



Mieux Contrôler les Fluctuations de Rendement grâce à une Meilleure Compréhension des Mécanismes d'Initiation et de Différenciation des Primordia Inflorescentiels du Bourgeon Latent de Vigne

Anna Li

► To cite this version:

Anna Li. Mieux Contrôler les Fluctuations de Rendement grâce à une Meilleure Compréhension des Mécanismes d'Initiation et de Différenciation des Primordia Inflorescentiels du Bourgeon Latent de Vigne. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0890 . tel-01865825

HAL Id: tel-01865825

<https://theses.hal.science/tel-01865825>

Submitted on 2 Sep 2018

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 DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ ŒNOLOGIE

Par Anna LI-MALLET

Mieux Contrôler les Fluctuations de Rendement grâce à une Meilleure
Compréhension des Mécanismes d'Initiation et de Différenciation des
Primordia Inflorescentiels du Bourgeon Latent de Vigne

Thèse dirigée par Mme. Laurence GENY-DENIS

Soutenue publiquement le 19 décembre 2017

Membres du Jury

M. DELOIRE, Alain
Mme. VAILLANT-GAVEAU, Nathalie
Mme. LEDUC, Nathalie
Mme. METAY, Aurélie
M. RAYNAL, Marc
M. CHARLIER, Laurent
Mme. GENY-DENIS, Laurence

Professeur Sup Agro Montpellier
MC Université de Reims
MC Université d'Angers
MC Sup Agro Montpellier
Ingénieur IFV
CIVB
Professeur Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Membre invité
Directeur de thèse

Mieux contrôler les fluctuations de rendement grâce à une meilleure compréhension des mécanismes d'initiation et de différenciation des primordia inflorescentiels du bourgeon latent de vigne

Résumé : Le déterminisme de la formation de la grappe reste parmi les phénomènes les moins bien précisés de la physiologie de la Vigne. La question a été abordée de plusieurs façons mais les éléments de réponse obtenus ne permettent pas encore de se faire une idée synthétique des mécanismes fondamentaux qui produisent l'apparition des primordia inflorescentiels (PI) en année N-1 et qui pourraient régir jusqu'à 65 à 70% du rendement final en année N. Notre étude s'est donc focalisée sur (i) la caractérisation du processus de formation des PI dans les bourgeons latents de vigne (*Vitis vinifera* L. Merlot) et la redéfinition de la constitution du rendement, (ii) la compréhension des mécanismes d'initiation et de différenciation des PI et (iii) l'évaluation des impacts de différents facteurs (ABA exogène, lumière et effeuillage) sur ces mécanismes.

Cette étude intégrale combinant des approches multi-échelles et multi-disciplinaires a permis dans un premier temps de mettre en évidence le déterminisme de la phase d'induction inflorescentielle dans la construction du rendement en identifiant trois phases clés du processus de formation des PI et en y intégrant une nouvelle notion qu'est le « degré de ramification des PI » ; puis dans un second temps, de proposer certains modes de régulation des mécanismes d'initiation et de différenciation des PI en identifiant trois types de marqueurs précoces de la fertilité potentielle : des marqueurs moléculaires (*VvCLE25-1*, *VvTFL1a* et *VvMFT1*), biochimiques (équilibre CKs/AIA, D-glucose et amidon), et environnementaux (ensoleillement et température journaliers cumulés).

L'ensemble des résultats pourra contribuer au développement d'un outil prédictif précoce de la « fertilité potentielle » (et donc du rendement probable maximum) afin de mieux guider et gérer la taille et les pratiques culturales.

Mots clés : Vigne, Bourgeon latent, Primordia inflorescentiels, Initiation et différenciation, Rendement.

Unité de Recherche

Univ Bordeaux, ISVV, EA 4577 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon,
France INRA, ISVV, USC 1366 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France

Better control yield fluctuations by understanding the initiation and differentiation mechanisms of inflorescence primordia in grapevine latent buds

Abstract: The grape cluster formation determinism remains the one of the undefined phenomena in grapevine physiology process. The topic has been tackled in multiple ways. However, based on all the known information, we still are not allowed to get a synthetic idea of the fundamental mechanisms that produce the appearance of inflorescential primordia in year N-1 and which could govern up to 65 to 70 % of final yield in year N. Our study focuses thus on (i) the characterization of IP formation process in grapevine latent buds (*Vitis vinifera* L. Merlot) and the redefinition of yield constitution, (ii) understanding IP initiation and differentiation mechanisms, and (iii) evaluating the impacts of different factors (exogenous ABA, light and leaf removal) on these mechanisms.

This comprehensive study, which combines multi-scale and multi-disciplinary approaches, firstly allowed us to highlight the determinism of inflorescence induction phase in yield construction by identifying three key phases in IP formation process and by incorporating a new notion which is "IP branching degree". Secondly, it proposed certain modes of regulation of IP initiation and differentiation mechanisms by identifying three types of early markers of bud fruitfulness: molecular markers (*VvCLE25-1*, *VvTFL1a* and *VvMFT1*), biochemical markers (CKs/IAA balance, D-glucose and starch), and environmental markers (cumulative daily sunshine and temperature).

The all-inclusive results contribute to the development of an early predictive tool of "bud fruitfulness" (and thereby the probable maximum yield) to better guide and manage the grapevine training and other cultural practices.

Keywords: grapevine, latent bud, inflorescence primordia, initiation and differentiation, yield

Unité de Recherche

Univ Bordeaux, ISVV, EA 4577 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France
INRA, ISVV, USC 1366 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France

A Lingling et à Jean

pour leur présence

pour leur soutien

avec toute mon affection et reconnaissance

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe de « Biochimie et Physiologie du Raisin » de l'Unité de Recherche Œnologie de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, sous la direction de Madame Laurence Geny-Denis, professeur à l'Université de Bordeaux. Je tiens tout d'abord à la remercier profondément de m'avoir accueillie dans son équipe, m'avoir confié ce sujet de thèse et m'avoir soutenue tout au long de ce travail. Sa dynamique, sa confiance, sa disponibilité, ses compétences, ses encouragements et son aide ont été déterminants dans la réalisation de cette étude. Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère et profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du jury pour leur collaboration à l'examen de ce travail et leur participation à la soutenance.

Je remercie profondément Madame Nathalie Vaillant-Gaveau et Monsieur Alain Deloire qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je suis très honorée de leur présence dans ce jury ; qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je tiens également à remercier Madame Nathalie Leduc, Madame Aurélie Metay et Monsieur Marc Raynal pour l'intérêt qu'ils ont manifesté pour ce travail en acceptant de faire partie de ce jury.

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier du CIVB (Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux). J'adresse mes remerciements à Monsieur Laurent Charlier qui a suivi tous les ans attentivement l'avancement de cette étude et qui a accepté d'être présent dans ce jury.

Je remercie aussi le château Ferran et notamment le chef de viticulture Monsieur Pierre-Hubert Gory qui nous a précieusement confié une parcelle permettant la réalisation de toutes les expérimentations de ce travail. Je le remercie aussi pour sa disponibilité et ses explications pratiques et techniques.

Mes remerciements s'adressent aussi à toute l'équipe du BIC (Bordeaux Imaging Centre). Un grand merci à Etienne, Melina et Sabrina pour m'avoir aidé à réaliser sous stress les coupes. Leurs soutiens scientifique et technique m'ont été tellement précieux que nul mot ne puisse exprimer ma profonde reconnaissance.

Ce travail ne serait jamais réalisé dans son intégralité sans l'implication de la plateforme Observatoire du Végétal/Chimie-Métabolisme de l'INRA Centre de Versailles-

Grignon. Je tiens à remercier Grégory, sa technicienne Sylvie et tous les autres membres ; outre vos soutiens scientifiques et techniques qui ont été déterminants dans ce travail. Votre accueil chaleureux, votre sympathie et votre dynamisme me sont inoubliables. Je garderai avec soin la photo du repas chinois.

Mes remerciements vont aussi à la plateforme Génome Transcriptome de l'INRA de Bordeaux et particulièrement à Monsieur Franck Salin et son ingénieur Christophe Boury pour leur compétence et leur intérêt porté à notre projet.

Je remercie également l'équipe d'EGFV, surtout Pierre-François qui m'a aidé à finir les traitements des données de RNAseq. Un grand merci pour tes explications et ton efficacité. Sans ton aide, je ne serais jamais allée jusqu'au bout du traitement.

Mes mots ne seront jamais assez forts pour témoigner de ma plus profonde reconnaissance et de ma sincère amitié aux collègues de mon équipe.

Je remercie d'abord Amélie et Céline pour leurs conseils et soutien scientifique, technique et moral qui m'ont été très chers. Leur esprit scientifique, leur rigueur et leur motivation me serviront pour toujours de modèle. Leur implication dans la lecture et la correction de cette thèse m'est précieuse. Je vous remercie profondément de vos amitiés et vos encouragements.

Je tiens aussi à remercier Léa, « LA » bio-informaticienne de l'équipe, qui m'a accordée son temps précieux pour les analyses statistiques des données. Je te remercie sincèrement pour tes compétences, ton efficacité et ta patience.

Mes remerciements s'adressent aussi à notre technicienne Audrey, qui a passé beaucoup de temps pour la réalisation des coupes, un travail fastidieux et lourd ; sans ton aide, l'étude microscopique ne se serait pas aussi bien effectuée.

Je remercie Julie, Pauline, Audray et Taku pour leur solidarité, leur amitié, leur encouragement. Grâce à vous, notre équipe est dynamique, harmonieuse et vivante.

Je remercie également mon stagiaire, Giovanni qui a participé à ce travail. Merci pour ton implication, ta rigueur et ta sympathie vénitienne. Je te souhaite bonne chance et bon courage pour la suite.

Je remercie particulièrement mes amies Margaux, Alice et Jing avec qui j'ai partagé de très bons moments et mes passions pour les vins, la musique classique, la culture, la France, les matchs de foot et de rugby, le cinéma... Vous m'avez toujours soutenu moralement durant

des périodes difficiles. Je suis ravie que vous appréciiez ma cuisine chinoise. Un grand merci pour tout !

Mes remerciements s'adressent à tous mes amis chinois de l'ISVV, Wen, Liming et Zhanwu pour leur partage d'expériences, leurs conseils, leur amitié et leur soutien.

Je tiens à remercier mes copines Shiyu et Jingyi, avec qui je me suis bien amusé et partagé bien des folies. Vos amitiés me sont le meilleur cadeau pour les 5 ans que j'ai passés à Bordeaux. Bon courage pour votre travail ou étude.

Enfin, j'adresse mes plus profondes reconnaissances et mes plus fortes émotions aux deux personnes les plus importantes de ma vie.

Un grand merci à ma mère, qui a tout fait pour que je puisse suivre mes études en France. Merci à maman pour ton amour, ta patience, ton sacrifice, les dix mois que tu passes ici en étant la plupart du temps solitaire afin de me soutenir physiquement et moralement !

Merci à toi Jean pour ton soutien de tout point de vue, ta patience, ton encouragement depuis plus de 12 ans. « Le plus juste et le plus doux des sentiments est la reconnaissance » (Jean-Pierre Claris de Florian, 1786).

VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHES

I. Publications issues des travaux de thèse et autres publications

A. Bernardon-Mery, C. Richou, C. Cholet, A. **Li-Mallet** et L. Geny. (2017) Biostimulation de la vigne : l'action d'un filtrat d'algues. *Phytoma*, N°702, p11-14.

A. **Li-Mallet**, A. Rabot and L. Geny. (2016). Factors controlling inflorescence primordia formation of grapevine: their role in latent bud fruitfulness? A review. *Botany*, Vol. 94, N° 3, p147-163.

A. **Li-Mallet**, A. Rabot and L. Geny. Is expression pattern of *VvL1L*, *VvMFT1* and *VvTFL1A* linked to IAA/ABA balance in grapevine fruitful buds? In *X International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology*. *Acta Horticulturae*, 1188, p149-156.

A. **Li-Mallet**, M. Petrel, E. Gontier, C. Cholet, A. Rabot, A. Osowski et L. Geny. Immunohistological method adaptation on grapevine seeds (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon). In *10^e Symposium International d'Œnologie de Bordeaux*. OENO 2015, Vigne et Vin Publications Internationales, p92-95.

II. Présentations affichées au cours de congrès régionaux et internationaux

A. **Li-Mallet** et L. Geny. Identification of key factors and markers of inflorescence initiation and differentiation in the control of grapevine yield fluctuations. **Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**, Bordeaux, 2017, France.

A. **Li-Mallet** et L. Geny. Is expression pattern of *VvL1L*, *VvMFT1* and *VvTFL1A* linked to IAA/ABA balance in grapevine fruitful buds? **X International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology**, Verona, 2016, Italy.

A. **Li-Mallet** et L. Geny. Understanding of inflorescence primordia initiation and differentiation: flowering gene pattern linked to IAA/ABA balance in grapevine buds. **Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**, Bordeaux, 2016, France.

A. **Li-Mallet** et L. Geny. Identification des facteurs clés et des marqueurs de l'induction inflorescentielle dans le contrôle de fluctuations du rendement. **Journée Technique du Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux**, Bordeaux, 2016, France.

A. **Li-Mallet**, M. Petrel, E. Gontier, C. Cholet, A. Rabot, A. Osowski et L. Geny. Immunohistological method adaptation on grapevine seeds (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet

Sauvignon), **10^e Symposium International d'Œnologie de Bordeaux**, Bordeaux, **2015**, France.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	- 1 -

CHAPITRE 1 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	- 5 -

I. CONTEXTE DE LA PROBLEMATIQUE	- 6 -
I.1. POURQUOI EST-IL SOUHAITABLE DE POUVOIR PREDIRE ET CONTROLER LE RENDEMENT ?	- 6 -
I.2. LA PROBLEMATIQUE : FLUCTUATION INTERANNUELLE DU RENDEMENT DE LA VIGNE	- 6 -
II. QUELQUES RAPPELS SUR L'ANATOMIE DE LA PHYSIOLOGIE DE LA VIGNE	- 8 -
II.1. STRUCTURES PERENNES	- 8 -
II.2. STRUCTURES CADUQUES	- 9 -
II.3. CYCLES DE DEVELOPPEMENT DE LA VIGNE	- 10 -
II.3.1. Cycle végétatif	- 10 -
II.3.2. Cycle reproducteur	- 12 -
III. BOURGEONS LATENTS, INITIATION ET DIFFERENCIATION DES PRIMORDIA INFLORESCENTIELS	- 14 -
III.1. FORMATION DU BOURGEON LATENT ET SON DEVELOPPEMENT	- 15 -
III.2. INITIATION ET DIFFERENCIATION DES PRIMORDIA INFLORESCENTIELS	- 16 -
III.3. RYTHME DE L'INITIATION ET DE LA DIFFERENCIATION DES PRIMORDIA INFLORESCENTIELS	- 17 -
III.4. FERTILITE POTENTIELLE DES BOURGEONS ET CONSTITUTION DU RENDEMENT	- 18 -
III.4.1. Différentes notions de la fertilité	- 18 -
III.4.2. Constitution du rendement	- 19 -
IV. IMPACT DES FACTEURS ABIOTIQUES ET BIOTIQUES SUR L'INITIATION ET LA DIFFERENCIATION DES PRIMORDIA	
INFLORESCENTIELS	- 21 -
IV.1. IMPACT DES FACTEURS ABIOTIQUES ET DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES	- 21 -
IV.1.1. Température	- 21 -
IV.1.2. Lumière	- 24 -
IV.1.3. Etat hydrique	- 27 -
IV.2. IMPACT DES FACTEURS BIOTIQUES ET INTERNES	- 28 -
IV.2.1. Nutrition carbonée : sucres solubles et amidon	- 28 -
IV.2.2. Nutrition minérale	- 30 -
IV.3. REGULATION ET EQUILIBRES HORMONAUX	- 33 -
IV.4. REGULATIONS MOLECULAIRES	- 36 -
IV.4.1. Gènes <i>CLE</i> (homologues de <i>CLAVATA</i>) : gènes clés de contrôle d'activité méristématique	- 36 -
IV.4.2. Gènes <i>MFT/FT/TFL1</i> et <i>MADS8</i> : gènes de régulation d'induction florale	- 37 -

CHAPITRE 2 MATERIELS ET METHODES **- 40 -**

I.	MATERIEL VEGETAL	- 41 -
I.1.	PARCELLE D'EXPERIMENTATION	- 41 -
I.2.	CONDITIONS CLIMATIQUES DES MILLESIMES ETUDIES	- 42 -
I.2.1.	2013	- 42 -
I.2.2.	2014	- 42 -
I.2.3.	2015	- 43 -
I.2.4.	2016	- 44 -
I.3.	EXPERIMENTATIONS ET PRELEVEMENTS	- 44 -
I.3.1.	Suivi du développement des bourgeons	- 44 -
I.3.2.	Effets de la mise à l'obscurité	- 46 -
I.3.3.	Effets de l'effeuillage	- 46 -
I.3.4.	Effets de l'acide abscissique (ABA) exogène	- 47 -
II.	ETUDE MICROSCOPIQUE	- 49 -
II.1.	DISSECTION	- 49 -
II.2.	FIXATION CHIMIQUE	- 49 -
II.3.	DESHYDRATATION ET INCLUSION	- 49 -
II.4.	COUPES	- 50 -
II.5.	COLORATIONS	- 51 -
II.5.1.	Coloration au bleu de toluidine	- 51 -
II.5.2.	Coloration APS (Acide périodique – Schiff)	- 51 -
III.	ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES D'INTERET PAR PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	- 52 -
III.1.	EXTRACTION DES ARN TOTAUX	- 52 -
III.2.	ELIMINATION DE L'ADN GENOMIQUE DES EXTRAITS D'ARN TOTAUX	- 53 -
III.3.	QUANTIFICATION ET APPRECIATION DE LA QUALITE DES ARN TOTAUX EXTRAITS	- 53 -
III.3.1.	Estimation de la quantité et de la contamination des ARN	- 53 -
III.3.2.	Vérification de la qualité des ARN totaux	- 54 -
III.3.3.	Vérification de l'efficacité du traitement à la DNase	- 54 -
III.4.	SYNTHESE DES ADN COMPLEMENTAIRES	- 55 -
III.5.	ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES PAR PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	- 56 -
III.5.1.	Définition des amorces	- 56 -
III.5.2.	PCR quantitative en temps réel	- 57 -
IV.	DOSAGE DES GLUCIDES	- 59 -

IV.1.	DOSAGE DES SUCRES SOLUBLES (D-GLUCOSE, D-FRUCTOSE ET SACCHAROSE)	- 59 -
IV.1.1.	Extraction des sucres solubles	- 59 -
IV.1.2.	Dosage des différents sucres solubles	- 59 -
IV.2.	DOSAGE DE L'AMIDON	- 60 -
IV.2.1.	Extraction de l'amidon	- 60 -
IV.2.2.	Dosage de l'amidon	- 61 -
V.	DOSAGES HORMONAUX	- 62 -
V.1.	EXTRACTION SIMULTANEE DE L'ABA, DE L'AIA ET DES CKS	- 62 -
V.2.	DETERMINATION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES HORMONES PAR L'UPLC	- 62 -
VI.	ESTIMATION DE LA FERTILITE POTENTIELLE REELLE, APPARENTE ET DU RENDEMENT	- 64 -
VI.1.	EVALUATION DE LA FERTILITE POTENTIELLE REELLE	- 64 -
VI.2.	EVALUATION DE LA FERTILITE POTENTIELLE APPARENTE ET DU RENDEMENT	- 64 -
VII.	TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES	- 66 -

**CHAPITRE 3 ETUDE MORPHOLOGIQUE ET CHRONOLOGIQUE DU DEVELOPPEMENT DU
BOURGEON LATENT DE VIGNE AU COURS DE LA PREMIERE ANNEE DU CYCLE REPRODUCTEUR - 67 -**

I.	APPROCHE MICROSCOPIQUE : DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DE L'EVOLUTION DES BOURGEONS LATENTS DE VIGNE AU COURS DE LEUR PREMIERE ANNEE DE FORMATION	- 68 -
I.1.	RESULTATS	- 68 -
I.2.	DISCUSSION	- 70 -
II.	APPROCHE MICROSCOPIQUE : DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE ET ANATOMIQUE DE L'EVOLUTION DES PRIMORDIA AU SEIN DE BOURGEONS LATENTS DE VIGNE AU COURS DE LEUR PREMIERE ANNEE DE FORMATION	- 72 -
II.1.	RESULTATS	- 72 -
II.2.	DISCUSSION	- 74 -
III.	RELATIONS ENTRE LA CHRONOLOGIE D'APPARITION DE FORMATION DES PRIMORDIA INFLORESCENTIELS DANS LES BOURGEONS AU COURS DE LEUR PREMIERE ANNEE DE DEVELOPPEMENT ET LE RENDEMENT	- 78 -
III.1.	RESULTATS	- 78 -
III.2.	DISCUSSION	- 80 -
IV.	DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	- 83 -

**CHAPITRE 4 ETUDE DES MECANISMES DE REGULATION DES PHASES D'INITIATION,
DIFFERENCIATION ET RAMIFICATION DES PRIMORDIA INFLORESCENTIELS DU BOURGEON LATENT
DE VIGNE : APPROCHE MOLECULAIRE, BIOCHIMIQUE ET HORMONALE - 89 -**

I.	APPROCHE MOLECULAIRE : ETUDE DE 6 GENES CANDIDATS AU COURS DE L'EVOLUTION DES BOURGEONS LATENTS DE VIGNE LORS DE LEUR PREMIERE ANNEE DE FORMATION	- 90 -

I.1.	GENES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE L'INITIATION AU NIVEAU DES MERISTEMES	- 90 -
I.1.1.	Gène <i>VvCLE25-1</i>	- 91 -
I.1.2.	Gène <i>VvCLE-TDIF</i>	- 93 -
I.1.3.	Gène <i>VvL1L</i>	- 94 -
I.2.	GENES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE LA TRANSITION FLORALE	- 95 -
I.2.1.	Gène <i>VvMADS8</i>	- 95 -
I.2.2.	Gène <i>VvTFL1a</i>	- 96 -
I.2.3.	Gène <i>VvMFT1</i>	- 97 -
II.	APPROCHE HORMONALE : ETUDE DE 3 FAMILLES DE REGULATEURS DE CROISSANCE (ACIDE INDOLE 3-ACETIQUE, ACIDE ABSCISSIQUE ET CYTOKININES) AU COURS DE L'EVOLUTION DES BOURGEONS LATENTS DE VIGNE LORS DE LEUR PREMIERE ANNEE DE FORMATION	- 100 -
II.1.	ACIDE INDOLE 3-ACETIQUE (AIA)	- 100 -
II.1.1.	Résultats	- 100 -
II.1.2.	Discussion	- 101 -
II.2.	CYTOKININES (CKs)	- 102 -
II.2.1.	Résultats	- 102 -
II.2.2.	Discussion	- 103 -
II.3.	ACIDE ABSCISSIQUE LIBRE	- 104 -
II.3.1.	Résultats	- 104 -
II.3.2.	Discussion	- 105 -
III.	APPROCHE BIOCHIMIQUE : ETUDE DE GLUCIDES AU COURS DE L'EVOLUTION DES BOURGEONS LATENTS DE VIGNE LORS DE LEUR PREMIERE ANNEE DE FORMATION	- 107 -
III.1.	RESULTATS	- 107 -
III.2.	DISCUSSION	- 108 -
IV.	DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	- 113 -

CHAPITRE 5 ETUDE DES EFFETS DE LA MODULATION DES TENEURS EN ABA, DE LA MISE A L'OBSCURITE ET DE L'EFFEUILLAGESUR LES MECANISMES D'INITIATION, DIFFERENCIATION ET RAMIFICATION DES PRIMORDIA INFLORESCENTIELS DES BOURGEONS LATENTS DE VIGNE - 122 -

I.	EFFETS DE LA MODULATION DES TENEURS EN ABA SUR L'INITIATION, LA DIFFERENCIATION ET LA RAMIFICATION DES PI DES BOURGEONS LATENTS DE VIGNE	- 124 -
I.1.	RESULTATS	- 125 -
I.1.1.	Effets des traitements sur les teneurs en ABA libre, AIA libre et cytokinines	- 125 -
I.1.2.	Effets des traitements sur l'expression des gènes remarquables <i>VvCLE25-1</i> , <i>VvTFL1a</i> et <i>VvMFT1</i>	- 125 -
I.1.3.	Effets des traitements sur les teneurs en glucides	- 126 -

I.2.	DISCUSSION	- 126 -
II.	EFFETS DE LA « MISE A L’OBSCURITE DES BOURGEONS » SUR L’INITIATION, LA DIFFERENCIATION ET LA RAMIFICATION DES PRIMORDIA INFLORESCENTIELS	- 132 -
II.1.	RESULTATS	- 133 -
II.1.1.	Effets de la mise à l’obscurité sur le poids moyen et l’organisation ontogénique des bourgeons	- 133 -
II.1.2.	Effets de la mise à l’obscurité sur les teneurs en ABA libre, AIA libre et cytokinines	- 133 -
II.1.3.	Effets de la mise à l’obscurité sur l’expression des gènes remarquables <i>VvCLE25-1</i> , <i>VvTFL1a</i> et <i>VvMFT1</i>	- 134 -
II.1.4.	Effets de la mise à l’obscurité sur les teneurs en glucides	- 134 -
II.2.	DISCUSSION	- 134 -
III.	EFFETS DE L’EFFEUILLAGE SUR L’INITIATION, LA DIFFERENCIATION ET LA RAMIFICATION DES PRIMORDIA INFLORESCENTIELS DES BOURGEONS LATENTS DE VIGNE	- 139 -
III.1.	RESULTATS	- 140 -
III.1.1.	Effets de l’effeuillage sur le poids moyen des bourgeons, la fertilité apparente et le volume des grappes	- 140 -
III.1.2.	Effets de l’effeuillage sur les teneurs en ABA libre, AIA libre et cytokinines	- 140 -
III.1.3.	Effets de l’effeuillage sur l’expression des gènes remarquables <i>VvCLE25-1</i> , <i>VvTFL1a</i> et <i>VvMFT1</i>	- 140 -
III.1.4.	Effets de l’effeuillage sur les teneurs en glucides	- 140 -
III.2.	DISCUSSION	- 141 -
IV.	DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	- 145 -
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	- 150 -
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 166 -
	ANNEXES	- 191 -

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation des différents organes d'un pied de vigne.	8
Figure 2 : Relation entre le rendement moyen (kg/pied) et le poids des rameaux (kg/pied) pour le Colombar greffé sur 25 porte-greffes différents dans un sol à salinité élevée (vignoble d'expérimentation à Robertson). ..	9
Figure 3 : Organisation du rameau principal de vigne.	9
Figure 4 : Cycle de développement de la vigne sous climat tempéré représentant les différents stades phénologiques et physiologiques.	10
Figure 5 : Modifications biochimiques de la base du sarment en fonction des stades phénologiques.	10
Figure 6 : Bourgeons au stade 05 de l'échelle BBCH. (A) bourgeon avec pleurs ; (B) bourgeon dans le coton.	12
Figure 7 : Courbe de croissance et de développement de la baie.	12
Figure 8 : Evolution des molécules d'intérêt œnologique à partir de la véraison jusqu'à la surmaturité	13
Figure 9 : Organisation d'un nœud du rameau principal de vigne.	14
Figure 10 : (a) Morphologie du bourgeon latent à la fin de sa différenciation ; (b) Diagramme en coupe transversale de l'organisation d'un bourgeon latent de vigne ; (c) Coupe longitudinale du bourgeon latent.	15
Figure 11 : Théorie sympodiale illustrant le rythme précis de la croissance du rameau et de l'insertion des nœuds.	15
Figure 12 : Organisation des pièces primordiales d'un bourgeon latent après dissection et observation en microscope à balayage.	16
Figure 13 : Développement de l'apex du rameau, de la vrille et de l'inflorescence à partir du méristème apical et de l'anlage).	17
Figure 14 : Effet de la température sur le nombre moyen de primordia inflorescentiels par bourgeon pour les 12 bourgeons de la base du rameau.	22
Figure 15 : Métaphase avec chromosomes alignés sur le plan équatorial dans le noyau d'une cellule méristématique d'un primordium inflorescentiel.	23
Figure 16 : A) Effet des niveaux d'exposition à la lumière sur le potentiel de fertilité des bourgeons exprimé en indice de fertilité intégrale (IFI) selon les cépages et la position de nœud. IFI est la somme de diamètres maxima moyens de tous les primordia inflorescentiels (mm) issus des bourgeons en dormance ; B) Effet des niveaux d'exposition à la lumière sur la contribution des bourgeons secondaires au potentiel de fertilité des bourgeons selon les cépages et la position de nœud.	25
Figure 17 : Effet du statut hydrique et azoté (A à D : en saison 1 ; E à H : en saison 2) sur la fertilité des bourgeons et le nombre de baies par grappe à maturité en saison 2 chez la Syrah et l'Aranel au cours de deux saisons successives.	27

Figure 18 : Détermination des éventuelles périodes critiques de la mise en fertilité des bourgeons (A) détermination par corrélation avec le nombre de baies par grappe ; (B) détermination de la période sensible au stress hydrique (FTSW : fraction of transpirable soil water) ; (C) corrélation entre le stress hydrique durant la période critique de la saison 1 et la fertilité des bourgeons pour la saison 2 ; (D) corrélation entre le stress hydrique durant la période critique de la saison 1 et le nombre de baies par grappe de la saison 2.	31
Figure 19 : Effets de l'apport de P sur le nombre de primordia inflorescentiels par bourgeon chez le Carignan un et deux ans après.	32
Figure 20 : Effets d'un ajout de cytokinines (10 μ M de PBA) sur l'expression relative de (a) <i>VvTFL1a</i> , (b) <i>VAP1</i> et (c) <i>VFL</i> dans les vrilles du Thompson Seedless cultivées sans (en gris) ou avec (en noir).	34
Figure 21 : Analyse des effets des cytokinines (PBA) sur le phénotype des vrilles cultivées avec 10 μ M de PBA.....	34
Figure 22 : Mode de fonctionnement du maintien des cellules méristématiques dans le méristème apical de l'axe principal.	37
Figure 23 : Hypothèse de modèle de fonctionnement de la différenciation des méristèmes. Triangle orange représente le degré de ramification des méristèmes.	38
Figure 24 : Modèle d'interactions des régulateurs contrôlant l'embryogenèse somatique chez <i>Arabidopsis</i>	39
Figure 25 : Localisation de la parcelle d'étude.	41
Figure 26 : Schéma représentatif de la position des bourgeons N0, N1 et N2 prélevés (points rouges) sur les souches.	44
Figure 27 : Photos représentant les modalités d'application de (A) la mise à l'obscurité ; (B) des traitements hormonaux.	46
Figure 28 : Zone de bourgeons primaires fixés pour l'étude microscopique avec étapes de dissection (A) zone de prélèvement de la partie centrale (entre les lignes rouges) contenant les primordia inflorescentiels ; (B) vue longitudinale de la zone coupée (largeur = 7 mm) avant élimination du bourgeon secondaire.	49
Figure 29 : Electrophorèse sur 1% de gel d'agarose des ARN totaux extraits (A) avant le traitement à la DNase et (B) après le traitement à la DNase.	54
Figure 30 : Programme de PCR quantitative en temps réel.....	57
Figure 31 : Rameau primaire de Merlot 35 jours après le débourrement.	69
Figure 32 : Evolution morphologique des bourgeons latents en formation au cours de la première année du cycle reproducteur.	69
Figure 33 : Evolution du poids moyen d'un bourgeon latent au cours de son développement durant la première année de formation en 2014, 2015 et 2016.....	70
Figure 34 : Evolution morphologique des structures reproductrices du bourgeon latent de vigne au cours de la première année de développement (année 2016).	72

Figure 35 : Evolution anatomique des structures du bourgeon latent de vigne au cours de la première année de développement (année 2014 : B, D, F, H et année 2015 : A, C, E, G, I).....	73
Figure 36 : Evolution du nombre de (A) primordia foliaires (PF), (B) primordia inflorescentiels non différenciés et (C) primordia inflorescentiels différenciés dans les 3 types de bourgeons (N0, N1 et N2) au cours de leur première année de développement (année 2016).	74
Figure 37 : Cumul des indicateurs thermiques et pluviométriques en 2014, 2015 et 2016 avec (A) sommes (base 10) des températures moyennes journalières cumulées et (B) sommes des heures d'ensoleillement journalier cumulé.	74
Figure 38 : Evolution de la température moyenne à Bordeaux depuis 1900.....	75
Figure 39 : Date (en jour julien) de différents stades phénologiques de la vigne entre 1945 et 2000 à Bordeaux.....	76
Figure 40 : Estimation (A) du nombre moyen d'inflorescences à la floraison et (B) du volume moyen des grappes au stade « fermeture de grappe » pour les 3 millésimes étudiés.	78
Figure 41 : Répartition des grappes (%) en fonction de leur volume pour les 3 millésimes étudiés....	79
Figure 42 : Estimation (A) du nombre moyen d'inflorescences à la floraison et (B) du volume moyen des grappes au stade « fermeture de grappe » par rameaux issus des 3 types de bourgeons en 2016 et 2017.	79
Figure 43 : Répartition des grappes (%) en fonction de leur volume dans les N0, N1 et N2 en 2015 et 2016.	80
Figure 44 : Evolution de l'expression de <i>VvCLE25-1</i> au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2014, (B) 2015 et (C) 2016.....	91
Figure 45 : Evolution de l'expression de <i>VvCLE-TDIF</i> au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2014, (B) 2015 et (C) 2016.	93
Figure 46 : Evolution de l'expression de <i>VvL1L</i> au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2014, (B) 2015 et (C) 2016.....	94
Figure 47 : Evolution de l'expression de <i>VvMADS8</i> au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2014, (B) 2015 et (C) 2016.....	95
Figure 48 : Evolution de l'expression de <i>VvTFL1a</i> au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2014, (B) 2015 et (C) 2016.....	96
Figure 49 : Evolution de l'expression de <i>VvMFT1</i> au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2014, (B) 2015 et (C) 2016.....	97

Figure 50 : Evolution de la teneur en AIA au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2015 et (B) 2016.	100
Figure 51 : Evolution de la teneur en tZR5MP au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.	101
Figure 52 : Evolution de la teneur en tZR au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.	102
Figure 53 : Evolution de la teneur en tZROG au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.	103
Figure 54 : Evolution de la teneur en tZ9G au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.	104
Figure 55 : Modèle actuel des voies de biosynthèse des cytokinines chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	104
Figure 56 : Evolution du rapport CKs actives/AIA au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.	105
Figure 57 : Evolution de la teneur en ABA libre au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.	105
Figure 58 : Evolution de la teneur en D-glucose au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.	107
Figure 59 : Evolution de la teneur en D-fructose au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.	108
Figure 60 : Evolution de la teneur en saccharose au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.	109
Figure 61 : Evolution de la teneur en amidon au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.	110
Figure 62 : Localisation de l'amidon dans les bourgeons latents de vigne à 159JAD.	111
Figure 63 : Représentation ACP des différentes variables suivies à 35JAD durant la première année de développement des bourgeons en 2015 et 2016.	117
Figure 64 : Représentation ACP des différentes variables suivies à 88JAD durant la première année de développement des bourgeons en 2015 et 2016.	118

Figure 65 : Représentation ACP des différentes variables suivies à 159JAD durant la première année de développement des bourgeons en 2015 et 2016.....	119
Figure 66 : Effets des traitements modifiant le métabolisme de l'ABA sur les teneurs en (A, B) ABA-libre, (C, D) AIA libre et (E, F) tZR dans les bourgeons 48h et 7 jours après l'application.	125
Figure 67 : Effets des traitements modifiant le métabolisme de l'ABA sur l'expression des gènes (A, B) <i>VvCLE25-1</i> , (C, D) <i>VvTFL1a</i> et (E, F) <i>VvMFT1</i> dans les bourgeons 48h et 7 jours après l'application.	126
Figure 68 : Effets des traitements modifiant le métabolisme de l'ABA sur les teneurs en (A, B) D-glucose, (C, D) D-fructose et (E, F) amidon dans les bourgeons 48h et 7 jours après l'application.	127
Figure 69 : Effets de la durée de mise à l'obscurité sur le poids moyen des bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.	133
Figure 70 : Comparaison microscopique des primordia formés dans les bourgeons N0, N1 et N2 en fonction de la date de mise à l'obscurité en 2016. (A-C) : témoins ; (D-F) : Obs60 et (G-I) : Obs103.	133
Figure 71 : Effets de la mise à l'obscurité sur les teneurs en (A) ABA libre, (B) AIA libre et (C) tZ9G dans les bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.....	134
Figure 72 : Effets de la mise à l'obscurité sur l'expressions des gènes (A) <i>VvCLE25-1</i> , (B) <i>VvTFL1a</i> et (C) <i>VvMFT1</i> dans les bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.	134
Figure 73 : Effets de la mise à l'obscurité sur les teneurs en (A) D-glucose, (B) D-fructose, (C) saccharose et (D) amidon dans les bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.	135
Figure 74 : Effets de l'effeuillage sur (A) le poids moyen d'un bourgeon, (b) la fertilité potentielle apparente en 2017 et (C) le rendement estimé en 2017.	140
Figure 75 : Effets de l'effeuillage sur les teneurs en (A) ABA libre, (B) AIA libre, (C) tZR et (D) tZROG dans les bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.....	141
Figure 76 : Effets de l'effeuillage sur l'expression des gènes (A) <i>VvCLE25-1</i> , (B) <i>VvTFL1a</i> et (C) <i>VvMFT1</i> dans les bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.	141
Figure 77 : Effets de l'effeuillage sur les teneurs en (A) D-glucose, (B) D-fructose, (C) saccharose et (D) amidon dans les bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.	142
Figure 78 : Représentation ACP des différentes variables suivies à 159JAD durant la première année de développement des bourgeons en 2015 et 2016 incluant la fertilité potentielle apparente des bourgeons et le rendement estimé.....	161
Figure 79 : Représentation ACP des différentes variables suivies à 35JAD durant la première année de développement des bourgeons en 2015 et 2016 incluant la fertilité potentielle apparente des bourgeons et le rendement estimé.....	162
Figure 80 : Représentation ACP des différentes variables suivies à 60JAD durant la première année de développement des bourgeons en 2015 et 2016 incluant la fertilité potentielle apparente des bourgeons et le rendement estimé.....	163

Figure 81 : Schéma bilan des relations observées entre les marqueurs biochimiques, hormonaux et moléculaires au cours des différentes phases de développement du bourgeon latent de vigne lors de la première année du cycle reproducteur. 164

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Effets de la durée d'exposition sur le nombre moyen de primordia inflorescentiels par bourgeon pour les bourgeons de la base 1-12, le poids moyen des primordia inflorescentiels dans les bourgeons de position 12 et la masse sèche moyenne des plantes (feuilles + rameaux + racines) 13 semaines après débourrement.	25
Tableau II : Effets de l'irrigation sur la viabilité des bourgeons et leur potentiel de fertilité chez le Thompson Seedless.	25
Tableau III : Corrélations entre les paramètres de maturité des fruits, de fertilité et de la résistance au froid.	29
Tableau IV : Effets d'une fertilisation en azote (N), en phosphore (P) et en potassium (K) sur la taille des primordia inflorescentiels dans les bourgeons de la base en 4ème et 6ème rang.	29
Tableau V : Conditions climatiques de 2013, 2014, 2015, 2016 et 2017.....	42
Tableau VI : Dates de la mi-floraison et de la mi-véraison du Merlot des 9 dernières années comparées aux normales des 20 dernières années dans la région bordelaise.	44
Tableau VII : Dates d'échantillonnage pour l'étude de suivi du développement des bourgeons en 2014, 2015 et 2016 et stades de développement des baies correspondants.	45
Tableau VIII : Analyses réalisées pour l'étude du suivi de développement des bourgeons en 2014, 2015 et 2016..	45
Tableau IX : Dates de mise à l'obscurité pour l'étude des effets de la lumière en 2016	46
Tableau X : Oligonucléotides utilisés en PCR quantitative en temps réel.	55
Tableau XI : Protocole de dosage du D-glucose et du D-fructose par cascades de réactions enzymatiques.	59
Tableau XII : Conditions d'analyse en UPLC de l'ABA, de l'AIA et des CKs et paramètres instrumentaux de la spectrométrie de masse.....	62
Tableau XIII : Correspondance en nombre de jours après débourrement entre les stades clés définis par Carolus et les dates caractérisées dans notre étude.....	75
Tableau XIV : Evolution des stades phénologiques de Merlot à Bordeaux.....	76
Tableau XV : Correspondances morphologiques et ontogéniques des bourgeons étudiés par rapport aux stades définis par Carolus (1970) et à la classification BBCH.	87
Tableau XVI : Tableau statistique représentant la significativité des différences entre les stades au cours de la première année du développement des bourgeons latents pour 6 gènes en 2014, 2015 et 2016.	92

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Matrice des corrélations de l'ensemble des variables selon le test de Pearson.

ABRÉVIATIONS

Unités :

°C	Degré Celsius
°Cj	Degré jour de croissance
µL	Microlitre
µm	Micromètre
A	Absorbance
cm ³	Centimètre cube
g	Gramme
H/E	Hauteur de feuillage après rognage/Ecartement des rangs
ha	Hectare
hL	Hectolitre
kg	Kilogramme
L	Litre
lux	Lumen par mètre carré
M	Mole par litre
mg	Miligramme
min	Minute
mL	Mililitre
mm	Milimètre
mol	Mole
Mpa	Mégapascal
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
rpm	Revolutions per minute / Tour par minute
V	Voltage
v	Volume

Instruments et techniques :

C18	Carbone 18
CT	Cycle Threshold
ESI	Electrospray ionization / Ionisation par électrospray
G/C	Guanine/Cytosine
MS	Mass spectrometry/Spectrométrie de masse
PCR	Polymerase Chain Reaction / Réaction en chaîne par polymérase
RNAseq	Whole transcriptome shotgun sequencing / Séquençage aléatoire du transcriptome entier
RT Q-PCR	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
TQS	Trip quadrupole mass spectrometer / Spectromètre de masse triple quadripôle
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography / Chromatographie en phase liquide à ultrahaute performance
UV	Ultraviolet

Solvants et réactifs :

BET	Bromure d'éthidium
CTAB	Bromure d'héxadecyltriméthylammonium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTPs	Désoxyribonucléotides
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
HCl	Acide chlorhydrique
IAA	Alcool isoamylique
LiCl	Chlorure de lithium
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
OsO ₄	Tétroxyde d'osmium
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
TAE	Tris-acétate-acide éthylène diamine tétraacétique

Gènes et protéines :

AP1	APETALA1
CLE	CLAVATA3/ESR
CLV	CLAVATA
EF1	Elongation Factor 1
FT	FLOWERING LOCUS T
L1L	LEAFY-COTYLEDON 1-like
LFY	LEAFY
MFT	Mother of FT and TFL1
SAND	Sp100, AIRE-1, NucP41-75, DEAF-1
SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1
TDIF	Tracheary element differentiation inhibition factor
TFL1	TERMINAL FLOWER 1
WUS	WUSCHEL

Introduction générale

Pour la production de vins de qualité, le rendement et la qualité des baies sont deux aspects essentiels pour le viticulteur qui recherche un équilibre entre quantité et qualité, pour d'un côté assurer son chiffre d'affaires, et d'un autre côté atteindre le niveau qualitatif désiré. Or, chaque année on observe une grande variabilité dans les rendements, avec des conséquences importantes en termes d'organisation du travail, d'orientation des pratiques viticoles et vinicoles, d'équilibre économique à l'échelle de l'exploitation, mais aussi à l'échelle régionale, nationale et mondiale. En France, depuis une dizaine d'années, de fortes fluctuations de rendement inter-millésimes ont été constatées : 2008, 2012, 2013 et 2014 sont des millésimes de petits volumes alors qu'en 2015 et 2016 les rendements étaient plus élevés. Ces variations interannuelles sont dues à de nombreux facteurs aussi bien externes (conditions environnementales fluctuantes, pratiques culturales) qu'internes (vigueur de la souche, équilibres hormonaux, patrimoine génétique, relation porte-greffe/greffon...), mais leurs effets cumulés sont mal connus. Dans la région bordelaise, les étés 2007 et 2013 ont été relativement frais avec un déficit en ensoleillement, semblant responsable de petits rendements en 2008 et 2014. Au contraire, les millésimes 2011 et de 2012 étaient très secs mais ils ont aussi été suivis de faibles rendements en 2012 et en 2013. En revanche, l'été 2014 fut chaud et humide et une forte sortie des inflorescences fut observée en 2015. De la même manière, en 2015 le printemps fut doux et l'été chaud, pouvant engendrer une très forte sortie et un fort rendement en 2016 (Geny-Denis, 2015). Ainsi les millésimes se suivent mais ne se ressemblent pas.

Les étapes de la construction du rendement sont complexes et la formation des grappes se déroule sur deux années consécutives. La première année correspond à la formation des primordia inflorescentiels dans les bourgeons latents, qui ne donnent en principe jamais de pousse l'année de leur formation. La deuxième année est caractérisée par l'épanouissement de ces bourgeons au printemps (débourrement) donnant naissance à un rameau fructifère sur lequel, après la floraison, les baies pourront se développer et murir. De nombreuses études ont montré que le rendement pouvait varier de 15% jusqu'à plus de 35% d'une année à l'autre (Bessis, 1965 ; Clingeleffer, 1984 ; Bramley, 2005). Pour certains auteurs (Dry, 2000 ; Dunn and Martin, 2007 ; Clingeleffer et Krstic, 2001 ; Clingeleffer, 2010 ; Guilpart *et al.*, 2014), 60% de la variation saisonnière du rendement pourraient être expliqués par un fonctionnement plus ou moins optimum de la phase de formation des primordia inflorescentiels (PI) dans les bourgeons au cours de la première année du cycle, laissant penser que cette phase est primordiale pour l'élaboration du rendement.

Ce sujet d'étude est relativement ancien. De nombreux travaux ont été réalisés entre les années 1960 et 1990 et ont apporté des connaissances essentielles d'un point de vue morphologique sur les mécanismes d'initiation et de différenciation des primordia inflorescentiels dans le bourgeon latent (Pouget, 1963 ; Bessis 1965, Carolus, 1970 ; Alsaïdi, 1975). Entre 1960 et 1990, ces approches morphologiques ont été complétées par l'étude des effets de différents facteurs hormonaux (cytokinines, gibbérellines, auxines), environnementaux (lumière, température, état hydrique) ou culturels (rognage, effeuillage) (May et Antcliff, 1963 ; Baldwin, 1964 ; May, 1965 ; Buttrose, 1969a, 1969b, 1969c, 1969d ; Loveys *et al.*, 1973 ; May *et al.*, 1976 ; Srinivasan et Mullins, 1978, 1979 ; Carbonneau et Casteran, 1979 ; Kliewer, 1982). Cependant, la plupart de ces études ont été conduites sous conditions contrôlées et se sont focalisées sur les effets, sans vision intégrative de l'ensemble de ces facteurs. Plus récemment (depuis 5 ans), ces thématiques ont été reprises soit par des approches génétiques et moléculaires mettant en évidence l'existence de gènes impliqués dans l'induction et l'initiation florale et dans la floraison (Diaz-Riquelme *et al.*, 2012), soit par des approches mathématiques visant à développer des modèles prédictifs du rendement (Guilpart *et al.*, 2014). Mais finalement, les mécanismes de régulation de la formation des PI dans les bourgeons restent non élucidés et les causes de la variabilité de fertilité observée dans les vignobles sont encore mal connues. A Bordeaux, les derniers travaux portant sur cet objet datent de 1970.

Pour essayer d'apporter des données nouvelles sur cette thématique, nous avons décidé de réaliser une étude intégrative en plein champ combinant des approches biochimiques, moléculaires, hormonales, microscopiques, statistiques et de :

- caractériser à nouveau le processus de formation des primordia inflorescentiels dans les bourgeons latents de vigne du Merlot de la région bordelaise au regard de la modification climatique depuis 40 ans ;

- apporter des données nouvelles pour mieux comprendre les interactions physiologiques qui peuvent exister entre certaines voies métaboliques qui favorisent ou non les processus d'induction, d'initiation, de différenciation et de ramification des primordia inflorescentiels ;

- évaluer l'impact de certains facteurs biotiques et abiotiques sur les processus de formation des primordia inflorescentiels et sur le rendement potentiel ;

- identifier des marqueurs physiologiques précoces des étapes de formation des primordia inflorescentiels afin de les intégrer dans la construction d'un modèle de prédiction du rendement.

Après avoir réalisé un état de l'art des connaissances actuelles sur le sujet et présenté l'ensemble des méthodes utilisées au cours de ce travail, ce mémoire s'articulera autour de 3 chapitres de résultats visant chacun à répondre aux objectifs cités ci-dessus.

Le premier chapitre de résultats s'attachera, à partir d'une approche macroscopique et microscopique, à (i) décrire les différentes phases d'apparition des organes préformés dans le bourgeon et (ii) réaliser la chronologie de cette apparition en relation avec le millésime et le type de bourgeon. Cette phase de description est indispensable pour la poursuite de notre étude car elle définira les stades clés pour l'étude des facteurs de régulation et commencera à établir les liens entre développement morphologique et rendement potentiel.

Le second chapitre de résultats étudiera l'évolution de certains gènes, marqueurs biochimiques et hormonaux au cours de la première année du développement du bourgeon de manière indépendante, puis essayera de les relier entre eux pour émettre des hypothèses de schéma de fonctionnement.

Le troisième chapitre, consacré aux travaux réalisés lors de la dernière année, aura pour objectif d'étudier les effets de la modulation des teneurs en acide abscissique, de la mise à l'obscurité et de l'effeuillage pour essayer de (i) affiner la compréhension des mécanismes de régulation étudiés lors du chapitre précédent pour les 3 approches considérées, (ii) caractériser le rôle de l'acide abscissique et de la lumière dans ces mécanismes et (iii) étudier l'impact d'une pratique culturale couramment utilisée à Bordeaux, l'effeuillage, qui modifie à la fois les équilibres sources/puits et la luminosité du bourgeon.

Enfin, nous proposerons une discussion générale visant à (i) mettre en évidence les étapes clés et critiques de la formation des bourgeons en lien avec le rendement et (ii) proposer des marqueurs d'état de la fertilité qui pourraient à terme être intégrés dans un modèle de prédiction précoce du rendement.

CHAPITRE 1

Synthèse bibliographique

I. Contexte de la problématique

I.1. Pourquoi est-il souhaitable de pouvoir prédire et contrôler le rendement ?

Dans le contexte de la vitiviniculture, différente de beaucoup d'autres cultures, la vigne présente une particularité qui consiste à chercher constamment un équilibre entre le rendement et la qualité du raisin en fonction du type de vin produit et en liaison avec le marché. Un rendement optimal est basé sur un niveau de qualité souhaité et une rentabilité économique prédéfinie par l'exploitation. Ainsi, le rendement peut varier de $20 \text{ hL} \cdot \text{ha}^{-1}$ jusqu'à $200 \text{ hL} \cdot \text{ha}^{-1}$ selon l'objectif de production désigné par chaque domaine viticole (Mézière *et al.*, 2009). En France, le rendement moyen de tous types de vins confondus basé sur les statistiques des huit dernières années est autour de $60 \text{ hL} \cdot \text{ha}^{-1}$ (source : www.data.gouv.fr). Un rendement parcellaire trop élevé est considéré néfaste pour la qualité du raisin, sachant que les raisins destinés à la vinification nécessitent une certaine concentration en molécules d'intérêt (sucres, acides, précurseurs aromatiques, polyphénols) afin de donner aux vins les propriétés organoleptiques recherchées et l'aptitude au vieillissement souhaitée (Kliewer et Dokoozlian, 2005).

En France, le rendement viticole est soumis à des réglementations européennes. L'Institut National des Appellations d'Origine (INAO) fixe les conditions de production de chaque appellation : zones géographiques, encépagement, pratiques culturales, mais aussi le rendement maximum. Par exemple, dans la région bordelaise, les cahiers des charges de l'INAO limitent le rendement maximum de l'IGP (Indication Géographique Protégée) Atlantique à $120 \text{ hL} \cdot \text{ha}^{-1}$, alors que pour les différentes AOC, les rendements sont limités à la fois par le nombre de grappes par cep et le volume de jus (12 grappes par cep et $54 \text{ hL} \cdot \text{ha}^{-1}$ pour l'AOC Pessac-Léognan ; 14 – 17 grappes par cep et $40 \text{ hL} \cdot \text{ha}^{-1}$ pour l'AOC Graves supérieure) (source : www.inao.gouv.fr). Il est donc très important de pouvoir évaluer et contrôler de façon précoce le volume d'une récolte à l'échelle d'un domaine dans le but d'atteindre l'objectif économique tout en gardant la qualité recherchée ; mais aussi à l'échelle d'une région viticole, voire d'un pays afin de faciliter la gestion du marché du vin.

I.2. La problématique : fluctuation interannuelle du rendement de la vigne

Outre la considération du pilotage conjoint du rendement et de la qualité du raisin, la vigne présente une variabilité de rendement inter-millésime très marquée avec des conséquences qualitatives et économiques importantes, ce qui préoccupe les viticulteurs. Les variations inter-annuelles sont généralement supérieures à 15%, mais dépassent régulièrement

35% (Clingeleffer et Krstic, 2001 ; Vasconcelos *et al.*, 2009 ; Clingeleffer, 2010 ; Guilpart *et al.*, 2014). Dans la région bordelaise, de faibles rendements par rapport au rendement moyen ont été observés en 2008, 2012, 2013 et 2014, dus à des conditions climatiques très variées. En effet, les étés 2007 et 2013 dans la région bordelaise ont été relativement frais avec un déficit d'ensoleillement, participant aux petits rendements en 2008 et 2014. De même, les étés 2011 et 2012 étaient très secs, ce qui a aussi entraîné de faibles rendements en 2012 et 2013. Par contre, l'été 2014 était chaud et humide, entraînant un grand nombre d'inflorescences et de fleurs en 2015 (Geny-Denis, 2015 ; Li-Mallet *et al.*, 2016). Quand les variations du rendement ont lieu dans plusieurs régions de production, elles peuvent avoir des impacts économiques à des échelles plus importantes, nationales voire internationales (Guilpart *et al.*, 2014).

La constitution du rendement est généralement considérée dépendante de trois composants : le nombre de grappes par cep, le nombre de baies par grappe et le poids moyen des baies. Chacun de ces composants peut être impacté par de nombreux facteurs externes et internes durant les deux années consécutives du cycle reproducteur. De plus, le déterminisme et les mécanismes de régulation de la constitution du rendement de la vigne sont encore très mal compris. Il est donc difficile d'estimer précocement la fluctuation du rendement (Keller, 2010 ; Clingeleffer, 2010). A long terme et grande échelle, la modélisation basée sur les données climatiques peut être utilisée pour une estimation très approximative du rendement, mais cette technique ne peut prévenir les effets sols, microclimats ou variabilité des pratiques culturales. A l'échelle d'une parcelle ou d'un domaine viticole, les méthodes basées sur le comptage d'inflorescences, de grappes par souche ou de baies par grappe peuvent être réalisées. Mais ces approches sont lourdes et ne donnent les informations que quelques mois à l'avance. Il est difficile d'adapter les pratiques culturales à partir des résultats issus de ces techniques afin de minimiser les variations interannuelles du rendement. La compréhension du déterminisme et des modes de régulation des variations inter-millésimes du rendement est donc nécessaire à l'établissement éventuel d'outils d'estimation précoce du rendement afin de piloter l'adaptation des pratiques culturales pour mieux contrôler le rendement final.

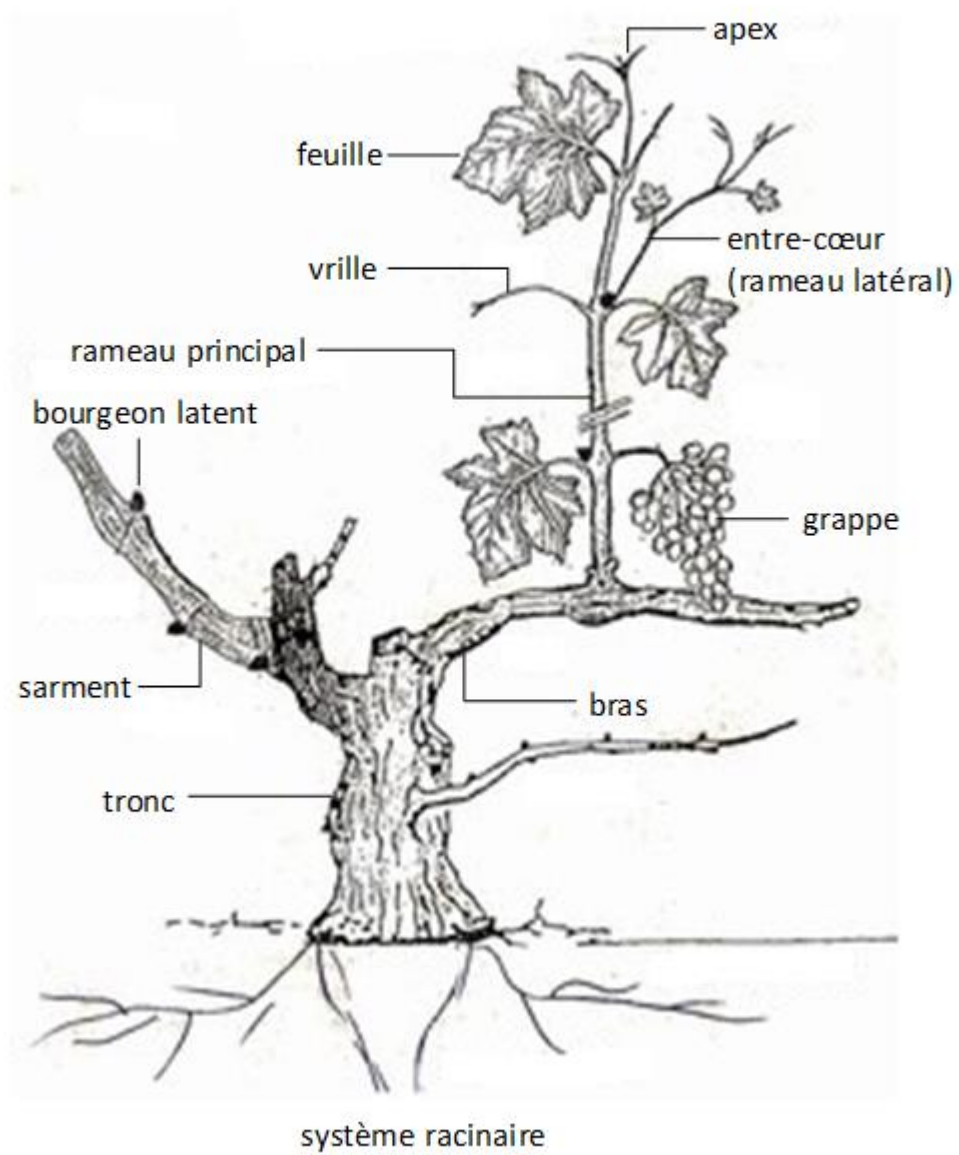


Figure 1 : Organisation des différents organes d'un pied de vigne.

II. Quelques rappels sur l'anatomie de la physiologie de la vigne

La vigne, ou vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.), est une plante ligneuse et pérenne de la famille des Vitaceae. Il s'agit d'une des rares lianes bien domestiquées.

Lorsque la vigne est cultivée, elle doit assurer à la fois une croissance végétative et une production suffisante de fruits grâce à la formation des organes reproducteurs. La croissance en longueur des tiges (ou rameaux) et des racines est assurée par la prolifération cellulaire ou mérése (multiplication cellulaire par mitoses successives) dans les méristèmes apicaux, alors que la croissance en épaisseur est assurée par les assises cambiales et subéro-phellodermiques dans les méristèmes secondaires. La formation et la croissance des organes reproducteurs de la vigne sont assurées par l'acquisition de nouvelles potentialités physiologiques grâce au processus de différenciation des cellules d'abord dans les bourgeons latents *via* les processus d'initiation et de différenciation des primordia inflorescentiels et de virage floral (Carbonneau *et al.*, 2015) puis dans un second temps, dans les fleurs après la fécondation et la nouaison.

Une vigne bien développée comporte (Figure 1) :

- des parties pérennes formées du système racinaire (porte-greffe) et d'une partie du système aérien (tronc et bras) ;
- des parties aériennes caduques que sont les rameaux, les feuilles, les bourgeons, les inflorescences, et les baies de raisin.

II.1. Structures pérennes

Les structures pérennes évoluent avec l'âge de la vigne. Plus la plante est vigoureuse, plus leur volume est important. Elles ont un rôle de structuration de la forme de la souche, mais surtout de stockage des réserves nutritionnelles, en carbone, en azote et autres éléments minéraux. Chaque année, au moment de la reprise végétative, les réserves sont mobilisées et utilisées pour la croissance des organes aériens et souterrains.

Les porte-greffes sont des hybrides plus ou moins complexes de *Vitis* « américaines » qui apportent une certaine tolérance au phylloxéra, un puceron s'attaquant au système racinaire et provoquant le dépérissement des *Vitis vinifera* (Keller, 2010 ; Carbonneau *et al.*, 2015).

Le système racinaire est l'interface entre la vigne et le sol. Il est le support physique de la vigne dans le sol et assure l'assimilation de l'eau et des éléments minéraux. Il

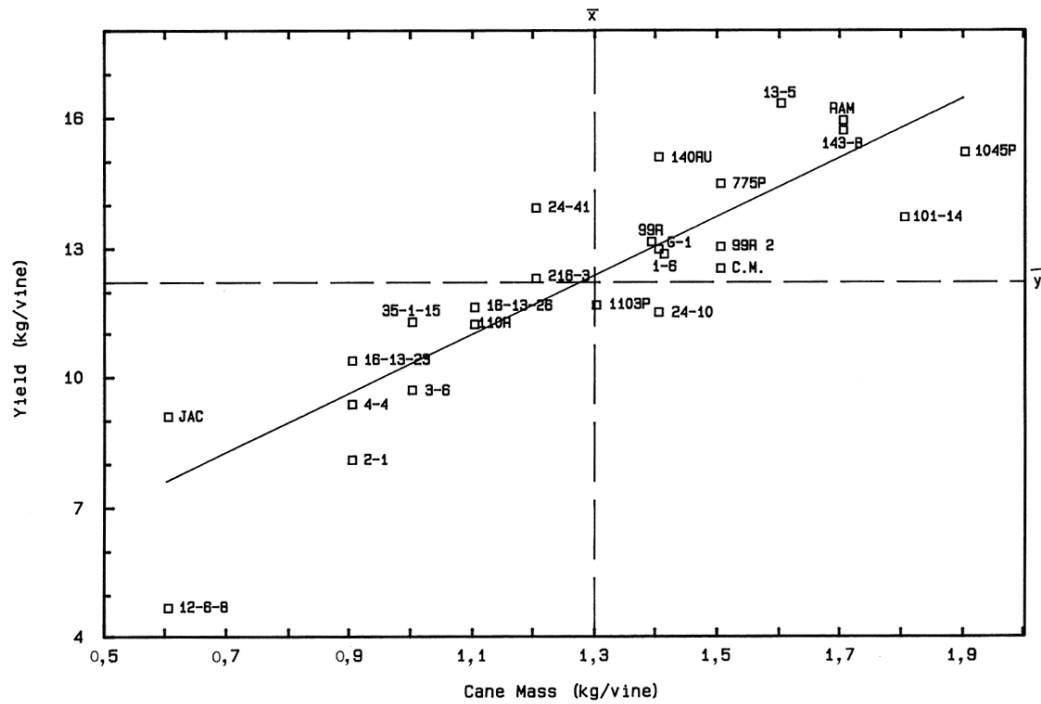


Figure 2 : Relation entre le rendement moyen (kg/pied) et le poids des rameaux (kg/pied) pour le Colombarde greffé sur 25 porte-greffes différents dans un sol à salinité élevée (vignoble d'expérimentation à Robertson). (Southey et Jooste, 1991).

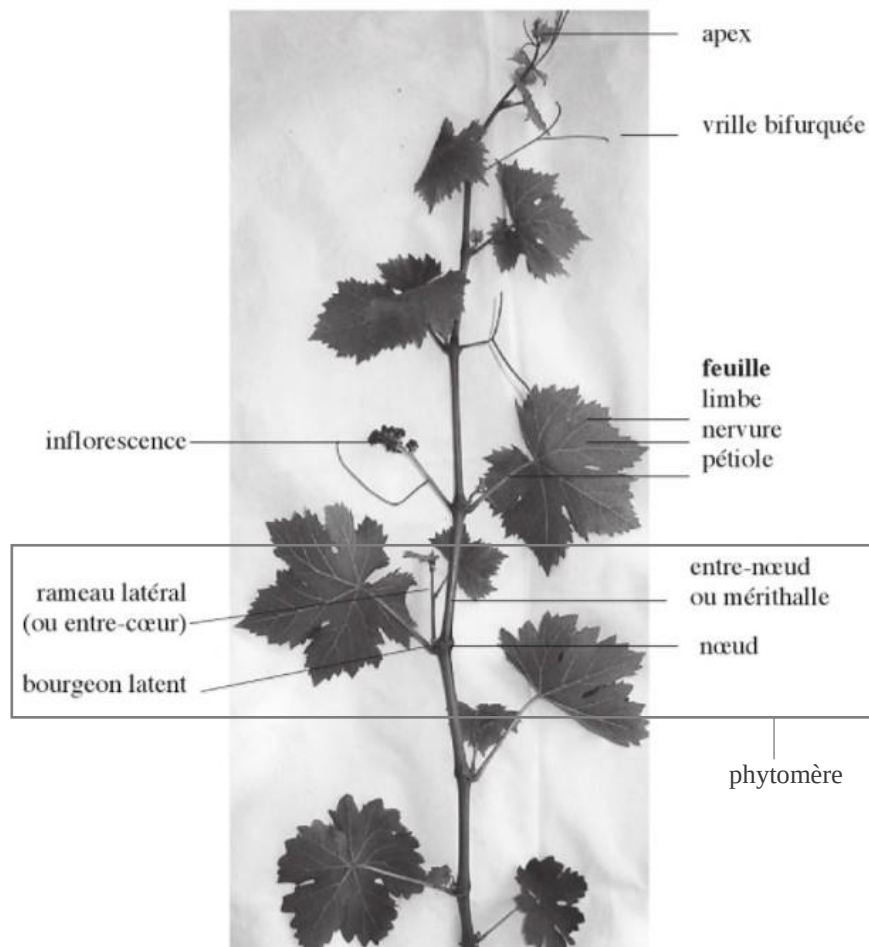


Figure 3 : Organisation du rameau principal de vigne (Carbonneau *et al.*, 2015).

sert aussi d'organe de stockage pour les éléments carbonés et minéraux. De plus, le système racinaire est une source des phytohormones (cytokinines et acide abscissique) qui moduleraient la physiologie de la plante entière. En raison du greffage, le système racinaire est formé par 3 types de racines avec des racines primaires (principales), secondaires et tertiaires (latérales). Les radicelles sont généralement renouvelées tous les ans. Le nombre et le placement des racines latérales ne sont pas prédéterminés, et dépendent de nombreux facteurs comme la nature du sol, la disponibilité en eau et éléments minéraux, la densité de plantation ou les pratiques culturales (Carbonneau *et al.*, 2015).

