabolites dont l'accumulation est spécifique à certaines combinaisons porte-greffe/greffon. Pour chacune des variétés CS et PN, les différents génotypes de porte-greffe affectent le métabolome de la pellicule des baies. Une corrélation positive a été observée entre le greffage du CS sur 110R et l'accumulation d'anthocyane-3-*O*-glucoside et d'anthocyane (acetyl)-3-*O*-glucoside, alors qu'aucun métabolite ne semble positivement corrélé avec la combinaison CS/RGM. Chez le PN, un seul métabolite semble corrélé positivement avec le porte-greffe 110R alors qu'une corrélation positive a été observée entre le PN greffé sur RGM et l'accumulation dans les pellicules de stilbènes et d'acides hydroxycinnamiques. Cette étude confirme que l'interaction entre le génotype du porte-greffe et le génotype du greffon affecte la composition des baies et leur potentiel œnologique. En particulier, certaines combinaisons porte-greffe/greffon favorise l'accumulation de composés organoleptiques tels que les anthocyanes et/ou les flavonols.

III- Effets de l'azote sur différentes combinaisons porte-greffe /greffon : analyse du métabolome

III.1. Introduction

Les conséquences des variations de disponibilité en azote sur le métabolisme des baies ont principalement été étudiées de façon ciblée au niveau transcriptionnel et métabolique (Cf chapitre 1). En effet, ce type d'approche permet d'isoler des composés et des paramètres clefs affectant certaines étapes impliquées dans le développement, la maturation, et la composition des baies. Cependant, les approches non ciblées telles que la métabolomique et la transcriptomique sont indispensables pour identifier les réseaux d'interactions entre le climat, les pratiques culturales, la composition de la baie, la vinification et la qualité du vin par exemple. Au cours de ma thèse, ces deux approches ont été utilisées pour étudier les effets de différents traitements azotés sur la composition des baies de différentes combinaisons porte-greffe/greffon.

III.2 Analyses métabolomiques

III.2.1. Effet de l'azote sur la composition du raisin

Les résultats obtenus pour le CS et le PN en fonction des différents traitements azotés sont présentés respectivement dans les figures 37 et 38. Indépendamment du cépage considéré, les « score plot » des données obtenues présentent la séparation des échantillons selon les traitements azotés (Y) en première composante. Les figures 37B et 38B confirment la validité des modèles à l'aide des tests de Permutation (R^2 (variable explicative) < 0.5) ; Q^2 (variable prédictive) < 0). Les validations des modèles par un test CV- Anova sont présentées dans les figures 37C et 38C.

La comparaison des cartes des poids factoriels du CS et du PN (respectivement Fig.37D et Fig.38D) montre que l'accumulation des métabolites est affectée par les différents traitements azotés. En effet, lors d'une faible disponibilité en azote (modalités N- et N) les pellicules des baies de raisin du CS et du PN accumulent un plus grand nombre de métabolites. De plus, lorsque l'azote est faiblement disponible, les baies issues de CS accumulent plus d'anthocyanes, d'anthocyanes acétylées et de flavonols (Fig. 37 D et E) et les baies issues du PN sont plus riches en anthocyanes et flavonols (Fig. 38 D et E).

L'identification des ions sélectionnés comme étant les plus discriminants révèle une corrélation positive entre la combinaison CS/N- et l'accumulation d'anthocyane-3-O-glucosides (pétunidine, delphinidine et cyanidine), d'anthocyanes (acétyl)-3-O-glucoside (delphinidine et pétunidine) et de Kaempférol-3-O-glucosides (Fig. 37 E). Une corrélation positive est observée entre la combinaison PN/N- et l'accumulation d'anthocyane-3-O-glucosides (péonidine, cyanidine et petunidine), de kaempférol-3-O-glucosides, quercétine-3-O-glucosides et de dihydroquercétine-O-désoxyhexoside (Fig. 38 E).

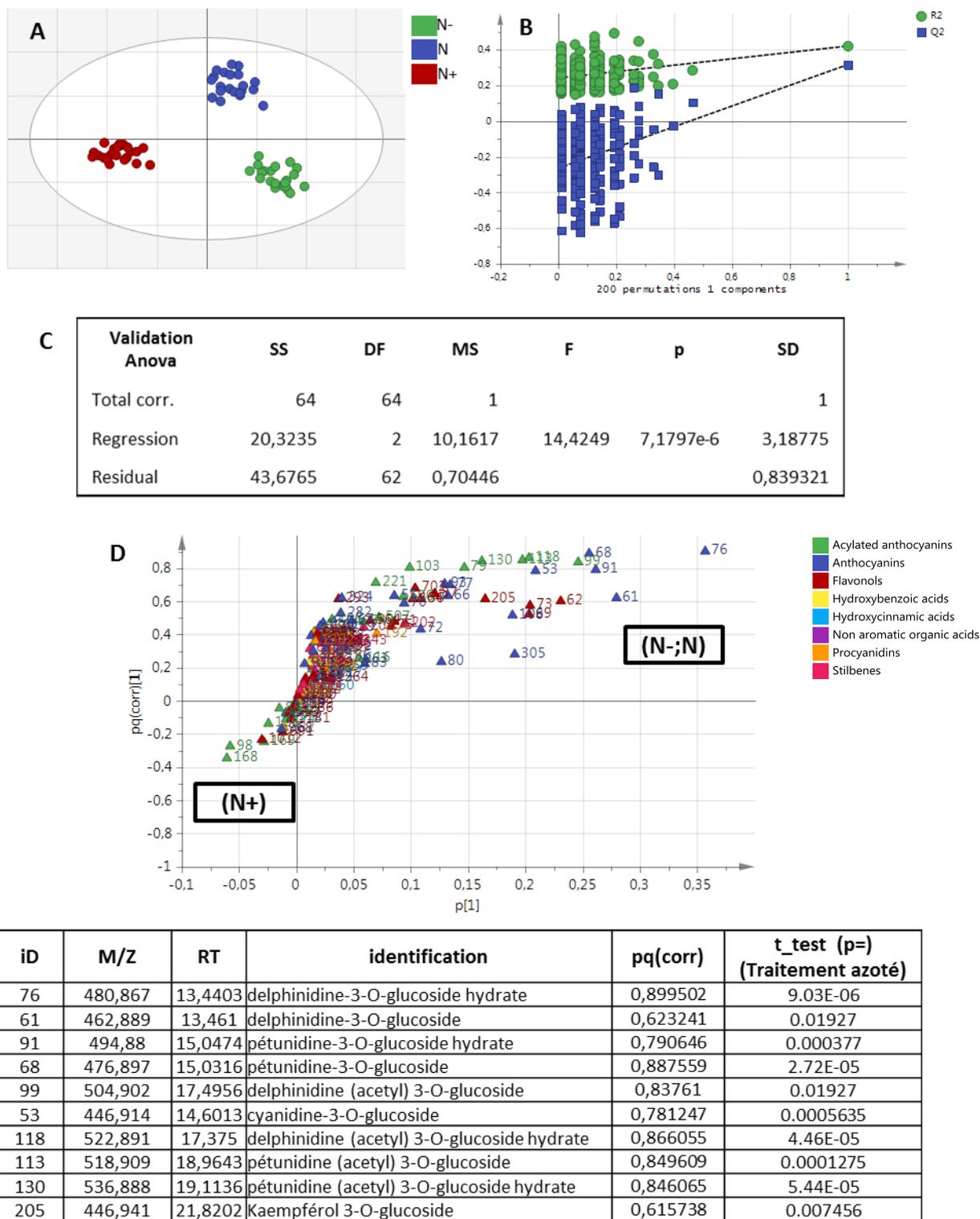


Figure 37 : Analyse OPLS des données LC-MS en mode négatif de pellicules issues du CS
 A : Score plot des individus après normalisation par centrage-réduction. B : validation du modèle OPLS par un test de permutation (200 permutations). C : Table de validation Anova du modèle. D : Représentation de la carte des poids factoriels sous forme de S-plot, ; chaque point représente un ion détecté en LC-MS. E : Identification des métabolites corrélés avec une faible disponibilité en azote

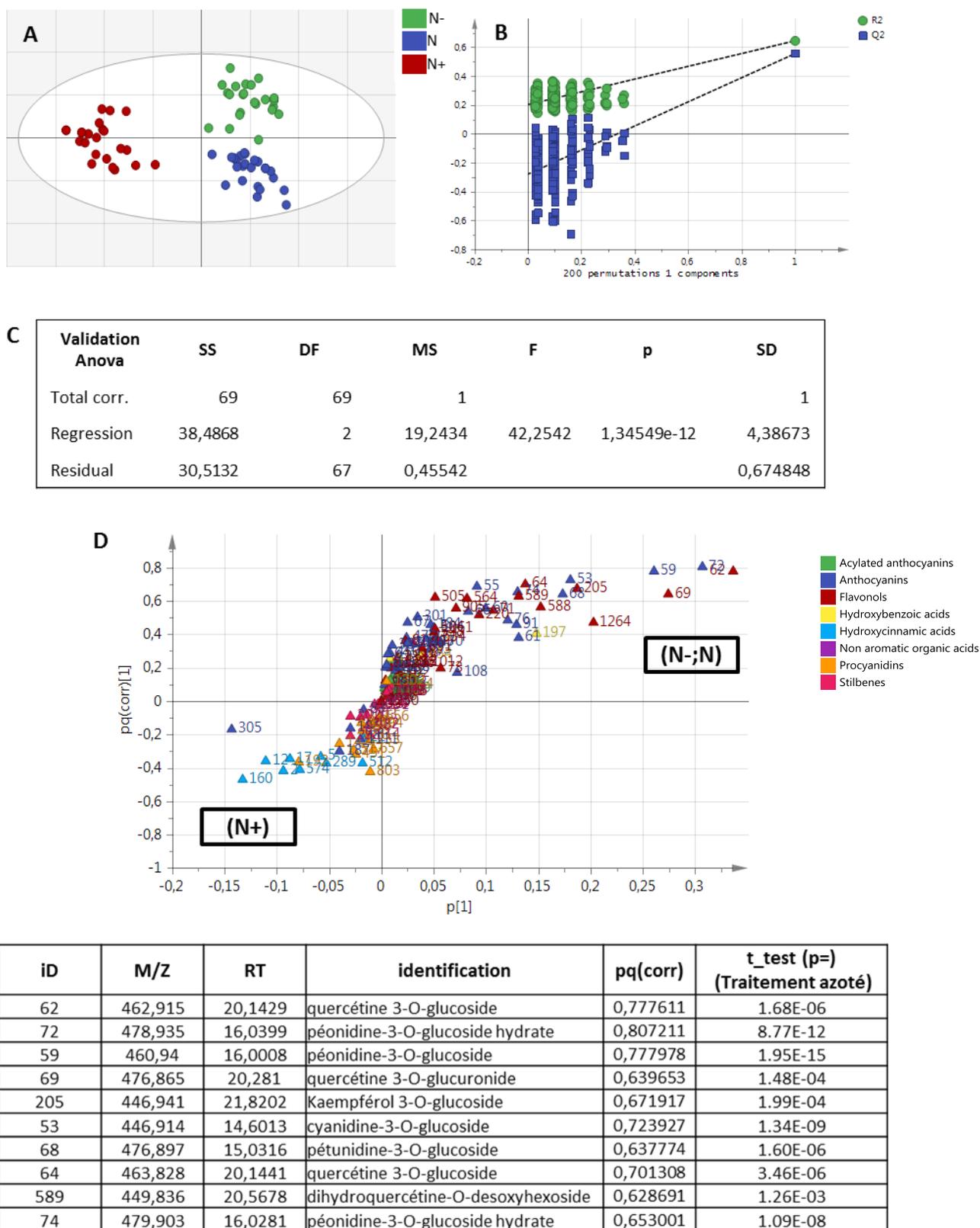


Figure 38 : Analyse OPLS des données LC-MS en mode négatif de pellicules issues du PN
A : Score plot des individus après normalisation par centrage-réduction. **B :** validation du modèle OPLS par un test de permutation (200 permutations). **C :** Table de validation Anova du modèle. **D :** Représentation de la carte des poids factoriels sous forme de S-plot, ; chaque point représente un ion détecté en LC-MS. **E :** Identification des métabolites corrélés avec une faible disponibilité en azote

Conclusions

L'effet de différents traitements azotés sur le métabolome des pellicules de baies de CS et de PN a été analysé (tableau 12). En condition N-, quel que soit le cépage considéré, une accumulation d'anthocyanes-3-*O*-glucoside (delphinidine, pétunidine, cyanidine et péonidine) et de kaempférol-3-*O*-glucoside est observée. Cependant, en condition N-, l'accumulation de certains métabolites semble spécifique de la variété de greffon étudiée. En effet, une accumulation d'anthocyanes (acétyl)-3-*O*-glucoside (delphinidine et pétunidine) est observée pour le CS et une accumulation de quercétine-3-*O*-glucoside et de quercétine-3-*O*-glucuronide est observée pour le PN.

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des effets d'une faible disponibilité en azote (N-) par rapport aux modalités (N+)

	Cabernet Sauvignon	Pinot Noir
Anthocyanes		
Delphinidine-3- <i>O</i> -glucoside	↗	↗
Pétunidine-3- <i>O</i> -glucoside	↗	↗
Malvidine-3- <i>O</i> -glucoside	=	=
Cyanidine-3- <i>O</i> -glucoside	↗	↗
Péonidine-3- <i>O</i> -glucoside	↗	↗
Anthocyanes acétylés		
Delphinidine (acétyl)-3- <i>O</i> -glucoside	↗	=
Pétunidine (acétyl)-3- <i>O</i> -glucoside	↗	=
Malvidine (acétyl)-3- <i>O</i> -glucoside	=	=
Cyanidine (acétyl)-3- <i>O</i> -glucoside	=	=
Péonidine (acétyl)-3- <i>O</i> -glucoside	=	=
Flavonols		
Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside	=	↗
Quercétine-3- <i>O</i> -glucuronide	=	↗
Kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside	↗	↗

III.2.2. Effet de l'azote en interaction avec différents porte-greffes sur la composition du raisin

Combinaison CS/110R :

Les résultats obtenus pour le CS greffé sur le porte-greffe 110R sont présentés dans la figure 39. Le score plot des données obtenues présente la séparation des échantillons selon les traitements azotés (Y) en première composante. La figure 39 B confirme la validité du modèle à l'aide d'un test de Permutation (R^2 (variable explicative) < 0.5 ; Q^2 (variable prédictive) < 0). La validation du modèle par un test CV- Anova est présentée dans la figure 39 C, la p-value ($7.01e^{-5}$) traduit la validité du modèle. La figure 39 D présente la carte des poids factoriels représentée sous forme de « S-plot ». Le profil d'accumulation des ions diffère selon les traitements. En effet, l'accumulation de nombreux métabolites corrèle avec une faible disponibilité en azote (modalités N et N-).

L'identification des ions sélectionnés comme étant les plus discriminants révèle une corrélation positive entre la combinaison CS/110R/N- et l'accumulation d'anthocyane-3-O-glucosides (pétunidine, delphinidine et cyanidine), d'anthocyanes (acétyl)-3-O-glucoside (delphinidine, cyanidine et pétunidine), de myricétine-O-hexoside et de quercétine-3-O-glucosides (Fig. 39 E).

Combinaison CS/RGM :

Les résultats obtenus pour le CS greffé sur le porte-greffe RGM sont présentés dans la figure 40. Comme attendu, le score plot des données obtenues présente la séparation des échantillons selon le traitement azoté (Fig. 40 A). Les deux tests de validation confirment la validité du modèle (R^2 (variable explicative) < 0.5 ; Q^2 (variable prédictive) < 0 ; p-value ($8e^{-3}$)) (Fig.40 B et C). De même que pour la combinaison CS/110R, le profil d'accumulation des métabolites diffère selon les traitements.

L'identification des ions sélectionnés comme étant les plus discriminants révèle une corrélation positive entre la combinaison CS/RGM/N- et l'accumulation d'anthocyane-3-O-glucosides (pétunidine, delphinidine et cyanidine) et d'anthocyanes (acétyl)-3-O-glucoside (delphinidine et cyanidine) (Fig. 40 E).

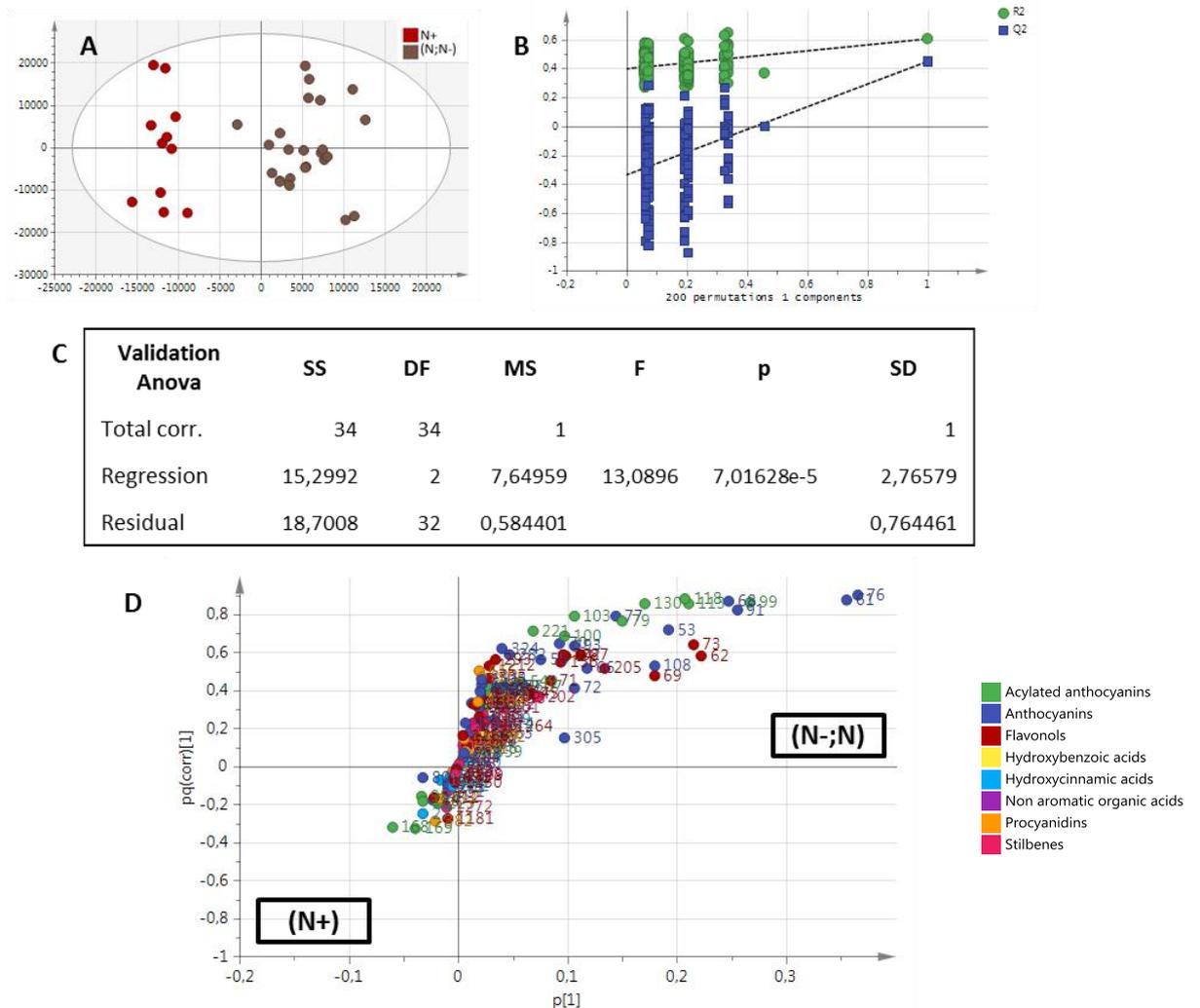


Figure 39 : Analyse OPLS des données LC-MS en mode négatif de pellicules issues du CS greffé sur le porte-greffe 110R.

A : Score plot des individus après normalisation par centrage-réduction. B : validation du modèle OPLS par un test de permutation (200 permutations). C : Table de validation Anova du modèle. D : Représentation de la carte des poids factoriels sous forme de S-plot ; chaque point représente un ion détecté en LC-MS. E : Identification des métabolites corrélés avec une faible disponibilité en azote.

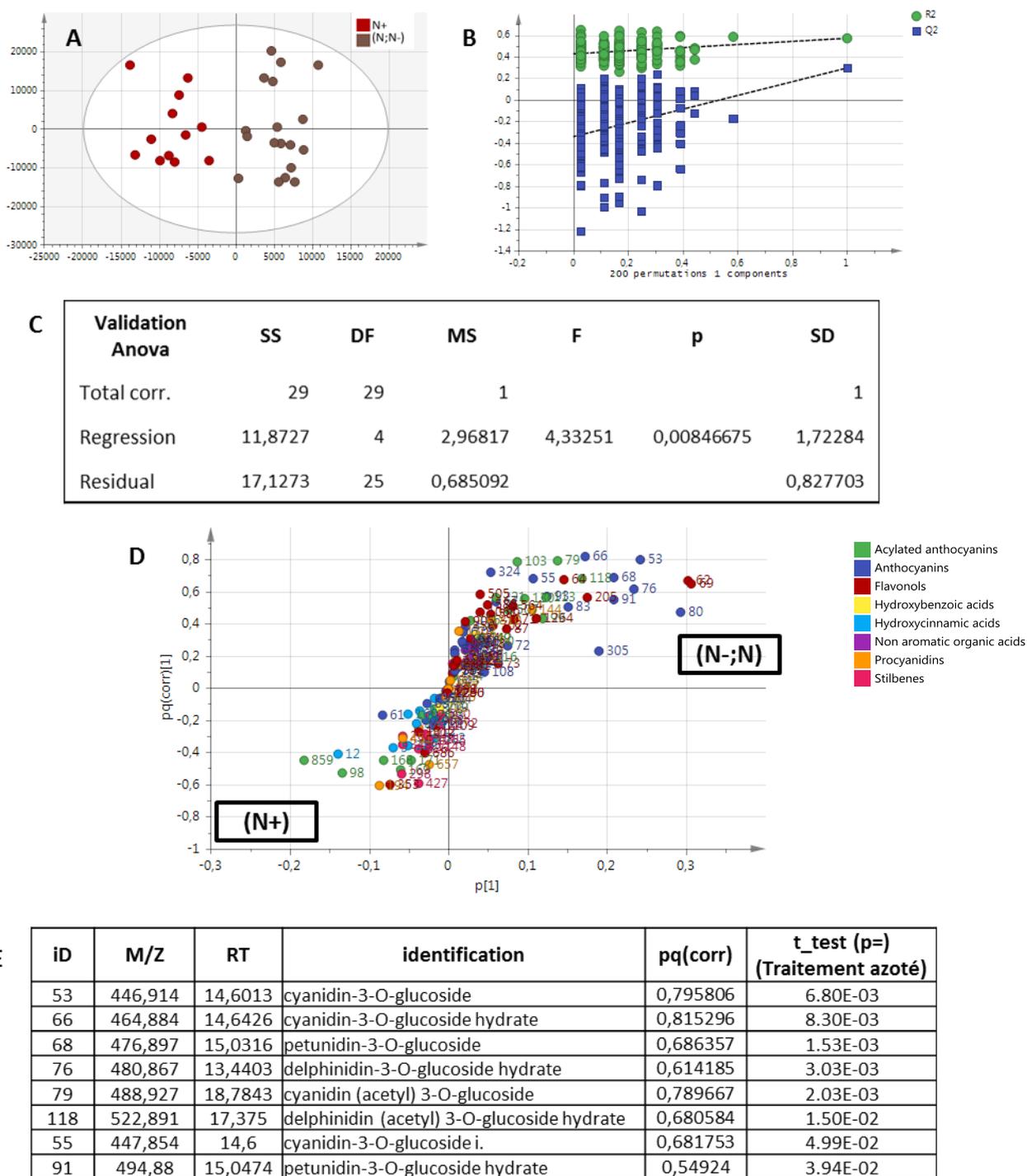


Figure 40 : Analyse OPLS des données LC-MS en mode négatif de pellicules issues du CS greffé sur le porte-greffe RGM.

A : Score plot des individus après normalisation par centrage-réduction. B : validation du modèle OPLS par un test de permutation (200 permutations). C : Table de validation Anova du modèle. D : Représentation de la carte des poids factoriels sous forme de S-plot ; chaque point représente un ion détecté en LC-MS. E : Identification des métabolites corrélés avec une faible disponibilité en azote

Combinaison PN/110R :

Le score plot des données obtenues pour le PN greffé sur le porte-greffe 110R présente la séparation des échantillons selon le traitement azoté (**Fig.41 A**). Les deux tests de validation confirment la validité du modèle (R^2 (variable explicative) <0.5) ; Q^2 (variable prédictive) < 0 ; p-value ($1.5e^{-6}$))(**Fig. 41 B et C**). La **figure 41 D** donne la carte des poids factoriels représentée sous forme de « S-plot ». Le profil d'accumulation des ions diffère selon les traitements. En effet, l'accumulation de nombreux métabolites corrèle avec une faible disponibilité en azote (modalités N et N-).

L'identification des ions sélectionnés comme étant les plus discriminants révèle une corrélation positive entre la combinaison PN/110R/N- et l'accumulation d'anthocyane-3-O-glucosides (pétunidine, péonidine et cyanidine), de quercétine-3-O-glucosides et de quercétine-3-O-glucuronides.

Combinaison PN/RGM :

Les résultats obtenus chez le PN greffé sur le porte-greffe RGM sont présentés dans la figure 42. Le score plot des données obtenues présente la séparation des échantillons selon le traitement azoté. Les deux tests de validation confirment la validité du modèle (R^2 (variable explicative) <0.5) ; Q^2 (variable prédictive) < 0 ; p-value ($2.05e^{-6}$)). La carte des poids factoriels (Fig. 42 D) indique que le profil d'accumulation des métabolites diffère selon les traitements.

L'identification des ions révèle qu'en conditions de faible disponibilité azotée, une corrélation positive est observée entre la combinaison PN/RGM et l'accumulation d'anthocyane-3-O-glucosides (péonidine et cyanidine), de quercétine-3-O-glucosides, de quercétine-3-O-glucuronides, de Kaempferol-3-O-glucosides et de monogalloyl glucose.

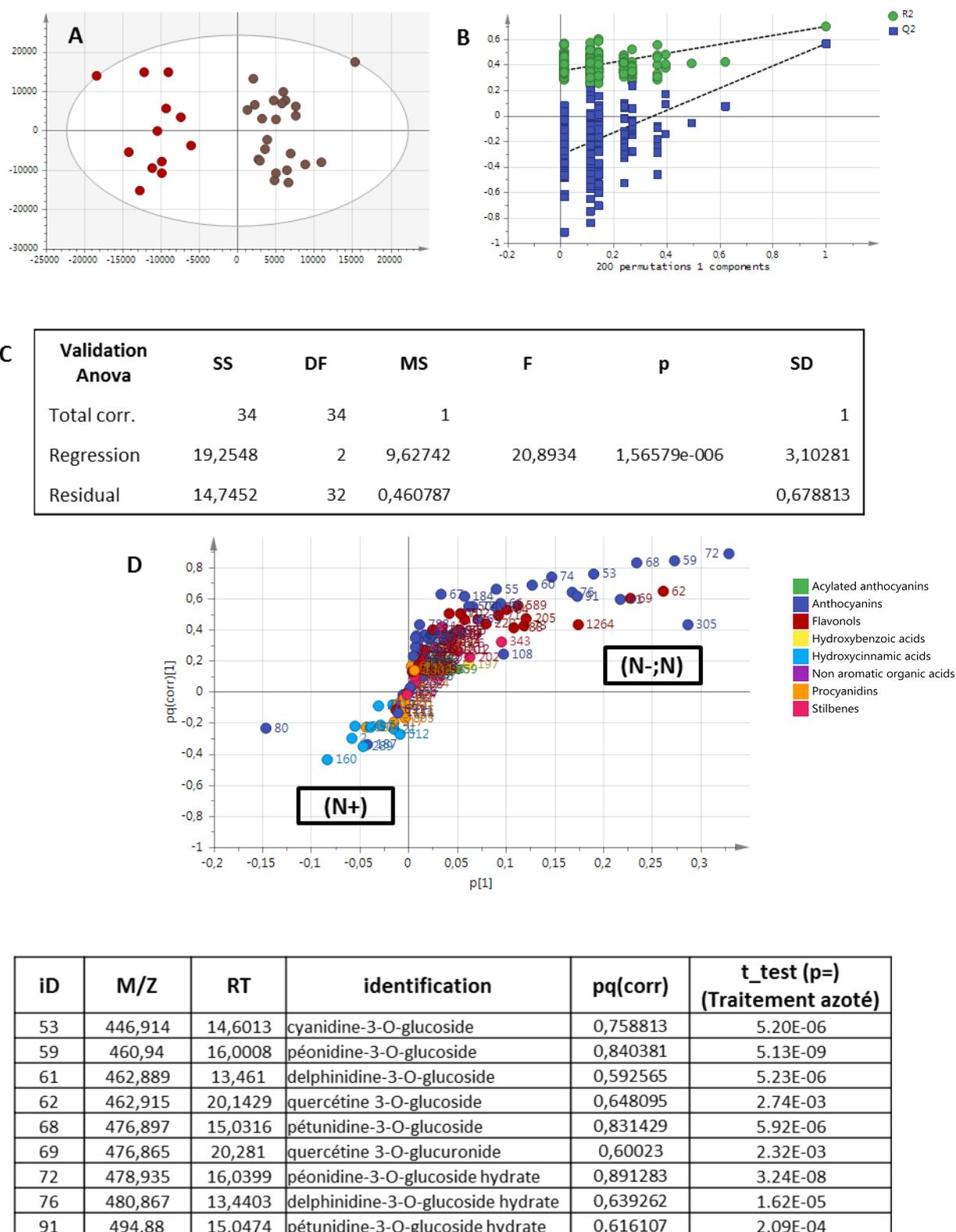


Figure 41 : Analyse OPLS des données LC-MS en mode négatif de pellicules issues du PN greffé sur le porte-greffe 110R.

A : Score plot des individus après normalisation par centrage-réduction. B : validation du modèle OPLS par un test de permutation (200 permutations). C : Table de validation Anova du modèle. D : Représentation de la carte des poids factoriels sous forme de S-plot ; chaque point représente un ion détecté en LC-MS. E : Identification des métabolites corrélés avec une faible disponibilité en azote

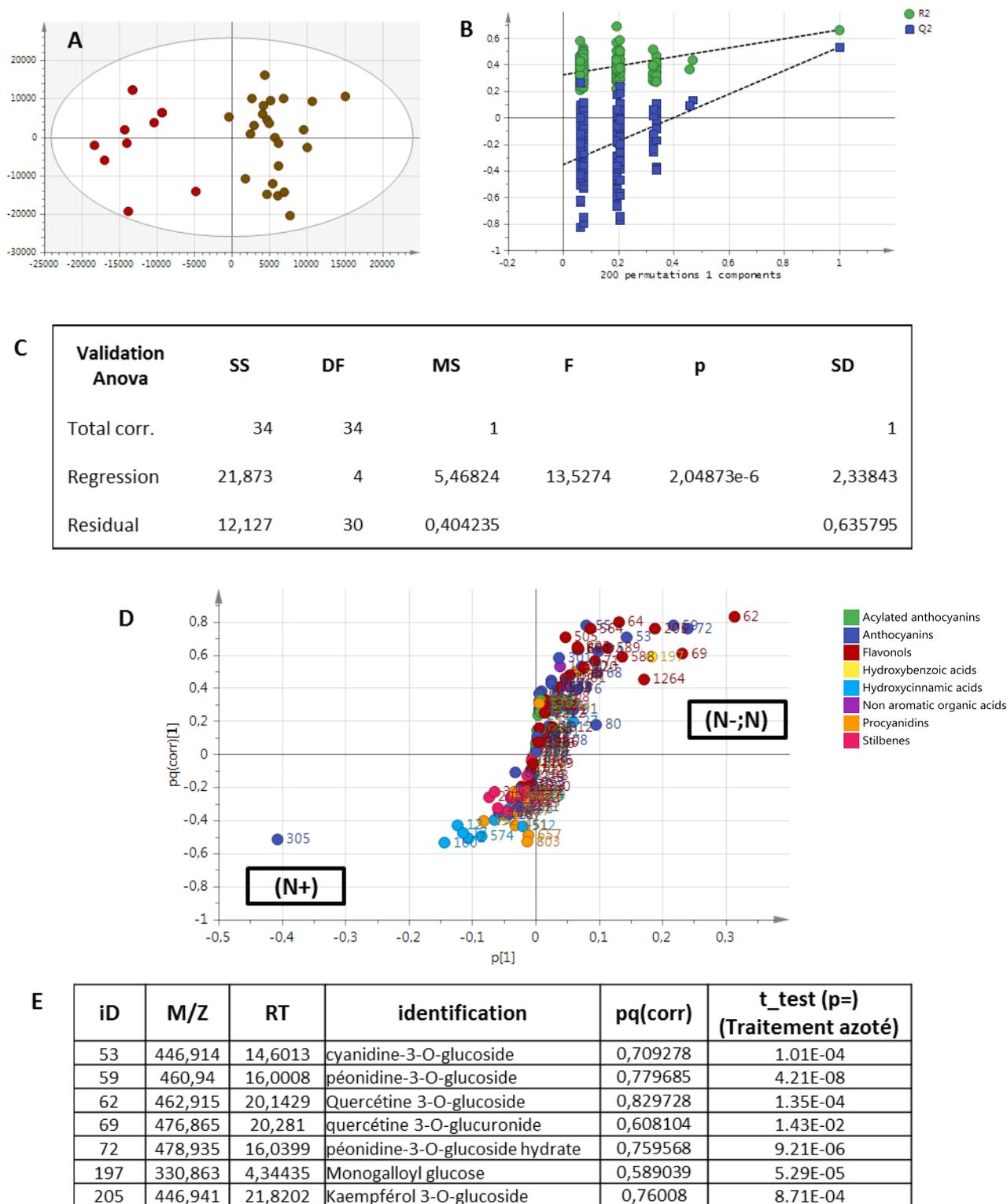


Figure 42 : Analyse OPLS des données LC-MS en mode négatif de pellicules issues du PN greffé sur le porte-greffe RGM.

A : Score plot des individus après normalisation par centrage-réduction. B : validation du modèle OPLS par un test de permutation (200 permutations). C : Table de validation Anova du modèle.

D : Représentation de la carte des poids factoriels sous forme de S-plot ; chaque point représente un ion détecté en LC-MS. E : Identification des métabolites corrélés avec une faible disponibilité en azote

III.3. Conclusions

L'effet de différents traitements azotés sur le métabolome des pellicules de baies de différentes combinaisons porte-greffe/greffon a été analysé (tableau 13). Au préalable, nous avons montré que l'accumulation de certains métabolites est spécifique à certaines combinaisons porte-greffe/greffon. En effet, une accumulation positive est observée entre le CS greffé sur 110R et l'accumulation d'anthocyane-3-*O*-glucosides (pétunidine, delphinidine et cyanidine), d'anthocyanes (acétyl)-3-*O*-glucoside (delphinidine et pétunidine) et de myricétine-*O*-hexoside. En conditions N-, le CS greffé sur 110R corrèle toujours avec l'accumulation de ces mêmes composés ainsi qu'avec l'accumulation de péonidine-3-*O*-glucoside, de quercétine-3-*O*-glucoside, de quercétine-3-*O*-glucuronide et de kaempferol-3-*O*-glucoside.

En condition de faible disponibilité azotée, alors qu'aucun métabolite ne semblait positivement corrélé avec la combinaison CS/RGM, une corrélation positive de l'accumulation d'anthocyane-3-*O*-glucosides (pétunidine, delphinidine, cyanidine et péonidine) et d'anthocyanes (acétyl)-3-*O*-glucoside (delphinidine et cyanidine) est observée. Une corrélation positive a été observée entre le PN greffé sur RGM et l'accumulation de resvératrol-*O*-glucoside et de dérivés d'acide hydroxycinnamique (acide coumaroyl tartarique et acide cafféoyl tartarique). Dans des conditions de faible disponibilité en azote, aucune corrélation avec les mêmes métabolites n'est observée, mais une corrélation avec l'accumulation d'anthocyane-3-*O*-glucosides (cyanidine et péonidine) ainsi qu'avec l'accumulation de flavonol-*O*-glucoside (quercétine et kaempférol), de quercétine-*O*-glucuronide et de monogalloyl glucose apparaît. La combinaison PN/110R présente une faible corrélation positive avec l'accumulation d'un seul métabolite, la quercétine (acétyl) 3-*O*-glucoside. En conditions N-, une corrélation positive entre le PN greffé sur 110R et l'accumulation d'anthocyane-3-*O*-glucosides (pétunidine, delphinidine, cyanidine et péonidine), de quercétine-3-*O*-glucoside et de quercétine-3-*O*-glucuronide a été observée.

Quelque soit la combinaison porte-greffe/greffon, l'accumulation de malvidine est quant à elle peu affectée par les différents niveaux de disponibilité azotée.

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des effets d'une faible disponibilité en azote (N-) par rapport aux modalités (N+) sur différentes combinaisons porte-greffe/greffon.

	Cabernet Sauvignon		Pinot Noir	
	RGM	110R	RGM	110R
Anthocyanes				
Delphinidine-3-O-glucoside	↗	↗	=	↗
Pétunidine-3-O-glucoside	↗	↗	=	↗
Malvidine-3-O-glucoside	=	=	=	=
Cyanidine-3-O-glucoside	↗	↗	↗	↗
Péonidine-3-O-glucoside	↗	↗	↗	↗
Anthocyanes acétylées				
Delphinidine (acétyl)-3-O-glucoside	↗	↗	-	-
Pétunidine (acétyl)-3-O-glucoside	=	↗	-	-
Malvidine (acétyl)-3-O-glucoside	=	=	-	-
Cyanidine (acétyl)-3-O-glucoside	↗	↗	-	-
Péonidine (acétyl)-3-O-glucoside	=	=	-	-
Flavonols				
Quercétine-3-O-glucoside	=	↗	↗	↗
Quercétine-3-O-glucuronide	=	=	↗	↗
Myricétine-O-hexoside	=	↗	=	=
Kaempférol-3-O-glucoside	=	↗	↗	=
Monogalloyl glucose	=	=	↗	=

IV- Effets de l'azote sur différentes combinaisons porte-greffe/greffon à maturité: analyse des profils transcriptomiques

IV.1. Analyse par RNA-Seq

Parallèlement aux analyses métabolomiques détaillées précédemment, des analyses transcriptomiques ont été effectuées en 2013 et 2014 sur des baies à maturité issues de CS greffé sur les deux porte-greffes RGM et 110R, soumis à deux conditions de disponibilité en azote (N- : 0.8 mM N ; et N+ :3.6 mM N).

Le tableau 14 résume les principales caractéristiques des données analysées. Les séquences ont été alignées sur le génome 12X assembly1 de *Vitis vinifera* à l'aide des programmes Tophat v2.0.10 (Kim et al., 2013) et bowtie2 v2.1.0 aligner (Langmead and Salzberg, 2012). Seules les séquences alignées une seule fois sur le génome de référence ont été conservées pour les analyses ultérieures. La quantification de l'expression des gènes a été effectuée en utilisant le programme HTSeq v0.5.4p33 (Anders et al., 2014).

Tableau 14 : Rendement de séquençage et statistique d'alignement sur le génome de référence
 2013.CS.110R.M.N-.B = année 2013. CS greffé sur 110R. M : stade maturité. N- : 0.8 mM N. B: répétition biologique
 2014.CS.RGM.M.N+.C= année 2014. CS greffé sur RGM. M : stade maturité. N+ : 3.6 mM N. C: répétition biologique

Nom de l'échantillon	Nombre total de séquences	Nombre de séquence unique	% de séquences alignées sur le génome de référence	% de séquences alignées une seule fois sur le génome de référence	% de séquences assignées
2013.CS.110R.M.N-.B	67643670	21115881	94.036	86.215	93.573
2013.CS.110R.M.N-.C	54538657	18613300	94.095	86.722	93.773
2013.CS.110R.M.N+.A	59933429	18143585	93.504	84.164	93.998
2013.CS.110R.M.N+.B	62883604	20888729	93.194	84.992	92.314
2013.CS.110R.M.N+.C	53722361	19812820	90.175	82.547	91.899
2013.CS.RGM.M.N-.A	63254985	19591996	93.908	86.012	93.655
2013.CS.RGM.M.N-.B	67363773	23650891	92.533	84.74	91.606
2013.CS.RGM.M.N-.C	56189018	19904478	93.125	85.367	92.662
2013.CS.RGM.M.N+.A	63828599	21195976	92.452	83.981	92.175
2013.CS.RGM.M.N+.B	56569160	19882087	91.733	83.359	92.463
2013.CS.RGM.M.N+.C	62774432	20680564	93.422	85.232	92.833
2014.CS.110R.M.N-.A	66150928	25083383	89.421	82.777	93.199
2014.CS.110R.M.N-.B	71316383	24560057	93.391	86.133	93.515
2014.CS.110R.M.N-.C	60321479	21763043	92.758	84.958	93.247
2014.CS.110R.M.N+.A	57905682	19529832	92.854	84.689	93.031
2014.CS.110R.M.N+.B	59506500	20057710	92.833	84.632	93.241
2014.CS.110R.M.N+.C	64304889	20575148	93.235	84.562	93.538
2014.CS.RGM.M.N-.A	59620232	22726373	93.099	85.5	92.907
2014.CS.RGM.M.N-.B	92795227	31802238	93.324	86.178	92.795
2014.CS.RGM.M.N-.C	53429092	21252077	93.476	86.071	93.004
2014.CS.RGM.M.N+.A	66294239	22437345	93.232	85.411	93.494
2014.CS.RGM.M.N+.B	70286469	23702961	92.966	84.923	93.187
2014.CS.RGM.M.N+.C	58013808	19883932	93.133	84.977	93.518

Dans un premiers temps, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée sur l'ensemble des valeurs RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped reads) des ARN séquencés pour chacune des combinaisons porte-greffe/traitement azoté/année (Fig. 43).

Cette analyse révèle une séparation des échantillons en fonction de l'année de l'expérimentation. En 2013, les échantillons issus du CS greffé sur 110R se séparent en fonction des différents traitements azotés, ce qui n'est pas le cas pour les échantillons issus du CS greffé sur RGM. En 2014, quelque soit le porte-greffe considéré, les échantillons se séparent en fonction des différents traitements azotés N+ et N-.

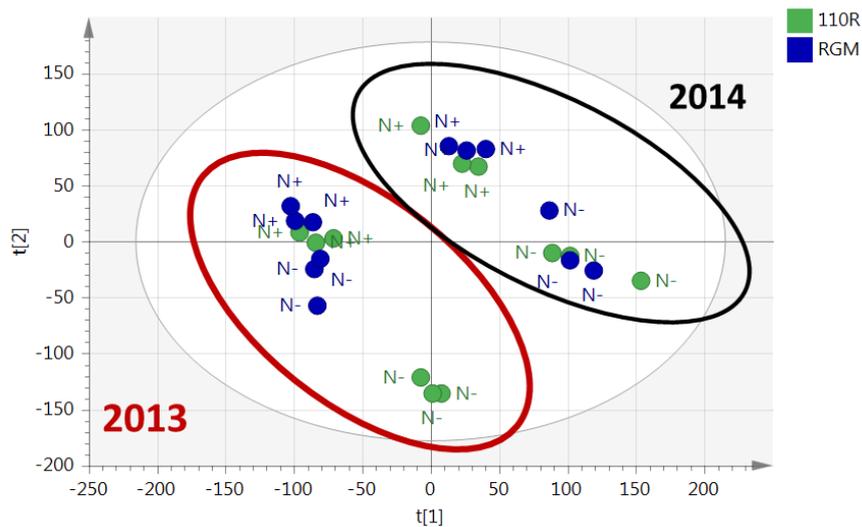


Figure 43 : Analyse en composantes principales de l'ensemble des valeurs RPKM obtenues lors de l'analyse RNA-Seq

Par la suite, une analyse de l'expression différentielle des gènes a été effectuée (p -value ajustée $< 0,05$, $-1 < \text{niveau d'expression (logFC)} > 1$) en fonction des différentes conditions (tableau 14). Le nombre de gènes sous- et surexprimés varie en fonction des conditions considérées. En effet, le nombre de gènes différentiellement exprimés entre les deux traitements azotés varie en fonction du porte-greffe mais aussi en fonction de l'année. En 2013, la comparaison de l'expression des gènes des baies issues du CS greffé sur RGM en fonction des deux modalités N+ et N- ne révèle que 10 gènes sous-exprimés et 2 surexprimés. En 2014, cette même comparaison révèle que 34 gènes sont sous-exprimés et 88 surexprimés. Le nombre de gènes différentiellement exprimés en fonction des deux modalités azotées est supérieur lorsque le CS est greffé sur 110 R. En effet, en 2013, 173 sont sous-exprimés et 224 sont surexprimés, alors que 103 gènes sont sous-exprimés et 160 surexprimés en 2014. Ces résultats sont en bon accord avec les observations faites précédemment lors de l'ACP. En effet, en 2013, aucune séparation ne semblait exister entre les échantillons issus du CS greffé sur RGM en fonction des deux traitements, alors qu'une séparation apparaissait en 2014.

De plus, le nombre de gènes différentiellement exprimés entre les deux porte-greffes varie en fonction de l'année, mais aussi en fonction des traitements azotés. En 2013, la comparaison de l'expression des gènes des baies issues du CS cultivé en conditions N- en fonction des deux porte-greffes RGM et 110R révèle 70 gènes sous-exprimés et 317

surexprimés. En 2014, cette même comparaison ne révèle aucun gène différentiellement exprimé. De même, en 2013, la comparaison de l'expression des gènes des baies issues du CS en conditions N+ en fonction des deux porte-greffes RGM et 110R ne révèle aucun gène différentiellement exprimé. En 2014, cette même comparaison révèle que 4 gènes sont sous-exprimés et 3 surexprimés (tableau 15).

Tableau 15 : Analyse d'expression différentielle entre échantillons pris deux à deux ($p < 0.05$; $-1 < \text{niveau d'expression (logFC)} > 1$).

Comparaisons	Nombre de gènes sous exprimés	Nombre de gènes surexprimés
2013.CS.M.110R N50vsN11	173	224
2013.CS.M.RGM N50vsN11	10	2
2014.CS.M.110R N50vsN11	103	160
2014.CS.M.RGM N50vsN11	34	88
2013CS.M.N11 RGMvs110R	70	317
2013CS.M.N50 RGMvs110R	0	0
2014CS.M.N11 RGMvs110R	0	0
2014CS.M.N50 RGMvs110R	4	3

Le diagramme d'Euler (Fig. 44) est une représentation schématique permettant de dégager les relations possibles entre les différentes conditions. Un seul gène en commun entre toutes les conditions semble différentiellement exprimé (transcrits plus abondants).

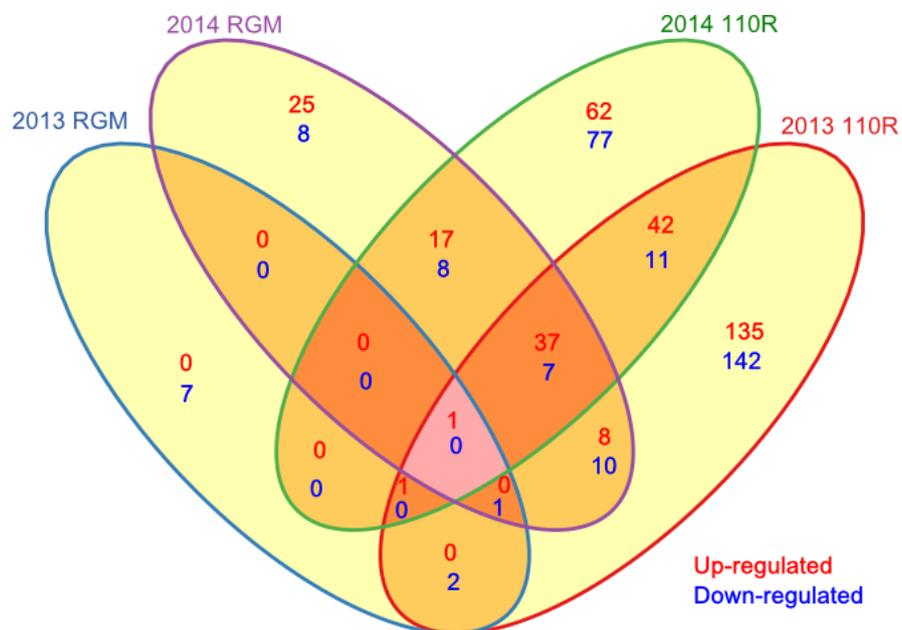


Figure 44 : Diagramme d'Euler représentant les gènes surexprimés (en rouge) et sous réprimés (en bleu) (p .value ajustée < 0.05 , $-1 < \text{niveau d'expression (logFC)} > 1$) en fonction des différents traitements azotée (N+ vs N-)

Une étude de la distribution de ces gènes par catégories fonctionnelles a été réalisée selon l'ontologie MapMan (Thimm et al., 2004a; Rotter et al., 2009) (Fig. 43). La catégorie fonctionnelle la plus affectée quelque soient les conditions considérées correspond aux gènes associés aux stress. D'autres catégories sont significativement affectées comme les mécanismes de transport, le métabolisme pariétal, les mécanismes de synthèse ou dégradation de protéines, le métabolisme secondaire des baies, la synthèse et la régulation des ARNs, le métabolisme des hormones, etc.

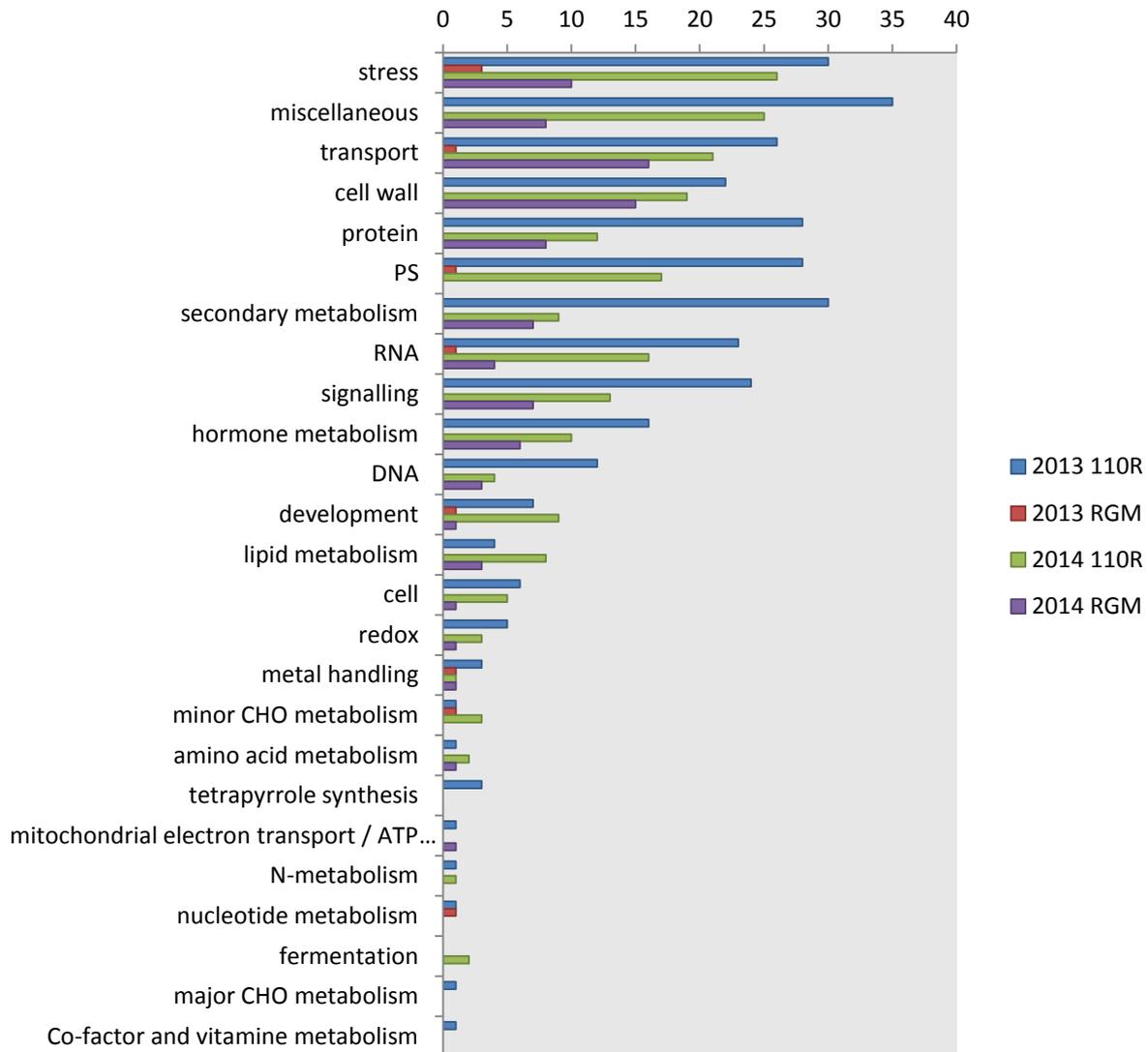


Figure 45 : Regroupement par catégories fonctionnelles (Mapman) des gènes différentiellement exprimés (p .value ajustée < 0.05 , $-1 < \text{niveau d'expression (logFC)} > 1$) en fonction des différents traitements azotés (N+ vs N-)

L'un des objectifs de cette thèse est de mieux comprendre l'impact du statut azoté sur le métabolisme secondaire des baies de raisin. A cette fin, les gènes différentiellement exprimés et qui interviendraient dans les processus liés à la synthèse des flavonoïdes ainsi que dans le métabolisme de l'azote ont été regroupés dans le tableau 16.

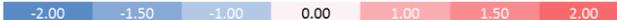
Un nombre faible de gènes associés au métabolisme des flavonoïdes sont différentiellement exprimés, parmi lesquels se trouvent plusieurs gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse de flavonols. Ils comprennent 3 gènes codant une dihydrokaempférol 4-réductase (ou dihydroflavanol 4-réductase DFR), enzyme impliquée dans la synthèse de la leucoanthocyanidine, ainsi qu'un gène codant une flavonol synthase impliqué dans la synthèse de flavonol à partir de dihydroflavanol. De plus, 9 gènes codant une naringenin-chalcone synthase ont été trouvés. Cette enzyme intervient de façon précoce dans la voie de biosynthèse et permet la condensation de trois molécules de malonyl-CoA et une molécule de p-coumaroyl-CoA afin de produire de la naringénine chalcone. Un autre gène codant une *O*-méthyltransférase 1 et deux gènes codant une *O*-méthyltransférase 2 ont été trouvés. Une autre grande famille de gènes codant pour des laccases a été retrouvée. Chez *A.thaliana*, les laccases ont été impliquées dans la biosynthèse des lignines, et la polymérisation oxydative des proanthocyanidines (Liang et al., 2006; Pourcel et al., 2005).

Dans la catégorie fonctionnelle « RNA », des gènes codant des facteurs de transcription de la famille des MYB, qui contrôlent notamment l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des anthocyanes, sont différentiellement exprimés. On trouve aussi des gènes codant des protéines LBD. Chez Arabidopsis, les protéines LBD répriment les gènes structuraux de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes en réponse à l'augmentation de l'apport azoté (Rubin et al., 2009). Elles régulent également la signalisation de l'auxine et l'activation de l'expansion des racines latérales en conditions de faible disponibilité en azote (Okushima et al., 2007; Lee et al., 2013).

L'abondance des transcrits de ces gènes en conditions N+ varie en fonction du génotype du porte-greffe et de l'année de l'expérimentation. Cependant, certaines tendances de fond apparaissent. En effet, les transcrits de naringenin-chalcone synthase et de flavonol synthase sont moins abondants en conditions N+ alors que les transcrits dihydrokaempferol 4-réductase sont plus abondants. Il est difficile de conclure quant à l'expression des gènes codant les facteurs MYB et LBD. Cependant, les transcrits du gène codant la protéine LBD 18, impliqué dans la régulation de la signalisation de l'auxine et l'activation de l'expansion des racines latérales semblent moins abondants en conditions N+.

Tableau 16 : Liste de gènes classés dans les catégories « métabolisme azoté », « métabolisme secondaire » et « RNA » différentiellement exprimés dans les baies de raisin en fonction des différents traitements azotés (N+ vs N-) (p.value ajustée < 0.05, -1 < niveau d'expression (logFC) > 1)

ID	Homologies	2013 110R	2014 110R	2013 RGM	2014 RGM
Nitrogen metabolism					
vv06s0004g06830	asparagine synthetase	1.47	1.32	0.01	1.17
vv05s0020g02480	glutamine synthase	0.96	1.43	0.48	0.47
Secondary metabolism					
vv01s0011g06460	aldo/keto reductase	-0.88	-1.05	-0.01	-0.66
vv18s0157g00090	alliinase family protein	1.61	1.37	0.45	1.04
vv18s0157g00170	alliinase family protein	-1.10	-0.04	-0.92	-0.31
vv03s0180g00250	cinnamyl alcohol dehydrogenase 5	-0.21	1.18	-0.19	0.46
vv02s0025g01260	dihydrokaempferol 4-reductase	1.01	1.59	0.59	0.70
vv15s0048g00980	dihydrokaempferol 4-reductase	1.06	-0.28	-0.02	0.18
vv16s0039g02350	dihydrokaempferol 4-reductase	1.27	1.02	-0.17	0.71
vv18s0001g03470	flavonol synthase	-1.31	-0.49	-0.59	-0.72
vv07s0031g03070	isoflavone reductase	-1.02	-0.29	-0.44	-0.29
vv18s0001g00080	laccase 14	1.38	-0.01	-0.09	0.08
vv18s0075g00540	laccase 14	1.05	0.05	0.15	0.05
vv18s0075g00670	laccase 14	1.01	-0.08	0.00	0.01
vv18s0075g00700	laccase 14	1.43	-0.06	-0.13	-0.03
vv18s0075g00780	laccase 14	1.59	-0.04	-0.10	0.07
vv18s0117g00550	laccase 14	-1.10	-0.12	0.09	-0.15
vv18s0122g00390	laccase 15	-1.18	-1.18	-0.32	-0.68
vv18s0122g00370	laccase 16	-1.10	-1.25	-0.47	-0.78
vv08s0007g01550	laccase 7	1.40	0.47	-0.26	-0.09
vv10s0042g00920	naringenin-chalcone synthase	-1.18	0.33	-0.23	0.05
vv16s0100g00770	naringenin-chalcone synthase	-1.05	-0.06	0.23	-0.19
vv16s0100g00860	naringenin-chalcone synthase	-1.11	-0.43	0.15	-1.43
vv16s0100g00940	naringenin-chalcone synthase	-1.28	-0.27	0.11	-1.72
vv16s0100g01000	naringenin-chalcone synthase	-0.60	-0.42	0.15	-1.24
vv16s0100g01030	naringenin-chalcone synthase	-1.10	-0.31	0.18	-1.07
vv16s0100g01120	naringenin-chalcone synthase	-1.22	-0.56	0.14	-0.96
vv16s0100g01140	naringenin-chalcone synthase	-1.12	-0.27	0.15	-0.42
vv16s0100g01170	naringenin-chalcone synthase	-1.08	-0.16	0.19	-0.31
vv02s0033g00660	nitrilase 4	1.07	-0.02	-0.06	-0.08
vv02s0033g00870	nitrilase 5	1.12	-0.06	-0.26	0.06
vv15s0048g02480	O-Methyltransferase 1	0.02	1.06	-0.40	0.46
vv12s0028g02810	O-methyltransferase family 2 protein	0.78	0.89	0.03	1.13
vv03s0038g03080	O-methyltransferase family 2 protein	-1.37	-0.94	-0.30	-0.47
vv16s0098g00860	oxidoreductase	0.46	0.96	0.27	1.10
vv17s0000g04610	strictosidine synthase 2	-1.19	0.47	-0.50	0.01
vv18s0001g04510	terpene synthase 21	0.24	1.52	-0.17	0.24
vv00s0218g00220	transferase	1.23	0.38	0.28	0.90
vv09s0096g00520	transferase family protein	-1.48	-0.27	-0.80	-0.58
RNA					
vv18s0001g05890	AP2 domain-containing transcription factor	-1.17	-0.26	-0.32	-0.25
vv18s0089g01030	AP2 domain-containing transcription factor	-1.09	-0.76	-0.22	-0.96
vv03s0063g00630	C2C2(Zn) GATA transcription factor family	-0.44	-1.09	-0.21	-0.96
vv08s0032g01110	C2C2(Zn) YABBY family	0.57	1.00	0.17	0.68
vv00s0229g00050	C2H2 zinc finger family	-0.33	-1.11	-0.21	-0.76
vv03s0091g00690	C2H2 zinc finger family	-0.67	-1.03	-0.07	-0.77
vv06s0061g00760	C2H2 zinc finger family	-1.18	-1.13	-0.30	-0.77
vv17s0000g07630	E2F/DP transcription factor family	-0.02	-1.01	-0.28	-0.56
vv03s0038g00130	Ethylene-responsive element binding protein family	-1.58	-0.81	-0.61	-0.78
vv02s0033g00300	G2-like transcription factor family, GARP	-0.08	-1.23	0.04	-0.80
vv03s0017g02280	G2-like transcription factor family, GARP	-1.41	-0.71	0.13	-0.55
vv12s0028g00980	G2-like transcription factor family, GARP	-1.41	-0.36	-0.37	-0.15
vv16s0098g01170	HB,Homeobox transcription factor family	-0.05	-1.58	-0.22	-1.55
vv14s0108g00390	Homeobox transcription factor family	1.23	0.24	0.30	0.50
vv13s0019g03720	LBD1 (Lob Domain-containing protein 1)	1.04	0.57	0.22	0.47
vv13s0019g03780	LBD1 (Lob Domain-containing protein 1)	-1.60	-0.47	-0.39	-0.24
vv15s0048g00830	LBD18 (Lob Domain-containing protein 18)	-1.20	-1.07	-0.03	-0.74
vv01s0011g03540	LBD41 (Lob Domain-containing protein 41)	-0.46	-1.25	-0.45	-0.70
vv14s0068g01800	MADS box transcription factor family	-1.04	0.04	-0.30	-0.13
vv08s0007g07580	MYB domain transcription factor family	0.28	-0.77	-0.74	-1.20
vv07s0031g02280	MYB transcription factor family	-1.01	-0.35	-0.21	-0.72
vv03s0063g02620	MYB-related transcription factor family	-0.21	1.83	-0.69	0.47
vv10s0116g01760	MYB-related transcription factor family	0.27	0.68	0.16	1.13
vv04s0069g00970	WRKY domain transcription factor family	-0.18	1.17	-0.08	0.03
vv19s0090g00840	WRKY domain transcription factor family	1.38	0.17	-0.12	0.14

Echelle de couleur en fonction du LogFC : 

IV.2. Analyse par PCR quantitative

Les données générées par l'approche transcriptomique n'ayant pas apporté d'informations précises sur le comportement de la plupart des gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes dans les baies de plantes soumises à différents niveaux azotés, nous avons choisi d'étudier les profils d'expression de ces gènes par PCR quantitative en temps réel. Cette analyse a été réalisée à partir d'ARNs totaux extraits de baies de CS et PN greffés sur deux génotypes de porte-greffes RGM et 110R et soumis à différents traitements azotés (N- et N+).

IV.2.1 Expression de gènes impliqués dans l'assimilation de l'azote

Le niveau d'expression de trois gènes codant des enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote a été quantifié par PCR quantitative en temps réel (Fig.46).

L'expression du gène *VvNiR* codant une nitrite réductase a été mesurée pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon en fonction des deux modalités azotées N+ et N-. En conditions N+, l'expression du gène *VvNiR* augmente. En effet, une augmentation significative de son expression est observée chez le CS et le PN indépendamment du porte-greffe et de l'année considérée. Par la suite, l'expression des deux gènes *VvGS* et *VvGOGAT* codant respectivement une glutamine synthétase et une glutamine-2-oxoglutarate aminotransférase, a été étudiée. Aucune différence significative de l'abondance des transcrits *VvGOGAT* n'est apparue en fonction des deux modalités azotées, quelque soient les combinaisons porte-greffe/greffon et l'année considérées. L'expression du gène *VvGS* semble augmenter en conditions N+, mais les résultats varient selon l'année et des combinaisons porte-greffe/greffon.