L'ensemble du système racinaire et du porte-greffe peut influencer le rendement selon les hybrides des porte-greffes et leur compatibilité avec le sol. Mais aussi à travers leur potentialité d'assimilation et de conduite de l'eau et des éléments minéraux qui, par la suite, impacteront la croissance de la partie aérienne. Par exemple, en condition de salinité relativement élevée, les porte-greffes 13-5, Ramsey, 143-B Mgt, 1045P ou encore 140Ru semblent être mieux adaptés, et ainsi induire une meilleure adaptation avec un rendement plutôt élevé (Figure 2) (Southey et Jooste, 1991).

Le tronc et les bras sont les parties pérennes aériennes. Le tronc est formé initialement de la tige principale lignifiée, et s'étend horizontalement avec l'âge pour former les bras. Selon le mode de conduite, il forme un à plusieurs bras permanents qui porteront les bois lignifiés de 2 et 3 ans, qui supportent eux-mêmes les tiges d'un an que l'on appelle les rameaux. Ces structures sont aussi des organes de stockage de réserves nutritionnelles, mais surtout elles assurent les flux d'eau et de sève nécessaires à la croissance des structures caduques.

II.2. Structures caduques

La vigne est une plante à croissance indéterminée. L'axe principal (tige principale ou rameau principal) est constitué d'une série de phytomères et d'un apex qui ne cesse de produire de nouveaux phytomères avant une chute naturelle ou un écimage ou rognage¹. Un phytomère comporte un entre-nœud (mérithalle), un nœud (point de jonction renflé entre deux entre-nœuds), ainsi que des organes insérés au niveau du nœud : une feuille, un complexe de bourgeons (bourgeon latent et bourgeon anticipé ou prompt-bourgeon) à l'aisselle de la feuille et une vrille ou une inflorescence du côté opposé de la feuille (Figure 3). Le rameau principal naît à partir du bourgeon latent porté par le rameau de l'année précédente. Il forme à sa base

¹ Ecimage ou rognage: suppression par l'homme des extrémités des rameaux poussant vers le haut (écimage) ou sur les côtés (rognage)

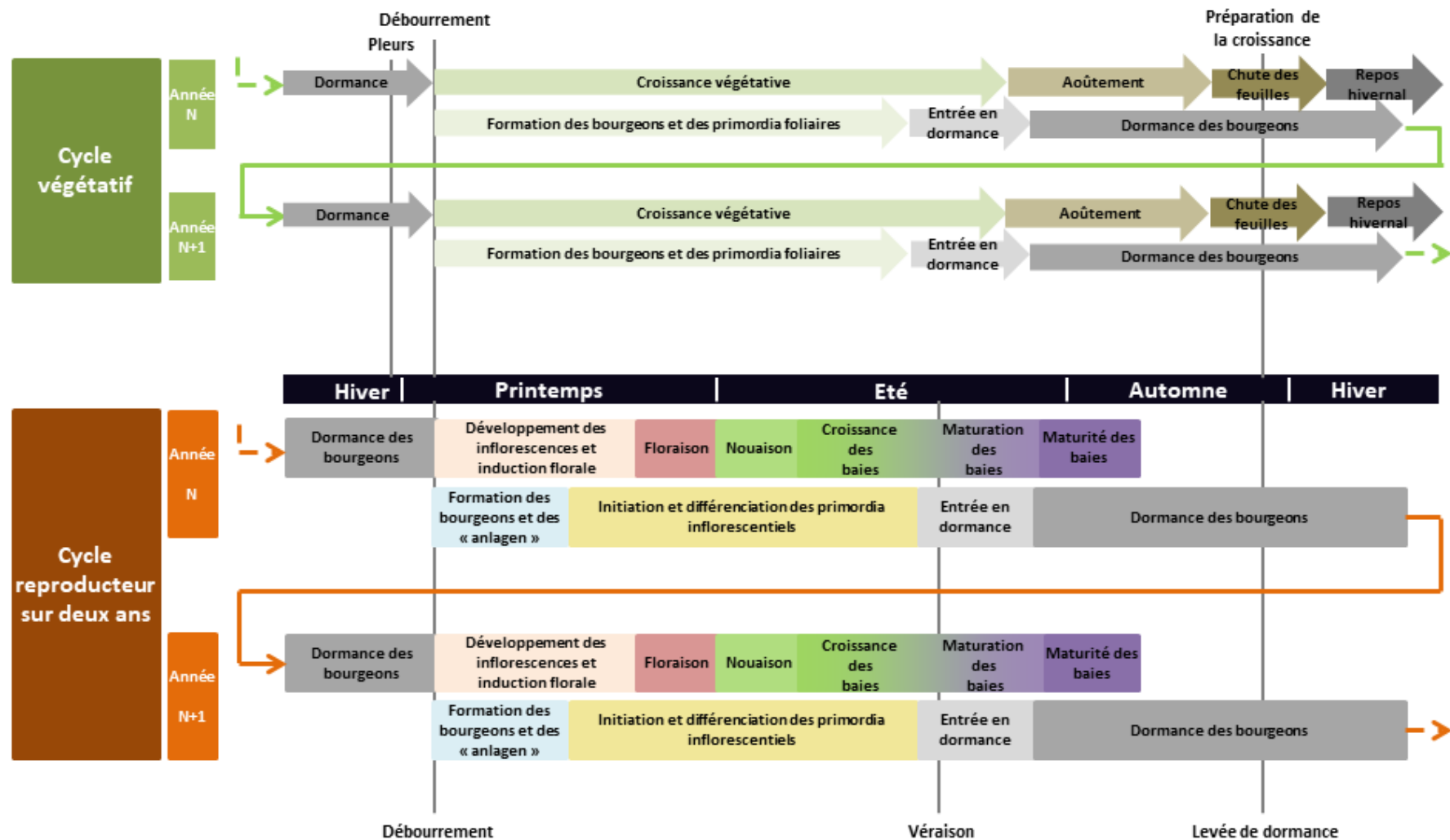


Figure 4 : Cycle de développement de la vigne sous climat tempéré représentant les différents stades phénologiques et physiologiques (schéma adapté de Carbonneau, 1992 ; Coombe et Iland, 2004 ; Carmona *et al.*, 2008).

un empatement au niveau duquel est inséré un ensemble de bourgeons (généralement non fructifères) appelés bourgeons de la couronne. L'apex est constitué par le méristème primaire à l'extrémité terminale du rameau principal, et par deux ébauches foliaires. On y retrouve une forte activité d'organogenèse jusqu'à la chute de l'apex induite par un stress hydrique ou trophique. L'apex du rameau exerce une dominance sur le développement des bourgeons axillaires selon deux mécanismes : (i) un mécanisme trophique qui consiste à détourner les métabolites au profit de l'apex par sa force de « puits » ; (ii) un mécanisme hormonal (appelé dominance apicale) par l'action de l'auxine qui inhibe les bourgeons sous-jacents (Carbonneau *et al.*, 2015). La suppression de l'apex par l'homme (écimage et/ou rognage) supprime la dominance apicale, et déclenchera dans un sens acropète le développement des entre-cœurs (rameaux latéraux) issus des bourgeons anticipés (prompt-bourgeons) qui sont formés au cours de l'année lors de la croissance du rameau principal (Champagnat, 1954).

Les rameaux principaux, issus des bourgeons latents de l'année précédente, sont très fertiles. Ils portent à leur base deux ou trois inflorescences qui deviendront, pendant la nouaison, des grappes après la fécondation, puis, dans les parties plus hautes, des vrilles. Les entre-cœurs, ou rameaux latéraux, sont rarement fertiles et ne produisent quasiment que des vrilles.

Les rameaux principaux deviennent généralement des sarments après l'aoûtement. Ce mécanisme physiologique suit un sens acropète, en commençant par les mérithalles de la base vers ceux du sommet, et induit de profonds changements morphologiques, anatomiques et biochimiques permettant ainsi aux organes aériens de supporter les conditions climatiques durant la phase de repos. Ainsi, les rameaux se déshydratent et accumulent des réserves carbonées et azotées qui pourront être utilisées l'année d'après, au moment du débourrement. Ce phénomène, principalement régulé par la modification des équilibres hormonaux, provoque également la mise en dormance des bourgeons latents portés par les rameaux.

II.3. Cycles de développement de la vigne

La vigne obéit à des cycles de développement complexes (i) en produisant des organes végétatifs au court du cycle végétatif, et (ii) en assurant sa reproduction avec la formation des baies et des pépins grâce au cycle reproducteur (Figure 4).

II.3.1. Cycle végétatif

Au sens strict, le cycle végétatif de la vigne (cycle végétatif complet) peut durer jusqu'à 18 mois. Il débute au printemps dans les bourgeons latents en croissance avec la préformation de l'axe principal de croissance végétative et des premiers mérithalles, ainsi que l'initiation

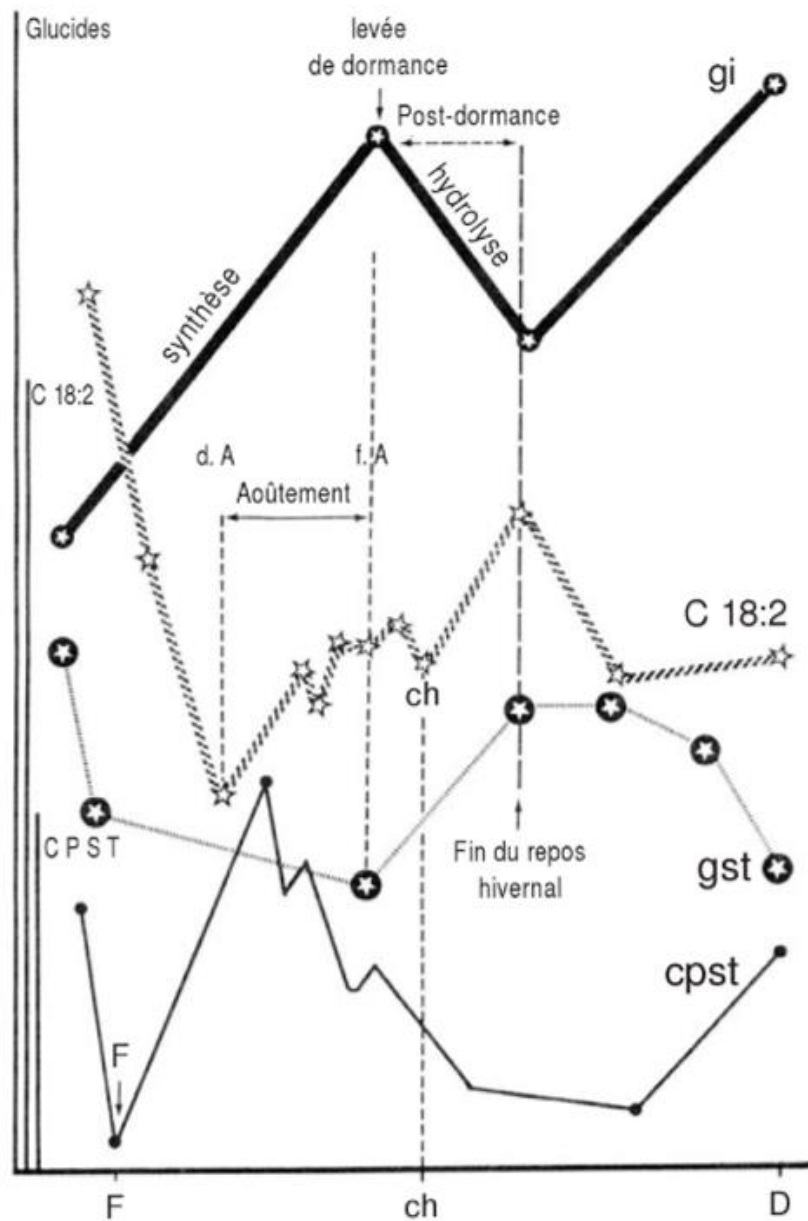


Figure 5 : Modifications biochimiques de la base du sarment en fonction des stades phénologiques, d'après les travaux de Bouard, Alsaïdi, Atalay et Darné de l'université de Bordeaux (Reynier, 2011).

- gi : glucides insolubles ; C 18:2 : acide linoléique ; gst : glucides solubles totaux ; cpst : composés phénoliques solubles totaux
- F : floraison ; ch : chute des feuilles ; D : débourrement l'année N+1

des primordia foliaires (PF). La croissance de ces organes végétatifs préformés s'arrête avec l'entrée en dormance des bourgeons latents en fin d'été.

La dormance des bourgeons latents peut être divisée en trois étapes successives (Bessis, 1965 ; Reynier, 2011 ; Legave *et al*, 2013 ; Dantec, 2014).

1) La paradormance, ou prédormance, est une phase pendant laquelle les bourgeons latents néoformés au printemps et portés par les rameaux en croissance ne débourrent pas à cause d'une inhibition exercée par des organes ou tissus plus ou moins éloignés des méristèmes et ébauches des bourgeons (inhibitions corrélatives).

2) L'endodormance (dormance *sensu stricto*) consiste en l'acquisition de l'incapacité à la croissance liée aux propriétés des tissus des bourgeons eux-mêmes, en l'absence de toutes inhibitions corrélatives et même si tous les facteurs externes sont favorables. Cette étape de dormance correspond elle-même à trois phases successives durant lesquelles de nombreuses variations métaboliques ont lieu (Figure 5) :

- L'entrée en dormance qui correspond à la perte de la faculté de débourrement sous contrôle de l'acide abscissique (ABA) en conditions thermiques chaudes et sous stress hydrique ;
- La dormance durant laquelle les bourgeons restent latents sans subir de profondes modifications ;
- La levée de dormance qui permet aux bourgeons de réacquérir progressivement une aptitude au débourrement sous l'action des premiers froids d'automne.

3) L'écodormance (quiescence ou post-dormance) est la phase pendant laquelle les bourgeons qui ont retrouvés leur capacité irréversible de débourrer, restent quiescents à cause des conditions externes défavorables, notamment les températures trop basses. Cette période est aussi marquée par une baisse de teneur en ABA qui, en activant l' α -amylase, entraîne l'hydrolyse d'amidon afin d'assurer la disponibilité en sucres solubles à la phase de transition entre la dormance et le débourrement du printemps.

Le cycle végétatif se poursuit par le débourrement des bourgeons latents au printemps et l'apparition des organes préformés. On considère généralement que le cycle végétatif est annuel avec une durée d'environ 7 mois, et ne commence qu'à partir du débourrement des bourgeons latents. Mais en fait, en raison de la formation des primordia foliaires, il semble plus juste de le considérer, comme le cycle reproducteur, étalé sur 2 millésimes, même si la totalité des organes végétatifs ne sont pas formés la première année. Le débourrement débute en

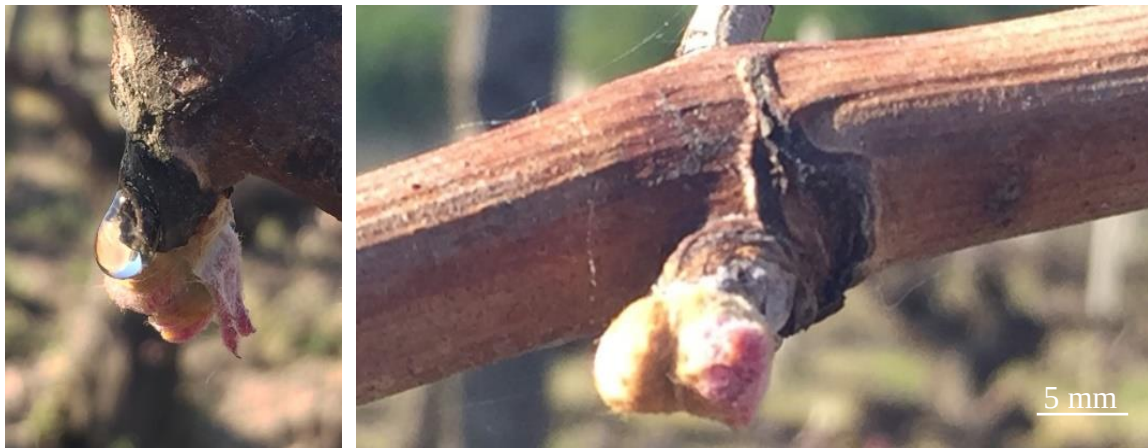


Figure 6 : Bourgeons au stade 05 de l'échelle BBCH. (A) bourgeon avec pleurs ; (B) bourgeon dans le coton (Photo : Anna Li-Mallet).

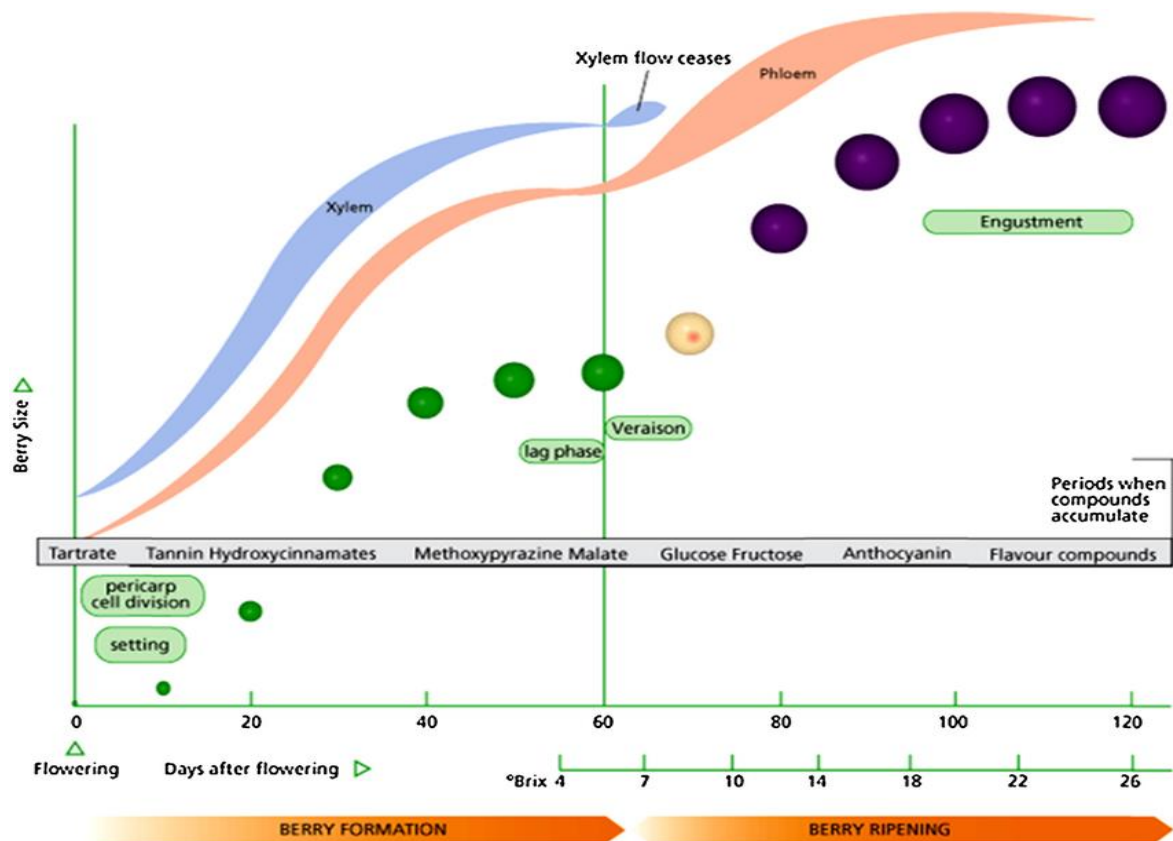


Figure 7 : Courbe de croissance et de développement de la baie (Kennedy, 2002).

général en fin d'hiver début du printemps avec reprise de la croissance active dans le bourgeon et du système racinaire en raison de l'augmentation des températures du sol (Alleweldt, 1965). Cette transition est marquée par l'exsudation de la sève xylémienne, appelée aussi « pleurs », visible à la surface d'incision de la taille d'hiver, ou toute autre plaie non subérifiée, sous l'action de la poussée racinaire (Figure 6A). Quand les conditions climatiques sont favorables pendant la phase de prédébourrement (température minimum atteinte et sommes de températures suffisantes pour un cépage donné), les bourgeons acquièrent les potentialités de croissance. Lorsque le seuil de température est atteint ($\geq 10^{\circ}\text{C}$ en moyenne) pendant une durée de 3 à 8 jours consécutifs, le débourrement est observé (Figure 6B) (Pouget, 1963 ; Buttrose, 1970 ; Olivain et Bessis, 1987 ; Carbonneau et *al.*, 1992).

Les nouvelles pousses sorties poursuivent leur développement de façon sigmoïdale, avec une courte période de croissance lente suivie par une phase de croissance rapide et active des tiges et des feuilles (maturation et néoformation). En général, à partir de fin juillet-début août, la croissance végétative ralentit et l'aoûtement des rameaux commence. Le cycle se termine avec la chute des feuilles en fin d'automne, après reconstitution des réserves. La plante rentre à nouveau en repos hivernal.

II.3.2. Cycle reproducteur

Le cycle reproducteur commence dans les bourgeons latents de l'année N-1, et partage des phases communes à la préformation des organes végétatifs du cycle végétatif. Au cours de cette période, les primordia inflorescentiels (PI) et vrillaires (PV) vont se développer et former les futures grappes. A partir d'août, ces bourgeons deviennent tout d'abord « dormants », puis « latents » après la levée de dormance en début d'hiver. Dans notre étude, la première année du cycle producteur est nommée « saison 1 ».

Le cycle se poursuit en « saison 2 » avec le débourrement des bourgeons latents formés l'année N-1 et conservés à la taille. L'axe principal et les primordia foliaires se développent respectivement en tige et feuilles, alors que le cycle reproducteur continue avec le développement des inflorescences à partir des primordia inflorescentiels formés en année N-1. Les inflorescences formeront des fleurs qui seront fécondées pour donner, après la nouaison, des baies et des pépins de raisin. La croissance des baies suit une double sigmoïde (Figure 7) avec deux phases (phase herbacée et phase de maturation) séparées par une période de latence (plateau herbacé) (Barnard et Thomas, 1933 ; Bessis, 1965 ; Bugnon et Bessis, 1968 ; Khanduja et Balasubrahmanyam, 1972 ; Srinivasan et Mullins, 1976 ; Williams, 2000).

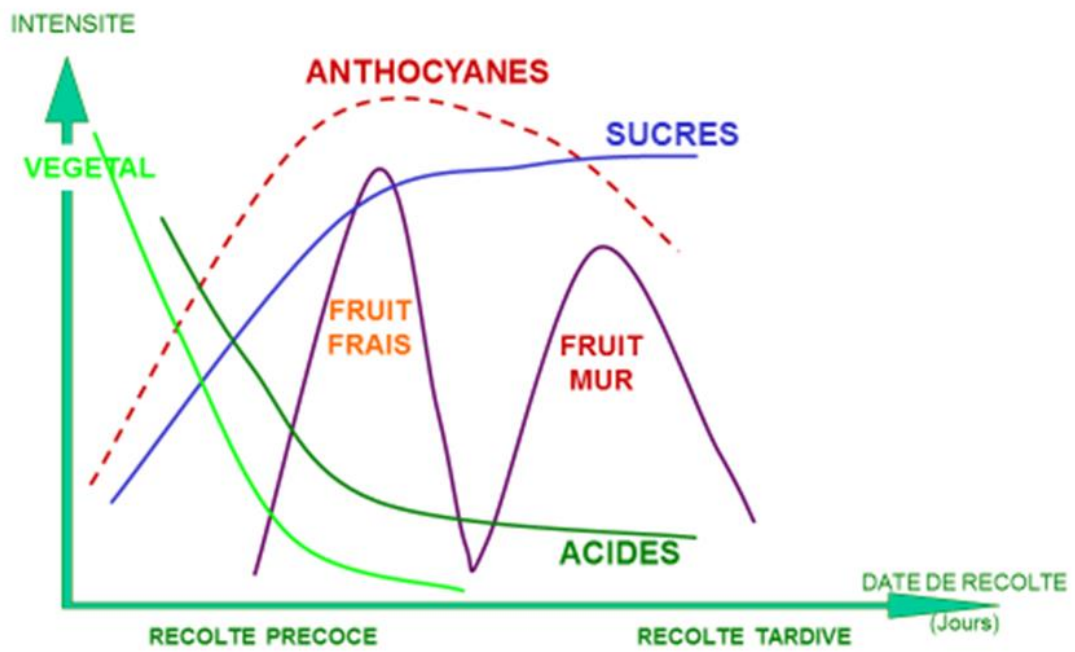


Figure 8 : Evolution des molécules d'intérêt œnologique à partir de la véraison jusqu'à la surmaturité (Source : www.enosens-grezillac.fr)

La phase herbacée correspond à la formation et à la croissance de la baie et des pépins, essentiellement dues aux multiplications et aux grandissements cellulaires (Ollat *et al.*, 2002 ; Cadot *et al.*, 2006). Durant cette phase, la baie reste verte, acide et amère. Bien que l'activité photosynthétique soit significative dans la baie, pour assurer ses besoins métaboliques, le transport xylémien et phloémien reste dynamique (Ollat *et al.*, 2002 ; Kappel, 2010 ; Reynier, 2011). A la fin de cette phase, le volume des pépins atteint presque son maximum. La croissance se ralentit par la suite et marque le plateau herbacé.

Après ce plateau herbacé, qui dure quelques jours selon les conditions climatiques, la phase de maturation débute avec la véraison. Elle est caractérisée par un ramollissement de la baie et un basculement métabolique (Figure 8). Le volume de la baie augmente à nouveau de manière importante, grâce à la reprise du grandissement cellulaire. Il est accompagné du chargement en sucres et en eau des vacuoles (Ollat *et al.*, 2002). En même temps, on observe dans la baie une diminution d'acidité en raison de la consommation d'acide malique pour la respiration, une augmentation en anthocyanes qui entraîne la coloration de la pellicule pour les cépages rouges, ainsi que des modifications aromatiques et tanniques (Kappel, 2010). L'ensemble de ces molécules d'intérêt détermine la maturité de la baie qui marque la fin du cycle reproducteur par la récolte.



Figure 9 : Organisation d'un nœud du rameau principal de vigne (Photos Anna LI-MALLET).

III. Bourgeons latents, initiation et différenciation des primordia inflorescentiels

Un bourgeon peut être défini comme une ébauche de rameau protégé par un ensemble de structures écailleuses. Ainsi, cet organe recouvert par des feuilles externes écailleuses contient un ensemble d'ébauches végétatives (ou foliaires) et/ou reproductrices (inflorescentielles ou florales) regroupées sur un axe de croissance extrêmement court (ébauche de très jeune tige).

Chez la vigne, on peut distinguer cinq types de bourgeons : les bourgeons latents, les prompt-bourgeons ou bourgeons anticipés, le bourgeon apical, les bourgeons de la couronne, les bourgeons du vieux bois,

- Bourgeons latents : ces bourgeons axillaires donneront naissance aux rameaux fructifères. Ils ne se développeront que la seconde année de leur formation, et sont le siège de la formation des pièces primordiales au cours de la saison 1 du cycle reproducteur. Après une phase de dormance hivernale, ils débourreront au printemps suivant pour donner des organes caduques végétatifs et reproducteurs ;
- Prompt-bourgeons : les prompt-bourgeons, situés à l'aisselle de la feuille à côté du bourgeon latent, ont la propriété de pouvoir se développer l'année de leur formation et donner les « entre-cœurs », rameaux généralement non fructifères (Huglin et Schneider, 1998) ;
- Bourgeon apical : situé à l'extrémité du rameau, il est le siège de l'organogenèse et de l'histogenèse permettant la formation des organes portés par le rameau ainsi que la croissance en longueur ;
- Bourgeons de la couronne : les bourgeons de la couronne, appelés aussi « bourgeons de l'empattement », sont des bourgeons dormants qui se trouvent à la base du sarment. Ils sont peu fertiles, et peuvent devenir des bourgeons du vieux bois s'ils ne débourrent pas (Bouard, 1971) ;
- Bourgeons du vieux bois : ce sont des bourgeons latents non développés qui se situent sur les bois de plus de deux ans (les bras et le tronc). Ces bourgeons, qui ne sont généralement pas fertiles, peuvent rester à l'état latent pendant plusieurs années puis perdre l'aptitude au débourrement quand ils sont couverts par les couches successives de bois. En revanche, une taille sévère peut provoquer leur débourrement, ce qui forme par la suite des pousses nommées « gourmands » (Huglin et Schneider, 1998).

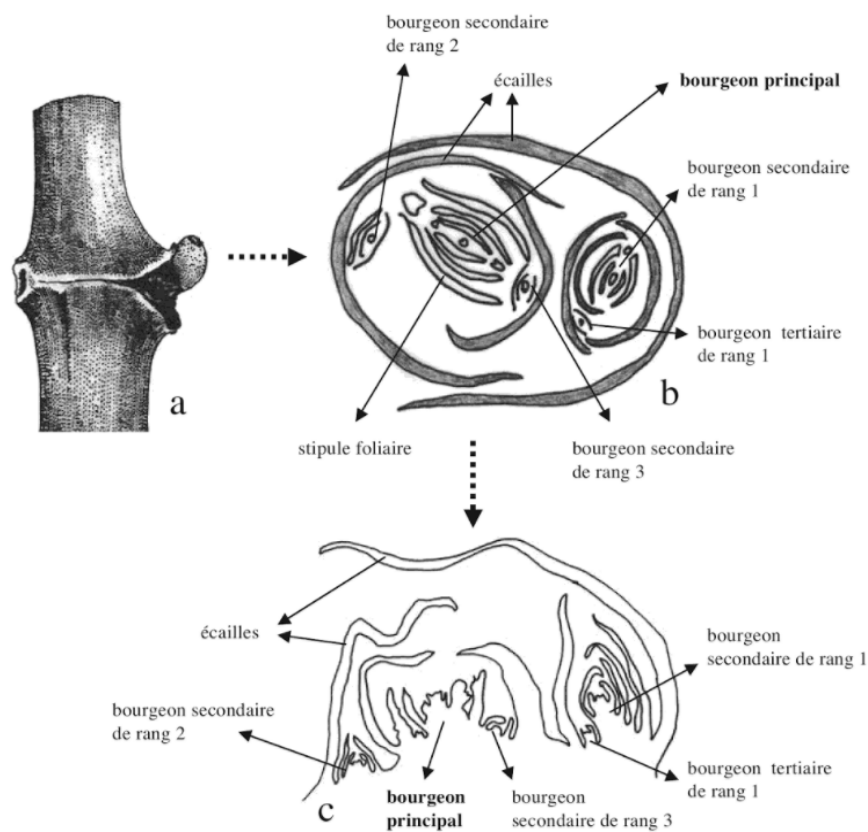


Figure 10 : (a) Morphologie du bourgeon latent à la fin de sa différenciation ; (b) Diagramme en coupe transversale de l'organisation d'un bourgeon latent de vigne ; (c) Coupe longitudinale du bourgeon latent (Carbonneau *et al.*, 2015).

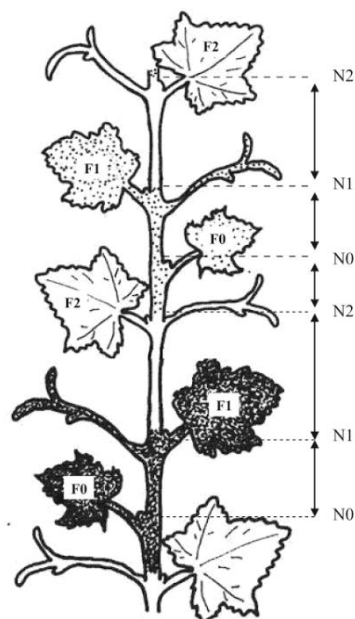


Figure 11 : Théorie sympodiale illustrant le rythme précis de la croissance du rameau et de l'insertion des nœuds (Carbonneau *et al.*, 2015 d'après Zimmermann, 1954 et Bouard, 1966).

III.1. Formation du bourgeon latent et son développement

La durée de vie d'un bourgeon latent est d'environ 10 mois, avec une phase de formation et de développement au cours de la saison 1 du cycle reproducteur, puis une phase de dormance et de latence en fin d'été, en automne et en hiver, avant son débourrement au printemps suivant. Après le débourrement, les jeunes pousses se développent en rameaux principaux sur lesquels des bourgeons axillaires se forment, au niveau de chaque nœud, à l'aisselle de la feuille. Ces premiers bourgeons sont les prompt-bourgeons (ou bourgeons anticipés) qui peuvent débourrer et se développer l'année de leur formation pour donner des rameaux anticipés (ou entre-cœur). Le premier méristème axillaire du prompt-bourgeon se développe ensuite rapidement en formant un bourgeon beaucoup plus complexe, nommé « bourgeon latent » (Figure 9). A l'état juvénile, il est difficile de distinguer le bourgeon latent du prompt-bourgeon, car le bourgeon latent est engainé par la préfeuille du prompt-bourgeon qui deviendra la première écaille du bourgeon latent. On ne peut distinguer les deux types de bourgeons qu'après quelques semaines de croissance.

Un bourgeon latent formé comprend un bourgeon primaire (ou principal) et des bourgeons secondaires (axillaires du principal) et parfois des bourgeons tertiaires (axillaires des secondaires) (Figure 10). Le bourgeon primaire comporte à la fin de sa différenciation des primordia foliaires et des primordia inflorescentiels disposés sur un axe végétatif principal, avec un méristème apical indéterminé et des mérithalles préformés. Les bourgeons secondaires ou tertiaires présentent la même organisation que le bourgeon primaire, mais sont beaucoup moins développés. Ils peuvent avoir potentiellement un comportement similaire à celui du bourgeon primaire, mais n'entrent en croissance que dans des circonstances particulières, telles que la destruction accidentelle du bourgeon primaire avant le débourrement ou celle du rameau principal après le débourrement, ou dans le cas d'un excès de vigueur (Carbonneau *et al.*, 2015).

A l'opposé des bourgeons latents, et donc des feuilles, sont insérés les organes oppositifoliés (grappes ou vrilles) qui sont disposés suivant un rythme d'insertion précis. Selon la théorie sympodiale, le rameau est formé d'une succession de 3 nœuds : le premier ne possédant aucun organe oppositifolié et appelé N0, suivi par deux nœuds portant une structure oppositifoliée et nommés respectivement N1 et N2, cette suite se reproduisant tout le long du rameau (Figure 11) (, Carbonneau, 1976 ; Louarn, 2005). Ce rythme est très important car il affecte non seulement la longueur moyenne des mérithalles, mais aussi la fertilité des bourgeons latents selon leur position d'insertion et l'existence ou non d'organes oppositifoliés (Bessis, 1965 ; Carbonneau, 1976 ; Olivain et Bessis, 1987).

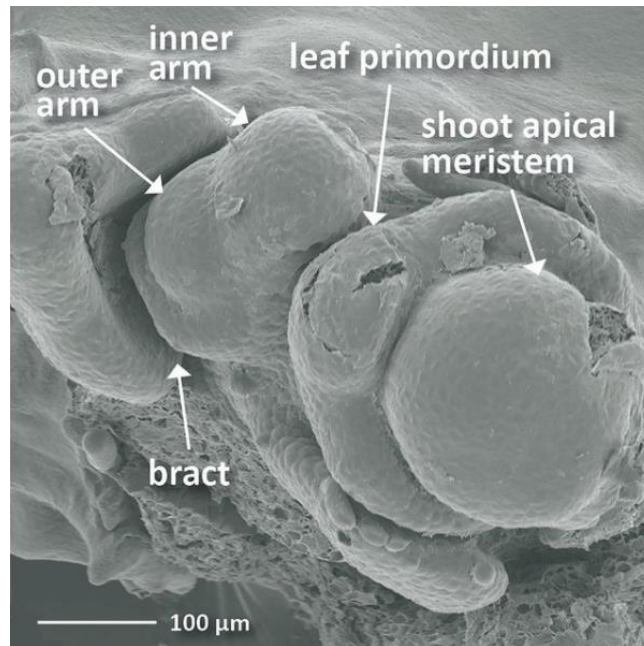


Figure 12 : Organisation des pièces primordiales d'un bourgeon latent après dissection et observation en microscope à balayage (Noyce *et al.*, 2015).

III.2. Initiation et différenciation des primordia inflorescentiels

Dans un complexe de bourgeons latents, bien que le bourgeon primaire soit en général dix fois plus fertile que les bourgeons secondaires, du fait de leur aptitude élevée au débourrement, le processus d'initiation et différenciation des primordia inflorescentiels reste le même.

La première manifestation de la croissance reproductive dans un bourgeon primaire correspond à la formation d'un « anlage » (ou ébauche d'organe oppositifolié) à partir du méristème végétatif du bourgeon. Il s'agit d'un primordium non différencié qui peut être considéré comme un indicateur de l'axe de formation des primordia inflorescentiels (Srinivasan et Mullins, 1976 ; Williams, 2000 ; Keller, 2009). L'anlage commence à se développer avec la formation d'une bractée dès que 3 à 4 primordia foliaires se sont formés dans le bourgeon primaire, et lorsqu'entre 11 et 22 jeunes feuilles s'installent sur le rameau principal portant ce bourgeon (Alsaïdi, 1975 ; Williams, 2000 ; Vasconcelos *et al.*, 2009). L'anlage se divise ensuite en deux parties de taille inégale, appelées des bras, qui ont le potentiel de produire des primordia d'organe oppositifolié, c'est-à-dire des primordia inflorescentiels ou vrillaires. Le bras le plus près de l'axe principal (bras interne) présente une taille supérieure au bras adjacent de la bractée (bras externe) (Figure 12) (Srinivasan et Mullins, 1976 ; Mullins *et al.*, 1992).

Les primordia inflorescentiels peuvent être formés à partir des deux bras (Srinivasan et Mullins, 1978). Le bras interne, ayant plus de potentialité à se différencier et à produire des ramifications globuleuses que le bras externe, contribuera par la suite, à la formation du corps principal de la future grappe, alors que le bras externe possèdera moins de ramifications (May, 1965 ; Srinivasan and Mullins, 1976). Le bras interne se différencie plusieurs fois et forme des bractées, contre lesquelles peuvent se trouver des ramifications secondaires et tertiaires axillaires. Le degré de ramification du bras interne se réduit graduellement dans le sens acropète (Srinivasan et Mullins, 1976 ; Williams, 2000 ; Vasconcelos *et al.*, 2009). De plus, une initiation d'anlage précoce dans la saison entraîne une ramification précoce des bras, donc du développement et la différenciation des primordia inflorescentiels (Cheema *et al.*, 1996). Après la formation de 1 à 3 primordia inflorescentiels dans le bourgeon primaire (dépendant du cépage et de la date de formation du bourgeon latent sur le rameau principal), le bourgeon latent entre en dormance (Pratt, 1971 ; Srinivasan et Mullins, 1976 ; Olivain et Bessis, 1987).

En revanche, les anlagen n'évoluent pas systématiquement en primordia inflorescentiels. Ils pourraient aussi devenir des primordia vrillaires en fonction des conditions environnementales (Srinivasan et Mullins, 1976 ; Srinivasan et Mullins, 1979). En effet, les

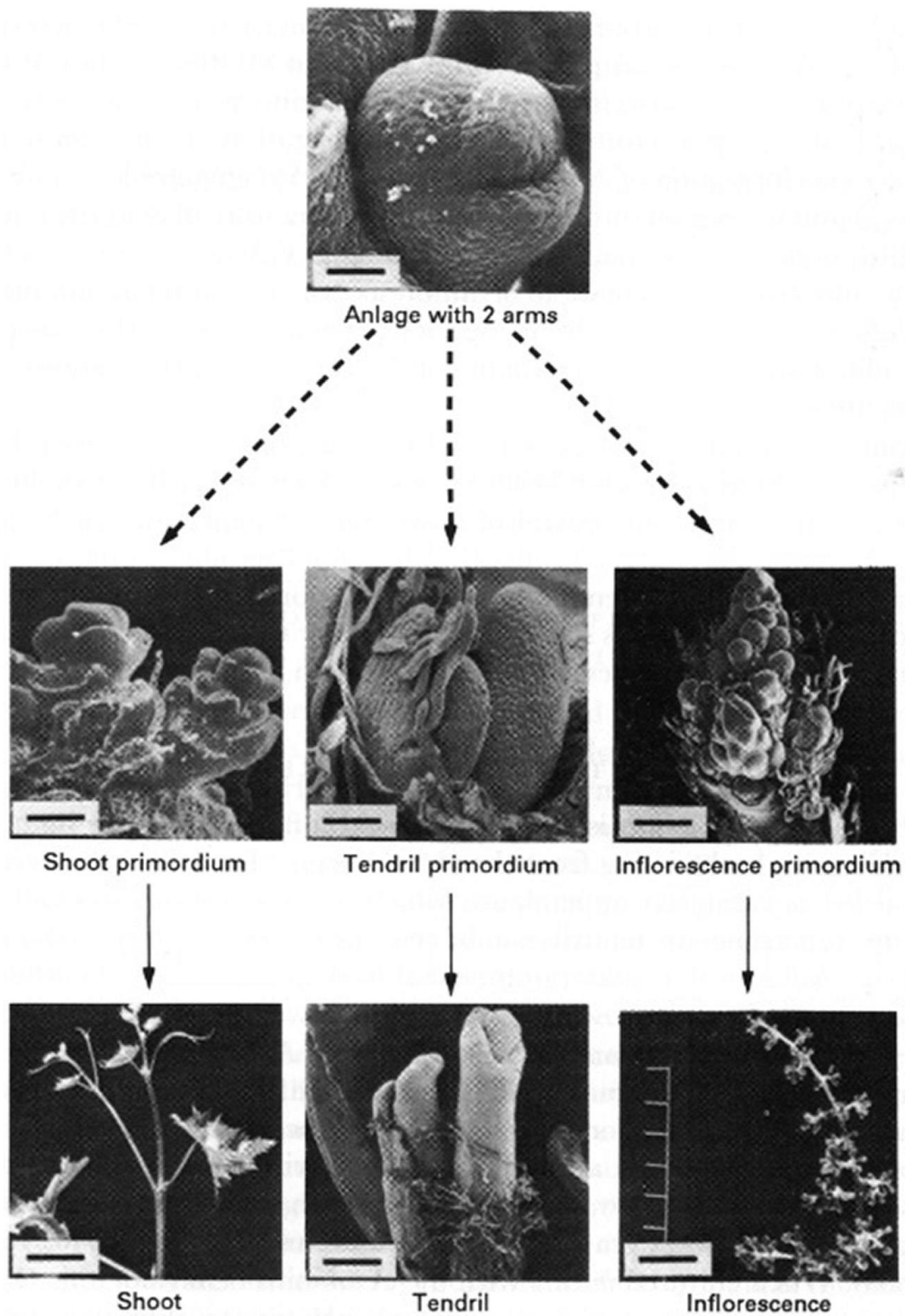


Figure 13 : Développement de l'apex du rameau, de la vrille et de l'inflorescence à partir du méristème apical et de l'anlage (Mullins *et al.*, 1992).

vrilles et les inflorescences de la vigne sont des homologues structuraux puisque tous deux sont dérivés du même anlage (Alsaïdi, 1975 ; May, 2000). La différence majeure entre ces deux voies alternatives d'évolution réside dans le fait que les anlagen qui subissent de nombreuses ramifications répétitives formeraient les primordia infloresceniels, alors que ceux qui se ramifient peu se développeraient en primordia vrillaires. Ainsi, un primordium vrillaire pourrait être considéré comme un primordium infloresceniel incomplètement évolué (Figure 13). De nombreux auteurs ont montré qu'un primordium vrillaire serait capable de se transformer en primordium infloresceniel et *vice versa* (Alsaïdi, 1975 ; Srinivasan et Mullins, 1979 ; Boss et Thomas, 2000).

III.3. Rythme de l'initiation et de la différenciation des primordia infloresceniels

Le rythme de la formation des anlagen dépend à la fois du cépage et des conditions environnementales.

Les données bibliographiques varient et indiquent des rythmes très variables pour lesquels il est souvent difficile de faire la part des choses entre l'effet du cépage et/ou des conditions environnementales. Par exemple, pour le Riesling et l'Aris cultivés en Allemagne, le développement des anlagen commence 5 à 7 semaines avant la floraison (Alleweldt et Ilter, 1969), alors qu'il ne débiterait que 12 à 15 jours avant la floraison dans les bourgeons de la base du « Chenin blanc » (Swanepoel et Archer, 1988). La formation du premier primordium infloresceniel chez l'Ugni blanc en France aurait lieu 9 semaines après débourrement, coïncidant avec la floraison, et le second serait initié environ 12 jours plus tard. Pour d'autres auteurs, la différenciation des primordia infloresceniels se terminerait souvent avec l'apparition d'un troisième primordium infloresceniel qui se mettrait en place 18 jours après le second (Alsaïdi, 1975). Swanepoel et Archer (1988) ont noté que l'initiation et la différenciation des premiers et seconds primordia infloresceniels des deux premiers bourgeons de la base seraient complètes environ 25 jours après la floraison. Pour le « Merlot » dans la région bordelaise (France), l'initiation débiterait 6 semaines après débourrement alors que cette phase serait observable 5 semaines après débourrement pour la « Syrah » à Montpellier (Carolus, 1970 ; Cheema *et al.*, 1996). Pour un même cépage, les conditions environnementales peuvent aussi impacter le rythme de l'initiation et la différenciation des primordia infloresceniels. Watt *et al.* (2008) ont indiqué que pour le « Chardonnay » en Australie, l'initiation des anlagen commencerait 4 semaines après débourrement à Barooga (climat chaud avec une température moyenne de 22,3 °C en janvier), et 6 semaines après le débourrement à Kyneton (climat froid avec une température moyenne de 18,1 °C en janvier), alors que le retard

du débourrement des bourgeons à Kyneton par rapport à Barooga ne dépasse pas 3 jours.

Ainsi les différences de rythme de formation du bourgeon sont encore mal connues et dépendent sûrement fortement de facteurs exogènes qui ne permettent pas, à ce jour, de proposer un calendrier fiable pour un cépage ou pour l'ensemble des cépages d'une même région viticole. Néanmoins, ces phases sont essentielles car elles conditionnent le début de la formation des futures grappes et le rendement final. L'impact sur la fertilité des bourgeons semble donc être fortement influencé par ce rythme. De ce fait, posséder un calendrier des durées des étapes essentielles de l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels pourrait être un outil intéressant pour évaluer la fertilité d'une parcelle et/ou adapter les pratiques culturales.

III.4. Fertilité potentielle des bourgeons et constitution du rendement

III.4.1. Différentes notions de la fertilité

La fertilité des bourgeons a été définie de plusieurs façons différentes par de nombreux chercheurs dès les années 1930.

La première façon d'exprimer la fertilité est de compter le nombre moyen de grappes portées par un cep. Plus précisément, on peut également compter le nombre moyen de grappes par bourgeon définissant ainsi l'« indice de fertilité » (Laporte, 1937). Cet indice est donc propre à chaque cépage et peut être extrêmement variable (il est de 1,23 pour le Pinot et de 3,47 pour le Chasselas de Fontainebleau). Cette notion a été améliorée par Branas *et al.* (1943) qui prennent en compte la différence de fertilité des bourgeons en fonction de leur rang d'insertion sur le rameau. Ils ont ainsi défini la fertilité comme le rapport N/x , N étant le nombre de grappes apparentes et x étant le nombre de bourgeons du même rang d'insertion des différents individus d'un même cépage. Cette notion a été reprise et appelée par Bessis (1960) « fertilité potentielle ». Or, en fonction du rang d'insertion, tous les bourgeons d'un même rameau n'ont pas la même aptitude au débourrement, puisque cette dernière évolue dans un sens acropète, c'est-à-dire augmente du rang 1 au rang 5, puis reste stable pour les bourgeons du milieu (du rang 6 au rang 10) et enfin diminue pour les bourgeons apicaux (du rang 11 à l'extrémité). Cette différence de capacité à débousser fait apparaître l'impact du débourrement sur le rendement final, permettant ainsi à Baltatu (1956) de définir le « coefficient réel de fertilité » en multipliant le pourcentage de débourrement d'un cep par l'indice de fertilité. En groupant tous ces facteurs importants, Bessis (1965) a distingué deux types de fertilité potentielle : la « fertilité potentielle réelle » sans tenir compte du taux de débourrement et la « fertilité potentielle apparente » qui est la valeur du rapport du nombre de grappes visibles après le débourrement au nombre de

pousses de même rang qui portent ces grappes. Ainsi selon les auteurs et les études menées, les indicateurs de fertilité peuvent varier rendant complexe la comparaison des résultats obtenus.

Dans notre étude, lorsque nous utiliserons le terme « fertilité » seul, il s'agira de la définition de la fertilité au sens strict, c'est à dire celle correspondant au nombre moyen des primordia inflorescentiels développés au sein des bourgeons latents du même rang d'un cep avant débourrement, correspondant ainsi à la « fertilité potentielle réelle » (« fruitfulness » en anglais) (Bessis, 1965 ; Srinivasan et Mullins, 1981a ; Dry, 2000 ; Williams, 2000 ; Sanchez et Dokoozlian, 2005). Si nous extrapolons nos résultats après le débourrement, nous utiliserons le terme de « fertilité potentielle apparente ». Il est important de noter la différence entre la « fertilité potentielle réelle » et la « fertilité potentielle apparente » (« bud fertility » en anglais), car cette dernière est impactée par le mode de taille qui, en modifiant les phénomènes d'acrotonie et d'inhibition corrélatives, affecte les taux de débourrement. En revanche, la fertilité d'un bourgeon de l'année N est un indice clé de la fertilité potentielle apparente de l'année N+1, en impactant directement le nombre de grappes portées par ce nœud.

III.4.2. Constitution du rendement

D'un point de vue purement économique, la fertilité peut être aussi définie comme le rendement final, exprimé en kilogrammes (kg) par cep, ou même directement en hectolitres (hL) par hectare (Galet, 1957). C'est d'ailleurs une représentation numérique très pratique de la fertilité potentielle apparente, et couramment utilisée par les viticulteurs aujourd'hui. Le rendement d'un cep est souvent déterminé selon une méthode mathématique simplifiée :

$$\frac{\text{poids des baies}}{\text{cep}} = \frac{\text{nombre de grappes}}{\text{cep}} \times \frac{\text{nombre de baies}}{\text{grappe}} \times \text{poids moyen des baies}$$

Le nombre de grappes par cep est prédéterminé en grande partie par le nombre de primordia inflorescentiels dans les bourgeons latents formés pendant la saison 1, donc la fertilité potentielle réelle. Durant la deuxième année du cycle reproducteur, la qualité du débourrement, de la floraison et de la nouaison conditionne le nombre de grappes par cep, alors que le poids moyen des baies résulte de la croissance et de la maturation des baies.

De nombreuses recherches ont montré que les fluctuations saisonnières (d'une année à l'autre) du rendement final pouvaient varier d'au moins 15%, mais plus souvent de plus de 35% (Bessis, 1965 ; Clingeleffer, 1984 ; Clingeleffer et Krstic, 2001 ; Bramley et Hamilton, 2004 ; Bramley 2005 ; Hall *et al.*, 2011). Le nombre de grappes par cep et le nombre de baies par grappe pourraient expliquer respectivement 60% et 30% des variations saisonnières du

rendement final pour un vignoble donné, alors que le poids moyen des baies n'impacterait que 10% de ces variations (Dry, 2000 ; Dunn et Martin, 2007 ; Clingeleffer et Krstic, 2001 ; Clingeleffer, 2010, Guilpart *et al.*, 2014). Ces résultats mettent en avant l'importance de la fertilité des bourgeons, et particulièrement du processus de l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels dans les bourgeons latents de l'année N, sur la fluctuation saisonnière du rendement final de l'année N+1.

IV. Impact des facteurs abiotiques et biotiques sur l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels

La constitution du rendement et ses variations saisonnières ont été rapportées précédemment comme étant étroitement liées à la « qualité » de l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels, en termes de nombre et de taille. De ce fait, la régulation de l'initiation et de la différenciation des primordia inflorescentiels est essentielle au contrôle de la fertilité des bourgeons latents et du rendement.

Les mécanismes de régulation, encore très mal connus, peuvent être impactés par différents facteurs abiotiques (température, lumière et état hydrique) et biotiques (nutrition énergétique et minérale, contrôles hormonaux et moléculaires). Jusqu'à aujourd'hui, la plupart des études se sont plutôt focalisées sur les effets de ces facteurs sur la fertilité des bourgeons et le rendement final, notamment les effets de la température, de l'intensité lumineuse, des sucres et de certaines phytohormones telles que les cytokinines (CK) et les gibbérellines (GA), mais très peu ont essayé d'étudier leurs modes de régulation.

IV.1. Impact des facteurs abiotiques et des conditions environnementales

De nombreuses recherches ont abordé les effets des conditions environnementales sur la formation des inflorescences et des fleurs, ainsi que sur la fertilité des bourgeons (May, 1965 ; Buttrose, 1969a, 1969b, 1969c et 1970 ; Mullins *et al.*, 1992 ; Clingeleffer et Krstic, 2001 ; Sanchez et Dokoozlian, 2005 ; Carmona *et al.*, 2008 ; Al-Obeed *et al.*, 2010 ; Guilpart *et al.*, 2014).

Ainsi, la température, la photopériode, la lumière ou le stress hydrique affecteraient les mécanismes et le déroulement de l'initiation et de la différenciation des primordia inflorescentiels. Ces facteurs pouvant avoir des effets seuls ou en synergie, l'initiation et la différenciation optimales des primordia inflorescentiels nécessiteraient une combinaison de chaleur, d'intensité lumineuse suffisante et d'absence de stress (Buttrose, 1970 ; Kliewer, 1975 ; Zelleke et Kliewer, 1979 ; Dunn et Martin, 2000 ; Petrie et Clingeleffer, 2005 ; Jones *et al.*, 2009).

IV.1.1. Température

De nombreux rapports indiquent que la formation des primordia inflorescentiels exigent des températures élevées (Alleweldt, 1963 ; Buttrose, 1974a ; Zelleke et Kliewer, 1979 ;

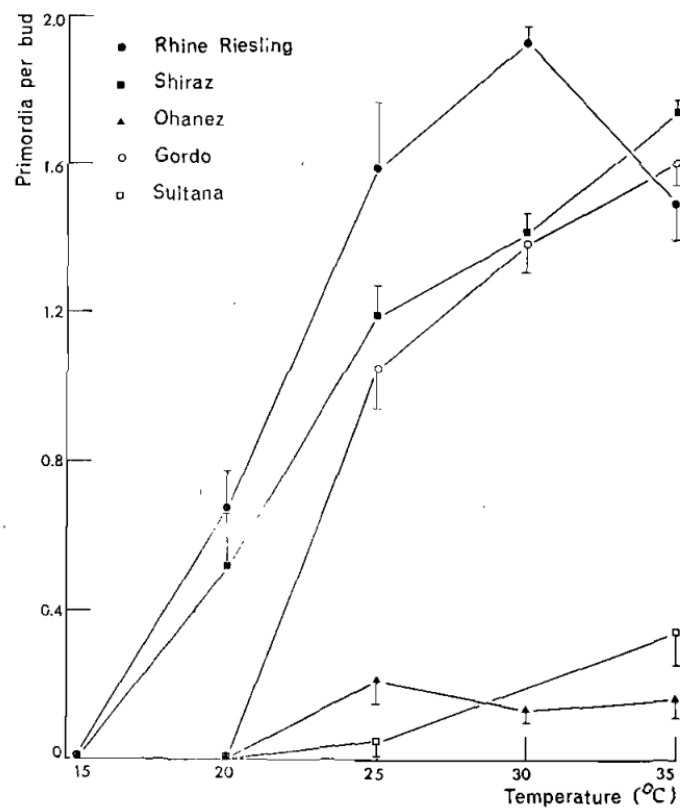


Figure 14 : Effet de la température sur le nombre moyen de primordia inflorescentiels par bourgeon pour les 12 bourgeons de la base du rameau (Buttrose, 1970).

Srinivasan et Mullins, 1980a ; Dunn et Martin, 2000 ; Petrie et Clingeleffer, 2005). Il a été montré qu'il existait une corrélation entre la température durant la phase d'initiation des primordia inflorescentiels en année N et le nombre d'inflorescences portées par le rameau pendant la floraison en année N+1 (Alleweldt, 1963). Buttrose (1974a) suggère même qu'il existe une période critique susceptible de répondre à de hautes températures 3 semaines avant la formation des anlagen pour le méristème des bourgeons latents, c'est-à-dire, 1 à 4 semaines après le débourrement selon les cépages.

L'initiation optimale des primordia inflorescentiels pendant la saison 1 nécessite en général une température supérieure à 20°C, mais cette température peut varier en fonction des cépages, et des conditions climatiques (Buttrose, 1970 ; Kasimatis *et al.*, 1975 ; Zelleke et Kliewer, 1979 ; Dunn et Martin, 2000 ; Petrie et Clingeleffer, 2005). Une courte période de fortes températures (30-35°C) pendant seulement 4 à 5 heures par 24 heures serait suffisante pour induire le nombre maximal de primordia inflorescentiels (Buttrose, 1969a, 1969b, 1970 ; Srinivasan et Mullins, 1981a, 1981b). Pour des vignes cultivées en pots et sous conditions environnementales contrôlées, Buttrose (1970) a démontré que l'initiation des primordia inflorescentiels du Muscat d'Alexandrie ne pouvait pas avoir lieu pour une température inférieure à 20°C, alors que pour la même température, le Riesling et la Syrah présentaient déjà un nombre moyen d'environ 0,5 primordia inflorescentiels initiés. Dans cette même étude, Buttrose démontre que la fertilité des bourgeons latents pour le Riesling atteint son maximum vers 30°C, alors que celle du Muscat d'Alexandrie et de la Syrah continuent à augmenter jusqu'à 35°C (Figure 14). De manière plus générale, il semblerait également que les cépages américains (hybrides interspécifiques), tels que le Delaware (*Vitis labrusca* L.), formeraient des primordia inflorescentiels dès 21 – 22°C, alors que les *Vitis vinifera* L. exigeraient en général une température de 25 à 28°C (Buttrose, 1970 ; Srinivasan et Mullins, 1981a ; Mullins *et al.*, 1992).

Le nombre maximum et la taille des primordia inflorescentiels pour un cépage donné sembleraient être aussi impactés par la température. Une courte exposition aux températures élevées est essentielle à l'initiation du second, voire du troisième primordium inflorescentiel pour beaucoup de cépages, y compris des cépages de climat froid comme par exemple le Thompson Seedless et l'Ohanez qui sont moins reproductifs que la plupart des cépages, mais répondent plus aux variations de température (Mullins *et al.*, 1992). De même, pour le Petit Manseng, une température moyenne supérieure à 24°C entre le 6 et le 25 juin dans le sud de la France peut induire un nombre maximum d'inflorescences pour l'année N+1. En revanche, quand la température moyenne est inférieure à 15°C pendant cette période, aucun primordium inflorescentiel n'est produit (Durquety *et al.*, 1982). Plus récemment, une forte relation

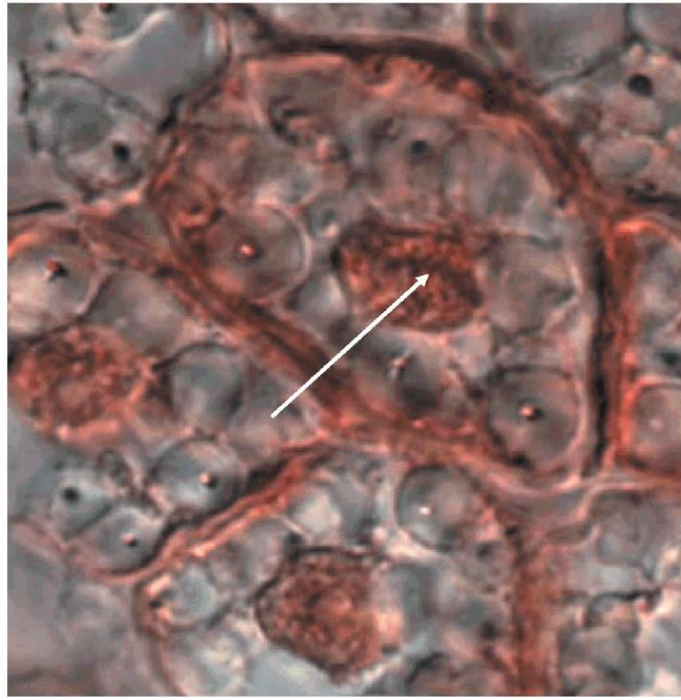


Figure 15 : Métaphase avec chromosomes alignés sur le plan équatorial dans le noyau d'une cellule méristématique d'un primordium inflorescentiel (mag 100 x huile à immersion). Photo prise au 18 juillet 2007 (Jone *et al.*, 2009).

linéaire entre la température durant l'initiation des primordia inflorescentiels en année N et le nombre de grappes par cep en année N+1 a été décrite pour le cépage « Chardonnay » : le nombre de grappes par rameau augmente de 0,22 par degré centigrade sur une plage de température de 13,8 à 17,5°C (MacGregor, 2000). De plus, les basses températures (inférieures à 20°C) au début du printemps ne permettraient pas de différenciation des primordia inflorescentiels et réduiraient donc leur taille, ce qui favoriserait la formation des vrilles et provoquerait ainsi une diminution de la fertilité des bourgeons (Buttrose, 1970).

De manière générale, l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels se terminent au moment de l'entrée en dormance et seraient bloquées par les températures froides. Or, dans certaines régions viticoles, les températures moyennes hivernales peuvent être insuffisamment basses pour induire et/ou prolonger la dormance. En 2009, Jones *et al.* montrent que dans certaines régions australiennes (sud de la Tasmanie), la température moyenne hivernale varie entre 4,1 et 12,4°C et provoque une mauvaise entrée en dormance des bourgeons du Pinot Noir, ce qui pourrait entraîner la poursuite du développement des primordia inflorescentiels dans les bourgeons latents (Figure 15). A Bordeaux, la température hivernale actuelle varie entre 3,3 et 10°C, mais dans un contexte de changement climatique, elle pourrait fortement augmenter et être comparable à celle des régions australiennes, modulant ainsi le rythme des phases d'initiation et de différenciation inflorescentielle. Ainsi, en plus des effets de la température printanière durant la période d'initiation des primordia inflorescentiels sur la fertilité des bourgeons, les températures hivernales doivent aussi être considérées, car elles pourraient favoriser un prolongement du développement des primordia inflorescentiels dans les régions à hiver tempéré et agir directement sur le rendement (Jones *et al.*, 2009).

En revanche, pour la saison 2 du cycle producteur en année N+1, certains auteurs ont décrit des effets contraires de la température avec une diminution du nombre de fleurs par inflorescence sous haute température. En conditions contrôlées, Pouget (1981) a montré qu'en appliquant des températures différentes juste avant et après le débourrement, le nombre de fleurs par inflorescence pouvait être modifié. Ainsi, à 12°C, le nombre de fleurs par inflorescence est significativement plus important qu'à 25°C chez le Merlot et le Cabernet sauvignon. Des résultats similaires ont été observés pour le Grenache et le Cardinal. Le nombre de fleurs est réduit sous 28°C par rapport à 12°C, dû à l'échec du développement des calices d'un certain nombre de primordia floraux à haute température (Ezzili, 1993). Pouget (1981) explique que les températures élevées entraînent une croissance trop rapide des organes végétatifs, et par conséquent un ralentissement de la formation des fleurs. May (1987) suggère également que les températures élevées pourraient causer une augmentation des cytokinines

dans les fleurs précocement initiées qui elles-mêmes auraient inhibé la formation d'autres fleurs. De ce fait, les bourgeons mis à l'ombre et soumis à des températures basses avant le débourrement auraient un nombre de fleurs plus important (Dunn et Martin, 2000 ; Petrie et Clingeleffer, 2005 ; Jones *et al.*, 2009). Sachant que la saison 2 du cycle reproducteur de l'année N est superposée avec la saison 1 du cycle reproducteur de l'année N+1, il est donc important de considérer les effets contraires de la température du printemps sur les rendements finaux de l'année N+1 et de l'année N+2.

IV.1.2. Lumière

Chez beaucoup de plantes herbacées, les différentes caractéristiques de la lumière, telles que la qualité de la lumière, l'intensité lumineuse et la photopériode, ont des influences aussi bien sur la fertilité des bourgeons (nombre d'inflorescences) que sur l'induction florale (Leduc *et al.*, 2014 ; Demotes-Mainard *et al.*, 2016 ; Huché-Thélier *et al.*, 2016). Chez la vigne, ces différentes caractéristiques ne semblent pas toujours vraies.

Contrairement à la plupart des plantes herbacées qui sont sensibles aux longueurs d'ondes de la lumière, l'influence du R/FR (ratio rouge/rouge lointain) sur la fertilité des bourgeons latents n'est pas significative chez la vigne (May, 1965 ; Dry, 2000). Aucune donnée ne concerne d'autres longueurs d'ondes. Néanmoins, Fallah et Kahrizi ont démontré en 2017 que les différentes longueurs d'ondes pouvaient impacter le développement des bourgeons axillaires de Crimson Seedless en condition de culture *in vitro*.

L'intensité lumineuse quant à elle, est un facteur clé pour l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels durant la saison 1, bien qu'il soit difficile de séparer les effets de l'intensité lumineuse et de la température sous conditions naturelles. Depuis plus de 50 ans, différentes approches ont été menées afin d'étudier les effets de la lumière, comme par exemple l'utilisation de serres ou de phytotrons (Vasconcelos *et al.*, 2009). Antcliff *et al.* (1955) ont été les premiers à proposer l'existence possible d'une relation entre l'intensité lumineuse et la fertilité des bourgeons (nombre d'inflorescences par rameau) dans les bourgeons du « Sultana ». Les effets de l'intensité lumineuse ont été étudiés dans les vignobles en lien avec la durée d'ensoleillement (Baldwin, 1964), ou encore avec la mise en ombrage (May et Antcliff, 1963). Ainsi, une forte intensité lumineuse seule peut induire un effet positif sur la fertilité des bourgeons (Buttrose, 1970), et quand elle est combinée à des températures élevées, un effet synergique peut être observé (Vasconcelos *et al.*, 2009).

De nombreuses études ont mis en évidence la théorie initiale d'Antcliff et Webster, qui ont souligné les effets de la lumière dans la détermination de la fertilité des bourgeons

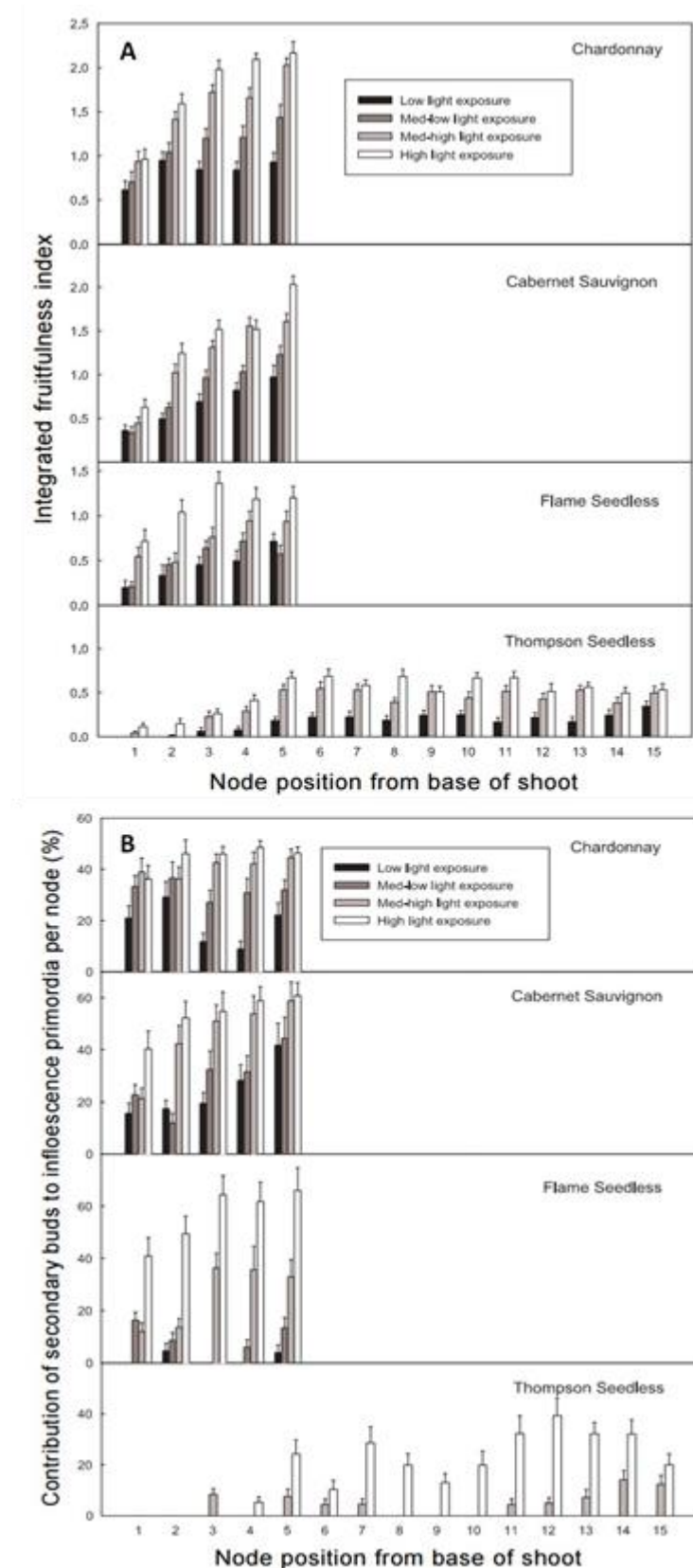


Figure 16 : A) Effet des niveaux d'exposition à la lumière sur le potentiel de fertilité des bourgeons exprimé en indice de fertilité intégrale (IFI) selon les cépages et la position de nœud. IFI est la somme de diamètres maxima moyens de tous les primordia inflorescentiels (mm) issus des bourgeons en dormance ; B) Effet des niveaux d'exposition à la lumière sur la contribution des bourgeons secondaires au potentiel de fertilité des bourgeons selon les cépages et la position de nœud (Sanchez et Dokoozilan, 2005).

(Buttrose, 1969a, 1969b ; Kliewer, 1982 ; Dry, 2000 ; Petrie et Clingeleffer, 2005 ; Sanchez et Dokoozlian, 2005). Les analyses de la perméabilité de la canopée à la lumière et les expérimentations conduites sur différentes formes de la canopée ont montré des changements de rendement final (Carbonneau et Casteran, 1979 ; Kliewer, 1982 ; Reynolds *et al.*, 1996 ; Caspari *et al.*, 1997 ; Loveys *et al.*, 2000 ; Greven *et al.*, 2005). Ainsi, l'intensité lumineuse pourrait influencer la fertilité des bourgeons à travers ses effets sur la photosynthèse et la disponibilité des glucides, mais aussi à travers un effet direct grâce à l'énergie lumineuse appliquée sur les bourgeons eux-mêmes (Vasconcelos *et al.*, 2009). Les bourgeons se situant à l'intérieur de la canopée sont moins fertiles que ceux situés à l'extérieur, à cause du manque de lumière. Ils ont aussi peu de chance de survivre à l'hiver froid à long terme. L'initiation et le développement des primordia inflorescentiels dans ces bourgeons sont aussi réduits (May *et al.*, 1976 ; Morgan *et al.*, 1985). De plus, le nombre de rameaux produits l'année suivante à partir de ces bourgeons latents, ainsi que le nombre de grappes diminueraient (Shaulis et Smart, 1974). Ces auteurs ont aussi rapporté que les feuilles localisées à l'intérieur de la canopée avaient une activité photosynthétique réduite, ce qui impacterait directement la production et l'assimilation des glucides. Ces feuilles ont en plus une durée de vie plus courte, due à des phénomènes de chlorose et d'abscission induits par l'ombrage. L'association entre la forte variabilité de la perception de la lumière par les différents rameaux du même cep et la forte variabilité de rendement final par rameau l'année suivante laissent donc supposer que la lumière est étroitement liée avec la fertilité des bourgeons, le pourcentage de débourrement et l'induction florale (Shaulis et Smart, 1974 ; Vasconcelos *et al.*, 2009). On remarque également que les bourgeons mis à l'ombrage ont une fertilité plus faible, et de ce fait, il semble très important que l'intensité lumineuse soit suffisante et puisse arriver dans la zone de formation des organes reproducteurs sous la canopée afin d'optimiser l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels, et augmenter ainsi la fertilité des bourgeons latents (Hopping, 1977 ; Koblet, 1985 ; Sanchez et Dokoozlian, 2005). Sanchez et Dokoozlian (2005) ont également montré que la lumière impactait positivement la fertilité des bourgeons primaires, mais aussi des bourgeons secondaires (Figure 16). La contribution des deux types de bourgeons au potentiel de fertilité des bourgeons en termes de nombre de primordia inflorescentiels par bourgeon augmenterait avec l'exposition à la lumière des rameaux portant ces bourgeons chez le Thompson Seedless, le Flame Seedless, le Chardonnay et le Cabernet sauvignon. Par ailleurs, la lumière aurait aussi un effet significatif sur la taille des primordia inflorescentiels dans les bourgeons primaires, mais pas dans les bourgeons secondaires, puisque dans les bourgeons primaires, le diamètre des primordia inflorescentiels augmente proportionnellement au niveau d'exposition à la lumière des rameaux porteurs.

Tableau I : Effets de la durée d'exposition sur le nombre moyen de primordia inflorescentiels par bourgeon pour les bourgeons de la base 1-12, le poids moyen des primordia inflorescentiels dans les bourgeons de position 12 et la masse sèche moyenne des plantes (feuilles + rameaux + racines) 13 semaines après débourrement (Buttrose, 1969b).

Experiment	Light regime	Primordia		Plant dry wt.
		No.	Wt. μg	
a	3600 f. c. 16 h/dark 8 h	0.89	19	56
b	3600 f. c. 12 h/dark 12 h	0.23	3	39
c	3600 f. c. 8 h/dark 16 h	0.17	10	26
d	3600 f. c. 7 h/dark 8 h/3600 f. c. 1 h/dark 8 h	0.20	7	24
e	3600 f. c. 8 h/low intensity incandescent light 16 h	0.17	20	35
f	3600 f. c. 12 h/dark 4 h/3600 f. c. 4 h/dark 4 h	0.75	22	57
g	2400 f. c. 24 h	1.23	65	57
h	900 f. c. 24 h	0.34	14	28
L.S.D. ($P < 0.05$)		0.20	n.a.	11
n.a. = not assessed.				

Tableau II : Effets de l'irrigation sur la viabilité des bourgeons et leur potentiel de fertilité chez le Thompson Seedless (Williams, 2000).

	Irrigation treatment (% ET)			
	0.2	0.6	1.0	1.4
Percentage of dissected buds that are alive	99	94	88	81
Percentage of live buds with clusters	68	71	62	58

*The numbers of canes retained after pruning in 1990, 1991, 1992, and 1993 were 4, 6, 6, and 8 per vine, respectively. Buds were dissected in either November or December of each year.

Irrigation treatments consisted of water applications at 20%, 60%, 100%, and 140% of full vineyard evapotranspiration (ET). ET was determined with a weighing lysimeter.

La lumière pourrait également agir *via* la photopériode, mais les effets de la photopériode sur l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels ne sont pas clairs, car il est difficile d'étudier les effets de la photopériode seule sans prendre en compte l'intensité lumineuse. Buttrose (1968) a rapporté qu'en conditions contrôlées, le nombre de primordia inflorescentiels du Muscat d'Alexandrie pouvait augmenter avec la durée du jour, quand l'intensité lumineuse était élevée (>36 000 lux) et quand la durée d'exposition à la lumière était supérieure à 12h (Tableau I). Buttrose (1969b) a continué à constater que pour une même quantité d'énergie lumineuse donnée, les vignes ont le même poids sec, mais pas la même fertilité des bourgeons. Avec une énergie lumineuse totale de 24 000 lux × 24 heures, le nombre de primordia inflorescentiels est plus important que chez les plants soumis à la même énergie totale mais avec 36 000 lux × 16 heures. De ce fait, le mécanisme conduisant à la formation des primordia inflorescentiels ne semble pas être étroitement lié au mécanisme d'accumulation de la masse sèche (photosynthèse nette) qui lui-même dépend de la quantité totale des énergies lumineuses reçues. Quelques années plus tard, des études ont confirmé que pour certains cépages (Riesling et Muscat d'Alexandrie), le nombre de primordia inflorescentiels par bourgeon augmentait quand la durée du jour était plus longue (Buttrose, 1970, 1974a ; Srinivasan et Mullins, 1981a). Tous ces résultats permettraient d'émettre l'hypothèse que si l'intensité lumineuse est suffisamment élevée (>18 000 lux) et fournie pendant plus de 12 heures par jour, la formation des primordia inflorescentiels de certains cépages pourrait dépendre de la durée d'exposition à la lumière. Cependant, toutes ces expérimentations ont été menées en conditions contrôlées sous serre, et aucune étude ne s'est focalisée sur cet aspect en plein champ. Il est donc difficile de confirmer l'impact exact de la photopériode et de la longueur du jour sur la fertilité des bourgeons.

Ainsi, un grand nombre de recherches ont montré la sensibilité des différents cépages à l'exposition à la lumière. Pour le Flame Seedless, les bourgeons primaires à 3 primordia inflorescentiels ne se forment qu'avec une très forte exposition à la lumière, alors que pour le Chardonnay, une exposition moyenne à forte suffit (Sanchez et Dokoozlian, 2005). Le Cabernet sauvignon pourrait induire un troisième primordium inflorescentiel qu'elles que soient les conditions d'exposition à la lumière (Sanchez et Dokoozlian, 2005). Les espèces américaines, y compris *Vitis labrusca*, seraient plus sensibles à la longueur du jour que *Vitis vinifera* (Kobayashi *et al.*, 1965 ; Sugiura *et al.*, 1975). Dépendant des cépages ou des espèces, la sensibilité de la fertilité des bourgeons à l'exposition à la lumière est ainsi différente et peu connue dans le cadre de pieds cultivés en conditions de plein champ.

De la même manière que pour la température, une réflexion doit être menée dans un contexte de changement climatique. Si ce dernier ne change pas fondamentalement l'intensité

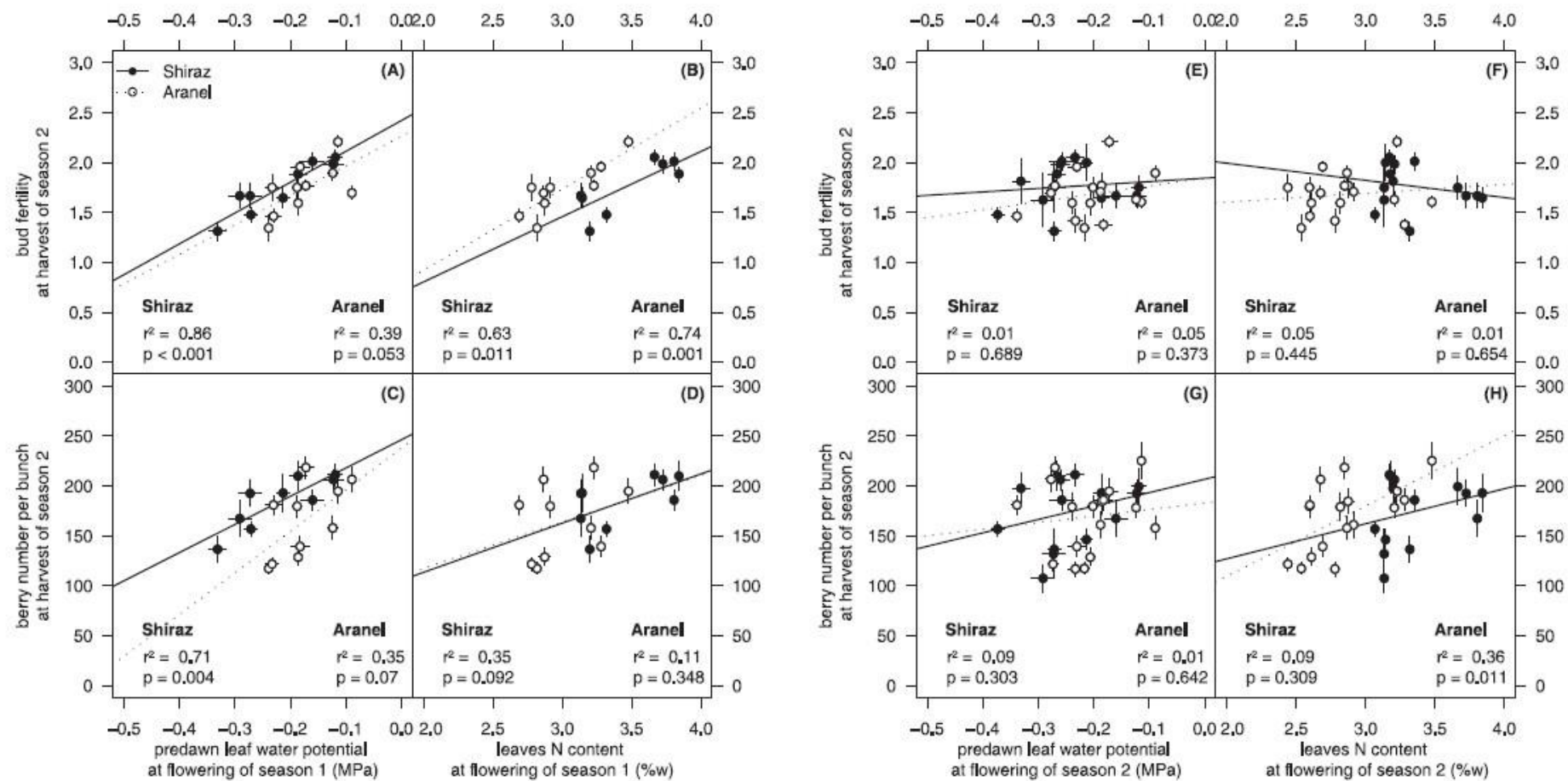


Figure 17 : Effet du statut hydrique et azoté (A à D : en saison 1 ; E à H : en saison 2) sur la fertilité des bourgeons et le nombre de baies par grappe à maturité en saison 2 chez la Syrah et l'Aranel au cours de deux saisons successives (Guilpart *et al.*, 2014).

lumineuse, le fait que l'augmentation de température hivernale puisse avancer le cycle phénologique peut modifier la photopériode et donc affecter les phénomènes cellulaires du bourgeon.

IV.1.3. Etat hydrique

L'état hydrique impacte la fertilité des bourgeons directement *via* la quantité d'eau disponible pour les différents processus de biosynthèse durant la division et l'élargissement cellulaire, mais aussi indirectement en changeant les activités photosynthétiques de la vigne, les flux de sèves, les équilibres hormonaux, la nutrition minérale et le microclimat autour des bourgeons latents (Loveys *et al.*, 1973 ; Dry et Loveys, 1998 ; Srinivasan et Mullins, 1978, 1979, 1980a). Deux cas de figure peuvent avoir des effets significatifs sur la fertilité des bourgeons durant la saison 1 : le stress hydrique, c'est-à-dire le déficit en eau et l'alimentation excessive en eau.

Un stress hydrique persistant réprime la fertilité des bourgeons en affectant à la fois le nombre et la taille des primordia inflorescentiels (Huglin, 1960 ; Vaadia et Kasimatis, 1961 ; Buttrose, 1974b ; Guilpart *et al.*, 2014). Williams (2000) a montré que, pour le Thompson Seedless, une irrigation optimale (entre 20% et 60% de l'évapotranspiration totale de tout le vignoble) pendant la saison 1 diminuait le taux de nécrose des bourgeons, favorisait l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels, et donc améliorait la fertilité des bourgeons latents pour le rendement final de la deuxième année (Tableau II). Une diminution de la fertilité des bourgeons et une baisse de la masse sèche des rameaux portant ces bourgeons sont également observées simultanément. De ce fait, le stress hydrique impacterait la fertilité des bourgeons *via* une réduction des activités photosynthétiques (Loveys *et al.*, 1973 ; Buttrose, 1974b ; Williams, 2000). De plus, le stress hydrique pourrait provoquer une diminution de la teneur en cytokinines dans la sève xylémienne (Livne et Vaadia, 1972), et une augmentation du niveau d'acide abscissique dans les feuilles et les tiges (Düring et Alleweldt, 1973). Ainsi, ce changement d'équilibre hormonal affecterait le nombre de primordia inflorescentiels pendant la saison 1. Guilpart *et al.* (2014) ont montré également que le plus grand rendement était obtenu avec des traitements simultanés de nutrition azotée (N) et d'irrigation pour les cépages Syrah et Aranel. Il rapporte aussi que la fertilité potentielle apparente en deuxième année (nombre d'inflorescences apparues par rameau) pourrait être réduite jusqu'à 40% quand le potentiel hydrique pendant la floraison de la première année diminue de -0,1 à -0,3 Mpa (Figure 17) (Hardie et Considine, 1976 ; Guilpart *et al.*, 2014). De plus, il a été montré que le déficit hydrique pendant la période de débourrement des bourgeons pouvait réduire la croissance végétative, et causer un débourrement irrégulier à faible taux, modulant ainsi le rendement (Van

Zyl, 1984 ; Vasconcelos *et al.*, 2009). Cependant, Smart *et al.* (1990) ont indiqué un effet contraire du stress hydrique avec augmentation de la fertilité des bourgeons en raison de la réduction de la canopée en conditions sèches permettant ainsi une meilleure exposition à la lumière.

En revanche, une irrigation excessive peut aussi impacter l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels, mais de façon indirecte. L'irrigation excessive favorise en effet une croissance végétative indésirable et une canopée très dense qui limite l'entrée de la lumière dans la zone des organes reproducteurs, et donc la perception de l'intensité lumineuse par les bourgeons (Carbonneau et Casteran, 1979). Williams (2000) a montré que pour le Thompson Seedless, quand l'irrigation dépasse 60% de l'évapotranspiration totale du vignoble, la fertilité des bourgeons diminuait (Tableau II). Matthews et Anderson (1989) en concluent que l'application d'une bonne, mais non excessive irrigation tout au long de la saison 1 était essentielle pour une récolte abondante, à condition que les autres facteurs environnementaux soient aussi favorables.

Ainsi, les différents facteurs environnementaux semblent avoir de manière indépendante des effets directs sur la fertilité des bourgeons. Mais de nombreuses interactions entre tous ces facteurs existent et peuvent aussi impacter simultanément les bourgeons latents en formation et les inflorescences sorties, ainsi que le fonctionnement physiologique de la plante entière tel que le métabolisme primaire, la nutrition minérale, les balances hormonales et l'expression des différents gènes. Il convient donc d'être prudent quant aux interprétations de l'effet de tel ou tel facteur et prendre en compte l'ensemble de l'environnement et de son évolution potentielle.

IV.2. Impact des facteurs biotiques et internes

Les glucides sous forme de sucres solubles et d'amidon sont les sources principales d'énergie primaire pour la vigne. Leur synthèse et leur stockage sont fortement impactés par les conditions environnementales et culturales, et résultent de changements de vigueur et de canopée. Un bon fonctionnement physiologique de la vigne nécessite également une assimilation appropriée d'autres types d'éléments tels que les éléments minéraux et l'eau. Cet équilibre et ce bon fonctionnement sont en partie régulés par la balance hormonale qui peut réorienter les différents substrats et ainsi modifier le fonctionnement cellulaire du bourgeon.

IV.2.1. Nutrition carbonée : sucres solubles et amidon

La plupart des études consacrées aux effets des glucides sur le déroulement du cycle reproducteur se sont surtout focalisées sur le développement des inflorescences et l'induction florale durant la floraison de la saison 2 du cycle reproducteur. Or, le processus de

Tableau III : Corrélations entre les paramètres de maturité des fruits, de fertilité et de la résistance au froid (Mansfield et Howell, 1981).

Treatment	1	2	3	4	5	6	7
Control (F)	7.34	136.40	2.68	33	6.6	269.68	288.74
Cordon (F)	7.64	190.28	2.41	34	13.3	236.18	272.41
Shoot (F)	7.21	144.35	2.24	35	11.6	253.28	286.42
Leaf (F)	6.74	183.23	2.43	32	7.8	237.70	257.81
Leaf (D)	6.88	196.88	2.43	31	8.1	233.25	253.81
Shoot (D)	6.63	155.38	2.41	33	14.8	239.03	280.55
Cordon (D)	5.14	149.23	2.14	30	41.4	152.53	260.29
Control (D)	2.52	124.80	1.62	28	88.4	25.68	221.38

1: change in soluble solids from véraison to harvest, 1977 (g./100 g).

2: 1977 yield (g/node retained).

3: clusters/node, 1978.

4: berries/cluster, 1978.

5: percent primary bud mortality, 1977-78.

6: 1978 yield (g/node retained).

7: 1978 yield (g/primary shoot).

Correlation coefficients

1 × 2; $r = +0.52$ n.s.

4 × 5; $r = -0.85$ **

1 × 3; $r = +0.87$ **

4 × 6; $r = +0.91$ **

1 × 4; $r = +0.91$ **

4 × 7; $r = +0.89$ **

1 × 5; $r = -0.93$ **

1 × 6; $r = +0.97$ **

5 × 6; $r = -0.99$ **

1 × 7; $r = +0.83$ **

5 × 7; $r = -0.76$ **

3 × 4; $r = +0.72$ *

6 × 7; $r = +0.87$ **

3 × 5; $r = -0.86$ **

3 × 6; $r = +0.89$ **

3 × 7; $r = +0.81$ **

* Significant at the 5% level.

** Significant at the 1% level.

développement reproducteur demande de l'énergie à partir de l'initiation des primordia inflorescentiels durant la croissance des bourgeons latents en année N jusqu'à la maturité des fruits en année N+1. Le métabolisme des glucides, leur transport et leur stockage sous différentes formes dans la plante entière durant la période de l'initiation des primordia inflorescentiels détermine le nombre de grappes qui pourront émerger l'année suivante (Candolfi-Vasconcelos et Koblet, 1990). Les glucides jouent donc un rôle clé dans la reproduction de la vigne (Caspari *et al.*, 1998). Ils sont impliqués (i) dans l'initiation des primordia inflorescentiels durant la saison 1, (ii) dans l'initiation florale pendant la floraison de la deuxième année et (iii) dans la méiose (Lebon *et al.*, 2008).

Pendant les stades précoces de développement des bourgeons, l'initiation des primordia inflorescentiels et des inflorescences dépendent de l'approvisionnement des réserves en amidon de l'année précédente et de l'intensité de la mobilisation des sucres de réserve, puis dans un second temps de l'activité photosynthétique de l'année courante (Lebon *et al.*, 2008). La relation entre la fertilité des bourgeons latents et l'approvisionnement des réserves en amidon de l'année précédente a été étudiée par plusieurs auteurs (Mansfield et Howell, 1981 ; Candolfi-Vasconcelos et Koblet, 1990 ; Howell *et al.*, 1994 ; Duchêne *et al.*, 2003a, 2003b ; Bennett *et al.*, 2005). Au début du printemps, les bras et les rameaux de l'année précédente, lignifiés, ont déjà procédé à la mise en réserve avant la dormance. Aucun organe n'est alors capable de produire des sucres *via* l'activité photosynthétique. De ce fait, la réserve en amidon de l'année précédente est la seule ressource en glucides dans la plante. Mansfield et Howell (1981) ont montré que la fertilité des bourgeons latents et le rendement final de l'année N+1 étaient fortement corrélés avec le métabolisme des glucides entre la véraison et la maturité des baies de l'année N (Tableau III). Si le niveau des réserves en amidon est insuffisant pour le développement de tous les primordia inflorescentiels, certains de ces derniers avortent (Lebon *et al.*, 2008). Lebon *et al.* (2008) a aussi expliqué que le nombre d'inflorescences apparues au printemps dépendait de l'approvisionnement des réserves de l'année précédente. Un effeuillage excessif (> 50% de la canopée) durant la saison 1 peut réduire le niveau des réserves en amidon et impacter la fertilité des bourgeons, c'est-à-dire le nombre d'inflorescences dans les bourgeons, et ainsi limiter l'émergence des inflorescences en deuxième année (Candolfi-Vasconcelos et Koblet, 1990 ; Duchêne *et al.*, 2003a, 2003b ; Bennett *et al.*, 2005). De plus, plus l'effeuillage est effectué tôt ou le degré de l'effeuillage est important, plus la réduction de la fertilité des bourgeons est significative (Mansfield et Howell, 1981 ; Candolfi-Vasconcelos et Koblet, 1990 ; Koblet *et al.*, 1994 ; Bennett *et al.*, 2005).

Tableau IV : Effets d'une fertilisation en azote (N), en phosphore (P) et en potassium (K) sur la taille des primordia inflorescentiels dans les bourgeons de la base en 4ème et 6ème rang (Srinivasan *et al.*, 1972).

Treatments	Mean size of cluster primordia expressed as D/L ratio		K % in the dry petiole	Total carbohydrate % in the dry petiole
	4th bud	6th bud		
Control	0,7986	0,8674	2,13	11,70
N	1,1333	1,1647	3,57	16,13
P	0,9907	0,8818	2,95	13,67
K	1,2600	1,2213	3,58	17,23
NP	1,1033	1,1026	2,61	14,13
NK	1,1275	0,9814	3,12	13,70
PK	1,1083	1,1506	3,42	14,30
NPK	1,1976	1,1190	3,21	14,30
L.S.D. ($P < 5\%$)	0,26	0,24	0,41	2,19

Un mois après le débourrement, l'amidon continue à être la seule source d'énergie carbonée disponible pour le développement des bourgeons et des inflorescences (Motomura, 1993) puisque les jeunes feuilles, qui n'ont pas encore atteint une surface suffisante, restent des organes « puits » nécessitant l'apport d'énergie pour leur propre développement (Lebon *et al.*, 2008). En tant que liane, la vigne privilégie pendant cette période la croissance végétative, au détriment de la formation des organes reproducteurs. Quand les feuilles atteignent une taille suffisante et deviennent une source d'assimilats, durant les premiers stades de la croissance des primordia inflorescentiels, les bourgeons latents reçoivent alors les glucides produits par leur feuille sous-jacente et le rameau qui les portent (Motomura, 1993). Ensuite, les activités photosynthétiques de ces feuilles augmentent pour atteindre leur optimum au moment de la floraison qui est plus ou moins synchronisée avec le déclin de la mobilisation des sucres depuis les organes pérennes (Zapata *et al.*, 2004 ; Lebon *et al.*, 2005). Au total, jusqu'à 44% de carbones assimilés par toute la plante seraient destinés au processus de reproduction : l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels, le développement des inflorescences, des fleurs, et des baies de raisin (Candolfi-Vasconcelos et Koblet, 1990).

IV.2.2. Nutrition minérale

IV.2.2.A. Azote

L'influence de la fertilisation azotée sur la formation des primordia inflorescentiels et des fleurs est peu connue. Il est généralement accepté qu'un apport optimal d'azote est nécessaire pour la formation des primordia inflorescentiels et la différenciation des fleurs (Baldwin, 1966 ; Alleweldt et Ilter, 1969 ; Srinivasan *et al.*, 1972 ; Vasconcelos *et al.*, 2009). Srinivasan *et al.* (1972) ont montré qu'un déficit azoté réduisait le nombre de primordia inflorescentiels par rameau et le nombre de fleurs par inflorescence. Pour une vigne ayant une teneur basse en azote, l'apport d'azote pourrait augmenter le nombre, ainsi que la taille des primordia inflorescentiels (Tableau IV) (Baldwin, 1966 ; Alleweldt et Ilter, 1969 ; Srinivasan *et al.*, 1972). En revanche, le mécanisme de régulation reste inconnu. De plus, pour *Vitis vinifera*, les études de l'impact de la nutrition azotée sur la fertilité des bourgeons sont souvent combinées avec des études sur l'alimentation en eau à cause de la relation proche de ces deux facteurs. De ce fait, les résultats ne permettent pas réellement de connaître les effets spécifiques de l'azote. Par exemple, l'étude de Guilpart *et al.* (2014) a démontré que la baisse de la teneur en azote dans les feuilles (LNC : Leaf N Content) était liée au niveau de la disponibilité en eau. Ainsi, ce serait la diminution de la teneur en azote des feuilles combinée à l'augmentation du stress hydrique durant la floraison de l'année N qui réduirait la fertilité des bourgeons jusqu'à 36% pour la Syrah et 40% pour l'Aranel en année N+1 (Guilpart *et al.*, 2014). Pour la Syrah et

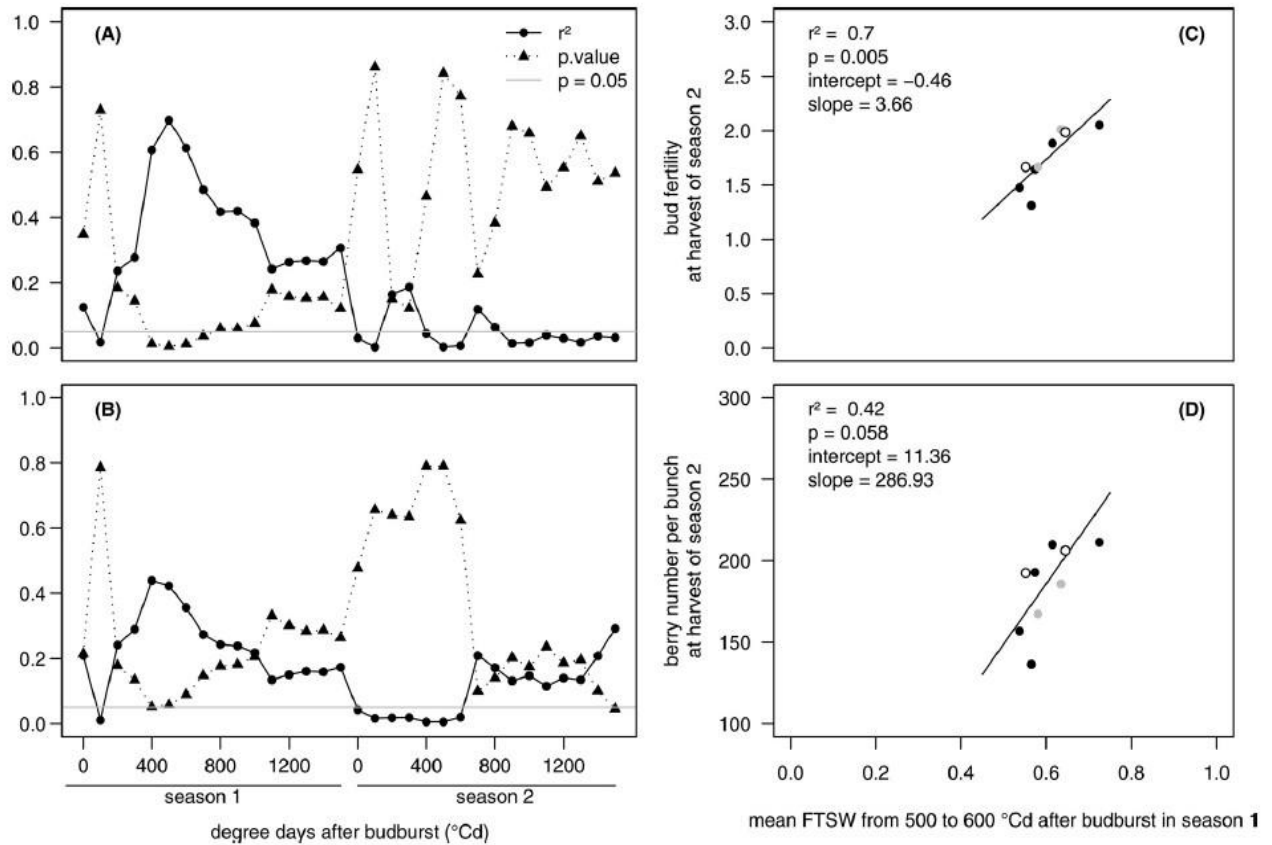


Figure 18 : Détermination des éventuelles périodes critiques de la mise en fertilité des bourgeons (A) détermination par corrélation avec le nombre de baies par grappe ; (B) détermination de la période sensible au stress hydrique (FTSW : fraction of transpirable soil water) ; (C) corrélation entre le stress hydrique durant la période critique de la saison 1 et la fertilité des bourgeons pour la saison 2 ; (D) corrélation entre le stress hydrique durant la période critique de la saison 1 et le nombre de baies par grappe de la saison 2 (Guilpart *et al.*, 2014).

l'Aranel, la fertilité des bourgeons et le nombre de baies par grappe à la maturité seraient significativement corrélés avec la teneur en azote et le niveau de stress hydrique de l'année précédente, alors qu'il n'y a presque pas de corrélation avec l'alimentation azotée de l'année même (Figure 17). Selon Guilpart *et al.* (2014), la formation des inflorescences serait sensible aux stress hydrique et azoté durant une période critique qui se situe entre 400 et 700 degrés-jour après le débourrement pendant la saison 1 (Figure 18). Ainsi, Guilpart *et al.* (2014) démontrent que la combinaison des deux paramètres (mesure d'azote et détermination de l'état hydrique) pendant la période critique serait un bon indicateur pour la détermination de la fertilité des bourgeons pendant la saison 1. Ces paramètres combinés pourraient être ainsi utilisés pour estimer le rendement maximal pour la deuxième année du cycle reproducteur.

D'un autre côté, l'application excessive d'azote durant la phase de croissance végétative de la saison 1 pourrait aussi réduire le nombre d'inflorescences différenciées par rameau, mais pas le nombre de fleurs par inflorescence (Alleweldt et Ilter, 1969). Ces résultats sont en accord avec ceux de Keller *et al.* (1995) et de Keller et Koblet (1995a), qui ont montré une réduction de la fertilité des bourgeons du Müller-Thurgau en réponse à la fois au déficit et à l'excès de nutrition azotée. L'impact de l'excès d'azote sur la fertilité des bourgeons semble être indirect : la modulation de l'apport de nutrition azotée modifierait la croissance végétative, et donc la canopée de la vigne. Avec un apport excessif d'azote, la canopée deviendrait plus large, limitant ainsi la perception de la lumière par les bourgeons qui est un facteur clé de l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels. De plus, pendant la saison 2 du cycle reproducteur, l'excès de vigueur induirait, par un apport excessif d'azote, la nécrose précoce du pédoncule inflorescentiel, ainsi que du filage, trouble physiologique provoquant la formation de vrilles à la place des inflorescences et donc une diminution du rendement final (Jackson et Coombe, 1988 ; Lombard *et al.*, 1991 ; Jackson, 1994 ; Parish, 1996 ; Keller *et al.*, 2001).

IV.2.2.B. Autres éléments minéraux : phosphore et potassium

Peu d'études ont porté sur les effets de différents éléments minéraux sur la formation des primordia inflorescentiels ; seuls le phosphore (P) et le potassium (K) ont été plus ou moins étudiés (Mullins *et al.*, 1992).

Skinner et Mattheus (1989) ont rapporté que pour un sol limité en P ($4,6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), l'application de nutrition phosphorique régulière pendant l'année N pouvait améliorer la fertilité des bourgeons du Carignan en année N+1 et maintenir un nombre de primordia

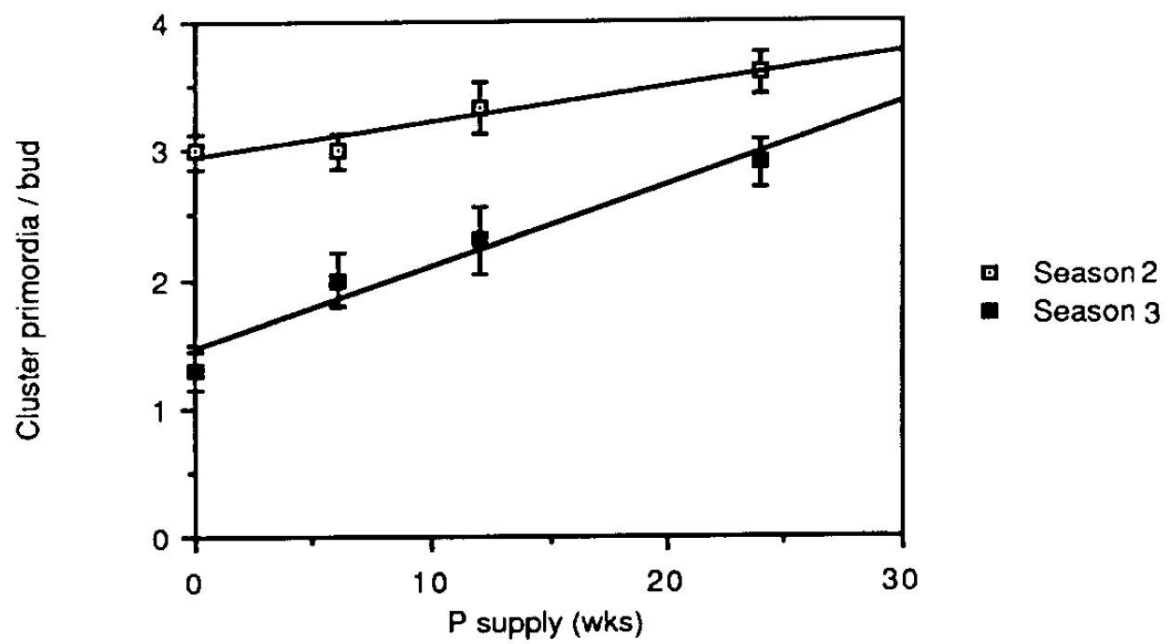


Figure 19 : Effets de l'apport de P sur le nombre de primordia inflorescentiels par bourgeon chez le Carignan un et deux ans après (Skinner et Matthews, 1989).

inflorescentiels initiés (jusqu'à 79%) en année N+2. Le manque de phosphore pendant la floraison en saison 1 du cycle pourrait causer une décroissance significative du nombre de primordia inflorescentiels initiés, mais aussi une diminution du nombre de baies, et du poids des grappes de la deuxième année. Comme l'apport de P pourrait influencer le maintien des primordia inflorescentiels initiés et la différenciation des fleurs, le déficit en P pourrait aussi impacter le rendement de la troisième année (Figure 19) (Skinner et Matthews, 1989). En revanche, l'apport de phosphore ne semble pas influencer la taille des primordia inflorescentiels (Tableau IV). Des études de flux de P radioactif ont montré une accumulation préférentielle de phosphore sous forme organique dans les apex des rameaux en croissance active et dans les jeunes bourgeons qui, par la suite, deviendraient fertiles.

Le potassium (K) joue aussi un rôle crucial dans la formation des inflorescences de la vigne. Une augmentation de la fertilité des bourgeons de Concord a été observée après une application de K dans les sols déficients en K des vignobles du Michigan (USA) et de Niagara Peninsula (Canada) (Larsen, 1963). Des effets similaires du potassium ont aussi été observés pour du Thompson Seedless dans un vignoble californien (Christensen, 1975). Une fertilisation potassique en année N entraînerait une augmentation entre 40% et 58% de la taille des primordia inflorescentiels dans les bourgeons latents (Tableau IV) (Srinivasan *et al.*, 1972). Les réponses positives de la vigne au potassium pourraient être liées au fait que les vignes sembleraient utiliser de préférence le potassium apporté que le potassium stocké dans le cep pour la croissance végétative et le développement des bourgeons (Obbink *et al.*, 1973).

En revanche, les études réalisées sont assez anciennes, et ne comprennent souvent qu'un seul élément, alors que la nutrition minérale concerne au moins quatre macroéléments : l'azote (N), le phosphore (P), le potassium (K) et le magnésium (Mg) et un ensemble d'oligoéléments. Ces éléments affectent le fonctionnement de la plante *via* les mécanismes de balances complexes, tels que les équilibres P/N et K/Mg et peuvent agir de manière antagoniste ou synergique selon leur niveau ou le stade de développement de la plante. De ce fait, il est difficile d'expliquer le mécanisme d'action et de régulation de chaque élément minéral sur l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels. Les niveaux optimaux de N, P et K étant associés à un niveau de production optimale, lui-même régulé par l'alimentation hydrique et les équilibres hormonaux (Jako, 1976 ; Srinivasan *et al.*, 1972).

IV.3. Régulation et équilibres hormonaux

Les effets des différents régulateurs de croissance sur la fertilité des bourgeons ont été bien étudiés séparément. Comme pour toutes les autres plantes ligneuses pérennes, les balances des différentes hormones spécifiques de la vigne sont exigées pour son développement des inflorescences et des fleurs (Zeevaart, 1976). Cependant, les mécanismes de régulation des balances hormonales sont complexes, et les moindres changements environnementaux et nutritionnels peuvent affecter ces balances, ce qui par conséquent impacte la fertilité des bourgeons latents.

Pour la vigne, le développement des primordia inflorescentiels est régulé à deux niveaux : (i) la formation, et (ii) la différenciation des anlagen (Vasconcelos *et al.*, 2009). Plusieurs familles de régulateurs hormonaux sont impliquées. Pour la floraison, les gibbérellines (GAs) et les cytokinines (CKs) sont deux familles d'hormones essentielles ; pour l'entrée en dormance et la levée de dormance avant le débourrement, le rôle de l'acide abscissique (ABA) a été démontré (Lavee et May, 1997 ; Koussa *et al.*, 1998 ; Or *et al.*, 2000 ; Orphir *et al.*, 2009). Quant aux auxines (AIA), leur rôle n'est que partiellement élucidé car elles agiraient en connexion avec les CKs (Müller et Leyser, 2011).

Les gibbérellines sont essentielles à la fois à la formation des anlagen et à la détermination de leur développement (Srinivasan et Mullins, 1980a). L'initiation précoce des anlagen (formation des axes des inflorescences) et la formation plus précoce des deux bras à partir des anlagen ont été observées après un traitement avec des GAs sur des vignes cultivées sous serre : les premiers anlagen sont apparus dans les bourgeons des rangs 2 et 3 après le traitement, alors qu'ils apparaissent en rangs 4 et 5 pour les plants non traités. Par contre, la formation des primordia inflorescentiels est inhibée par le traitement avec des GAs, et les anlagen formés dans les vignes traitées par les GAs ne peuvent se développer qu'en vrilles. L'utilisation d'inhibiteur de la biosynthèse des GAs (chlorméquat) a montré que ce phénomène était réversible (Mullins *et al.*, 1992). Ces résultats montrent que le rôle des GAs dépend du stade de développement des bourgeons latents avec des effets bénéfiques sur la formation des anlagen durant les stades très précoces du développement, et des effets inhibiteurs sur la formation des primordia inflorescentiels pendant la détermination du développement des anlagen. Plus récemment, l'étude d'un mutant appelé « L1 » (Layer 1 méristématique) et dérivé du Pinot Meunier a montré que ce phénotype ne formait pas de vrilles, mais uniquement des inflorescences tout le long du rameau. Le gène muté responsable de ce phénotype est un homologue du gène *GA INSENSITIVE (GAI)* d'*Arabidopsis thaliana*. De ce fait, l'insensibilité de ce mutant aux GAs a entraîné la transformation des primordia vrillaires en primordia

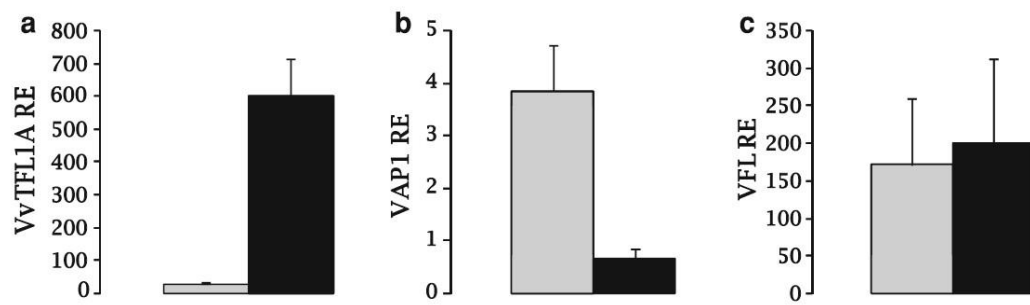


Figure 20 : Effets d'un ajout de cytokinines (10 μ M de PBA) sur l'expression relative de (a) *VvTFL1a*, (b) *VAP1* et (c) *VFL* dans les vrilles du Thompson Seedless cultivées sans (en gris) ou avec (en noir) (Crane et al., 2012).

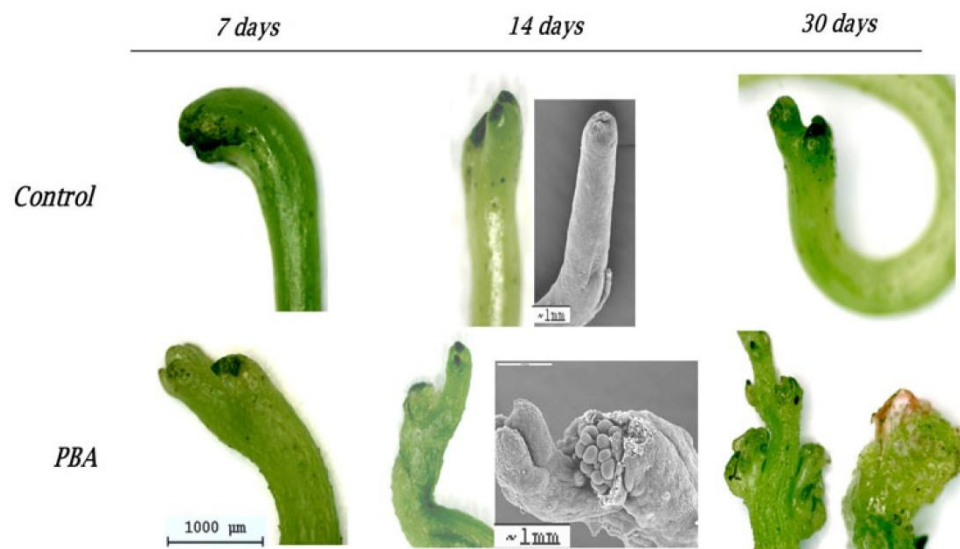


Figure 21 : Analyse des effets des cytokinines (PBA) sur le phénotype des vrilles cultivées avec 10 μ M de PBA (Crane et al., 2012).

inflorescentiels et ainsi favoriser la formation des inflorescences, confirmant le rôle inhibiteur des GAs dans l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels (Boss et Thomas, 2002).

Les cytokinines sont aussi impliquées dans le contrôle du développement des inflorescences de la vigne. Srinivasan et Mullins (1978, 1979, 1980a, 1981a et 1981b) ont induit la formation d'inflorescences et de structures inflorescentielles à la place de vrilles dans quelques espèces de *Vitis* par des traitements à base de cytokinine 6-(bensylamino)-9-(2-tetrahydropyranyl)-9H-purine (PBA). La conversion des vrilles en inflorescences peut avoir lieu dans les anlagen indifférenciés, mais aussi dans les jeunes vrilles (Mullins *et al.*, 1992). Le traitement avec le chlorméquat favorise aussi la formation des inflorescences à partir des anlagen et des vrilles, mais il n'induit pas la formation des inflorescences quand il est appliqué seul. Il apparaît que le chlorméquat pourrait modifier la balance hormonale de GA/CKs, en favorisant la production des CKs et en inhibant la biosynthèse de GAs (Coombe, 1967 ; Srinivasan et Mullins, 1980a, 1981a, 1981b ; Mullins *et al.*, 1992). Plus récemment, Crane *et al.* (2012) ont mis en évidence que, dans les vrilles de Thompson Seedless traitées avec des CKs, l'expression du gène *VvTFL1a*, (gène impliqué dans le contrôle de la différenciation inflorescentielle) était surexprimé près de 14 fois par rapport aux plantes non traitées (Figure 20). Or, pendant le développement des vrilles chez une plante sans traitement aux CKs, on constate naturellement une régulation négative de *VvTFL1a*. Il a donc été suggéré qu'un point de transition existerait durant le développement des vrilles, et que ce point pourrait être retardé par les CKs. Un tel délai pourrait affecter négativement l'acquisition précoce de l'identité méristématique florale (IMF) et augmenter le degré de ramification des primordia inflorescentiels pour ainsi transformer les vrilles en structures inflorescentielles (Figure 21). De ce fait, il est supposé que le développement des inflorescences, qui est positivement régulé par les CKs, dépendrait du délai d'acquisition des caractéristiques du méristème floral par les anlagen (Crane *et al.*, 2012).

Si les CKs sont considérées avoir un effet positif sur l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels, les récentes études conduites par Dun *et al.* (2012) ont montré dans le cas du petit pois (*Pisum sativum*), qu'un apport de cytokinines à forte concentration n'induisait pas d'amélioration de croissance des bourgeons. De plus, la concentration la plus forte testée (0,1% dimethyl sulfoxide) paraîtrait toxique pour la plante, entraînant des réductions de la croissance de ramification des bourgeons. Ces résultats sont intéressants, car ils montrent un effet négatif des CKs à une forte concentration sur l'initiation et la différenciation des primordia des bourgeons, qui est contraire à tout ce qui a été démontré pour la vigne jusqu'à nos jours.

De plus, les CKs représentent des messagers secondaires et pourraient être impliquées dans le signal auxinique (AIA). **L'AIA** semble être un facteur important dans la régulation des activités des bourgeons, dû à l'effet inhibiteur de l'apex sur le débourrement des bourgeons axillaires le long du rameau (Bessis, 1965). Müller et Leyser (2011) ont montré que l'AIA pouvait réguler négativement la biosynthèse des CKs, et de ce fait, mis en évidence que les CKs pouvaient être des messagers secondaires de l'auxine dans la régulation du développement des bourgeons. La ramification de l'axe principal et des primordia inflorescentiels est souvent inhibée par le méristème apical, à travers la production et le transport d'AIA (Prusinkiewicz *et al.*, 2009). L'AIA paraît aussi limiter la disponibilité des CKs, et quand la concentration d'AIA est faible, la ramification est stimulée par les CKs synthétisées (Müller et Leyser, 2011 ; Peer *et al.*, 2011 ; He *et al.*, 2012 ; Leduc *et al.*, 2014, Rameau *et al.*, 2015 ; Roman *et al.*, 2016). Les primordia inflorescentiels proches du méristème apical sont ainsi potentiellement moins ramifiés que les primordia inflorescentiels basaux, en partie à cause de leur proximité de la source d'AIA (Eltom *et al.*, 2014).

En revanche, les effets de **l'ABA** sur l'initiation et la ramification des primordia inflorescentiels ont très peu été étudiés. Par contre dans le bourgeon, son rôle dans la levée et l'entrée en dormance est relativement bien connu. D'un côté, il a été démontré que dans les bourgeons latents la teneur en ABA diminuait considérablement durant la levée de dormance entraînant un changement d'équilibre ABA/GA, induisant l'hydrolyse d'amidon par l' α -amylase favorisant ainsi le début de l'organogenèse (Koussa *et al.*, 1998 ; Zapata *et al.*, 2004 ; Mohamed *et al.*, 2012 ; Rubio *et al.*, 2014). D'un autre côté, l'ABA, induit par les hautes températures et le stress hydrique pendant l'été, est aussi le facteur clé de l'induction et du contrôle de l'entrée en dormance des bourgeons latents et de la mise en réserve d'amidon avant la dormance (Rinne *et al.*, 1994 ; Koussa *et al.*, 1998 ; Or *et al.*, 2000 ; Zheng *et al.*, 2015). Sachant que cette phase correspondrait à la phase tardive d'initiation et de ramification des primordia inflorescentiels, il serait possible de supposer que l'ABA pourrait jouer un rôle (i) dans le contrôle du rythme de la fin d'initiation et de ramification des primordia inflorescentiels *via* la régulation de l'entrée en dormance des bourgeons, (ii) dans la qualité de la mise en réserve d'amidon pour la disponibilité des sucres au printemps suivant.

Les modes de régulation hormonale dans le développement des bourgeons, ainsi que dans l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels sont très complexes. Les signaux internes des hormones peuvent affecter aussi l'expression des différents gènes impliqués dans la réponse aux conditions environnementales et nutritionnelles. Les balances hormonales varient aussi avec les espèces et les variétés de plantes, et peuvent être impactées par les conditions environnementales et les maladies. De nombreuses études ont été menées

sur les effets des hormones clés comme les GAs, les CKs et l'AIA. Par contre peu d'études ont porté sur l'acide abscissique (ABA), les strigolactones, ainsi que les différentes balances hormonales pendant les phases précoces de développement des bourgeons. Les modes de régulation de ces hormones et leur interaction avec la fertilité des bourgeons de la vigne sont encore peu connus, et nécessitent plus de recherches dans le futur.

IV.4. Régulations moléculaires

Aujourd'hui, les mécanismes de régulation moléculaire de l'initiation et de la différenciation des primordia inflorescentiels dans les bourgeons latents restent encore très peu connus. La plupart des études portant sur la reproduction de la vigne concernent souvent la mise à fleur (Mandel *et al.*, 1992 ; Weigel *et al.*, 1992 ; Macknight *et al.*, 1997 ; Carmona *et al.*, 2002) et l'embryogenèse (Schellenbaum *et al.*, 2008 ; Maillot *et al.*, 2009 ; Gambino *et al.*, 2011). De plus, de nombreuses études sur la régulation moléculaire de ces processus chez la vigne se réfèrent encore souvent à *Arabidopsis thaliana* pour la compréhension des fonctionnements physiologiques et biologiques des gènes identifiés.

Cependant, entre l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels et la mise à fleur ainsi que l'embryogenèse, il existe un processus commun qui consiste en la formation et la différenciation des méristèmes, ou encore plus précisément en la prolifération et la différenciation des cellules méristématiques. Ainsi, on pourrait supposer que certains gènes impliqués dans le mécanisme de la mise à fleur et dans l'embryogenèse pourraient aussi participer à la formation et la différenciation des méristèmes végétatifs et reproducteurs, et donc au processus d'initiation et de différenciation des primordia inflorescentiels dans les bourgeons latents de la vigne. De ce fait, certaines familles de gènes susceptibles d'intervenir dans le contrôle des activités méristématiques, la régulation de la floraison ainsi que l'embryogenèse somatique seraient intéressantes à étudier. Chez *Arabidopsis thaliana*, des gènes clés ont pu être identifiés depuis longtemps comme par exemple les gènes de la famille de *CLAVATA*, gènes clés de contrôle d'activité cellulaire du méristème apical. Les gènes *MFT/FT/TFL1* et *MADS8* seraient quant à eux impliqués dans la régulation des méristèmes floraux, et donc dans le contrôle d'induction de la floraison. Mais aussi des gènes comme *LEC1* qui montrent des propriétés de régulation de division et de prolifération cellulaire dans l'embryogenèse somatique.

IV.4.1. Gènes *CLE* (homologues de *CLAVATA*) : gènes clés de contrôle d'activité méristématique

Les gènes de la famille *CLAVATA* (*CLV1,2 ou 3*) ont été identifiés chez de nombreuses espèces végétales (Cock et McCormick, 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, des mutants *clv3*

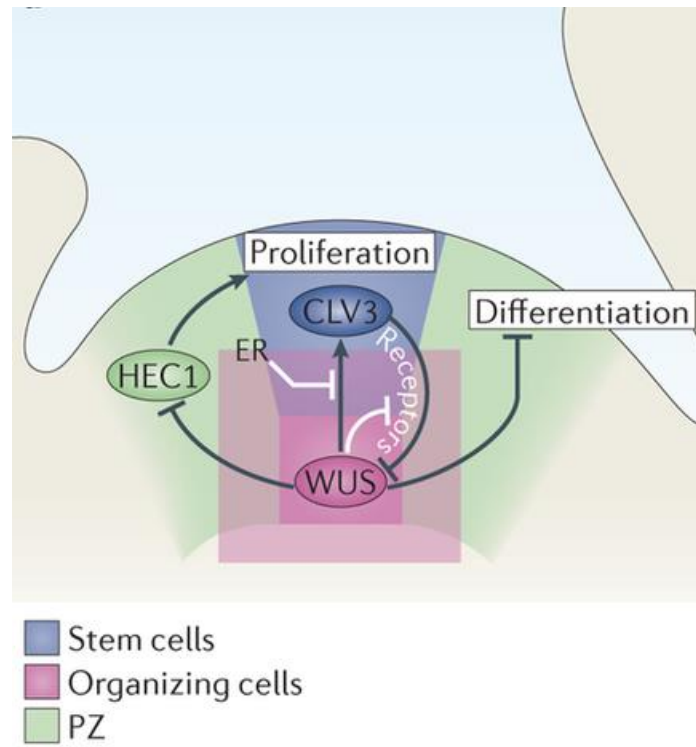


Figure 22 : Mode de fonctionnement du maintien des cellules méri-stématiques dans le méri-stème apical de l'axe principal (Heidstra et Sabatini, 2014).

(déficients pour ce gène) ont pu être réalisés et présentent une expansion excessive du méristème apical, avec une surproduction des organes floraux (Clark *et al.*, 1995). Au contraire, une surexpression des gènes *CLV3* défavorise le maintien du méristème et entraîne l'arrêt de croissance de l'apex méristématique (Brand *et al.*, 2000). Ces études ont mis en évidence le rôle central des gènes *CLV3* dans la régulation du maintien de méristème apical.

Le mode de fonctionnement des gènes *CLV3* dans le contrôle du méristème apical est relativement bien connu. Les *CLV3* sont localisés et exprimés au niveau des premières assises des cellules méristématiques dans la zone centrale du méristème apical (Fletcher *et al.*, 1999). Il a été montré que les *CLV3* répriment l'expression des gènes *WUSCHEL* (*WUS*) qui lui-même est un régulateur positif d'activités cellulaires du méristème apical. Ces deux gènes fonctionnent en équilibre et permettent une finesse de régulation des activités méristématiques (Figure 22) (Brand *et al.*, 2000 ; Carles et Fletcher, 2003 ; Sharma *et al.*, 2003 ; Strabala *et al.*, 2006).

Chez la vigne, des homologues des gènes *CLV3* ont été récemment identifiés, et sont nommés *CLAVATA3/ESR-like* (*CLE*). Parmi les différents gènes *CLE* identifiés, deux paraissent intéressants car ils présentent des expressions relativement importantes dans les bourgeons axillaires. Il s'agit de *VvCLE25-1* et *VvCLE-TDIF* (Tominaga-Wada *et al.*, 2013).

Bien que le rôle exact des gènes *CLE* ne soient pas encore établis chez la vigne, leurs fonctions intégratrices des différents signaux endogènes et exogènes chez d'autres espèces à intérêt agronomique est aujourd'hui connu (Benlloch *et al.*, 2015). Cette famille de gènes est reconnue pour être un des acteurs majeurs de la formation méristématique. Aussi, dans notre contexte d'étude, ces gènes pourraient jouer un rôle dans la régulation des mécanismes de division et de prolifération cellulaire du méristème apical du bourgeon, et ainsi être impliqués dans le processus d'initiation et de différenciation des bourgeons latents.

IV.4.2. Gènes *MFT/FT/TFL1* et *MADS8* : gènes de régulation d'induction florale

Aujourd'hui chez différentes espèces végétales, un grand nombre de gènes impliqués dans l'induction florale sont connus. Les premiers à avoir été étudiés sont *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) et *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*) associés à des facteurs de transcription de type *MADS*. *TFL1* est particulièrement intéressant puisqu'il a été démontré comme étant un gène majeur dans le contrôle du rythme de détermination des inflorescences (Ratcliffe *et al.*, 1999 ; Blazquez *et al.*, 2006). C'est cette famille de gènes qui va exercer un contrôle plus ou moins direct face aux facteurs endogènes que sont les hormones.

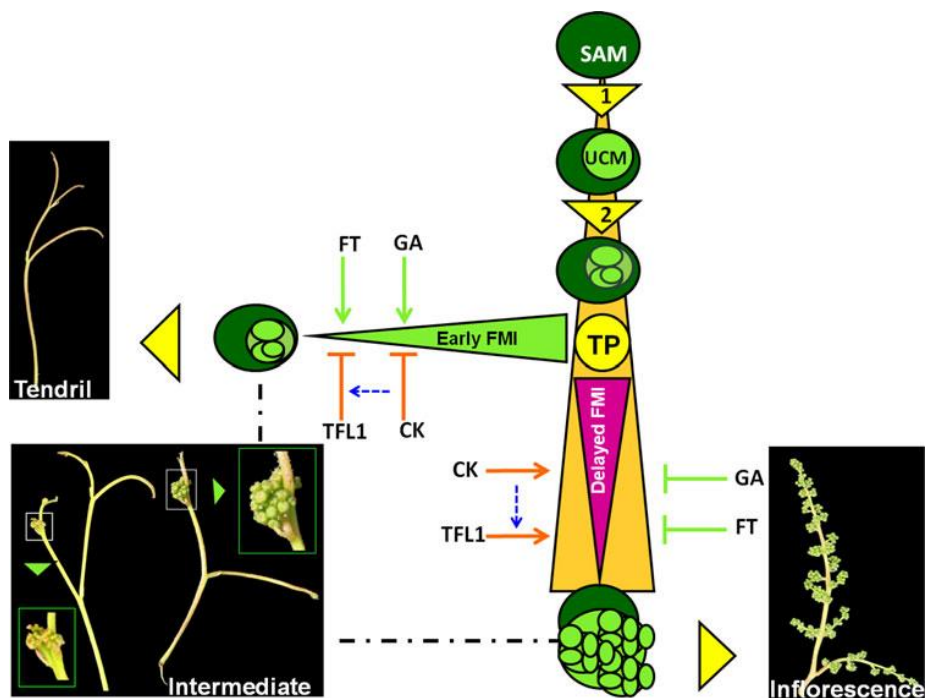


Figure 23 : Hypothèse de modèle de fonctionnement de la différenciation des méristèmes. Triangle orange représente le degré de ramification des méristèmes ; Cercles vert foncé représentent le méristème apical de l'axe principal et Cercles vert clair représentent les ramifications méristématiques (Crane *et al.*, 2012).

Chez la vigne, ces gènes sont identifiés et nommés *VvFT*, *VvTFL1a* et *VvMADS8*, et participent également à la mise en place de l'induction florale. Les études d'expression de ces gènes ont montré que *VvMADS8* était surexprimé précocement dans les bourgeons axillaires. Ainsi, il est supposé que *VvMADS8* pourrait être un gène impliqué dans la phase précoce du développement des inflorescences (Sreekantan et Thomas, 2006).

Une étude plus récente de *VvTFL1* a montré que le niveau de transcrits dans les bourgeons latents situés vers l'apex est significativement plus élevé que celui dans les bourgeons de la base, pour le cépage Superior Seedless (Crane *et al.*, 2012). La surexpression de ce gène dans les bourgeons latents plus fertiles durant le printemps de la saison 1 suppose qu'ils pourraient réguler positivement la fertilité des bourgeons pendant la phase précoce.