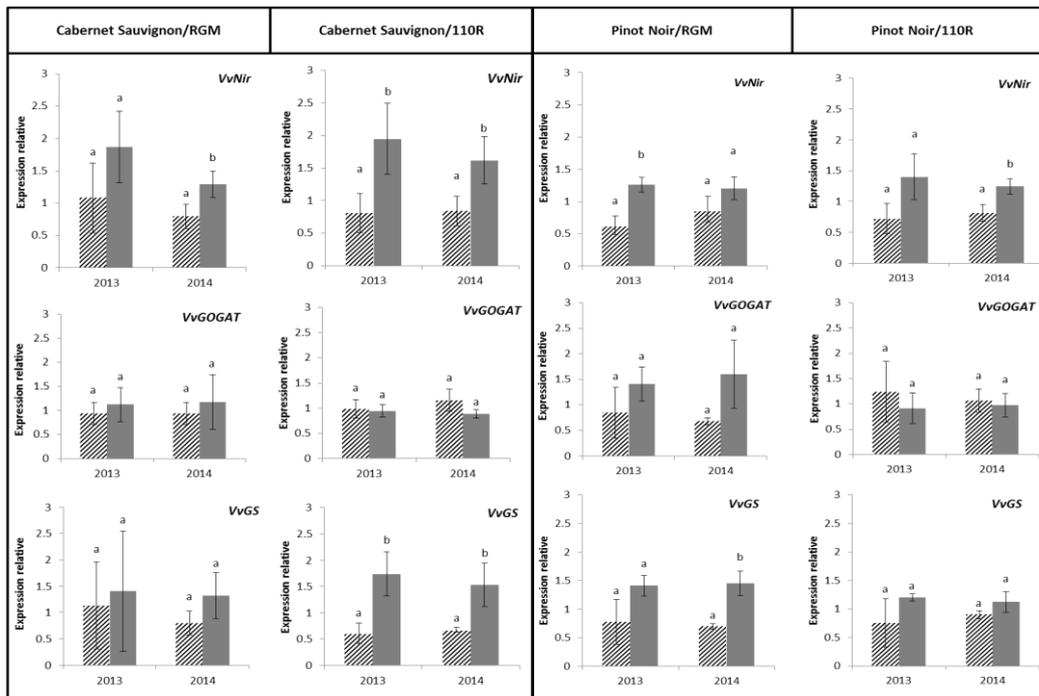


Figure 46 : Profils d'expression des gènes intervenant dans l'assimilation de l'azote. Les expressions relatives ont été normalisées par rapport à l'expression des gènes *VvActin* et *VvGAPDH*. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques \pm écart type de la moyenne. Pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon/année des tests de student ont été effectués; a, b et c pour chaque combinaison indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes ($p \leq 0.05$).

IV.2.1. Expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes

L'expression de deux gènes *VvPAL 1* et *VvPAL 2* codant deux isoformes de la phénylalanine ammonia lyase, impliquées dans la première étape de la voie de biosynthèse, a été mesurée (Fig.47). L'expression du gène *VvPAL1* semble diminuer lors d'une forte disponibilité azotée, mais aucune différence significative n'apparaît quelles que soient la combinaison porte-greffe/greffon et l'année considérées. De la même manière, aucune différence significative de l'expression du gène *VvPAL2* n'apparaît en fonction des deux modalités azotées N+ et N-. Les différents niveaux d'azote ne semblent pas affecter l'expression de *VvANR* et de *VvLAR2* dans notre expérimentation, quelque soient la combinaison porte-greffe/greffon et l'année considérées.

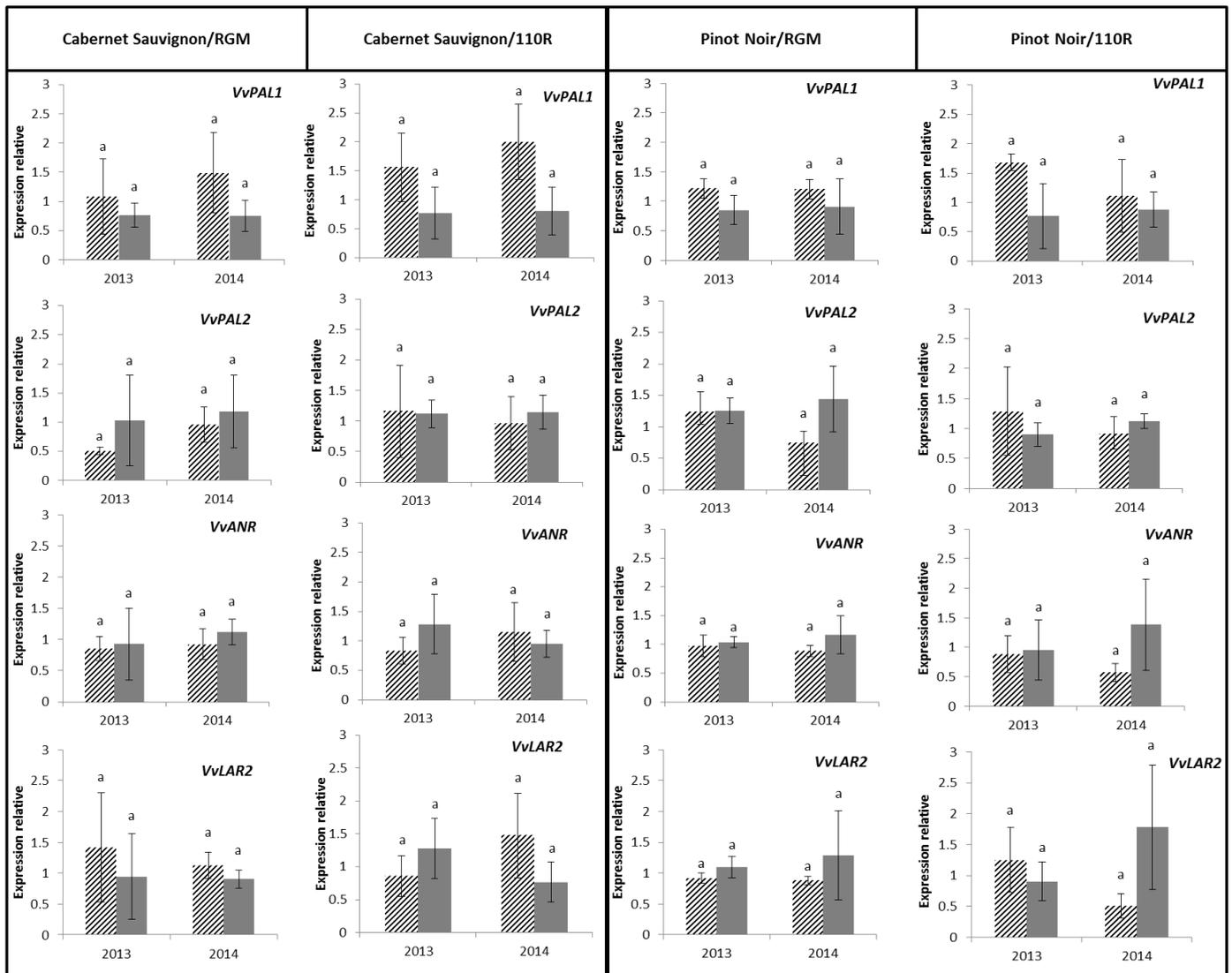


Figure 47 : Profils d'expression des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Les expressions relatives ont été normalisées par rapport à l'expression des gènes *VvActin* et *VvGAPDH*. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques \pm écart type de la moyenne. Pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffon/année des tests de student ont été effectués; a, b et c pour chaque combinaison indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes ($p \leq 0.05$).

IV.2.3. Expression de gènes impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes

Les analyse RNA-Seq ont permis de mettre en évidence un différentiel d'expression de gènes codant des facteurs de transcription de type Myb et des protéines de type LBD dans les baies en fonction de différentes disponibilités en azote.

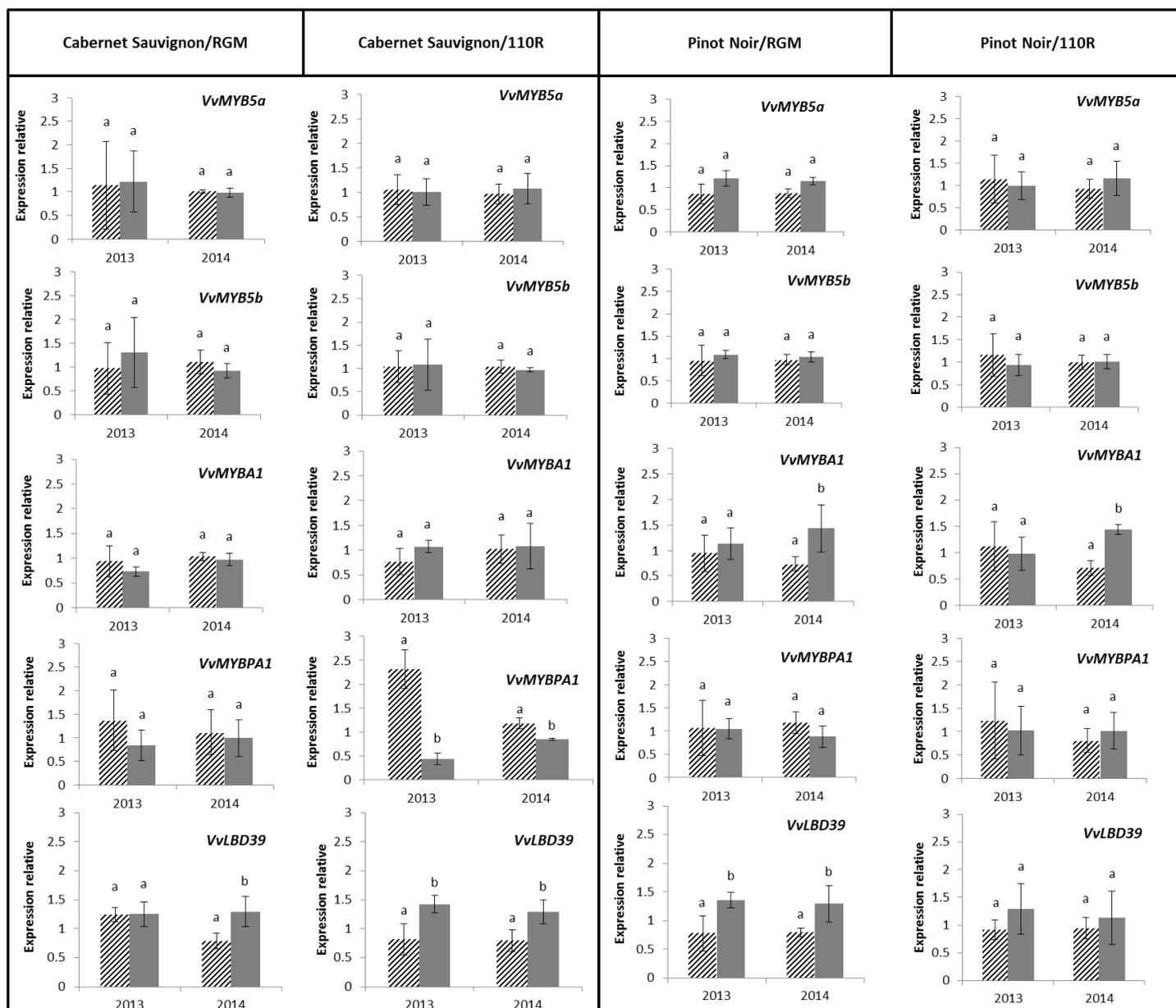


Figure 48: Profils d'expression des gènes intervenant dans la régulation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.

Les expressions relatives ont été normalisées par rapport à l'expression des gènes *VvActin* et *VvGAPDH*. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques \pm écart type de la moyenne. Pour chacune des combinaisons porte-greffe/greffe/année des tests de student ont été effectués; a, b et c pour chaque combinaison indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes ($p \leq 0.05$).

Les profils d'expression de différents gènes codant des protéines de type Myb ainsi que le gène *VvLBD39*, homologue de *AtLBD39* connu chez *Arabidopsis* comme étant un répresseur fort de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, ont été étudiés par PCR quantitative (Fig. 48).

L'abondance des transcrits *VvMYB5a* et *VvMYB5b* n'est pas affectée en fonction des différents traitements azotés indépendamment de la combinaison porte-greffe/greffon et de l'année considérées. L'effet de l'azote sur l'abondance des transcrits du gène *VvMYBA1* varie en fonction des cépages. Pour le CS, les différents niveaux d'azote sont sans effet. Chez le PN, aucune différence d'abondance des transcrits *VvMYBA1* n'est observée en 2013, mais leur abondance augmente en conditions N+ en 2014. Les transcrits *VvMYBPA1* ne sont pas affectés par le niveau d'azote chez le PN. Les transcrits *VvMYBPA1* diminuent significativement à fort niveau d'azote lorsque le CS est greffé sur 110R, mais non sur RGM.

IV.3. Conclusions

L'analyse détaillée des données RNA-Seq doit être poursuivie pour chacune des catégories fonctionnelles. Néanmoins, dans un premier temps, nous nous sommes particulièrement intéressés aux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes et dans sa régulation. Un faible nombre de gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des composés phénoliques est significativement affecté à maturité par les différents traitements azotés dans les baies. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse ciblée de l'expression de gènes dans les baies de plantes soumises à différentes modalités azotées. Les analyses RNA-Seq ont cependant révélé que des transcrits d'une naringenin-chalcone synthase et d'une flavonol synthase sont moins abondants en conditions N+. Ces analyses ont aussi confirmé l'implication des facteurs de transcription appartenant à la famille des MYB. Les analyses qPCR ont permis de montrer qu'en conditions N+ provoquent une augmentation de l'abondance des transcrits nitrite réductase et de celle de *VvLBD39*, dont l'homologue chez *Arabidopsis* est un répresseur de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Une grande variabilité de l'expression des gènes codant des protéines de la famille des MYB a été observée en fonction des différentes combinaisons porte-greffe/greffon.

Chapitre 4 : Effets de la nutrition azotée sur les baies de plants de vigne cultivés au vignoble

Parallèlement à l'étude réalisée sur les plantes en pots en conditions semi-contrôlées (chapitre 3), des expérimentations aux vignobles ont été réalisées pour étudier l'influence de l'apport d'azote sur le métabolisme primaire et secondaire des baies dans des conditions normales de viticulture. Cette partie de notre étude a été conduite sur deux cépages, le CS et le PN, cultivés chacun dans une région différente. L'expérimentation sur le CS a été conduite au Château Couhins à Villenave d'Ornon et celle sur le PN a été conduite au domaine Henri Bourgeois à Sancerre. La même stratégie expérimentale a été suivie dans les deux régions. Cependant, les deux terroirs étant différents, les données obtenues chez les deux cépages ont été traitées séparément.

I- Impact des différents traitements sur le statut hydrique, le statut azoté et la physiologie des plantes

I.1. Statut hydrique des plantes

Chacune des parcelles a été irriguée tout au long de la saison (8 L/jour/plant). Le potentiel de tige s'exprime en MPa, les valeurs s'échelonnent entre -0.1 et -1.4 MPa, où -1.4 MPa indique une forte contrainte hydrique et les valeurs < -0.9 MPa indique une absence de contrainte hydrique. Les valeurs comprises entre -0.9 et -1.4 MPa indiquent que les plantes ont subi une contrainte hydrique modérée à sévère (Choné et al., 2000).

Les valeurs obtenues dans nos expériences indiquent une absence de contrainte hydrique au cours de la saison pour chacun des cépages lors des deux années d'expérimentation (Fig. 49).

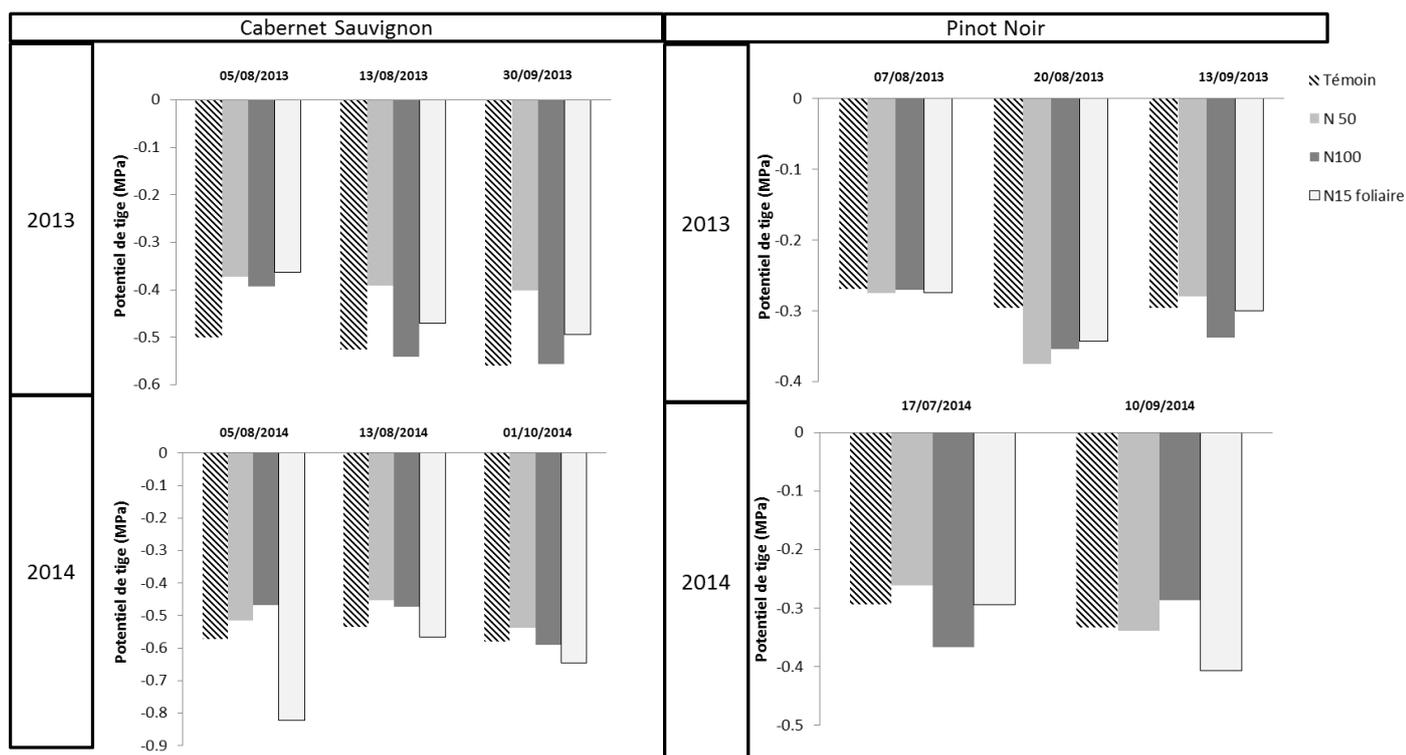


Figure 49 : Estimation du statut hydrique des plants par mesure du potentiel de tige
 Les mesures représentent des valeurs uniques obtenues à différentes dates au cours de la saison

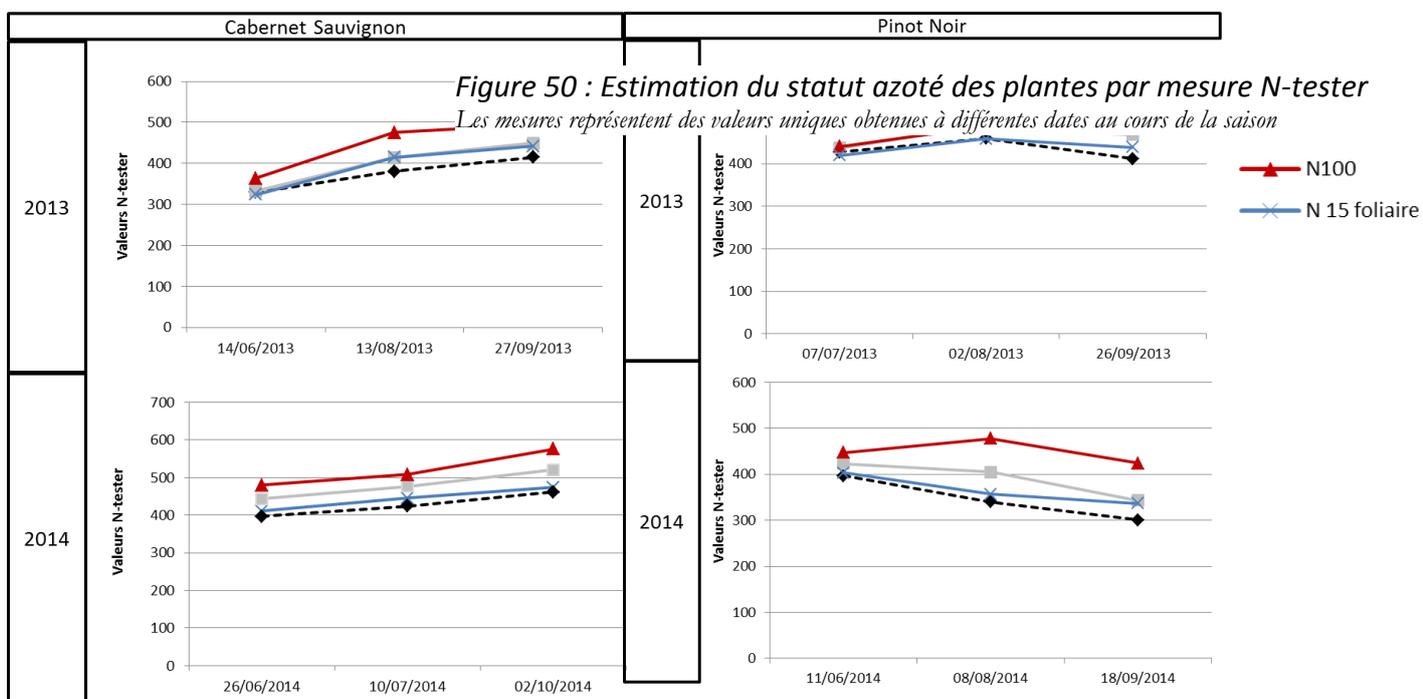
I.2. Statut azoté des plantes

Trois régimes azotés ont été comparés à une modalité témoin (sans apport), en absence de contrainte hydrique: deux fertilisations azotées ajoutées au sol (50 unités d'azote par hectare (U/ha) et 100 U/ha) et une pulvérisation foliaire (15 U/ha). Le statut azoté des plantes a été estimé à l'aide de différents indicateurs.

I.2.1. Mesure N-tester

A la floraison et à mi-véraison, les différents traitements ne modifient pas le statut azoté des plants de CS. A maturité, peu de différences apparaissent, mais la modalité N100 semble néanmoins présenter des valeurs de N-tester supérieures à celles des autres modalités (Fig. 50).

Sur le PN, peu de différences apparaissent entre les différentes modalités à chacun des stades en 2013. En 2014, à mi-véraison et à mi-maturité, la modalité N100 présente une valeur de N-tester plus élevée.



I.2.2. Azote total des limbes et des pétioles

A la mi-véraison, pour chacune des combinaisons, des pétioles et des limbes ont été prélevés et leur teneur en azote total a été déterminée (Tableau 17).

Tableau 17 : Mesures de la teneur en azote total des limbes et des pétioles

Cabernet Sauvignon			Test statistique	
	Pétioles	Limbes	Année	
2013			Pétioles	Limbes
Témoin	0.47 ± 0.01 ac	1.85 ± 0.05 a		
N 50	0.52 ± 0.03 bc	1.90 ± 0.07 a	NS	NS
N 100	0.55 ± 0.01 b	2.11 ± 0.11 b		
N 15 foliaire	0.46 ± 0.03 a	1.92 ± 0.09 a		
2014			Traitement	
Témoin	0.47 ± 0.05 a	1.74 ± 0.04 b	Pétioles	Limbes
N 50	0.57 ± 0.12 ab	1.84 ± 0.13 ab		
N 100	0.67 ± 0.05 b	1.98 ± 0.03 a	***	***
N 15 foliaire	0.50 ± 0.03 a	1.88 ± 0.07 ab		
Pinot Noir			Test statistique	
	Pétioles	Limbes	Année	
2013			Pétioles	Limbes
Témoin	0.45 ± 0.01 a	2.03 ± 0.11 a		
N 50	0.47 ± 0.04 ab	2.08 ± 0.08 a	**	NS
N 100	0.53 ± 0.04 b	2.18 ± 0.07 a		
N 15 foliaire	0.46 ± 0.02 a	2.12 ± 0.08 a		
2014			Traitement	
Témoin	0.45 ± 0.03 a	1.65 ± 0.15 b	Pétioles	Limbes
N 50	0.61 ± 0.14 ab	2.24 ± 0.15 a		
N 100	0.76 ± 0.06 b	2.31 ± 0.13 a	**	***
N 15 foliaire	0.57 ± 0.07 a	2.06 ± 0.19 a		
Azote total (%)				

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques; ± écart type à la moyenne. L'unité correspond à la teneur en azote en % de matière sèche. Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents facteurs (traitement et année) sur les données obtenues chez le CS et le PN ; les étoiles indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$) ; NS signifie Non Significatif ; pour chaque combinaison a, b et c indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

Une première analyse comparant les différents traitements a été réalisée pour chacun des cépages. Les données obtenues diffèrent significativement en fonction du traitement azoté pour les limbes ($p < 0.001$) et les pétioles ($p < 0.001$ pour CS et $p < 0.01$ pour PN).

Une seconde analyse statistique a comparé les valeurs de la teneur en azote des limbes ou des pétioles pour les années 2013 et 2014. Chez le CS et le PN, aucune différence significative n'est observée au niveau des limbes entre les deux années. De la même manière, pour le CS, aucune différence n'est observable entre les deux années au niveau des pétioles. Pour le PN, les valeurs de teneurs en azote des pétioles des plantes traitées en 2014 sont significativement supérieures à celles de 2013.

Les teneurs en azote des limbes et des pétioles de chacune des combinaisons en fonction du traitement azoté sont comparées dans le tableau 17.

Chez le CS, pour les deux années, une différence significative apparaît entre les teneurs en azote des limbes et des pétioles entre les modalités témoin et N100. Cependant aucune différence n'est observée entre les modalités témoin, N50 et N15 foliaire.

Chez le PN, les analyses réalisées sur les pétioles en 2013 et 2014 indiquent une différence significative entre les deux modalités témoin et N100. Aucune différence entre les modalités témoin, N50 et N15 foliaire n'est observée. Pour les limbes, en 2013, il n'y a pas de différence entre les modalités. En 2014, les analyses révèlent une différence significative entre les deux modalités témoin et N100 et aucune différence entre les modalités témoin, N50 et N15 foliaire.

I.2.3. Azote assimilable du moût

L'analyse de l'azote assimilable du moût a été réalisée par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (Fig.51) à différents stades au cours de la maturation chez le CS et le PN.

Quels que soient le stade et l'année, les valeurs d'azote assimilable des moûts issus de la modalité N100 sur le CS sont supérieures à celle des autres modalités, la modalité témoin ayant les valeurs les plus faibles.

Sur le PN, les teneurs en azote assimilable des moûts issus de la modalité témoin sont inférieures à celles des moûts issus des modalités N100 et N50, quels que soient le stade et l'année considérés. En 2013, les teneurs en azote assimilable des modalités témoin et N15 foliaire sont très comparables. A maturité, aucune distinction n'existe entre les modalités N100 et N50. En 2014, quel que soit le stade, les valeurs de la modalité N100 sont supérieures aux autres modalités, la modalité témoin ayant les valeurs les plus faibles.

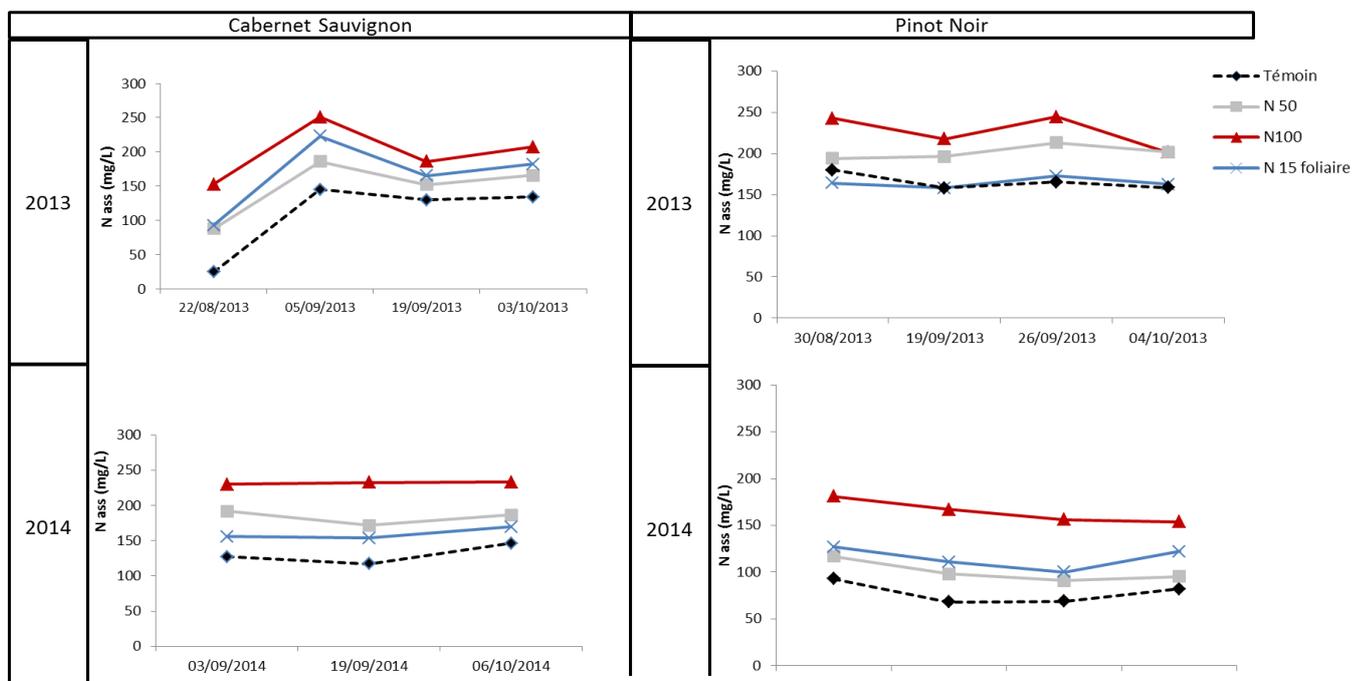


Figure 51 : Estimation de la teneur en azote assimilable des moûts par FTIR
Les mesures représentent des valeurs uniques obtenues à différentes dates au cours de la saison

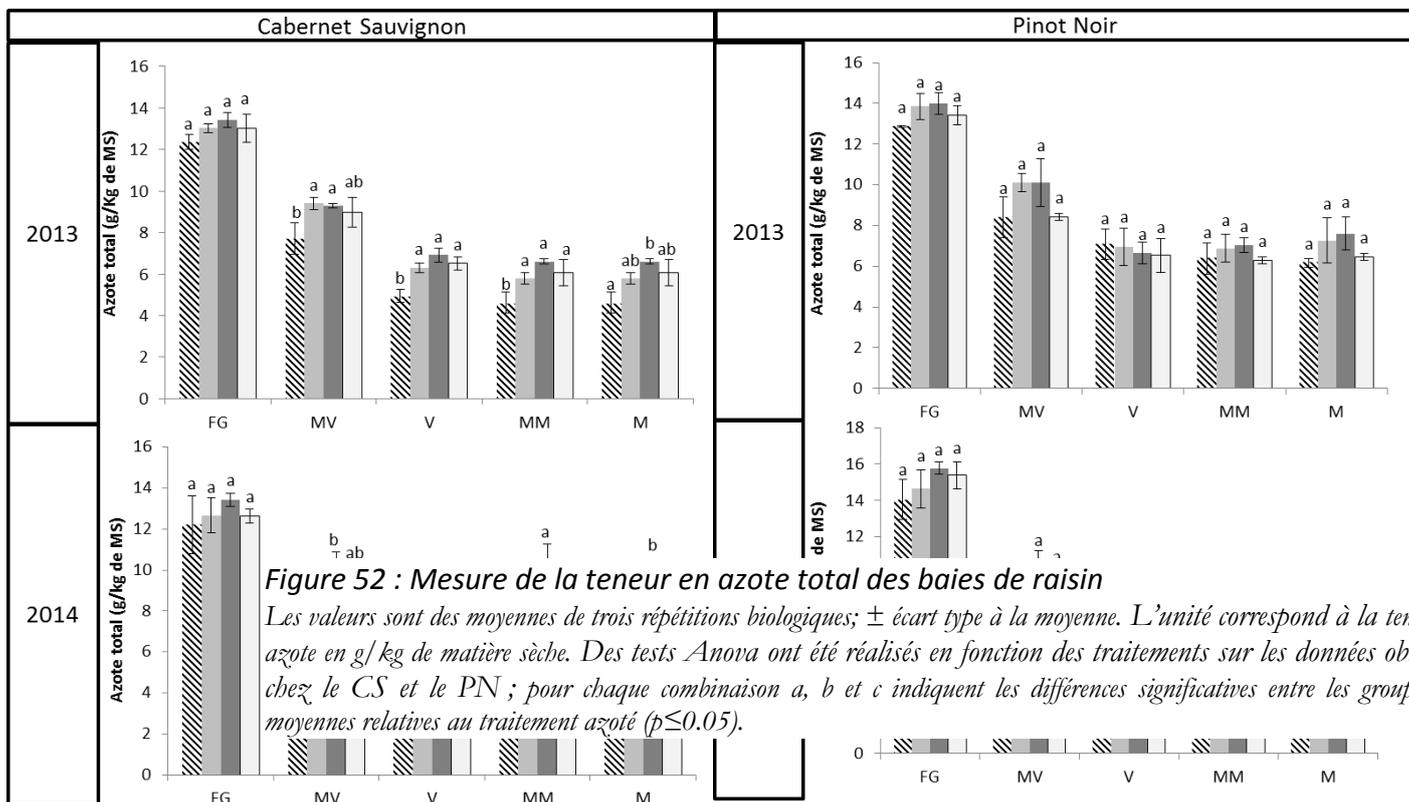
I.2.4. Azote total des baies

La teneur en azote total des baies CS et PN a été déterminée par la méthode de DUMAS (1831) à différents stades au cours de la maturation (Fig. 52).