De plus, il a été également montré que la famille de gènes *FT/TFL1*, qui était habituellement impliquée dans le contrôle de la floraison, pouvait aussi intervenir dans la transformation de structure vrillaire en structure inflorescentielle, dans le cas de culture embryogénique somatique sous effets des CKs (Crane *et al.*, 2012). La surexpression de *VvTFL1* entraînerait donc un délai d'acquisition d'IMF en maintenant une prolifération cellulaire importante dans les méristèmes et favoriserait ainsi la taille des primordia inflorescentiels (Figure 23). Enfin, si le fonctionnement du couple *FT/TFL1* est bien connu, il s'agit là d'une vaste famille de gènes. Au sein de celle-ci, un autre gène identifié comme *MOTHER of FT and TFL1 (MFT)*, est présent dans de nombreuses espèces végétales ligneuses, telles que le rosier, la vigne ou encore *Jatropha curcas* (Carmona *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2013 ; Randoux *et al.*, 2014 ; Tao *et al.*, 2014), ou non comme le fraisier (Iwata *et al.*, 2012 ; Hu *et al.*, 2016), ou monocotylédones comme par exemple *Symplocarpus* (Ito-Inaba *et al.*, 2016). Pour la vigne, deux isoformes *MFT* ont été identifiées, et une seulement a été retrouvée dans les bourgeons latents (*MFT1*) (Carmona *et al.*, 2007). Les travaux de Diaz-Riquelme *et al.* (2012) ont mis en évidence une expression de *VvMFT1* dans les bourgeons latents de la vigne. De plus, le rôle de ce gène dans le rythme de la floraison a récemment été mis avant pour des espèces végétales soumise à des remontées de floraison comme le Rosier et le Fraisier (Remay *et al.*, 2009 ; Iwata *et al.*, 2012). Ces données bibliographiques établies sur le rôle de *MFT* dans la mise en place de la floraison, combinées à celles connues sur l'importance et la régulation de *MFT* par l'ABA lors des processus de germination (Xi *et al.*, 2010) en font un gène potentiellement intéressant dans le cadre de notre étude.

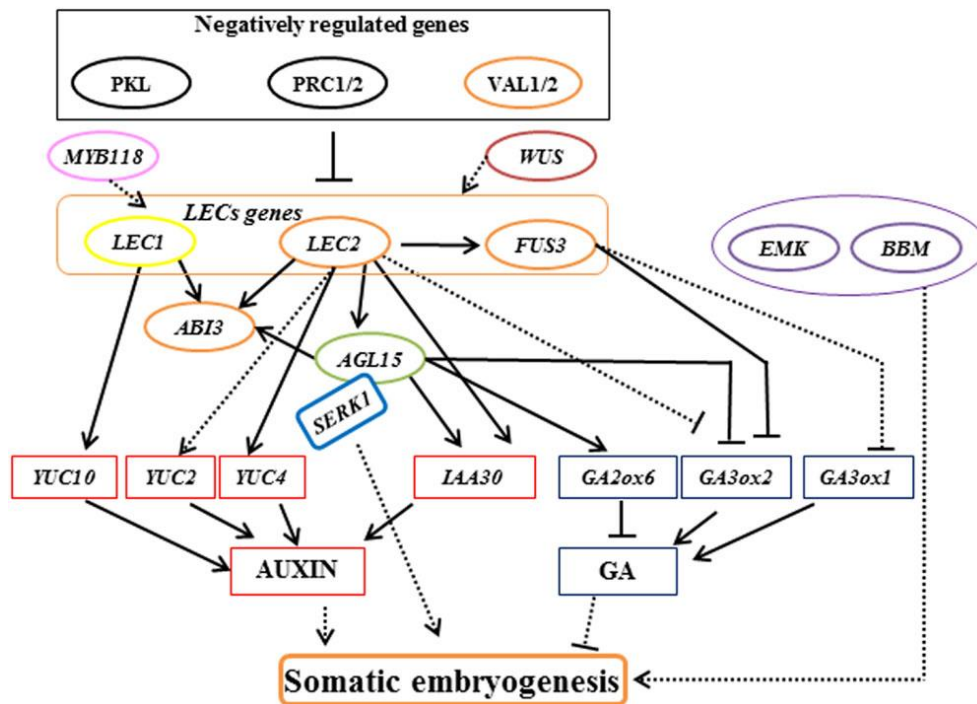


Figure 24 : Modèle d'interactions des régulateurs contrôlant l'embryogenèse somatique chez *Arabidopsis*. Les lignes continues indiquent les régulations transcriptionnelles directes mises en évidence ; les lignes pointillées indiquent les régulations transcriptionnelles dont les mécanismes restent inconnus ; les cercles orange représentent les gènes codant pour les protéines B3-domain ; les cercles verts représentent les gènes codant pour les facteurs de transcription MADS-box ; les cercles violets représentent les gènes codant pour les facteurs de transcription AP2 (Guan *et al.*, 2016).

IV.4.3. Gènes *VvL1L* (homologue de *AtLEC1*) : gène d'induction d'embryogenèse somatique

Chez *Arabidopsis thaliana*, les rôles des gènes *LEC* (*LEAFY COTYLEDON 1*) sont assez bien établis dans l'embryogenèse somatique. Les *LEC* pourraient être induits par les gènes *WUS* et réguleraient l'embryogenèse somatique par plusieurs voies de signalisation, notamment sous l'action d'hormones clés connues : AIA et des GAs (Figure 24) (Guan *et al.*, 2016).

Chez la vigne, l'expression du gène *VvL1L* (*LEAFY COTYLEDON 1-like*), un homologue de *AtLEC1*, est détectée seulement au cours de la phase précoce de l'induction, avant l'apparition des embryons somatiques (Schellenbaum *et al.*, 2008 ; Maillot *et al.*, 2009). Ces travaux laissent supposer que ces familles de gènes pourraient être impliquées dans le processus d'initiation et de différenciation des primordia inflorescentiels.

Au regard de l'ensemble des données de la littérature et pour pouvoir avoir un regard sur différents régulateurs moléculaires clés des mécanismes d'induction, d'initiation et de ramification des primordia inflorescentiels, 6 gènes connus chez la vigne ont été ciblés dans notre étude : *VvTFL1a*, *VvMFT*, *VvMADS8*, *VvCLE25-1*, *VvCLE-TDIF* et *VvL1L*.

A l'image des autres facteurs de régulation déjà cités, l'implication des gènes dans les mécanismes d'induction, d'initiation et de ramification des primordia inflorescentiels est encore mal connue chez la vigne. Les effets antagonistes et synergiques sont sans doute nombreux et fortement impactés par les conditions environnementales et nutritionnelles, ne permettant d'émettre que des hypothèses quant aux relations existantes entre eux.

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

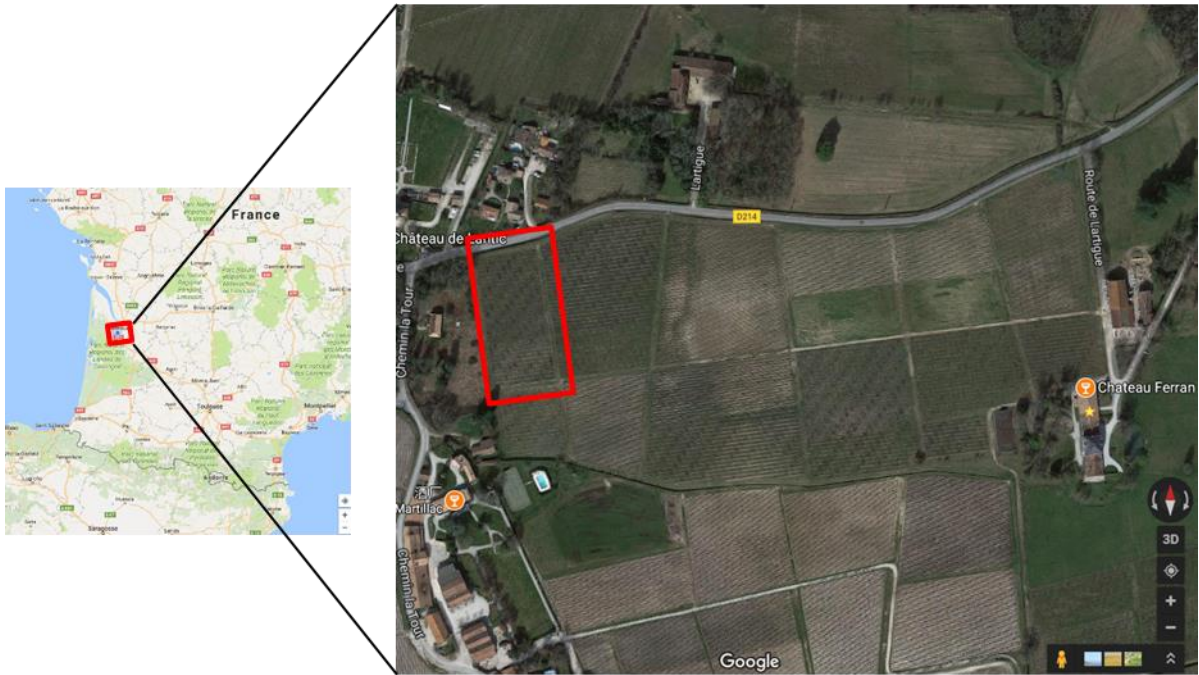


Figure 25 : Localisation de la parcelle d'étude (Google Maps)

L'objectif de notre travail est de réaliser une étude intégrative combinant des approches microscopiques, moléculaires, hormonales et biochimiques afin de (i) mieux comprendre les mécanismes de régulation des processus d'initiation et de différenciation des primordia inflorescentiels, (ii) évaluer les différents impacts de la lumière, de l'équilibre hormonal et de certaines pratiques culturales comme l'effeuillage sur la fertilité des bourgeons et (iii) proposer des indicateurs permettant au viticulteur d'évaluer précocement la fertilité potentielle. C'est pour cette raison que nous avons choisi de travailler uniquement sur une parcelle en plein champ conduite directement par le viticulteur.

I. Matériel végétal

I.1. Parcelle d'expérimentation

Notre étude a été réalisée sur une parcelle de Merlot au château Ferran, situé à Martillac dans la région bordelaise (N44°42'44'', W0°31'55''), appellation Pessac-Léognan (Figure 25). La parcelle présente les caractéristiques suivantes :

- cépage : Merlot
- porte-greffe : 3309 C
- année de plantation : 1983
- type de sol : sables graveleux avec sous-sol argilocalcaire
- travaux en vert : effeuillage une face (stade petit pois), rognage, échardage systématique
- densité/ha² : 5556
- orientation des rangs : E/O
- taille : Guyot double
- hauteur de rognage : 1,75 m
- H/E^3 : 0,4

Cette parcelle a été choisie en raison de sa sensibilité aux variations de rendement (données historiques fournies par le château), mais ne présentant pas de variabilité intra-parcellaire, ni de déséquilibre nutritionnel, ni de symptômes de viroses, ni de variation de vigueur.

² Densité/ha: $10000 / (\text{Ecartement des rangs (m)} \times \text{Ecartement des pieds (m)})$ = densité réelle sans prendre compte les tournières

³ H = hauteur de feuillage après rognage (= hauteur de rognage – hauteur de tronc) ; E = écartement des rangs

Tableau V : Conditions climatiques de 2013, 2014, 2015, 2016 et 2017 (données MétéoCiel, station Mérignac Bordeaux).

	Température maximale moyenne (°C)						Température minimale moyenne (°C)						Ensoleillement total (h)						Précipitations totales (mm)					
	Normal	2013	2014	2015	2016	2017	Normal	2013	2014	2015	2016	2017	Normal	2013	2014	2015	2016	2017	Normal	2013	2014	2015	2016	2017
Janvier	10,1	9,5	12,7	10,3	12,4	8,6	3,1	3,9	6,6	3,1	6	0,7	96	55,8	68,7	75,4	58,2	132,3	87,3	138	181,1	93,4	233,8	27,5
Février	11,7	10	13,1	10,6	12	14,1	3,3	2,2	5,7	2,5	5,5	5,4	114,9	129,4	90,8	113,4	95,1	101,6	71,7	76,5	125,1	79,5	151,3	75
Mars	15,1	14,5	16,1	14,5	14	16,6	5,4	5,2	5,8	6,2	5,5	7,8	169,7	164,6	181,7	107,1	145,4	143,7	65,3	71,1	88	38	110,2	65,3
Avril	17,3	17,3	19,4	20	16,8	19,5	7,4	7,6	9,2	9	7,4	6,6	182,1	190,5	203	192,1	161,7	279,3	78,2	56,9	54	26,9	59,8	21,5
Mai	21,2	17,4	19,7	21,3	20,9	23,7	11	8,9	10,3	11,6	11,4	12,7	217,4	137,7	203,7	201,7	189,7	263,8	80	88,3	71,2	33,5	92,6	46,4
Juin	24,5	21,9	26,3	27,3	23,5	27,2	14,1	13,1	15,4	14,7	14,4	16,2	238,7	179,7	287,2	200,8	179,9	262,6	62,2	132	67,1	43,8	74,5	136,9
Juillet	26,9	30,4	26,1	29,1	27,2	26,4	15,8	18,3	16,6	17	15,8	17,1	248,5	331	243,5	280,8	273,1	189,1	49,9	82,5	50,8	35,3	12,7	27,8
Août	27,1	26,9	24,7	27,9	29,4	28	15,7	15,6	14,8	16,3	16,1	16,1	242,3	276,5	208,8	251,6	312,9	263,7	56	36,6	79,5	86,7	11,3	30,2
Septembre	24	23,8	26,6	22,7	26,9		12,9	14,2	14,6	12,2	14,6		202,7	170,6	265,4	204	220,9		84,3	95,3	21,9	35,4	65,1	
Octobre	19,4	20,7	22,7	18,4	18,9		10,4	12,5	12,2	9,4	9		147,2	139,8	193,3	168,9	165,7		93,3	87,4	41,4	51,8	11,2	
Novembre	13,7	12,5	16,6	16,7	13,8		6,1	6,5	10	8,9	7,1		94	69,3	85,5	108,1	89,8		110,2	114,3	119,8	49,6	85,5	
Décembre	10,5	11,3	10	14,7	12,1		3,8	2,9	3,8	6,5	4,2		81,8	130,2	73,9	120,3	123,9		105,7	69,2	54,3	12,5	13,2	
Annuel	18,5	18,0	19,5	19,5	19,0		9,1	9,2	10,4	9,8	9,8		2035,3	1975,1	2105,5	2024,2	2016,3		944,1	1048,1	954,2	586,4	921,2	

I.2. Conditions climatiques des millésimes étudiés

Nos travaux ont été effectués durant 3 années 2014, 2015 et 2016 couvrant ainsi les récoltes de 2015, 2016 et 2017. Ces millésimes présentent des différences climatiques notables pour l'ensemble de la région bordelaise (Tableau V).

I.2.1. 2013

2013, ne fait pas partie de notre étude, mais sachant que le cycle reproducteur s'étend sur deux années consécutives, il est indispensable de considérer les conditions climatiques de 2013 pour expliquer le développement des inflorescences et le rendement de 2014. En 2013, après un hiver pluvieux et froid, le débourrement a été tardif (15 avril soit environ 10 jours après la date moyenne) mais relativement homogène. Le printemps fut à l'image de l'hiver : très peu ensoleillé et frais, avec 79h d'insolation de moins que la valeur normale et une température maximale inférieure jusqu'à 3,8°C à la normale. Ces déficits, thermique et en ensoleillement, ont continué en juin, avec, en plus des précipitations dépassant le double de la valeur normale, rendant ainsi la floraison compliquée. La date moyenne de la mi-floraison a été notée vers le 18 juin, soit 15 jours de retard par rapport à la moyenne des 10 dernières années. Au moment de la floraison, la surface foliaire était plus faible que la normale et les conditions à la fois climatiques et nutritives ont engendré cette année-là une forte coulure. Par contre, un bel été s'est installé : remarquablement chaud et ensoleillé en juillet et août, mais accompagné de violents orages, ce qui permit à la vigne de récupérer son retard végétatif sans limitation hydrique sévère. L'automne de 2013 fut marqué par un début de période pluvieuse en septembre, puis resta calme jusqu'à la fin des vendanges. Novembre et décembre 2013 restèrent dans la moyenne.

I.2.2. 2014

2014 fut une année chaude, avec quasiment tous les mois, des températures moyennes supérieures aux normales sauf en août. Les deux premiers mois furent, en plus, particulièrement arrosés avec des précipitations deux fois plus importantes que la normale. Le printemps 2014 s'installa tranquillement avec des indicateurs climatiques de mars et d'avril très proches des valeurs normales. Les derniers jours de mars furent plus chauds et arrosés, provoquant un débourrement précoce vers fin mars (le 27 mars dans notre étude), soit 10 jours plus tôt que la moyenne décennale (Geny-Denis et Dubourdieu, 2015). Mais cette douceur moyenne cache de fortes variations thermiques en avril et mai, accompagnées d'orages et de grêle en mai

avant la floraison, ce qui a annulé l'avance prise au débourrement et rendu le début de la floraison très hétérogène. La chaleur est revenue en juin, avec des températures moyennes mensuelles plus élevées que les valeurs normales, et un fort ensoleillement (287 h contre 239 h pour la valeur normale). La date moyenne de mi-floraison de 2014 fut estimée autour du 7 juin sans accident de coulure fortement marqué. La température du mois de juillet fut comparable à la moyenne, permettant à la vigne de se développer sans stress, par contre août fut frais et arrosé provoquant un retard de maturation (mi-véraison observée le 13 août, soit 8 jours plus tard que la moyenne). L'arrêt de croissance végétative et l'entrée en dormance furent eux aussi retardés. Heureusement, les conditions se sont améliorées pour la fin de maturation et les vendanges qui ont pu être réalisées sous un temps chaud, ensoleillé et très sec. Ce temps perdura jusqu'à la fin de l'automne pour revenir comparable aux normales saisonnières en décembre, où les précipitations totales du début d'hiver restèrent 2 fois moins importantes que les valeurs de référence. Le rendement réel de notre parcelle en 2014 est de 53 hL·ha⁻¹.

I.2.3. 2015

2015 commença par trois mois plus froids et plus secs que la normale, induisant ainsi un débourrement tardif des bourgeons, vers le 15 avril pour le Merlot dans la région bordelaise (le 11 avril dans notre étude) (Geny-Denis et Dubourdieu, 2016). Par contre, le temps changea en avril, avec une forte augmentation des températures rendant ce mois d'avril le plus chaud depuis 1950 et le plus chaud des 3 millésimes de notre étude avec une température maximale moyenne de 20°C. Cette augmentation d'ensoleillement associée à un déficit de précipitation permit un débourrement homogène et un début de croissance rapide des pousses. Ces conditions climatiques ont continué jusqu'en juillet, annulant totalement le retard du débourrement, et entraînant une floraison précoce vers le 4 juin pour Merlot. L'été fut aussi chaud et sec, induisant une limitation hydrique suffisante pour arrêter la croissance et induire la mi-véraison vers le 6 août mais sans provoquer de stress hydrique important. Quelques pluies furent bénéfiques en août pour éviter les blocages de maturation des baies. L'automne, ensoleillé et très sec, s'installa ensuite rapidement avec une baisse de températures en septembre et octobre. Après les vendanges, les températures ré-augmentèrent en novembre et décembre, ce qui caractérise la fin d'année 2015 comme celle ayant les températures maximales et minimales moyennes les plus élevées et les précipitations les plus faibles depuis plus de 40 ans. Le rendement réel de notre parcelle en 2015 est de 41 hL·ha⁻¹.

Tableau VI : Dates de la mi-floraison et de la mi-véraison du Merlot des 9 dernières années comparées aux normales des 20 dernières années dans la région bordelaise.

Période	Mi floraison	Mi véraison
1995-2015	2 Juin	6 Août
2008	11 juin	15 Août
2009	5 Juin	3 Août
2010	9 Juin	9 Août
2011	17 mai	21 Juillet
2012	11 juin	12 Août
2013	18 juin	22 Août
2014	7 juin	13 Août
2015	5 Juin	6 août
2016	11 juin	7 août

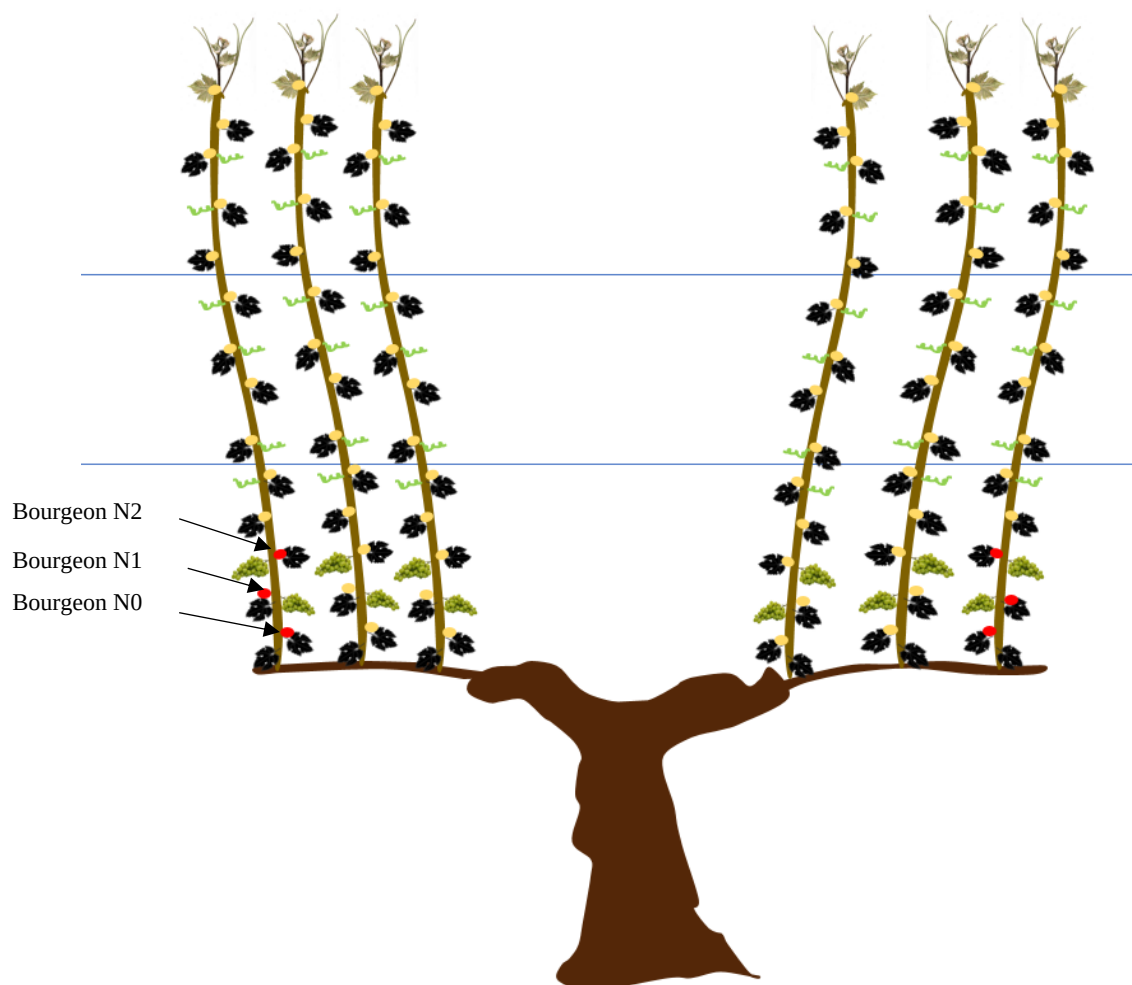


Figure 26 : Schéma représentatif de la position des bourgeons N0, N1 et N2 prélevés (points rouges) sur les souches.

I.2.4. 2016

En 2016, les indicateurs climatiques hivernaux ressemblèrent à ceux de 2014. Le début d'année fut doux et très pluvieux avec 3 fois plus de précipitations en janvier et 2 fois plus en février que la normale. Les températures douces, le déficit d'ensoleillement et l'excès de précipitation par rapport aux valeurs normales induisirent un débourrement fin mars (le 28 mars dans notre étude), plus précoce qu'en 2013 et 2015, mais plus tardif qu'en 2014. Par contre, le printemps fut frais et la croissance ralentie. L'avance prise au débourrement fut annulée, retardant même la floraison notée le 11 juin, soit 8 jours plus tard que la moyenne des 20 dernières années (Tableau VI). Mais, à partir de ce moment-là, le beau temps s'installa pour tout l'été avec un grand nombre d'heures d'ensoleillement (+30% par rapport à la normale en août) et très peu de précipitations. La nouaison fut excellente, le retard de la floraison s'atténua et la date moyenne de mi-véraison fut notée au 7 août. Les fortes pluies de début d'année permirent d'éviter un important stress hydrique estival et d'induire ainsi un bon fonctionnement des vignes. Les rendements de 2016 furent exceptionnellement hauts. L'automne fut ensuite marqué par un temps frais et sec en octobre, avant d'entrer dans un hiver doux et sec en décembre. Le rendement réel de notre parcelle en 2016 est de 72 hL·ha⁻¹.

I.3. Expérimentations et prélèvements

I.3.1. Suivi du développement des bourgeons

Pour cette étude, 3 types de bourgeons (N0, N1 et N2) ont été étudiés en fonction de leur rang d'insertion et de la présence ou pas d'un organe oppositifolié, puisqu'il a été montré que le rythme de formation des phytomères pouvait avoir un impact sur la longueur des mérithalles et la longueur des entre-cœurs issus des ces bourgeons axillaires (Louarn, 2005 ; Pallas *et al.*, 2008).

Pour cela, chaque type de bourgeon a été prélevé séparément sur 50 rameaux les plus à l'extérieur de chaque aste afin de préserver les rameaux utilisés à la taille pour l'année suivante (Figure 26) :

- bourgeon « N1 » : bourgeon du nœud portant la 1^{ère} grappe.
- bourgeon « N2 » : bourgeon du nœud portant la 2^{ème} grappe.
- bourgeon « N0 » : bourgeon du nœud sans grappe et se trouvant juste en dessous du N2.

Les stades de prélèvement ont été déterminés selon la bibliographie et les stades clés du développement des bourgeons latents décrits par Carolus (1970). Contrairement aux stades phénologiques du développement des baies de raisin qui présentent des repères visuels pour

Tableau VII : Dates d'échantillonnage pour l'étude de suivi du développement des bourgeons en 2014, 2015 et 2016 et stades de développement des baies correspondants.

Jours après débourrement	2014		2015		2016	
	Date de prélèvement	Stade de développement des baies correspondant	Date de prélèvement	Stade de développement des baies correspondant	Date de prélèvement	Stade de développement des baies correspondant
35	-	-	16/05/2015	Boutons floral séparé	02/05/2016	Bouton floraux agglomérés
60	-	-	10/06/2015	nouaison	27/05/2016	début floraison
88	23/06/2014	nouaison	08/07/2015	petit pois	24/06/2016	nouaison
103	08/07/2014	petit pois	23/07/2015	fermeture de grappes	10/07/2016	petit pois
118	23/07/2014	fermeture de grappes	07/08/2015	mi-véraison	25/07/2016	début véraison
159	02/09/2014	récolte	17/09/2015	récolte	04/09/2016	récolte

Tableau VIII : Analyses réalisées pour l'étude du suivi de développement des bourgeons en 2014, 2015 et 2016. (✓) : analyses réalisées séparément sur N0, N1 et N2 ; (M) : analyses réalisées sur un mélange d'échantillons de N0, N1 et N2.

Jours après débourrement (JAD)	Analyses microscopiques			Analyses moléculaires			Analyses hormonales			Analyses biochimiques			Séquençage des RNA (RNAseq)		
	2014	2015	2016	2014	2015	2016	2014	2015	2016	2014	2015	2016	2014	2015	2016
35	-			-	✓	✓		✓	✓		✓	✓		M	
60	-	✓		-	✓	✓		✓	✓		✓	✓		M	
88	✓	✓		✓	✓	✓	M	✓	✓		✓	✓		M	
103	✓	✓		✓	✓	✓	M	✓	✓		✓	✓		M	
118	✓	✓		✓	✓	✓	M	✓	✓		✓	✓		M	
159	✓	✓		✓	✓	✓	M	✓	✓		✓	✓		M	

chaque stade, les stades de prélèvement des bourgeons ont été définis par rapport à la date de débourrement de chaque année (notés JAD : jours après débourrement), et sont précisés dans les tableaux suivants (Tableau VII) :

- 35JAD : Ramification primaire du 1^{er} PI, anlage à deux bras visible (stade F de Carolus)
- 60JAD : Ramification secondaire du 1^{er} PI et formation du second anlage à deux bras (stades G et I selon Carolus)
- 88 JAD : Poursuite des ramifications du 1^{er} PI et ramification secondaire du 2^{ème} PI (Stade K selon Carolus)
- 103JAD : Fin de ramification du 1^{er} PI, poursuite des ramifications secondaires du 2^{ème} PI et formation du 3^{ème} anlage à l'origine du 3^{ème} PI (Stade J et K selon Carolus)
- 118JAD : Fin de ramification des 2 premiers PI, début de ramification secondaire du 3^{ème} PI
- 159JAD : Stade final, dormance

Les différentes analyses, effectuées sur l'ensemble des bourgeons des 3 millésimes, sont résumées dans le Tableau VIII. A chaque stade, pour les analyses moléculaires, hormonales et biochimiques, 50 bourgeons N0, N1 et N2 ont été prélevés et aussitôt plongés dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. Pour les analyses microscopiques, 10 bourgeons N0, N1 et N2 ont été prélevés le matin, toujours dans la même plage horaire afin de pouvoir réaliser des observations comparables. Ils ont été stockés à 4°C et rapportés le plus rapidement possible au laboratoire où ils ont subi une dissection et une fixation.

En 2014, les prélèvements n'ont commencé qu'au stade 88JAD à cause des contraintes de validation du financement de ce travail. Seules les analyses microscopiques, moléculaires et biochimiques ont été effectuées en raison de très faibles quantités de matière végétale et des difficultés de mise au point des techniques. Pour les autres années (2015, 2016), les prélèvements ont débuté dès le stade de formation des ébauches (35JAD).

Les analyses microscopiques ont été réalisées sur 2014 et 2015 afin de visualiser le développement des primordia foliaires et inflorescentiels, et de déterminer les stades clés de développement des bourgeons latents du Merlot dans la région bordelaise. En 2016, l'approche microscopique a été complétée par une approche macroscopique réalisée *via* la dissection de bourgeons afin de valider la chronologie et le rythme des phases d'initiation et de différenciation des primordia inflorescentiels. Les analyses moléculaires, hormonales et biochimiques ont été menées pour les 2 ou/et 3 millésimes dans le but d'identifier et valider

Tableau IX : Dates de mise à l'obscurité pour l'étude des effets de la lumière en 2016

Nom de l'expérience	2016	
	Date de mise à l'obscurité	Date de prélèvement
Obs35	02/05/2016	04/09/2016
Obs60	27/05/2016	04/09/2016
Obs103	10/07/2016	04/09/2016

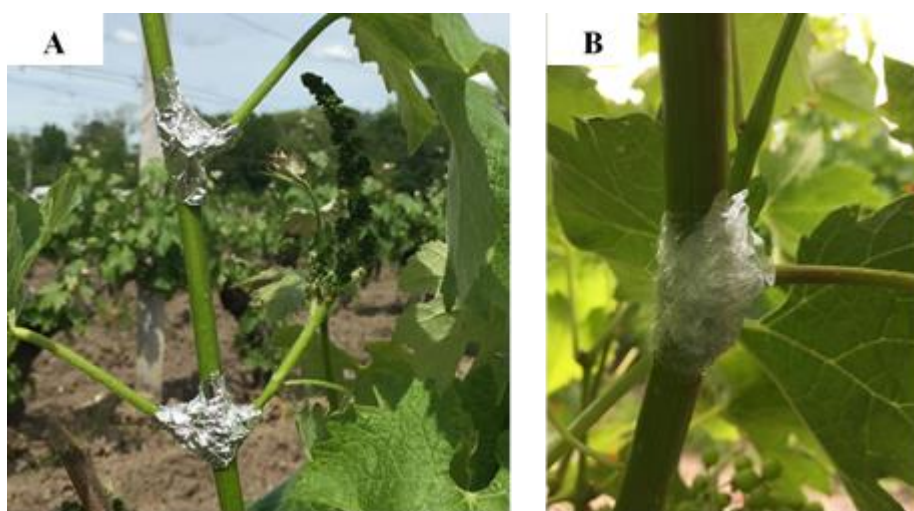


Figure 27 : Photos représentant les modalités d'application de (A) la mise à l'obscurité ; (B) des traitements hormonaux.

des indicateurs de la fertilité des bourgeons, et de comprendre les mécanismes de modulation de l'initiation et de la différenciation des primordia inflorescentiels. En 2015, un séquençage des ARN sur les 6 stades de développement a également été réalisé pour valider les analyses moléculaires des gènes étudiés, et essayer d'identifier de nouveaux gènes candidats pouvant être des indicateurs potentiels de la fertilité des bourgeons. Mais à ce jour, le traitement des données ne permet pas encore d'exploiter les résultats.

Les estimations de rendement final ont été réalisées au stade « fermeture de grappe » des baies de raisin en 2015, 2016 et 2017 dans le but de déterminer la relation entre la fertilité des bourgeons latents en année N et le rendement final de l'année N+1. Ces données de rendement sont ensuite reliées aux indicateurs biochimiques, hormonaux et moléculaires caractérisés par les analyses.

I.3.2. Effets de la mise à l'obscurité

Les effets de la mise à l'obscurité ont été étudiés en 2016 afin de déterminer les conséquences d'une modulation de l'ensoleillement direct sur les mécanismes de l'initiation, la différenciation et la ramification des primordia inflorescentiels.

La « mise à l'obscurité » des bourgeons s'est effectuée aux stades 35JAD (Obs35), 60JAD (Obs60) et 103JAD (Obs103) (induisant ainsi une mise à l'obscurité pendant 124, 99 et 56 jours respectivement) (Tableau IX).

20 pieds de vignes d'un même rang ont été utilisés pour chaque date. Sur chaque pied, tous les bourgeons latents le long du rameau le plus extérieur de chaque aste ont été entourés de papier aluminium afin d'induire un déficit d'insolation et de diminuer l'effet de compensation de la perception de la lumière par les bourgeons situés au-dessus et en dessous de nos bourgeons N0, N1 et N2 (Figure 27A).

Tous les bourgeons N0, N1 et N2 traités, ainsi que les témoins (bourgeons non traités) ont été prélevés au stade 159JAD, et immédiatement plongés dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C pour les analyses moléculaires, hormonales et biochimiques.

I.3.3. Effets de l'effeuillage

L'effeuillage est une pratique culturale très utilisée dans la région bordelaise. Il s'agit de la suppression intégrale ou partielle des feuilles dans la zone fructifère afin d'améliorer la qualité des baies de raisin. Cette pratique modifie le microclimat, et notamment le pourcentage de filtration de la lumière solaire en créant des porosités dans la zone où se trouvent les bourgeons étudiés. Ainsi, les bourgeons portés par des rameaux effeuillés présentent une meilleure exposition à la lumière. Cette pratique modifie également les équilibres sources/puits

de par la suppression d'une partie des feuilles productrices des sucres.

La parcelle utilisée est généralement effeuillée sur une face entre le stade nouaison et stade petit pois (entre 88 et 103JAD), avec suppression des 6 feuilles basales. 50 souches effeuillées ont été choisies et considérées comme témoin alors que 50 autres souches, toutes situées sur le rang d'à côté, n'ont pas été effeuillées et sont nommées « non effeuillées ». Les bourgeons issus des rangs effeuillés (témoins) et non effeuillés ont été directement prélevés au stade 159JAD dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C jusqu'aux analyses moléculaires, hormonales et biochimiques.

I.3.4. Effets de l'acide abscissique (ABA) exogène

L'ABA est connu chez la vigne pour être impliqué dans les mécanismes d'entrée en dormance des bourgeons (Koussa *et al.*, 1994, 1998), mais peu de travaux concernent son rôle lors des phases plus précoces. Il est également connu pour être une des premières réponses au stress hydrique (Pantin *et al.*, 2013), mais son rôle dans la régulation du fonctionnement stomatique ou du développement est souvent masqué par d'autres hormones (Williams et Ayars, 2005 ; Marchadier et Hetherington, 2014) comme l'acide salicylique ou les brassinostéroïdes. Une étude a donc été initiée en 2016 sur la même parcelle pour vérifier le rôle de l'ABA lors des phases précoces du développement du bourgeon et dans le cas d'un stress hydrique. Quatre solutions pouvant moduler les teneurs finales en ABA des bourgeons ont été appliquées directement sur ces organes entre 60 et 88JAD :

- **ABA** : 1 L de 2-cis, 4-trans-abscisic acid (98%, Aldrich, Germany) à $2 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ et à 0,5% de Tween 20 (agent d'humidification) (Lacampagne *et al.*, 2010) ;
- **Fluridone** (inhibiteur non spécifique de la biosynthèse de l'ABA) : 1 L de fluridone (Pastanal 99,8%, Sigma-Aldrich, Germany) à 10^{-4} mol·L⁻¹ et à 0,5% de Tween 20 (Kikuchi *et al.*, 2006) ;
- **ABA+Fluridone** : 1 L d'ABA à $2 \cdot 10^{-4}$ mol·L⁻¹ et de fluridone à 10^{-4} mol·L⁻¹ et à 0,5% de Tween 20 ;
- **Témoin** : 1L de l'eau miliQ à 0,5% de Tween 20.

L'application des solutions a été réalisée le 24 juin 2016, au stade 88JAD. Les 3 types de bourgeons N0, N1 et N2 des 2 rameaux les plus à l'extérieur de chaque aste ont été traités sur 20 pieds pour chaque solution. Chaque bourgeon a été entouré d'une bande de compresse non-tissée imbibée d'1 mL de solution. Cette compresse est ensuite entourée par une bande de papier aluminium afin de protéger l'ABA contre la dégradation par la lumière, elle-même recouverte par une bande de cellophane pour favoriser la fixation du dispositif et limiter l'évaporation du réactif (Figure 27B).

40 pieds de vignes d'un même rang ont été utilisés pour chaque traitement. Sur chaque pied, tous les bourgeons latents le long du rameau le plus extérieur de chaque aste ont été traités avec la même solution. Les prélèvements des bourgeons témoins et traités ont été effectués 48h et 7 jours après les traitements. 40 bourgeons de chaque type par traitement et par date de prélèvement ont été prélevés directement dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C jusqu'aux analyses moléculaires, hormonales et biochimiques.

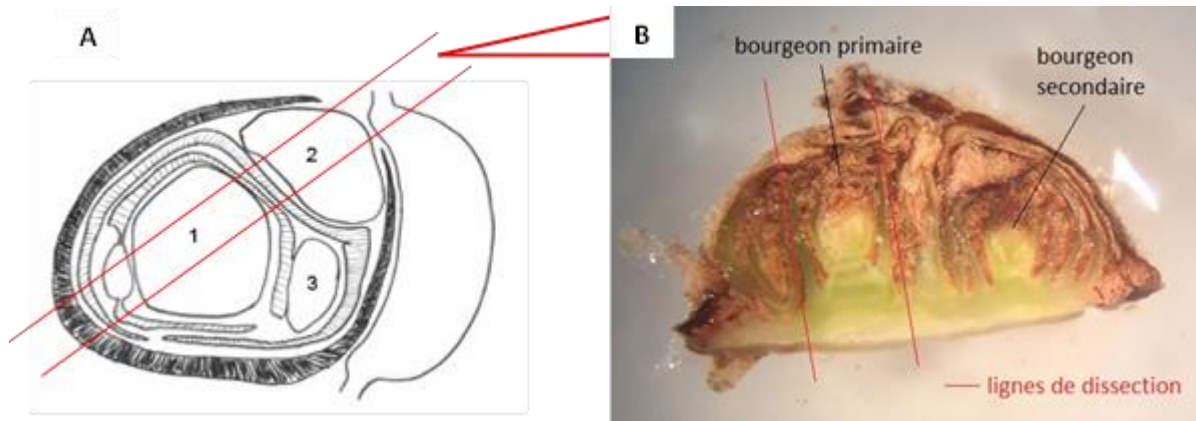


Figure 28 : Zone de bourgeons primaires fixés pour l'étude microscopique avec étapes de dissection (A) zone de prélèvement de la partie centrale (entre les lignes rouges) contenant les primordia inflorescentiels ; (B) vue longitudinale de la zone coupée (largeur = 7 mm) avant élimination du bourgeon secondaire.

II. Etude microscopique

Pour chacun des prélèvements, 10 bourgeons ont été ramenés au laboratoire pour subir une dissection, une fixation et une inclusion selon les protocoles adaptés à la fixation par le glutaraldéhyde et à l'inclusion dans la résine d'époxy. Des coupes semi-fines (1 μm d'épaisseur) ont été réalisées pour les observations en microscopie photonique de l'évolution de la structure des primordia foliaires, inflorescentiels et vrillaires, ainsi que des grains d'amidon.

II.1. Dissection

Les bourgeons ramenés au laboratoire ont été disséqués avec précision à l'aide d'une lame de rasoir et sous loupe binoculaire, toujours dans les mêmes plans de dissection (Figure 28). Avant fixation, les bourgeons secondaires et la bourre ont été éliminés pour ne garder que la section correspondant au bourgeon primaire. Les morceaux ainsi obtenus mesurent environ 2 à 3 mm de longueur et de largeur, et moins de 1 mm d'épaisseur. Ils sont très rapidement plongés dans le liquide fixateur.

II.2. Fixation chimique

Pour chaque bourgeon, une ou deux sections d'environ 1-2 mm^3 sont immédiatement déposées au pinceau dans un pilulier contenant 3 mL de tampon phosphate 0,1M⁴, pH7,2, avec 2,5% de glutaraldéhyde. Chaque pilulier est conservé sous cloche à vide pour un dégazage des tissus à 4°C pendant 3h, puis à température ambiante pendant 1 h. Les échantillons sont ensuite rincés 5 fois pendant 10 minutes à 4°C dans du tampon phosphate 0,1M, pH7,2 pour l'élimination de l'excès de fixateur, puis conservés dans du tampon phosphate 0,1M, pH7,2 à 4°C toute la nuit.

Le lendemain, après une ultime étape de rinçage avec du tampon phosphate 0,1M, pH7,2 pendant 15 minutes à 4°C, les échantillons sont fixés dans du tampon phosphate 0,1M, pH7,2 contenant 1% d' OsO_4 (tétroxyde d'osmium) pendant 2 h à 4°C. Après cette étape de fixation, les échantillons sont rincés 4 fois avec du tampon phosphate 0,1M, pH7,2 pendant 20 minutes à 4°C et conservés ensuite une nuit à 4°C dans du tampon phosphate 0,1M, pH7,2.

II.3. Déshydratation et inclusion

Après l'étape de fixation, l'inclusion s'est poursuivie immédiatement en commençant

⁴ Tampon phosphate sorenson 0,1 M, pH7,2 : 76% phosphate disodique 0,1 M/24% phosphate monopotassique 0,1 M (v/v)

par une série de déshydratations à 4°C selon le programme suivant : 20% éthanol/eau (v/v) pendant 15 minutes, 40% éthanol/eau (v/v) pendant 15 minutes, 60% éthanol/eau (v/v) pendant 15 minutes, 80% éthanol/eau (v/v) pendant 15 minutes, 90% éthanol/eau (v/v) pendant 15 minutes, 100% éthanol/eau (v/v) deux fois 30 minutes, et enfin 100% éthanol/eau (v/v) pendant 1 h.

Une fois déshydratés, les échantillons sont inclus dans de la résine « époxy »⁵ selon le programme d'imprégnation progressive suivant :

- 50% éthanol absolu/50% oxyde de propylène (v/v) à 4°C pendant 30 minutes,
- 100% oxyde de propylène à 4°C 2 fois 15 minutes,
- 100% oxyde de propylène à température ambiante pendant 10 minutes,
- 66% oxyde de propylène/34% résine époxy (v/v) à température ambiante pendant 30 minutes,
- 50% oxyde de propylène/50% résine époxy (v/v) à température ambiante pendant 30 minutes,
- 34% oxyde de propylène/66% résine époxy (v/v) à température ambiante pendant 45 minutes,
- 100% résine époxy à température ambiante pendant successivement 15 minutes, 30 minutes, puis toute une nuit, et enfin pendant 15 minutes le lendemain matin.

Chaque échantillon est ensuite placé dans une gélule mise en étuve à 60°C pendant 4 jours pour la polymérisation de la résine. Une fois les échantillons polymérisés, les blocs sont démoulés des gélules par incubation à l'eau chaude, puis conservés à l'abri de l'humidité jusqu'aux coupes.

II.4. Coupes

Les coupes ont été réalisées par le pôle de microscopie du Bordeaux Imaging Center. Les blocs contenant les échantillons de bourgeons primaires ont été sectionnés en utilisant un couteau de diamant monté sur un ultra-microtome (Ultracut-UCT, Leica Microsystems).

Les coupes semi-fines d'1 µm d'épaisseur ont été recueillies sur des lames de verre pour la microscopie photonique.

⁵ Résine « epoxy » (EMbed 812 Kit, Electron Microscopy Sciences, UK) : 46,7% EM bed 812/16,8% DDSA (Dodecenyl Succinic Anhydride)/33,6% NMA (Methyl-5-Norbornene-2,3-Dicarboxylic Anhydride)/1,5% DMP-30 (2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol) (m/m/m/m)

II.5. Colorations

II.5.1. Coloration au bleu de toluidine

Le bleu de toluidine, ou chlorhydrate de triméthylthionine, est un colorant basique progressif qui colore en bleu clair les structures cytoplasmiques et conjonctives (Langeron, 1942 ; Ganter et Jollès, 1970). Il est fréquemment utilisé en histologie et en particulier sur les coupes semi-fines de tissus fixés au glutaraldéhyde et enrobés dans les résines époxy (Epon) pour observer l'organisation des tissus.

0,5 g de bleu de toluidine est dissout dans 100 mL d'eau distillée. Les lames portant des coupes sont déposées dans un bain de bleu de toluidine pendant 2 minutes. Elles sont ensuite lavées puis séchées avant d'être protégées par les lamelles collées.

II.5.2. Coloration APS (Acide périodique – Schiff)

La coloration APS, qui colore les polysaccharides en couleur rose, a été utilisée dans notre étude pour visualiser les grains d'amidon. En effet, l'acide périodique, un oxydant puissant, est capable de rompre la liaison 1-2 glycol (CHOH-CHOH) des cycles osidiques des chaînes polysaccharidiques. Les deux fonctions aldéhydes (RCHO) ainsi créées réduisent ensuite le leucodérivé de la fuschine basique de Schiff qui devient rose (McManus, 1948 ; Thiéry, 1967 ; Roland, 1974).

La coloration a été effectuée dans des cuves de coloration par des bains successifs selon le programme suivant :

- hydratation dans de l'eau distillée pendant 5 minutes,
- hydrolyse des liaisons covalentes dans un bain d'acide périodique pendant 30 minutes,
- lavages dans de l'eau distillée trois fois 10 minutes,
- coloration par le réactif de Schiff pendant 15 minutes,
- lavages sulfureux avec du métabisulfite trois fois 10 minutes,
- lavage à l'eau de ville pendant 3 minutes.

Un témoin négatif a été réalisé sans l'étape d'hydrolyse des liaisons covalentes dans le bain d'acide périodique, ne permettant pas au réactif de Schiff d'être réduit en couleur rose, ce qui rend donc la coupe « témoin » incolore.

Les lames ont été ensuite séchées sur une plaque chauffante (Biorad, USA) à 60°C pendant toute une nuit. Des lamelles soigneusement dégraissées ont été collées sur chaque lame avec de l'acrytol mounting medium, puis séchées dans une étuve à 60°C pendant 48h.

Les coupes ont été observées avec un microscope photonique (Léica, Allemagne).

III. Etude de l'expression des gènes d'intérêt par PCR quantitative en temps réel

III.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux a été réalisée selon la méthode de Reid *et al.* (2006), adaptée aux bourgeons de vigne pour les études de PCR (polymerase chain reaction) quantitative en temps réel, ainsi que pour le séquençage des ARN.

La composition du tampon d'extraction est la suivante :

- 300 mM de Tris HCl pH 8,
- 25 mM acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA),
- 2 M NaCl,
- 2% (m/v) bromure d'héxadecyltriméthylammonium (CTAB),
- 2% (m/v) polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) insoluble,
- 0,05% (m/v) spermidine trihydrochloride,
- 2% (v/v) β -mercaptoethanol,
- H₂O ultrapure stérile RNA-free en quantité suffisante pour le volume final.

Au moment de l'extraction, 2% (v/v) de β -mercaptoethanol est ajouté extemporanément au tampon d'extraction, qui est ensuite chauffé au bain-marie à 65°C pendant 10 à 15 minutes.

0,1g de poudre de bourgeons préalablement broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un vibro-broyeur à billes (MM400, Retsch, Allemagne) est mélangé à 2 mL de tampon d'extraction dans un tube Falcon stérile. Le mélange est incubé au bain-marie à 65°C pendant 15 minutes et « vortexé » toutes les minutes pour une bonne homogénéisation. Une première extraction est réalisée par ajout de 2 mL de chloroforme/alcool isoamylique (IAA) (24 :1 ; v/v). Après centrifugation à 6500 g pendant 15 min à 4°C, la phase supérieure aqueuse est prélevée et transférée dans un nouveau tube Falcon stérile. L'étape est répétée pour une extraction complète. Les ARN extraits sont ensuite mélangés avec 0,1 volume d'acétate de sodium (3 M, pH5,2) et 0,6 volume d'isopropanol, puis mis à précipiter à -80°C pendant 30 minutes. Ensuite, une centrifugation est réalisée à 6500 g, à 4°C pendant 15 minutes. Le culot est récupéré et repris en suspension dans 1 mL de tampon Tris-EDTA à pH 7,4 (Sigma-Aldrich, USA), puis transféré dans un nouveau tube Eppendorf stérile de 2 mL. Après ajout de 0,3 volume de chlorure de lithium à 10 M (LiCl), les ARN sont précipités à 4°C pendant une nuit. Le lendemain, les ARN

sont centrifugés pendant 30 minutes à 20000 g et à 4°C. Le culot est ensuite récupéré et lavé dans 150 µL d'éthanol à 70% froid. Après une nouvelle centrifugation à 20000 g et à 4°C pendant 10 minutes, le culot est séché, puis remis en suspension dans 30 µL d'eau RNase-free⁶ stérile, et stocké à -80°C.

III.2. Elimination de l'ADN génomique des extraits d'ARN totaux

Un dosage des ARN totaux extraits est effectué par mesure des absorbances à 230 nm, 260 nm et 280 nm à l'aide d'un Nanodrop (Shimadzu Biotech, Japon) afin de déterminer la concentration et la pureté des ARN. L'intégralité des ARN est vérifiée par l'électrophorèse (90 V), sur gel d'agarose de 1,5% (m/v).

Suite à la vérification qualitative et quantitative des extraits d'ARN totaux, un traitement à la DNase (désoxyribonucléase) est réalisé afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique (ADNg) qui pourrait fausser la détermination du niveau d'expression relative des gènes d'intérêt.

Le traitement à la DNase est réalisé avec l'utilisation d'un kit RTS (Room Temperature Stable) DNase (RTS DNaseTM Kit, MO Bio Laboratories, US). Un volume contenant jusqu'à 30 µg maximum d'ARN totaux extraits est mélangé avec 10 unités (1 µL) de DNase, 0,1 volume de Buffer 10X (tampon réactionnel), et un volume d'eau RNase-free stérile suffisant au volume réactionnel final. Le mélange est ensuite mis à incuber à 37°C dans un thermocycleur (MJ Mini Thermo cycler, Bio-Rad, USA) pendant 20 minutes pour l'hydrolyse de l'ADN génomique. Puis, 0,1 volume de résines (RTS DNase removal resin) est ajouté dans le mélange qui est ensuite incubé à température ambiante pendant 10 minutes. Une agitation toutes les minutes est réalisée pour une bonne dispersion des résines qui vont éliminer l'ADN génomique hydrolysé. Après une centrifugation à température ambiante pendant 1 minute à 13000 g, le surnageant contenant les ARN totaux purifiés est récupéré et transféré dans un nouveau tube Eppendorf stérile. Les ARN sont à nouveau dosés par Nanodrop et analysés par électrophorèse.

III.3. Quantification et appréciation de la qualité des ARN totaux extraits

III.3.1. Estimation de la quantité et de la contamination des ARN

La concentration des ARN est déterminée au Nanodrop par mesure d'absorbance à 260 nm qui correspond à leur absorption maximale. Des mesures d'absorbances à 230 nm et 280 nm, qui correspondent respectivement aux absorptions maximales des sucres et des protéines, sont également réalisées. Le ratio A260 nm/A230 nm représentant la contamination des sucres

⁶ RNase-free : dépourvu de RNase (ribonucléase)

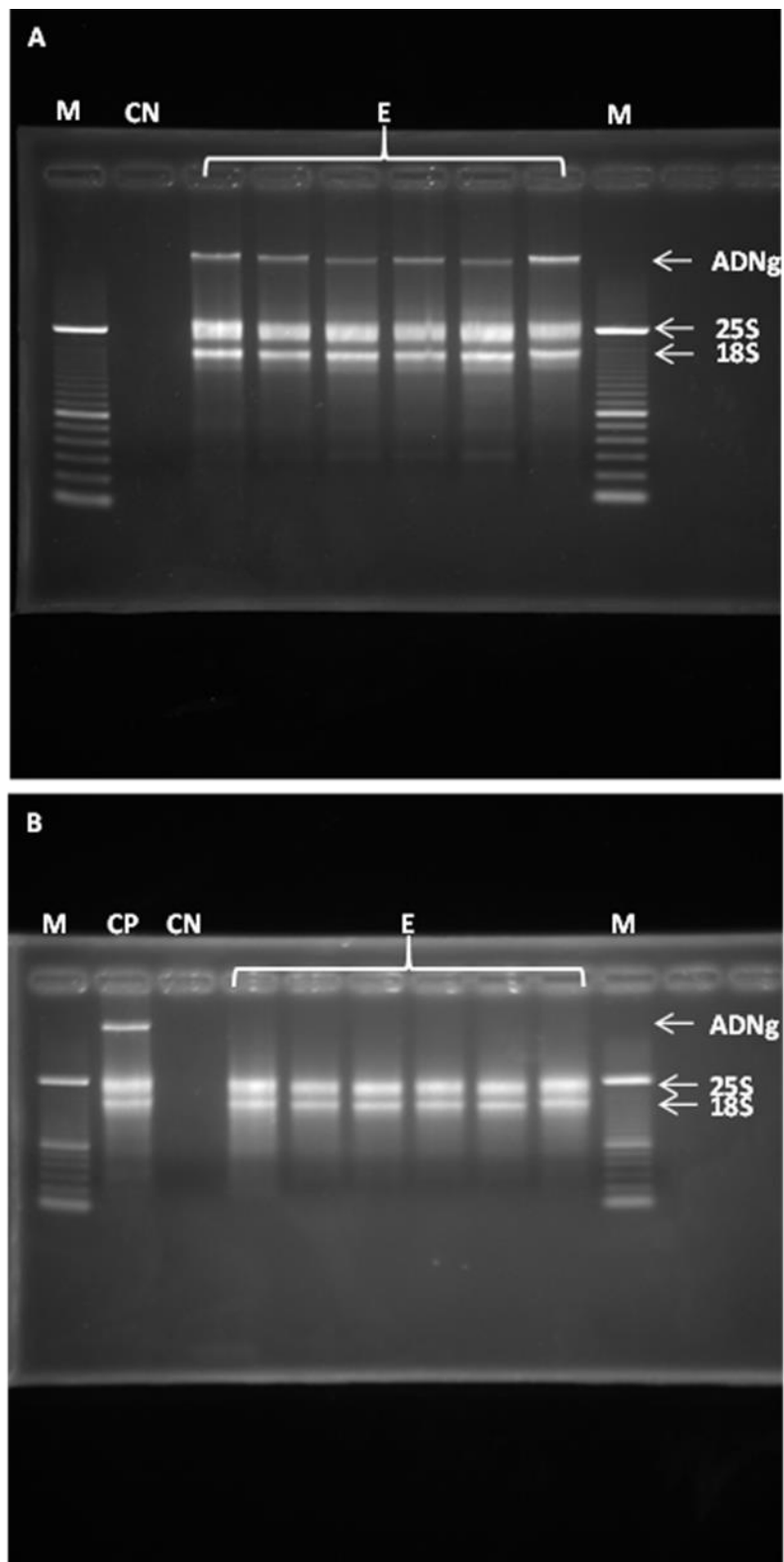


Figure 29 : Electrophorèse sur 1% de gel d'agarose des ARN totaux extraits (A) avant le traitement à la DNase et (B) après le traitement à la DNase.

doit être compris entre 1,8 et 2, alors que le rapport A260 nm/A280 nm étant un indice de la présence de protéines doit se situer autour de 2.

III.3.2. Vérification de la qualité des ARN totaux

L'intégralité des ARN totaux est vérifiée par dépôt de 0,5 µg d'ARN, préalablement mélangé avec 1 µL de tampon de charge 6X, sur gel d'agarose à 1,5% (m/v). La préparation du gel est effectuée par la dissolution d'agarose dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate-EDTA). La migration se fait dans du tampon TAE 1X sous un voltage constant de 90 V. Les acides nucléiques, chargés négativement, migrent vers l'anode en fonction de leur masse moléculaire et leur encombrement stérique. A la fin de la migration, le gel est incubé dans du tampon TAE 1X en présence de bromure d'éthidium (BET) pendant 10 minutes. Le BET s'intercale entre les bases azotées, ce qui permet de leur visualisation sous rayonnement ultra-violet (UV).

L'observation de deux bandes majoritaires correspond respectivement aux deux sous-unités 28S et 18S d'ARN ribosomiques qui sont les ARN majoritaires présents dans les extraits. La présence de deux bandes nettes et l'absence de « smear »⁷ signifient que l'intégralité des ARN ne sont pas dénaturés (Figure 29A).

III.3.3. Vérification de l'efficacité du traitement à la DNase

Afin de vérifier l'efficacité du traitement à la DNase et donc l'absence d'ADNg, une PCR des extraits d'ARN purifiés est effectuée à l'aide d'un thermocycleur, suivie par une électrophorèse, ce qui permet de visualiser l'ADNg amplifié si la contamination persiste.

Les amorces utilisées pour cette étape sont spécifiques au gène *VvEF1* (Tableau X). Le milieu réactif présente la composition suivante :

- 2,5 µL 5X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega, USA)
- 0,5 µL dNTP 40 mM en mélange équimolaire
- 0,5 µL amorce sens *VvEF1α* 10 mM
- 0,5 µL amorce anti-sens *VvEF1α* 10 mM
- 0,5 MgCl₂ (concentration)
- 7,4 µL H₂O RNase-free stérile
- 0,125 µL Taq polymérase

0,5 µL d'ARN purifié est ajouté dans un tube Eppendorf stérile contenant 12 µL de milieu réactif. Parallèlement, un témoin positif et un témoin négatif sont préparés respectivement avec ajout de 0,5 µL d'ARN totaux non traités et 0,5 µL d'H₂O RNase-free

⁷ Smear : une trainée après la migration des ARN due à la dégradation des ARN

Tableau X : Oligonucléotides utilisés en PCR quantitative en temps réel.

Nom du gène	Amorce	Nombre de nucléotides	Séquence de l'amorce	Taille d'amplicon	Tm°C	GC%
<i>VvEF1</i>	Fw	20	5'-GAACTGGGTGCTTGATAGGC-3'	164	62,0	52,4
	Rv	24	5'-AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA-3'		61,8	41,7
<i>VvSAND</i>	Fw	24	5'-GCATTTGATCCACTTGCAGATAAG-3'	76	62,1	41,7
	Rv	24	5'-CAACATCCTTTACCCATTGACAGA-3'		62,3	41,7
<i>VvMADS8</i>	Fw	22	5'-CAAGGAACAAATCGAGCAACTG-3'	182	62,0	45,5
	Rv	22	5'-CAGGCAGTCCAATGAACAAGTC-3'		62,0	50,0
<i>VvTFL1a</i>	Fw	20	5'-CACAGATATCCCAGGCACCA-3'	194	62,0	45,5
	Rv	22	5'-TGGATCCCTATATTGGCCTTG-3'		62,0	50,0
<i>VvMFT1</i>	Fw	20	5'-CCCAGTGAACCGACATTGAG-3'	215	61,5	55,0
	Rv	20	5'-TGGCGTGTGCTAAAATTGCT-3'		61,7	45,0
<i>VvCLE25-1</i>	Fw	20	5'-CAAATGGACCCGATCCCAT-3'	196	62,7	50,0
	Rv	20	5'-GCAAACCTGGGATTCCTCCAA-3'		62,3	50,0
<i>VvCLE-TDIF</i>	Fw	22	5'-GCATGGCAGCATTTAGAACAAC-3'	205	61,9	45,5
	Rv	22	5'-TTCACAGTGGAAGTGGGAGATG-3'		62,4	50,0
<i>VvL1L</i>	Fw	20	5'-CATGCCAAAATCTCGGATGA-3'	195	61,9	45,0
	Rv	20	5'-CATGGTGAGTGGCTCCATGT-3'		62,0	55,0

stérile dans des milieux réactifs. Des cycles de PCR sont ensuite appliqués sur ces mélanges selon le programme suivant :

- dénaturation initiale de l'ADN : 95°C pendant 2 minutes,
- 35 cycles d'amplification avec :
 - dénaturation de l'ADN cible : 95°C pendant 1 minute,
 - hybridation des amorces : 54°C pendant 1 minute,
 - élongation des amorces : 72°C pendant 1 minute,
- phase finale : 75°C pendant 5 minutes

A l'issue de la PCR, l'électrophorèse est réalisée par dépôt des produits d'amplification sur gels d'agarose à 1,2% (m/v) pendant 20 minutes à 90 mV. L'absence de la bande d'ADN amplifiés montre l'efficacité du traitement à la DNase, et donc l'élimination de toute trace d'ADNg (Figure 30B).

III.4. Synthèse des ADN complémentaires

La technique de transcription inverse (RT, reverse transcription) consiste à synthétiser des ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN messagers (ARNm) comme matrices contenus dans les extraits des ARN totaux.

1 µg d'ARN totaux sont mélangés avec 4 µL de mélange de réactifs (qScript™ cDNA SuperMix, Quanta Biosciences, US) nécessaires à la transcription inverse : tampon de RT buffer, dNTPs, amorces, MgCl₂, oligo (dT), inhibiteur de RNase et transcriptase inverse. Le volume est complété à 20 µL avec de l'eau RNase-free stérile. La transcription inverse est ensuite réalisée à l'aide d'un thermocycleur selon un programme suivant : 25°C pendant 5 minutes, 42°C pendant 30 minutes et 85°C pendant 5 minutes. Les ADNc synthétisés sont dilués au 1/5^{ème} dans de l'eau RNase-free stérile et stockés à -20°C.

Les ADNc synthétisés sont amplifiés par PCR avec l'utilisation des amorces spécifiques au gène *VvEF1α*. 0,5 µL d'ADNc est ajouté dans le milieu réactif qui est le même que celui de la PCR d'ADNg. Un témoin positif et un témoin négatif sont préparés respectivement par ajout de 0,5 µL de banques d'ADNc préalablement réalisées et 0,5 µL de l'eau RNase-free stériles dans les milieux réactifs. La PCR est ensuite réalisée selon le même protocole que celui de la PCR d'ADNg.

Les amplifiats sont ensuite déposés sur gels d'agarose à 1,2% (m/v) pendant 20 minutes à 90 mV. La visualisation de la bande correspondant aux ADNc de *VvEF1α* amplifiés à la même intensité sur tous les échantillons signifie la bonne qualité de transcription inverse, et permet la semi-quantification des ADNc.

III.5. Etude de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel

La technologie de la PCR quantitative en temps réel (RT Q-PCR) est basée sur la détection et la quantification d'une molécule fluorescente pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (seuil de détection) (Poitras et Houde, 2002). L'agent intercalant choisi pour notre étude est le SYBR IQ-Green supermix (Bio-Rad) qui, en se liant à l'ADN double brin naissant durant l'étape d'élongation, émet une fluorescence directement mesurée dans le tube PCR à l'aide d'un fluorimètre couplé à un thermocycleur (MyIQ™ Single Color Real-Time PCR Détection System, Bio-Rad). Sachant que la technologie basée sur le SYBR Green ne nécessite aucune sonde fluorescente, sa spécificité repose donc entièrement sur les amorces spécifiques à chaque gène étudié.

III.5.1. Définition des amorces

Huit gènes sont étudiés dans cette étude : six gènes d'intérêt et deux gènes dits « de ménage » car ils sont exprimés constitutivement : *VvEF1 α* (codant pour la chaîne alfa du facteur d'élongation EF1) et *VvSAND* (codant pour le domaine SAND (Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1)). Ces gènes de ménage permettent de vérifier la concentration constante des ADNc entre les différents échantillons, et servent à la normalisation des résultats au moment de la détermination de l'expression relative. Les amorces de RT Q-PCR spécifiques à chaque gène sont présentées dans le Tableau X.

Les séquences d'ADNc des gènes de la vigne ont été recherchées dans la base de données NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) et dans la base de données Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>). Les alignements des séquences sont systématiquement effectués avec le logiciel Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) afin de déterminer le nombre de transcrits (variants) différents à rechercher et de positionner les amorces.

Les amorces ont ensuite été définies à partir des séquences d'ADNc à l'aide du site « Primer 3 plus » (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Lors du design des amorces, plusieurs paramètres sont imposés afin d'éviter la formation, pendant l'amplification, de dimères d'amorces qui fausserait la quantification : la taille d'amplicon est comprise entre 70 et 200 paires de bases ; la température d'hybridation optimale pour chaque

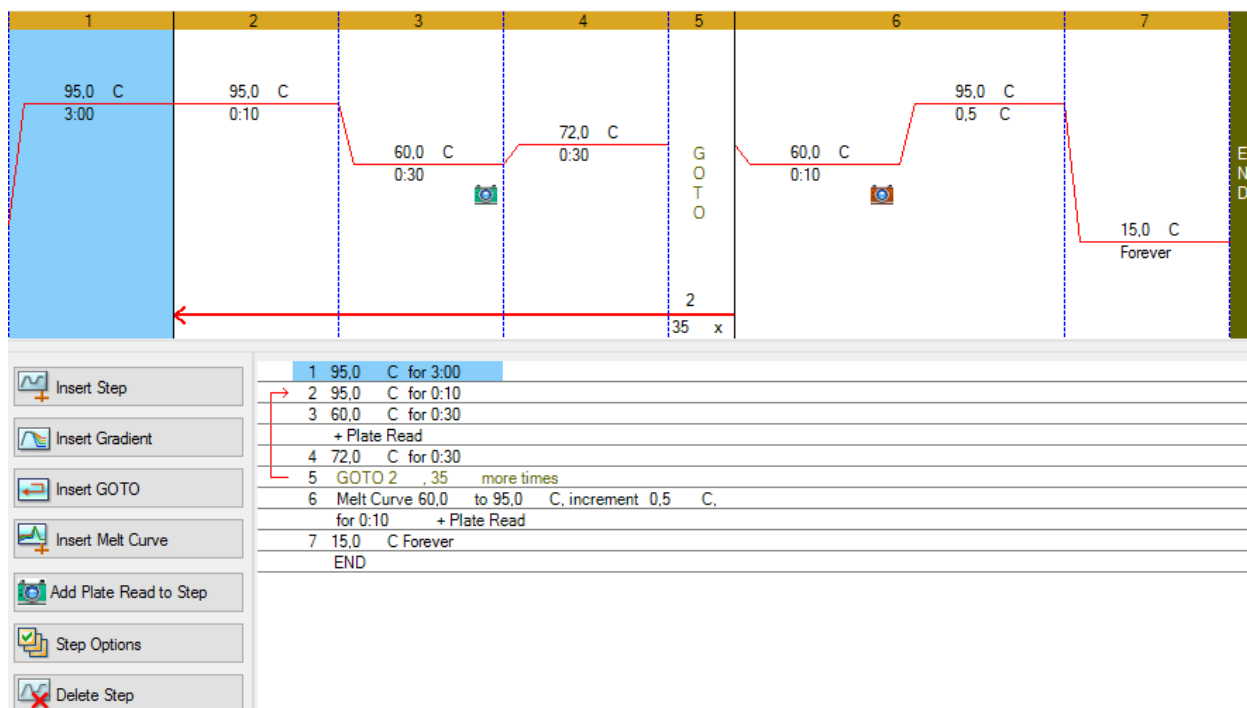


Figure 30 : Programme de PCR quantitative en temps réel.

couple d'amorce est de 60°C. La taille des séquences d'amorces est comprise entre 20 et 24 bases, avec un pourcentage en G/C autour de 50% et le nombre de bases auto-complémentaires en 3' inférieur à 4.

Un mélange d'1 µL de tous les échantillons a été réalisé. Ce pool a été dilué en cascades afin d'obtenir une gamme de concentrations connues allant de 10 ng·µL⁻¹ à 10 pg·µL⁻¹. Chaque couple d'amorce a ensuite été testé sur cette gamme d'ADNc afin de vérifier leur température de fusion et de valider leur efficacité (qui devait être comprise entre 90 et 110%). A l'issue de la RT Q-PCR, les courbes d'étalonnage ont été établies afin de vérifier, *via* le coefficient r^2 (qui devait être supérieur à 0,95), que le nombre de copies des gènes cibles était bien proportionnel à chaque point de concentration, ce qui valide la spécificité des couples d'amorce choisis.

III.5.2. PCR quantitative en temps réel

Outre les triplicats biologiques, l'étude de l'expression des gènes par RT Q-PCR a été réalisée en triplicats techniques par répétition de réactions. Le milieu de la réaction de RT Q-PCR était composé de 10 µL de SYBR IQ-Green Supermix (Bio-Rad, USA), 1 µL d'un couple d'amorces dont 0,5 µL d'amorce sens et 0,5 µL d'amorce anti-sens, 4 µL d'eau RNase-free stérile, et 5 µL d'ADNc comme matrice. La réaction d'amplification et la détection des signaux sont effectuées à l'aide d'un thermocycleur (CFX96 Real-Time System, Bio-Rad, USA), selon le programme suivant (Figure 30) :

- dénaturation initiale : 95°C pendant 3 minutes,
- 35 cycles d'amplification avec :
 - dénaturation : 95°C pendant 10 secondes,
 - hybridation : 60°C pendant 30 secondes,
 - élongation : 72°C pendant 30 secondes,
 - mesure de fluorescence,
- établissement de courbes de fusion : augmentation de la température de 0,5°C toutes les 10 secondes jusqu'à 95°C avec mesure de la fluorescence à chaque palier.

L'analyse des données et la détermination de l'expression relative ont été réalisées selon la méthode « $2^{-\Delta\Delta CT}$ » (Livak et Schmittgen, 2001).

Les CT des gènes d'intérêt et des gènes de ménage sont d'abord normalisés par rapport à leur efficacité déterminée selon l'étalonnage de chaque gène par le logiciel Bio-Rad CFX Manager. ΔCT représente la différence de CT normalisé entre les gènes d'intérêt et les gènes de ménage pour chaque échantillon. En même temps, des ΔCT de référence sont déterminés

avec la différence de CT entre les gènes d'intérêt et les gènes de ménage pour des références définies en fonction de problématiques, qui sont : (i) N0, N1 et N2 à 88JAD pour l'étude de suivi de profil d'évolution de chaque millésime ; (ii) N0 de chaque stade pour la comparaison entre rang de bourgeon ; (iii) N0, N1 et N2 des bourgeons « témoins » traités avec de l'eau à 48h et à 7 jours pour l'étude de l'ABA ; (iv) N0, N1 et N2 des bourgeons « témoins » qui n'ont pas été mis au noir ; (v) N0, N1 et N2 des bourgeons « témoins » issus de l'effeuillage. $\Delta\Delta CT$ est ensuite déterminé par la différence entre ΔCT de chaque échantillon et ΔCT de référence, ainsi l'expression relative est calculée selon la fonction $2^{\Delta\Delta CT}$.

Les amplicons ont ensuite été déposés sur gel d'agarose à 1,2% (m/v) pour l'électrophorèse afin de vérifier la présence d'une bande unique de taille attendue correspondant aux ADNc amplifiés du gène étudié.

Tableau XI : Protocole de dosage du D-glucose et du D-fructose par cascades de réactions enzymatiques.

Réactif à ajouter	Dosage du sucrose		Dosage du D-glucose et D-fructose	
	Témoin négatif (μl)	Extrait (μl)	Témoin négatif (μl)	Extrait (μl)
Réactif 1	67	67	-	-
Extrait	-	33	-	33
Mixer, incubation pendant minimum 15min à 20-25°C ou 5min à 37°C. Ajouter ensuite :				
Réactif 2	333	333	333	333
Eau distillée	600	567	667	634
Mixer, lire les absorbances après 3min de repos. Commencer la réaction par ajout de :				
Réactif 3	6	6	6	6
Mixer, attendre la fin de la réaction (environ 10-15min) et lire les absorbances des solutions.				
Si la réaction ne s'arrête pas au bout de 15min, continuer à lire les absorbances toutes les 2 min jusqu'à la stabilisation des absorbances. Ajouter ensuite :				
Réactif 4	-	-	6	6
Mixer, lire les absorbances au bout de 15min				

IV. Dosage des glucides

La méthode de dosage des glucides est basée sur la mesure, par spectrophotométrie, de l'absorbance du NADPH produit par une série de réactions enzymatiques qui dégradent les différents sucres.

IV.1. Dosage des sucres solubles (D-glucose, D-fructose et saccharose)

IV.1.1. Extraction des sucres solubles

0,01 g de poudre fraîche congelée a été mélangé avec 2 mL d'eau distillée dans un tube Eppendorf de 2 mL puis incubé dans un thermoshaker (Thermal Shake lite, VWR, USA) à 60°C pendant 1 h. Le mélange est ensuite centrifugé à 20 000 g pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant contenant les sucres solubles est prélevé et transféré dans un nouveau tube Eppendorf. Les extraits sont conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

IV.1.2. Dosage des différents sucres solubles

Le dosage simultané des trois sucres solubles (D-glucose, D-fructose et saccharose) par le kit enzymatique (R-Biopharm UV-method, USA) repose sur les activités des différentes enzymes. Le D-glucose est hydrolysé par l'hexokinase en G-6-P (glucose-6-phosphate). Le D-fructose est hydrolysé par l'hexokinase en F-6-P (fructose-6-phosphate) qui est ensuite catalysé par la phosphoglucose isomérase en G-6-P. Le saccharose est hydrolysé par l'invertase (β -fructosidase) en D-fructose et D-glucose, ce dernier est ensuite catalysé en G-6-P. Les G-6-P ainsi produits sont oxydés par la G-6-P déshydrogénase en D-gluconate-6-phosphate en présence de NADP^+ qui lui-même est réduit en même temps en NADPH^8 . Les NADPH sont ensuite quantifiés par spectrophotométrie à 340 nm.

Les réactions enzymatiques ont été effectuées directement dans les cuves de spectrophotométrie à 1 cm de longueur de trajet selon un programme précis (Tableau XI). Les réactions pour le dosage du saccharose et celles pour le D-glucose et le D-fructose ont été réalisées séparément mais simultanément.

Pour le dosage du saccharose, 67 μL d'extraits ont été mélangés avec 33 μL de réactif 1 (buffer citrate, pH4,6 et 720 unités de β -fructosidase) préalablement chauffé pendant 5 minutes à 37°C. Un témoin négatif est préparé en même temps avec seulement 67 μL de réactif 1 sans ajout d'extrait. Le mixte et le témoin négatif sont ensuite incubés à 37°C pendant 5 minutes. Après un ajout de 333 μL de réactif 2 (buffer triéthanolamine, pH7,6 ; NADP à

⁸ NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

2.44 mg·mL⁻¹ ; ATP⁹ à 5,78 mg·mL⁻¹ ; sulfate de magnésium), le milieu réactif est complété à 1 mL par de l'eau distillée. La lecture de la première absorbance à 340 nm est réalisée après 3 minutes de repos. Ensuite, 6 µL de réactif 3 contenant 320 unités d'hexokinase et 160 unités de glucose-6-phosphate déshydrogénase sont ajoutés dans le milieu réactif. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, une deuxième lecture d'absorbance à 340 nm est effectuée.

Parallèlement au dosage du saccharose ont été effectués les dosages de D-glucose et de D-fructose. 33 µL d'extraits sont mélangés avec 333 µL de réactif 2 dans une cuve de spectrophotométrie. Le milieu réactif est ensuite complété à 1 mL avec de l'eau distillée. Un témoin négatif est préparé sans ajout d'extrait. Après 3 minutes de repos, la première lecture d'absorbance à 340 nm est réalisée, suivie d'un ajout de 6 µL de réactif 3. Une deuxième lecture d'absorbance à 340 nm est ensuite effectuée à la fin des réactions enzymatiques. Puis, 6 µL de réactif 4 contenant 420 unités de phosphoglucose isomérase sont ajoutés afin de catalyser la transformation du D-fructose en D-glucose. Enfin, une troisième lecture d'absorbance à 340 nm est réalisée après 15 minutes d'incubation à température ambiante.

IV.2. Dosage de l'amidon

Le dosage de l'amidon a été effectué aussi à l'aide d'un kit enzymatique (R-Biopharm UV-method, USA). Le principe reste identique à celui du dosage des sucres solubles, mais l'enzyme clé est l'amyloglucosidase qui hydrolyse la chaîne d'amidon en D-glucose. Ce dernier est ensuite hydrolysé par des réactions enzymatiques en D-gluconate-6-phosphate avec la réduction de NADP⁺ en NADPH qui est dosé par spectrophotométrie à 340 nm de longueur d'onde.

IV.2.1. Extraction de l'amidon

0,04 g de poudre fine préalablement broyée et conservée à -80°C ont été ajoutés dans un tube de 10 mL contenant 2,5 mL de DMSO (diméthylsulfoxyde) et 0,625 mL de HCl 8M. Le mélange a été ensuite incubé dans un thermoshaker (Thermal Shake lite, VWR, USA) à 60°C pendant 1h. Après refroidissement rapide, l'extrait est ajusté à pH 4,5 afin d'obtenir une couleur pâle, puis transféré dans une fiole jaugée de 10 mL. Le volume est ensuite complété à la jauge avec de l'eau distillée. Après précipitation de la poudre à température ambiante pendant 20 minutes, la suspension claire est prélevée et transférée dans un tube, puis conservée à -20°C jusqu'au dosage.

⁹ ATP: Adénosine triphosphate

IV.2.2. Dosage de l'amidon

Sachant que la méthode d'extraction extrait aussi du D-glucose, un témoin sans ajout d'amyloglucosidase est obligatoire pour chaque échantillon afin de réaliser la détermination en aval de la teneur en amidon. En même temps, un témoin négatif qui teste l'efficacité du kit a été préparé sans ajout de l'extrait.

33 μL d'extrait sont ajoutés dans une cuve de spectrophotométrie contenant 67 μL de réactif 1 (buffer citrate, pH 4,6 ; 84 unités d'amyloglucosidase). Pour le témoin négatif, 33 μL d'eau distillée sont mélangées à 67 μL de réactif 1, alors que pour le témoin de l'échantillon, seuls 33 μL d'extrait sont ajoutés dans une cuve. Après incubation à 60°C dans une étuve pendant 15 minutes, 333 μL de réactif 2 (buffer triéthanolamine, pH7,6 ; NADP à 2,78 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; ATP à 7,04 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; sulfate de magnésium) sont ajoutés dans le cuve. Le volume est ensuite complété jusqu'à 766 μL avec de l'eau distillée. La première lecture d'absorbance à 340 nm est effectuée 3 minutes après. Puis, 6 μL de réactif 3 contenant 200 unités d'hexokinase et 100 unités de glucose-6-phosphate déshydrogénase sont ajoutés pour la catalyse des réactions enzymatiques. Après incubation à température ambiante pendant 15 minutes, la deuxième lecture d'absorbance à 340 nm est effectuée.

Tableau XII : Conditions d'analyse en UPLC de l'ABA, de l'AIA et des CKs et paramètres instrumentaux de la spectrométrie de masse.

Colonne analytique Uptisphere C18 UP3HDO en phase inverse		
Diamètre des particules: 3 µm		
Longueur: 100 mm		
Diamètre intérieur: 2,1 mm		
Solvant d'élution:		
Phase mobile:		
Solvant A: eau miliQ à 1% acide acétique (v/v)		
Solvant B: acétonitrile à 1% acide acétique (v/v)		
Analytiques standards:		
Volume d'injection: 5 µL		
Débit: 0,4 mL·min ⁻¹		
Programme indicatif du gradient pour l'ABA et l'AIA		
Temps (min)	Solvant A	Solvant B
0	98	2
3	70	30
7,5	50	50
8,5	5	98
9,6	0	100
13,2	98	2
15,7	98	2
Programme indicatif du gradient pour les CKs		
Temps (min)	Solvant A	Solvant B
0	95	5
13	40	60
16	0	100
16,5	95	2
MS Triple quadripole - Mode d'ionisation - électrospray (ESI)		
Voltage capillaire: 1,5 kV		
Source température: 130°C		
N2 flux: cône 150 L·h ⁻¹ , désolvatation 800 L·h ⁻¹		
Gaz de collision: Argon		
Flux de gaz: 0,18 mL·min ⁻¹		

V. Dosages hormonaux

Si les effets des CKs et des GAs sur l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels ont été relativement bien étudiés, les rôles de l'ABA, ainsi que des différents équilibres hormonaux sur ces mécanismes restent encore peu clairs. Il est donc important d'analyser l'ensemble de ces hormones afin de comprendre leur implication dans l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels sous conditions naturelles.

Notre étude des hormones a porté sur 3 familles d'hormones : acide abscissique (ABA), auxine (AIA) et cytokinines (CKs). Elle a été réalisée en collaboration avec l'INRA de Versailles-Grignon (Institut Jean-Pierre Bourgin, Observatoire du Végétal/Chimie-Métabolisme).

V.1. Extraction simultanée de l'ABA, de l'AIA et des CKs

L'extraction simultanée de l'ABA, de l'AIA et des CKs a été réalisée en triplicat. 1 mg de poudre lyophilisée est mélangé avec 800 μL de tampon d'extraction d'acétone/ H_2O /acide acétique (80/19/1, v/v/v) et 10 μL de mixte de standard interne (ABA-d4 : 0,1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, AIA-C13 : 0,05 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ et CKs : 0,05 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) dans un tube Eppendorf de 2 mL. Le mélange est « vortexé » puis soniqué à 25 Hz pendant 1 minute, ensuite incubé dans un thermomixer (Eppendorf ThermoMixer, Eppendorf, USA) à 1000 rpm pendant 10 minutes à 10°C. Le mélange est ensuite centrifugé à 10000 rpm pendant 10 minutes à 10°C. Le surnageant est prélevé et transféré dans un nouveau tube Eppendorf. Le culot est ensuite ré-extrait 2 fois dans 400 μL de tampon d'extraction. Les surnageants sont prélevés et mélangés avec celui de la première extraction. L'extrait est séché ensuite dans un Speedvaccum, puis conservé à -20°C jusqu'aux analyses en UPLC.

V.2. Détermination qualitative et quantitative des hormones par l'UPLC

L'extrait sec est repris dans 100 μL d'acétonitrile/ H_2O (50/50, v/v), puis filtré dans un vial de 1 mL. L'analyse des hormones a été effectuée en chromatographie en phase liquide à haute pression (Water Acquity ultra performance liquid chromatograph) couplée à une spectrométrie de masse quadripolaire (Waters Xevo Trip quadrupole mass spectrometer TQS) (UPLC-ESI-MS/MS).

Les paramètres d'analyse sont décrits selon un programme précis (Tableau XII). Le volume d'injection est de 5 μL . Les composés sont séparés sur une colonne en phase inverse (Uptisphere C18 UP3HDO, 100×2,1 mm×3 μm particle size ; Interchim, France) chauffée à

40°C avec une vitesse de flux de 0,4 mL·min⁻¹. La phase mobile est composée de (A) 0,1% acide acétique/H₂O (v/v) et (B) 0,1% acide acétique/acétonitrile (v/v).

L'analyse de l'ABA et de l'AIA suit le même gradient d'élution (temps, %A) : (0 min., 98%), (3 min., 70 %), (7.5 min., 50 %), (8.5 min., 5 %), (9.6 min., 0%), (13.2 min., 98 %), (15.7 min., 98 %). Pour les CKs, le gradient d'élution est suivant (temps, %A) : (0 min., 95 %), (13 min., 40 %), (16 min., 0 %), (16.5 min., 95 %). La spectrométrie de masse est conduite par électrospray et à l'aide de la plateforme MRM (Multi Reaction Monitoring) en mode négatif pour l'ABA et les CKs et en mode positif pour l'AIA.

Les paramètres instrumentaux sont définis comme suit : le voltage capillaire est à 1,5kV (en mode négatif) ; la température de la source et du gaz désolvaté est respectivement de 130°C et 500°C. L'azote est utilisé pour assister le cône et la désolvatation avec respectivement un flux de 150 L·h⁻¹ et 800 L·h⁻¹. L'argon est utilisé comme gaz de collision avec un flux de 0,18 mL·min⁻¹.

L'acquisition des données et le traitement des résultats sont réalisés à l'aide de logiciel « MassLynx ».

VI. Estimation de la fertilité potentielle réelle, apparente et du rendement

Différentes études ont montré que 60% de variation du rendement final était expliqué par la fertilité des bourgeons de l'année précédente (Guilpart et *al.* 2014). De ce fait, afin de savoir si les indicateurs identifiés dans notre étude en 2014, 2015 et 2016 pouvaient influencer le rendement final, il a été important d'évaluer la fertilité potentielle réelle et apparente en lien avec le rendement.

VI.1. Evaluation de la fertilité potentielle réelle

La fertilité potentielle réelle a été évaluée par le comptage des primordia inflorescentiels à partir des coupes microscopiques et/ou des dissections de bourgeons au stade 159JAD avant la période de repos hivernal.

En 2016, un suivi de la cinétique des processus d'initiation et de différenciation des primordia inflorescentiels a été effectué. Pour chaque stade de prélèvement, 10 bourgeons N0, N1 et N2 ont été prélevés et immédiatement disséqués sous loupe binoculaire au laboratoire. Le nombre de primordia foliaires et le nombre de primordia inflorescentiels non différenciés et différenciés a été ensuite déterminé.

VI.2. Evaluation de la fertilité potentielle apparente et du rendement

La fertilité potentielle apparente a été évaluée par le comptage du nombre d'inflorescences sorties au stade « bouton floral ».

L'estimation précoce du rendement est basée sur la méthode de l'IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin) qui met en évidence la forte corrélation entre le volume de la grappe de *Vitis vinifera* en cours de croissance et son poids à la récolte (Serrano *et al.*, 2005). Elle est calculée à partir de la mesure de la longueur et de la largeur maximale des grappes au stade « fermeture de grappe » selon la formule mathématique de calcul pour un cône :

$$V = \frac{1}{2} \pi r^2 \times h$$

où V est le volume estimé de la grappe, r est le rayon de la grappe (= ½ largeur de la grappe) et h est la longueur de la grappe.

En 2015, le comptage des inflorescences et l'estimation du rendement ont été réalisés sur 40 pieds répartis aléatoirement sur 5 rangs sans tenir compte du type de bourgeons portant

les rameaux en croissance. Au vu des résultats obtenus, en 2016 et 2017, le comptage du nombre de grappes et l'estimation du rendement ont été réalisés séparément pour les rameaux issus de nœuds N0, N1 et N2 sur 40 pieds répartis aléatoirement sur 5 rangs.

L'estimation du rendement a été aussi réalisée sur l'ensemble des pieds non effeuillés.

Sachant que le poids moyen d'une grappe du Merlot dans la région bordelaise selon la Chambre d'Agriculture de la Gironde est d'environ 150 g et que ce poids se réfère à un volume de grappe moyen estimé d'environ 100 cm³ (Serrano *et al.*, 2005), l'estimation du rendement selon la méthode de l'IFV a permis de classer arbitrairement les grappes en différentes catégories en fonction de leur volume :

- petite grappe : < 50 cm³
- grappe moyenne : 50 – 200 cm³
- grosse grappe : 200-600 cm³
- très grosse grappe : > 600 cm³.

VII. Traitement statistique des données

Dans ce travail, le traitement statistique des données a été réalisé à l'aide du logiciel R (Ihaka et Gentleman, 1996). Pour toutes les données obtenues, la normalité a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk.

Pour les données suivant une loi normale, des tests paramétriques ont été réalisés (analyse de variance-ANOVA, Test de Student).

Le test post-hoc Conover-Inman a été utilisé après le test de Kruskal-Wallis. La significativité retenue est comprise entre 0,05 et 0,1 et est représentée sur les graphiques par une étoile.

Pour les données ne suivant pas une loi normale, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé.

Le test post-hoc Tukey (HSD) a été utilisé après l'ANOVA. Les p values retenues sont celles inférieures à 0,05 et sont représentées par des lettres dans les tableaux de traitements de données ou sur les figures.

Enfin, des matrices de corrélations entre variables (Peterson *et al.*, 2013) et une approche de représentation par Analyse en Composante Principale (ACP) sur l'ensemble des variables ont été réalisées. L'ACP est une méthode statistique essentiellement descriptive, qui a pour but de représenter sous forme graphique le maximum de l'information contenue dans un tableau de données. On applique usuellement une ACP sur un ensemble de p variables aléatoires $X_1, \dots, X_p$ caractérisant n individus. Chaque individu est alors représenté dans un espace à p dimensions par des coordonnées qui sont les valeurs prises par cet individu pour les p variables considérées. L'ACP consiste à synthétiser l'information et visualiser les individus sur la base des nouvelles variables qui se substituent aux variables initiales. Cette méthode cherche à déterminer les axes qui expliquent le mieux la dispersion des individus. Ces axes, appelés composantes principales, sont des combinaisons linéaires des variables initiales (Chira, 2009).

CHAPITRE 3

**Etude morphologique et chronologique du
développement du bourgeon latent de
vigne au cours de la première année du
cycle reproducteur**

Les étapes de développement des bourgeons de vigne sont connues depuis bien longtemps et de nombreux auteurs ont déjà décrit l'apparition et l'évolution des différents organes (Barnard et Thomas, 1933 ; Bessis, 1965 ; Bugnon et Bessis, 1968 ; Srinivasan et Mullins, 1976). Mais dans un contexte de changement climatique et de pratiques culturales, il est nécessaire de vérifier si les données recueillies depuis maintenant depuis 40 ans sont toujours d'actualité. Ce premier chapitre a donc pour objectif à partir d'une approche macroscopique et microscopique de (i) décrire les différentes phases d'apparition des organes préformés dans le bourgeon, (ii) réaliser la chronologie de cette apparition en relation avec le millésime et le type de bourgeon.

Cette phase de description est indispensable pour la poursuite de notre étude car elle définira les stades clés pour l'étude des facteurs de régulation et commencera à établir les liens entre développement morphologique et rendement potentiel.

I. Approche microscopique : description morphologique de l'évolution des bourgeons latents de vigne au cours de leur première année de formation

L'objectif de cette première approche était de pouvoir caractériser morphologiquement l'évolution du bourgeon latent au cours de sa première année de développement *via* l'observation macroscopique directement en plein champ afin de :

- proposer des critères visuels de caractérisation ;
- repérer des stades clés de modifications morphologiques qui pourraient ensuite servir de base pour définir les stades de prélèvements ou des repères pour le viticulteur.

Pour cela, au cours des millésimes 2015 et 2016, l'évolution morphologique des bourgeons de la base de 50 rameaux primaires de Merlot a été suivie régulièrement du débourrement jusqu'à la chute des feuilles. Pour chaque type de bourgeon (N0, N1 et N2), la caractérisation morphologique et la description des organes externes ont été réalisées environ toutes les 2 semaines, complétées par des photos et des prises d'échantillon pour l'évaluation du poids.

I.1. Résultats

Les observations réalisées au cours des 2 années d'étude (2015 et 2016) sont similaires et comparables.

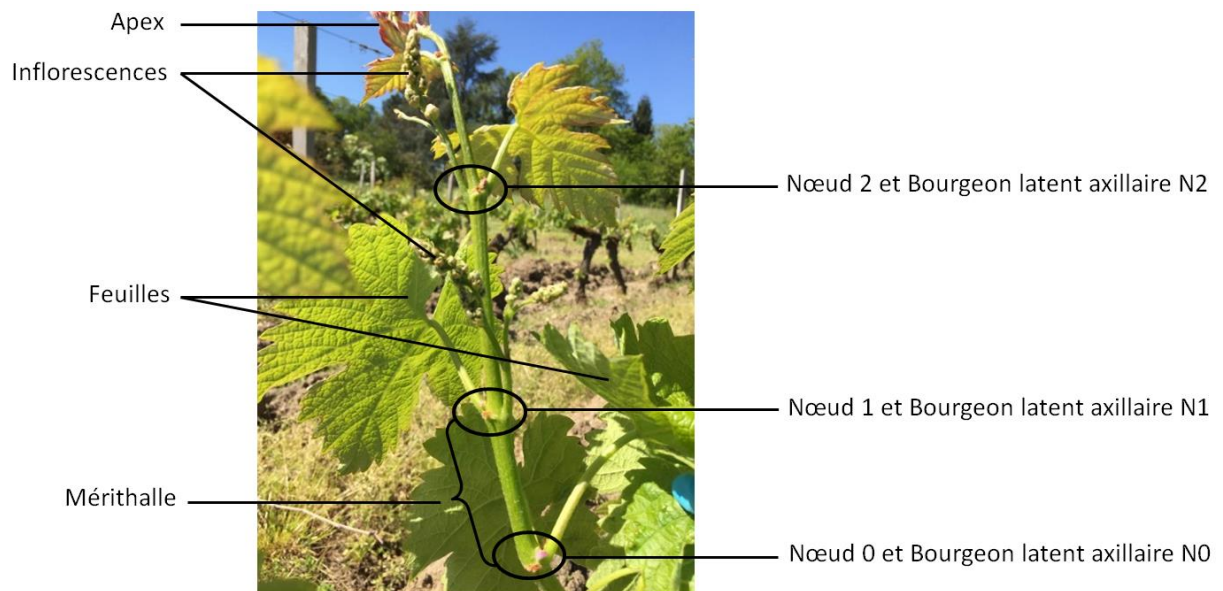


Figure 31 : Rameau primaire de Merlot 35 jours après le débourrement.



Figure 32 : Evolution morphologique des bourgeons latents en formation au cours de la première année du cycle reproducteur.

Après le débourrement, la formation des bourgeons latents portés par la nouvelle tige débutent simultanément avec l'apparition de chaque nœud qui portera une feuille et deux bourgeons axillaires.

Dans le cas de notre étude, on peut commencer à distinguer à l'œil nu les bourgeons axillaires des nœuds de la partie inférieure du rameau 35 jours après le débourrement (JAD). A ce stade, on distingue également les autres bourgeons tels que l'apex et les bourgeons de la couronne ainsi que les premiers organes que sont les feuilles et les deux inflorescences (Figure 31).

Si on s'intéresse à la zone du nœud, on peut observer au stade 35JAD les deux types de bourgeons formés, c'est-à-dire le bourgeon anticipé (ou prompt bourgeon) et le bourgeon dit latent (Figure 32A). A ce stade, les deux bourgeons sont souvent accolés. Le bourgeon anticipé présente une pointe rose alors que le bourgeon latent est totalement vert, enrobé par la préfeuille du bourgeon anticipé et de plus petit volume. Le poids moyen des bourgeons latents à ce stade-là est compris entre 10 et 30 mg pour les deux années étudiées (2015 et 2016) (Figure 33). Il n'y a pas de différences significatives de poids moyen entre les bourgeons de différents rangs.

Quelques semaines plus tard, au stade 60JAD, la morphologie des bourgeons a totalement changé. Certains bourgeons anticipés se sont développés en entre-cœurs, tandis que les bourgeons latents sont totalement séparés du bourgeon anticipé et présentent un aspect triangulaire, légèrement bombé à la base, avec des écailles fermées (Figure 32B). Il est maintenant facile de les distinguer à l'aisselle de la feuille. Leur poids moyen a fortement augmenté par rapport au stade 35JAD : doublé ou triplé en 2015, quintuplé pour les bourgeons N2 en 2016 (Figure 33). A ce stade, commencent à apparaître des différences de poids entre les types de bourgeons avec les bourgeons N2 qui sont plus gros que les bourgeons N0 et N1.

Le développement des bourgeons se poursuit rapidement et le stade suivant a été identifié comme le moment où l'extrémité des écailles commence à s'ouvrir en raison de la formation des organes préformés. Pour les deux années, ce stade a été observé 88 jours après le débourrement. A ce stade, les deux écailles des bourgeons latents sont légèrement écartées et les bourgeons sont verts (Figure 32C). Leur poids a significativement augmenté, mais de manière variable selon leur rang (Figure 33). Ainsi, pour les deux années étudiées, la croissance des bourgeons N0 a été la plus rapide, ils ont atteint leur poids maximum à ce stade-là et sont les plus gros. On observe également, à 88JAD et pour les deux années une hiérarchie pour les

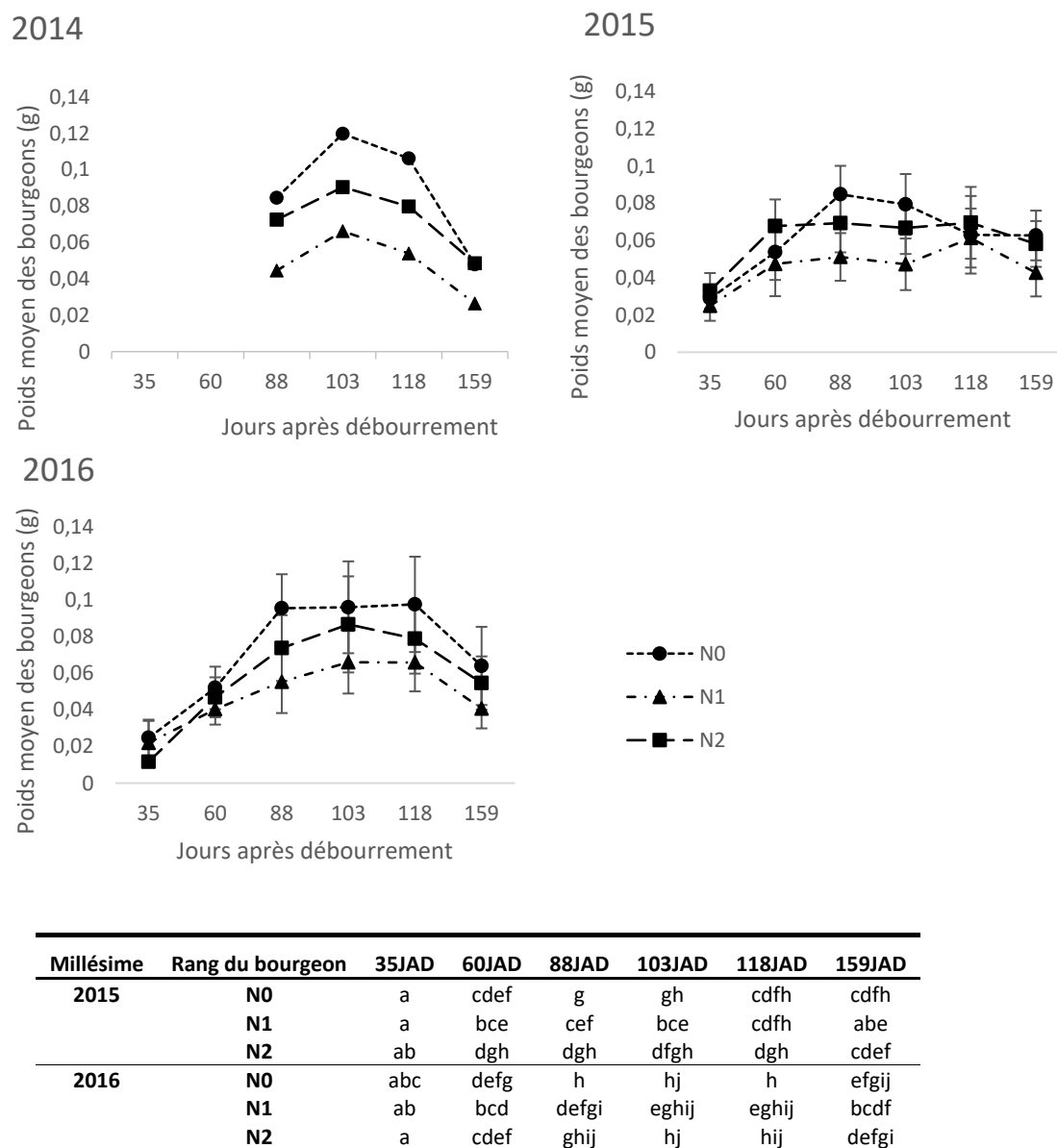


Figure 33 : Evolution du poids moyen d'un bourgeon latent au cours de son développement durant la première année de formation en 2014, 2015 et 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de quinze répétitions indépendantes ; le tableau représente les différences significatives ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis : a, b, c, d, e, f, g, h, i, j pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes

poids des bourgeons : N0 étant plus lourd que N2 lui-même plus lourd que N1.

La phase suivante se caractérise par un ralentissement de la croissance et une modification morphologique des bourgeons avec brunissement des écailles dû à un début de lignification. Nous retiendrons le stade 103 jours après débourrement, remarquable par le changement de couleur des écailles (Figure 32D). A ce stade, le poids moyen évolue différemment selon les bourgeons et les millésimes (Figure 33) : pour les bourgeons N0, il a augmenté en 2014, diminué en 2015 alors qu'il est resté constant en 2016 ; pour les bourgeons N1 et N2 il est resté constant en 2015 et a augmenté légèrement en 2014 et en 2016. Mais dans tous les cas, les bourgeons N0 ont tendance à rester plus gros que les bourgeons N1 et N2.

Après le stade 103JAD, le brunissement des écailles de bourgeons s'accélère (Figure 32E et 32F), la couleur marron s'accentue et on commence à l'œil nu à noter des caractéristiques de dessiccation avec la fermeture des écailles. Au cours de cette période, on considèrera alors deux stades : 118JAD qui correspond au stade où tout le bourgeon est de couleur marron clair mais avec des écailles encore légèrement ouvertes et 159JAD qui correspond au stade A de Baggiolini, c'est-à-dire bourgeon d'hiver avec une couleur brune foncée et des écailles totalement fermées. Le poids moyen commence à diminuer et la diminution s'accélère jusqu'au dernier stade caractérisé (Figure 33). A ce stade, il n'y a pas de différence significative de poids ni entre les bourgeons, ni entre les années.

I.2. Discussion

Nos observations nous ont permis de différencier 6 étapes clés correspondant à des modifications morphologiques facilement observables au cours de la première année de formation des bourgeons : 35JAD, 60JAD, 88JAD, 103JAD, 118JAD et 159JAD.

Jusqu'à ce jour, aucun auteur n'avait décrit ces étapes en les faisant correspondre à un rythme fixe à partir du débourrement. Les descriptions faites jusqu'alors (Barnard et Thomas, 1933 ; Bessis, 1965 ; Bugnon et Bessis, 1968 ; Carbonneau, 1992 ; Coombe and Iland 2004 ; Carmona *et al.*, 2008) se basaient sur les stades phénologiques de la plante entière ou des stades définis spécifiquement pour le bourgeon (Carolus, 1970 ; Srinivasan et Mullins, 1981a)

L'intérêt de cette approche est de pouvoir s'affranchir des phases de développement des autres organes végétatifs qui peuvent être fortement influencées par les pratiques viticoles.

Ces résultats confirment les observations déjà rapportées dans la bibliographie, avec des données plus précises concernant l'évolution du poids des bourgeons et les différences entre type de bourgeon. Ainsi, la première phase jusqu'au stade 88JAD peut être définie comme

une phase d'organogenèse, rapide et simultanée à la phase de croissance végétative de la plante la plus active (Carbonneau *et al.*, 2007). Puis cette phase serait suivie d'une seconde période dite d'ontogenèse avec un ralentissement des mécanismes d'initiation des primordia, une orientation vers des mécanismes de différenciation permettant la formation des ramifications et une stabilisation progressive du poids du bourgeon. Cette période durerait jusqu'au stade fermeture de grappe qui est concomitant au stade 103JAD défini ici et qui, pour de nombreux auteurs, marque le début de la phase de prédormance chez les bourgeons de vigne (Barnard et Thomas, 1933 ; Bessis, 1965 ; Bugnon et Bessis, 1968 ; Carbonneau 1992 ; Coombe and Iland 2004 ; Carmona *et al.*, 2008). Cet arrêt de grossissement est alors définitif à partir de 118JAD. Il correspond à l'entrée en dormance et au début d'aoûtement pour la plante entière.

L'évolution du poids moyen des bourgeons est parfaitement reliée aux périodes définies et aux modifications morphologiques. Il augmente rapidement entre 35JAD et 88JAD en raison d'un métabolisme actif de la plante permettant la formation de nouveaux organes (organogenèse). Puis atteint son maximum au moment où l'arrêt de croissance de la plante s'installe (ontogenèse), et diminue après l'entrée en dormance, pendant la phase d'aoûtement. Ces profils d'évolution du poids moyen sont semblables entre les deux millésimes et entre les bourgeons de différents rangs. Mais, les poids varient selon le type de bourgeons, le poids moyen des bourgeons N1 étant toujours inférieur à celui des bourgeons N0 et N2. L'hypothèse d'une différence anatomique peut alors être envisagée.

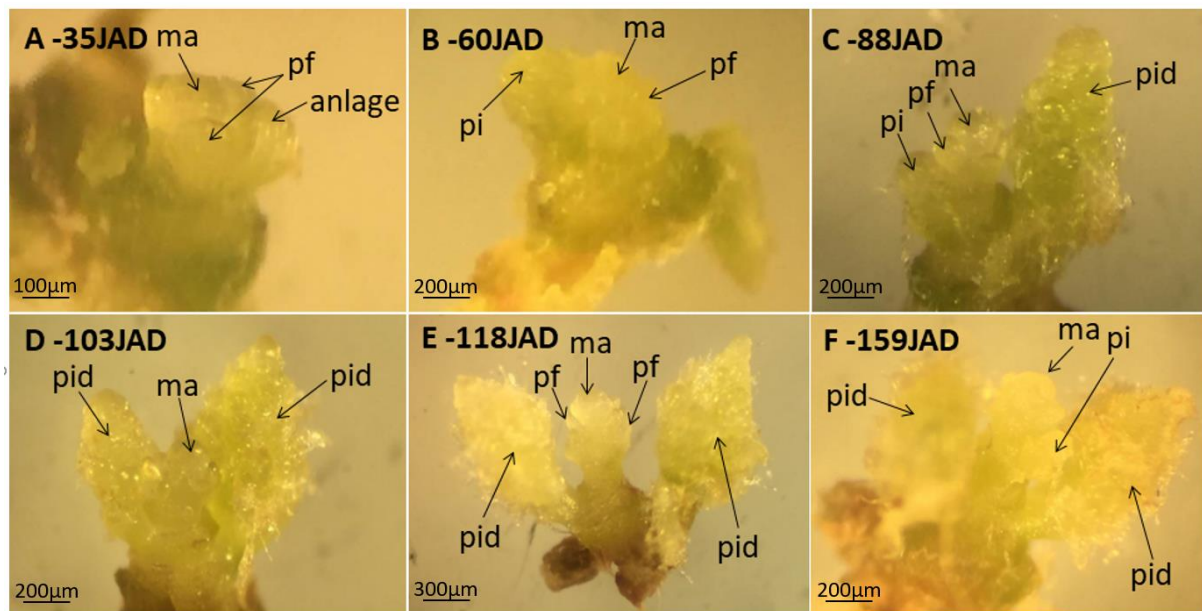


Figure 34 : Evolution morphologique des structures reproductrices du bourgeon latent de vigne au cours de la première année de développement (année 2016).

ma : méristème apical ; **pf** : primordium foliaire ; **pi** : primordium inflorescentiel ; **pid** : primordium inflorescentiel différencié

II. Approche microscopique : description morphologique et anatomique de l'évolution des primordia au sein de bourgeons latents de vigne au cours de leur première année de formation

L'établissement de stades clés de modifications morphologiques des bourgeons latents en lien avec l'évolution du poids de ces derniers a permis de démontrer qu'il existait (i) des phénomènes de croissance suffisamment importants pour faire varier le poids de l'organe en lien avec les phases de croissance de la plante et (ii) des comportements différents entre les bourgeons.

L'objectif de cette seconde approche est donc de décrire, *via* des techniques macro et microscopiques, l'organisation interne du bourgeon et l'apparition des primordia (foliaires et inflorescentiels) afin de les corrélérer avec l'évolution du poids et la fertilité potentielle.

II.1. Résultats

Les coupes microscopiques réalisées en 2014 et 2015 dans l'axe longitudinal des bourgeons ont permis d'observer le type d'organes formés ainsi que la chronologie de leur apparition. La dissection des bourgeons au cours de leur développement en 2016 a permis de compléter les observations microscopiques grâce au comptage des organes formés.

35 jours après le débourrement (35JAD), il est possible d'observer la première ébauche (anlage) du primordia inflorescentiel à partir du méristème végétatif (Figure 34A). Il s'agit d'un méristème reproducteur non différencié qui a un aspect globuleux. Il est proche du méristème apical (ma), mais se distingue par le fait qu'il porte souvent deux bras, dont un gros bras interne et un petit bras externe (Figure 34A). A ce stade, on ne peut identifier clairement les primordia foliaires (PF) qui sont environ au nombre de quatre à cinq, ainsi qu'une dizaine de bractées formant les écailles (Figures 35A et 36A). On note que le nombre de PF des bourgeons N2 est légèrement inférieur à celui des bourgeons N0 et N1 ; puis au cours du développement, ce phénomène s'estompe et il n'existe plus entre les 3 types de bourgeons de différences significatives à partir du stade suivant (Figure 36A).

La croissance du méristème apical se poursuit dans son axe, et permet alors à l'anlage d'évoluer en primordium inflorescentiel (PI) dans un axe légèrement dévié (Figure 34B). 60 jours après le débourrement, l'anlage formé commence à se développer en PI non différencié (Figure 35A). Ainsi, le méristème reproducteur qui se trouve au sommet de l'axe du primordium, est caractérisé par la présence d'environ 5 à 7 couches de cellules méristématiques de petite

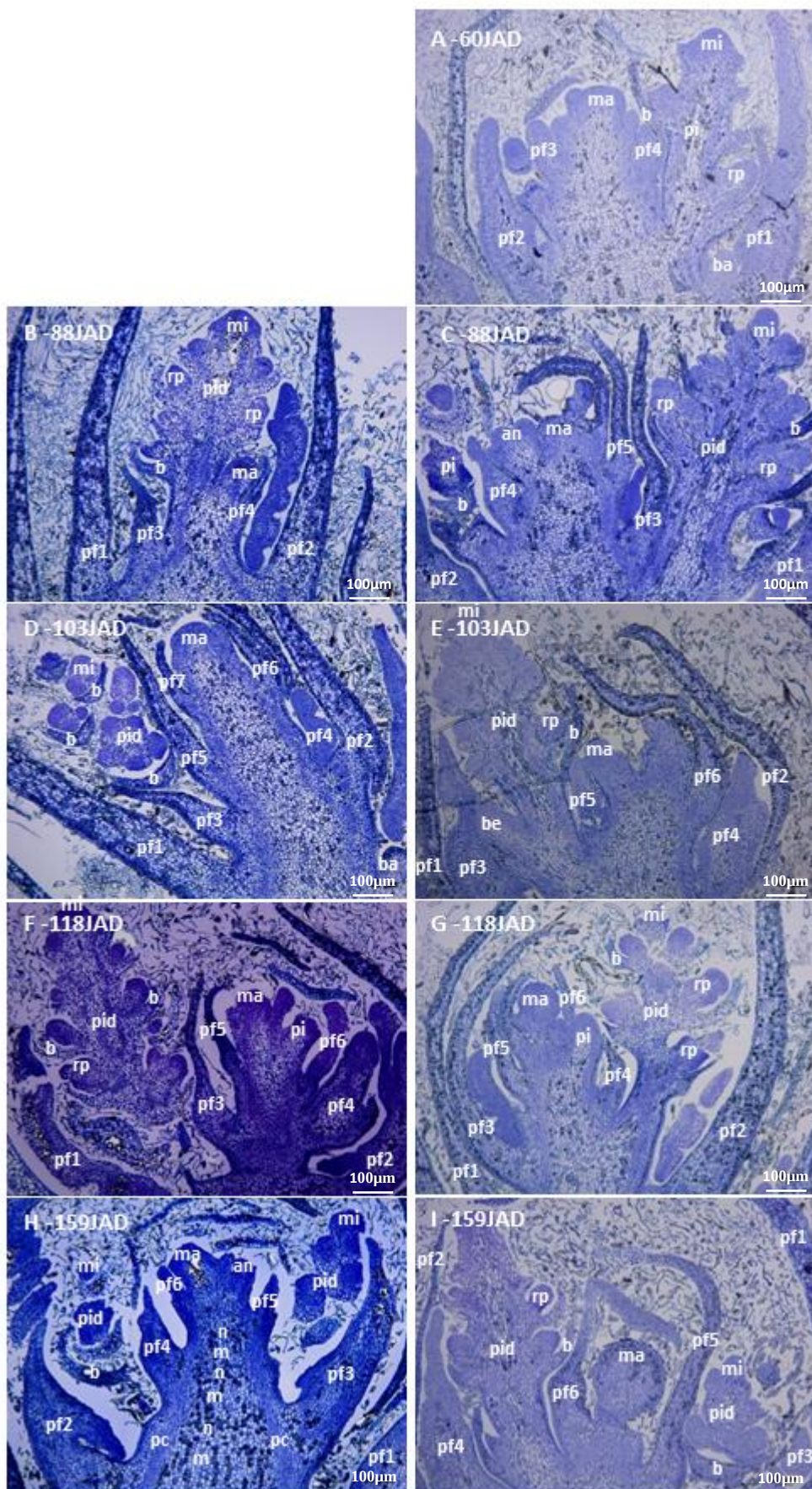


Figure 35 : Evolution anatomique des structures du bourgeon latent de vigne au cours de la première année de développement (année 2014 : B, D, F, H et année 2015 : A, C, E, G, I).

ma : méristème d'apex ; **mi** : méristème inflorescentiel ; **an** : anlage ; **be** : bras externe ; **pf** : primordium foliaire ; **pi** : primordium inflorescentiel ; **pid** : primordium inflorescentiel différencié ; **b** : bractée ; **rp** : ramification primaire ; **n** : nœud ; **m** : méristhale ; **pc** : procambium

taille sans plastes différenciés (Figure 35A). Le début de la différenciation d'un primordium inflorescentiel s'observe avec l'apparition de petites structures globuleuses le long de l'axe de croissance du primordium après le stade 60JAD (Figure 34C). Il s'agit de la formation de bractées et de ramifications méristématiques. La taille de la ramification méristématique basale est plus importante que celle de la ramification apicale. Lorsque débute la différenciation du premier primordium inflorescentiel, il est possible d'observer l'anlage du second primordium inflorescentiel qui aura le même rythme de développement, avec environ 10 à 12 jours de décalage. A ce stade-là, il est aussi possible de distinguer 2 à 3 mérithalles préformés séparés par plusieurs couches de cellules qui s'allongent horizontalement par rapport à l'axe végétatif principal et qui deviendront des nœuds (Figure 35C). Passé ce stade, les primordia inflorescentiels continuent leur ramification dans le sens acropète, ce qui leur donne la forme finale d'une grappe. Ainsi avant le stade 60JAD, il n'est pas possible de différencier des primordia inflorescentiels (PI) sauf pour le nœud N0 où le premier commence à être visible (Figure 36B).

Entre 60 et 88 jours après le débourrement, les mécanismes de différenciation s'intensifient, et le nombre moyen des PI par bourgeon augmente significativement pour dépasser 1 PI différencié et 2 PI indifférenciés par bourgeon et ceci pour les trois types de bourgeons (Figures 36B et 36C). Au cours de cette phase de développement actif, le premier PI formé poursuit sa ramification en forme de grappe avec formation de ramifications secondaires, voire tertiaires dans certains bourgeons (Figures 35B et 35C). Le deuxième PI s'initie mais n'est pas ou peu encore différencié (Figure 34C). Il n'y a plus de différences entre les trois types de bourgeons pour le nombre moyen de PI indifférenciés à ce stade-là (Figure 36B).

Après 88JAD, l'initiation des PI se ralentit, ce qui se traduit par une augmentation lente du nombre de PI dans les bourgeons (Figure 36B). Par contre la ramification des deux PI initiés se poursuit de manière plus active puisque à 103 jours après le débourrement, le premier PI a pratiquement atteint sa taille définitive avec des ramifications tertiaires et le second PI commence à se ramifier avec apparitions de ramifications secondaires (Figures 35D et 35E). En même temps, un troisième PI peut s'initier dans certains bourgeons bien développés (Figure 34D). Ce rythme se poursuit jusqu'à 159JAD où le nombre moyen de PI par bourgeon dépasse 2,6 et le nombre de PI ramifiés par bourgeon atteint 2 en moyenne (Figures 34E, 34F, 35F, 35G, 35H, 35I et 36C). A ce stade, il est possible d'observer dans les bourgeons de Merlot jusqu'à trois primordia inflorescentiels. Les deux premiers sont bien ramifiés et disposés de part et d'autre de l'axe de croissance végétative, alors que le troisième reste souvent à l'état d'un anlage et est situé du même côté que le second primordia inflorescentiel (Figures 35F et

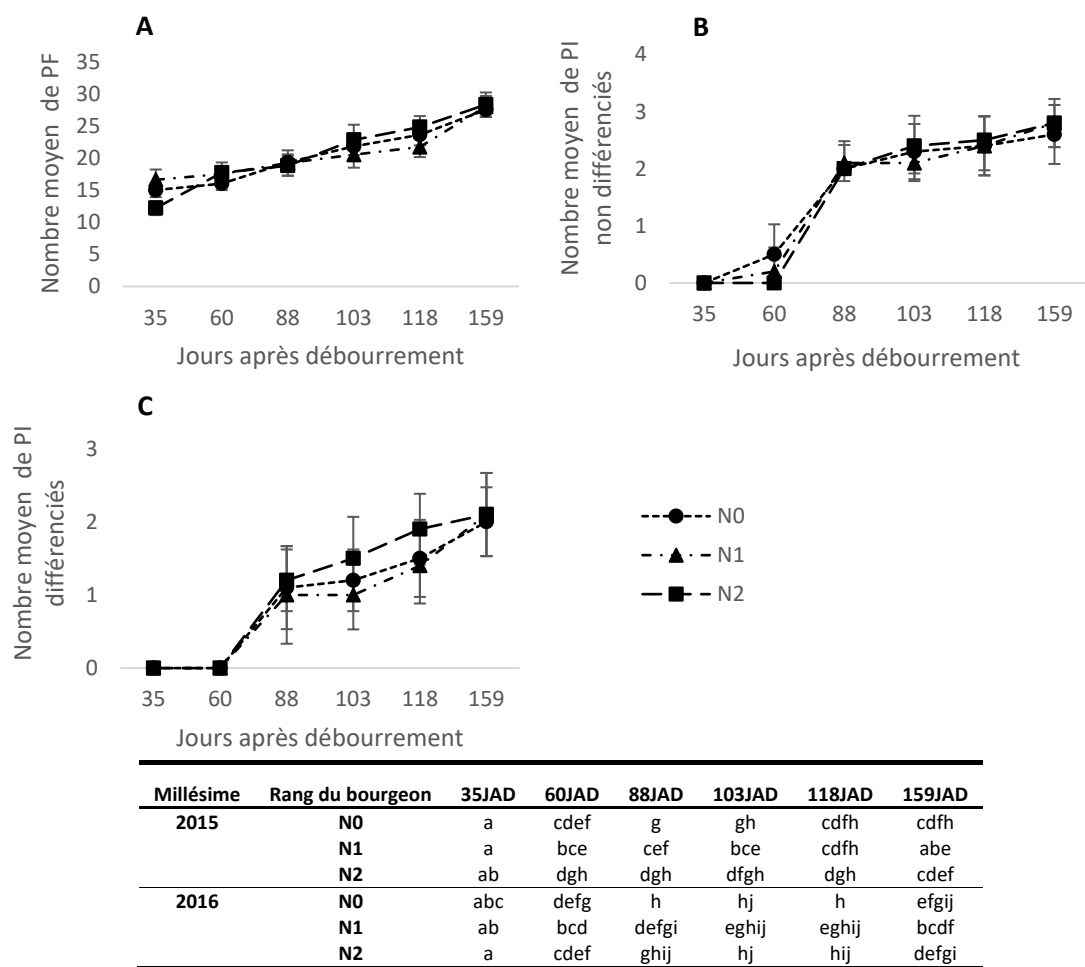


Figure 36 : Evolution du nombre de (A) primordia foliaires (PF), (B) primordia inflorescentiels non différenciés et (C) primordia inflorescentiels différenciés dans les 3 types de bourgeons (N0, N1 et N2) au cours de leur première année de développement (année 2016).

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions indépendantes ; le tableau représente les différences significatives ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis : a, b, c, d, e, f pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes

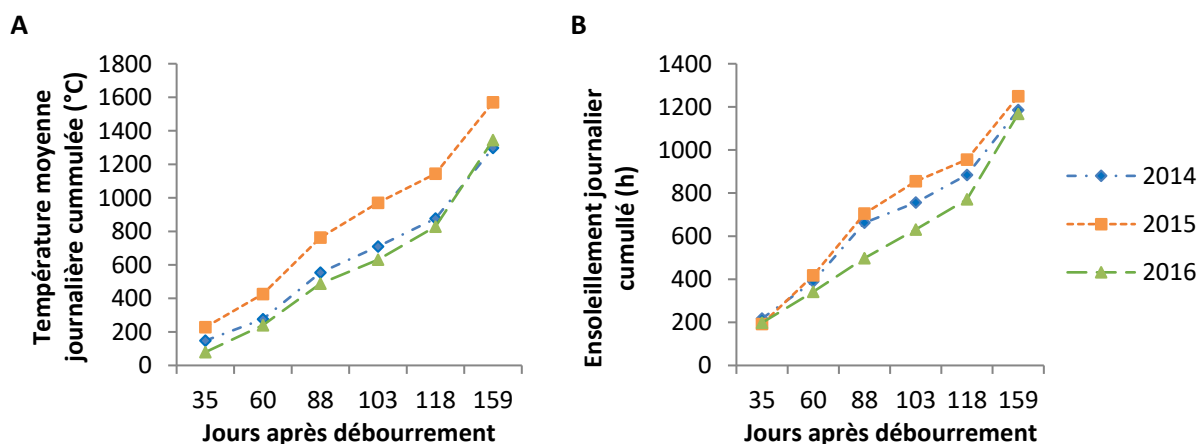


Figure 37 : Cumul des indicateurs thermiques et pluviométriques en 2014, 2015 et 2016 avec (A) sommes (base 10) des températures moyennes journalières cumulées et (B) sommes des heures d'ensoleillement journalier cumulé (Source : météoici.fr).

35H). Même si au final, le nombre total de PI n'est pas significativement différent entre les 3 types de bourgeons (Figure 36B), la cinétique de la ramification du second PI semble varier entre les bourgeons N0, N1 et N2. En effet, la ramification du second PI dans les bourgeons N2 semble être plus rapide que celle dans le bourgeon N0, qui est elle-même est plus rapide que celle dans le bourgeon N1 (Figure 36C).

L'étude réalisée sur deux millésimes différents montre que la chronologie d'apparition des différentes structures est identique quelle que soit l'année considérée. Par contre, il semblerait qu'en 2015 les premières structures soient apparues légèrement plus rapidement qu'en 2014 permettant un degré de ramification un peu plus important en 2015 qu'en 2014 (Figure 35). De plus, Il est également important de noter que les conditions climatiques de 2015 étaient plus favorables que celles de 2014 avec une somme des températures cumulées et un nombre d'heures d'ensoleillement plus élevés (Figure 37).

De nombreux travaux ont montré que la température et la lumière étaient deux facteurs environnementaux clés qui pouvaient conditionner directement le rythme d'initiation, de différenciation et de ramification des PI. Il est généralement considéré qu'une température au-dessus de 20°C est nécessaire pour l'initiation optimale des PI (Buttrose, 1970 ; Kasimatis *et al.*, 1975 ; Dunn et Martin, 2000 ; Petrie et Cligeleffer, 2005). Buttrose (1970) rapporte que les températures inférieures à 20°C au début du printemps ne permettraient pas de ramification des PI et ainsi réduirait leur taille. A l'inverse, une forte intensité lumineuse et une longue durée d'ensoleillement pourrait favoriser l'initiation, la différenciation et la ramification des PI (Antcliff *et al.*, 1955 ; Baldwin, 1964 ; Buttrose, 1970 ; Dry, 2000 ; Petrie et Cligeleffer, 2005 ; Sanchez et Dokoozlian, 2005). Dans notre étude, la température maximale journalière moyenne entre 35JAD et 60JAD est de 19,23°C en 2014, 21,43°C en 2015, et 16,25°C en 2016 (Source : météoiel.fr). La température moyenne journalière cumulée en 2015 est supérieure à celle de 2014 tout au long du développement des bourgeons, et l'ensoleillement journalier cumulé en 2015 est légèrement plus important qu'en 2014 (Figure 37). Ces conditions climatiques pourraient être reliées à la précocité de l'initiation et de la ramification des PI en 2015. En ce qui concerne 2016, les conditions climatiques sont moins favorables avec une somme des températures moyennes journalières cumulées et un ensoleillement journalier cumulé plus faibles qu'en 2014 et 2015, mais néanmoins supérieures aux valeurs limites.

II.2. Discussion

Depuis les années 60, de nombreux auteurs ont décrit le processus de l'initiation, la différenciation et la ramification des PI dans les bourgeons latents. Le premier indicateur de la

Tableau XIII : Correspondance en nombre de jours après débourrement entre les stades clés définis par Carolus et les dates caractérisées dans notre étude.

Travaux de Carolus (1970)			Correspondance (en nombre de jours) par rapport à la date présumée de débourrement pour les 3 bourgeons de la base en 1970	Correspondance (en nombre de jours) par rapport à la date présumée de débourrement pour les 3 bourgeons de la base en 2016
Stades	Définition	Période		
Stade A	1 ^{er} PF soulevé	T0 = 8 Jours après la feuille étalée	15JAD	
Stade B	2 ^{ème} PF soulevé	T0 + 8 jours	23JAD	
Stade C	3 ^{ème} PF soulevé	T0 + 20 jours	35JAD	
Stade D	4 ^{ème} PF soulevé	T0 + 30 jours	45JAD	
Stade E	Initiation 1 ^{er} PI	T0 + 30 jours	45JAD	
Stade F	1 ^{ère} ramification du 1 ^{er} PI, formation de l'aile (anlage)	T0 + 35 jours	50JAD	35JAD
Stade G	Initiation 2 ^{ème} PI	T0 + 45 jours	60JAD	
Stade H	1 ^{ère} ramification du 2 ^{ème} PI, formation de l'aile (anlage)	T0 + 52 jours	67JAD	
Stade I	Ramification secondaire du 1 ^{er} PI	T0 + 52 jours	67JAD	60JAD
Stade J	Initiation 3 ^{ème} PI	T0 + 60 jours	75JAD	
Stade K	Initiation 4 ^{ème} PI et ramification secondaire du 2 ^{ème} PI	T0 + 72 jours	87JAD	88JAD
Stade L	Stade final de l'organogenèse	T0 + 110 jours	103JAD	118JAD

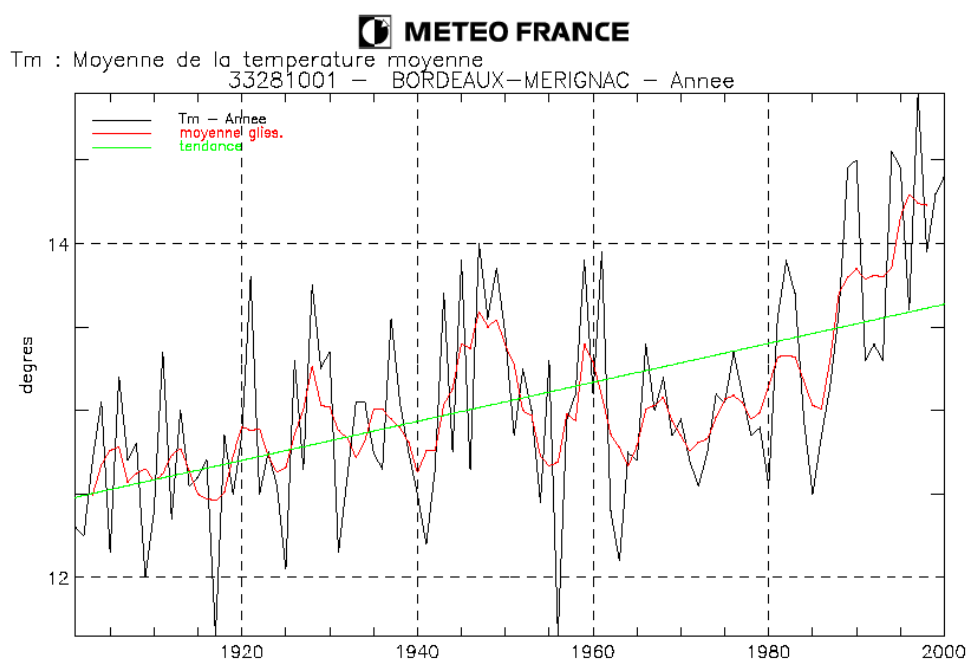


Figure 38 : Evolution de la température moyenne à Bordeaux depuis 1900 (Source : Météo France).

formation de l'axe reproducteur correspond à la formation d'un anlage (ébauche non différenciée) (Carolus, 1970 ; Srinivasan et Mullins, 1976, 1980b ; Williams, 2000). Le développement de cette ébauche au printemps induit la formation d'une bractée qui se divise ensuite en deux bras ayant le potentiel de produire des PI ou des PV (primordia vrillaires) qui donneront, selon le degré de ramification, des grappes ou des vrilles (Carolus, 1970 ; Alsaidi, 1975 ; Srinivasan et Mullins, 1976, 1980b ; Mullins *et al.*, 1992). Il est également admis que le nombre de PI formés avant la fin de la saison 1 du cycle reproducteur varie de 1 à 4 selon le cépage (Carolus, 1970 ; Pratt, 1971).

La dissection et l'observation microscopique des coupes longitudinales des bourgeons nous ont permis de bien suivre les grandes étapes de l'initiation, de la différenciation et de la ramification des PI. Nos observations sont globalement en accord avec les nombreux travaux antérieurs et notamment ceux réalisés par Carolus en 1970 sur le Merlot à Bordeaux, et qui avait défini 12 stades d'évolution des bourgeons au cours de leur première année de développement avant l'entrée en dormance (Tableau XIII).

Nous retrouvons une partie des stades définis par Carolus ; seul le stade K n'a jamais pu être retrouvé car contrairement à cet auteur, nous n'avons jamais observé le 4^{ème} primordium inflorescentiel au cours des 3 années d'étude. Ainsi, au stade 159JAD (à la fin de l'été) le nombre moyen des PI par bourgeon pour le Merlot à Bordeaux dans notre étude a atteint 2,8, soit un maximum de 3 PI par bourgeon. Mais, dans la plupart des cas, seulement 2 PI sont bien ramifiés, le troisième restant à l'état d'anlage ou de ramification primaire ne permettant pas de le différencier en PI ou en PV. Nos observations se rapprochent plus de celles d'Alsaidi (1975), de Srinivasan et Mullins (1979) ou de Boss et Thomas (2000) qui n'ont jamais observé plus de 3 PI différenciés dans leurs travaux.

Au-delà des structures formées, la périodicité des phases de développement des PF et PI peut varier en fonction des cépages et des régions viticoles (Alleweldt et Ilter, 1969 ; Alsaidi, 1975 ; Swanepoel et Archer, 1988 ; Cheema *et al.*, 1996 ; Watt *et al.* 2008) rendant quasiment impossible l'établissement d'un calendrier universel. Pour le Merlot à Bordeaux, Carolus (1970) avait parfaitement mis en évidence les périodes clés (Tableau XIII). Ce rythme n'avait pas été vérifié depuis plus de 40 ans, alors que l'influence du changement climatique sur la phénologie de la vigne et la qualité du vin dans la région bordelaise a été mise en évidence depuis près de deux décennies (Jones et Davis, 2000 ; Van Leeuwen *et al.*, 2004 ; Jones *et al.*, 2005). La température moyenne annuelle à Bordeaux est passée d'environ 12,5°C dans les années 70 à environ 14°C aujourd'hui (Figure 38). Le nombre annuel de jours chauds (T°C moyenne > 25°C) est passé de 60 jours dans les années 70 à 100 jours actuellement (source :

Tableau XIV : Evolution des stades phénologiques de Merlot à Bordeaux (Données : <http://www.bordeauxraisins.fr/>).