Quels que soient le cépage et l'année considérés, aucune différence de la teneur en azote des baies n'apparaît au stade fermeture de la grappe selon les différents traitements azotés.

Concernant le CS en 2013, les teneurs en azote des baies issues de la modalité N100 sont significativement supérieures à celle des modalités témoin. En 2014, la même tendance apparaît aux stades mi-véraison, véraison, mi-maturité et maturité, mais les différences ne sont pas significatives.

Concernant le PN en 2013, aucune différence significative de la teneur en azote total des baies n'apparaît en fonction des différents traitements. En 2014, à partir de la mi-véraison jusqu'à la maturité, les teneurs en azote des baies issues des modalités N100 sont significativement supérieures aux modalités témoin.



I.3. Vigueur des plantes

I.3.1. Surface foliaire

Concernant le CS, les mesures de surface primaire et secondaire ne montrent aucune différence entre les différents traitements (Tableau 18). En effet, quelle que soit l'année considérée, les différences de disponibilité en azote ne semblent pas affecter significativement les surfaces foliaires primaire et secondaire.

Chez le PN, la surface foliaire primaire n'est pas sensible au traitement azoté, contrairement à la surface foliaire secondaire ($p < 0.05$). En effet, les mesures de surface foliaire secondaire réalisées en 2014 indiquent une différence significative entre les modalités azotées N50 et N100 et les modalités témoin et N15 foliaire (Tableau 18).

La comparaison des valeurs des surfaces foliaires primaire et secondaire indique une différence significative en fonction des deux années ($p < 0.001$) pour le CS et le PN.

Tableau 18 : Surfaces foliaires primaires et secondaires

Cabernet Sauvignon			Test statistique	
	Surface Foliaire primaire	Surface Foliaire secondaire	Année	
2013			SFI	SFII
Témoin	1.18±0.15 a	0.63±0.26 a	***	***
N 50	1.23±0.10 a	0.95±0.25 a		
N 100	1.12±0.17 a	0.88±0.22 a		
N 15 foliaire	1.15±0.22 a	0.86±0.23 a		
2014			Traitement	
Témoin	1.28±0.71 a	1.46±0.94 a	SFI	SFII
N 50	1.27±0.74 a	1.70±1.03 a		
N 100	1.24±0.73 a	1.57±0.97 a	NS	NS
N 15 foliaire	1.05±0.61 a	1.56±0.95 a		
Pinot Noir			Test statistique	
	Surface Foliaire primaire	Surface Foliaire secondaire	Année	
2013			SFI	SFII
Témoin	1.30±0.33 a	1.58±0.80 a	***	***
N 50	1.41±0.09 a	1.94±0.25 a		
N 100	1.37±0.15 a	1.84±0.41 a		
N 15 foliaire	1.33±0.21 a	1.72±0.63 a		
2014			Traitement	
Témoin	1.05±0.12 a	0.64±0.30 a	SFI	SFII
N 50	1.11±0.14 a	0.87±0.27 b		
N 100	1.04±0.13 a	1.00±0.37 b	NS	*
N 15 foliaire	1.03±0.09 a	0.57±0.17 a		

Les valeurs sont des moyennes de dix répétitions biologiques; \pm écart type à la moyenne ; l'unité correspond à la surface foliaire primaire et secondaire en m^2/cep . Des tests ANOVA ont été réalisés en fonction de différents facteurs (traitement et année) sur les données obtenues chez le CS et le PN ; les étoiles indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$) ; NS signifie Non Significatif ; a, b et c pour chaque combinaison indique les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

I.3.2. Masse des bois de taille

Des fagots de bois de tailles réalisés pour chaque placette pendant la saison hivernale ont été pesés.

Pour le CS, la comparaison des valeurs obtenues montre une différence significative entre les deux années 2013 et 2014 ($p < 0.001$) (Tableau 19). Cependant, aucune différence n'apparaît entre les différents traitements azotés. En effet, quelle que soit l'année considérée, les différents traitements azotés ne semblent pas affecter la masse des bois de taille. Pour le PN, aucune différence n'apparaît entre les valeurs obtenues en 2013 et 2014 ou en fonction des différents traitements.

Tableau 19 : Masse des bois de taille (kg)

Cabernet Sauvignon		Test statistique (Test Anova)
2013		Année ***
Témoin	3.58±0.63 a	
N 50	4.01±0.53 a	
N 100	4.35±0.26 a	
N 15 foliaire		3.89±0.78 a
2014		Traitement NS
Témoin	5.37±1.31 a	
N 50	6.39±2.06 a	
N 100	6.44±1.41 a	
N 15 foliaire		4.95±0.95 a
Pinot Noir		Test statistique (Test Anova)
2013		Année NS
Témoin	3.57±0.65 a	
N 50	3.87±0.30 a	
N 100	4.31±0.30 a	
N 15 foliaire		3.82±0.35 a
2014		Traitement *
Témoin	3.50±0.67 a	
N 50	3.93±0.86 a	
N 100	4.55±0.61 a	
N 15 foliaire		3.55±0.53 a

Les valeurs sont des moyennes de quatre répétitions biologiques; ± écart type à la moyenne ; l'unité correspond à la masse des bois de taille en kg/bloc. Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents facteurs (traitement et année) sur les données obtenue chez le CS et le PN ; les étoiles indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes (: $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$) ; NS signifie Non Significatif ; a, b et c pour chaque combinaison indique les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).*

I.4. Conclusions

L'ensemble des observations est résumé dans le tableau 20.

Des analyses agronomiques ont été réalisées pour vérifier la robustesse des expérimentations au vignoble.

Les valeurs de potentiel de tige obtenues lors de ces deux années d'expérimentation confirment l'absence de contrainte hydrique.

Quel que soit le cépage considéré, les valeurs de N-tester mesurées lors d'un apport azoté (N100) sont supérieures à celles des plantes témoins. Pour le CS, les valeurs d'azote total des limbes des modalités N100 sont supérieures à celles des témoins en 2013 et 2014. La même observation est faite pour le PN en 2014. L'azote total des pétioles est significativement augmenté par les deux modalités N100. Concernant les baies, quels que soient le cépage et l'année considérés, les teneurs en azote total sont supérieures pour la modalité N100 par rapport au témoin. Toutefois, la différence n'est statistiquement significative que pour les baies de CS en 2013 et celles de PN en 2014.

Les apports azotés n'ont pas ou peu modifié la vigueur des plantes. Nous pouvons donc conclure que les effets biologiques observés par la suite ne sont vraisemblablement pas liés à une modification de la vigueur des plantes.

Tableau 20 : Tableau récapitulatif des effets observés lors d'un traitement azoté (N100) en comparaison avec les plantes non traitées (Témoin)

	Forte disponibilité azotée (N100) à maturité			
	Cabernet Sauvignon		Pinot Noir	
	2013	2014	2013	2014
Statut hydrique				
Potentiel de tige	=	=	=	=
Statut azoté				
Valeur N-tester	↗	↗	↗	↗
Valeur azote total des limbes	↗	↗	=	↗
Valeur azote total des pétioles	↗	↗	↗	↗
Valeur azote total des baies	↗	=	=	↗
Vigueur				
Surface foliaire primaire	=	=	=	=
Surface foliaire secondaire	=	=	=	↗
Valeur masse de bois de taille	=	=	=	=

II- Effets de différents traitements azotés sur la teneur en métabolites primaires et secondaires d'intérêts

II.1. Teneur en sucres et acides organiques des baies

Les sucres (glucose et fructose) et les acides organiques (acides malique et tartrique) ont été dosés dans la pellicule et la pulpe des baies. De plus, une estimation des teneurs en sucres réducteurs, en acidité totale et en acide malique ainsi que la détermination du pH ont été réalisées sur le moût à maturité par FTIR. Les valeurs obtenues à maturité pour le CS et le PN sont présentées dans les tableaux 21 et 22 respectivement.

Pour le CS, les concentrations en glucose et fructose de la pulpe et de la pellicule ne sont pas sensibles aux traitements azotés. De même, les teneurs en acide tartrique ne sont pas affectées par les différents traitements pour les deux années. En 2013, les concentrations en acide malique de la pellicule et la pulpe ne varient pas en fonction des différents traitements, mais en 2014 elles sont significativement plus faibles dans la pellicule pour la modalité N100. Néanmoins, aucune différence n'est observable dans la pulpe. Les dosages par FTIR révèlent une tendance non significative à la diminution des teneurs en sucres réducteurs du moût en 2013 sous l'effet d'un traitement azoté. En 2014, la même tendance apparaît être statistiquement significative. En 2013 et 2014, le traitement azoté augmente significativement l'acidité totale des moûts. De plus, en 2013, les concentrations en acide malique sont significativement plus élevées dans les moûts issus de la modalité N100. Cependant, aucune différence n'apparaît entre les valeurs de pH des deux modalités.

Pour le PN, les teneurs en glucose, fructose et acide tartrique dans la pulpe et la pellicule ne sont pas affectées par les traitements azotés. En 2013, ces traitements n'affectent pas non plus la concentration en acide malique de la pulpe et de la pellicule. Cependant, en 2014 la concentration en acide malique est significativement plus élevée dans la pulpe pour la modalité N100. Les dosages réalisés sur le moût révèlent que les teneurs en sucres réducteurs, en acidité totale et en acide malique ainsi que les valeurs de pH ne sont pas affectées par les différents traitements.

Tableau 23 : Composition en acides aminés libres de la pellicule et de la pulpe des baies de Cabernet Sauvignon

	Cabernet Sauvignon							
	2013				2014			
	Pellicules		Pulpes		Pellicules		Pulpes	
	Témoin	N100	Témoin	N100	Témoin	N100	Témoin	N100
ASP	2.70 ± 0.05 ^a	3.23 ± 0.54 ^a	0.34 ± 0.17 ^a	0.56 ± 0.17 ^a	2.66 ± 1.30 ^a	3.20 ± 1.64 ^a	0.51 ± 0.08 ^a	0.66 ± 0.13 ^a
GLU	2.70 ± 0.13 ^a	3.36 ± 0.53 ^a	0.73 ± 0.25 ^a	1.18 ± 0.22 ^a	2.16 ± 1.76 ^a	2.09 ± 2.36 ^a	1.03 ± 0.09 ^a	1.23 ± 0.16 ^a
ASN	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.001 ^a	0.06 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.06 ^a	0.02 ± 0.001 ^a	0.02 ± 0.001 ^a
SER	0.72 ± 0.15 ^a	1.12 ± 0.17 ^b	0.30 ± 0.06 ^a	0.51 ± 0.06 ^b	2.01 ± 0.52 ^a	2.94 ± 0.39 ^a	0.35 ± 0.07 ^a	0.48 ± 0.07 ^a
GLY	0.15 ± 0.08 ^a	0.22 ± 0.03 ^b	0.03 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.01 ^b	3.94 ± 1.07 ^a	8.68 ± 1.48 ^b	0.07 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^a
GLN	0.71 ± 0.24 ^a	1.28 ± 0.13 ^b	0.21 ± 0.04 ^a	0.42 ± 0.07 ^b	1.65 ± 0.36 ^a	2.29 ± 0.12 ^b	0.18 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.08 ^b
HIS	0.14 ± 0.04 ^a	0.22 ± 0.05 ^b	0.07 ± 0.02 ^a	0.17 ± 0.03 ^b	0.26 ± 0.16 ^a	1.09 ± 0.17 ^b	0.10 ± 0.03 ^a	0.13 ± 0.04 ^a
ARG	2.88 ± 0.43 ^a	4.22 ± 0.87 ^b	1.26 ± 0.15 ^a	1.81 ± 0.63 ^b	6.01 ± 1.72 ^a	21.76 ± 7.22 ^b	0.48 ± 0.29 ^a	1.60 ± 0.67 ^b
THR	0.61 ± 0.15 ^a	1.02 ± 0.21 ^b	0.18 ± 0.06 ^a	0.62 ± 0.09 ^b	1.63 ± 0.64 ^a	4.54 ± 1.12 ^b	0.29 ± 0.11 ^a	0.59 ± 0.20 ^b
ALA	0.82 ± 0.28 ^a	1.30 ± 0.21 ^b	0.41 ± 0.10 ^a	1.08 ± 0.20 ^b	2.21 ± 0.80 ^a	3.74 ± 0.69 ^a	0.79 ± 0.28 ^a	1.44 ± 0.52 ^a
GABA	1.03 ± 0.63 ^a	0.95 ± 0.23 ^a	0.71 ± 0.21 ^a	1.04 ± 0.16 ^b	1.70 ± 0.63 ^a	2.24 ± 0.48 ^a	0.84 ± 0.24 ^a	1.28 ± 0.11 ^b
PRO	3.43 ± 0.32 ^a	3.55 ± 1.05 ^a	9.54 ± 7.03 ^a	23.9 ± 3.58 ^b	8.22 ± 2.71 ^a	10.6 ± 1.84 ^a	13.07 ± 4.59 ^a	19.36 ± 1.34 ^a
TYR	0.06 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.03 ^b	0.01 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^b	0.25 ± 0.10 ^a	0.49 ± 0.14 ^b	0.02 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.01 ^b
CYS	0.12 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.08 ^b	nd	nd	nd	nd
VAL	0.13 ± 0.03 ^a	0.19 ± 0.03 ^b	0.18 ± 0.03 ^a	0.31 ± 0.03 ^b	1.03 ± 0.38 ^a	1.46 ± 0.32 ^a	0.24 ± 0.07 ^a	0.3 ± 0.05 ^a
MET	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ILE	0.03 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.02 ^b	0.10 ± 0.03 ^a	0.16 ± 0.02 ^b	0.69 ± 0.26 ^a	1.02 ± 0.25 ^a	0.12 ± 0.03 ^a	0.14 ± 0.04 ^a
LYS	0.03 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.001 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.02 ^a	0.16 ± 0.05 ^b	0.01 ± 0.001 ^a	0.02 ± 0.001 ^a
LEU	0.05 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.03 ^b	0.12 ± 0.03 ^a	0.24 ± 0.03 ^b	1.03 ± 0.43 ^a	1.87 ± 0.51 ^a	0.11 ± 0.04 ^a	0.15 ± 0.03 ^a
PHE	0.06 ± 0.03 ^a	0.10 ± 0.01 ^b	0.06 ± 0.02 ^a	0.15 ± 0.03 ^b	0.63 ± 0.33 ^a	1.36 ± 0.51 ^b	0.08 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.02 ^a
Acides aminés totaux	15.4±2.53^a	21.22±3.42^b	14.33±7.21^a	32.47±4.91^b	40.31±12.03^a	78.69±14.75^b	18.3±5.74^a	27.86±3.07^b
Teneur en acides aminés en nmol/mg de matière fraîche								

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques; ± écart type à la moyenne. Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents traitements azotés; nd signifie non déterminé ; a et b pour chaque combinaison indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

Tableau 24 : Composition en acides aminés libres de la pellicule et de la pulpe des baies de Pinot Noir

	Pinot Noir							
	2013				2014			
	Pellicules		Pulpes		Pellicules		Pulpes	
	Témoin	N100	Témoin	N100	Témoin	N100	Témoin	N100
ASP	2.03 ± 0.50 ^a	2.69 ± 0.12 ^a	0.29 ± 0.03 ^a	0.41 ± 0.06 ^b	3.98 ± 2.88 ^a	5.71 ± 0.87 ^a	0.65 ± 0.12 ^a	0.99 ± 0.13 ^b
GLU	3.12 ± 0.53 ^a	4.31 ± 0.21 ^a	0.81 ± 0.05 ^a	1.17 ± 0.14 ^b	5.34 ± 3.97 ^a	5.14 ± 2.68 ^a	1.37 ± 0.12 ^a	2.03 ± 0.26 ^b
ASN	0.04 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.001 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.05 ^a	0.41 ± 0.28 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.03 ^a
SER	1.00 ± 0.22 ^a	1.87 ± 0.24 ^b	0.37 ± 0.06 ^a	0.67 ± 0.12 ^b	2.43 ± 0.96 ^a	4.62 ± 0.85 ^b	0.4 ± 0.09 ^a	1.2 ± 0.25 ^b
GLY	0.07 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.001 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.05 ^a	0.34 ± 0.04 ^a	0.06 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.02 ^a
GLN	0.86 ± 0.19 ^a	2.21 ± 0.45 ^b	0.32 ± 0.08 ^a	0.87 ± 0.22 ^b	0.84 ± 0.66 ^a	3.37 ± 1.55 ^b	0.35 ± 0.03 ^a	1.24 ± 0.35 ^b
HIS	0.32 ± 0.07 ^a	0.53 ± 0.08 ^a	0.08 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.02 ^a	0.37 ± 0.31 ^a	1.09 ± 0.37 ^a	0.08 ± 0.04 ^a	0.22 ± 0.03 ^b
ARG	9.40 ± 1.66 ^a	17.88 ± 3.98 ^b	2.06 ± 0.33 ^a	3.74 ± 0.88 ^b	13.64 ± 8.8 ^a	60.25 ± 10.76 ^b	1.72 ± 0.72 ^a	9.05 ± 1.70 ^b
THR	3.04 ± 0.40 ^a	4.89 ± 0.51 ^b	0.71 ± 0.08 ^a	1.11 ± 0.11 ^b	4.02 ± 1.42 ^a	12.89 ± 2.61 ^b	0.71 ± 0.22 ^a	2.46 ± 0.37 ^b
ALA	1.55 ± 0.32 ^a	3.35 ± 0.56 ^b	1.04 ± 0.13 ^a	1.84 ± 0.39 ^b	2.84 ± 1.21 ^a	10.31 ± 2.02 ^a	0.9 ± 0.27 ^a	4.01 ± 0.69 ^b
GABA	0.31 ± 0.07 ^a	0.43 ± 0.14 ^a	0.23 ± 0.04 ^a	0.25 ± 0.06 ^a	0.87 ± 0.30 ^a	1.24 ± 0.39 ^a	0.36 ± 0.05 ^a	0.37 ± 0.09 ^a
PRO	3.60 ± 1.10 ^a	7.63 ± 0.81 ^b	3.17 ± 0.62 ^a	5.06 ± 1.49 ^b	7.61 ± 3.65 ^a	16.24 ± 3.1 ^b	3.97 ± 0.47 ^a	5.56 ± 0.50 ^b
TYR	0.16 ± 0.02 ^a	0.26 ± 0.04 ^b	0.04 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.02 ^b	0.29 ± 0.11 ^a	0.70 ± 0.14 ^b	0.03 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.02 ^b
CYS	0.08 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.001 ^a	0.02 ± 0.001 ^a	0.02 ± 0.001 ^a	0.32 ± 0.14 ^a	0.27 ± 0.15 ^a	0.01 ± 0.02 ^a	0.01 ± 0.001 ^a
VAL	0.44 ± 0.08 ^a	0.77 ± 0.12 ^a	0.16 ± 0.03 ^a	0.24 ± 0.05 ^b	1.25 ± 0.65 ^a	2.59 ± 0.72 ^a	0.19 ± 0.04 ^a	0.49 ± 0.09 ^b
MET	0.18 ± 0.04 ^a	0.23 ± 0.05 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	nd	nd	nd	nd
ILE	0.33 ± 0.06 ^a	0.42 ± 0.05 ^a	0.10 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.03 ^a	1.14 ± 0.51 ^a	1.65 ± 0.24 ^a	0.12 ± 0.02 ^a	0.24 ± 0.04 ^b
LYS	0.07 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.04 ^b	0.02 ± 0.002 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.05 ^a	0.21 ± 0.15 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.01 ^b
LEU	0.45 ± 0.08 ^a	0.64 ± 0.1 ^a	0.13 ± 0.03 ^a	0.19 ± 0.04 ^a	1.29 ± 0.65 ^a	2.36 ± 0.25 ^a	0.13 ± 0.03 ^a	0.34 ± 0.06 ^b
PHE	0.23 ± 0.07 ^a	0.30 ± 0.07 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.02 ^a	0.43 ± 0.16 ^a	0.97 ± 0.25 ^b	0.05 ± 0.01 ^a	0.15 ± 0.04 ^b
Acides aminés totaux	27.28±4.2^a	48.82±7.09^b	9.69±0.86^a	16.08±3.62^b	47.11±22.9^a	134.3±22.27^b	11.19±1.86^a	28.76±4.23^b

Teneur en acides aminés en nmol/mg de matière fraîche

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques; ± écart type à la moyenne. Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents traitement azoté; nd signifie non déterminé ; a, b et c pour chaque combinaison indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

II.2. Composition en acides aminés des baies

L'analyse de la teneur de 20 acides aminés libres a été réalisée par UHPLC-DAD sur la pellicule et la pulpe du CS et du PN. Les données à maturité du CS et PN sont présentées respectivement dans les tableaux 23 et 24.

Pour le CS, la teneur en acides aminés totaux, correspondant à la somme des acides aminés libres dosés dans la pellicule et la pulpe des baies est significativement plus élevée pour les modalités N100 en 2013 et 2014. PRO et ARG sont les deux acides aminés majoritaires dans la pellicule et la pulpe. PRO représente environ 60 à 70 % des acides aminés totaux dans la pulpe, et environ 15 à 20 % dans la pellicule. ARG représente environ 10 à 15 % des acides aminés totaux dans la pellicule et environ 5 à 10 % dans la pulpe.

Pour le PN, le traitement azoté augmente significativement les teneurs en acides aminés totaux par rapport aux témoins. Comme pour le CS, des deux acides aminés PRO et ARG sont les acides aminés majoritaires dans la pellicule et la pulpe. PRO représente environ 20 à 30 % des acides aminés totaux dans la pulpe et environ 15 à 20 % dans la pellicule. ARG représente environ 25 à 35 % des acides aminés totaux dans la pellicule et environ 15 à 20 % dans la pulpe.

Les acides aminés acides. ASP et GLU sont plus concentrés dans la pellicule que dans la pulpe.

Pour le CS, la concentration de ces deux acides aminés n'est pas affectée par les traitements azotés. Pour le PN, les concentrations en ASP et GLU ne sont pas affectées par les différents traitements dans la pellicule, mais elles sont plus élevées dans la pulpe pour la modalité N100.

Les acides aminés basiques. ARG est l'une des formes privilégiées de stockage de l'azote chez les plantes et, en effet, quel que soit le cépage ou le tissu considéré, sa concentration augmente significativement sous l'effet d'un apport azoté. Le traitement azoté augmente par ailleurs faiblement les concentrations en LYS et HIS dans la pellicule et la pulpe du CS et PN.

Les acides aminés apolaires. Les acides aminés apolaires dosés sont PHE, ILEU, ALA, PRO, VAL, LEU et GLY.

Pour le CS, la teneur en PHE, précurseur de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, augmente significativement lors d'un traitement azoté pour les deux années étudiées. Dans la pulpe, l'apport d'azote n'entraîne aucune différence significative en 2014.

Concernant le PN, en 2013, les concentrations de PHE dans la pulpe et la pellicule ne diffèrent pas entre la modalité témoin et N100. Cependant, en 2014, quel que soit le compartiment considéré, une augmentation significative de la concentration en PHE est observée. En cas d'apport azoté, les concentrations des autres acides aminés apolaires tendent à augmenter indépendamment du cépage et du compartiment considérés.

Les acides aminés polaires. Les acides aminés polaires dosés sont TYR, THR, la GLN, SER et ASN. Comme ARG, ASN est une forme de stockage de l'azote chez les plantes. Cependant, dans la pellicule et la pulpe du PN et du CS, la concentration en ASN ne diffère pas entre les modalités témoin et N100. En revanche, les concentrations en TYR, THR et GLN augmentent significativement dans la pellicule et la pulpe du CS et PN sous l'effet d'un apport azoté.

II.3. Composition en anthocyanes des baies

Les anthocyanes de la pellicule du CS et du PN ont été analysées par UHPLC-DAD. Les données obtenues pour le CS et PN à maturité sont présentées respectivement dans les tableaux 25 et 26.

De façon générale, ces analyses ont révélé la présence de cinq anthocyanidines majeures : delphinidine, cyanidine, pétunidine, péonidine et malvidine chez les deux cépages. De plus, chez le CS, chacune de ces molécules est présente sous trois formes: glucosylée, acétylée et coumaroylée.

Pour les deux cépages, les concentrations en anthocyanes totales, correspondant à la somme des anthocyanes dosées, ne sont pas affectées par les différents traitements azotés en 2013 et 2014. La concentration de chacune des anthocyanes dosées ne varie pas non plus en fonction des traitements azotés quels que soient le cépage et l'année considérés. Cependant le profil d'accumulation exprimé en pourcentage des différentes anthocyanes glycosylées varie avec les différents traitements (Fig. 53).

La malvidine-3-*O*-glucoside est la forme d'anthocyane majoritaire produite dans les deux cépages. Pour le CS, la malvidine-3-*O*-glucoside représentait 40 à 50 % des anthocyanes totales en 2013, et 30 à 40 % en 2014. Pour le PN, elle représentait 50 à 60 % des anthocyanes totales analysées.

Pour le CS, la delphinidine-3-*O*-glucoside est la seconde forme d'anthocyane majoritairement accumulée. Sa proportion est augmentée significativement par la fertilisation azotée, alors que la proportion de pétunidine-3-*O*-glucoside diminue. Les proportions de cyanidine-3-*O*-glucoside et de péonidine-3-*O*-glucoside sont insensibles au traitement azoté.

Pour le PN, la péonidine-3-*O*-glucoside est la seconde forme d'anthocyane majoritairement accumulée dans la pellicule. Aucune différence du profil d'accumulation des anthocyanes en fonction des différents traitements n'a été observée pour l'année 2013. Cependant en 2014, les proportions de la delphinidine-3-*O*-glucoside et de la pétunidine-3-*O*-glucoside sont significativement plus faibles pour les modalités N100 que pour le témoin.

Figure 53 : Profil d'accumulation des anthocyanes des pellicules de Cabernet Sauvignon et Pinot Noir

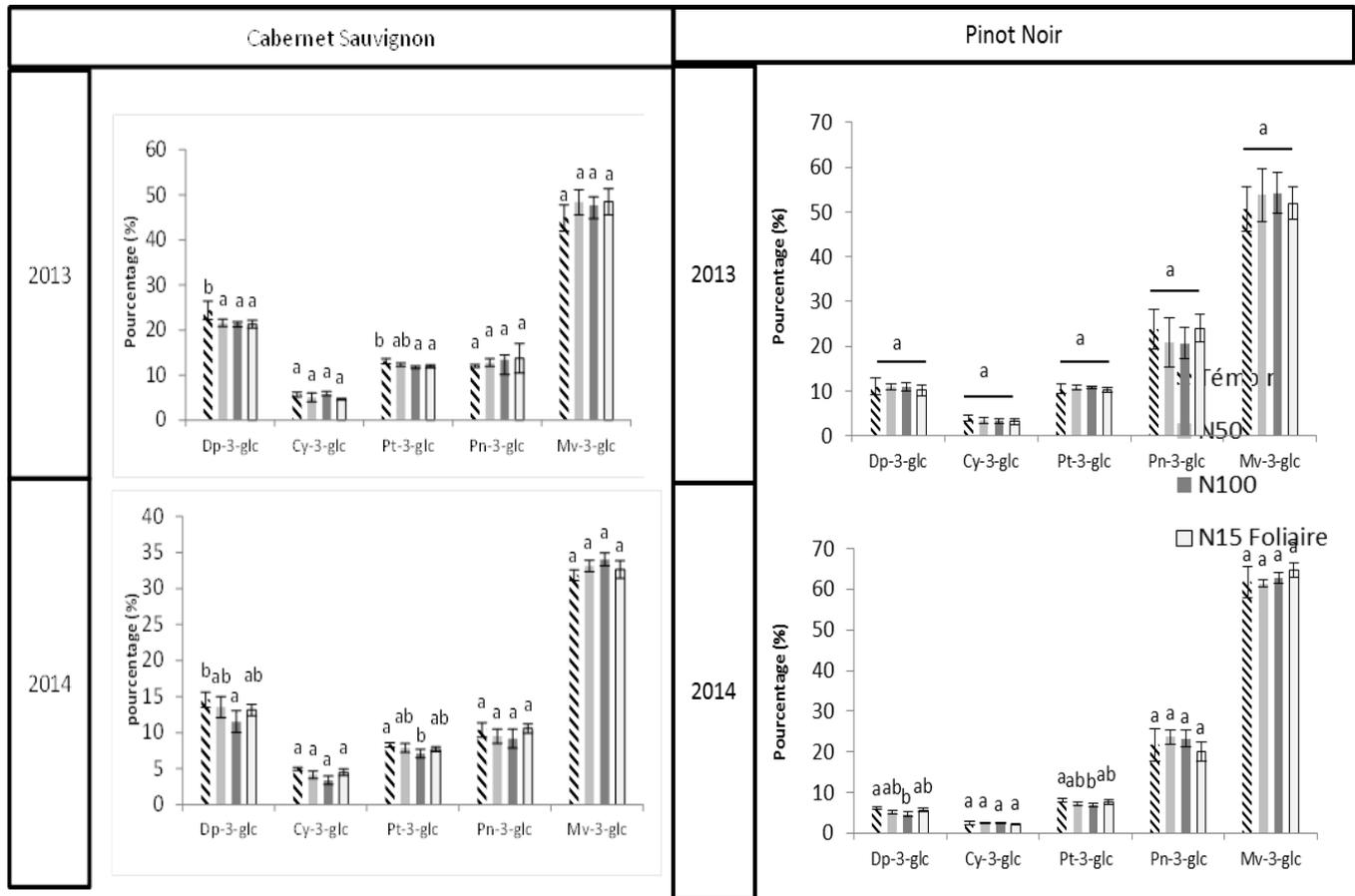


Tableau 25 : Teneur en anthocyanes des pellicules de baies de Cabernet Sauvignon

	Cabernet Sauvignon							
	2013				2014			
	Témoin	N50	N100	N15 foliaire	Témoin	N50	N100	N15 foliaire
Dp-3-glc	3.99 ± 0.84 a	2.98 ± 0.30 a	2.79 ± 0.72 a	3.51 ± 0.62 a	1.83 ± 0.25 a	1.50 ± 0.22 a	1.31 ± 0.31 a	1.51 ± 0.14 a
Cy-3-glc	0.93 ± 0.20 a	0.69 ± 0.11 a	0.72 ± 0.18 a	0.76 ± 0.15 a	0.63 ± 0.07 a	0.46 ± 0.06 a	0.38 ± 0.09 a	0.52 ± 0.08 a
Pt-3-glc	2.13 ± 0.36 a	1.71 ± 0.21 a	1.53 ± 0.41 a	1.97 ± 0.34 a	1.04 ± 0.11 a	0.87 ± 0.11 a	0.81 ± 0.16 a	0.89 ± 0.08 a
Pn-3-glc	1.95 ± 0.20 a	1.76 ± 0.12 a	1.72 ± 0.40 a	2.29 ± 0.81 a	1.30 ± 0.15 a	1.05 ± 0.03 a	1.03 ± 0.13 a	1.22 ± 0.14 a
Mv-3-glc	7.27 ± 0.42 a	6.72 ± 1.03 a	6.19 ± 1.69 a	7.96 ± 1.15 a	4.00 ± 0.21 a	3.78 ± 0.42 a	3.83 ± 0.43 a	3.75 ± 0.15 a
Dp-3-glc-ac	0.36 ± 0.07 a	0.30 ± 0.03 a	0.30 ± 0.08 a	0.41 ± 0.14 a	0.39 ± 0.05 a	0.36 ± 0.06 a	0.34 ± 0.08 a	0.33 ± 0.03 a
Pt-3-glc-ac	0.30 ± 0.05 a	0.25 ± 0.04 a	0.25 ± 0.07 a	0.35 ± 0.11 a	0.31 ± 0.03 a	0.30 ± 0.06 a	0.30 ± 0.06 a	0.28 ± 0.04 a
Mv-3-glc-ac	1.14 ± 0.07 a	1.20 ± 0.18 a	1.23 ± 0.37 a	1.71 ± 0.54 a	1.64 ± 0.08 a	1.76 ± 0.34 a	1.94 ± 0.23 a	1.61 ± 0.10 a
Cy-3-glc-cou	0.07 ± 0.01 a	0.06 ± 0.01 a	0.06 ± 0.03 a	0.08 ± 0.02 a	0.04 ± 0.01 a	0.03 ± 0.01 a	0.03 ± 0.01 a	0.04 ± 0.01 a
Pt-3-glc-cou	0.13 ± 0.01 a	0.12 ± 0.01 a	0.10 ± 0.03 a	0.15 ± 0.03 a	0.07 ± 0.01 a	0.06 ± 0.01 a	0.06 ± 0.01 a	0.06 ± 0.01 a
Pn-3-glc-cou	0.41 ± 0.12 a	0.34 ± 0.05 a	0.30 ± 0.07 a	0.46 ± 0.26 a	0.13 ± 0.04 a	0.12 ± 0.01 a	0.12 ± 0.02 a	0.13 ± 0.02 a
Anthocyanes totales	19.51 ± 2.2 a	17.04 ± 1.94 a	16.08 ± 4.18 a	20.77 ± 3.84 a	12.56 ± 0.88 a	11.37 ± 1.12 a	11.26 ± 1.44 a	11.49 ± 0.76 a

Teneur en anthocyanes (µg/mg de matière fraîche)

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques; ± écart type à la moyenne. Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents traitements azotés; a, b et c pour chaque combinaison indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

Tableau 26 : Teneur en anthocyanes des pellicules de baies de Pinot Noir

	Pinot Noir							
	2013				2014			
	Témoin	N50	N100	N15 foliaire	Témoin	N50	N100	N15 foliaire
Dp-3-glc	1.17 ± 0.34 a	1.11 ± 0.20 a	1.15 ± 0.13 a	1.05 ± 0.08 a	0.39 ± 0.08 a	0.34 ± 0.03 a	0.30 ± 0.08 a	0.42 ± 0.07 a
Cy-3-glc	0.41 ± 0.09 a	0.34 ± 0.07 a	0.34 ± 0.07 a	0.33 ± 0.06 a	0.15 ± 0.03 a	0.17 ± 0.01 a	0.15 ± 0.01 a	0.15 ± 0.01 a
Pt-3-glc	1.12 ± 0.30 a	1.10 ± 0.19 a	1.13 ± 0.09 a	1.08 ± 0.03 a	0.52 ± 0.10 a	0.47 ± 0.04 a	0.43 ± 0.10 a	0.56 ± 0.08 a
Pn-3-glc	2.58 ± 0.91 a	2.07 ± 0.19 a	2.17 ± 0.45 a	2.52 ± 0.44 a	1.39 ± 0.29 a	1.54 ± 0.13 a	1.45 ± 0.12 a	1.47 ± 0.09 a
Mv-3-glc	5.29 ± 0.60 a	5.54 ± 1.33 a	5.66 ± 0.34 a	5.43 ± 0.53 a	4.04 ± 0.97 a	4.01 ± 0.21 a	3.95 ± 0.74 a	4.77 ± 0.53 a
Anthocyanes totales	10.57±2.06 a	10.18±1.57 a	10.48±0.60 a	10.46±0.67 a	6.51±1.26 a	6.53±0.32 a	6.27±1.04 a	7.37±0.63 a
Teneur en anthocyanes (µg/mg de matière fraîche)								

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions biologiques; ± écart type à la moyenne. Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents traitements azotés; a, b et c pour chaque combinaison indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

II.3. Composition en flavan-3-ols et procyanidines des pépins

Les monomères catéchine (C), épicatechine (EC), épicatechine gallate (ECG) et les procyanidines dimères (B1, B2, B3, B4, B6 et B8) ont été identifiés et quantifiés par HPLC-UV dans les extraits de tannins de pépins. Les données obtenues à maturité pour le CS et le PN sont présentées respectivement tableaux 27 et 28.