	Date débourrement	Date floraison	Date véraison
Moyenne 1960-1970	8 avril	13 juin	18 août
Moyenne 2000-2010	1 avril	2 juin	4 août

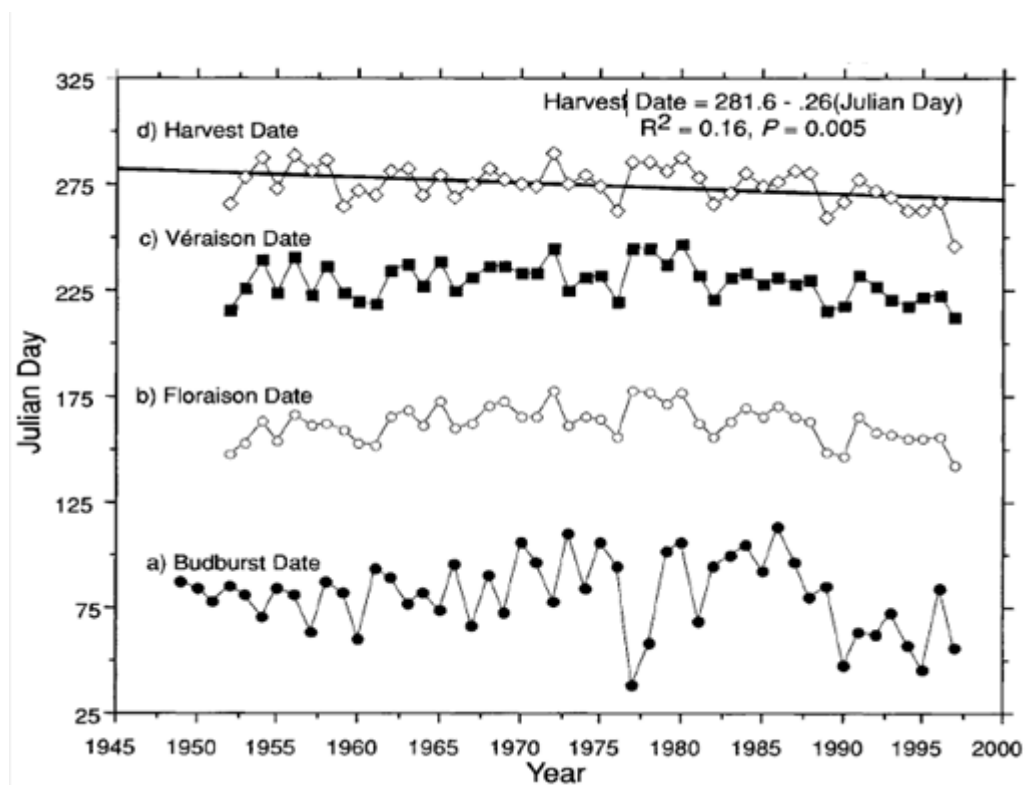


Figure 39 : Date (en jour julien) de différents stades phénologiques de la vigne entre 1945 et 2000 à Bordeaux (Jones et Davis, 2000).

www.meteo-bordeaux.fr). Ce réchauffement climatique a non seulement entraîné l'avancement des dates de débourrement (Tableau XIV), de floraison et véraison, mais aussi réduit l'écart entre les stades clés phénologiques en termes de nombre de jours (Figure 39) (Jones et Davis, 2000). Il était donc important de redéterminer le rythme des stades clés de l'initiation, la différenciation et la ramification des PI afin d'estimer l'impact des modifications climatiques sur ces mécanismes.

Ainsi nos travaux démontrent que certains aspects de ces mécanismes ont pu être modifiés. Le premier point concerne la précocité de la production des anlagen et du début des phases de ramification. En effet, pour les 3 années étudiées, dès le stade 35JAD, les anlagen à 2 bras sont observables. En 1970, ce stade (stade F) n'était atteint pour les bourgeons de la base que 50 jours après le débourrement, soit deux semaines plus tard qu'actuellement. Cet écart persiste mais se réduit pour les stades suivants avec par exemple la formation des ramifications secondaires du 1^{er} PI (stade I) observée 60 jours après le débourrement alors que Carolus la notait 67 jours après le débourrement (Tableau XIII). Le second point porte sur la période de fin de ramifications des PI qui ne semble pas s'arrêter deux mois après leur formation comme indiqué par Carolus. Elle semble continuer pendant la phase de prédormance jusqu'au stade 118JAD voir jusqu'au stade 159JAD, le troisième PI pouvant poursuivre son initiation très lentement jusqu'à la fin de l'été. **Il en ressort donc que la période actuelle d'initiation, de différenciation et de ramification des PI chez le Merlot s'étend sur une durée plus longue que celle décrite dans les années 70, en débutant en moyenne 2 semaines plus tôt et se terminant plus de 15 jours après.**

Ainsi comme pour la phénologie, la physiologie du bourgeon lors de sa première année de développement semble impactée par les modifications climatiques. Le développement des primordia inflorescentiels dépend de nombreux facteurs, mais parmi les facteurs climatiques, la température et la lumière sont considérés comme les plus importants (Baldwin 1964 ; May *et al.*, 1976 ; Smart *et al.*, 1982 ; Morgan *et al.*, 1985) et montrent invariablement des corrélations directes entre exposition à la lumière, températures et fécondité. En conditions contrôlées, des relations quantitatives ont été établies entre la température et la fertilité (Buttrose, 1970 ; Kasimatis *et al.*, 1975 ; Dunn et Martin, 2000 ; Petrie et Cligeleffer, 2005) et une gamme de température optimum (entre 20 et 35°C) a été établie par Keller *et al.*, (2010), mais aucunes données ne concernent l'impact de la température sur le rythme des mécanismes d'induction et d'initiation inflorescentielle. L'éclairement des bourgeons latents est également un facteur à prendre en compte pour ses effets positifs sur la formation des inflorescences (Antcliff *et al.*, 1955 ; Baldwin, 1964 ; Buttrose, 1970 ; Dry, 2000 ; Petrie et Clingleffer, 2005 ; Sanchez et

Dokoozlian, 2005). Mais en conditions de plein champ, il est difficile de vérifier si cet effet est dû à un effet direct ou indirect *via* la photosynthèse et le statut carboné des bourgeons (Keller et Koblet, 1995b ; Dry, 2000 ; Lebon *et al.*, 2008). Ainsi, on peut supposer que l'augmentation de la température moyenne de fin d'hiver et de début de printemps observée depuis les dernières décennies à Bordeaux, qui entraîne un débourrement plus précoce et donc une exposition à la lumière plus longue des bourgeons formés, stimulerait les premières activités cellulaires dans le bourgeon et favoriserait la mise en place du 1^{er} PI plus précocement. La comparaison des 3 millésimes étudiés conforte cette hypothèse avec la formation du premier anlage plus précocement en 2015 qu'en 2014 et 2016, en lien avec les températures moyennes entre 35JAD et 60JAD dépassant 21°C cette année-là (21,43°C) contre 19,23°C en 2014 et 16,25°C en 2016.

A ce stade du manuscrit, il est encore difficile d'émettre une hypothèse sur l'impact du changement de rythme des phases d'induction, d'initiation et de ramification des inflorescences sur le rendement final, car nos résultats montrent également que **la cinétique d'organisation des structures reproductrices du bourgeon ne peut être considérée comme une droite et doit être divisée en deux phases distinctes :**

- **Entre 35JAD et 88JAD : une phase d'organogenèse** au cours de laquelle les deux premiers PI sont initiés et le premier ramifié ;
- **Entre 88JAD et 118JAD : une phase d'ontogenèse** pendant laquelle se déroule la ramification du deuxième PI et l'initiation du troisième PI.

Pour la première fois, il est possible de relier les phases d'apparition des organes dans le bourgeon avec leur cinétique d'évolution de poids. En effet, l'augmentation rapide du poids moyen des bourgeons entre 35JAD et 88JAD est superposée à la phase de croissance active, permettant l'initiation rapide des primordia foliaires, ainsi que l'initiation et le début des ramifications des 2 premiers primordia inflorescentiels. Ensuite, au cours de la seconde période, le poids évolue plus lentement mais continue à augmenter alors que le nombre d'organe formé diminue. Mais contrairement à ce que proposait Carolus, nous ne pouvons valider l'hypothèse que le degré d'organisation atteint par un bourgeon dépendrait davantage de la vitesse de différenciation des ébauches que de la durée de son organogenèse puisque les différences de poids moyen observées entre les bourgeons N1, N0 et N2 ne sont pas retrouvées en termes de nombre moyen de PI ou de PF. L'hypothèse de niveaux de ramification de PI variable entre les bourgeons en fonction de la précocité du début de la phase d'initiation des PI est plutôt privilégiée pour expliquer ces différences.

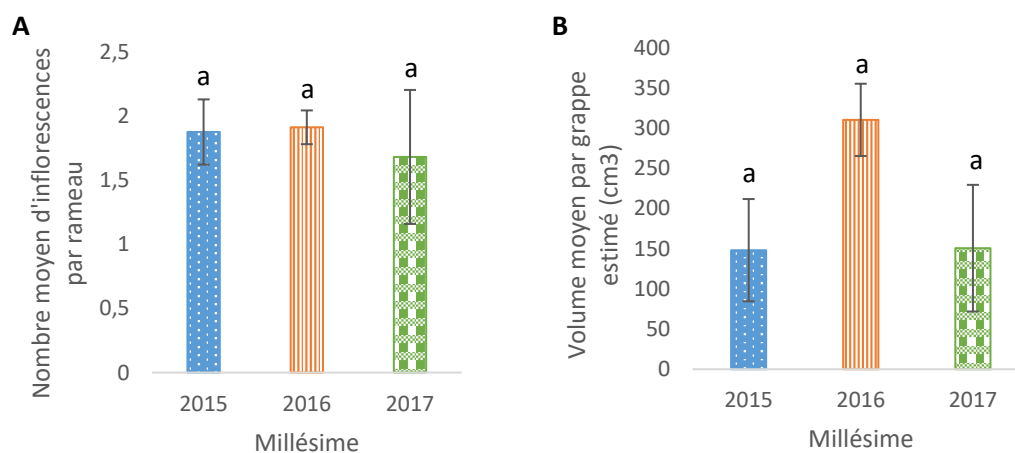


Figure 40 : Estimation (A) du nombre moyen d'inflorescences à la floraison et (B) du volume moyen des grappes au stade « fermeture de grappe » pour les 3 millésimes étudiés.

Les résultats représentent la moyenne (A) $\pm$ écart-type moyen et (B) $\pm$ 1/4 quartile des grappes portées par 40 pides ; a pour chaque histogramme indiquent l'absence de différence significative entre les groupes de moyennes ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis.

III. Relations entre la chronologie d'apparition de formation des primordia inflorescentiels dans les bourgeons au cours de leur première année de développement et le rendement

Le rendement d'un pied de vigne est souvent simplifié par la détermination du poids des baies par pied qui correspond au produit du nombre de grappes par pied, du nombre de baies par grappe et du poids moyen d'une baie (Galet, 1957). Parmi ces variables, le nombre maximal de grappes est prédéterminé par le nombre de PI initiés dans les bourgeons latents, alors que le degré de ramification des PI pourrait conditionner en partie la taille des grappes (Bessis, 1965 ; Clingeleffer, 1984 ; Clingeleffer et Krstic, 2001).

Les résultats présentés précédemment ont décrit les processus de constitution des organes reproducteurs chez le Merlot à Bordeaux. Nous avons démontré que les mécanismes de différenciation semblaient être liés à la précocité du millésime permettant la formation de presque 3 PI indifférenciés. Mais, si à ce stade de notre travail, il est possible de caractériser les étapes permettant l'évaluation de la fertilité potentielle réelle des bourgeons latents, c'est-à-dire le nombre de grappe potentielle, nous ne pouvons pas caractériser le degré de ramification qui impactera sur le poids de la grappe.

La troisième partie de ce chapitre a donc pour objectif de relier la fertilité potentielle réelle avec le rendement final, en tenant compte du nombre de grappes préformées et du niveau de ramification de ces grappes.

III.1. Résultats

Le nombre moyen d'inflorescences par rameau est présenté Figure 40A. Le comptage effectué au stade « bouton floral » pour chaque millésime donne une indication de la fertilité potentielle apparente qui traduit le nombre de PI ayant subi une différenciation suffisante pour se développer après le débourrement. Quel que soit le millésime, le nombre moyen de grappes ayant atteint le stade floraison est toujours inférieur au nombre de primordia inflorescentiels compté dans les bourgeons au stade bourgeon d'hiver. En effet, le nombre de grappes varie de 1,68 en 2017 à 1,91 en 2016 et ne présente pas de différence significative entre les millésimes alors que le nombre de PI différenciés au stade 159JAD était au minimum de 2. Ainsi la fertilité potentielle apparente est toujours inférieure à la fertilité potentielle réelle. Notons tout de même qu'en 2017, il existe une variabilité importante entre les souches, sûrement due à l'épisode de gel du 27 Avril 2017 qui a pu détruire certaines jeunes grappes même si nos pieds repères

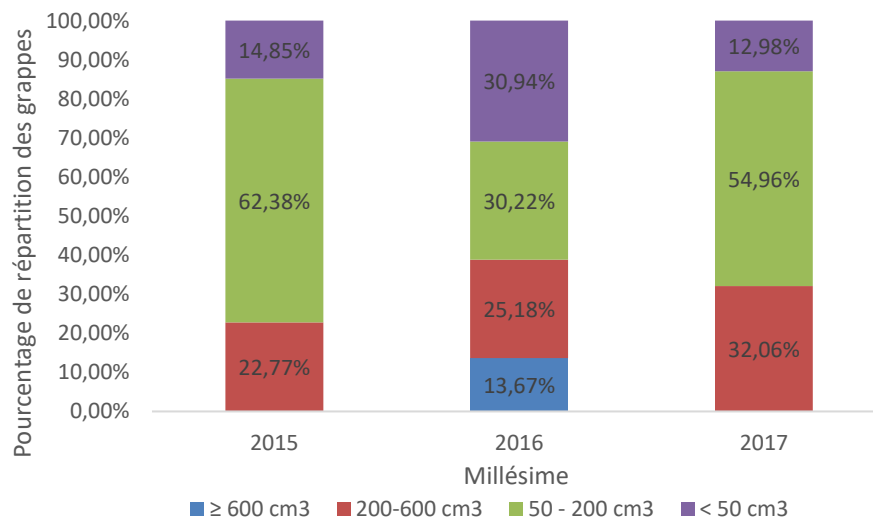


Figure 41 : Répartition des grappes (%) en fonction de leur volume pour les 3 millésimes étudiés.

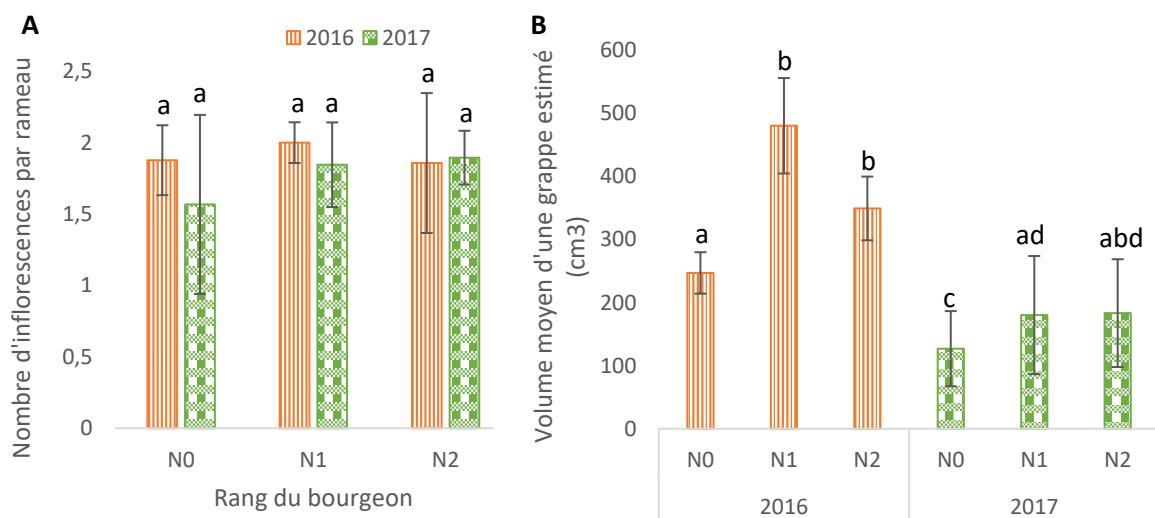


Figure 42 : Estimation (A) du nombre moyen d'inflorescences à la floraison et (B) du volume moyen des grappes au stade « fermeture de grappe » par rameaux issus des 3 types de bourgeons en 2016 et 2017.

Les résultats représentent la moyenne (A) $\pm$ écart-type moyen et (B) $\pm 1/4$ quartile des grappes portées par 40 pides ; a, b, c, d pour chaque histogramme indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis.

ne présentaient pas de dégâts visibles. Ces résultats confirment que le 3^{ème} PI non ou mal différencié ne poursuit pas son développement de manière suffisante lors des phases de post dormance ou pré-débourrement pour produire une inflorescence capable d'aller jusqu'au stade floraison toutes les années.

Le niveau de ramification, donc de différenciation des PI, a été évalué par l'estimation du volume des grappes au stade fermeture de grappe (Figure 40B). En effet, on peut supposer qu'il existe une relation entre le nombre de ramifications préformées et le volume des grappes. Ainsi les grappes de 2016 sont largement plus volumineuses qu'en 2015 et 2017, traduisant un nombre de ramifications plus important. Ce constat peut être relié aux observations des bourgeons en 2015 dont les phases d'initiation et de ramifications avaient été plus précoces et plus longues qu'en 2014 et 2016.

L'approche globale et l'estimation moyenne du volume des grappes traduit néanmoins des écarts types importants. Afin de confirmer ces résultats, nous avons décidé de classer les types de grappes en fonction de leur volume. Quatre classes ont été définies arbitrairement : très grosse grappe ($> 600 \text{ cm}^3$), grosse grappe ($200 - 600 \text{ cm}^3$), grappe moyenne ($50 - 200 \text{ cm}^3$), petite grappe ($< 50 \text{ cm}^3$). La Figure 41 montre la répartition des classes exprimée en pourcentage pour les trois millésimes. Ce mode d'expression montre dans un premier temps, que la répartition des classes varie d'un millésime à l'autre. 2016 est le seul millésime qui présente des grappes classées dans la catégorie « très grosse grappe » et est le millésime qui présente aussi le plus de petites grappes (30,94%). Notons également que même si le volume moyen par grappe est comparable entre 2015 et 2017, 2017 présente plus 10% de grosses grappes par rapport à 2015. Ainsi, à partir de ces deux constatations, il semblerait qu'en 2015 les phases de différenciation des PI aient permis pour près de 14% des PI de mieux se différencier conduisant, en 2016, à la production de grosses grappes alors que le nombre total de grappes est similaire aux autres années (Figure 40A). Ces résultats laissent donc entrevoir des possibilités de fonctionnement différent selon les années et les bourgeons, dépendant plus de l'importance des processus de ramification que d'initiation.

Les observations microscopiques de 2014 et 2015 ont démontré l'existence d'un rythme de fonctionnement différent selon le type du bourgeon. Afin d'essayer d'illustrer cet impact sur la fertilité potentielle réelle et la fertilité potentielle apparente, l'estimation du rendement a été réalisée séparément en 2016 et 2017, pour les bourgeons N0, N1 et N2 (Figure 42A).

Les résultats confirment ceux obtenus avec les mesures sans différenciation des bourgeons. Le nombre d'inflorescence par rameau issu des bourgeons N0, N1 ou N2 est

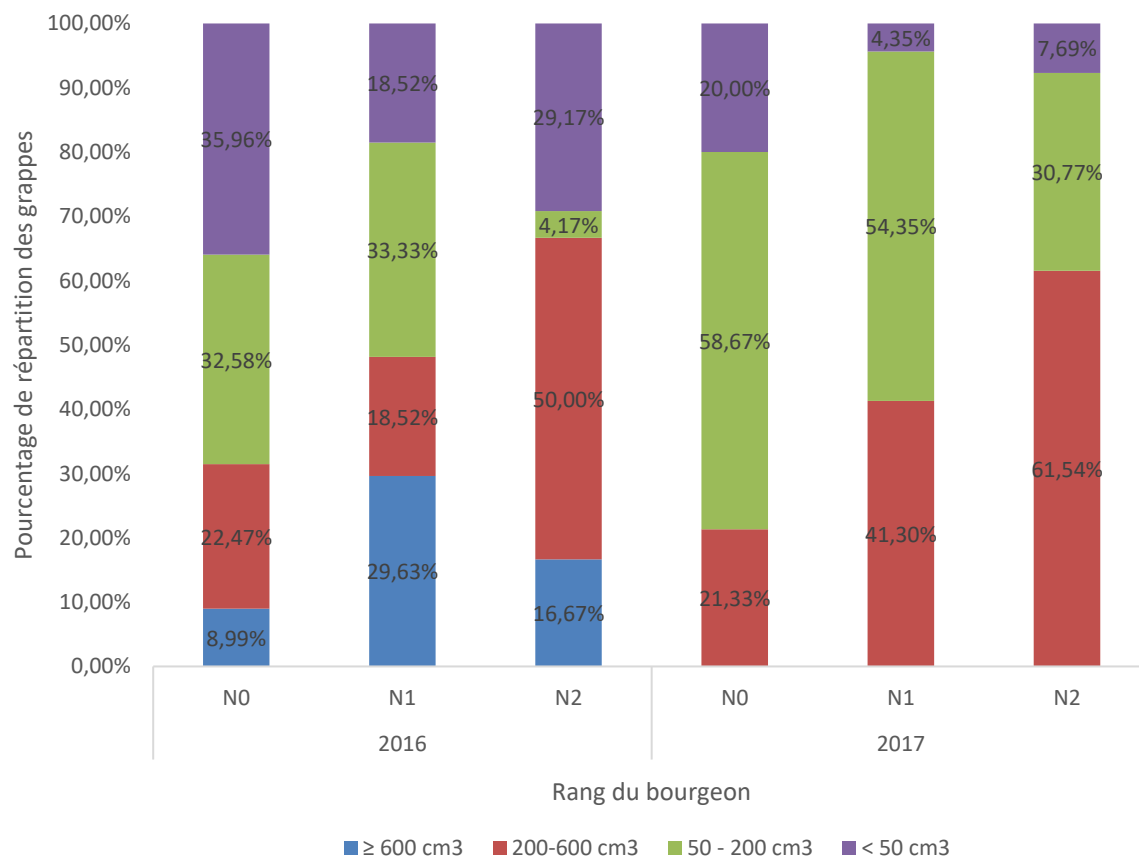


Figure 43 : Répartition des grappes (%) en fonction de leur volume dans les N0, N1 et N2 en 2015 et 2016.

toujours inférieur au nombre de PI différenciés observés dans les bourgeons au stade 159JAD l'année précédente. En 2016, le nombre moyen d'inflorescences par rameau varie de 1,86 pour les rameaux issus des bourgeons N2 et 2 pour rameaux issus des bourgeons N1, sans différences significatives entre les trois types de bourgeons. En 2017, le nombre moyen semble plus faible qu'en 2016. Il varie de 1,57 pour les rameaux issus des bourgeons N0 à 1,89 pour les rameaux issus bourgeons N2, avec comme précédemment une variabilité plus importante en 2017 en raison du gel de printemps. Nos résultats ne permettent pas statistiquement de démontrer une différence entre les années et les types de bourgeons, mais nous observons que le nombre moyen d'inflorescences portées par des rameaux issus de bourgeons N0 a tendance à être inférieur à ceux des rameaux issus de bourgeons N1 et N2 (Figure 42A).

Si le volume moyen estimé par grappe ne présentait pas de différence significative lorsque l'on considère l'ensemble des 3 types de bourgeons sans distinction (Figure 10B), des variations significatives apparaissent lorsque l'on considère séparément chaque type de bourgeons (Figure 11B).

Ainsi, pour les deux millésimes étudiés, il apparaît que les grappes développées sur des rameaux issus de bourgeons N1 et N2 sont toujours plus volumineuses que les grappes portées par les rameaux issus de bourgeons N0. Ce phénomène est particulièrement marqué en 2016. Quand on regarde le pourcentage de répartition des grappes en fonction de leur volume (Figure 43), on constate que pour ces rameaux issus de N1 et N2, ces forts volumes de grappes sont directement liés aux pourcentages élevés de grosses (200-600 cm³) à très grosses (≥ 600 cm³) grappes.

III.2. Discussion

Les grandes fluctuations du rendement de la vigne ont été rapportées dans de nombreuses études. Elles peuvent varier d'au moins 15%, mais plus fréquemment de 35% (Bessis, 1965 ; Clingeleffer, 1984 ; Clingeleffer et Krstic, 2001 ; Bramley et Hamilton, 2004 ; Bramley, 2005 ; Hall *et al.*, 2011 ; Guilpart *et al.*, 2014). Dans cette étude, pendant trois millésimes consécutifs, de très grandes variations du rendement ont été aussi constatées.

La fertilité des bourgeons en termes de nombre moyen de PI initiés ne semble pas varier de manière significative entre les millésimes. Le nombre moyen d'inflorescences par rameau ne dépasse jamais 2 pour les trois millésimes et ceci quel que soit le type de bourgeon, alors que le comptage du nombre moyen des PI montre que la fertilité potentielle réelle peut atteindre 2,8. Ceci suppose donc que dans la plupart des cas, le troisième PI, qui est souvent peu

différencié, deviendrait une vrille comme l'ont déjà démontré Carolus (1970), Alsaidi (1975), Srinivasan et Mullins (1979) ou Boss et Thomas (2000).

De plus, selon les données communiquées au sein de notre équipe, le poids des 100 baies ne présente pas de différences significatives entre 2015 et 2016 (170 g pour 2015 et 183 g pour 2016). Les variations de rendement ne seraient donc pas dues au nombre de grappes, ni du poids des baies, mais plutôt au volume des grappes. **Ainsi, les différences de rythme et de capacité de ramification des PI seraient le premier facteur modulant le rendement pour les bourgeons de la base du rameau.** Cette hypothèse est étayée par les observations microscopiques de 2014 et 2015 corrélées aux estimations de nombre et de volume moyen de grappes en 2015 et 2016. Ces estimations de rendement précoce étant elles-mêmes confortées par les rendements agronomiques réels plus importants de la parcelle en 2016 qu'en 2015 : 41 hL·ha⁻¹ en 2015 et 72 hL·ha⁻¹ en 2016 (données château). Ces variations de rendement peuvent donc être reliées au pourcentage important de très grosses grappes de 2016, résultat d'une phase de ramification intense des PI formés dans les bourgeons primaires en 2015. On observe également cette année-là, un pourcentage de petites grappes plus important que les deux autres années, pouvant être relié à la température moyenne du millésime 2015 plus élevée, à sa précocité et à sa durée de phase plus longue permettant au 3^{ème} PI de commencer à se ramifier. En effet, Watt *et al.* (2010) ont montré que sous climat chaud, le processus de ramification des PI était beaucoup plus important que celui observé sous climat froid. Sachant que le degré de ramification des PI détermine si un primordium reproducteur évolue en vrille ou en inflorescence (Mullins *et al.*, 1992 ; Watt *et al.*, 2008 ; Crane *et al.*, 2012), on peut supposer que le devenir des troisièmes PI dépend de leur degré de ramification lui-même fortement dépendant de la température. **Le rythme d'organisation du bourgeon entre les différents plastochrones étant fixe (Pouget, 1966 ; Carolus, 1970), la précocité de l'initiation du 1^{er} PI semble donc essentielle à la complexification de ramification.**

Nos résultats montrent également dans cette partie, qu'il existe une différence de rendement entre les rameaux issus de bourgeons N0, N1 et N2. Les rameaux issus des bourgeons N0 ayant un rendement plus faible que ceux issus des bourgeons N1 et N2 pendant deux millésimes consécutifs. Ces observations avaient déjà été réalisées par divers auteurs (Bessis, 1965 ; Carolus, 1970 ; Srinivasan et Mullins, 1981a) qui décrivaient sans l'expliquer, le fait que les nœuds N0 sans organe oppositifolié étaient plus faibles que les nœuds situés au-dessus et ayant un organe oppositifolié. Pour la première fois, nous montrons que cette différence ne semble pas être due à la fertilité potentielle des bourgeons traduite en nombre moyen des PI formés, mais pourrait être liée à la capacité de différenciation des PI ou au rythme des séquences de formation des différents primordia dans le bourgeon. En effet, nous avons

démontré que ces bourgeons avaient l'augmentation de poids la plus rapide et la plus importante, et qu'ils produisaient plus précocement le premier primordium alors que le nombre final de PI était comparable aux autres. Se pose à ce stade du manuscrit la question du rôle de l'organe oppositifolié dans le contrôle du fonctionnement des bourgeons. Chez la vigne, alors que de nombreux auteurs ont montré, *via* des pratiques d'effeuillage, le rôle de la feuille axillaire sur le développement du bourgeon, aucuns travaux ne portent sur le rôle de l'inflorescence ou de la grappe. Par contre, chez de nombreux végétaux à feuilles opposées, la notion de préséance des feuilles a été clairement établie dans le contrôle du développement du bourgeon et, grâce à la présence ou à l'absence d'un côté et/ou de l'autre d'une des deux feuilles, l'un des bourgeons domine l'autre avec modulation du fonctionnement de ses méristèmes (Champagnat, 1969). On peut alors supposer, à l'image de la feuille opposée, que la présence d'un organe comme la grappe sur les nœuds N1 et N2 pourrait impacter le développement des bourgeons axillaires. Cette hypothèse est confortée par la mise en évidence des phénomènes rythmiques et la taille différente des entre-cœurs en fonction de la position du bourgeon anticipé (les entre-cœurs les plus longs étant toujours ceux issus de prompt-bourgeons situés sur les nœuds N0) (Bouard, 1966). La formation de ce nouvel organe axillaire au bourgeon latent pourrait être concurrentiel vis-à-vis des assimilats, et induire des équilibres sources-puits différentes dans les bourgeons N0 par rapport aux bourgeons N1 et N2.

IV. Discussion générale et conclusion

Ce premier chapitre avait pour objectif de caractériser les premières phases du cycle de développement des bourgeons latents de Merlot à Bordeaux afin de :

- définir des stades clés sur lesquels nous pourrions nous baser pour étudier les facteurs impliqués dans la régulation de la construction du rendement,
- définir des critères morphologiques et anatomiques facilement détectables par le viticulteur pour caractériser le stade d'avancement du développement du bourgeon,
- réviser, après 40 ans, le rythme d'apparition des différents organes préformés du Merlot à Bordeaux dans un contexte de modifications climatiques et de pratiques culturales,
- relier les phases clés de formation des primordia inflorescentiels à la fertilité et au rendement.

Nos observations, réalisées au cours de trois millésimes (2014, 2015, 2016), ont d'abord permis de vérifier les stades clés définis dans la littérature pour les phases d'initiation, de différenciation et de ramification des primordia inflorescentiels (Bessis, 1965 ; Carolus, 1970 ; Alsaidi, 1975 ; Srinivasan et Mullins, 1976 ; Williams, 2000 ; Keller, 2009). Grâce à une approche morphologique et anatomique, nous avons pu définir 6 dates clés qui correspondent à des étapes majeures de formation des primordia et qu'il est possible de relier aux stades déjà définis par Carolus en 1970, mais avec des décalages de temporalité attribués principalement à l'évolution climatique. En effet, les modifications de climat subies depuis plusieurs décennies dans la région bordelaise ont entraîné une modification du rythme de l'initiation et de la ramification des PI par rapport à ce qui avait été caractérisé dans les années 1970 par Carolus. Actuellement, l'initiation commence plus tôt (avant 35JAD) et l'arrêt de la différenciation des PI est plus tardif (après 118JAD), alors que dans les années 70, l'initiation et la ramification des PI n'étaient observées que 6 semaines après débourrement, et étaient considérées terminées au stade L ce qui correspond au 103JAD dans notre étude. Ainsi, nous observons un rallongement de la durée globale des phases d'initiation, de différenciation et de ramification des PI. Ce processus semble être étroitement lié aux conditions climatiques plus chaudes en fin d'hiver et pendant la période de développement végétatif que dans les années 1970. Selon García de Cortázar-Atauri *et al.* (2010), l'augmentation de la température entre janvier et avril peut avancer la date de débourrement de la vigne même si la levée de dormance semble être retardée en cas d'un hiver doux. Ainsi, avec le débourrement plus précoce constaté en moyenne 8 jours plus tôt que dans les années 1970, les processus cellulaires seraient initiés plus

précocement. De plus, selon Cheema *et al.* (1996) l'initiation précoce d'anlage dans la saison pourrait entraîner une ramification précoce des bras. Ainsi, cette précocité de débourrement associée à des températures de début de printemps douces serait à l'origine des décalages observés : 15 jours plus tôt pour la formation du premier anlage et 8 jours plus tôt pour les premières ramifications. De plus, il a été montré chez plusieurs espèces de plantes ligneuses que l'induction de la dormance profonde nécessitait des basses températures en fin d'automne (Li *et al.*, 2003 ; Heide et Prestrud, 2005 ; Svendsen *et al.*, 2007), or depuis deux décennies les températures de fin d'automne sont de moins en moins froides à Bordeaux (Jones et Davis, 2000 ; www.bordeauxraisins.fr). De plus, Watt *et al.* (2010) ont également montré que sous climat chaud, le processus de ramification des PI était beaucoup plus important que celui observé sous climat froid. Sachant que le degré de ramification des PI détermine un primordium reproducteur évoluant en vrille ou en inflorescence (Mullins *et al.*, 1992 ; Watt *et al.*, 2008 ; Crane *et al.*, 2012), on peut supposer que le devenir des troisièmes PI dépend de leur degré de ramification lui-même fortement dépendant de la température. En effet, Li *et al.* (2003) ont montré chez le bouleau (*Betula pubescens* et *Betula pendula*) qu'une augmentation de 4°C pouvait retarder la cessation de la croissance et l'induction de la dormance profonde des bourgeons, ce qui laisse supposer qu'avec l'augmentation de la température moyenne en automne, l'activité cellulaire des pièces primordiales ne s'arrêtait pas totalement en raison d'une entrée en dormance plus tardive, et que la différenciation des PI formées pourrait alors continuer lentement plus tard dans la saison. Cette hypothèse rejoint les observations de Jones *et al.* (2009) qui explique que les mitoses continuent plus tardivement dans les bourgeons latents de vigne cultivées en zones à hiver tempéré qu'en zones à hiver froid.

Ainsi, les conditions climatiques actuelles avancent et rallongent les phases d'induction, d'initiation et de différenciation inflorescentielle pour le Merlot à Bordeaux par rapport aux années 1970 en (1) favorisant une initiation plus précoce du premier anlage permettant la formation d'un 3^{ème} PI légèrement ramifié et (2) rallongeant la période de différenciation des inflorescences qui, plus tardive peut assurer la formation de grappes mieux ramifiées.

Pour la première fois, une cinétique des phases de formation des primordia inflorescentiels en lien avec le poids des bourgeons et les processus cellulaires a pu être établie. Ainsi, au cours du processus de formation des bourgeons lors de la première année, deux phases critiques ont été pour la première fois identifiées pour le Merlot :

- une phase d'organogenèse entre 35JAD et 88JAD, permettant l'initiation des deux premiers PI et la ramification du premier PI
- une phase d'ontogenèse de 88JAD jusqu'à 118JAD avec ramification du deuxième PI et initiation d'un troisième PI qui peut selon les millésimes donner une grappe l'année suivante.

Le comptage des grappes en N+1 et leur répartition par catégories de taille ont vérifié notre hypothèse sur 3 millésimes successifs. Pour les trois millésimes étudiés, il s'est avéré que le nombre de PI estimé dans les bourgeons était toujours supérieur à 2 PI par bourgeon. Mais ce nombre était toujours plus important que le nombre d'inflorescences compté au moment de la floraison qui était en général inférieur à 2, ce qui ne rend pas possible une estimation précoce du rendement par la seule évaluation de la fertilité potentielle exprimée en nombre de futures grappes. Par contre, les variations de rendement évalué à partir du volume des grappes semblent être reliées à la précocité du début de la phase de ramification du premier primordia inflorescentiel. Cette précocité stimulerait alors la différenciation du 3^{ème} PI devenant alors une grappe. Ces observations corroborent l'hypothèse de Cheema *et al.* (1996) qui explique que l'initiation précoce d'anlage dans la saison pourrait entraîner une ramification précoce des bras. Selon Jones *et al.* (2009) et Watt *et al.* (2010), l'intensité et la durée de la phase d'induction inflorescentielle permettraient, en lien avec la température, une plus grande ramification des PI. Ainsi, 2015 qui a été une année précoce, chaude, sans contrainte hydrique marquée et avec un cycle végétatif long aurait permis un début de différenciation des méristèmes précoce au printemps, favorisant ainsi la formation de grosses grappes au niveau des premiers PI et d'une troisième grappe, augmentant ainsi significativement le rendement en 2016.

Nos travaux confortent l'hypothèse de Guilpart *et al.* (2014) qui avait proposé que la composante du rendement pouvait s'élaborer sur une période plus ou moins longue, et divisée en deux phases :

- une première phase de détermination de la valeur maximale de la composante du rendement qui correspondrait, pour nous, à la phase d'initiation des primordia,
- une seconde phase de réalisation totale ou partielle de ce maximum qui correspondrait à la période de ramification des primordia.

Pour Guilpart *et al.* (2014), chacune de ces phases peut être affectée par des facteurs limitants, « si la phase d'élaboration du maximum n'est réduite par aucun facteur limitant, la composante peut alors atteindre son potentiel déterminé génétiquement. A l'inverse,

l'occurrence d'un facteur limitant durant la phase de détermination du maximum limite la valeur finale que pourra atteindre la composante ». Dans notre cas, pour les trois années étudiées, aucun facteur limitant ne semble avoir impacté la première phase assurant ainsi le potentiel maximum d'inflorescence (3PI et 2 inflorescences). Par contre, les conditions climatiques du millésime 2015, plus favorables aux mécanismes de division et grandissement cellulaire, auraient permis de produire des ramifications plus tôt et plus longtemps, assurant ainsi le rendement plus élevé en 2016. La période critique de détermination de la composante maximum définie par Guilpart *et al.* (2014) entre 400 et 700°Cj est confirmée par nos observations qui définissent la période comprise entre 60 et 88JAD comme étant la période clé permettant au bourgeon de basculer d'une phase d'initiation des primordia vers une phase de ramification.

Ainsi, nous avons pu relier d'une part le nombre de PI à la précocité de l'initiation du premier PI, et d'autre part le rendement de l'année suivante à la capacité de ramification du premier PI durant la fin de la première phase de croissance active des primordia et à la durée de la seconde phase de croissance lente des primordia. La période remarquable, et potentiellement critique, se situe entre 60 et 88JAD pour des sommes de température journalières similaires à celles décrites par Guilpart et al. (2014) et comprises entre 400 et 700°Cj après débourrement.

Enfin, nos travaux ont démontré que le type de bourgeons de la base du rameau en lien avec la présence d'organe oppositifolié (grappe) n'avait pas d'impact sur le nombre de PI mais par contre pouvait moduler la capacité de ramification des PI formés. Ainsi, le rythme des phases d'initiation et la capacité de ramification des primordia inflorescentiels pourraient être régulés par la présence ou l'absence de l'organe oppositifolié. Il s'est avéré que le rendement final des rameaux issus de bourgeons N0 était toujours inférieur à celui des rameaux issus de bourgeons N1 et N2. A notre connaissance, nous sommes les premiers à rapporter ces observations. Jacques Bouard (1966), par ces travaux sur la rythmicité, avait montré de nombreuses différences anatomiques et physiologiques entre les 3 types de bourgeon (épaisseur du diaphragme, taille de la préfeuille du bourgeon latent, taille et longueur de l'entre-cœur issus du prompt-bourgeon) laissant donc supposer une régulation différente des mécanismes cellulaires entre les types de bourgeon, mais rien ne se rapportait aux grappes portées par les rameaux issus de ces bourgeons. De même, les travaux de Bessis (1965) sur la fertilité des bourgeons ne rapportent que les différences de fertilité des bourgeons en fonction de leur rang

Tableau XV : Correspondances morphologiques et ontogéniques des bourgeons étudiés par rapport aux stades définis par Carolus (1970) et à la classification BBCH.

	Dates post débourrement	Caractères morphologiques visibles et évolution poids	Stades de développement des organes internes	Stades définis par Carolus (1970)	Stades repères phénologique selon BBCH
ORGANOGENESE	35JAD	Bourgeon anticipé uniquement visible avec une pointe rose Bourgeon latent enrobé par la préfeuille du bourgeon anticipé	1 ^{er} anlage à deux bras visible formant le 1 ^{er} PI Environ 10 PF formés	Stade F	2014 : -
					2015 : Bouton floraux séparés (57)
					2016 : Bouton floral agglomérés (57)
	60JAD	Bourgeon latent visible, en de forme triangulaire avec écailles vertes fermées Forte augmentation du poids	Ramification secondaire du 1 ^{er} PI Formation du 2 nd anlage à l'origine du 2 ^{ème} PI	Stade G-I	2014 : -
					2015 : nouaison (71)
					2016 : début floraison (61)
	88JAD	Bourgeon latent à dos bombé, vert avec deux écailles légèrement écartées Poursuite de l'augmentation du poids	Poursuite de ramification du 1 ^{er} PI Ramification du 2 ^{ème} PI	Stade K	2014 : nouaison (71)
					2015 : petits pois (75)
					2016 : nouaison (71)
ONTOGENESE	103JAD	Brunissement des écailles Ralentissement de l'augmentation du poids Poids maximum atteint	Fin de ramification du 1 ^{er} PI Poursuite Ramification du 2 ^{ème} PI Formation du 3 ^{ème} anlage à l'origine du 3 ^{ème} PI	Stade J-K	2014 : petit pois (75)
					2015 : fermeture de grappe (77)
					2016 : petit pois (75)
	118JAD	Brunissement des écailles Début de dessèchement du bourgeon et fermeture des deux écailles Poids stable ou légèrement décroissant	2 premiers PI bien ramifiés Début de ramification du 3 ^{ème} PI	-	2014 : fermeture de grappe (77)
					2015 : mi-véraison (83)
					2016 : début véraison (81)
DORMANCE	159JAD	Bourgeon de couleur brune déshydraté Ecailles lignifiées et fermées Poids décroissant	Stade final, dormance	Stade L	2014 : récolte (89)
					2015 : récolte (89)
					2016 : récolte (89)

d'insertion le long du rameau, et non en fonction de la présence d'un organe oppositifolié. Nos résultats démontrent tout de même que si le bourgeon N0 ne présente pas un nombre inférieur de PI par rapport aux deux autres, les primordia inflorescentiels qu'il va former produisent les grappes plus petites. Les mécanismes régulant ces différences sont donc actuellement inconnus chez la vigne. Le rôle de la présence ou de l'absence de l'organe oppositifolié n'a pas été établi. Il pourrait être rapproché de celui établi dans le cas de la présence des feuilles chez les plantes à feuilles opposées (Champagnat, 1969) ou de mécanismes de concurrence vis-à-vis des assimilats, comme déjà décrit dans le cadre de travaux sur l'effeuillage (Fournioux et Bessis, 1984). De plus, selon Bouard (1966), les prompt-bourgeons situés sur les nœuds N0 auraient une capacité de croissance plus importantes que les prompt-bourgeons des nœuds N1 et N2 et produiraient plus rapidement des entre-cœurs plus vigoureux. Plus récemment, Louarn (2005) et Pallas *et al.*, (2008) ont aussi confirmé que les entre-cœurs issus des bourgeons N0 étaient plus longs et avaient une vitesse de croissance plus rapide que ceux des N1 et N2, ce qui serait dû à une force « puits » plus importante du N0 en raison de l'absence d'organes oppositifoliés. On peut alors émettre l'hypothèse qu'il se produirait au moment de la sortie de l'entre-cœur, une concurrence accrue qui limiterait alors la phase de ramification des primordia inflorescentiels. Les entre-cœurs des bourgeons anticipés N0 étant plus vigoureux que ceux des bourgeons anticipés N1 et N2, leur force de puits serait alors plus forte, ce qui réduirait la taille des futures grappes.

Ainsi, nous avons pu démontrer qu'il existait des différences de niveau de ramification des primordia inflorescentiels selon le type de bourgeon, et envisager une interaction possible entre le bourgeon et les autres organes insérés au niveau du nœud.

Dans ce chapitre nous avons mis en évidence que le rythme de formation des organes dans les bourgeons latents de Merlot avait évolué depuis 40 ans à Bordeaux en raison de l'augmentation des températures moyennes. Ce rythme est maintenant plus précoce et plus long, permettant ainsi une augmentation potentielle de la fertilité et du rendement en condition hydrique non limitante.

En raison de ces modifications climatiques, les repères phénologiques de la plante entière, jusque-là utilisés pour caractériser les étapes de développement du bourgeon, ne semblent plus en adéquation avec les phases de développement des organes du bourgeon. Une nouvelle description des phases est proposée avec une période d'ontogénèse et une période d'organogénèse (Tableau XV).

Nos travaux ont également permis de démontrer que le rendement (et les variations de rendement) était, pour le Merlot à Bordeaux, plus lié aux phases de ramification

des primordia inflorescentiels qu'à la phase d'initiation. Ces phénomènes expliquent en partie les différences de rendements entre millésimes et entre types de bourgeons (N0, N1 et N2).

A Bordeaux, dans le cadre des tailles courtes et de millésimes non limitants d'un point de vu thermique et hydrique, la fertilité potentielle réelle définie par le nombre de primordia inflorescentiels n'est pas un indicateur pertinent pour évaluer le rendement en raison du nombre de PI formé supérieur à 2. Par contre, la précocité de l'initiation du premier PI semble être un facteur déterminant pour l'évaluation de la taille des grappes.

L'ensemble de ces premières données pose maintenant la question des modes de régulation de ces mécanismes au niveau du bourgeon lui-même, mais également entre les bourgeons.

Le chapitre suivant se propose donc, par une étude intégrative combinant des approches moléculaires, hormonales et biochimiques, d'apporter quelques éléments pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'initiation, de la différenciation et de la ramification des PI dans les bourgeons latents en lien avec le rendement final.

CHAPITRE 4

Etude des mécanismes de régulation des phases d'initiation, différenciation et ramification des primordia inflorescentiels du bourgeon latent de vigne : approche moléculaire, biochimique et hormonale

Le mécanisme de régulation de l'initiation, la différenciation et la ramification des PI dans les bourgeons latents reste encore peu connu aujourd'hui. Bien que les recherches sur la fertilité des bourgeons latents et le rendement de la vigne soient reprises depuis une dizaine d'années, les études moléculaires, biochimiques et hormonales consacrées à la compréhension du déterminisme de la fertilité des bourgeons en lien avec le rendement sont rares.

L'objectif de ce chapitre est donc, dans un premier temps, d'étudier l'évolution de certains gènes, marqueurs biochimiques et hormonaux au cours de la première année du développement du bourgeon de manière indépendante puis, dans un second temps de les relier entre eux pour émettre des hypothèses de schéma de compréhension.

I. Approche moléculaire : étude de 6 gènes candidats au cours de l'évolution des bourgeons latents de vigne lors de leur première année de formation

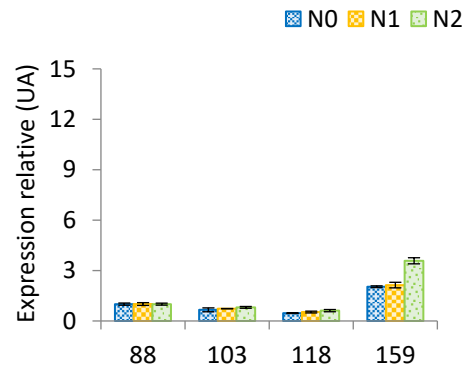
Les analyses des réseaux de régulation moléculaire des bourgeons latents sont encore essentiellement basées sur l'identification des orthologues des gènes d'*Arabidopsis thaliana* (Boss *et al.*, 2003 ; Calonje *et al.*, 2004 ; Krizek et Fletcher, 2005 ; Carmona *et al.*, 2007). En 2012, Diaz-Riquelme *et al.* ont identifié par microarray quelques familles de gènes présentant différents profils d'évolution dans les bourgeons latents au cours de leur cycle de développement. Mais leurs fonctions biologiques dans cet organe restent mal connues voire inconnues. Néanmoins, certaines familles sont mieux connues car impliquées généralement dans la régulation des processus de floraison ou de méristémisation. En raison de la correspondance chronologique des phases de méristémisation et de floraison, aux phases d'initiation et de différenciation des primordia inflorescentiels, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à 6 gènes, tous connus dans ces processus floraux. Il s'agit donc de :

- VvCLE25-1
- VvCLE-TDIF
- VvL1L
- VvMADS8
- VvTFL1a
- VvMFT1

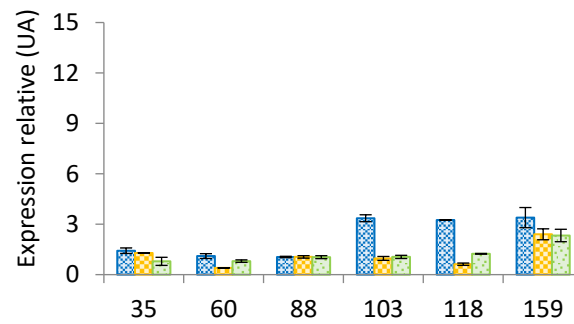
I.1. Gènes impliqués dans la régulation de l'initiation au niveau des méristèmes

Dans cette approche « gènes candidats », parmi les 6 gènes choisis 3 participent au maintien des structures méristématiques. Il s'agit de VvCLE25-1, VvCLE-TDIF et VvL1L.

A -2014



B -2015



C -2016

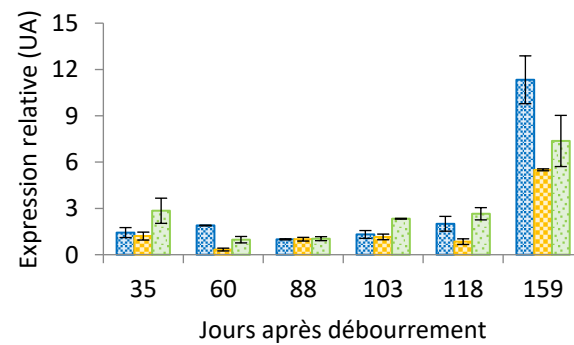


Figure 44 : Evolution de l'expression de *VvCLE25-1* au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2014, (B) 2015 et (C) 2016. (Statistiques présentées dans le Tableau XVI).

I.1.1. Gène *VvCLE25-1*

VvCLE25-1 est un gène de la famille des gènes *CLAVATA (CLV)*. Les gènes *CLV* ont été identifiés pour la première fois chez *Arabidopsis thaliana* (Pearce *et al.*, 1991). Ils sont aujourd'hui identifiés chez plus de 40 espèces annuelles, ligneuses, monocotylédones, dicotylédones et sont connus pour la plupart dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire du méristème apical caulinaire (MAC). Plus récemment, plusieurs gènes codant les protéines de CLV3-like, dont *VvCLE25-1* ont été identifiés dans différents organes de vigne, notamment dans les bourgeons axillaires (Tominaga-Wada *et al.*, 2013). Cependant, les fonctions biologiques de ce gène chez la vigne, et particulièrement dans les bourgeons latents, ne sont pas encore bien connues.

I.1.1.A. Résultats

L'évolution et la comparaison des niveaux d'expression du gène *VvCLE25-1* pour les trois années et pour les trois types de bourgeons sont résumées (Figures 44A, B et C).

Pour ce gène, le niveau d'accumulation des transcrits est assez variable sur les 3 plans d'études considérés (évolution au cours des stades d'intérêt, type de bourgeons, comparaison des millésimes).

Dans un premier temps, si l'on s'intéresse au niveau d'expression au sein des stades d'intérêt (Jours Après Débourrement – JAD) nous constatons que le niveau d'expression le plus important est retrouvé à 159JAD et présente une surexpression (près de 5 fois) par rapport au stade contrôle (88JAD). Cette surexpression est conservée à ce stade dans les 3 types de bourgeons considérés (N0, N1 et N2) mais avec des différences de niveaux notables entre les millésimes. En effet, pour le millésime 2014, le niveau de transcrits de *VvCLE25-1* est significativement plus important dans le bourgeon N2 que pour N0 et N1. En revanche, pour les millésimes 2015 et 2016, nous constatons un profil différent avec une surexpression marquée dans les N0 tandis que les bourgeons de type N1 et N2 présentent des niveaux d'accumulation de transcrits similaires.

Si la surexpression de *VvCLE25-1* est clairement observable et conservée au stade 159JAD, nous remarquons ici que les profils d'accumulation de transcrits varient selon les millésimes. En effet, pour 2014, avant ce stade aucune différence d'expression significative pour ce gène n'est retrouvée. Cette tendance semble similaire pour le millésime 2016. En revanche pour le millésime 2015, l'accumulation des transcrits de *VvCLE25-1* débute plus précocement (dès 103JAD) et est significativement différente, notamment pour les bourgeons N0.

Tableau XVI : Tableau statistique représentant la significativité des différences entre les stades au cours de la première année du développement des bourgeons latents pour 6 gènes en 2014, 2015 et 2016 ; les lettres pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre les groupes des moyennes ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis.

VvCLE25-1	35JAD			60JAD			88JAD			103JAD			118JAD			159JAD		
	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2
2014							abc	abc	ab	de	de	ad	f	ef	def	bdg	cg	g
2015	abc	abcd	efg	abdef	g	efg	defg	abcd	defg	c	adefg	adef	c	eg	abcdf	c	bc	bc
2016	abcde	abcd	abde	abde	c	acd	acd	acd	acd	abcd	abcd	abe	abde	cd	be	e	be	e
VvCLE-TDIF	35JAD			60JAD			88JAD			103JAD			118JAD			159JAD		
	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2
2014							a	ab	ab	cde	ab	abc	c	bc	cd	de	de	e
2015	ab	abcd	abcd	abcde	cdef	a	bcde	abc	cde	abc	defg	cdef	abcd	g	defg	efg	g	fg
2016	a	abcde	bcd	ae	bd	bcde	ae	ace	ace	ace	ae	bef	abcdef	acde	bd	abcde	bcde	b
VvL1L	35JAD			60JAD			88JAD			103JAD			118JAD			159JAD		
	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2
2014							ab	ab	ab	ac	b	cd	ef	de	f	f	cd	de
2015	a	a	a	abc	abc	ab	bcde	abcd	cdef	abcd	efgh	efgh	defg	h	gh	defgh	defgh	efgh
2016	abc	abcdef	abcd	adefg	adefg	g	g	efg	eg	abcdf	efgh	efg	abdefg	abcdef	defg	c	bc	bc
VvMADS8	35JAD			60JAD			88JAD			103JAD			118JAD			159JAD		
	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2
2014							ab	ab	a	cd	abe	bef	cde	abf	cef	d	cde	cef
2015	a	a	bcd	a	a	bcd	bcde	bcde	bcd	abe	a	abe	ae	cd	abce	abce	bcde	d
2016	abcde	a	abd	abcd	abcde	abcde	abcdef	abcdef	abcde	abcdef	abcdef	cef	abcdef	bcdef	abc	cdef	ef	f
VvTFL1a	35JAD			60JAD			88JAD			103JAD			118JAD			159JAD		
	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2
2014							a	a	a	bc	d	ef	de	d	bf	g	cg	cg
2015	ab	ab	a	bc	bcd	ab	de	de	cde	def	ef	efg	hi	gh	fgh	i	hi	hi
2016	ab	a	abcd	a	abc	a	cdefg	bcde	bcdef	defgh	efgh	efghi	hij	fghi	ghij	ij	ij	j
VvMFT1	35JAD			60JAD			88JAD			103JAD			118JAD			159JAD		
	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2	N0	N1	N2
2014							abc	d	ad	abc	abd	d	abc	c	ad	abc	bc	c
2015	abcde	efg	aefg	ef	aefg	bcd	bc	abcdg	bcd	abdg	abcd	adeg	bcd	c	efg	ef	f	f
2016	abcd	abc	ac	abcd	abcdef	efg	abcdefg	defg	efg	eg	abdefg	defg	bdefg	g	abcdf	c	abcd	abcdef

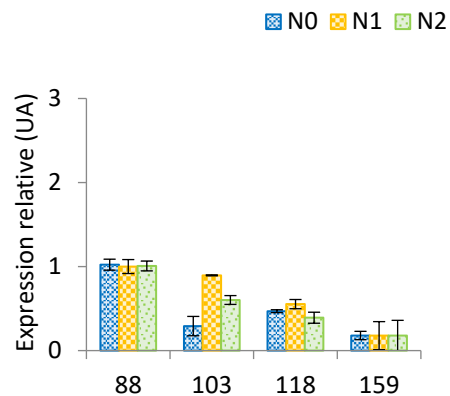
Finalement, un dernier point concernant l'analyse en RT Q-PCR de ce gène est remarquable entre les millésimes. Si à 159JAD la surexpression de *VvCLE25-1* est clairement établie, le niveau d'accumulation à ce stade diffère notamment entre les millésimes 2014/2015 et le millésime 2016. En effet, cette surexpression est presque 2,5 fois plus importante pour ce dernier millésime.

I.1.1.B. Discussion

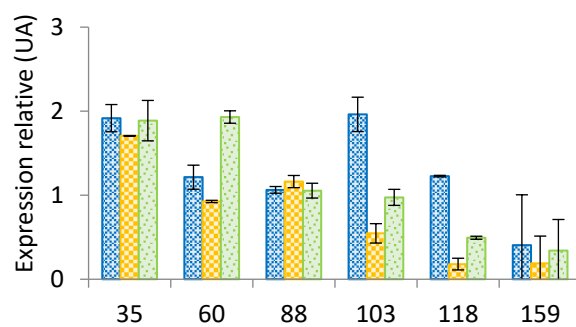
Pour la première fois, *VvCLE25-1* est étudié dans les bourgeons latents au cours de leur développement. Les résultats montrent que ***VvCLE25-1* est faiblement exprimé lors de l'organogenèse tandis que l'accumulation des transcrits est maximale lors de l'entrée en pré-dormance.**

L'émission d'une hypothèse pouvant expliquer un tel profil et son rôle éventuel dans la régulation de l'initiation et de la différenciation des PI du bourgeon chez la vigne reste aujourd'hui compliquée en raison du manque de données bibliographiques pour cette espèce. Il faut pour cela se baser sur les connaissances acquises chez d'autres espèces, notamment *Arabidopsis thaliana*. Ainsi, il est connu que cette famille de gènes est surtout localisée dans la zone centrale du MAC (Clark *et al.*, 1995 ; Lenhard et Laux, 2003) et l'étude de mutants *clv3* chez cette même espèce montre un élargissement des méristèmes apicaux caulinaires et floraux produisant un nombre de feuilles et de fleurs plus élevé que dans le cas normal (Clark *et al.*, 1995). Des mesures d'activité mitotique dans les méristèmes mutants *clv3* ont également montré une accumulation de cellules dans la zone centrale du MAC (Morot-Gaudry *et al.*, 2017). Au regard de la littérature, les gènes *CLV3* joueraient un rôle dans la régulation et le contrôle du nombre de cellules du MAC, le contrôle du développement ainsi que la régulation de la différenciation cellulaire des méristèmes apicaux et latéraux (Clark *et al.*, 1995 ; Autran et Traas, 2001 ; Lenhard et Laux, 2003 ; Heidstra et Sabatini, 2014 ; Yang et Jiao, 2016 ; Morot-Gaudry *et al.*, 2017). **Aussi, dans notre cas, l'expression faible de *VvCLE25-1* durant le début du cycle, c'est-à-dire au cours de l'organogenèse, pourrait, comme dans les mutants *clv3* d'*Arabidopsi thalianas*, favoriser la prolifération des cellules dans le méristème apical et les méristèmes des PI, et ainsi augmenter leur taille et leur maintien dans le temps. La surexpression de *VvCLE25-1* au stade 159JAD jouerait un rôle dans l'activation de la différenciation cellulaire et dans le passage du méristème indéterminé au méristème déterminé, et marquerait le début de la transition des primordia inflorescentiels en primordia floraux.**

A -2014



B -2015



C -2016

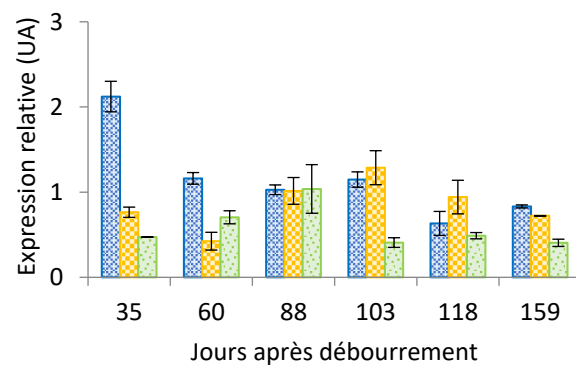


Figure 45 : Evolution de l'expression de *VvCLE-TDIF* au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2014, (B) 2015 et (C) 2016. (Statistiques présentées dans le Tableau XVI).

I.1.2. Gène *VvCLE-TDIF*

Le gène *VvCLE-TDIF* est aussi un gène de la famille des *CLV3*, identifié en même temps que *VvCLE25-1* chez la vigne (Tominaga-Wada *et al.*, 2013), mais aucune étude à ce jour ne permet d'établir son rôle exact dans les bourgeons latents de la vigne. Identifié chez d'autres espèces comme le soja, le ricin, le lupin, la noix de cajou, il participe à la mise en place précoce des mycorhizes en agissant comme signal sur la temporalité de différenciation cellulaire.

I.1.2.A. Résultats

L'évolution et la comparaison des niveaux d'expression du gène *VvCLE25-TDIF* pour les trois années et pour les trois types de bourgeons sont résumées (Figures 45A, B et C).

Concernant l'évolution du gène *VvCLE-TDIF* au cours des différents stades étudiés, nous observons une tendance globale de diminution des niveaux de transcrits à partir de 103JAD, quel que soit le millésime considéré.

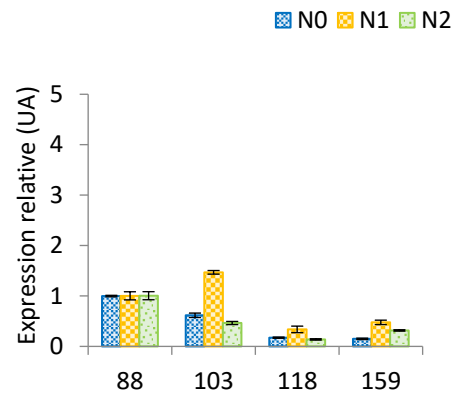
Cependant, pour les 3 millésimes étudiés, le niveau d'expression de *VvCLE-TDIF* est 2,5 fois plus important à 159JAD en 2016. A ce stade, au sein d'un millésime donné, peu de variations sont retrouvées entre les rangs de bourgeons. Toutefois, les quelques variabilités entre les types de bourgeons sont observées lors de la phase d'organogenèse (35-60JAD) en 2016. En effet, nous constatons une surexpression de ce gène dans les bourgeons N0 alors que dans les bourgeons N1 et N2, ce gène semble sous exprimé. A contrario, en 2015, c'est dans les bourgeons N2 que cette surexpression est retrouvée.

I.1.2.B. Discussion

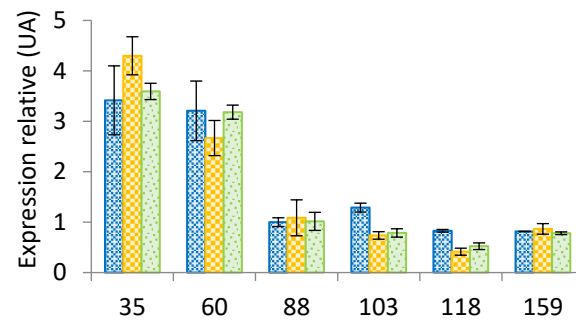
Les profils d'expression de *VvCLE-TDIF* dans cette étude sont différents de ceux de *VvCLE25-1*. L'expression de *VvCLE-TDIF* est plus importante lors de l'organogenèse, alors que *VvCLE25-1* est surexprimé au stade 159JAD. Ces observations laissent penser qu'au contraire de *VvCLE25-1* qui régulait plutôt négativement la prolifération et le nombre de cellules du MAC, *VvCLE-TDIF* aurait un rôle positif dans la prolifération des cellules du MAC aux stades précoces, donc favoriserait l'initiation des primordia.

En effet, *VvCLE-TDIF* code pour une protéine CLAVATA3/ESR(CLE)-related TDIF-like, dont le nom du peptide TDIF (Tracheary element Differentiation Inhibitory Factor) traduit sa fonction comme facteur d'inhibiteur de différenciation des cellules cambiales en intervenant aussi dans la régulation de l'homéostasie cellulaire du MAC (Clark *et al.*, 1997 ; Fletcher *et al.*, 1999 ; Ogawa *et al.*, 2008). La surexpression du gène *CLE-TDIF* pourrait favoriser la

A -2014



B -2015



C -2016

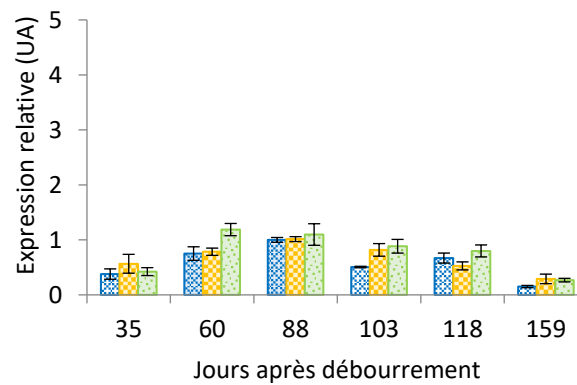


Figure 46 : Evolution de l'expression de *VvL1L* au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2014, (B) 2015 et (C) 2016. (Statistiques présentées dans le Tableau XVI).

prolifération cellulaire des cambiums et des procambiums, et ainsi inhiber leur différenciation (Hirakawa *et al.*, 2010). Chez *Arabidopsis thaliana* l'application des peptides CLE-TDIF induirait l'initiation des bourgeons axillaires (Yaginuma *et al.*, 2011) et en tant que peptide mobile CLE-TDIF pourrait favoriser la division et le maintien des cellules, empêchant alors la différenciation cellulaire (Hirakawa *et al.*, 2008 ; Yaginuma *et al.*, 2011 ; Leasure et He, 2012). Il est admis que la formation d'un primordium à partir d'un méristème caulinaire nécessite une augmentation et un changement de l'orientation des divisions cellulaires permettant la formation d'un dôme au niveau du méristème et l'émergence d'un primordium (Morot-Gaudry *et al.*, 2017), ce qui pourrait confirmer notre hypothèse sur le rôle de VvCLE-TDIF dans l'initiation des PI.

I.1.3. Gène VvL1L

Le gène VvL1L (*LEAFY-COTYLEDON 1-like*) est un membre de la famille des gènes *LEAFY-COTYLEDON* impliqué dans le développement de l'embryon. Le gène L1L a été caractérisé dans de nombreuses plantes, telles que *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Helianthus annuus*, *Helianthus tuberosus*, *Theobroma cacao* ou *Citrus sinensis* (Kwong *et al.*, 2003 ; Alemanno *et al.*, 2008 ; Chiappetta *et al.*, 2009 ; Tan *et al.*, 2011 ; Zhu *et al.*, 2014). Il a été montré que le gène L1L pouvait jouer un rôle important dans les cals embryogéniques, les embryons somatiques et les grains immatures favorisant l'élongation cellulaire (Kwong *et al.*, 2003 ; Gaj *et al.*, 2005 ; Chiappetta *et al.*, 2009). Chez la vigne, peu d'études se sont focalisées sur cette famille *LEAFY-COTYLEDON*, qui, à chaque fois ont été effectuées uniquement sur des embryons somatiques (Schellenbaum *et al.*, 2008 ; Maillot *et al.*, 2009) démontrant que VvL1L était surexprimé aux stades précoces de l'embryogenèse, mais son rôle exact et son mode de fonctionnement reste à établir.

I.1.3.A. Résultats

L'évolution et la comparaison des niveaux d'expression du gène VvL1L pour les trois années et pour les trois types de bourgeons sont résumées (Figures 46A, B et C).

Le gène VvL1L, semble présenter des profils globalement similaires au cours de nos différents stades d'intérêt. En effet, au cours de la phase d'ontogenèse (88-118JAD), l'accumulation des transcrits de VvL1L diminue au cours du temps et ce pour chaque type de bourgeon (N0, N1, N2) étudié. Cette observation est valable pour chacun des millésimes (2014, 2015 et 2016) considérés.

En revanche lorsque l'on s'intéresse à la phase d'organogenèse, l'effet millésime semble être très présent puisqu'en 2015, nous retrouvons une surexpression importante de VvL1L

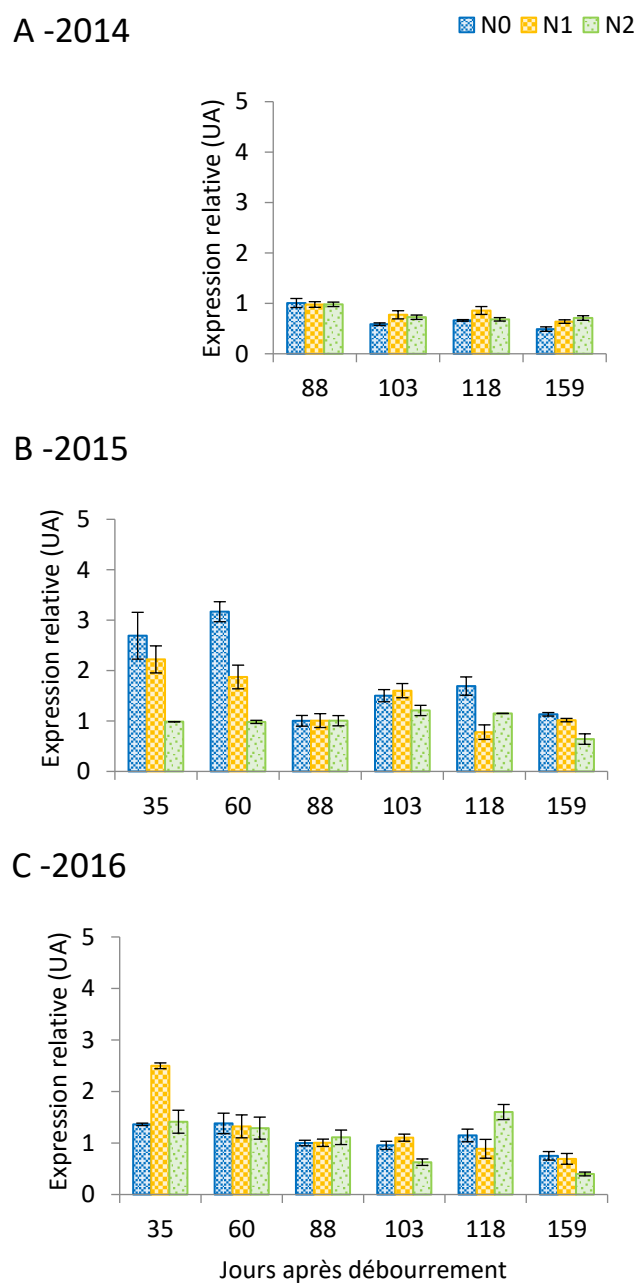


Figure 47 : Evolution de l'expression de *VvMADS8* au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2014, (B) 2015 et (C) 2016. (Statistiques présentées dans le Tableau XVI).

(3 fois plus que le contrôle) dans chaque type de bourgeon analysé. Ce résultat n'est absolument pas retrouvé lors de la phase d'organogenèse du millésime 2016 puisqu'au stade 35JAD comme à 60JAD, *VvL1L* semble cette fois réprimé.

I.1.3.B. Discussion

Pour la première fois, le gène *VvL1L* a été étudié dans les bourgeons latents durant leur développement en année 1. **Dans notre étude, *VvL1L* présente une période de surexpression entre 35JAD et 60JAD, durant la phase d'initiation des anlagen, suivie par une période où le niveau d'expression est plus faible jusqu'à 159JAD.** Ces profils correspondent à ceux de *VvL1L* étudiés dans les cals et les embryons somatiques de la vigne, où l'expression de *VvL1L* est uniquement détectée pendant la phase d'induction et avant l'apparition des embryons somatiques (Schellenbaum *et al.*, 2008). **Ainsi, nos résultats nous permettent de supposer que *VvL1L* jouerait un rôle important dans l'initiation des PI, et probablement aurait un effet de régulation positive sur l'induction et de l'initiation des anlagen.** Cependant, en l'état actuel, il est encore difficile d'aller plus loin dans l'interprétation de son mode de fonctionnement.

I.2. **Gènes impliqués dans la régulation de la transition florale**

Dans cette approche « gènes candidats », sur les 6 gènes choisis 3 participent à la régulation de la transition florale. Il s'agit ici de *VvMADS8*, *VvTFL1a* et *VvMFT*.

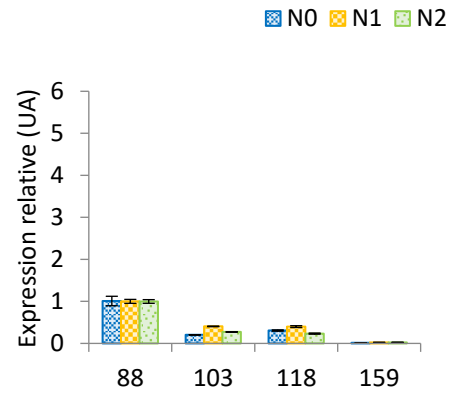
I.2.1. **Gène *VvMADS8***

Le gène *VvMADS8* fait partie de la famille des gènes *MADS-box* et est un homologue d'un intégrateur floral, *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*) d'*Arabidopsis* (Sreekantan et Thomas, 2006 ; Perez *et al.*, 2011). Le rôle du gène *AtSOC1* est assez bien connu. Il peut intervenir en tant qu'intégrateur floral pendant la floraison et dans le contrôle du timing de la détermination du méristème floral (Onouchi *et al.*, 2000 ; Moon *et al.*, 2003 ; Lee et Lee, 2010). Chez la vigne, les fonctions de *VvMADS8* sont moins bien connues. Certaines études supposent que ce gène pourrait jouer un rôle dans le développement précoce des inflorescences (Sreekantan et Thomas, 2006 ; Almada *et al.*, 2009 ; Diaz-Riquelme *et al.*, 2012).

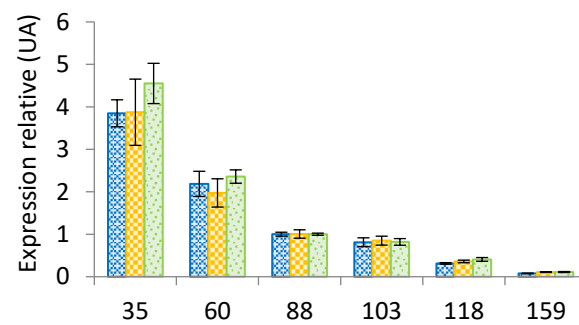
I.2.1.A. Résultats

L'évolution et la comparaison des niveaux d'expression du gène *VvMADS8* pour les trois années et pour les trois types de bourgeon sont résumées (Figures 47A, B et C).

A -2014



B -2015



C -2016

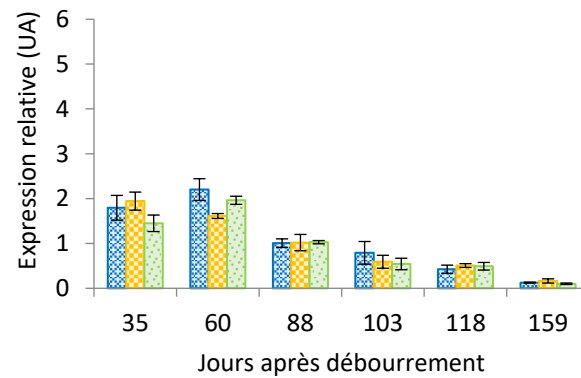


Figure 48 : Evolution de l'expression de *VvTFL1a* au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2014, (B) 2015 et (C) 2016. (Statistiques présentées dans le Tableau XVI).

Le comportement de ce gène dans notre contexte d'étude ne montre aucune différence significative de comportement entre les types des bourgeons analysés. En revanche, comme pour *VvL1L*, une accumulation des transcrits plus importante (1,5 fois plus que le témoin) lors des stades de la phase d'organogenèse est observé. Ce profil, remarqué pour la première fois en 2015, est retrouvé lors du millésime 2016. Lors du millésime 2015, la surexpression de *VvMADS8* semble être plus importante dans les bourgeons N1 et N2.

I.2.1.B. Discussion

Dans notre étude, l'expression du gène *VvMADS8* est détectée très précocement (à 35 et 60JAD). **Son niveau de transcrits est important entre 35JAD et 88JAD, ce qui correspond à la phase d'organogenèse** des PI identifiée dans le chapitre précédent. Nos résultats vont dans le sens de ceux d'Almada *et al.* (2009) et de Diaz-Riquelme *et al.* (2012) qui laissent supposer que ***VvMADS8* pourrait jouer un rôle dans la régulation positive de l'initiation et la différenciation des PI.**

I.2.2. **Gène *VvTFL1a***

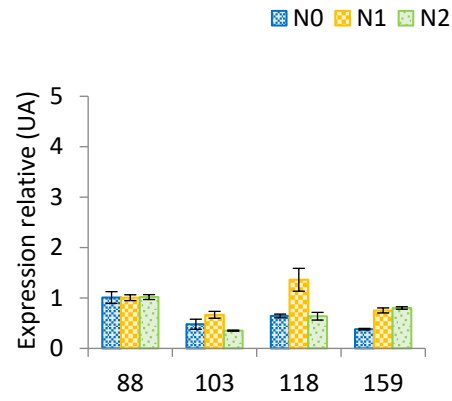
Le gène *VvTFL1a* est un homologue d'intégrateurs floraux de la famille des gènes *FT/TFL1* d'*Arabidopsis thaliana* mais a aussi été caractérisé chez la vigne (Joly *et al.*, 2004 ; Boss *et al.*, 2006 ; Sreekantan et Thomas, 2006 ; Carmona *et al.*, 2007 ; Crane *et al.*, 2012 ; Diaz-Riquelme *et al.*, 2012). Le rôle de *VvTFL1* durant la floraison est relativement bien connu. Il est aujourd'hui défini comme le répresseur du développement floral et pourrait contrôler la durée de la floraison (Boss *et al.*, 2006 ; Yao *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2011 ; Yao *et al.*, 2012, Crane *et al.*, 2012).

I.2.2.A. Résultats

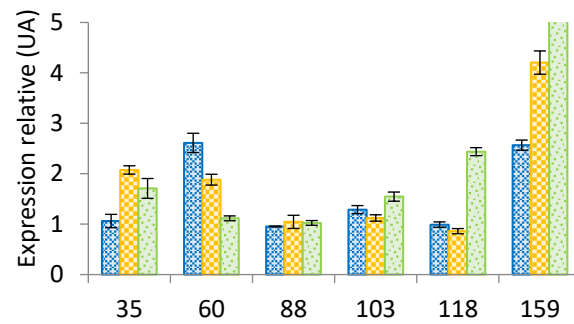
Le profil d'évolution de ce gène dans notre contexte scientifique semble très conservé (Figures 48A, B et C). Effectivement, le profil d'accumulation des transcrits de *VvTFL1a* est identique quel que soit le type des bourgeons étudiés. De la même manière, nous ne constatons aucune différence d'évolution de l'expression de *VvTFL1a* en fonction des 3 millésimes étudiés (2014, 2015, 2016). Ce profil d'évolution se caractérise ici par une diminution progressive du niveau de transcrit au cours du temps. Si *VvTFL1a* est fortement exprimé lors de la phase d'organogenèse (stade 35 à 88JAD), son expression décroît énormément lors de la phase d'ontogenèse pour arriver à un niveau quasi nul au moment de l'entrée en prédormance (159JAD).

Si le fonctionnement de ce gène est remarquablement conservé d'un rang de bourgeon à l'autre et d'un millésime à l'autre, nous pouvons noter dans cette étude que le niveau

A -2014



B -2015



C -2016

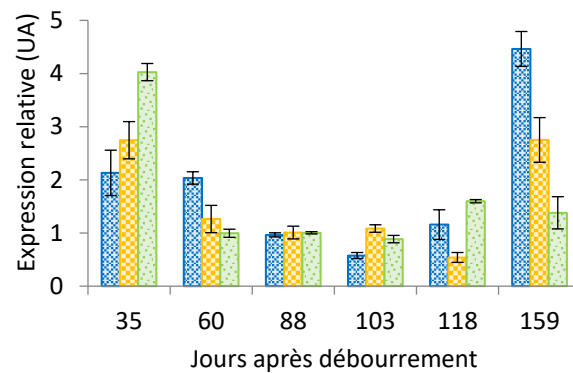


Figure 49 : Evolution de l'expression de *VvMFT1* au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2014, (B) 2015 et (C) 2016. (Statistiques présentées dans le Tableau XVI).

d'accumulation des transcrits de *VvTFL1a* semble cependant presque 2 fois plus faible en 2016 qu'en 2015 (Figures 48B et 48C).

I.2.2.B. Discussion

Dans cette étude, **le gène *VvTFL1a* est surexprimé très tôt entre 35JAD et 60 JAD dans les bourgeons latents en 2015 et 2016**. Nos résultats confortent ceux de Boss *et al.* (2006), de Crane *et al.* (2012) et de Yao *et al.* (2012) qui ont démontrés que *VvTFL1a* était exprimé tôt au niveau du méristème végétatif apical dans les bourgeons. **A partir de 60JAD, l'expression de ce gène chute progressivement avant la fin de la phase d'initiation des deux premiers PI, laissant penser qu'en précédant l'initiation des PI, sa surexpression pourrait être un signal dans le contrôle de l'induction et de l'initiation des PI.**

A partir de 60JAD, le niveau d'expression de *VvTFL1a* reste relativement faible, alors que la différenciation des PI débute et s'intensifie. Plusieurs études au cours de la floraison chez diverses espèces et notamment la vigne ont montré que ce gène pouvait maintenir le méristème apical indéterminé et retarder l'acquisition de l'identité du méristème floral dans le processus de mise en fleurs (Weigel *et al.*, 1992 ; Parcy *et al.*, 2002 ; Boss *et al.*, 2006 ; Sohn *et al.*, 2007 ; Crane *et al.*, 2012). De ce fait, **la diminution de l'expression de *VvTFL1a* après l'initiation des PI pourrait favoriser le développement et la différenciation des PI, c'est-à-dire la ramification des méristèmes inflorescentiels en favorisant l'acquisition de l'identité du méristème floral après la phase d'initiation.**

I.2.3. **Gène *VvMFT1***

Le gène *MFT* (Mother of *FT* and *TFL1*) est connu depuis longtemps chez *Arabidopsis thaliana* pour être un homologue à la fois de *FT* et de *TFL1* et a donc un rôle certain dans les différentes étapes menant à la floraison (Bradley *et al.*, 1997). Comme précisé dans le chapitre bibliographique, il a été retrouvé chez plusieurs espèces et semble agir comme inducteur de la floraison (Yoo *et al.*, 2004).

I.2.3.A. Résultats

Dans notre étude, le profil d'expression de ce gène est conservé suivant les millésimes (Figures 49A, B et C). Il semble de manière intéressante fonctionner sur deux temporalités. En effet, aux stades 35 et 60JAD (phase d'organogenèse), il semble surexprimé puis l'accumulation des transcrits diminue de manière significative au cours de la phase d'ontogénèse. Cette diminution ne semble pas conservée dans le temps puisqu'une nouvelle accumulation des transcrits de *VvMFT1* est retrouvée à partir de la fin de cette phase (118JAD). Cette accumulation est fortement constatée lors de la phase d'entrée en dormance(159JAD).

Si de manière globale ce profil est retrouvé pour les différents millésimes étudiés, nous remarquons que les différents types de bourgeons ne présentent pas le même profil d'expression. Lors de la phase d'organogenèse, nous observons que (i) à 35JAD : les bourgeons N1 et N2 présentent une surexpression de *VvMFT1* par rapport à N0, et (ii) à 60JAD, dans le bourgeon N0, *VvMFT1* est cette fois surexprimé par rapport à N1 et N2. Cette observation est valable pour les 2 millésimes considérés, à savoir 2015 et 2016. Lors de la phase d'entrée en dormance, là encore les rangs des bourgeons semblent répondre différemment. En effet, en 2015 si une accumulation des transcrits est significativement observée, elle semble suivre un gradient selon le rang des bourgeons ($N0 < N1 < N2$). Toutefois, si cette surexpression significative de *VvMFT1* est retrouvée à ce stade, le gradient, suivant le type des bourgeons, est cette fois inversé avec $N0 > N1 > N2$.

I.2.3.B. Discussion

MFT appartient à la famille des gènes *FT/TFL1* et est retrouvé chez de nombreuses espèces végétales (Tao *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2012 ; Iwata *et al.*, 2012 ; Nishikawa *et al.*, 2008 ; Igasaki *et al.*, 2008 ; Carmona *et al.*, 2007). Il est connu pour réguler le rythme de l'initiation de la floraison et de la germination (Yoo *et al.*, 2004 ; Xi *et al.*, 2010 ; Iwata *et al.*, 2012).

Dans notre étude, ***VvMFT1* présente un profil remarquable au cours du temps et est conservé entre les millésimes étudiés. Il semble impacter les deux phases majeures de l'initiation, de la différenciation et de la ramification des PI : l'organogenèse (35-88JAD) et l'ontogenèse (88-118JAD).**

Dans la littérature, le fonctionnement de *MFT* est double puisqu'il s'agit à la fois d'un homologue de *FT* (inducteur des processus de floraison) et de *TFL1* (represseur des processus de floraison) (Nakamura *et al.*, 2011). Récemment, dans la majeure partie des espèces végétales, il semble que *MFT* oriente sa fonction positivement en faveur de l'induction florale (similaire à *FT*) (Yoo *et al.*, 2004 ; Iwata *et al.*, 2012 ; Randoux *et al.*, 2012). Nos résultats iraient dans ce sens puisque l'on retrouve une accumulation des transcrits de *VvMFT1* lors de la phase d'organogenèse (35-88JAD) puis au moment de l'entrée en dormance (159JAD), mais cette accumulation décroît progressivement au cours de la phase d'ontogenèse (88-118JAD). **De manière intéressante, le comportement de *VvMFT1* semble antagoniste à celui de *VvTFL1a*.** Ce type de résultats a déjà été retrouvé lors de l'étude de Li *et al.* (2012) sur la floraison de l'orchidée, qui émet l'hypothèse **qu'une plus forte expression de *DnMFT* dans les bourgeons pourrait participer au maintien des PI dans le temps.**

Par ailleurs, chez de nombreuses espèces végétales, *MFT* est fortement impliqué dans l'embryogenèse lors de la germination, et semble fortement et directement régulé par l'ABA (Xi *et al.*, 2010, Nakamura *et al.*, 2011 ; Igasaki *et al.*, 2008). Or chez la vigne, cette hormone est à l'origine de nombreux contrôles métaboliques. L'importance de cette hormone chez la vigne et les données bibliographiques sur le contrôle de l'embryogenèse par *MFT* régulé par l'ABA soulèvent l'importance d'une régulation potentielle de *VvMFT1* par l'ABA.

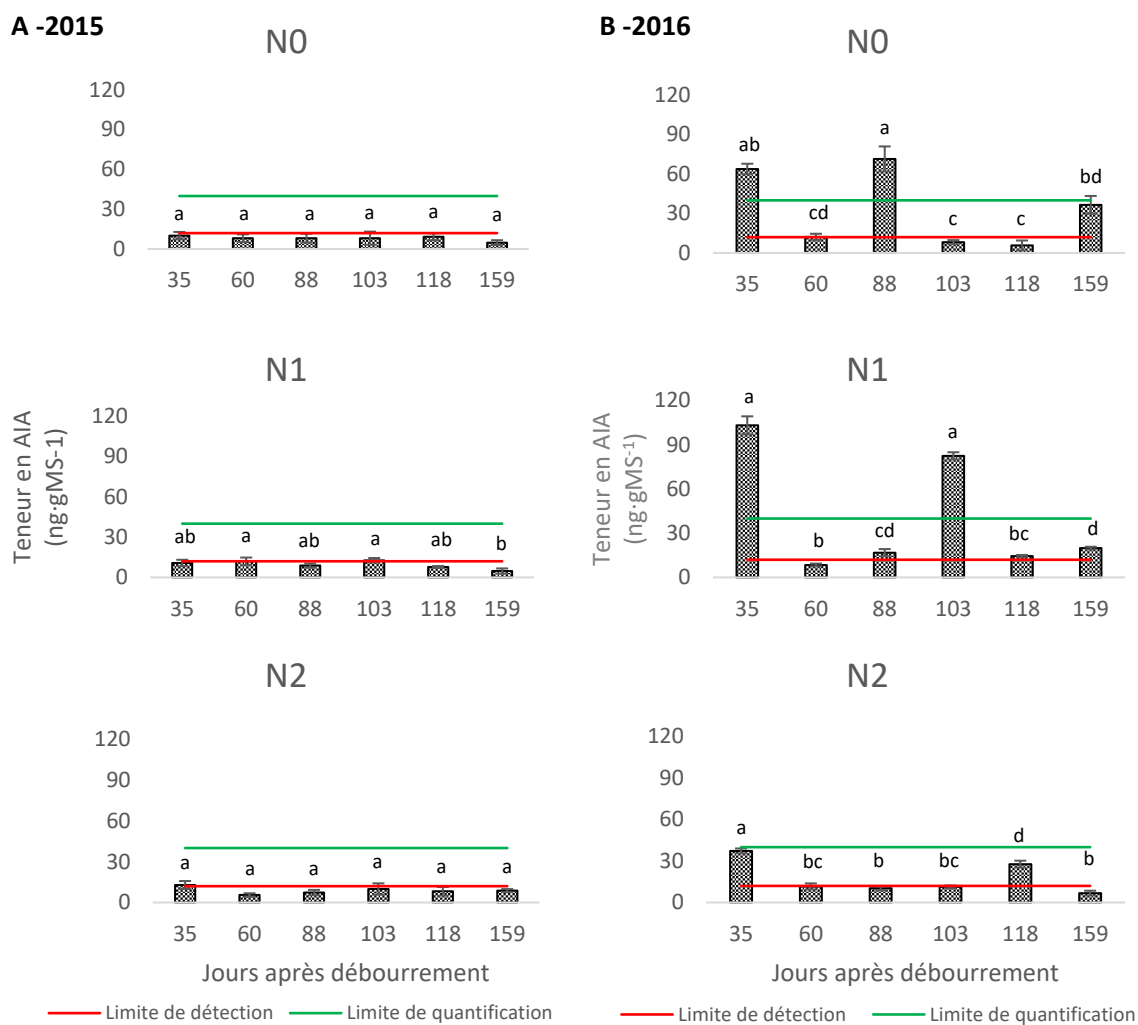


Figure 50 : Evolution de la teneur en AIA au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle de développement en (A) 2015 et (B) 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; a, b, c, d pour chaque histogramme indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis.

II. Approche hormonale : étude de 3 familles de régulateurs de croissance (acide indole 3-acétique, acide abscissique et cytokinines) au cours de l'évolution des bourgeons latents de vigne lors de leur première année de formation

Les effets des différents régulateurs de croissance sur la fertilité des bourgeons ont été bien étudiés séparément. Comme toutes les autres plantes ligneuses pérennes, les balances des différentes hormones spécifiques sont exigées pour le développement des inflorescences et des fleurs de la vigne (Zeevaart, 1976). Cependant, les mécanismes de régulation des balances hormonales sont complexes, et les moindres changements environnementaux et nutritionnels peuvent affecter ces balances, ce qui par conséquent peut impacter la fertilité des bourgeons latents.

En raison des compétences du laboratoire et des travaux déjà réalisés sur les équilibres hormonaux dans les fleurs et les baies, nous avons choisi de nous focaliser sur 3 familles de régulateurs : les auxines avec l'acide indole 3-acétique sous sa forme libre (AIA), l'acide abscissique sous sa forme libre (ABA) et quatre cytokinines : trans-zéatine-riboside-5'-monophosphate (tZR5MP), trans-zéatine-riboside (tZR), trans-zéatine-riboside-O-glucoside (tZROG) et trans-zéatine-9-glucoside (tZ9G).

II.1. Acide indole 3-acétique (AIA)

L'AIA est une hormone bien connue chez la vigne pour son rôle dans l'organisation du méristème apical, les phénomènes de dominance apicale régulant ainsi le non développement du bourgeon latent lors de sa première année de développement, et dans les mécanismes d'expansion cellulaire (Bessis, 1965 ; Iwahori, 1967 ; Gea *et al.*, 1994).

II.1.1. Résultats

Après une année de test et de mise au point sur les échantillons de 2014, le dosage de l'AIA a été réalisé tout au long du cycle dans les bourgeons récoltés en 2015 et 2016. Les résultats sont présentés (Figure 50).

Les résultats obtenus ne permettent une interprétation que pour le millésime 2016, en raison des teneurs inférieures au seuil de détection en 2015 (Figures 50A et 50B). Dans un premier temps, l'analyse des profils d'évolution des teneurs permet de mettre en évidence des teneurs toujours plus importantes au stade 35JAD et ceci pour les trois types de bourgeons étudiés (Figure 50B). Ensuite, ces teneurs chutent drastiquement pour ré-augmenter

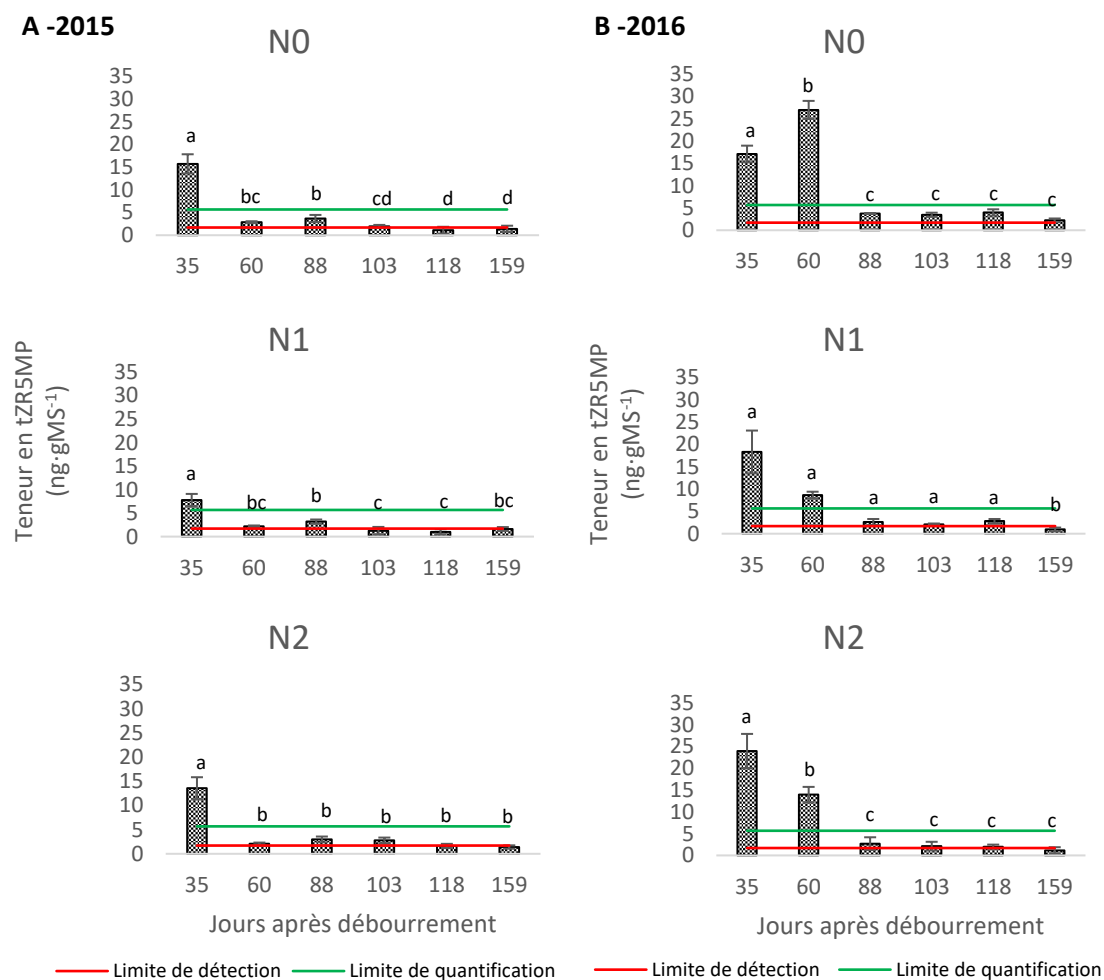


Figure 51 : Evolution de la teneur en tZR5MP au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; a, b, c pour chaque histogramme indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis.

ponctuellement aux stades 88JAD pour les bourgeons situés sur les nœuds N0, 103JAD pour les nœuds N1 et 118JAD pour les nœuds N2 (Figure 50B).

II.1.2. Discussion

L'auxine (AIA) est une phytohormone relativement bien connue dans le monde végétal. Cette hormone, synthétisée essentiellement dans les méristèmes apicaux des tiges, dans les jeunes feuilles, ainsi que dans les fruits et les graines en développement, est transportée de façon basipète dans la plante entière. Elle joue un rôle dans l'embryogenèse, dans le contrôle de l'organisation du méristème apical et dans les mécanismes d'expansion cellulaire (Iwahori, 1967 ; Gea *et al.*, 1994). Elle favorise aussi la production des racines latérales et adventives, ainsi que le développement des fruits (Heller *et al.*, 2000 ; Raven *et al.*, 2005). Enfin, elle participe à la néoformation des bourgeons en synergie avec les cytokinines, mais est aussi responsable de la dominance apicale induisant l'inhibition du débourrement des bourgeons axillaires par l'apex (Champagnat, 1965 ; Bessis, 1965 ; Perrone et Felicini, 1974 ; Cline, 1991).

Les teneurs en AIA détectées dans les différents types de bourgeons en 2016 correspondent aux teneurs décrites dans la bibliographie (Kracke *et al.*, 1981 ; Bottcher *et al.*, 2010). Si les auxines ont été dosées ponctuellement dans les bourgeons, leur évolution au cours du développement dans ces organes n'a jamais été étudiée, contrairement aux fleurs et aux baies (Bottcher *et al.* 2010). Ainsi, comme dans les fleurs et les grappes, **les teneurs les plus importantes sont retrouvées dans le bourgeon en début de cycle puis diminuent brusquement lorsque le premier PI est initié. Par la suite, un second pic est observé à des stades différents en fonction des bourgeons considérés, peut être en lien avec la précocité de l'initiation du second PI dans les bourgeons N0 et du troisième PI dans les bourgeons N1**, comme décrit au chapitre précédent. En effet, comme déjà démontré pour différentes espèces, les auxines joueraient un rôle important dans l'architecture méristématique des inflorescences (Xu *et al.*, 2005 ; Wu et Mcsteen, 2007 ; Barazesh et McSteen, 2008 ; Gallavotti *et al.*, 2008 ; Shimizu-Sato *et al.*, 2009) en favorisant dans une certaine mesure la ramification des inflorescences. Gallavotti *et al.* (2008) ont montré chez le maïs que des traitements à base de NPA (acide *N*-1-naphtylphthalamique), un inhibiteur de transport des auxines, diminuait considérablement le nombre de ramification du méristème inflorescentiel démontrant ainsi que cette famille de régulateur était nécessaire à la formation des méristèmes axillaires et des primordia latéraux.

Mais le rôle des auxines dans le bourgeon n'est pas clair en raison des corrélations possibles avec les cytokinines, les auxines supportant l'activité méristématique alors que les

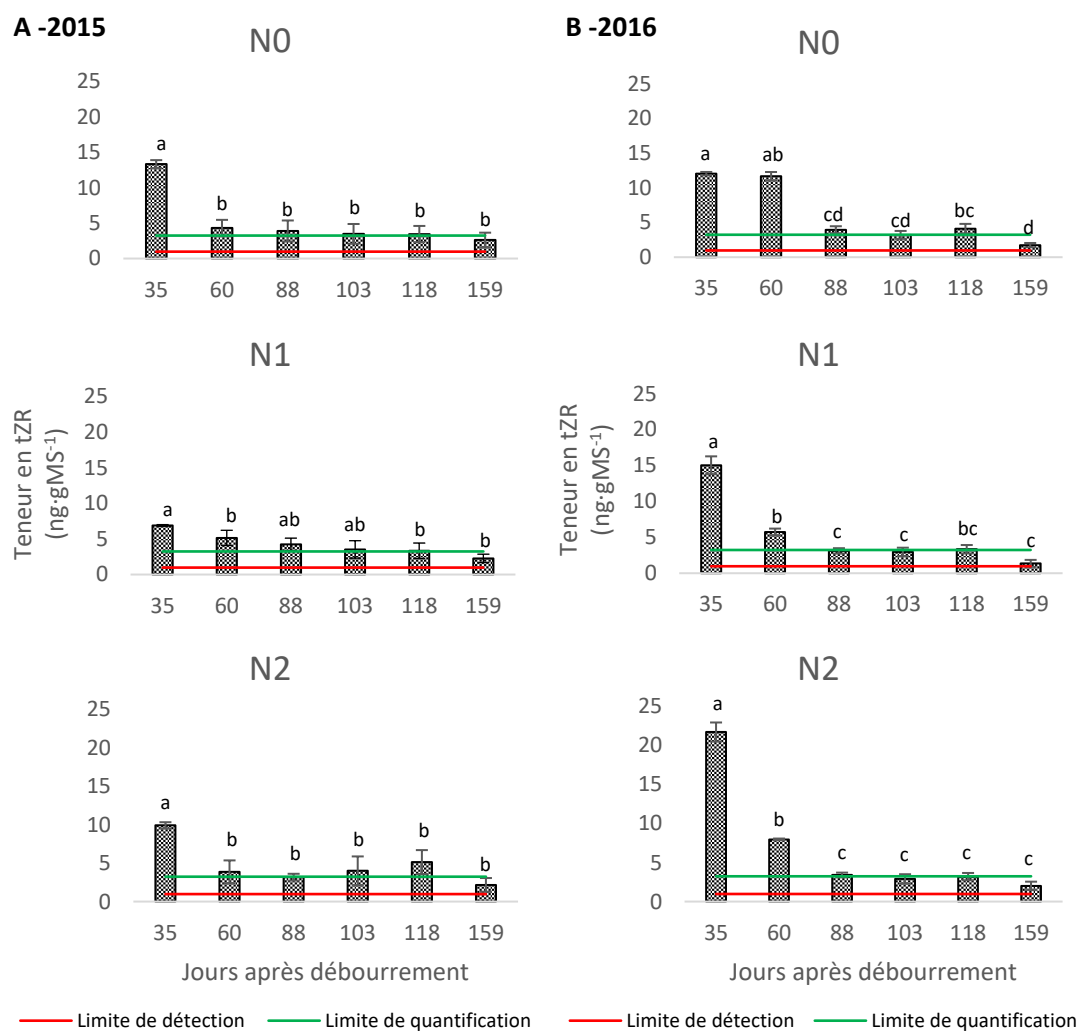


Figure 52 : Evolution de la teneur en tZR au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; a, b, c, d pour chaque histogramme indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis.

cytokinines étant impliquées majoritairement dans le contrôle des mécanismes de différenciation (Moubayidin *et al.*, 2009). Ainsi, l'équilibre auxines/cytokinines jouerait un rôle clé dans la programmation des phases de division cellulaire et des phases de croissance/différenciation.

II.2. Cytokinines (CKs)

Les CKs sont une famille de phytohormones complexes dont la plus répandue est la zéatine, et surtout la trans-zéatine (tZ) (Heller *et al.*, 2000 ; Raven *et al.*, 2007). Elles sont connues pour leurs propriétés activatrices de la division cellulaire, de la croissance et de la différenciation cellulaire (Heller *et al.*, 2000 ; Raven *et al.*, 2007) et leurs actions complémentaires à celle des auxines (Moubayidin *et al.*, 2009). Chez la vigne, les effets des CKs sur la mise en place des primordia inflorescentiels ont été relativement bien documentés. Ces phytohormones sont considérées comme des régulateurs positifs dans le développement des bourgeons, en favorisent l'initiation des PI (Srinivasan et Mullins, 1978, 1979, 1980a, 1981a, 1981b ; Mullins *et al.*, 1992 ; Crane *et al.*, 2012).

Dans notre travail, quatre formes de CKs ont été détectées et quantifiées : la trans-zéatine-riboside-5'-monophosphate (tZR5MP), la trans-zéatine-riboside (tZR) et la trans-zéatine-riboside-O-glucoside (tZROG) et la trans-zéatine-9-glucoside (tZ9G).

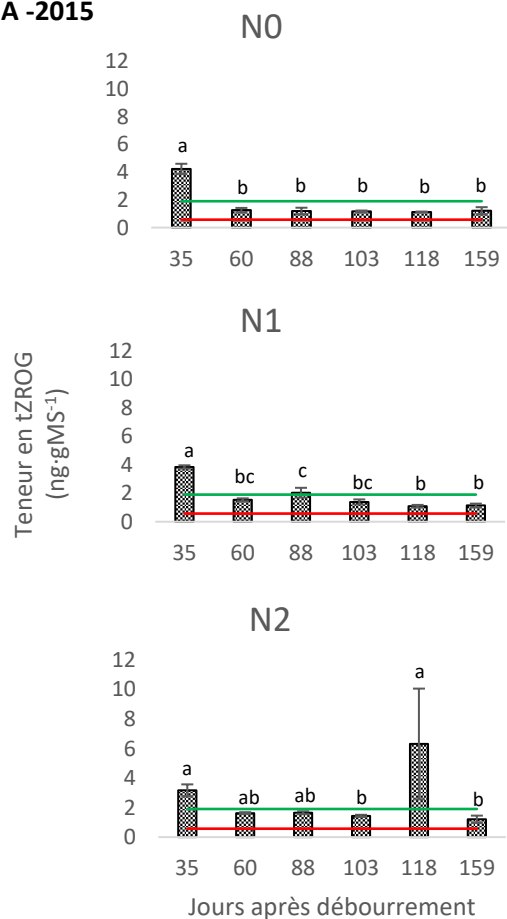
II.2.1. Résultats

Les évolutions des teneurs des 4 formes détectées dans les bourgeons N0, N1 et N2 au cours des deux millésimes sont présentées (Figures 51, 52, 53 et 54).

Comme attendu, les teneurs en trans-zéatine-riboside-5'-monophosphate (tZR5MP), trans-zéatine-riboside (tZR) et trans-zéatine-riboside-O-glucoside (tZROG) évoluent de manière similaire ; à savoir une chute massive des teneurs après le stade 60JAD, rendant quasiment impossible la détection et la quantification à partir du stade 88JAD. Ce profil est similaire pour les trois types de bourgeon et pour les deux années, avec néanmoins une chute des teneurs plus précoce en 2015 qu'en 2016 (Figures 51, 52 et 53). En ce qui concerne les teneurs pour les deux stades où la détection est possible (35JAD et 66JAD), on observe un gradient, avec des teneurs en tZR5MP plus importantes que celles en tZR, elles-mêmes plus élevées que celles en ZROG.

Par contre, la trans-zéatine-9-glucoside (tZ9G) évolue à l'inverse des trois autres, avec une accumulation nette et massive à partir de 88JAD en 2015 et 103JAD en 2016 (Figure 54) ; et ceci de manière identique pour les 3 types de bourgeons.

A -2015



B -2016

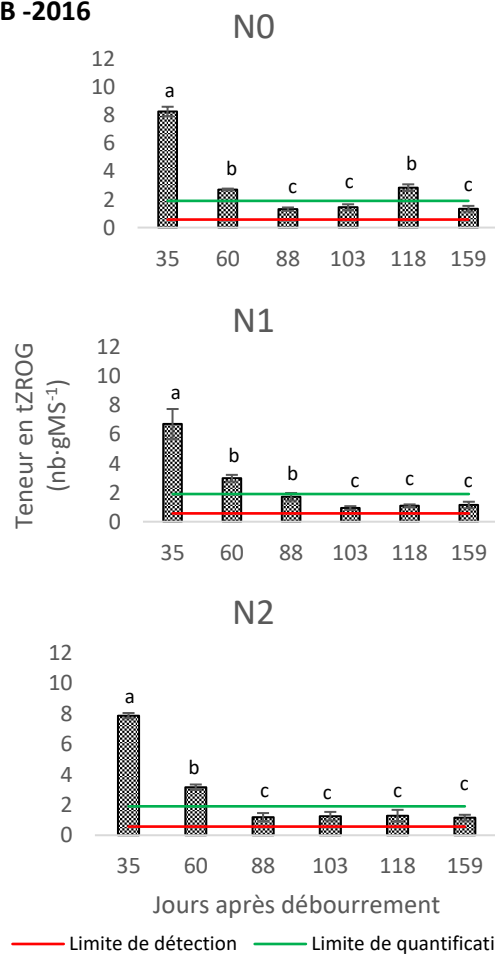


Figure 53 : Evolution de la teneur en tZROG au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; a, b, c pour chaque histogramme indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis.

II.2.2. Discussion

Les quatre CKs étudiées dans notre travail sont des formes conjuguées de la zéatine. Selon, Galuszka *et al.* (2008) les cytokinines pourraient agir à très faibles concentrations (0,2-10 ng·gMF⁻¹). Les teneurs détectées dans notre étude sont globalement plus faibles que celles trouvées chez la vigne par Lombard *et al.* (2006), mais tout à fait comparables avec celles de Field *et al.* (2009) et de Crane *et al.* (2012).

tZR5MP, tZR et tZROG présentent exactement le même profil d'évolution quel que soit le type de bourgeon et le millésime, tandis que tZ9G évolue à l'inverse des trois autres. Ces deux profils d'évolution sont à relier avec la voie métabolique des cytokinines et le rôle attribué à chacune (Figure 55). tZR5MP et tZR sont des formes intermédiaires de la voie métabolique situées à la suite l'une de l'autre et permettant la synthèse de la transzéatine (tZ) à l'origine des formes de réserve. Ainsi, tZ peut être glycosylée en tZROG qui est une forme de mise en réserve temporaire avec possibilité de déglycosylation pour redonner de la tZ, mais également en tZ9G, forme de stockage inactive et de détoxification des CKs (Parker et Letham, 1974 ; Letham et Palni, 1983 ; Heller *et al.*, 2000 ; Sakakibara, 2006).

Dans notre cas, les formes actives sont retrouvées en grande quantité pendant la période d'organogenèse et la forme conjuguée pendant la période d'ontogenèse. Les deux formes intermédiaires de la biosynthèse de tZ (tZR5MP, tZR) qui présentent de fortes teneurs aux stades très précoces (35JAD et/ou 60JAD) marquent la phase d'activation de tZ. Le profil des teneurs en tZROG est similaire à ceux de tZR5MP et tZR, confirmant que tZROG pourrait être une forme de réserve temporaire de tZ (Cook *et al.*, 2001) permettant de réguler l'équilibre final des CKs actives avant 60JAD. **Ainsi, avec de fortes accumulations pendant la phase d'organogenèse, l'initiation et le début des ramifications des primordia inflorescentiels sont assurés confirmant le rôle des cytokinines dans la détermination du devenir des primordia inflorescentiels** (Srinivasan et Mullins, 1978, 1979, 1980a, 1981b ; Mullins *et al.*, 1992 ; Crane *et al.*, 2012). Mais sachant que les CKs actives jouent un rôle positif dans l'initiation ainsi que dans la différenciation des PI en favorisant la division et la prolifération cellulaire et en maintenant l'identité des méristèmes inflorescentiels, on peut se poser la question de la diminution remarquable des teneurs en CKs dès 60JAD et non pas plus tardivement ? Deux mécanismes semblent pouvoir expliquer cette chute. Le premier considère les teneurs en CKs dans la plante entière, avec classiquement une chute des teneurs à floraison (Tromp et Ovaa, 1971), ce qui correspondrait au stade 60JAD. Le second concerne les équilibres hormonaux au sein du bourgeon même en lien avec les auxines. Le rapport CKs/AIA montre un équilibre plus favorable aux cytokinines à 35JAD en 2015 et 60JAD en 2016

(Figure 56) en lien avec la précocité du millésime et le début observé des phases de ramification des anlagen formés. **En effet, au regard des rôles attribués à chaque famille de régulateur, on pourrait penser qu'en début de développement, l'équilibre hormonal favorable aux auxines induit la formation des anlagen puis, dès les deux premiers PI formés, cet équilibre s'inverse ce qui permet aux cytokinines de jouer leur rôle dans les mécanismes de ramification** comme proposé par Moubayidin *et al.* (2009) et Roman *et al.* (2016). Ce dernier auteur vient de démontrer chez le rosier que l'application exogène de cytokinines directement sur les bourgeons ou indirectement sur le rameau décapité facilitait l'organogenèse avec apparition de nouveaux primordia foliaires. Chez la vigne, l'application de cytokinines sur l'inflorescence juste au moment de leur apparition augmente l'allongement des inflorescences et la taille des fleurs, alors qu'en absence de cytokinines les inflorescences tombent (Mullins, 1967).

L'accumulation progressive de la forme inactive (tZ9G) débute quant à elle au moment où les formes actives ne sont quasiment plus quantifiables confirmant l'hypothèse de Hou *et al.* (2004) sur la possibilité de moduler les concentrations en CKs par des processus de *N*-glycosylation. Cette augmentation coïncide avec la période critique de basculement entre la phase dite d'organogenèse et d'ontogenèse, et ceci pour les deux millésimes, malgré des précocités différentes. En relation avec le volume des grappes et le rendement estimé en année $n+1$, on peut également noter que l'accumulation de la forme inactive est plus rapide et plus importante en 2015 qu'en 2016, laissant envisager soit que **l'accumulation des formes non actives au profit des formes actives réduirait la production de nouveaux organes préformés et stimulerait la ramification, soit à l'inverse, que la diminution des formes actives lèverait une inhibition potentielle des mécanismes de ramification.**

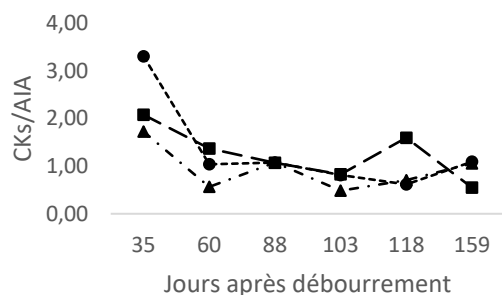
II.3. Acide abscissique libre

II.3.1. Résultats

Comme pour l'AIA, après une année de test et de mise au point sur les échantillons de 2014, le dosage de l'ABA libre a été réalisé tout au long du cycle dans les bourgeons récoltés en 2015 et 2016. Les résultats sont présentés Figure 57.

Les profils des teneurs en ABA libre sont très différents des profils des deux familles d'hormones précédentes. De manière générale, les courbes ont une forme « en cloche » avec les teneurs les plus faibles mesurées en début de cycle, suivi d'une augmentation avec un plateau visible à partir de 60JAD en 2015 et 88JAD en 2016, et enfin d'une diminution au dernier stade (diminution plus marquée en 2016). Quels que soient l'année étudiée et le type

A -2015



B -2016

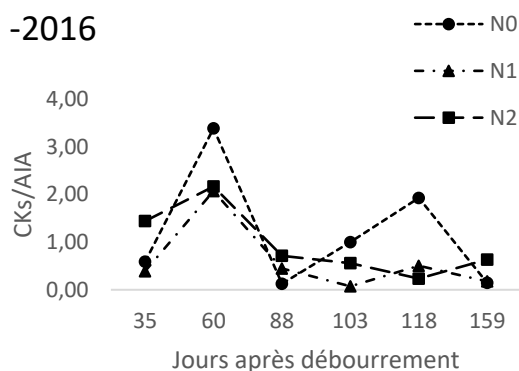
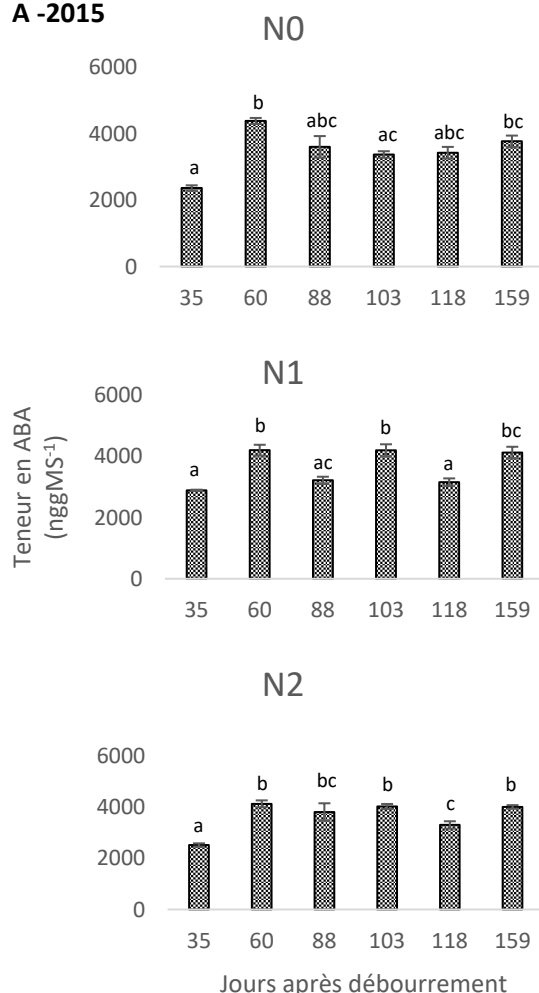


Figure 56 : Evolution du rapport CKs actives/AIA au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.

A -2015



B -2016

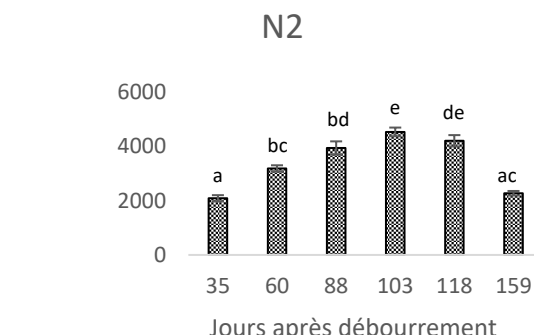
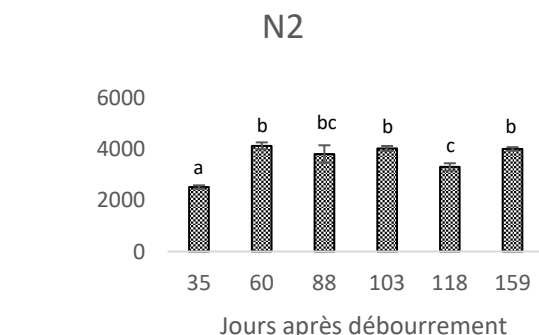
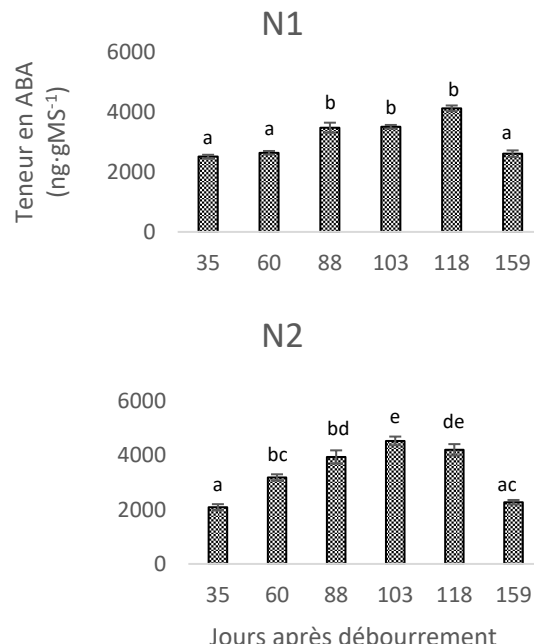
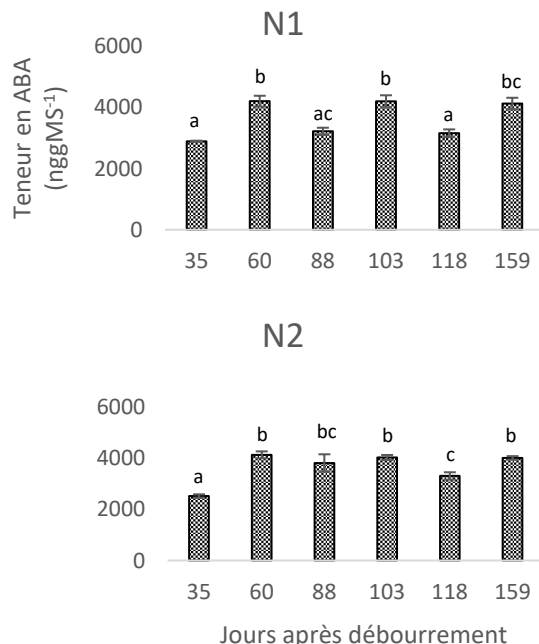
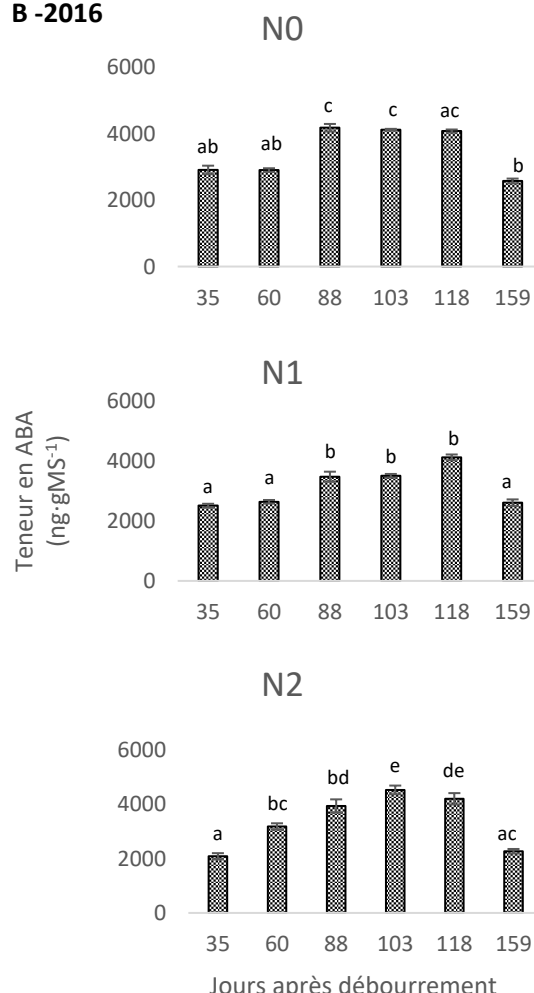


Figure 57 : Evolution de la teneur en ABA libre au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; a, b, c, d, e pour chaque histogramme indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis.

de bourgeon il n'y a pas de différence de teneur significative, sauf pour le bourgeon N1 dont les teneurs sont toujours plus faibles à 60JAD, 88JAD et 103JAD.

Les teneurs en ABA libre détectées lors de cette étude sont de même ordre de grandeur que celles décrites dans la bibliographie sur le bourgeon de vigne (Koussa *et al.*, 1994 et 1998).

II.3.2. Discussion

L'acide abscissique (ABA), une molécule de la famille des terpènes est une phytohormone dont le nom est tiré de son rôle dans l'abscission des feuilles (Heller *et al.*, 2000). Ses propriétés physiologiques au cours du cycle de croissance des plantes sont relativement bien connues. Parmi les nombreux rôles qui lui sont attribués (i) la résistance au stress et particulièrement la fermeture des stomates en réponse à une limitation hydrique, (ii) la maturation des fruits non climactériques et (iii) l'induction et le prolongement de la dormance sont les mieux documentés (Le Page-Degivry et Gaussen, 1970 ; Durand *et al.*, 1975 ; Le Page-Degivry et Bulard, 1979 ; Raven *et al.*, 2007 ; Vishwakarma *et al.*, 2017).

Chez la vigne, l'ABA a été particulièrement étudié dans le cadre du stress hydrique, de la maturation des baies et des mécanismes de dormance des bourgeons et des pépins (Broquedis, 1987 ; Koussa *et al.*, 1994 ; Lavee et May, 1997 ; Koussa *et al.*, 1998 ; Or *et al.*, 2000 ; Orphir *et al.*, 2009 ; Tombesi *et al.*, 2015). Par contre, aucune étude n'a porté sur l'effet de l'ABA lors des phases d'initiation, de différenciation et de ramification inflorescentielle alors que de nombreux auteurs ont confirmé que durant le cycle reproducteur, la teneur en ABA était très importante dans les fleurs de vigne durant la floraison, puis diminuait à la nouaison pour réaugmenter à la véraison dans les baies et enfin rechuter à la maturité, montrant l'importance de ce régulateur de croissance dans le cadre du développement des organes reproducteurs de la vigne, même si son rôle n'est pas encore clairement défini (Baigorri *et al.*, 2001 ; Antolin *et al.*, 2003 ; Koussa *et al.*, 2004).

Dans nos bourgeons, **l'ABA libre s'accumule progressivement jusqu'à la fin de la phase d'organogenèse**, alors que dans les organes en croissance (entre-nœuds et feuilles), Antolin *et al.* (2003) et Koussa *et al.* (2004) avaient observé une chute des teneurs corrélée négativement aux activités de croissance. Mais ces auteurs avaient aussi noté une accumulation d'ABA libre dans les fleurs au moment de l'anthèse, qui correspond pour nous à la période de début de stabilisation des teneurs en ABA. Le rôle de ce régulateur dans le bourgeon à cette période reste encore mal documenté, d'autant plus qu'il est généralement considéré comme un inhibiteur de croissance au sens large du terme. Pourtant, récemment plusieurs auteurs (Humplík *et al.*, 2015 ; Van Staden et Bornman, 1969 ; Teltscherová et Seidlová, 1977)

évoquent le rôle positif de l'ABA dans les mécanismes liés à la morphogenèse. Chez la tomate, l'utilisation de mutants ABA-déficients a permis d'observer que ces plantes avaient des feuilles plus petites que les témoins et que l'application d'ABA exogène permettait de récupérer la taille foliaire (Sharp *et al.*, 2000). Ce même type de constatation a été également fait chez *Arabidopsis thaliana* (Barrero *et al.*, 2005). **Au vu de nos résultats, il est donc légitime de se poser la question d'un éventuel rôle de l'ABA au cours de la phase d'organogenèse dans le bourgeon latent d'autant plus qu'il paraît possible de relier les plus faibles teneurs en ABA des bourgeons de type N1 à leur plus faible poids, ainsi qu'au plus petit volume des grappes estimé en année n+1.**

Plus tardivement, à la fin de la phase d'ontogenèse (après 118JAD), les teneurs d'ABA libre observées chutent, ce qui corrobore les observations de Koussa *et al.* (1998). Selon cet auteur, à la fin de l'été, la fin de la phase de pré-dormance et le début de l'entrée en dormance sont marqués par une diminution de la teneur en ABA-libre et une augmentation de la teneur en ABA-GE associées aux activités α -amylase et invertases impliquées dans l'accumulation de l'amidon et du saccharose en fin d'été ; ce qui semble être le cas dans notre étude au vu de l'évolution des teneurs en sucres étudiée dans le paragraphe suivant, mais qui aurait mérité d'être vérifié par des dosages d'ABA-GE.

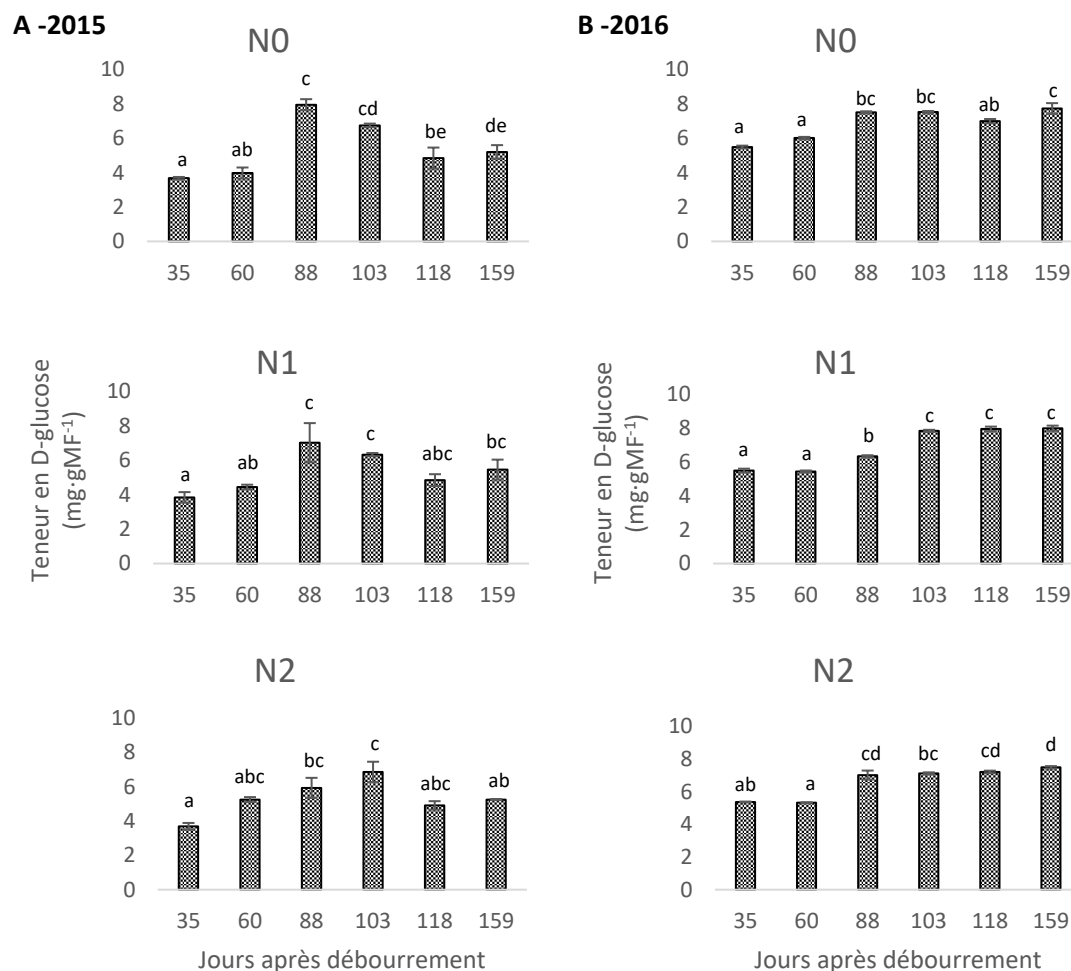


Figure 58 : Evolution de la teneur en D-glucose au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; a, b, c, d, e pour chaque histogramme indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis.

III. Approche biochimique : étude de glucides au cours de l'évolution des bourgeons latents de vigne lors de leur première année de formation

Les glucides sous forme de sucres solubles et d'amidon sont les sources énergétiques principales pour la croissance des plantes. Le premier chapitre de ce travail a mis en évidence un certain « rythme » des phases d'initiation et de ramification des PI, ainsi que les stades clés correspondants qui s'étendent sur plus de 4 mois au cours de la première année du cycle de développement du bourgeon. Le processus commence environ un mois après le débourrement et dure au moins jusqu'à l'entrée en dormance. Il couvre quasiment toute la période de croissance active de la plante, pendant laquelle les origines, les formes et les quantités de ressources énergétiques varient en fonction de l'organe, de son âge, de ses capacités intrinsèques de croissance, de la surface foliaire, de son activité photosynthétique, des conditions climatiques, des conditions trophiques d'alimentation minérale ou hydrique, des équilibres organes sources/organes puits et des pratiques culturales (Chaumont *et al.*, 1994 ; Hendrickson *et al.*, 2004 ; Petit *et al.*, 2006 ; Lebon *et al.*, 2008 ; Vaillant-Gaveau *et al.*, 2014).