Pour les deux cépages, les teneurs en tannins totaux, correspondant à la somme des teneurs des monomères et procyanidines dosés, ne sont pas affectées par les traitements azotés en 2013 et 2014. De plus, la teneur de chacun des métabolites dosés ne varie pas en fonction des traitements azotés quelque soient le cépage et l'année considérée.

Par la suite, le degré de polymérisation moyen (DPM) des extraits de tannins des pépins et des pellicules a également été déterminé (Fig.54).

Quelque soit le cépage considéré, aucune différence du degré de polymérisation moyen des tannins des pépins n'apparaît en fonction des traitements.

Chez le PN, le degré de polymérisation des tannins des pellicules ne varie pas en fonction des différents traitements.

Chez le CS, une différence significative apparaît entre la modalité N100 et les modalités Témoin, N50 et N15 foliaire. En effet, lors d'un traitement azoté de 100 U, le degré de polymérisation des tannins augmente.

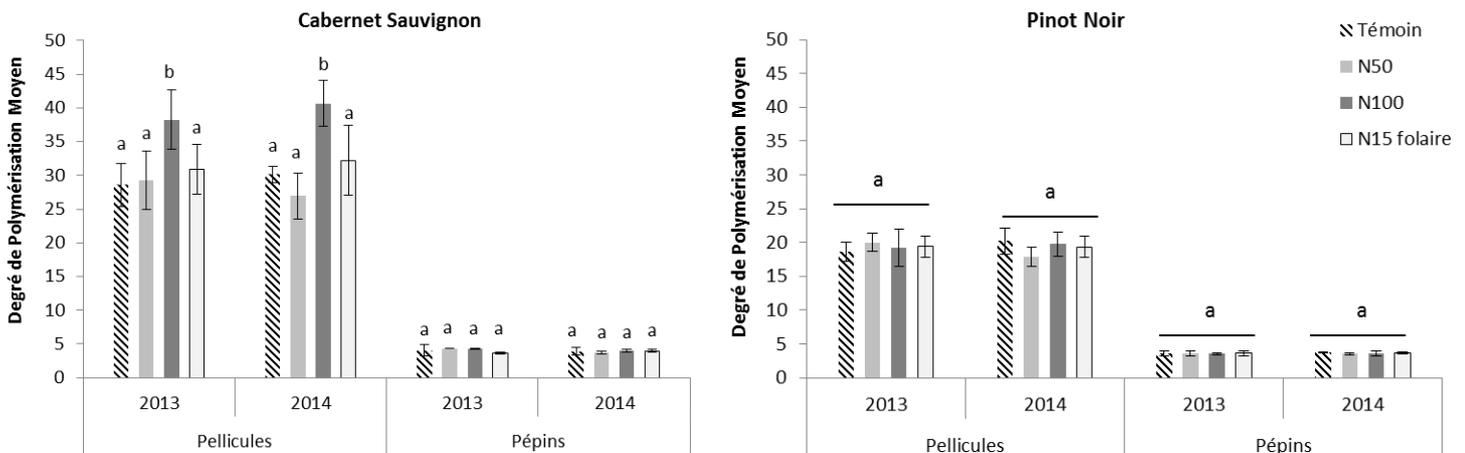


Figure 54 : Estimation du degré de polymérisation des tannins de la pellicule et des pépins des baies de Cabernet Sauvignon et de Pinot Noir

Tableau 27 : Teneurs en flavan-3-ols et procyanidines des pépins de Cabernet Sauvignon

	Cabernet Sauvignon							
	2013				2014			
	pépins				pépins			
	Témoin	N50	N100	N15 foliaire	Témoin	N50	N100	N15 foliaire
Procyanidine B1	0.59 ± 0.13 a	0.76 ± 0.17 a	0.65 ± 0.26 a	0.74 ± 0.04 a	1.01 ± 0.13 a	0.90 ± 0.05 a	0.89 ± 0.15 a	0.92 ± 0.15 a
EGC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Procyanidine B3	0.68 ± 0.19 a	0.66 ± 0.11 a	0.74 ± 0.16 a	0.75 ± 0.04 a	0.74 ± 0.33 a	0.59 ± 0.06 a	0.49 ± 0.09 a	0.64 ± 0.12 a
Catéchine	6.38 ± 2.71 a	5.96 ± 1.08 a	6.57 ± 0.86 a	6.26 ± 1.25 a	5.47 ± 1.16 a	6.57 ± 1.59 a	5.58 ± 1.51 a	6.01 ± 1.46 a
Procyanidine B4	0.06 ± 0.02 a	0.09 ± 0.01 a	0.08 ± 0.02 a	0.09 ± 0.01 a	0.59 ± 0.27 a	0.51 ± 0.04 a	0.38 ± 0.18 a	0.49 ± 0.15 a
Procyanidine B2	1.18 ± 0.11 a	1.76 ± 0.56 a	1.1 ± 0.17 a	1.12 ± 0.14 a	0.82 ± 0.20 a	0.78 ± 0.03 a	0.68 ± 0.21 a	0.75 ± 0.23 a
Epicatechine	5.09 ± 1.51 a	6.68 ± 1.85 a	6.3 ± 0.90 a	5.96 ± 0.37 a	3.17 ± 0.76 a	3.05 ± 0.09 a	2.89 ± 0.49 a	2.99 ± 0.67 a
Procyanidine B6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
EGCG	0.78 ± 0.06 a	1.32 ± 0.73 a	1.18 ± 0.24 a	0.76 ± 0.24 a	0.61 ± 0.24 a	0.56 ± 0.11 a	0.49 ± 0.18 a	0.56 ± 0.21 a
Procyanidine B8	3.36 ± 0.58 a	3.86 ± 1.96 a	3.96 ± 0.80 a	2.91 ± 1.00 a	2.26 ± 0.89 a	2.17 ± 0.17 a	2.02 ± 0.36 a	2.27 ± 0.64 a
ECG	10.24 ± 4.33 a	11.78 ± 4.63 a	14.06 ± 2.17 a	11.64 ± 1.97 a	11.58 ± 1.11 a	9.95 ± 1.15 a	10.35 ± 2.16 a	10.62 ± 1.23 a
Σ flavanols dosés	29.15±6.84 a	33.78±8.58 a	35.52±4.72 a	31.17±1.33 a	26.25±4.51 a	25.08±2.04 a	23.78±4.68 a	25.26±3.68 a

Teneur en flavan-3-ols et procyanidines (µg/mg de matière sèche)

Les valeurs sont des moyennes de quatre répétitions biologiques; ± écart type à la moyenne. Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents traitements azotés; a, b et c pour chaque combinaison indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

Tableau 28 : Teneurs en flavan-3-ols et procyanidines des pépins de Pinot Noir

	Pinot Noir							
	2013				2014			
	Témoin	pépins			Témoin	pépins		
N50		N100	N15 foliaire	N50		N100	N15 foliaire	
Procyanidine B1	1.04 ± 0.16 a	1.00 ± 0.20 a	1.04 ± 0.09 a	4.04 ± 6.15 a	1.76 ± 0.19 a	1.9 ± 0.25 a	2.07 ± 0.82 a	1.75 ± 0.34 a
EGC	nd							
Procyanidine B3	1.67 ± 0.19 a	1.44 ± 0.48 a	1.56 ± 0.30 a	1.59 ± 0.27 a	2.38 ± 0.45 a	2.43 ± 0.44 a	1.49 ± 0.82 a	2.25 ± 0.37 a
Catéchine	13.44 ± 1.16 a	14.45 ± 2.91 a	16.05 ± 0.35 a	14.12 ± 1.67 a	12.97 ± 3.09 a	14.24 ± 2.08 a	4.92 ± 5.69 a	13.95 ± 3.23 a
Procyanidine B4	0.11 ± 0.01 a	0.09 ± 0.06 a	0.16 ± 0.07 a	0.11 ± 0.02 a	1.26 ± 0.27 a	1.32 ± 0.36 a	0.71 ± 0.45 a	1.14 ± 0.24 a
Procyanidine B2	1.15 ± 0.14 a	1.20 ± 0.20 a	1.24 ± 0.29 a	1.22 ± 0.21 a	1.22 ± 0.11 a	1.41 ± 0.16 a	1.39 ± 0.60 a	1.29 ± 0.23 a
Epicatéchine	11.41 ± 1.19 a	11.17 ± 2.01 a	11.89 ± 1.79 a	10.71 ± 1.48 a	7.39 ± 1.41 a	9.47 ± 1.80 a	7.00 ± 3.47 a	8.31 ± 1.93 a
Procyanidine B6	nd							
EGCG	1.78 ± 0.23 a	1.68 ± 0.46 a	1.56 ± 0.47 a	1.63 ± 0.39 a	7.23 ± 1.06 a	8.02 ± 1.36 a	6.59 ± 1.72 a	7.07 ± 1.38 a
Procyanidine B8	5.27 ± 0.80 a	5.38 ± 1.25 a	5.10 ± 0.46 a	4.74 ± 0.75 a	11.87 ± 2.57 a	12.89 ± 2.18 a	10.93 ± 2.64 a	11.9 ± 1.04 a
ECG	13.91 ± 2.11 a	13.18 ± 1.88 a	14.46 ± 2.05 a	13.31 ± 1.6 a	1.76 ± 0.19 a	1.90 ± 0.25 a	2.07 ± 0.82 a	1.75 ± 0.34 a
Σ flavanols dosés	49.79±5.6 a	49.59±8.76 a	53.06±5.52 a	51.46±9.69 a	47.26±8.18 a	52.89±8.64 a	36.05±12.8 a	48.77±8.75 a

Teneur en flavan-3-ols et procyanidines (µg/mg de matière sèche)

Les valeurs sont des moyennes de quatre répétitions biologiques; ± écart type à la moyenne. Des tests Anova ont été réalisés en fonction de différents traitements azotés; a, b et c pour chaque combinaison indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes relatives au traitement azoté ($p \leq 0.05$).

II.4 Conclusions

Des expérimentations au vignoble ont été réalisées pour étudier l'influence de la fertilisation azotée sur le métabolisme primaire et secondaire du raisin dans des conditions normales de viticulture. Les données sont résumées dans le tableau 29. Les effets d'un excès d'azote sur la vigne et notamment sur la composition des baies de raisins sont bien connus (cf Chapitre 1). Cependant lors de nos expérimentations, la plupart des effets décrits dans la littérature n'ont pas été observés. En effet, la fertilisation azotée n'a que peu modifié les teneurs en acides organiques et elle n'a pas modifié celle des sucres et des anthocyanes.

Une augmentation de la teneur en acides aminés a été observée. Cependant, le changement de parcelles sur les deux années d'expérimentation, ne nous a pas permis d'observer les effets éventuels du stockage de l'azote des années précédentes.

Deux résultats intéressants ont pu être observés. D'une part, bien que la teneur en anthocyanes ne soit pas modifiée par des apports azotés, leur composition est altérée par un apport de 100U d'azote. En effet, les pourcentages de delphinidine-3-glucoside et pétunidine-3-glucoside diminuent chez les modalités N100. Ces deux anthocyanes sont toutes deux issues de la glycosylation et/ou de la méthylation de la même anthocyanidine, la delphinidine. D'autre part, le degré de polymérisation des tannins de la pellicule des baies de CS augmente significativement chez les modalités N100 par rapport aux modalités témoin. Cependant, cette observation n'est pas visible chez le PN.

Tableau 29 : Tableau récapitulatif des effets observés lors d'un traitement azoté (N100) par rapport aux plantes non traitées (témoin)

	Forte disponibilité azotée (N100) à maturité							
	Cabernet Sauvignon				Pinot Noir			
	2013		2014		2013		2014	
	<i>pellicules</i>	<i>pulpes</i>	<i>pellicules</i>	<i>pulpes</i>	<i>pellicules</i>	<i>pulpes</i>	<i>pellicules</i>	<i>pulpes</i>
Acides organiques								
Acide malique	=	=	↘	=	=	=	=	↗
Acide tartrique	=	=	=	=	=	=	=	=
Sucres réducteurs								
Glucose	=	=	=	=	=	=	=	=
Fructose	=	=	=	=	=	=	=	=
Acides aminés totaux	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
Anthocyanes totales	<i>pellicules</i>		<i>pellicules</i>		<i>pellicules</i>		<i>pellicules</i>	
	=		=		=		=	
% Delphinidine-3-glc	↘		↘		=		↘	
% Pétunidine-3-glc	↘		↘		=		↘	
% Malvidine-3-glc	=		=		=		=	
% Cyanidine-3-glc	=		=		=		=	
% Péonidine-3-glc	=		=		=		=	
Flavan-3-ols et procyanidines	<i>pellicules</i>	<i>pépins</i>	<i>pellicules</i>	<i>pépins</i>	<i>pellicules</i>	<i>pépins</i>	<i>pellicules</i>	<i>pépins</i>
	-	=	-	=	-	=	-	=
DPM	↗	=	↗	=	=	=	=	=

III- Effet de l'azote sur le profil d'expression de gènes : analyse par RNA-Seq

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans la régulation du métabolisme primaire et secondaire des baies en réponse à la nutrition azotée, une analyse transcriptomique par RNA-Seq a été réalisée. Les résultats obtenus en 2013 sont présentés sous forme de l'article ci-dessous. Les données de l'année 2014 seront prochainement traitées et intégrées à l'article pour une soumission future. L'article présente l'étude des effets de l'azote sur le métabolisme primaire et secondaire de deux cépages, le Sauvignon blanc et le Cabernet Sauvignon. Les données présentées sur le Sauvignon blanc ont été obtenues et analysées par Pierre Helwi, doctorant au sein du laboratoire encadré par le Pr. Cornelis van Leeuwen, dont le projet de recherche concerne plus particulièrement l'effet de la nutrition azotée sur les composantes aromatiques (IBMP) et précurseurs d'arômes (thiols volatils). Les données présentées sur le Cabernet Sauvignon ont été obtenues et analysées par moi-même.

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

Aude Habran^{1*}, Pierre Helwi^{1*}, Sabine Guillaumie¹, Celine Kleim², Kees Van Leeuwen¹ and Serge Delrot¹

¹Univ. Bordeaux, ISVV, Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne, UMR 1287, F-33140 Villenave d'Ornon, France

²Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg, BP 10142-67404 ILLKIRCH Cedex

*both authors contributed equally to this work

RÉSUMÉ

L'azote est un des éléments majeurs influençant le développement végétatif et reproducteur de la vigne, ainsi que la composition et le potentiel œnologique des baies de raisin. Cette étude présente une analyse transcriptomique des effets de l'azote sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire chez la baie de raisin. Des analyses par RNA-Seq ont été faites aux stades mi-maturité (M) et maturité (MM) sur des baies de Sauvignon Blanc (SB) et de Cabernet Sauvignon (CS) après une fertilisation au sol avec 100 kg d'azote par hectare. Les transcriptomes des baies ainsi traitées ont été comparés à ceux de baies témoins non traitées. Les deux cépages répondent différemment à un apport en azote, et présentent des profils d'expressions de gènes distincts. Le nombre de gènes différentiellement exprimés (GDE) varie entre les deux cépages : SB présente plus de GDE à MM qu'à M tandis que CS montre un profil inverse. Dans le baies de CS, 176 et 127 gènes sont spécifiques respectivement des stades MM et M, alors que 53 gènes surexprimés et 7 gènes sous-exprimés sont communs aux deux stades. Concernant CS, les expressions de 96 et 358 gènes sont spécifiques respectivement des stades MM et M, et seulement 4 gènes surexprimés sont communs entre les deux stades. En général, plus de gènes sont surexprimés que sous-exprimés en réponse à un apport en azote. Les transcrits spécifiques de la réponse à un apport azoté correspondent à des gènes de différentes natures. Pour cette étude, seuls les gènes en relation avec le métabolisme de l'azote, le métabolisme secondaire, et le transport ont été pris en compte. Un certain nombre de gènes candidats potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse des métabolites sont affectés par un apport en azote.

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. 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 than down-regulated by N. 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 (Bell and Henschke, 2005a). For grapevine, nitrogen affects vigor, yield and sensitivity to fungi, particularly *Botrytis cinerea* (Keller et al., 2001b). Concerning the berries, it impacts sugar and organic acid contents, amino acid concentration and levels of total phenolics and aroma compounds (Barbier, 2004b; Bell and Henschke, 2005a; Spayd et al., 1994b)

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 sulfanylhexas-1-ol, 3SH) (Figure 1).

Phenylalanine (Phe) derived from shikimate and glutamate pathways is the precursor of polyphenols compounds (Lillo et al., 2008b). 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 (Hilbert et al., 2003b). 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* (Scheible et al., 2004), which are involved in the regulation of flavonoid biosynthesis (Lillo et al., 2008b).

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 (Darriet et al., 1995; Tominaga et al., 1996). This compound, which is not found in grape berries and musts, is released during alcoholic fermentation from non-volatile and odorless precursors originally present in the berry. 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) (Darriet et al., 1995; Peyrot des Gachons et al., 2002; Tominaga et al., 1998). 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 (Choné et al., 2006; Lacroux et al., 2008; Peyrot des Gachons et al., 2005). In the berry, Glut-3SH is formed by the combination of glutathione to *trans*-2-hexenal, mediated by a glutathione-*S*-transferase enzyme (VvGST) (Kishimoto et al., 2005; Kobayashi et al., 2010; Mueller, 2004; Thibon et al., 2011). The Cys-3SH derives from the catabolism of the glutathionylated precursor. This reaction requires the presence of two enzymes: a γ -glutamyltranspeptidase (VvGGT) 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, we also addressed genes involved in transport mechanisms due to their essential role in nitrogen and secondary metabolism regulation.

3 sulfanylhexan-1-ol

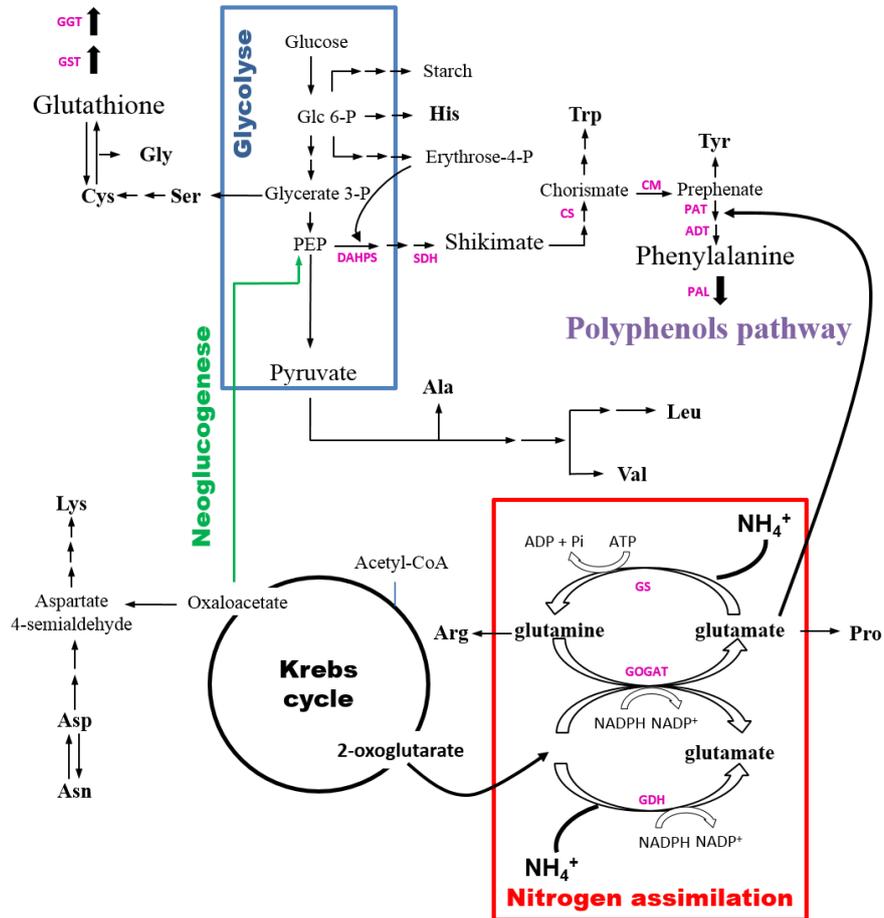


Figure 1. Primary and secondary metabolism pathways related to nitrogen assimilation. ADT, arogenate dehydratase; Ala, alanine; Arg, arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartate; CM, chorismate mutase; CS, chorismate synthase; Cys, cysteine; DAHPS, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase; GDH, 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 vineyard 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 (van Leeuwen et al., 2000). After centrifugation, the juice was analyzed with a Fourier Transform Infra-Red spectrometer (FTIR, WineScan FOSS®, FRANCE, 92000 Nanterre) (Destrac et al., 2015).

Berry 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) (Reid et al., 2006) 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 a 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 v2.0.10 (Kim et al., 2013) and the bowtie2 v2.1.0 aligner (Langmead and Salzberg, 2012). Gene expression was quantified from uniquely aligned reads using HTSeq v0.5.4p3 (Anders et al., 2015) 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) (Love et al., 2014b). Adjustment for multiple testing was performed with the Benjamini and Hochberg (1995) method (Benjamini and Hochberg, 1995). Genes of interest were defined by their gene ontology from Ath_AGI_TAIR9_Jan2010 using MapMan interface (Thimm et al., 2004b). 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

Berry 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, nitrogen supply significantly impacted the amount of primary metabolites 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.

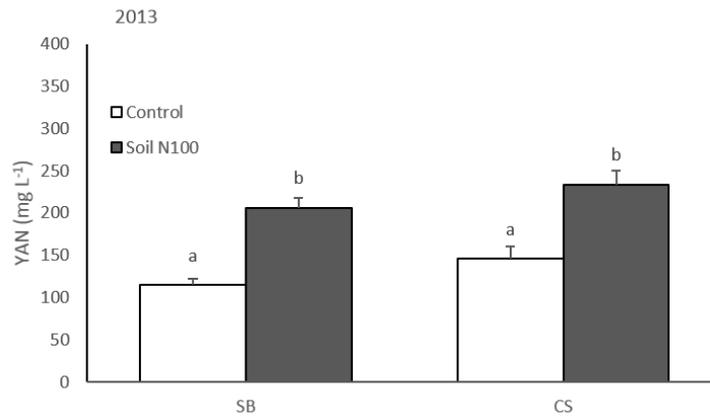


Figure 2. Effect of nitrogen supply on yeast available nitrogen in SB and CS grape berries just prior to harvest.

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 variations 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). The number of differentially expressed genes (DEG) between stages was variety dependent. 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).

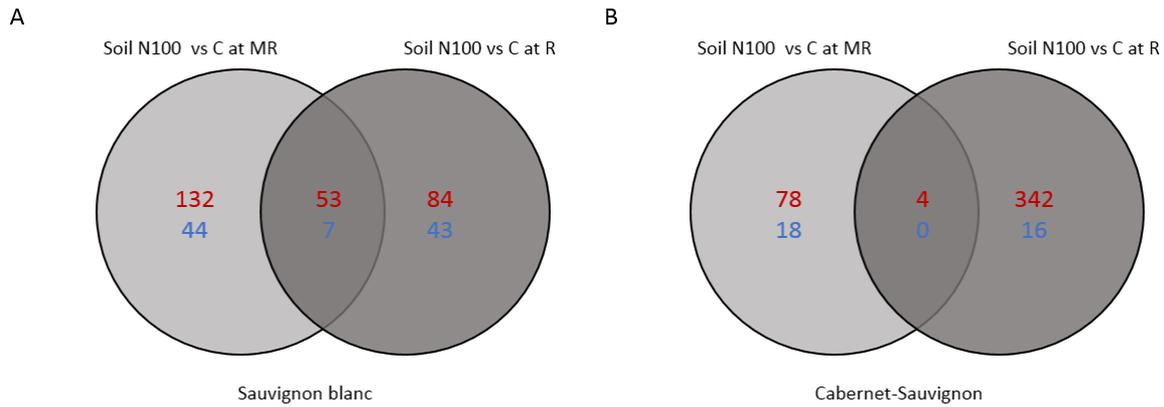


Figure 3. Venn diagrams representing the number of differentially expressed genes between the control and the soil N100 fertilized modality for (A) Sauvignon blanc and (B) Cabernet-Sauvignon at mid-ripening (MR) and ripeness (R).

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.

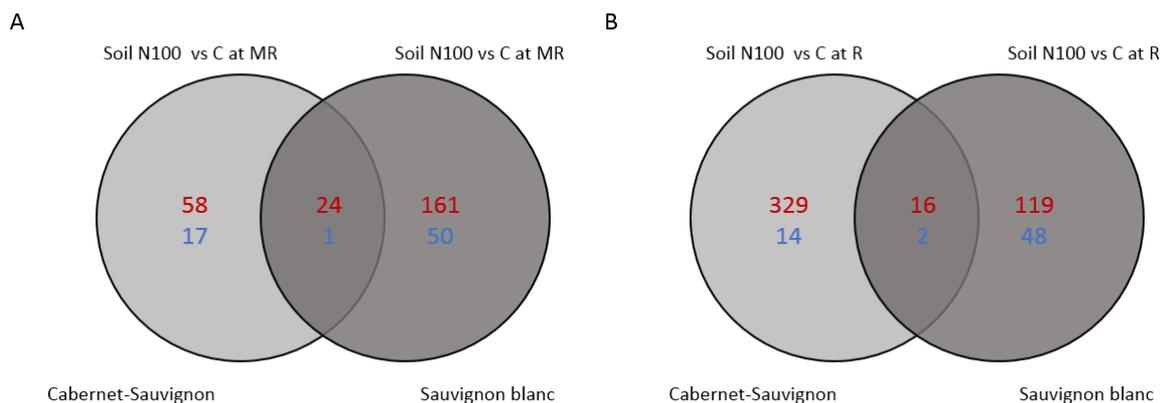


Figure 4. Venn diagrams representing the number of genes differentially expressed in response to nitrogen supply in SB and CS varieties at MR (A) and R (B) stages.

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.

Mapman BIN. 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. Number of gene was performed using Mapman interface in order to describe global biological processes enriched in response to nitrogen supply.

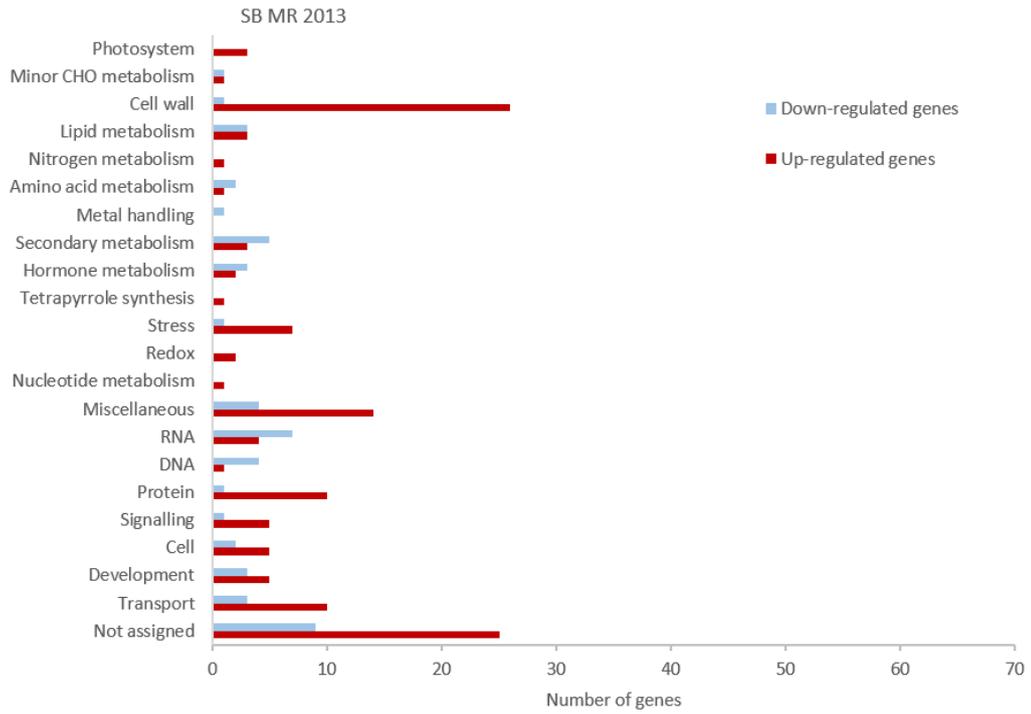
In SB berries at MR, functional annotation and GO term enrichment covered many metabolic pathways and biological processes, including photosystems, minor CHO metabolism, cell wall, nitrogen, lipid, amino acid, hormone and secondary metabolisms, tetrapyrrole synthesis, metal handling, stress, redox, nucleotide 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).

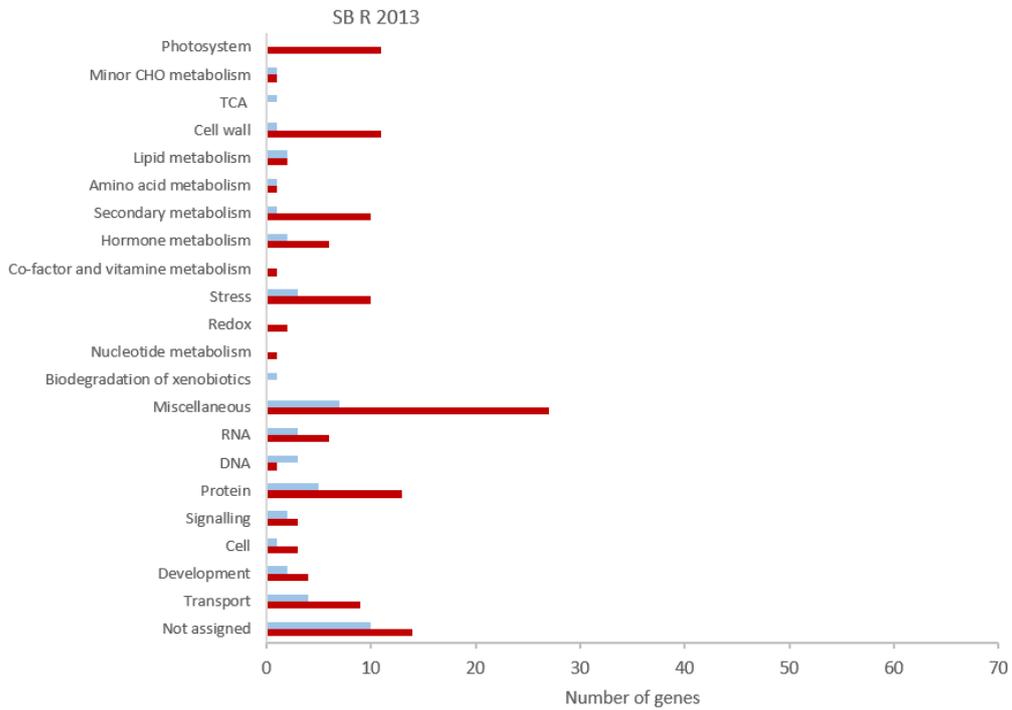
At R, GO term enrichment included families related to photosystems, minor CHO metabolism, glycolysis, fermentation, TCA, cell wall, lipid, amino acid, hormone, co-factor and vitamin metabolism, tetrapyrrole synthesis, stress, RNA, secondary metabolism, cell, development, redox, protein, signaling, transport and nucleotide metabolism. At this stage, the 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.

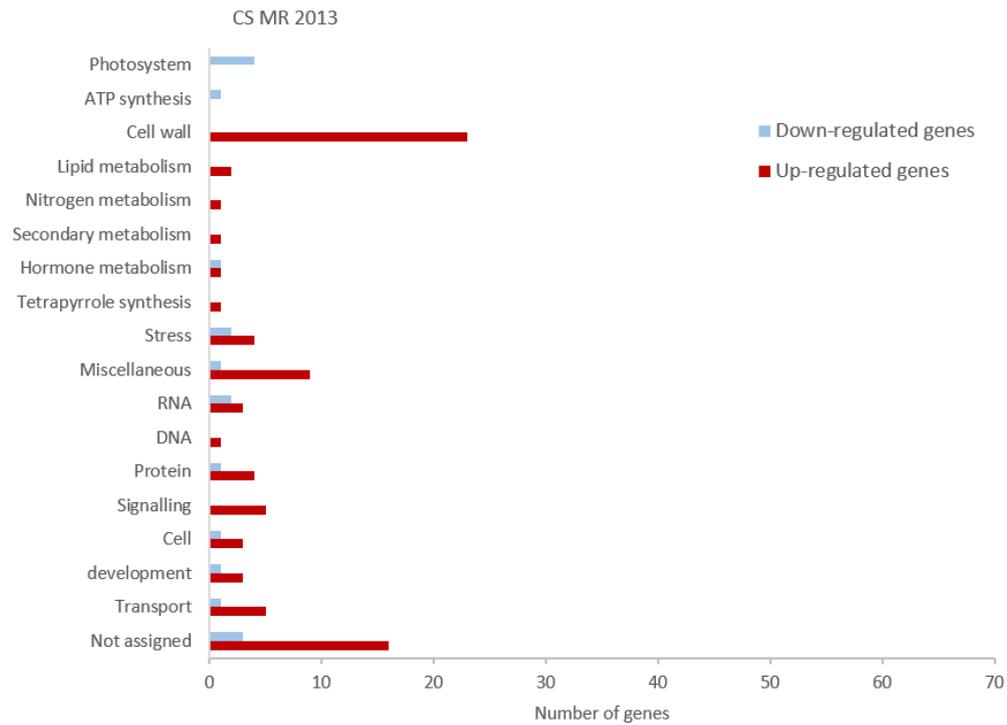
A



B



C



D

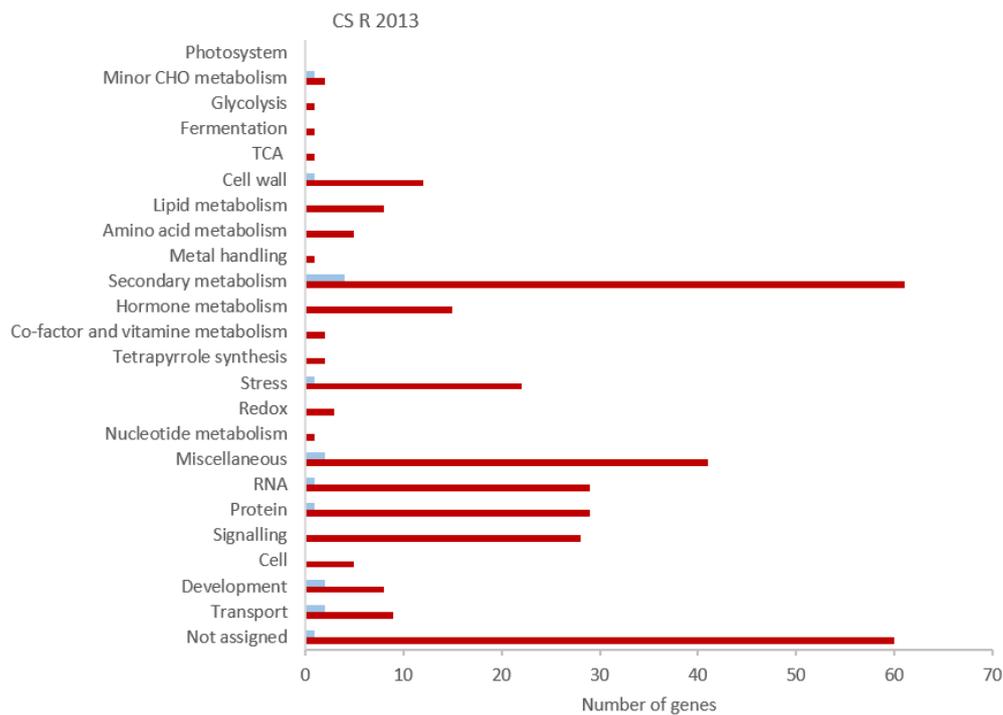


Figure 5. Analysis of functional categories of all genes differentially expressed between the control and the soil N100 treatment for (A) SB at MR, (B) SB at R, (C) CS at MR and (D) CS at R.

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 (Crété et al., 1997). The *Arabidopsis* homologue of *VIT_16s0098g00290* encodes a NADH-dependent glutamate synthase 1 (GLT1) that synthesizes L-glutamate from 2-oxoglutarate and L-glutamine (Lancien et al., 2002).

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. *AtGSTU25* binds to *S*-hexanol-glutathione, which can be the product of the addition of glutathione to *trans*-2-hexenal (Davoine et al., 2006; Dixon and Edwards, 2009; Feussner and Wasternack, 2002). 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 (Fäldt et al., 2003).

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 (Beaudoin et al., 2009). Finally, *VIT_18s0001g03470* encoding a flavonol synthase was down-regulated by N supply. 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 (Kuhn et al., 2011; Owens et al., 2008; Preuß et al., 2009; Stracke et al., 2009). The corresponding *Arabidopsis* mutants accumulate high amounts of anthocyanins and glycosylated forms of dihydroflavonols (Owens et al., 2008; Stracke et al., 2009; Wisman et al., 1998).

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 (Zhu et al., 2012). MPT3 affects plant metabolism and leaf and flower development (Jia et al., 2015). 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 (Piotrowski et al., 2001). Nitrilases belonging to the NIT4 family thus may have a different and more general function and will likely not be associated with auxin production (Piotrowski et al., 2001).

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 (Krouk et al., 2010c; Won et al., 2011). 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 (Blee et al., 2003).

Finally, worth mentioning are two genes coding for glutathione-S-transferase, namely a glutathione-S-transferase tau 19, *VvGSTU19* (*VIT_19s0015g02690*) an homologue of *VvGSTU19* 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 (Kanno et al., 2012). 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. The homologue of *VIT_00s0259g00140* in *Arabidopsis* encodes for an oligopeptide transporter 3 (OPT3) implicated in the translocation of small peptides and some metals (Wintz et al., 2003). The OPT gene family is implicated in nitrogen remobilization (Koh et al., 2002; Pike et al., 2009). Moreover, the expression of this gene can be induced by copper, iron or manganese deficiencies (Wintz et al., 2003).

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.

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 (Kushiro et al., 2004).

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 (Klepek et al., 2005; Reinders et al., 2005). 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 (Tommasini et al., 1998). As already mentioned, glutathione is a pro-precursor of the 3SH precursors, metabolites responsible for the formation of the 3SH (Kobayashi et al., 2010; Thibon et al., 2011). 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.

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 (Liu et al., 2003).

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 (Cao et al., 2011). The OPT proteins may be involved in 4 different processes: long-distance metal transport (Stacey et al., 2008), heavy metal sequestration (Cagnac et al., 2004; Pike et al., 2009), nitrogen mobilization (Koh et al., 2002; Pike et al., 2009) and glutathione transport (Bogs et al., 2003; Cagnac et al., 2004; Pike et al., 2009; Zhang et al., 2004). 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 (Koh et al., 2002). 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 (Subileau et al., 2008).

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 (Yazaki et al., 2008).

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 (Lillo et al., 2008b), and cinnamoyl-CoA reductase is involved in lignin branch biosynthetic pathway (Lacombe et al., 1997).

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 (Dao et al., 2011).

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 (Tommasini et al., 1998). 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 (Yazaki et al., 2008).

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 (Chen et al., 2004; Tholl et al., 2005).

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 (May et al., 2011).

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

CONCLUSIONS

In the present study, we compared the transcript abundances of two grapevine varieties of *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 require 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	(E)- 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	Falvone-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, GST23 (<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.

Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives

Notre travail de thèse avait pour objectif de mieux comprendre les effets de l'azote sur le métabolisme secondaire de la baie de raisin et de déterminer s'il pouvait expliquer une partie des effets du stress hydrique. A cette fin, nous avons mis en place une expérimentation sur plantes en pots en conditions semi-contrôlées et une expérimentation au vignoble. Les conséquences sur les baies de la disponibilité en azote ont été analysées sur différentes combinaisons porte-greffe/greffon. Deux cépages ont été utilisés, le CS et le PN, choisis car leur profil d'accumulation des anthocyanes est contrasté. Le CS possède des formes d'anthocyanes acylées absentes chez le PN (Fong et al., 1971). Les deux cépages ont été greffés sur deux génotypes de porte-greffe, RGM et 110R, choisis en fonction de la vigueur qu'ils confèrent au greffon, respectivement faible et forte (Tandonnet et al., 2010).

Une seconde expérimentation menée au vignoble a permis d'étudier l'impact de différentes fertilisations azotées sur le métabolisme secondaire des baies dans des conditions réelles de viticulture. Les plantes utilisées lors de cette expérimentation étaient âgées de 6 à 10 ans avec un système racinaire bien développé et non confiné.

Les résultats peuvent être discutés en termes d'effets du porte-greffe, de l'azote, de biologie intégrative, et de comparaison entre effets de l'azote et effets du stress hydrique.

I. Effets de l'azote sur le statut azoté des vignes

Différentes approches ont été utilisées pour estimer le statut azoté des plantes. En effet, il n'existe pas d'indicateur à la fois facilement mesurable et clairement représentatif de ce statut. Il est donc conseillé de croiser divers indicateurs (Van Leeuwen et al., 2000; Soyer et al., 2003; Van Leeuwen and Friant, 2011).

Les mesures de N-tester (mesure optique de la teneur en chlorophylle des feuilles) et les dosages de l'azote total dans les différents compartiments (limbes, pétioles, baies et moût) ont révélé l'impact des différents traitements sur le statut azoté des plantes (Fig. 55). Toutefois, bien que les teneurs en azote diffèrent clairement entre les différentes modalités pour les plantes cultivées en pots, le contraste entre le statut azoté des plantes en réponse aux traitements est plus faible au vignoble (cf Chapitre 4, paragraphe I.2.). De nombreux facteurs environnementaux tels que la température et/ou l'humidité du sol, l'accessibilité du système racinaire ainsi que les différentes pratiques culturales peuvent influencer l'absorption et l'assimilation de l'azote par les plantes au vignoble (Keller, 2010b). Malgré leurs limitations, les plantes en pots sont donc un matériel pertinent, au moins en première approche.

II. Effets de l'azote sur la vigueur des vignes

La vigueur des plantes a été estimée par mesure de la surface foliaire en fin de croissance et celle de la masse des bois de taille. De nombreuses études ont rapporté que ces deux paramètres augmentent sous l'effet d'apports azotés (Bell and Robson, 1999; Keller and Hrazdina, 1998; Conradie, 2001). Lors de notre expérimentation sur plantes en pots,

nous avons confirmé une augmentation de la masse des bois de tailles (rameaux primaires et secondaires) sous l'effet de l'azote (tableau 8). Cependant, aucune variation de surface foliaire primaire n'a été observée en fonction des différents traitements azotés, alors que la surface foliaire secondaire des plantes est augmentée par l'azote (tableau 7). Des travaux antérieurs ont montré que la plasticité des rameaux secondaires de vigne face aux facteurs environnementaux est plus élevée que celle des rameaux primaires (Lebon et al., 2006; Metay et al., 2014). De plus chez *A. thaliana*, les différences de disponibilité azotée influencent le nombre de ramifications secondaires via la régulation de la signalisation de deux hormones, l'auxine et les strigolactones (Jong et al., 2014).

Lors de l'expérimentation menée au vignoble, aucune variation des surfaces foliaires et de la masse des bois de taille n'a été observée en fonction des différents traitements azotés. Ceci peut-être dû d'une part au faible impact des traitements azotés sur les teneurs en azote (voir-ci-dessus), d'autre part au fait que des pratiques culturales comme le rognage des bois ont pu induire un biais dans les mesures.

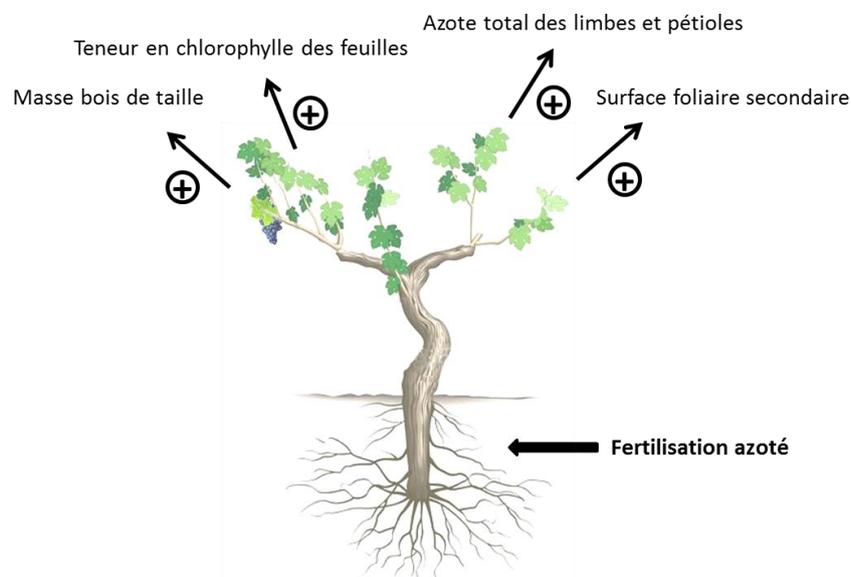


Figure 55 : Récapitulatif de l'impact d'une fertilisation azotée sur la Vigne

III. Effets de l'azote sur les métabolites primaires de la baie de raisin

Des résultats antérieurs obtenus au Laboratoire et dans d'autres équipes démontrent qu'une forte disponibilité en azote modifie la composition des baies. Elle augmente notamment la teneur des acides aminés et des acides organiques (Bell et al., 1979; Spayd et al., 1994; Soubeyrand et al., 2014), et diminue les teneurs des sucres des baies (Hilbert et al., 2003; Barbier, 2004).

Les analyses des métabolites primaires des baies montrent que la plupart des effets d'une forte disponibilité en azote décrits dans la littérature (pour revue, Bell and Henschke,

2005) ne sont pas observés lors de l'expérimentation faite au vignoble. En effet, la fertilisation azotée n'a que peu modifié les teneurs en acides organiques et elle n'a pas modifié la teneur des sucres de la baie (tableaux 21 et 22).

Cependant, une augmentation de la teneur des acides aminés totaux dans les baies a été observée sous l'effet de l'azote. La teneur en acides aminés totaux est donc plus sensible à l'azote que ne le sont les teneurs en sucres ou en acides organiques. Un apport azoté chez la vigne augmente le transport de GLU et GLN via la sève xylémienne vers les organes de la plante (KELLER et al., 2001). L'augmentation dans les baies de la teneur en GLN, forme majeure d'azote dans le xylème (KELLER et al., 2001) pourrait résulter d'une augmentation de l'assimilation d'azote racinaire suivie de son transport vers les fruits. ARG et ASN sont les formes privilégiées de stockage de l'azote chez les plantes (Gaudillère, 1997; Masclaux-Daubresse et al., 2010; Krapp et al., 2011). Sous l'effet d'un apport azoté, la teneur en ARG augmente, mais nous n'avons observé aucune modification de la teneur en ASN (tableaux 23 et 24). Cette observation pourrait être expliquée par le fait que ARG est directement issue du GLU alors que ASN est synthétisée à partir de l'oxaloacétate. En accord avec les travaux réalisés par Hilbert et al. (2003) et Soubeyrand (2013), une augmentation de la teneur en PHE, acide aminé précurseur de la voie de biosynthèse des flavonoïdes a été observée lors d'un apport azoté. De plus, nos résultats confirment qu'un apport azoté semble entraîner une diminution des teneurs en anthocyanes (Tableau 25 et 26). Cette diminution peut être due à une synthèse accrue de la PHE et/ou à une utilisation diminuée de cet acide aminé par les voies métaboliques situées en aval. Chez *A.thaliana*, il a été montré qu'une carence azotée conduit à une augmentation de l'abondance des transcrits de l'ADT (arogenate déshydratase), enzyme responsable de la synthèse de la PHE à partir du L-arogenate (Scheible et al., 2004 ; Lillo et al., 2008). D'autre part, les mêmes auteurs ont également montré une augmentation des transcrits de la PAL en conditions de carence azotée alors qu'à l'inverse, chez la vigne, une diminution de ces transcrits a été observée sous l'effet d'un apport azoté (Soubeyrand et al., 2014). Il serait intéressant de poursuivre notre travail par une étude spécifique de l'impact de la nutrition azotée sur ces deux enzymes à différents stades de maturation de la baie.

Les dosages des métabolites primaires sur les échantillons issus de l'expérimentation des plantes en pot sont en cours.

IV. Effets de l'azote sur les métabolites secondaires du raisin

IV.1. Effets de l'azote sur la teneur en anthocyanes et en flavonols

Chez diverses espèces, une faible disponibilité azotée favorise la biosynthèse des composés phénoliques dans différents organes (Bongue-Bartelsman and Phillips, 1995; Stewart et al., 2001; Fritz et al., 2006; Nguyen and Niemeyer, 2008). Pour le cépage Merlot, Hilbert et al. (2003) ont montré qu'une disponibilité limitée de l'azote augmente la teneur des principales formes d'anthocyanes non acylées (Dp-3-glc, Pt-3-glc, Mv-3-glc, Cy-3-glc et Pn-3-glc) et des formes acylées de la malvidine.

Conformément à ces observations, une accumulation de Dp-3-glc, Pt-3-glc, Cy-3-glc et Pn-3-glc en condition N- a été observée sur les plantes en pots. Chez le CS, une augmentation de l'accumulation de Dp-3-acétyl-glc et Pt-3-acétyl-glc a également été trouvée (Fig. 37). Cependant, au cours de notre étude, les teneurs de Mv-3-glc et de ses

dérivés acylés ne sont pas affectées par les différents niveaux de disponibilité azotée. Cette différence avec le Merlot (Hilbert, 2003) pourrait être d'origine variétale.

Nos résultats montrent aussi que les faibles teneurs en azote conduisent à une accumulation plus importante de flavonols dans les baies à maturité. Chez *A. thaliana*, une accumulation de kaempférol-3-glc dans les feuilles et de quercétine dans les semences a été mise en évidence en conditions de déficit azoté (Stewart et al., 2001; Lea et al., 2006). Chez la Vigne, une accumulation de la quantité de flavonols totaux des baies au stade véraison de CS cultivés en pots est observée dans des conditions de déficit azoté (Keller et al., 1998). Cependant, aucune réponse de la teneur en flavonols au traitement azoté n'avait été observé sur le CS cultivé au vignoble (Soubeyrand et al., 2014). Au cours de notre travail, une augmentation de kaempférol-3-O-glucoside a été observée pour chacun des cépages en conditions N-, en accord avec ce qui a été montré chez *A.thaliana*. De plus, chez le PN, une augmentation de quercétine-3-O-glucoside et quercétine-3-O-glucuronide a été observée. Ce cépage présente une plus forte proportion d'anthocyanes di-hydroxylées que le CS, ce qui permet de supposer que la voie utilisant la F3'H serait plus active chez le PN. D'autre part, il a été montré qu'une carence en azote augmente l'abondance des transcrits de cette enzyme (Scheible et al., 2004 ; Soubeyrand, 2013), ce qui pourrait expliquer l'augmentation des dérivés de quercétine sous conditions N- pour le PN. De la même façon, la carence azotée a un effet positif sur la FLS (pour revue Lillo et al, 2008) conduisant à une augmentation des teneurs en kaempférol. Comme pour les enzymes ADT et PAL, il serait intéressant d'étudier plus précisément l'impact de l'azote sur ces deux enzymes chez la Vigne.

Pour l'expérimentation au vignoble, aucune modification de la teneur totale en anthocyanes n'a été observée. Toutefois, comme décrit dans la littérature (Hilbert et al., 2003a; Soubeyrand et al., 2014), le profil en anthocyanes est altéré, le pourcentage d'anthocyanes tri-hydroxylées (delphinidine-3-O-glucoside et pétunidine-3-O-glucoside) diminuant lors d'un apport azoté. Ce résultat montre que l'altération du profil anthocyanique, comme celle de la teneur en acides aminés sont des marqueurs sensibles du statut azoté, même en absence de réponses des glucides ou des acides organiques.

IV.2. Effets de l'azote sur le DPM des tannins et sur les teneurs en flavan-3-ols et procyanidines

Les effets de l'azote sur les tannins des raisins sont peu décrits dans la littérature. Selon Delgado et al. (2004), une fertilisation azotée modérée favoriserait l'accumulation de tannins totaux alors qu'une forte fertilisation azotée la diminuerait.

Dans nos conditions expérimentales au vignoble, aucune modification de l'accumulation des flavan-3-ols, ou du DPM des tannins n'a été observée dans les pépins en réponse aux apports azotés. Par contre, une augmentation du DPM des tannins de la pellicule a été observée pour les baies de CS. A notre connaissance, aucune étude précédente n'avait mis en évidence un impact d'une fertilisation azotée sur le DPM des tannins. Selon Zhou et al (2014), l'augmentation du DPM des tannins (jusqu'à une valeur de 10), s'accompagne d'une augmentation de l'activité anti-oxydante de ces composés. Chez les plantes, Les composés phénoliques (dont les tannins) sont connus pour leur rôle de protection face à différents facteurs environnementaux abiotiques et biotiques (propriétés antifongiques, mécanisme de défense contre les herbivores...). L'augmentation du DPM des tannins et donc de leur activité anti-oxydante pourrait être une réponse des plantes à un excès d'azote. En effet, la nitrate réductase impliquée dans l'assimilation de l'azote et aussi

impliquée dans la synthèse de NO (oxyde de nitrate), messenger interagissant avec la signalisation des espèces actives d'oxygène chez les végétaux (Noctor et al., 2014; Trapet et al., 2015). D'autre part, selon Pourcel et al (2005), une laccase pourrait être impliquée dans le mécanisme de polymérisation des flavonoides chez *Arabidopsis thaliana*. Les données RNA-Seq obtenues sur notre expérimentation au vignoble démontrent une augmentation de l'abondance des transcrits codant différentes isoformes de cette enzyme. Il conviendrait donc d'explorer plus avant l'hypothèse selon laquelle une de ces laccases pourrait contrôler la polymérisation des tannins sous l'effet de l'azote.

D'autre part, dans les vins, les proanthocyanidines ont une importance organoleptique non négligeable car elles sont responsables de l'astringence et de l'amertume. Le DPM des proanthocyanidines peut modifier les perceptions du dégustateur. En effet, Mirabel (2000) a montré que l'astringence et l'amertume des tanins étaient liées au DPM. La polymérisation des tannins conduit à une augmentation conjointe de l'intensité de sensation de ces deux paramètres jusqu'à un DPM de 4, puis l'intensité de sensation de l'amertume se stabilise pour des valeurs de DPM au-delà de 4. Par contre, l'intensité de sensation de l'astringence ne varie pas pour des valeurs de DPM entre 4 et 18 puis augmente de nouveau pour atteindre un optimum pour un DPM compris entre 20 et 28. Au-delà de 28, l'intensité de sensation de l'astringence diminue légèrement. Les résultats obtenus lors de notre étude montrent que le CS présente des valeurs de DPM supérieures à 20 et ce, quelles que soient les conditions azotées. Il semblerait donc que pour ce cépage, dans nos conditions expérimentales, la nutrition azotée n'ait pas d'impact sur la perception organoleptiques des vins concernant ces paramètres. Chez le PN, les valeurs de DPM sont inférieures à 20 quel que soit le traitement, ce qui pourrait conduire à des vins moins astringent que pour le CS sans que la nutrition azotée ne soit impliquée.

Aucune modification de l'accumulation des procyanidines n'a été observée dans la pellicule des baies des plantes en pots. L'estimation du DPM des tannins des pellicules n'a pas pu être réalisée par manque de matériel végétal. En effet, les plantes utilisées lors de cette expérimentation étaient âgées de 2 ans en 2013 et 3 ans en 2014 et leur rendement était faible. Les analyses des teneurs en proanthocyanidine des pépins sont en cours.

Un certain nombre d'analyses doivent encore être réalisées, mais ces travaux montrent l'impact de l'azote non seulement sur la teneur en anthocyanes mais aussi sur la teneur en flavonols et, ponctuellement, sur le DPM des tannins. De plus, notre travail souligne l'absence de variation des teneurs en flavan-3-ols (monomères et dimères) lors de différents traitements azotés (Fig. 56).

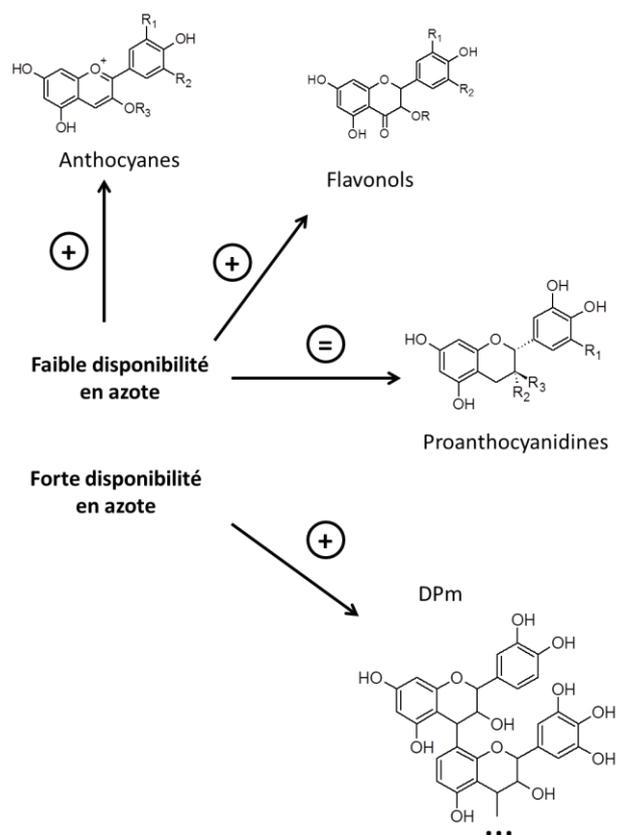


Figure 56 : schéma général des effets de l'azote observés sur les produits de la voie de biosynthèse des flavonoïdes

IV.3. Effets de l'azote sur la biosynthèse des flavonoïdes

De nombreuses études se sont intéressées à la régulation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes par la disponibilité de différents minéraux chez *A. thaliana* (pour revue, Lillo et al., 2008). Il a ainsi été démontré que lors d'une carence azotée, l'abondance des transcrits *PAL*, *4CL*, *F3H*, *F3'H*, *DFR* et *LDOX* (*ANS*), et celle de gènes impliqués dans la régulation de la voie (*Myb PAP1* et *Myb PAP2*) sont augmentées (Scheible, 2004). Chez la Vigne, lors d'une limitation en azote, une augmentation de l'abondance des transcrits *PAL*, *CHS*, *F3'5'H*, *DFR*, et *LDOX* a été observée dans les baies à maturité (Soubeyrand et al., 2014).

Au cours de notre étude, des analyses transcriptomiques par RNA-Seq ont été effectuées sur chacune des deux expérimentations (pots et vignoble). Seules les baies issues de CS et SB au vignoble ont été analysées. Un faible nombre de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes est significativement affecté lors de différents traitements azotés au stade maturité. Ces transcrits étant plus exprimés à des stades plus précoces du développement du raisin, il aurait été intéressant d'étudier des baies à des stades plus jeunes.

Sur des suspensions cellulaires de vigne de la lignée GT3, Soubeyrand (2013) a trouvé une augmentation de l'abondance des transcrits *PAL* ainsi qu'une augmentation d'activité de l'enzyme correspondante en conditions de carence azotée. Au contraire, les travaux sur CS cultivé au vignoble par le même auteur montrent une diminution de l'abondance des

transcrits *PAL* lors d'un apport azoté (Soubeyrand et al., 2014). Au cours de notre travail, les analyses RNA-seq et qRT-PCR sur baies issues des essais en pots ne montrent aucune différence de l'abondance des transcrits, mais au vignoble, ces transcrits augmentent lors d'un apport azoté. Ces deux observations vont à l'encontre de ce qui a été observé par Soubeyrand (2013). De plus, Soubeyrand (2013) a montré une diminution de l'abondance des transcrits *DFR* lors d'un apport azoté (cellules GT3 et au vignoble). Nous avons retrouvé cette réponse de la *DFR* sur les baies issues de l'expérimentation en pots, mais pas sur celles issues des essais au vignoble. La comparaison des résultats des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes montre que seuls les transcrits *CHS* présentent une abondance différentielle sous l'effet de l'azote dans toutes nos expérimentations. Lors des essais sur plantes en pots, comme décrit par Soubeyrand et al. (2014), l'abondance des transcrits de ces gènes diminue lors d'un apport azoté. Cependant, lors des expérimentations au vignoble, l'abondance de ces transcrits augmente.

Les variations des transcrits des gènes impliqués dans le métabolisme des flavonoïdes semble donc dépendre des gènes, du type de dispositif (en pots, vignoble) et des auteurs. Cette variabilité peut avoir plusieurs explications non mutuellement exclusives pour le moment. (a) L'abondance des transcrits des gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes varie pendant la maturation des baies (Terrier et al., 2005), et le moment de l'échantillonnage est donc un paramètre important. Une étude de la cinétique de la transcription de ces gènes serait indispensable afin de mieux comprendre l'impact de l'azote sur la voie de biosynthèse des flavonoïdes. (b) le statut azoté initial et la réponse à l'azote des plantes en pots et au champ peuvent être différents (c) s'agissant de familles multigéniques, il y a toujours un risque que les signaux observés proviennent de gènes voisins, notamment si les sondes utilisées en PCR ne sont pas assez spécifiques (d) le nombre de répétitions expérimentales est peut-être insuffisant.

De façon intéressante, les analyses ont montré que les gènes codant les facteurs de transcription MYB et LBD semblent régulés au niveau transcriptionnel par un apport azoté. En effet, les analyses transcriptomiques par qPCR ont montré une augmentation des transcrits *VvMYBA1* sur PN en 2014 et une diminution des transcrits *VvMYBPA1* lors d'un apport azoté. De plus, une augmentation des transcrits *VvLBD39* a été observée, confirmant les résultats de Soubeyrand et al. (2014). Cette observation est en accord avec les mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes par l'azote chez *A. thaliana* (Zhou et al., 2012) et fait de *VvLBD39* une cible intéressante pour des études fonctionnelles ultérieures approfondies.

L'analyse transcriptomique approfondie des différentes catégories fonctionnelles et de leur enrichissement, n'a pas été possible dans le temps imparti pour cette thèse, bien que les données aient été acquises. Elle doit donc être poursuivie dans les meilleurs délais. Cependant, nos résultats montrent qu'il est essentiel d'intégrer et d'étudier en parallèle les données moléculaires et biochimiques. En effet, l'analyse du métabolome révèle qu'une faible disponibilité azotée affecte l'accumulation des anthocyanes et des flavonols, mais ceci ne se reflète pas clairement dans les données transcriptomiques. La difficulté de corrélérer l'abondance de transcrits avec l'abondance des métabolites a déjà été notée (Pillet, 2011; Redestig and Costa, 2011). Les études réalisées chez *A. thaliana* pour lesquelles l'intégration d'analyses métabolomiques et transcriptomiques a permis d'identifier la fonction de gènes inconnus ont nécessité un nombre de réplicats importants (Hirai et al., 2004; Tohge et al., 2005). En tout état de cause, elles ne prennent pas en compte les autres types de régulations (post-transcriptionnelles, traductionnelles, post-traductionnelles). Il serait par

ailleurs important d'étudier l'expression du génome à différents stades de développement des baies. Les régulations de l'expression des gènes pourraient en effet intervenir à un stade plus précoce que les modifications du métabolome.

V. Effets de différents porte-greffes sur la composition des baies de raisin

Au cours de notre travail, les analyses métabolomiques des pellicules de baies ont montré que l'accumulation de certains métabolites est spécifique à certaines combinaisons porte-greffe/greffon. Ainsi, le CS greffé sur le porte-greffe 110R accumule plus d'anthocyanes-3-O-glucoside et d'anthocyane-3-O-acétyl-glucoside que lorsqu'il est greffé sur le porte-greffe RGM. Le PN greffé sur RGM accumule plus de stilbènes et d'acides hydroxycinnamiques que lorsqu'il est greffé sur le porte-greffe 110R.

Divers impacts des porte-greffes sur la physiologie des greffons ont été précédemment décrits. Le génotype du porte-greffe affecte la surface foliaire (Zerihun and Treeby, 2002), le développement racinaire (Tandonnet et al., 2010), la vigueur végétative (Stevens et al., 2008) et le rendement (Stevens et al., 2010). D'autres études ont été réalisées sur l'impact des porte-greffes sur la composition des baies, du moût et du vin. Le génotype du porte-greffe influence les teneurs d'azote assimilable du moût (Stockert et al., 2013), la teneur en acides aminés des moûts (Holzapfel and Treeby, 2007), la teneur en sucres et en anthocyanes des vins (Ollat and Lafontaine, 2003) et la teneur en acide malique des baies (Berdeja et al., 2014). Cependant, la métabolomique non ciblée n'avait encore jamais été utilisée pour étudier l'impact de différentes combinaisons porte-greffe/greffon sur la composition des baies. Elle a permis de montrer que l'interaction entre le porte-greffe et le génotype du greffon affecte les métabolites secondaires et donc le potentiel œnologique des baies. Les mécanismes impliqués dans l'interaction porte-greffe/greffon restent encore peu connus (Gregory et al., 2013). Cependant, ces deux porte-greffes conférant des vigueurs différentes au greffon, les effets observés au cours de notre étude pourraient être indirectement liés aux différences de vigueur. Les travaux menés par Lecourt (2013) ont démontré la forte implication des réserves azotées (acides aminés) et de la composante NRE (Nitrogen Remobilization Efficiency) dans l'établissement des différentiels de croissance entre les porte-greffes. Les différences de croissance aérienne induites par les deux génotypes de porte-greffe seraient liées à leur niveau en réserves azotées, à leur capacité à les mobiliser mais aussi à leur mode d'allocation de N au sein de la plante.

VI. Effets de l'azote sur la biosynthèse des flavonoïdes en interaction avec différents porte-greffes

Nous avons observé une accumulation de Dp-3-glc, Pt-3-glc, Cy-3-glc et Pn-3-glc en conditions de faible disponibilité azotée, quelle que soit la combinaison porte-greffe/greffeon considérée. Cependant, l'accumulation des différents flavonols semble dépendre de la combinaison porte-greffeon/greffeon étudiée. En effet, en conditions N-, aucune accumulation de ces composés n'a été observée sur la combinaison CS/RGM, alors qu'une accumulation de quercétine-3-O-glucoside, de myricétine-O-hexoside et de kaempférol-3-O-glucoside a été observée dans la pellicule de baies de CS greffé sur 110R. Pour le PN, quel que soit le porte-greffe, une accumulation de quercétine-3-O-glucoside et de quercétine-3-O-glucuronide a été observée alors que l'accumulation de kaempférol-3-O-glucoside n'a pu être observée que chez le PN greffé sur RGM.

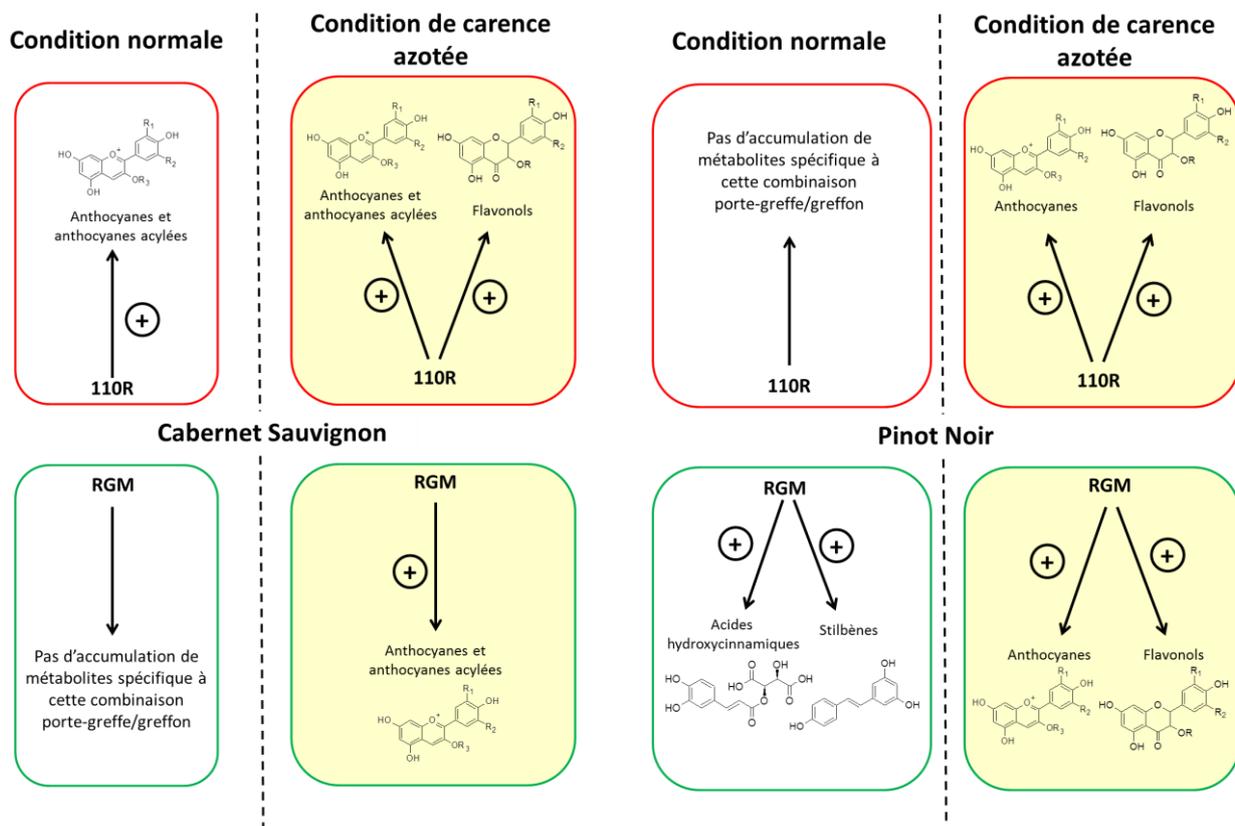


Figure 57 : Accumulation de métabolites secondaires dont la nature diffère en fonction des différentes combinaisons porte-greffe/greffeon/condition azotée

Les analyses RNA-Seq des baies de CS montrent un profil de transcrits différents dans les baies issues de CS greffés sur deux génotypes de porte-greffe différents en réponse à l'azote (Fig. 43). Le porte-greffe RGM semble moins sensible aux différences de disponibilité azotée du sol que le porte-greffe 110R. En effet, lors de la première année d'expérimentation, si le profil des transcrits diffère en fonction du traitement azoté lorsque le CS est greffé sur 110R, aucune différence du profil n'est observée en fonction des traitements azotés lorsqu'il est greffé sur RGM. Cependant, l'année suivante, une différenciation du profil des transcrits en

fonction des traitements est observée pour les deux géotypes de porte-greffe. Tandonnet et al. (2010) ont mis en évidence que la biomasse racinaire des deux combinaisons CS/RGM et CS/110R chez des plantes âgées de 1 an différait. En effet, la biomasse racinaire de la combinaison CS/RGM était inférieure à celle de la combinaison CS/110R. L'élongation des racines latérales serait réduite chez le porte-greffe RGM en comparaison au porte-greffe 110R. Cette différence de biomasse racinaire pourrait être liée à la différence de réponse à l'azote entre les deux porte-greffes lors de la première année d'expérimentation. De plus, l'effet cumulatif du traitement azoté sur les plantes pourrait expliquer le changement de comportement du porte-greffe RGM entre les deux années. En effet, Guilpart et al. (2014) ont pu mettre en évidence que différents traitements azotés lors de la saison précédente influençaient la fertilité des bourgeons et le nombre de baies par grappe de la saison suivante. Les effets d'une faible disponibilité azotée pour chacune des combinaisons sur la voie de biosynthèse des flavonoïdes observés lors de notre étude sont résumés figure 57.

VII. Relation entre stress hydrique et stress azoté

Les effets d'un stress hydrique relatés dans la littérature, notamment sur la biosynthèse des flavonoïdes (augmentation de la teneur en anthocyanes et en flavonols)(Koundouras et al., 2006a; Castellarin et al., 2007b; Deluc et al., 2009; Berdeja et al., 2014) sont similaires aux effets observés lors d'un déficit azoté (Keller and Hrazdina, 1998; Hilbert et al., 2003a; Soubeyrand et al., 2014).

Nos résultats corroborent donc l'hypothèse selon laquelle une partie des effets du stress hydrique peuvent être liés au stress azoté consécutif à la diminution d'absorption de la solution du sol. Nous avons par ailleurs précisé les effets du stress azoté sur différentes catégories d'anthocyanes, et montré qu'il pourrait s'étendre à des modifications du DPM des tannins des pellicules.

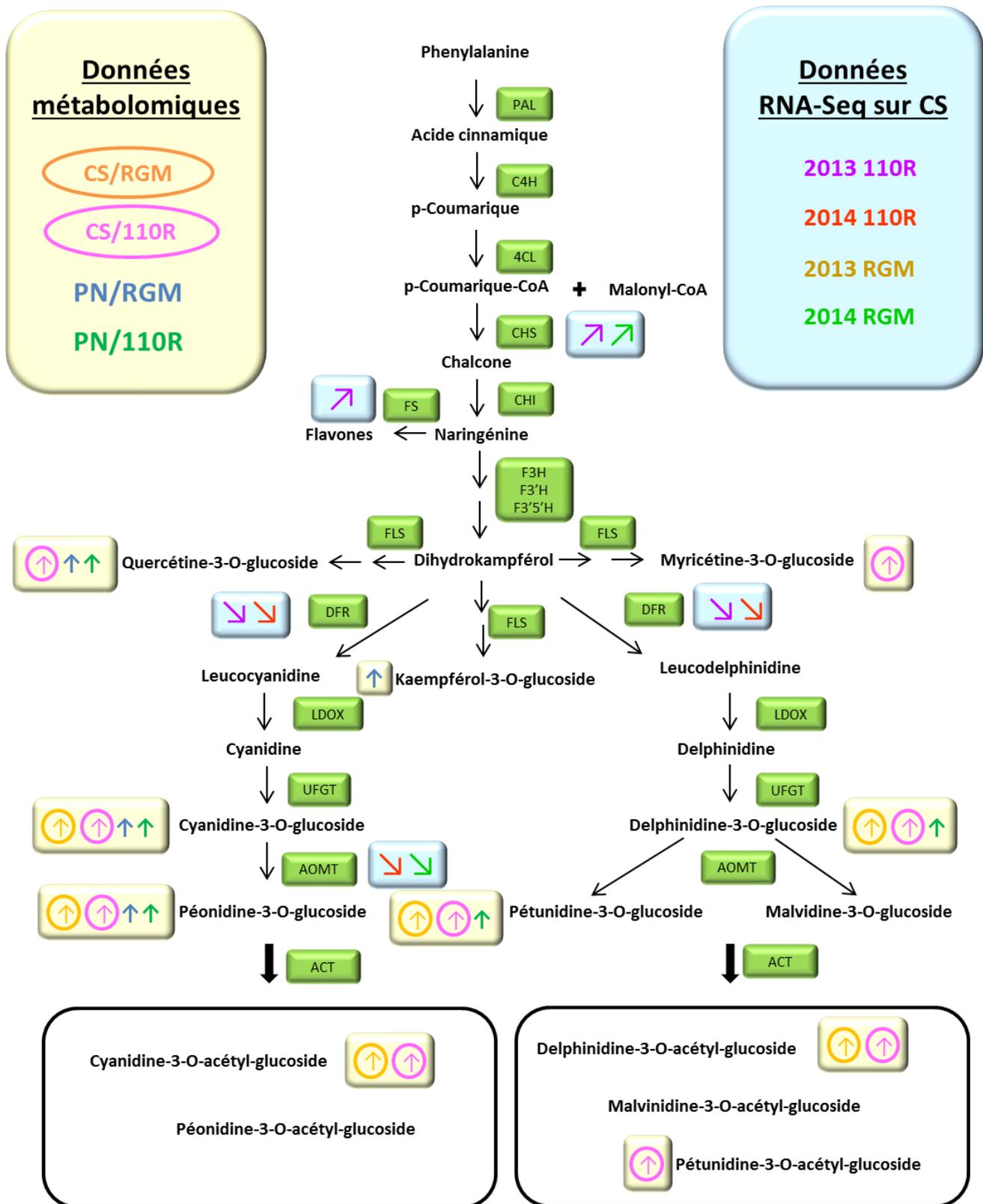


Figure 58 : Voie simplifiée de la biosynthèse des flavonoïdes et influence d'une faible disponibilité azotée N- sur les anthocyanes et les flavonols selon différentes combinaisons porte-greffe/greffon ainsi que sur l'abondance des transcrits du CS selon différentes combinaisons porte-greffe/année d'expérimentation. Les données métabolomiques sont présentées dans un cadre beige ; les données transcriptomiques sont présentées dans un cadre bleu.

CS, Cabernet Sauvignon; PN, Pinot Noir; RGM, Riparia Gloire de Montpellier; 110R, 110 Richter; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate:CoA ligase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; FS, flavone synthase; F3H, flavanone 3 β -hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; LDOX, leucoanthocyanidin dioxygenase; UFGT, UDP glucose:flavonoid-3-O-glucosyltransferase; AOMT, anthocyanin O-methyltransferase; ACT, anthocyanin acyltransferase

VIII. Perspectives

Les perspectives immédiates consistent à finir les analyses des métabolites primaires (plantes en pots), et à terminer l'analyse exhaustive des données RNA seq qui n'ont pas pu être achevées dans le temps imparti.

Nos travaux suggèrent une augmentation du DPM des proanthocyanidines de la pellicule de Cabernet sauvignon sous l'effet de l'azote. En parallèle, les analyses transcriptomiques ont démontré une régulation par l'azote de gènes codant différentes isoformes de laccase, enzymes qui pourraient être impliquées dans le mécanisme de polymérisation des proanthocyanidines. Une étude plus approfondie afin de vérifier si une laccase pourrait effectivement contrôler la polymérisation des tannins en réponse à l'apport d'azote pourrait être menée sur un système modèle simplifié tel que des suspensions cellulaires de vigne. Ce matériel biologique présente la particularité d'accumuler des composés phénoliques en culture liquide. De plus, ce système permet de contrôler facilement la quantité d'azote disponible dans le milieu. Il serait aussi intéressant pour appuyer cette hypothèse d'étudier des lignées transgènes de Vigne, surexprimant les gènes de biosynthèse des laccases ou au contraire délétées pour cette voie de biosynthèse. Il conviendrait aussi d'étudier si les modifications de DPM des tannins sont trouvées sur diverses combinaisons porte-greffe/greffon, et quel est leur potentiel en termes d'impact organoleptique.

De même, nos résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle VvLBD39 joue un rôle important dans les réponses métaboliques observées. La pertinence de la caractérisation fonctionnelle de ce gène chez la vigne est donc renforcée.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes dans la baie par l'azote n'ont pas pu être entièrement élucidés lors de ce travail. Ce dernier devra être complété par des analyses des réponses de la plante à des temps courts après l'apport azoté. En effet, les plantes ont la capacité de s'adapter à leur environnement et les mécanismes moléculaires mis en œuvre ne pourraient être visibles que peu de temps après l'apport azoté.

Un autre aspect de ce travail portait sur les effets de la disponibilité en azote sur le potentiel qualitatif des baies en interaction avec différentes combinaisons porte-greffe/greffon. Une accumulation de métabolites secondaires dont la nature diffère en fonction des différentes combinaisons porte-greffe/greffon a été démontrée. La caractérisation de l'accumulation de métabolites à caractère organoleptique de différentes combinaisons porte-greffe/greffon généralement utilisées par les viticulteurs pourrait être envisagée. Ceci devrait associer la métabolomique non ciblée et les analyses sensorielles.

L'absence de contrainte hydrique pendant nos expériences confirme un effet régulateur de l'azote et corrobore l'hypothèse selon laquelle les effets observés lors d'un stress hydrique seraient liés à un déficit d'absorption et d'assimilation de l'azote. Afin de confirmer cette conclusion par une autre approche, une expérimentation comparant le métabolome de baies issues soit de plantes soumises à un déficit hydrique couplé à une carence azotée soit de plantes soumises à une carence azotée en absence de contrainte hydrique devrait être envisagée.

De plus, nous nous sommes focalisés sur les effets de l'azote sur la baie. Une approche intégrative de l'étude de la réponse à l'azote de la plante entière pourrait être développée avec l'utilisation de marquage isotopique au ^{15}N et analyse de la composition du xylème et du phloème dans les différentes combinaisons porte-greffe/greffon, suivant en cela

l'approche développée par Lecourt (2013). De même, les modifications de croissance des rameaux secondaires sous l'effet de l'azote pourraient être dûs à des modifications hormonales (auxines, strigolactones). L'impact des strigolactones sur la physiologie du greffon est actuellement étudié au laboratoire dans le cadre de la thèse de N. Cochetel avec les porte-greffes 1103P et RGM. Cette approche pourrait être étendue aux porte-greffes 110R et RGM pour renforcer les conclusions obtenues.

REFERENCES

- Ahmad, N., Gupta, S., and Mukhtar, H. (2000). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor κ B in cancer cells versus normal cells. *Arch. Biochem. Biophys.* *376*, 338–346.
- Amrani, J., and Mercier, M. (1994). Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis* *33*, 133–138.
- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* *11*, 106–118.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2014). HTSeq—A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* *btu638*.
- Anders, S., Pyl, P., and Huber, W. (2015). HTSeq - A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* *31*, 166–169.
- Ardi, R., Kobilier, I., Jacoby, B., Keen, N.T., and Prusky, D. (1998). Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *53*, 269–285.
- Balasubrahmanyam, V.R., Eifert, J., and Diofasi, L. (1978). Nutrient reserves in grapevine canes as influenced by cropping levels. *Vitis* *17*, 23–29.
- Barbier, H. (2004a). Recherche de marqueurs associés à la contrainte en azote et en carbone chez la vigne (*Vitis vinifera* var. Cabernet Sauvignon) (Bordeaux 2).
- Barbier, H. (2004b). Recherche de marqueurs associés à la contrainte en azote et en carbone chez la vigne (*Vitis vinifera* var. Cabernet-Sauvignon). Doctoral dissertation, Bordeaux 2.
- Beaudoin, F., Wu, X., Li, F., Haslam, R.P., Markham, J.E., Zheng, H., Napier, J. a, and Kunst, L. (2009). Functional characterization of the Arabidopsis beta-ketoacyl-coenzyme A reductase candidates of the fatty acid elongase. *Plant Physiol.* *150*, 1174–1191.
- Bell, S.J., and Henschke, P.A. (2005a). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* *11*, 242–295.
- Bell, S.-J., and Henschke, P.A. (2005b). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* *11*, 242–295.
- Bell, S.-J., and Robson, A. (1999). Effect of nitrogen fertilization on growth, canopy density, and yield of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* *50*, 351–358.
- Bell, A.A., Ough, C.S., and Kliewer, W.M. (1979). Effects on must and wine composition, rates of fermentation, and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* Var. Thompson seedless grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* *30*, 124–129.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc.* *57*, 289–300.

- Berdeja, M., Hilbert, G., Dai, Z. w., Lafontaine, M., Stoll, M., Schultz, H. r., and Delrot, S. (2014). Effect of water stress and rootstock genotype on Pinot Noir berry composition. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20, 409–421.
- Biagi, M., and Bertelli, A.A.E. (2015). Wine, alcohol and pills: What future for the French paradox? *Life Sci.* 131, 19–22.
- Blee, K.A., Choi, J.W., O’Connell, A.P., Schuch, W., Lewis, N.G., and Bolwell, G.P. (2003). A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. *Phytochemistry* 64, 163–176.
- Bogs, J., Bourbonloux, a., Cagnac, O., Wachter, a., Rausch, T., and Delrot, S. (2003). Functional characterization and expression analysis of a glutathione transporter, BjGT1, from *Brassica juncea*: Evidence for regulation by heavy metal exposure. *Plant Cell Environ.* 26, 1703–1711.
- Bogs, J., Ebadi, A., McDavid, D., and Robinson, S.P. (2006). Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiol.* 140, 279–291.
- Bogs, J., Jaffé, F.W., Takos, A.M., Walker, A.R., and Robinson, S.P. (2007). The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiol.* 143, 1347–1361.
- Bongue-Bartelsman, M., and Phillips, D.A. (1995). Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 539–546.
- Boss, P.K., Davies, C., and Robinson, S.P. (1996). Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* 111, 1059–1066.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 67–87.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56, 317–333.
- Bremner, J.M., and others (1996). Nitrogen-total. *Methods Soil Anal. Part 3*, 1085–1121.
- Cagnac, O., Bourbonloux, A., Chakrabarty, D., Zhang, M.-Y., and Delrot, S. (2004). AtOPT6 transports glutathione derivatives and is induced by primisulfuron. *Plant Physiol.* 135, 1378–1387.
- Cao, J., Huang, J., Yang, Y., and Hu, X. (2011). Analyses of the oligopeptide transporter gene family in poplar and grape. *BMC Genomics* 12, 465.
- Carando, S., and Teissedre, P.-L. (1999). Catechin and procyanidin levels in french wines: contribution to dietary intake. In *Plant Polyphenols 2*, G.G. Gross, R.W. Hemingway, T. Yoshida, and S.J. Branham, eds. (Springer US), pp. 725–737.

Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., and Galán-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* *113*, 859–871.

Castellarin, S.D., Di Gaspero, G., Marconi, R., Nonis, A., Peterlunger, E., Paillard, S., Adam-Blondon, A.-F., and Testolin, R. (2006). Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *Bmc Genomics* *7*, 12.

Castellarin, S.D., Matthews, M.A., Gaspero, G.D., and Gambetta, G.A. (2007a). Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta* *227*, 101–112.

Castellarin, S.D., Pfeiffer, A., Sivilotti, P., Degan, M., Peterlunger, E., and DI GASPERO, G. (2007b). Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell Environ.* *30*, 1381–1399.

Castellarin, S.D., Bavaresco, L., Falginella, L., Goncalves, M.I.V.Z., and Di Gaspero, G. (2012). phenolics in grape berry and key antioxidants (Bentham Science Publishers).

Celette, F. (2007). Dynamique des fonctionnements hydrique et azoté dans une vigne enherbée sous le climat méditerranéen. Thèse Montpellier Supagro.

Chen, F., Ro, D., Petri, J., Gershenzon, J., Pichersky, E., and Tholl, D. (2004). Characterization of a root-specific Arabidopsis terpene synthase responsible for the formation of the volatiles. *Plant Physiol.* *135*, 1956–1966.

Cheynier, V., and Rigaud, J. (1986). HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *Am. J. Enol. Vitic.* *37*, 248–252.

Chira, K. (2009). Structures moléculaire et perception tannique des raisins et des vins (Cabernet-Sauvignon, Merlot) du Bordelais. Bordeaux 2.

Chira, K., Suh, J.-H., Saucier, C., and Teissède, P.-L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* *6*, 75–82.

Choné, X., Tregoat, O., Leeuwen, C. van, and Dubourdieu, D. (2000). Vine water deficit: among the 3 applications of pressure chamber, stem water potential is the most sensitive indicator. *J. Int. Sci. Vigne Vin* *34*, 169–176.

Choné, X., Van Leeuwen, C., Chéry, P., and Ribéreau-Gayon, P. (2001). Terroir influence on water status and nitrogen status of non-irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). Vegetative development, must and wine composition. *Afr. J. Enol. Vitic.* *22*, 8–15.

Choné, X., Lavigne-Cruège, V., Tominaga, T., van Leeuwen, C., Castagnède, C., Saucier, C., and Dubourdieu, D. (2006). 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* *40*, 1–6.

- Cohen, S.A., and Michaud, D.P. (1993). Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* *211*, 279–287.
- Combourieu, B. (2007). Du métabolisme au métabolome: complémentarité des approches par RMN et spectrométrie de masse. *Spectra Anal.* *36*, 20–25.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., and Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1–22.
- Cone, K.C., Burr, F.A., and Burr, B. (1986). Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *83*, 9631–9635.
- Conradie, W.J. (1980). Seasonal uptake of nutrients by Chenin blanc in sand culture: I. Nitrogen. *Afr J Enol Vitic* *1*, 59–65.
- Conradie, W.J. (1986). Utilization of nitrogen by the grape-vine as affected by time of application and soil type. *Afr J Enol Vitic* *7*, 76–84.
- Conradie, W.J. (1992). Partitioning of nitrogen in grapevines during autumn and the utilization of nitrogen reserves during the following growing season. *Afr. J Enol Viticult* *13*, 45–51.
- Conradie, W.J. (2001). 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. *South Afr. J. Enol. Vitic.* *22*, 53–59.
- Coombe, B.G. (1976). The development of fleshy fruits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* *27*, 207–228.
- Coombe, B.G. (1987). Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. *Am. J. Enol. Vitic.* *38*, 120–127.
- Coombe, B.G. (1992). Research on development and ripening of the grape berry. *Am. J. Enol. Vitic.* *43*, 101–110.
- Coombe, B., and Bishop, G. (1980). Development of the grape berry. II. Changes in diameter and deformability during veraison. *Aust. J. Agric. Res.* *31*, 499–509.
- Coombe, B.G., and Matile, P. (1980). Solute accumulation by grape pericarp cells. I. sugar uptake by skin, segments. *Biochem. Physiol. Pflanz.* *175*, 369–381.
- Coombe, B. g., and McCARTHY, M. g. (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Aust. J. Grape Wine Res.* *6*, 131–135.
- Cramer, G.R., Ergül, A., Grimplet, J., Tillett, R.L., Tattersall, E.A.R., Bohlman, M.C., Vincent, D., Sonderegger, J., Evans, J., Osborne, C., et al. (2006). Water and salinity stress in grapevines:

early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct. Integr. Genomics* 7, 111–134.

Crété, P., Caboche, M., and Meye, C. (1997). Nitrite reductase expression regulated at the post-transcriptional level by nitrogen source in *Nicotiana glauca* and *Arabidopsis*. *Plant J.* 11, 625–634.

Czemmel, S., Stracke, R., Weisshaar, B., Cordon, N., Harris, N.N., Walker, A.R., Robinson, S.P., and Bogs, J. (2009). The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYB1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries. *Plant Physiol.* 151, 1513–1530.

Dai, Z.W., Ollat, N., Gomes, E., Decroocq, S., Tandonnet, J.-P., Bordenave, L., Pieri, P., Hilbert, G., Kappel, C., van Leeuwen, C., et al. (2011). Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 62, 413–425.

Dai, Z.W., Meddar, M., Renaud, C., Merlin, I., Hilbert, G., Delrot, S., and Gomès, E. (2014). Long-term in vitro culture of grape berries and its application to assess the effects of sugar supply on anthocyanin accumulation. *J. Exp. Bot.* 65, 4665–4677.

Dao, T.T.H., Linthorst, H.J.M., and Verpoorte, R. (2011). Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem. Rev.* 10, 397–412.

Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J.-N., and Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragr. J.* 10, 385–392.

Davies, C., and Robinson, S.P. (1996). Sugar accumulation in grape berries (cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues). *Plant Physiol.* 111, 275–283.

Davoine, C., Falletti, O., Douki, T., Iacazio, G., Ennar, N., Montillet, J.-L., and Triantaphylidès, C. (2006). Adducts of oxylipin electrophiles to glutathione reflect a 13 specificity of the downstream lipoxygenase pathway in the tobacco hypersensitive response. *Plant Physiol.* 140, 1484–1493.

Delas, J. (2000). La fertilisation de la vigne (Féret Bordeaux,, France).

Delgado, R., Martín, P., delÁlamo, M., and González, M.-R. (2004). Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *J. Sci. Food Agric.* 84, 623–630.

Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T., Carde, J.-P., Mérillon, J.-M., and Hamdi, S. (2006). Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol.* 140, 499–511.

Deluc, L., Bogs, J., Walker, A.R., Ferrier, T., Decendit, A., Merillon, J.-M., Robinson, S.P., and Barrieu, F. (2008). The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of

anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiol.* **147**, 2041–2053.

Deluc, L.G., Quilici, D.R., Decendit, A., Grimplet, J., Wheatley, M.D., Schlauch, K.A., Mérillon, J.-M., Cushman, J.C., and Cramer, G.R. (2009). Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics* **10**, 212.

Destrac, A., Flutre, T., Renaud, C., Morin, E., Durand, L., Delrot, S., and van Leeuwen, C. (2015). 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, pp. 641–645.

Dixon, D.P., and Edwards, R. (2009). Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* **284**, 21249–21256.

Dixon, R.A., Xie, D.-Y., and Sharma, S.B. (2005). Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* **165**, 9–28.

Dokoozlian, N.K., and Kliewer, W.M. (1996). Influence of light on grape berry growth and composition varies during fruit development. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **121**, 869–874.

Downey, M.O., Dokoozlian, N.K., and Krstic, M.P. (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 257–268.

Dry, P. r., and Loveys, B. r. (1998). Factors influencing grapevine vigour and the potential for control with partial rootzone drying. *Aust. J. Grape Wine Res.* **4**, 140–148.

Dufour, C., and Sauvaitre, I. (2000). Interactions between anthocyanins and aroma substances in a model system. Effect on the flavor of grape-derived beverages. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1784–1788.

El Gharras, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**, 2512–2518.

Fäldt, J., Arimura, G., Gershenzon, J., Takabayashi, J., and Bohlmann, J. (2003). Functional identification of AtTPS03 as (E)-beta-ocimene synthase: a monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 745–751.

Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R., and Hubick, K.T. (1989). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 503–537.

Ferrari, G. (2002). Influence of must nitrogen composition on wine and spirit quality and relation with aromatic composition and defects—A review. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **36**, 1–10.

Feussner, I., and Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 275–297.

- Fong, R.A., Kepner, R.E., and Webb, A.D. (1971). Acetic-acid-acylated anthocyanin pigments in the grape skins of a number of varieties of *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.* 22, 150–155.
- Frankel, E., German, J., Kinsella, J., Parks, E., and Kanner, J. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet* 341, 454–457.
- Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., and Stitt, M. (2006). Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* 46, 533–548.
- Fujita, A., Goto-Yamamoto, N., Aramaki, I., and Hashizume, K. (2006). Organ-specific transcription of putative flavonol synthase genes of grapevine and effects of plant hormones and shading on flavonol biosynthesis in grape berry skins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 632–638.
- Gaudillère, J.P. (1997). Gestion de l'azote chez les espèces ligneuses. INRA Ed. Mieux Compr. 295–305.
- Gaudillère, J.-P., Leeuwen, C.V., and Ollat, N. (2002). Carbon isotope composition of sugars in grapevine, an integrated indicator of vineyard water status. *J. Exp. Bot.* 53, 757–763.
- Geny, L., Saucier, C., Bracco, S., Daviaud, F., and Glories, Y. (2003). Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *J. Agric. Food Chem.* 51, 8051–8054.
- Ghasemzadeh, Ali (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plants Res.* 5, 6697–6703.
- Glad, C., Farineau, J., Regnard, J.-L., and Morot-Gaudry, J.-F. (1994). The relative contribution of nitrogen originating from two seasonal supplies to the total nitrogen pool present in the bleeding sap and in whole *Vitis vinifera* cv. Pinot noir grapevines at bloom time. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 327–332.
- Goto-Yamamoto, N., Wan, G.H., Masaki, K., and Kobayashi, S. (2002). Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*). *Plant Sci.* 162, 867–872.
- Guillaumie, S., Ilg, A., Réty, S., Brette, M., Trossat-Magnin, C., Decroocq, S., Léon, C., Keime, C., Ye, T., Baltenweck-Guyot, R., et al. (2013). Genetic analysis of the biosynthesis of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, a major grape-derived aroma compound impacting wine quality. *Plant Physiol.* 162, 604–615.
- Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L., and Cordonnier, R.E. (1985). The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. Muscat during first development and maturation. *J. Sci. Food Agric.* 36, 857–862.
- Harborne, J.B., and Williams, C.A. (2001). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 18, 310–333.

- Hardie, W. j., O'Brien, T. p., and Jaudzems, V. g. (1996). Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape, *Vitis vinifera* L. *Aust. J. Grape Wine Res.* *2*, 97–142.
- Hawker, J.S. (1969). Changes in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries. *Phytochemistry* *8*, 9–17.
- He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M.J., and Duan, C.-Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules* *17*, 1571–1601.
- Hemingway, R.W. (1982). Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-cis-procyanidins. *J. Chem. Soc. Perkin* *1*, 1209–1216.
- Hichri, I., Heppel, S.C., Pillet, J., Léon, C., Czemmel, S., Delrot, S., Lauvergeat, V., and Bogs, J. (2010). The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine. *Mol. Plant* *3*, 509–523.
- Hilbert, G., Soyer, J.P., Molot, C., Giraudon, J., Milin, S., and Gaudillère, J.P. (2003a). Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot. *Vitis-Geilweilerhof* *42*, 69–76.
- Hilbert, G., Soyer, J.P., Molot, C., Giraudon, J., Milin, S., and Gaudillère, J.P. (2003b). Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot. *Vitis* *42*, 69–76.
- Hirai, M.Y., Yano, M., Goodenowe, D.B., Kanaya, S., Kimura, T., Awazuhara, M., Arita, M., Fujiwara, T., and Saito, K. (2004). Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 10205–10210.
- Hugueney, P., Provenzano, S., Verriès, C., Ferrandino, A., Meudec, E., Batelli, G., Merdinoglu, D., Cheynier, V., Schubert, A., and Ageorges, A. (2009). A novel cation-dependent O-methyltransferase Involved in anthocyanin methylation in grapevine. *Plant Physiol.* *150*, 2057–2070.
- Iriti, M., and Faoro, F. (2009). Bioactivity of grape chemicals for human health. *Nat. Prod. Commun.* *4*, 611–634.
- Jeong, S.T., Goto-Yamamoto, N., Hashizume, K., and Esaka, M. (2006). Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Sci.* *170*, 61–69.
- Jia, F., Wan, X., Zhu, W., Sun, D., Zheng, C., Liu, P., and Huang, J. (2015). Overexpression of mitochondrial phosphate transporter 3 severely hampers plant development through regulating mitochondrial function in *Arabidopsis*. *Plos One* *10*, e0129717.

- Jong, M. de, George, G., Ongaro, V., Williamson, L., Willetts, B., Ljung, K., McCulloch, H., and Leyser, O. (2014). Auxin and strigolactone signaling are required for modulation of *Arabidopsis* shoot branching by nitrogen supply. *Plant Physiol.* *166*, 384–395.
- Kanno, Y., Hanada, a., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., and Seo, M. (2012). Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 9653–9658.
- Keller, M. (2010a). *The science of grapevines: anatomy and physiology* (Academic Press).
- Keller, M. (2010b). *The science of grapevines: anatomy and physiology* (Academic Press).
- Keller, M., and Hrazdina, G. (1998). 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.* *49*, 341–349.
- Keller, M., Kummer, M., and Vasconcelos, M.C. (2001a). Reproductive growth of grapevines in response to nitrogen supply and rootstock. *Aust. J. Grape Wine Res.* *7*, 12–18.
- Keller, M., Kummer, M., and Vasconcelos, M.C. (2001b). Reproductive growth of grapevines in response to nitrogen supply and rootstock. *Aust. J. Grape Wine Res.* *7*, 12–18.
- Kennedy, J. (2002). *Understanding grape berry development. Pract. Winery Vineyard 2002.*
- Kennedy, J.A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E.J., and Jones, G.P. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 5348–5355.
- Kennedy, J.A., Saucier, C., and Glories, Y. (2006). Grape and wine Phenolics: history and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.* *57*, 239–248.
- Kiba, T., Feria-Bourrellier, A.-B., Lafouge, F., Lezhneva, L., Boutet-Mercey, S., Orsel, M., Bréhaut, V., Miller, A., Daniel-Vedele, F., Sakakibara, H., et al. (2012). The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell* *24*, 245–258.
- Kim, D., Perteza, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* *14*, R36.
- Kim, H.K., Choi, Y.H., and Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat. Protoc.* *5*, 536–549.
- Kim, H.K., Choi, Y.H., and Verpoorte, R. (2011). NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends Biotechnol.* *29*, 267–275.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., and Takabayashi, J. (2005). Volatile C6-aldehydes and allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* *46*, 1093–1102.

- Klepek, Y.-S., Geiger, D., Stadler, R., Klebl, F., Landouar-Arsivaud, L., Lemoine, R., Hedrich, R., and Sauer, N. (2005). Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺-Symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *Plant Cell* *17*, 204–218.
- Kliebenstein, D.J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant Cell Environ.* *27*, 675–684.
- Kliewer, W.M. (1965). Changes in concentration of glucose, fructose, and total soluble solids in flowers and berries of *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.* *16*, 101–110.
- Kliewer, W.M. (1991). Methods for determining the nitrogen status of vineyards. In *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, (American Society for Enology and Viticulture, ASEV), pp. 133–147.
- Kliewer, W.M., Howarth, L., and Omori, M. (1967). Concentrations of tartaric acid and malic acids and their salts in *Vitis vinifera* grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* *18*, 42–54.
- Kobayashi, H., Takase, H., Kaneko, K., Tanzawa, F., Takata, R., Suzuki, S., and Konno, T. (2010). 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.* *2*, 176–185.
- Koh, S., Wiles, A.M., Sharp, J.S., Naider, F.R., Becker, J.M., and Stacey, G. (2002). An oligopeptide transporter gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *128*, 21–29.
- Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., and Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* *64*, 923–933.
- Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., and Brouillard, R. (2008). Corrigendum to “Analysis and biological activities of anthocyanins.” *Phytochemistry* *69*, 1939–1940.
- Koundouras, S., Marinos, V., Gkoulioti, A., Kotseridis, Y., and van Leeuwen, C. (2006a). Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 5077–5086.
- Koundouras, S., Marinos, V., Gkoulioti, A., Kotseridis, Y., and van Leeuwen, C. (2006b). Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated Cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 5077–5086.
- Krapp, A., Berthome, R., Orsel, M., Mercey-Boutet, S., Yu, A., Castaings, L., Elftieh, S., Major, H., Renou, J.-P., and Daniel-Vedele, F. (2011). Arabidopsis roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant Physiol.* *157*, 1255–1282.
- Krapp, A., David, L.C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A.-S., Chaillou, S., Ferrario-Mery, S., Meyer, C., and Daniel-Vedele, F. (2014a). Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* *65*, 789–798.

- Krapp, A., David, L.C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A.-S., Chaillou, S., Ferrario-Mery, S., Meyer, C., and Daniel-Vedele, F. (2014b). Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* *65*, 789–798.
- Krouk, G., Crawford, N.M., Coruzzi, G.M., and Tsay, Y.-F. (2010a). Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Curr. Opin. Plant Biol.* *13*, 265–272.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., et al. (2010b). Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev. Cell* *18*, 927–937.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., et al. (2010c). Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev. Cell* *18*, 927–937.
- Kuhn, B.M., Geisler, M., Bigler, L., and Ringli, C. (2011). Flavonols accumulate asymmetrically and affect auxin transport in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *156*, 585–595.
- Kuhn, N., Guan, L., Dai, Z.W., Wu, B.-H., Lauvergeat, V., Gomes, E., Li, S.-H., Godoy, F., Arce-Johnson, P., and Delrot, S. (2013). Berry ripening: recently heard through the grapevine. *J. Exp. Bot.* *65*, 1–17.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., and Nambara, E. (2004). The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J.* *23*, 1647–1656.
- Lacombe, E., Hawkins, S., Van Doorselaere, J., Piquemal, J., Goffner, D., Poeydomenge, O., Boudet, a M., and Grima-Pettenati, J. (1997). Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *11*, 429–441.
- Lacroux, F., Tregoat, O., van Leeuwen, C., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne-Cruège, V., and Dubourdieu, D. (2008). Effect of foliar nitrogen and sulphur application on aromatic expression of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *J. Int. Sci. Vigne Vin* *42*, 125–132.
- Lancien, M., Martin, M., Hsieh, M.H., Leustek, T., Goodman, H., and Coruzzi, G.M. (2002). Arabidopsis *glt1-T* mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *Plant J.* *29*, 347–358.
- Landrault, N., Larronde, F., Delaunay, J.-C., Castagnino, C., Vercauteren, J., Merillon, J.-M., Gasc, F., Cros, G., and Teissedre, P.-L. (2002). Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *J. Agric. Food Chem.* *50*, 2046–2052.
- Langcake, P. (1981). Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.* *18*, 213–226.

- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359.
- Lavee, S., and May, P. (1997). Dormancy of grapevine buds - facts and speculation. *Aust. J. Grape Wine Res.* 3, 31–46.
- Lea, U.S., Slimestad, R., Smedvig, P., and Lillo, C. (2006). Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta* 225, 1245–1253.
- Lebon, E., Pellegrino, A., Louarn, G., and Lecoœur, J. (2006). Branch development controls leaf area dynamics in grapevine (*Vitis vinifera*) growing in drying soil. *Ann. Bot.* 98, 175–185.
- Lecourt, J. (2013). Rôle de la nutrition azotée dans le contrôle de l'allocation de la biomasse d'une vigne greffée: validation par marquage isotopique et modélisation. Bordeaux 2.
- Lee, H.W., Kim, M.-J., Kim, N.Y., Lee, S.H., and Kim, J. (2013). LBD18 acts as a transcriptional activator that directly binds to the EXPANSIN14 promoter in promoting lateral root emergence of Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 73, 212–224.
- van Leeuwen, C.K., and Friant, P. (2011). les méthodes d'estimation de l'alimentation azotée de la vigne et des raisins au vignoble.
- van Leeuwen, C., Friant, P., Soyer, J.P., Molot, C., Chone, X., and Dubourdieu, D. (2000). L'intérêt du dosage de l'azote total et de l'azote assimilable dans le mûot comme indicateur de la nutrition azotée de la vigne. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 34, 75–82.
- Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R.G., and Last, R.L. (1993). Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell Online* 5, 171–179.
- Liang, M., Davis, E., Gardner, D., Cai, X., and Wu, Y. (2006). Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of Arabidopsis. *Planta* 224, 1185–1196.
- Lillo, C., Lea, U.S., and Ruoff, P. (2008a). Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environ.* 31, 587–601.
- Lillo, C., Lea, U.S., and Ruoff, P. (2008b). Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environ.* 31, 587–601.
- Liu, H.-F., Wu, B.-H., Fan, P.-G., Li, S.-H., and Li, L.-S. (2006). Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by principal component analysis. *J. Sci. Food Agric.* 86, 1526–1536.
- Liu, L.-H., Ludewig, U., Gassert, B., Frommer, W.B., and von Wirén, N. (2003). Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 133, 1220–1228.

- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014a). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* *15*, 550–571.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014b). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2. *Genome Biol* *15*, 550.
- Ludwig, S.R., Habera, L.F., Dellaporta, S.L., and Wessler, S.R. (1989). Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *86*, 7092–7096.
- Mabrouk, H., Carbonneau, A., and Sinoquet, H. (1997). Canopy structure and radiation regime in grapevine. I. Spatial and angular distribution of leaf area in two canopy systems. *Vitis_Geilweilerhof* *36*, 119–124.
- Maigre, D. (2002). Comportement du Pinot noir en présence d'enherbement permanent et influence de la fumure azotée. 1. Résultats agronomiques. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* *34*, 187–192.
- Maigre, D., and Murisier, F. (1992). Comparaison de techniques d'entretien des sols viticoles dans trois sites pedoclimatiques différents de Suisse romande. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*
- Marschner, P. (2012). *Marschner's mineral nutrition of higher plants* (Academic Press).
- Martínez-Lüscher, J., Torres, N., Hilbert, G., Richard, T., Sánchez-Díaz, M., Delrot, S., Aguirreolea, J., Pascual, I., and Gomès, E. (2014). Ultraviolet-B radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries. *Phytochemistry* *102*, 106–114.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., and Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* *105*, 1141–1157.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., and Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 7692–7702.
- Mattivi, F., Vrhovsek, U., Masuero, D., and Trainotti, D. (2009). Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Aust. J. Grape Wine Res.* *15*, 27–35.
- Matus, J.T., Loyola, R., Vega, A., Peña-Neira, A., Bordeu, E., Arce-Johnson, P., and Alcalde, J.A. (2009). Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *J. Exp. Bot.* *60*, 853–867.
- Matus, J.T., Poupin, M.J., Cañón, P., Bordeu, E., Alcalde, J.A., and Arce-Johnson, P. (2010). Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.* *72*, 607–620.

- May, A., Berger, S., Hertel, T., and Köck, M. (2011). The *Arabidopsis thaliana* phosphate starvation responsive gene AtPPsPase1 encodes a novel type of inorganic pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* *1810*, 178–185.
- Metay, A., Magnier, J., Guilpart, N., and Christophe, A. (2014). Nitrogen supply controls vegetative growth, biomass and nitrogen allocation for grapevine (cv. Shiraz) grown in pots. *Funct. Plant Biol.* *42*, 105–114.
- Miller, A.J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S.J., and Wells, D.M. (2007). Nitrate transport and signalling. *J. Exp. Bot.* *58*, 2297–2306.
- Mirabel, M. (2000). Caractéristiques chimiques et organoleptiques des tanins des raisins de I var. Merlot et Cabernet Sauvignon issus de différents terroirs bordelais. Thèse, Université de Bordeaux 2.
- Mori, K., Sugaya, S., and Gemma, H. (2005). Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci. Hortic.* *105*, 319–330.
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., and Hashizume, K. (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J. Exp. Bot.* *58*, 1935–1945.
- Mori, K., Sato, H., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., Kobayashi, S., Sugaya, S., Gemma, H., and Hashizume, K. (2015). Effects of abscisic acid treatment and night temperatures on anthocyanin composition in Pinot noir grapes. *VITIS - J. Grapevine Res.* *44*, 161–165.
- Morlat, R., VENIN, G., and Jacquet, A. (1987). Influence du mode d'entretien du sol sur l'alimentation en eau de la vigne en Anjou. Conséquences agronomiques. *Agronomie* *7*, 183–191.
- Mosawy, S., Jackson, D.E., Woodman, O.L., and Linden, M.D. (2014). The flavonols quercetin and 3',4'-dihydroxyflavonol reduce platelet function and delay thrombus formation in a model of type 1 diabetes. *Diab. Vasc. Dis. Res.* *11*, 174–181.
- Mueller, M.J. (2004). Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr. Opin. Plant Biol.* *7*, 441–448.
- Nguyen, P.M., and Niemeyer, E.D. (2008). Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agric. Food Chem.* *56*, 8685–8691.
- Nicol, J.M., Stirling, G.R., Rose, B.J., May, P., and Heeswijck, R. van (1999). Impact of nematodes on grapevine growth and productivity: current knowledge and future directions, with special reference to Australian viticulture. *Aust. J. Grape Wine Res.* *5*, 109–127.
- Noctor, G., Mhamdi, A., and Foyer, C.H. (2014). The Roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiol.* *164*, 1636–1648.
- Ojeda, H., Deloire, A., Carbonneau, A., Ageorges, A., and Romieu, C. (1999). Berry development of grapevines : Relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. *Vitis* *38*, 145–150.

- Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., and Deloire, A. (2002). Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 261–267.
- Okamoto, M., Vidmar, J.J., and Glass, A.D.M. (2003). Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiol.* 44, 304–317.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., and Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 Regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 118–130.
- Ollat, N., and Lafontaine, M. (2001). Short and long term effects of three rootstocks on Cabernet Sauvignon vine behaviour and wine quality. In *Workshop on Rootstocks' Performance in Phylloxera Infested Vineyards* 617, pp. 95–99.
- Ollat, N., Diakou-Verdin, P., Carde, J.P., Barrieu, F., Gaudillere, J.P., and Moing, A. (2002). Grape berry development: a review. *J. Int. Sci. Vigne Vin Fr.* 36, 109–131.
- Orsel, M., Krapp, A., and Daniel-Vedele, F. (2002). Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol.* 129, 886–896.
- Owens, D.K., Alerding, A.B., Crosby, K.C., Bandara, A.B., Westwood, J.H., and Winkel, B.S.J. (2008). Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147, 1046–1061.
- Pascual-Teresa, S., and Sanchez-Ballesta, M.T. (2008). Anthocyanins: from plant to health. *Phytochem. Rev.* 7, 281–299.
- Peng, M., Bi, Y.-M., Zhu, T., and Rothstein, S.J. (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis* responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene NLA. *Plant Mol. Biol.* 65, 775–797.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., and Dubourdieu, D. (2002). 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.* 50, 4076–4079.
- Peyrot des Gachons, C., van Leeuwen, C., Tominaga, T., Soyer, J.-P., Gaudillère, J.-P., and Dubourdieu, D. (2005). 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.* 85, 73–85.
- Pike, S., Patel, A., Stacey, G., and Gassmann, W. (2009). *Arabidopsis* OPT6 is an oligopeptide transporter with exceptionally broad substrate specificity. *Plant Cell Physiol.* 50, 1923–1932.
- Pillet, J. (2011). Impact du microclimat sur le métabolisme de la baie de raisin. Thèse, Université de Bordeaux 2.

- Pillet, J., Egert, A., Pieri, P., Lecourieux, F., Kappel, C., Charon, J., Gomès, E., Keller, F., Delrot, S., and Lecourieux, D. (2012). VvGOLS1 and VvHsfA2 are Involved in the heat stress responses in grapevine berries. *Plant Cell Physiol.* *53*, 1776–1792.
- Piotrowski, M., Schönfelder, S., and Weiler, E.W. (2001). The *Arabidopsis thaliana* isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode β -cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *J. Biol. Chem.* *276*, 2616–2621.
- Pouget, R. (1988). The vine varieties of French AOC vineyards: history and possibilities of development. *Bull. OIV Fr.*
- Pourcel, L. (2005). TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in Arabidopsis seed coat. *Plant Cell* *17*, 2966–2980.
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., and Debeaujon, I. (2005). TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in Arabidopsis seed coat. *Plant Cell* *17*, 2966–2980.
- Preuß, A., Stracke, R., Weisshaar, B., Hillebrecht, A., Matern, U., and Martens, S. (2009). Arabidopsis thaliana expresses a second functional flavonol synthase. *FEBS Lett.* *583*, 1981–1986.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., and Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* *36*, 781–784.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., and Pouysegu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* *50*, 586–621.
- Raes, J. (2003). Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *133*, 1051–1071.
- Rawal, H.C., Singh, N.K., and Sharma, T.R. (2013). Conservation, divergence, and genome-wide distribution of PAL and POX A gene families in plants. *Int. J. Genomics* *2013*.
- Redestig, H., and Costa, I.G. (2011). Detection and interpretation of metabolite–transcript coresponses using combined profiling data. *Bioinformatics* *27*, i357–i365.
- Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., and Lund, S.T. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* *6*, 27.
- Reinders, A., Panshyshyn, J. a., and Ward, J.M. (2005). Analysis of transport activity of Arabidopsis sugar alcohol permease homolog AtPLT5. *J. Biol. Chem.* *280*, 1594–1602.
- Reisch, B.I., Owens, C.L., and Cousins, P.S. (2012). Grape. In *Fruit Breeding*, M.L. Badenes, and D.H. Byrne, eds. (Springer US), pp. 225–262.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., Tillard, P., Forde, B.G., and Gojon, A. (2006). The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling

pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 19206–19211.

Reynier, A. (1989). *Manuel de viticulture* (11e ed.) (Lavoisier).

Ribéreau-Gayon, J., and Peynaud, E. (1960). *Traité d'oenologie*.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., and Lonvaud, A. (2012). *Traité d'oenologie - Tome 1 - 6e éd. - Microbiologie du vin. Vinifications* (Dunod).

Rodriguez-Lovelle, B., Soyer, J., and Molot, C. (1997). Nitrogen availability in vineyard soils according to soil management practices. Effects on vine. In *V International Symposium on Grapevine Physiology* 526, pp. 277–286.

Rotter, A., Camps, C., Lohse, M., Kappel, C., Pilati, S., Hren, M., Stitt, M., Coutos-Thévenot, P., Moser, C., Usadel, B., et al. (2009). Gene expression profiling in susceptible interaction of grapevine with its fungal pathogen *Eutypa lata*: extending MapMan ontology for grapevine. *BMC Plant Biol.* *9*, 104.

Roujou de Boubée, D., Van Leeuwen, C., and Dubourdieu, D. (2000). 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.* *48*, 4830–4834.

Roux, A. (2011). *Analyse du métabolome urinaire humain par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution*. Paris 6.

Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K., and Scheible, W.-R. (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *21*, 3567–3584.

Ruhl, E., Fuda, A., and Treeby, M. (1992). Effect of potassium, magnesium and nitrogen supply on grape juice composition of Riesling, Chardonnay and Cabernet Sauvignon vines. *Aust. J. Exp. Agric.* *32*, 645–649.

Scheible, W.-R. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *PlantPhysiol.* *136*, 2483–2499.

Scheible, W., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K., Stitt, M., et al. (2004). 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.* *136*, 2483–2499.

Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* *3*, 1101–1108.

Schreiner, R.P., Lee, J., and Skinkis, P.A. (2013a). N, P, and K Supply to Pinot noir Grapevines: impact on vine nutrient status, growth, physiology, and yield. *Am. J. Enol. Vitic.* *64*, 26–38.

- Schreiner, R.P., Scagel, C.F., and Lee, J. (2013b). N, P, and K supply to Pinot noir grapevines: impact on berry phenolics and free amino acids. *Am. J. Enol. Vitic. ajev*.2013.13037.
- Seger, C., , and Sturm, S. (2007). Analytical aspects of plant metabolite profiling platforms: current standings and future aims. *J. Proteome Res.* 6, 480–497.
- Serra, I., Strever, A., Myburgh, P. a., and Deloire, A. (2014). Review: the interaction between rootstocks and cultivars (*Vitis vinifera* L.) to enhance drought tolerance in grapevine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20, 1–14.
- Shiraishi, M., Fujishima, H., and Chijiwa, H. (2010). Evaluation of table grape genetic resources for sugar, organic acid, and amino acid composition of berries. *Euphytica* 174, 1–13.
- Singleton, V.L., Timberlake, C.F., and Lea, A.G.H. (1978). The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *J. Sci. Food Agric.* 29, 403–410.
- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A., and Perata, P. (2006). Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140, 637–646.
- Soubeyrand, E. (2013). Etude de la régulation par l'azote de la biosynthèse des anthocyanes dans les cellules de vigne, par une approche intégrative. Thèse, Université de Bordeaux 2.
- Soubeyrand, E., Basteau, C., Hilbert, G., van Leeuwen, C., Delrot, S., and Gomès, E. (2014). Nitrogen supply affects anthocyanin biosynthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet Sauvignon berries. *Phytochemistry* 103, 38–49.
- Souquet, J.-M., Cheynier, V., Brossaud, F., and Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* 43, 509–512.
- Soyer, J.P., Gaudillère, J.-P., Chantelot, E., Milin, S., and Molot, C. (2003). L'azote des feuilles et des moûts, deux indicateurs complémentaires pour évaluer le statut azoté de la vigne. *J. Int. Sci. Vigne Vin Int. J. Vine Wine Sci.* 37, 91–101.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., and Tonelli, C. (1994). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.* 24, 743–755.
- Spayd, S.E., Wample, R.L., Evans, R.G., Stevens, R.G., Seymour, B.J., and Nagel, C.W. (1994a). Nitrogen fertilization of white Riesling grapes in Washington. Must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 34–42.
- Spayd, S.E., Tarara, J.M., Mee, D.L., and Ferguson, J.C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 171–182.
- Stacey, M.G., Patel, A., McClain, W.E., Mathieu, M., Remley, M., Rogers, E.E., Gassmann, W., Blevins, D.G., and Stacey, G. (2008). The *Arabidopsis* AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. *Plant Physiol.* 146, 589–601.

- Stevens, R.M., Pech, J.M., Gibberd, M.R., Walker, R.R., Jones, J.A., Taylor, J., and Nicholas, P.R. (2008). Effect of reduced irrigation on growth, yield, ripening rates and water relations of Chardonnay vines grafted to five rootstocks. *Aust. J. Grape Wine Res.* *14*, 177–190.
- Stevens, R.M., Pech, J.M., Gibberd, M.R., Walker, R.R., and Nicholas, P.R. (2010). Reduced irrigation and rootstock effects on vegetative growth, yield and its components, and leaf physiological responses of Shiraz. *Aust. J. Grape Wine Res.* *16*, 413–425.
- Stewart, A.J., Chapman, W., Jenkins, G.I., Graham, I., Martin, T., and Crozier, A. (2001). The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environ.* *24*, 1189–1197.
- Stracke, R., De Vos, R.C.H., BartelNiewoehner, L., Ishihara, H., Sagasser, M., Martens, S., and Weisshaar, B. (2009). Metabolomic and genetic analyses of flavonol synthesis in *Arabidopsis thaliana* support the in vivo involvement of leucoanthocyanidin dioxygenase. *Planta* *229*, 427–445.
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J.-M., and Degryse, E. (2008). 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.* *56*, 9230–9235.
- Sun, A.Y., Simonyi, A., and Sun, G.Y. (2002). The “French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols.. *Free Radic. Biol. Med.* *32*, 314–318.
- Sun, B., Ribes, A.M., Leandro, M.C., Belchior, A.P., and Spranger, M.I. (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal. Chim. Acta* *563*, 382–390.
- Sweetman, C., Sadras, V.O., Hancock, R.D., Soole, K.L., and Ford, C.M. (2014). Metabolic effects of elevated temperature on organic acid degradation in ripening *Vitis vinifera* fruit. *J. Exp. Bot.* *65*, 5975–5988.
- Tandonnet, J.-P., Cookson, S. j., Vivin, P., and Ollat, N. (2010). Scion genotype controls biomass allocation and root development in grafted grapevine. *Aust. J. Grape Wine Res.* *16*, 290–300.
- Tarara, J.M., Lee, J., Spayd, S.E., and Scagel, C.F. (2008). Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot Grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* *59*, 235–247.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S., and Gerós, H. (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 18711–18739.
- Terrier, N., Glissant, D., Grimplet, J., Barrieu, F., Abbal, P., Couture, C., Ageorges, A., Atanassova, R., Léon, C., Renaudin, J.-P., et al. (2005). Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* *222*, 832–847.

- Thibon, C., Cluzet, S., Mérillon, J.M., Darriet, P., and Dubourdieu, D. (2011). 3-Sulfanylhexanol precursor biogenesis in grapevine cells: the stimulating effect of *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* *59*, 1344–1351.
- Thiebeau, P., Herré, C., Doledec, A.-F., Perraud, A., Panigai, L., Mary, B., and Nicolardot, B. (2005). Incidence du mode de couverture du sol sur la fourniture en azote des sols de vigne en Champagne. *J. Int. Sci. Vigne Vin* *39*, 163–178.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y., and Stitt, M. (2004a). mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* *37*, 914–939.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. a., Rhee, S.Y., and Stitt, M. (2004b). MAPMAN: A user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* *37*, 914–939.
- Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J., and Pichersky, E. (2005). Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant J.* *42*, 757–771.
- Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y., Yano, M., Nakajima, J., Awazuhara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D.B., Kitayama, M., et al. (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor: metabolomics and transcriptomics. *Plant J.* *42*, 218–235.
- Tominaga, T., Darriet, P., and Dubourdieu, D. (1996). Identification de l'acetate de 3-mercaptohexanol, composé à forte odeur de buis, intervebant dans l'arôme des vins de Sauvignon. *Vitis* *35*, 207–210.
- Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., and Dubourdieu, D. (1998). A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc: S-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* *46*, 5215–5219.
- Tommasini, R., Vogt, E., Fromenteau, M., Hörtensteiner, S., Matile, P., Amrhein, N., and Martinoia, E. (1998). An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J.* *13*, 773–780.
- Trapet, P., Kulik, A., Lamotte, O., Jeandroz, S., Bourque, S., Nicolas-Francès, V., Rosnoblet, C., Besson-Bard, A., and Wendehenne, D. (2015). NO signaling in plant immunity: A tale of messengers. *Phytochemistry* *112*, 72–79.
- Van Leeuwen, C., Friant, P., Soyer, J.P., Molot, C., Choné, X., and Dubourdieu, D. (2000). L'intérêt du dosage de l'azote total et de l'azote assimilable dans le moût comme indicateur de la nutrition azotée de la vigne. *J Int Sci Vigne Vin* *34*, 75–82.
- Van Leeuwen, C., Gaudillere, J.P., and Tregoat, O. (2001). L'évaluation du régime hydrique de la Vigne à partir du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$. *J Int Sci Vigne Vin* *35*, 195–205.

- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., FitzGerald, L.M., Vezzulli, S., Reid, J., et al. (2007). A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* 2, e1326.
- Vicente, M.R.-S., and Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 62, 3321–3338.
- Von Wirén, N., Lauter, F.-R., Ninnemann, O., Gillissen, B., Walch-Liu, P., Engels, C., Jost, W., and Frommer, W.B. (2000). Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant J.* 21, 167–175.
- Walker, A.R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D.A., Thomas, M.R., and Robinson, S.P. (2007). White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant J.* 49, 772–785.
- Waterhouse, A.L., and Lamuela-Raventós, R.M. (1994). The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry* 37, 571–573.
- Waters, D.L.E., Holton, T.A., Ablett, E.M., Lee, L.S., and Henry, R.J. (2005). cDNA microarray analysis of developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) berry skin. *Funct. Integr. Genomics* 5, 40–58.
- Wermelinger, B., Baumgärtner, J., and Gutierrez, A.P. (1991). A demographic model of assimilation and allocation of carbon and nitrogen in grapevines. *Ecol. Model.* 53, 1–26.
- Whiting, J. (2010). Rootstock breeding and associated R&D in the viticulture and wine industry.
- Wintz, H., Fox, T., Wu, Y.Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H.S., Zhu, T., and Vulpe, C. (2003). Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278, 47644–47653.
- Wisman, E., Hartmann, U., Sagasser, M., Baumann, E., Palme, K., Hahlbrock, K., Saedler, H., and Weisshaar, B. (1998). Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12432–12437.
- Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., Zheng, Z., Dai, X., Cheng, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y., Chory, J., and Zhao, Y. (2011). Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 18518–18523.
- Yazaki, K., Sugiyama, A., Morita, M., and Shitan, N. (2008). Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* 7, 513–524.

- Yin, Y., Borges, G., Sakuta, M., Crozier, A., and Ashihara, H. (2012). Effect of phosphate deficiency on the content and biosynthesis of anthocyanins and the expression of related genes in suspension-cultured grape (*Vitis* sp.) cells. *Plant Physiol. Biochem.* *55*, 77–84.
- Zapata, C., Deléens, E., Chaillou, S., and Magné, C. (2004). Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J. Plant Physiol.* *161*, 1031–1040.
- Zhang, H., and Forde, B.G. (1998). An *Arabidopsis* MADS Box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* *279*, 407–409.
- Zhang, H., and Forde, B.G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* *51*, 51–59.
- Zhang, M.-Y., Bourbouloux, A., Cagnac, O., Srikanth, C. V, Rentsch, D., Bachhawat, A.K., and Delrot, S. (2004). A novel family of transporters mediating the transport of glutathione derivatives in plants. *Plant Physiol.* *134*, 482–491.
- Zheng, Y., Tian, L., Liu, H., Pan, Q., Zhan, J., and Huang, W. (2009). Sugars induce anthocyanin accumulation and flavanone 3-hydroxylase expression in grape berries. *Plant Growth Regul.* *58*, 251–260.
- Zhou, H.-C., Tam, N.F., Lin, Y.-M., Ding, Z.-H., Chai, W.-M., and Wei, S.-D. (2014). Relationships between degree of polymerization and antioxidant activities: A study on proanthocyanidins from the leaves of a medicinal mangrove plant *Ceriops tagal*.
- Zhou, L.-L., Shi, M.-Z., and Xie, D.-Y. (2012). Regulation of anthocyanin biosynthesis by nitrogen in TTG1–GL3/TT8–PAP1-programmed red cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* *236*, 825–837.
- Zhu, W., Miao, Q., Sun, D., Yang, G., Wu, C., Huang, J., and Zheng, C. (2012). The mitochondrial phosphate transporters modulate plant responses to salt stress via affecting ATP and gibberellin metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* *7*, 1–10.