Cependant, si les rôles et les modes d'actions des glucides ont été relativement bien documentés dans les fleurs de vigne pendant la floraison, et dans les bourgeons durant la dormance hivernale, les effets des glucides sur l'initiation et la ramification des PI en lien avec la fertilité des bourgeons et le rendement restent peu connus (Candolfi-Vasconcelos et Koblet, 1990 ; Caspari *et al.*, 1998 ; Lebon *et al.*, 2008). L'objectif de cette partie du travail était de réaliser le suivi de l'évolution de différents glucides au cours du développement des bourgeons afin de mieux connaître l'influence des principales sources carbonées et leur lien éventuel avec l'expression des gènes et les équilibres hormonaux.

III.1. Résultats

Les profils d'évolution des teneurs en D-glucose, D-fructose, saccharose et amidon ont été établis en 2015 et 2016, pour les 3 types de bourgeons, et sont présentés dans les Figures 58, 59, 60 et 61.

Au cours des deux années, le D-glucose et le D-fructose évoluent de manière comparable. Les teneurs augmentent jusqu'au stade 88JAD puis se stabilisent (Figures 58 et 59). Même si les écarts sont faibles, on peut noter des teneurs légèrement supérieures en 2016 par rapport à 2015. Les teneurs mesurées sont comparables à celles reportées dans les études

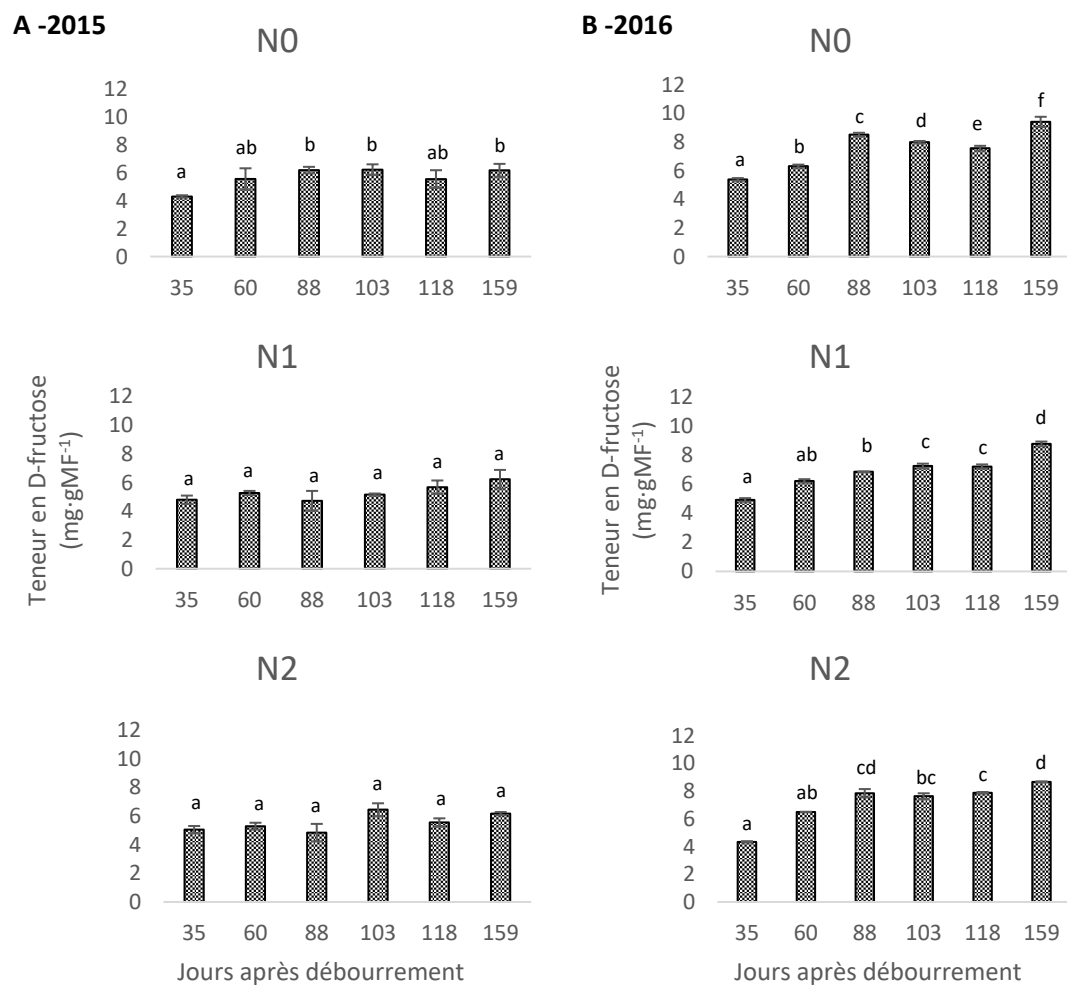


Figure 59 : Evolution de la teneur en D-fructose au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; a, b, c, d, e, f pour chaque histogramme indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis.

précédentes (Koussa *et al.*, 1998 ; Mohamed *et al.*, 2012).

En ce qui concerne le saccharose, les profils d'évolution diffèrent d'une année sur l'autre (Figure 60). En 2015, les teneurs sont faibles jusqu'au stade 118JAD, puis augmentent plus ou moins brusquement selon les bourgeons au dernier stade (159JAD) marquant un état différent des autres stades. Ce sucre de transport s'accumule lorsque l'utilisation du glucose et du fructose se réduit, induisant ainsi une augmentation des teneurs en fin de cycle, jusqu'à 1,5 à 3 fois plus qu'au stade 35JAD, ce qui est comparable avec l'évolution de la teneur en saccharose dans les entre-nœuds (Hamman *et al.*, 1996). En 2016, assez étonnamment, les teneurs mesurées sont pour la plupart des stades inférieurs au seuil de quantification, rendant difficile l'interprétation. Mais comme en 2015, les teneurs les plus importantes sont observées en fin de période.

L'amidon, en tant que sucre de réserve, va s'accumuler lors des derniers stades du développement au moment de l'entrée en dormance (118JAD et surtout 159JAD) (Figure 61). Les teneurs sont faibles jusqu'à l'entrée en dormance puis augmentent fortement et brusquement au stade 159JAD avec un facteur multiplicateur pouvant aller jusqu'à 5 par rapport au stade précédent. L'accumulation de l'amidon a lieu essentiellement dans les primordia foliaires et les bractées, et ne s'observe pas dans le MAC et les méristèmes inflorescentiels (Figure 62). Ce profil est identique pour les deux années, seules les teneurs varient avec des niveaux plus faibles en 2016 qu'en 2015. Le profil d'évolution et les teneurs observés sont en accord avec ce qui est décrit pour les bourgeons de vigne dans la littérature (Koussa *et al.*, 1998).

III.2. Discussion

Si de nombreux travaux ont reporté l'évolution des teneurs en glucides des bourgeons au cours de l'entrée en dormance, la dormance et le débourrement (Koussa *et al.*, 1998 ; Mohamed *et al.*, 2012), aucun ne s'est intéressé aux phases plus précoces au cours de l'induction, de l'initiation et de la ramification des primordia foliaires et inflorescentiels. Nous devons donc, pour essayer de discuter nos résultats, nous reporter aux travaux portant sur l'initiation florale, le développement des pièces florales, la formation de l'inflorescence et la floraison.

Dans le premier chapitre, nous avons démontré que le développement du bourgeon de vigne la première année pouvait être divisé en deux périodes : une première période d'organogenèse jusqu'au stade 88JAD puis une seconde phase d'ontogenèse jusqu'à l'entrée

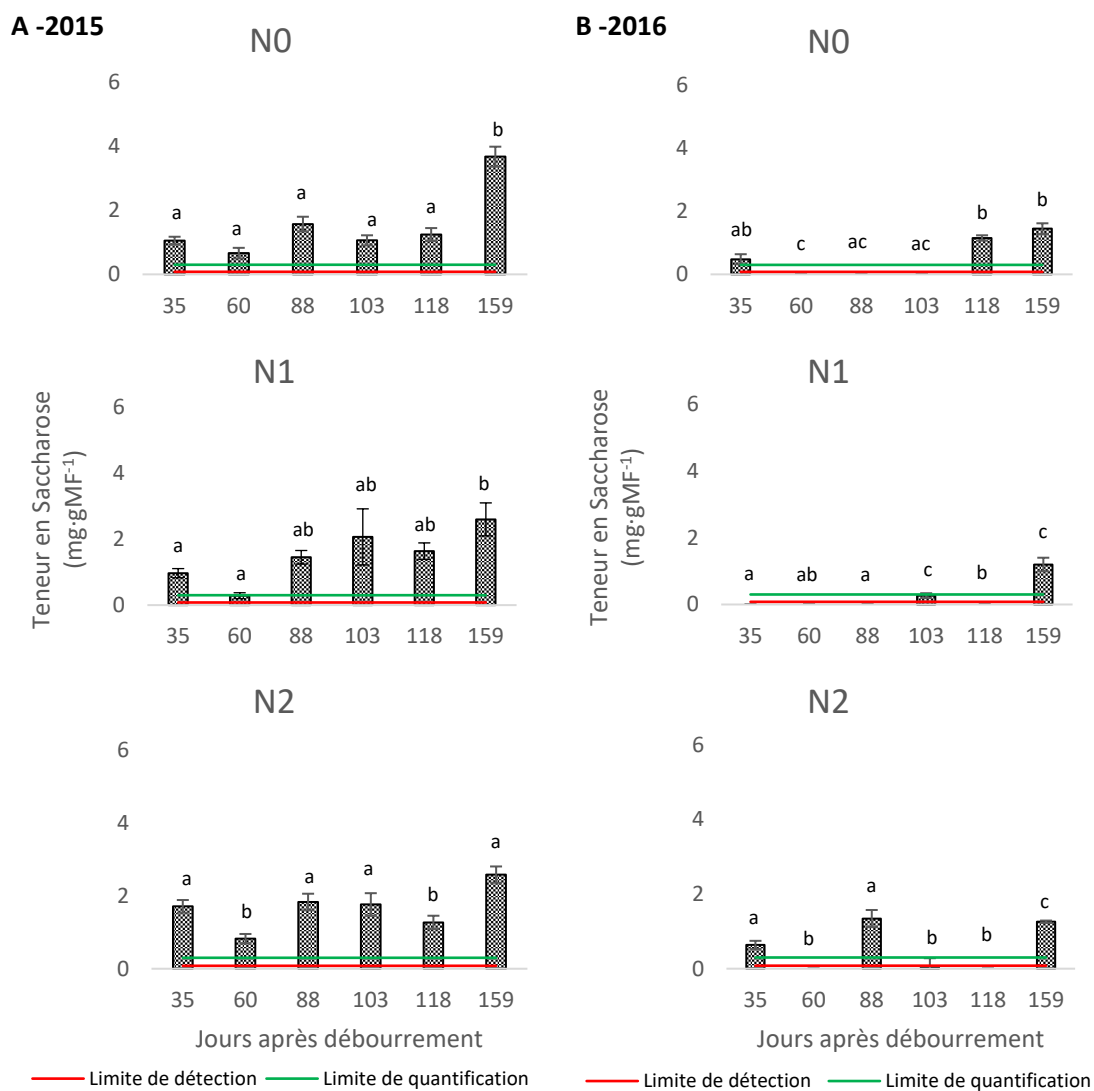


Figure 60 : Evolution de la teneur en saccharose au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; a, b, c pour chaque histogramme indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis.

en dormance. Ces deux périodes correspondent à des phases où la demande en glucides est importante et, à l'image de ce qui a été démontré dans l'inflorescence pour la même période, le rôle des glucides dans la construction des différents organes serait primordial (Clément *et al.*, 1996 ; Lebon *et al.*, 2006). Les sucres impliqués peuvent être des sucres solubles ou des sucres insolubles, et proviennent de la photosynthèse, des réserves ou des deux (Clément *et al.*, 1994, 1996 ; Zapata *et al.*, 2004 ; Lebon *et al.*, 2006).

En début de période étudiée, les teneurs en glucides solubles comme le D-glucose et le D-fructose augmentent de manière significative jusqu'au stade 88JAD. Pendant cette période, le méristème apical est à l'origine de la formation de tous les primordia du bourgeon (Bessis, 1965). La transition de la phase végétative à la phase reproductrice a lieu dans ce méristème et se décompose en deux étapes (i) la transformation du méristème végétatif en méristème inflorescentiel et (ii) la transformation du méristème inflorescentiel en méristème floral (Battey et Tooke 2002 ; Barbier *et al.*, 2015). Cette période serait en partie régulée par un réseau complexe de voies de signalisation (Mouradov *et al.*, 2002) dont celles des hormones et des glucides (Barbier *et al.*, 2015 ; Roman *et al.*, 2016). Selon, Bernier *et al.* (1993), Bonhomme *et al.*, (2010) et Henry *et al.* (2011), **la concentration en glucides dans la sève et le transport du saccharose seraient des facteurs endogènes participant à la transformation du méristème végétatif en méristème floral.** Dès 1977, il a été montré que l'induction florale se traduisait par une modification des relations sources/puits, permettant une meilleure alimentation du méristème apical en glucides (Sachs et Hackett, 1977). Cet apport en glucides serait notamment facilité par des variations de l'activité invertase acide au niveau de l'apex (Pryke et Bernier, 1978), comme cela a pu également être montré dans le bourgeon au moment de la levée de dormance par Koussa *et al.* (2005). Malheureusement cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée dans nos travaux car les mesures d'activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme des glucides n'ont pas été réalisées.

Néanmoins, il est possible de relier l'évolution des teneurs en saccharose et en glucides solubles dans nos travaux. En effet, en début de période, lorsque les teneurs en glucides solubles augmentent, les teneurs en saccharose restent faibles laissant peut-être présager une forte activité des invertases. Selon Corbesier *et al.* (1998), la transition du méristème végétatif en méristème floral serait relative à l'augmentation des teneurs en saccharose. Chez de nombreuses espèces, ce sucre serait un signal fort contrôlant ces mécanismes. Par exemple, il existerait chez *Fuchsia hydryda*, une forte corrélation entre la floraison et le contenu en saccharose des apex (King et Ben-Tal, 2001) ; chez la tomate, le saccharose induirait la transition florale d'apex de plantes végétatives jusqu'à une concentration maximale de 30 g.L⁻¹, puis l'inhiberait pour des teneurs plus élevées (Dielen *et al.*, 2001). Plus récemment, dans les bourgeons de

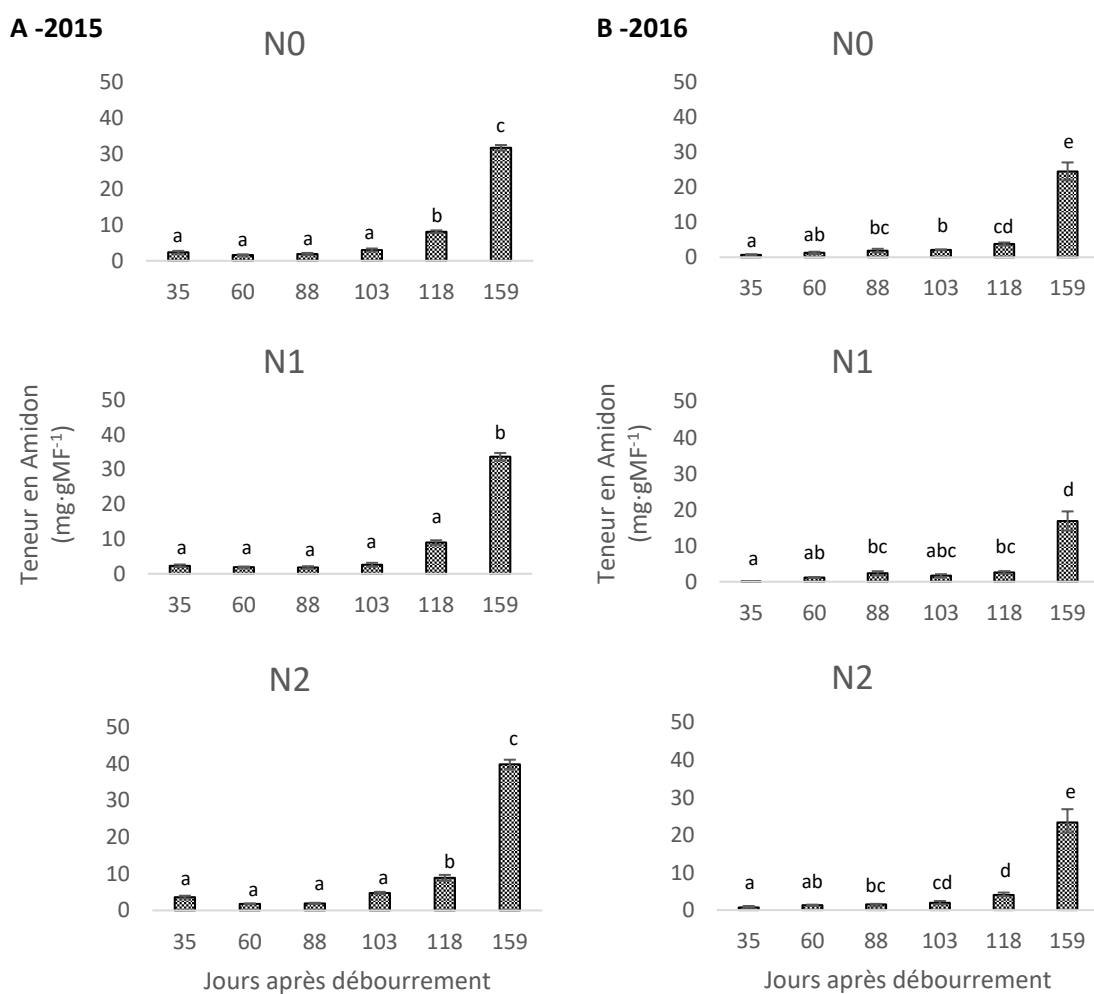


Figure 61 : Evolution de la teneur en amidon au cours du développement des bourgeons latents de vigne de type N0, N1 et N2, pendant la première année du cycle reproducteur en (A) 2015 et (B) 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; a, b, c, d, e pour chaque histogramme indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis.

rosier, Rabot *et al.* (2012), Barbier *et al.* (2015) ainsi que Roman *et al.* (2016) ont démontré le rôle de molécule signal attribué au saccharose, dans les mécanismes de production des primordia et les différents types de réponse possibles en fonction des concentrations détectées dans le bourgeon ou appliquées. **Ces données pourraient expliquer les variations des teneurs en saccharose observées dans nos échantillons, avec de faibles teneurs en début de saison et une augmentation en fin de période au moment où les mécanismes d'embryogenèse diminuent.** En effet, chez la vigne, Lebon *et al.*, (2004) et Zapata *et al.* (2004) ont démontré que la période de diminution de la teneur en saccharose était accompagnée d'une augmentation ou d'une stabilisation des sucres assimilables (D-glucose et D-fructose) coïncidant avec la période de transition physiologique de toute la plante et traduisant un changement des relations organes sources-puits, qui correspondrait exactement au début du stade d'ontogenèse des primordia inflorescenciels identifiée dans notre étude. **Ainsi, le saccharose pourrait jouer un rôle de signal « positif » au moment du passage de la phase d'organogenèse à l'ontogenèse lorsque les teneurs sont « faibles », puis un rôle de signal « négatif » au moment de l'entrée en dormance lorsque les teneurs ré augmentent.**

Enfin, nos travaux, comme ceux de Koussa *et al.* (1998), mettent en évidence **une forte accumulation d'amidon au moment de l'entrée en dormance ce qui limite ainsi la disponibilité de sucres solubles.** Cette augmentation des teneurs est corrélée aux variations d'acide abscissique. Le rôle de cette hormone dans le blocage de l'activité α -amylase a bien été démontré (Koussa *et al.*, 1998) et expliquerait cette augmentation ; par contre le rôle de l'amidon en tant que molécule signal dans ces mécanismes n'a pas encore été identifié. En revanche, l'importance de l'amidon et de son hydrolyse a bien été mis en évidence lors du débourrement et de la floraison (Lebon *et al.* 2005 ; Rubio *et al.*, 2016). D'après Duchêne *et al.* (2003b) une meilleure mise en réserve en automne entraînerait directement une précocité de débourrement et de floraison ainsi qu'un plus grand nombre de fleurs par inflorescence. Vaillant-Gaveau *et al.* (2014) ont également rapporté que l'accumulation et la mise en réserve des sucres pourraient impacter le nombre d'inflorescence par pied de l'année suivante. Juste après le débourrement (au stade 35JAD), le développement des primordia foliaires et du premier primordia inflorescentiel nécessite une mobilisation importante des sucres solubles mais en raison du faible nombre de feuilles étalées et de l'état hétérotrophe de la plante à ce stade là (Lebon *et al.*, 2005), ces sucres ne peuvent provenir que de l'hydrolyse de l'amidon, mis en réserve l'année précédente (Koussa *et al.*, 1998 ; Zapata *et al.*, 2004 ; Mohamed *et al.*, 2012 ; Rubio *et al.*, 2014). **A l'image de l'inflorescence, un niveau minimum d'amidon dans le bourgeon en fin de cycle pourrait donc être nécessaire au début de l'organogenèse**

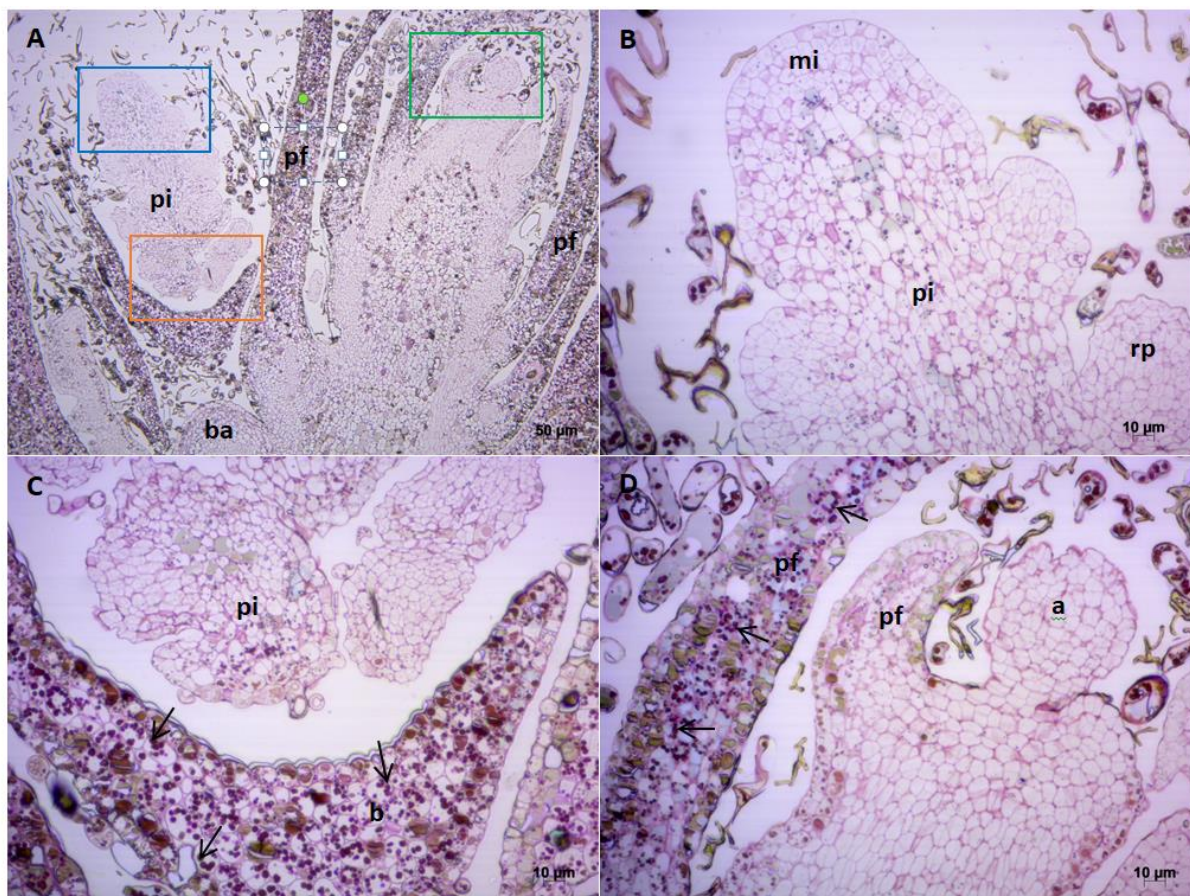


Figure 62 : Localisation de l'amidon (A) dans les bourgeons latents de vigne à 159JAD ; (B) zone représentant le cadre bleu au niveau des primordia inflorescentiels ; (C) zone représentant le cadre orange dans les bractées ; (D) zone représentant le cadre vert au niveau de l'apex et des primordia foliaires.

a : apex ; **mi** : méristème inflorescentiel ; **pi** : primordium inflorescentiel ; **pf** : primordium foliaire ; **ba** : bourgeon axillaire ; **rp** : ramification primaire ; **b** : bractée ; **flèche** : grains d'amidon

et à l'accumulation des glucides solubles. Dans notre étude, les différences de teneurs en sucres solubles entre les années semblent montrer que ce phénomène d'hydrolyse varie selon les années et peut impacter directement le début des activités cellulaires du bourgeon. De ce fait, on peut supposer que **la disponibilité des sucres solubles est un facteur de réussite au développement des bourgeons et à la construction du rendement**, comme cela a déjà été démontré de nombreuses fois chez différents arbres fruitiers (Scholefield *et al.*, 1985 ; Garcia-Luis *et al.*, 1988 ; Breen, 2016 ; Gonçalves *et al.*, 2016).

Ainsi, nos travaux permettent pour la première fois d'envisager l'importance du métabolisme glucidique dans les mécanismes d'ontogenèse et d'organogenèse du bourgeon latent au cours de la première année de développement en lien avec la construction du rendement. **La première phase de formation des primordia foliaires et des deux premiers primordia inflorescentiels semble être fortement reliée à la disponibilité en sucres solubles.** A partir de 88JAD, les teneurs en D-glucose et D-fructose en 2016 sont plus importantes qu'en 2015, traduisant peut-être des équilibres organes sources-organes puits différents entre les deux années. **Puis la phase d'organogenèse pourrait être contrôlée par le niveau de saccharose qui pourrait prolonger de manière plus ou moins importante la ramification des PI.** Les essais d'effeuillage total confortent cette hypothèse puisqu'en cas de défoliation totale, le nombre d'inflorescence est largement diminué (Candolfi-Vasconcelos et Koblet 1990, Lebon *et al.*, 2004). **En fin de période, le ralentissement des activités cellulaires ainsi que la modification des équilibres hormonaux induiraient une augmentation des teneurs en saccharose provoquant alors l'entrée en dormance et l'accumulation d'amidon.** A partir du 118JAD, les sucres sont d'avantage transportés vers les fruits, mais aussi dans les organes de réserves. L'accumulation du saccharose et de l'amidon observée dans notre étude témoigne parfaitement de ce phénomène déjà décrit par Koussa *et al.* (1998) dans les bourgeons de Merlot à Bordeaux. Nos résultats ne permettent pas de relier la quantité d'amidon accumulé à ce stade et la fertilité potentielle réelle des bourgeons latents formés si l'on considère le nombre de futures grappes. Par contre, **la phase d'organogenèse débutant très précocement (au stade 35JAD), l'année suivante serait très fortement modulée par la disponibilité des sucres assimilables en fin d'hiver, c'est-à-dire par la réserve d'amidon produite l'année précédente.** Ainsi, **la quantité de saccharose et d'amidon accumulés en fin d'année 1 aurait plutôt une influence sur la phase d'organogenèse des PI aux stades précoces de l'année suivante.** Cette hypothèse corrobore les travaux de Duchêne *et al.* (2003a) et de Vaillant-Gaveau *et al.* (2014) qui ont établi un lien entre mise en réserve hivernale et

développement des organes reproducteurs de l'année suivante chez la vigne. Cette hypothèse est également confortée par nos mesures, puisque la comparaison des teneurs en saccharose et en amidon au stade 159JAD entre 2015 et 2016 montre que les années de plus faible accumulation d'amidon dans les bourgeons se traduisent toujours en année N+1 par des grappes en moyenne de plus faible volume.

IV. Discussion générale et conclusion

Dans le premier chapitre, nous avons pu identifier et caractériser deux processus de formation des primordia inflorescentiels lors de la première année de développement du bourgeon :

- une phase d'organogenèse entre 35JAD et 88JAD, permettant l'initiation des deux premiers primordia inflorescentiel et la ramification du premier PI,
- une phase d'ontogenèse de 88JAD jusqu'à 118JAD au cours de laquelle les PI formées se ramifient

Au-delà de ces deux phases, une période pendant laquelle il est possible d'observer à la fois des processus d'organogenèse et d'ontogenèse et qui est située entre 60JAD et 88JAD, a été caractérisée comme période remarquable et potentiellement critique dans la construction du rendement.

L'objectif de ce chapitre était dans un premier temps d'étudier l'évolution de certains gènes, marqueurs biochimiques et hormonaux au cours de la première année du développement du bourgeon de manière indépendante afin de mieux comprendre leurs rôles, puis dans un second temps de les relier entre eux pour émettre des hypothèses de schéma de régulation.

En ce qui concerne l'approche moléculaire, nos travaux montrent pour la première fois l'implication différentielle de gènes spécifiquement liés au processus du contrôle méristématique au cours de l'organogenèse (*VvCLE25-1*, *VvCLE-TDIF* et *VvMFT*) et de gènes spécifiquement impliqués dans la transition florale au moment de la période d'ontogenèse (*VvTFL1a*, *VvMADS8* et *VvMFT*).

VvCLE25-1, *VvCLE-TDIF* et *VvMFT1* semblent jouer des rôles prépondérants dans les processus précoces de contrôle méristématique au cours de la phase d'organogenèse. *VvCLE25-1* est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire et de la taille du MAC en réprimant la prolifération cellulaire lorsqu'il est exprimé (Clark *et al.*, 1995 ; Autran et Traas, 2001 ; Heidstra et Sabbatini, 2014 ; Yang et Jiao, 2016), alors que *VvCLE-TDIF* est censé inhiber la différenciation des cellules procambiales dans les bourgeons (Clark *et al.*, 1997 ; Fletcher *et al.*, 1999 ; Ogawa *et al.*, 2008 ; Hirakawa *et al.*, 2010 ; Yaginuma *et al.*, 2011). *VvL1L* aurait un rôle similaire à celui du gène *LEC1* dans l'embryogenèse en favorisant l'induction juste avant l'apparition des embryons somatiques (Schellenbaum *et al.*, 2008). De ce fait, la

surexpression de *VvL1L*, *VvCLE-TDIF* et la sous expression de *VvCLE25-1* pendant la phase d'organogenèse dans les bourgeons pourraient favoriser la prolifération cellulaire du MAC et l'initiation des PI. Leur profil d'expression s'inverse à partir de 88JAD, au début de la phase d'ontogenèse permettant alors de « libérer » les mécanismes de différenciation et de ramification des PI qui contrôlèrent la taille des PI différenciés.

En complément, des gènes, normalement décrits comme participants à la transition florale (*VvTFL1a*), semblent pouvoir également intervenir dans la phase d'organogenèse. En effet, *VvTFL1a*, comme son homologue *TFL*, est connu pour son rôle dans l'induction des mécanismes de division et de prolifération cellulaires ainsi que dans le maintien des méristèmes indifférenciés, réprimant ainsi la floraison (Shannon et Meeks-Wagner, 1991 ; Joly *et al.*, 2004 ; Boss *et al.*, 2006 ; Danilevskaya et Meng, 2010 ; Iwata *et al.*, 2014). *VvMADS8*, quant à lui, même s'il est moins bien connu, pourrait jouer un rôle dans le développement précoce des inflorescences (Sreekantan et Thomas, 2006 ; Almada *et al.*, 2009 ; Diaz-Riquelman *et al.*, 2012). Enfin, *VvMFT1*, gène peu documenté, semble être un inducteur de la floraison et pourrait jouer un rôle positif dans la transition des méristèmes floraux (Yoo *et al.*, 2004 ; Hedman *et al.*, 2009). De ce fait, la surexpression de *VvTFL1a* et de *VvMADS8*, accompagnée de la très faible expression de *VvMFT1* pendant la phase d'organogenèse pourraient en partie favoriser les activités cellulaires dans les anlagen néoformés et augmenter leur taille. A partir de la phase d'ontogenèse, *VvTFL1a* et *VvMADS8* voient leur niveau d'expression fortement chuter, alors que *VvMFT1* est surexprimé permettant une meilleure coordination dans la différenciation et la ramification des PI initiés.

Les interactions possibles entre gènes sont complexes et nos résultats ne nous permettent que d'envisager partiellement certaines relations. En effet, pour comprendre le mode de fonctionnement entre les différents gènes, nous aurions dû envisager l'étude moléculaire de manière plus complète en intégrant les gènes du contrôle méristématique telle que *WUS*, *CLV1*, *SAM* et *BRC* pour avoir un aspect complet de régulation du MAC durant l'organogenèse, ainsi que de la floraison avec *FD*, *FT*, *AP1* et *LFY* dans le but de mieux comprendre la phase d'ontogenèse et les transitions méristématiques inflorescentiels et floraux.

Pour la première fois, une étude portant sur la formation des bourgeons a pu mettre en évidence les rôles clés de 3 gènes (VvTFL1a, VvCLE25-1 et VvMFT1) dans les mécanismes de formation des PI chez la vigne. Ces premiers résultats permettent

d'envisager l'utilisation de ces gènes comme marqueurs potentiels des processus de formation des primordia inflorescentiels.

En complément de l'approche moléculaire, nous avons démontré que les mécanismes d'initiation, de différenciation et de ramification des PI semblent également contrôlés par l'équilibre hormonal et la disponibilité en glucides.

Dans ce travail, les rôles classiquement attribués par la bibliographie aux trois hormones étudiées (AIA, CKs et ABA) sont retrouvés. Outre son rôle dans l'embryogenèse et le mécanisme d'expansion cellulaire (Iwahori, 1967 ; Gea *et al.*, 1994), l'AIA pourrait participer aussi à la néoformation des bourgeons (Champagnat, 1965, Bessis, 1965 ; Perrone et Felicini, 1974 ; Cline, 1991). En complément, les CKs qui sont connues pour leur propriété activatrice de la division et différenciation cellulaire (Heller *et al.*, 2000 ; Raven *et al.*, 2007), pourraient aussi agir avec l'AIA (Moubayidin *et al.*, 2009). Ainsi, l'inversion de l'équilibre CKs/AIA entre le début et la fin de la phase d'organogenèse semble en adéquation avec les rôles attribués à chaque famille. Le faible ratio CKs/AIA à 35JAD met en évidence le rôle de l'AIA dans l'activation de la division cellulaire et l'organogenèse, alors que le ratio très important de CKs/AIA à 60JAD conforte le rôle de CKs actives dans la prolifération et la différenciation cellulaire permettant le début de la ramification des PI préalablement initiés (Moubayidin *et al.*, 2009 ; Roman *et al.*, 2016). L'impact de cet équilibre CKs/AIA pourrait être modulé par les teneurs en ABA. En effet, si l'ABA est bien connu pour son implication dans la résistance au stress, la maturation des fruits ainsi que l'induction et le maintien de la dormance (Le Page-Degivry et Gaussen, 1970 ; Durand *et al.*, 1975 ; Le Page-Degivry et Bulard, 1979 ; Raven *et al.*, 2007 ; Vishwakarma *et al.*, 2017), son rôle dans l'initiation et la différenciation des PI est peu établi, alors que des études récentes ont rapporté que l'ABA pouvait intervenir positivement dans la morphogenèse (Sharp *et al.*, 2000 ; Barrero *et al.*, 2005 ; Humplik *et al.*, 2015). Nos résultats montrent une accumulation progressive d'ABA durant la phase d'organogenèse laissant penser qu'il pourrait agir positivement dans les mécanismes liés à la morphogenèse comme c'est le cas chez la tomate (Sharp *et al.*, 2000) et favoriser l'installation des PI en début d'organogenèse. Cette nouvelle hypothèse, confortée par les mesures de poids de bourgeon, complète les observations de Koussa *et al.*, (2004) quant à l'accumulation de l'ABA au moment de la floraison et son rôle positif dans certains mécanismes de morphogenèse. En fin de période, l'évolution des teneurs en ABA confirme plus classiquement son rôle dans l'entrée en dormance et l'arrêt des processus d'activité cellulaire. Nos travaux montrent donc que l'équilibre hormonal est essentiel au contrôle de ces processus, d'autant plus qu'il semble possible de relier l'évolution des teneurs en ABA avec le niveau d'expression de *VvMFT1*, ou des CKs avec *VvTFL1a*. Pour être complet, nos travaux auraient mérité d'être étayés par des dosages

d'ABA-GE et de gibbérellines, dont on connaît respectivement l'importance dans les mécanismes d'entrée en dormance (Koussa *et al.*, 1994) pour l'ABA et l'inhibition de l'initiation et la différenciation des primordia inflorescentiels pour les gibbérellines (Boss et Thomas, 2002).

Ainsi nous avons pu démontrer pour la première fois, l'importance de l'équilibre hormonal AIA/CKs/ABA dans les mécanismes de formation des PI.

L'AIA et l'ABA (dans une certaine mesure) seraient impliquées positivement dans la phase d'organogenèse alors que les CKs actives favoriseraient l'ontogenèse. Ces régulateurs pourraient soit agir directement sur le niveau d'expression des gènes liés aux mécanismes d'initiation et de différenciation, soit indirectement via le métabolisme des sucres.

Outre les aspects moléculaires et hormonaux, l'activité cellulaire est fortement modulée par la disponibilité en sucres. Le suivi des profils d'évolution des différents glucides nous permet d'envisager un rôle majeur de ces molécules dans l'organisation des phases d'organogenèse et d'ontogenèse du bourgeon. En fonction du ratio (Glucose+Fructose) / Saccharose, les sucres pourraient agir à la fois comme source carbonée assurant la dépense énergétique (Clément *et al.*, 1994, 1996 ; Zapata *et al.*, 2004 ; Lebon *et al.*, 2006) mais aussi en tant que molécules signal intervenant dans les différentes voies de régulation d'organogenèse et d'ontogenèse (Bernier *et al.*, 1993 ; Bonhomme *et al.*, 2010 ; Henry *et al.*, 2011 ; Mouradov *et al.*, 2012 ; Barbier *et al.*, 2015 ; Roman *et al.*, 2016). Ainsi, l'accumulation massive et la disponibilité en sucres solubles en début de cycle (jusqu'au stade 88JAD) permettraient d'initialiser précocement cette phase et favoriseraient les multiplications et divisions cellulaires. A partir de 88JAD, la concentration en glucide dans la sève et le transport du saccharose seraient des facteurs endogènes participant à la transformation du méristème végétatif en méristème floral (King et Ben-Tal, 2001 ; Dielen *et al.*, 2001 ; Rabot *et al.*, 2012 ; Barbier *et al.*, 2015 ; Roman *et al.*, 2016) favorisant ainsi dans notre cas, le passage définitif dans la phase d'organogenèse. Ensuite, l'accumulation du saccharose pourrait marquer la fin de période d'ontogenèse induisant l'accumulation de l'amidon, qui doit être suffisante pour favoriser le début de l'organogenèse l'année suivante.

Ces données semblent essentielles dans notre travail car elles permettent pour la première fois d'identifier dans le bourgeon de vigne des marqueurs glucidiques en lien avec les premières phases de développement des bourgeons latents. La première phase de formation des primordia semble être fortement reliée à la disponibilité en sucres solubles, puis la phase d'organogenèse pourrait être contrôlée en partie par le niveau de saccharose

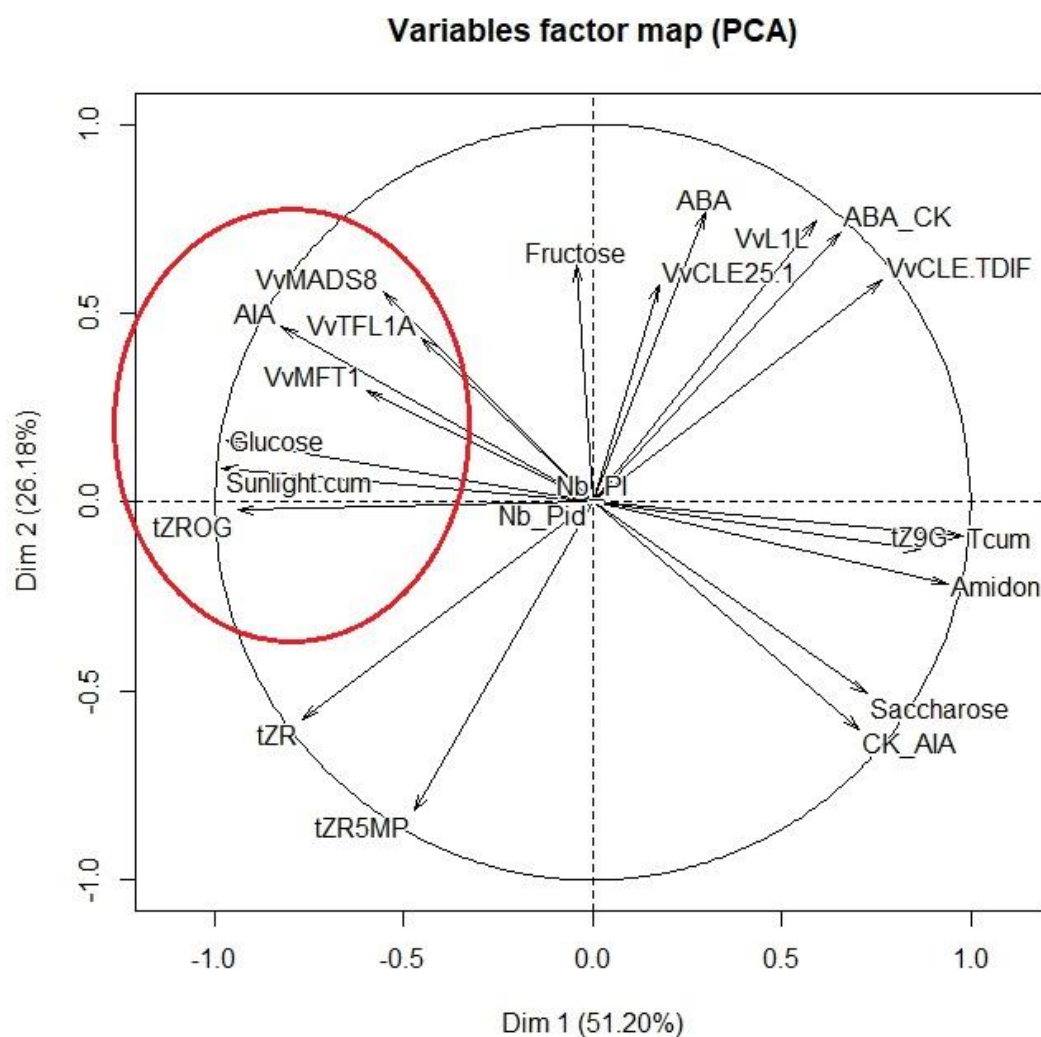


Figure 63 : Représentation ACP des différentes variables suivies à 35JAD durant la première année de développement des bourgeons en 2015 et 2016.

Tcum : température moyenne journalière cumulée à 35JAD ; **Sunlight.cum** : ensoleillement journalier cumulé à 35JAD ; **Nb_PI** : nombre de PI ; **Nb_Pid** : nombre de PI différenciés ; **ABA_CK** : ratio ABA/CKs actives ; **CK_AIA** : ratio CKs actives/AIA

qui pourrait de manière plus ou moins importante prolonger la phase de ramification des PI. En fin de période, l'accumulation d'amidon marque l'arrêt des activités cellulaires et semblerait moduler de manière significative la disponibilité des sucres assimilables nécessaires à l'année suivante.

L'évolution des teneurs de ces différents sucres a pu être reliée au poids des bourgeons et à la taille des inflorescences.

A l'image des gènes, le dosage des teneurs en différents sucres comme marqueurs potentiels de la qualité des processus de formation des primordia inflorescentiels semble pouvoir être envisageable.

Notre étude a donc caractérisé différents indicateurs pour les phases d'organogenèse, d'ontogenèse et d'induction de l'entrée en dormance des bourgeons, en lien avec la fertilité potentielle et apparente des bourgeons latents de vigne. Ces trois phases clés sont également fortement influencées par les conditions climatiques et nous avons démontré que le changement climatique observé dans la région bordelaise depuis près de deux décennies (Jones et Davis, 2000 ; Van Leeuwen *et al.*, 2004 ; Jones *et al.*, 2005) avait également modifié la temporalité des phases de formation du bourgeon par rapport à ce qui avait été démontré dans les années 1970.

Au regard des résultats obtenus, des corrélations entre les indicateurs étudiés et les conditions climatiques semblent pouvoir exister (Annexe 1). Pour cela, une analyse en composante principale (ACP) a été menée aux 3 stades clés (35JAD, 88JAD et 159JAD) afin de mettre en évidence (i) les indicateurs les plus pertinents pouvant expliquer les mécanismes principaux de l'étape considérée et (ii) les effets des facteurs climatiques (Figures 63, 64 et 65). Quels que soient les stades étudiés, l'axe principal peut expliquer plus de 40% de nos variables, et les deux axes expliquent plus de 68% de l'ensemble des variables, ce qui est suffisant pour justifier leur choix. La comparaison des trois ACP montre des différences de groupes de variables en lien avec l'évolution morphologique du bourgeon pouvant nous permettre, suite à ces analyses, d'identifier un ensemble de marqueurs pertinents des différentes phases du début du développement du bourgeon.

A 35JAD (Figure 63), l'axe principal qui explique plus de 51% des variables traduit la temporalité des mécanismes de mise en place des processus d'initiation et de ramification des PI. Les variables sont positionnées le long de cet axe en fonction de leur implication dans les mécanismes induits. Un premier groupe de variables (entouré en cercle rouge) composé de *VvTFL1a*, *VvMFT1*, *VvMADS8*, teneurs en AIA, D-glucose, tZROG et intensité lumineuse

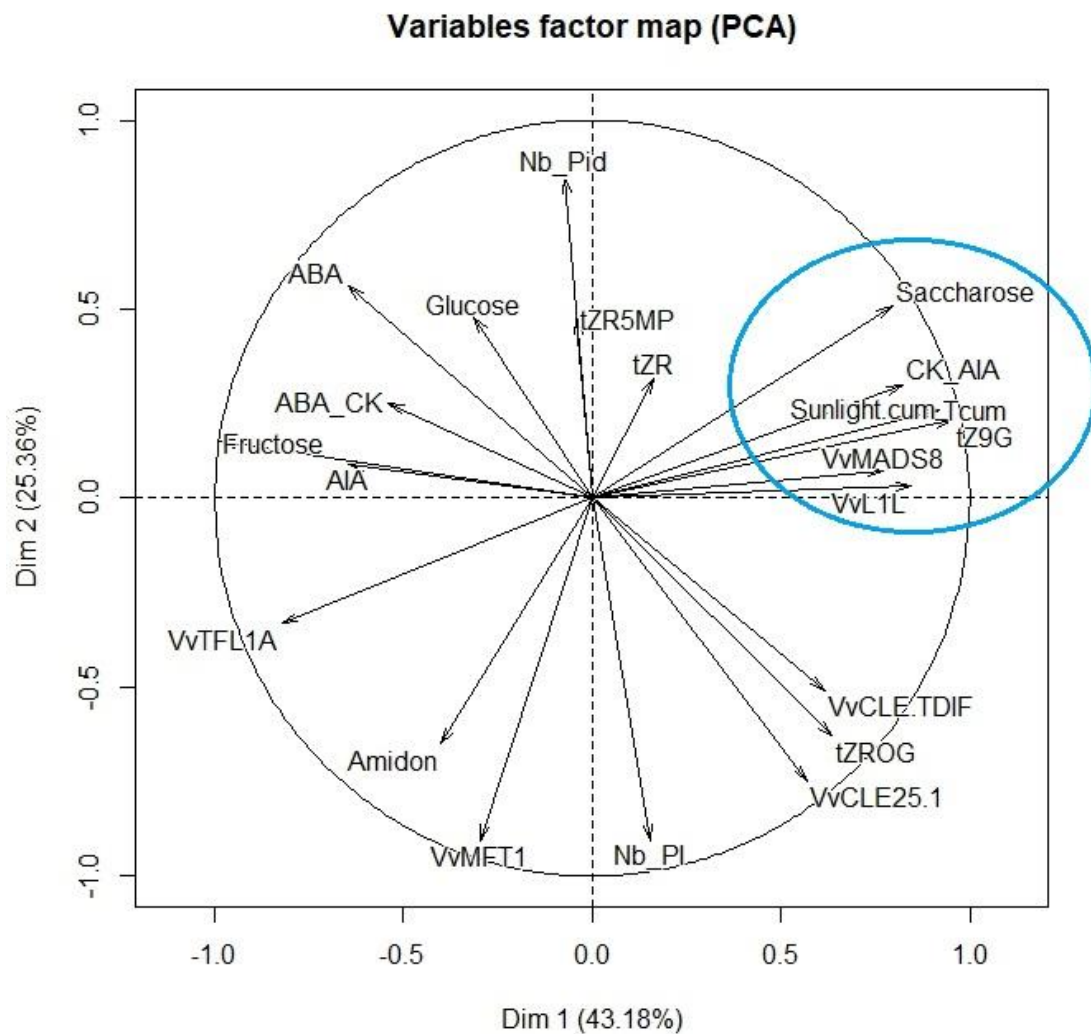


Figure 64 : Représentation ACP des différentes variables suivies à 88JAD durant la première année de développement des bourgeons en 2015 et 2016.

Tcum : température moyenne journalière cumulée à 88JAD ; **Sunlight.cum** : ensoleillement journalier cumulé à 88JAD ; **Nb_PI** : nombre de PI ; **Nb_Pid** : nombre de PI différenciés ; **ABA_CK** : ratio ABA/CKs actives ; **CK_AIA** : ratio CKs actives/AIA

peut être identifié pour leur implication précoce dans la phase d'organogenèse des bourgeons. Durant cette phase, les vecteurs représentant *VvTFL1a* et *VvMFT1* semblent fonctionner ensemble, confirmant les rôles que nous leur avons attribués dans l'initiation des anlagen en fonction de leur niveau d'expression (surexpression de *VvTFL1a* et sous expression de *VvMFT1*). Les vecteurs représentatifs des teneurs en AIA, tZROG, et D-glucose, sont également orientés de manière similaire, nous laissant penser qu'il existe une bonne corrélation avec les gènes cités ci-dessus et les mécanismes cellulaires de la phase précoce d'organogenèse. L'analyse ACP montre également que le vecteur « ensoleillement cumulé » est regroupé avec les précédents, et donc qu'il est impliqué comme facteur environnemental dans le contrôle des processus d'initiation des PI. Cette hypothèse confirme celle d'Izawa *et al.*, 2002 qui ont démontré chez le riz que les orthologues de la famille des gènes *FT/TFL* étaient impliqués dans le contrôle de la floraison et répondaient au signal lumineux. La même constatation a été rapportée pour le *Petunia* récemment (Tsukamoto *et al.*, 2016). A l'opposé de ce groupe et de manière antagoniste, il est possible d'identifier un second groupe de variables composé des teneurs en tZ9G, en amidon et en saccharose ainsi que du facteur température cumulée. Ainsi, parmi ces deux groupes, il est possible de distinguer des marqueurs potentiels de la phase d'organogenèse tels que les teneurs en D-Glucose, le cumul des T°C, ou les teneurs en AIA et tZROG, et à terme de pouvoir envisager de les intégrer dans un modèle prédictif de la qualité et de la précocité de la première étape de la formation des primordia inflorescentiel.

Entre 60 et 88JAD, la répartition des groupes change avec un « éclatement » de la disposition des variables sur l'ensemble des axes identifiés (Figure 64). Ce stade correspond, dans le bourgeon, à la période précédemment identifiée comme remarquable et critique traduisant le passage de la phase d'organogenèse à la phase d'ontogenèse et donc la transition des méristèmes inflorescentiels en méristèmes floraux (Battey et Tooke, 2002 ; Barbier *et al.*, 2015). Au niveau nutritionnel, cette période marque également la fin de la période d'hétérotrophie pour les assimilats carbonés et une demande accrue en assimilats des fleurs et jeunes baies ce qui modifie les équilibres sources/puits au sein de la plante entière (Clément *et al.*, 1994 ; Clément *et al.*, 1996 ; Zapata *et al.*, 2004 ; Lebon *et al.*, 2006). Le niveau des transcrits des gènes qui seraient impliqués positivement dans l'initiation des PI durant la phase d'organogenèse, comme *VvTFL1a*, *VvMADS8* et encore *VvL1L* diminue globalement à partir de ce stade, alors *VvCLE25-1* et *VvMFT1*, identifiés dans notre étude comme gènes favorisant la différenciation et la ramification des PI, commencent à être surexprimés. A cette période, les conditions climatiques peuvent énormément varier d'une année à l'autre, rendant ce stade critique pour de nombreux auteurs (Mullins *et al.*, 1992 ; Watt *et al.*, 2008 ; Guilpart *et al.*,

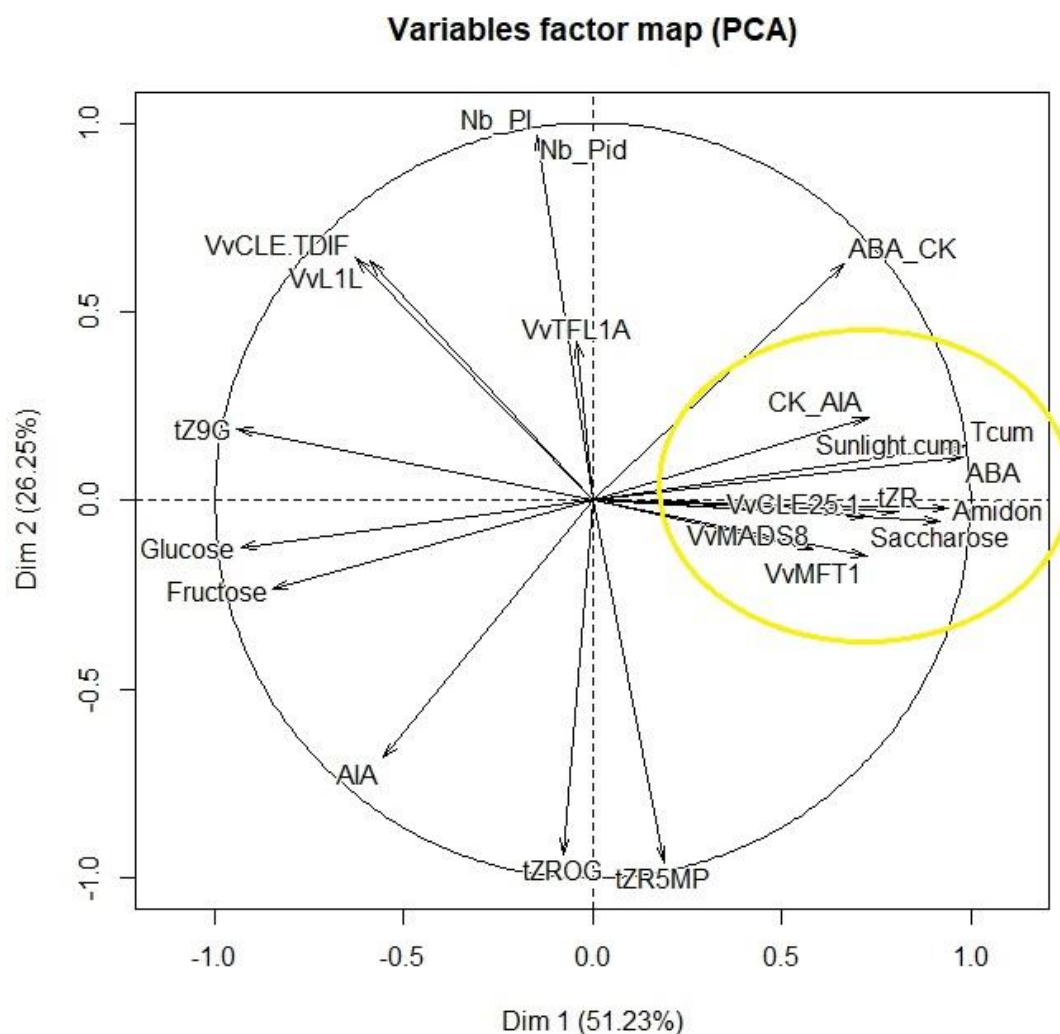


Figure 65 : Représentation ACP des différentes variables suivies à 159JAD durant la première année de développement des bourgeons en 2015 et 2016.

Tcum : température moyenne journalière cumulée à 159JAD ; **Sunlight.cum** : ensoleillement journalier cumulé à 159JAD ; **Nb_PI** : nombre de PI ; **Nb_Pid** : nombre de PI différenciés ; **ABA_CK** : ratio ABA/CKs actives ; **CK_AIA** : ratio CKs actives/AIA

2014). Ainsi, la multitude de ces changements, aussi bien au niveau du bourgeon que de la plante entière, serait régulée de façon très complexe par de nombreux facteurs exogènes et endogènes difficiles à caractériser individuellement. L'analyse ACP traduit parfaitement ce phénomène avec une organisation des vecteurs de manière radiale et sur l'ensemble des plans de la représentation ne permettant pas de regrouper les variables en groupe spécifique. Néanmoins, un groupe de variables regroupant les teneurs en saccharose, l'équilibre CKs/AIA et les gènes *VvL1L* et *VvMADS8* semblent fonctionner de manière conjointe (entouré en bleu) et pourraient caractériser le début de la phase d'ontogenèse. En effet, comme discuté précédemment, à partir de 88JAD, la modification de l'équilibre CKs/AIA au profit des CKs (et notamment de tZ9G) ainsi que la chute des teneurs en saccharose pourraient agir comme signaux positifs vis-à-vis de la diminution d'expression de *VvMADS8* et *VvL1L* (qui seraient des gènes régulateurs positifs de la phase d'organogenèse) ce qui pourrait favoriser la différenciation des PI. En raison de la position des vecteurs « lumière cumulée » et « température journalière cumulée », il semblerait également que ces différents paramètres pourraient être fortement dépendants des conditions climatiques, comme déjà envisagé par Guilpart *et al.* (2014), ce qui mériterait une étude spécifique.

Nous avons démontré dans le premier chapitre que la précocité de l'initiation des PI à 35JAD, la capacité de ramification des PI durant la phase d'ontogenèse à partir de 88JAD et la qualité de mise en réserve au moment de l'entrée en dormance semblaient des facteurs essentiels à la production d'inflorescences de grande taille en année N+1. Ainsi, les mécanismes cellulaires impliqués tardivement pendant la phase d'ontogenèse et d'entrée en dormance seraient également essentiels dans les mécanismes de construction du rendement. L'analyse ACP (Figure 13C) réalisée au dernier stade de prélèvement (159JAD) traduit l'état final du bourgeon au moment de la dormance. Comme pour le premier stade, un groupe de variables remarquables (entouré en jaune) peut être identifié. A ce stade, de nombreux indicateurs (teneurs élevées en amidon et saccharose, chute de l'ABA libre au bénéfice de l'ABA-GE, surexpression de *VvMFT1*, *VvMADS8* et *VvCLE25-1*) semblent fonctionner ensemble et pouvoir expliquer une meilleure capacité de ramification des PI, permettant ainsi une amélioration de la fertilité potentielle apparente des bourgeons latents au moment de l'entrée en dormance. L'accumulation du saccharose et de l'amidon semble être bien corrélée avec les teneurs en ABA, ce qui confirme notre hypothèse et corrobore la proposition de Koussa *et al.* (1998) sur l'interaction entre l'ABA et la mise en réserve hivernale dans les bourgeons. Cette accumulation serait d'une part le signe d'un bon fonctionnement du métabolisme carboné pendant la saison 1 facilitant les mécanismes de ramification et, d'autre part permettrait par la suite, après son hydrolyse, une meilleure reprise de croissance du bourgeon au moment du

débourrement. *VvMFT1* et *VvCLE25-1* qui sont surexprimés à ce stade font également partie de ce groupe confirmant le fait qu'ils favoriseraient la formation des ramifications (Yoo *et al.*, 2004 ; Hedman *et al.*, 2009 ; Sreekantan et Thomas, 2006 ; Almada *et al.*, 2009 ; Diaz-Riquelman *et al.*, 2012) et pourraient être régulés par l'ABA et/ou l'équilibre CKs/AIA (Mohamed *et al.*, 2010 ; Xi *et al.*, 2010 ; Tao *et al.*, 2014 ; Bi *et al.*, 2016). L'ensemble de ces variables sont également corrélées aux indicateurs climatiques : température et luminosité.

Cette approche par ACP a eu pour avantage de mettre en évidence des groupes de variables qui semblent fonctionner ensemble et de manière différentielle selon le stade de développement du bourgeon considéré.

Cette approche nous a également permis de valider l'hypothèse émise au chapitre précédent portant sur une phase remarquable et critique pour la construction des PI située au moment du basculement de la période d'organogenèse et d'ontogenèse. A ce stade, la disposition des indicateurs au niveau de la représentation ACP ne permet que difficilement d'identifier des groupes, démontrant ainsi la complexité des modes de régulation pouvant être impliqués.

Dans ce second chapitre, nous avons pu identifier des facteurs moléculaires, biochimiques et hormonaux participant au contrôle de formation des PI dans le bourgeon de vigne au cours de la première année de son développement.

L'évolution de ces facteurs, relativement bien conservée entre les trois types de bourgeons, confirme les étapes clés identifiées à partir des observations anatomiques et morphologiques au chapitre 3. La phase d'organogenèse serait fortement dépendante des teneurs en glucides solubles, de l'équilibre AIA/CKs/ABA, de la surexpression de *VvTFL1a* et de la sous-expression de *VvMFT1* et *VvCLE25-1*. Le passage à la phase d'ontogenèse serait le résultat d'un signal positif du saccharose et du basculement de l'équilibre AIA/CKs au profit des cytokinines. Ces signaux pourraient moduler les niveaux d'expression des gènes précités et la répression de *VvTFL1a* permettrait la surexpression de *VvMFT1* et *VvCLE25-1* favorisant la transformation du méristème végétatif en méristème inflorescentiel et ainsi la formation des ramifications à partir des anlagen formés. Cette phase d'ontogenèse serait ensuite en partie régulée par le niveau d'expression de *VvMFT1*, les teneurs en ABA, saccharose et amidon, qui pourraient pour ce dernier être ensuite essentiel au débourrement.

Nos résultats confirment aussi les rôles déjà attribués aux régulateurs hormonaux dans le développement du bourgeon. Néanmoins, pour la première fois nous envisageons un rôle positif de l'ABA dans les mécanismes de morphogenèse et envisageons pour la vigne que *VvMFT1* serait bien régulé par l'ABA.

Enfin, l'ensemble de ces marqueurs biologiques semblent impactés par les conditions climatiques (somme des températures et luminosité) qui pourraient, après étude complémentaire, être utilisés comme indicateur dans un modèle d'évaluation de la qualité des processus de formation des PI.

L'ensemble de ces données posent maintenant la question des modes de régulation de ces mécanismes par les régulateurs hormonaux, le facteur lumière et les équilibres sources/puits pouvant être modulés par des pratiques culturales comme l'effeuillage.

Le chapitre suivant se propose donc, par la réalisation de divers essais de modulation des teneurs en ABA, de mise à l'obscurité ou de suppression d'une partie du feuillage, d'apporter quelques éléments pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'initiation, de la différenciation et de la ramification des PI dans les bourgeons latents en lien avec le rendement final.

CHAPITRE 5

Etude des effets de la modulation des teneurs en ABA, de la mise à l'obscurité et de l'effeuillage sur les mécanismes d'initiation, différenciation et ramification des primordia inflorescentiels des bourgeons latents de vigne

Les chapitres précédents nous ont permis d'identifier trois phases importantes dans les processus de formation des primordia inflorescentiels : une phase critique très précoce d'organogenèse concomitante au début de croissance active des organes végétatifs, une phase remarquable d'ontogenèse au cours de laquelle la surface foliaire est suffisante pour permettre d'atteindre l'équilibre sources/puits optimum, puis une phase tardive d'entrée en dormance correspondant au début de l'aoûtement.

La phase d'organogenèse entre 35 et 88JAD serait à l'origine du nombre de PI formés alors que la période d'ontogenèse entre 88JAD et 118JAD déterminerait la taille de ces PI en fonction de la durée de ramification. Le rendement final serait chez le Merlot à Bordeaux plutôt lié à la seconde phase du fait d'une phase d'organogenèse maintenant précoce permettant la formation d'un nombre de PI toujours supérieur au nombre de grappes développées l'année suivante.

Mais pour autant, chaque phase est importante et l'occurrence d'un facteur limitant pendant l'une des deux premières périodes pourrait limiter soit le nombre de grappes soit leur taille en impactant les équilibres hormonaux, l'expression des gènes ou la disponibilité en assimilats carbonés. Plusieurs travaux chez la vigne ont déjà reporté les effets de modifications des équilibres hormonaux, d'un stress hydrique, d'une carence azotée ou de pratiques culturales comme la défoliation sur le rendement (Zapata *et al.* 2004 ; Lebon *et al.*, 2006 ; Lebon *et al.*, 2008 ; Vaillant-Gaveau *et al.*, 2014 ; Guilpart *et al.*, 2014), mais jusqu'à ce jour personne n'a réalisé d'étude intégrative en évaluant de manière simultanée l'expression de gènes, l'équilibre hormonal et les teneurs en sucres.

Pour cette raison, nous avons choisi d'étudier, lors de la dernière année de ce travail, les effets de la modulation des teneurs en ABA, de la mise à l'obscurité et de l'effeuillage pour essayer de (i) affiner la compréhension des mécanismes de régulation étudiés lors du chapitre précédent pour les 3 approches considérées, (ii) caractériser le rôle de l'acide abscissique et de la lumière dans ces mécanismes et (iii) étudier l'impact d'une pratique culturale couramment utilisée à Bordeaux, l'effeuillage, qui modifie à la fois les équilibres sources/puits et la luminosité du bourgeon.

I. Effets de la modulation des teneurs en ABA sur l'initiation, la différenciation et la ramification des PI des bourgeons latents de vigne

Si les effets des CKs et des gibbérellines sur la régulation de la fertilité des bourgeons sont relativement bien connus, les effets de l'ABA ont été très peu étudiés, alors que notre travail a montré dans le chapitre précédent que l'évolution des teneurs en ABA pouvaient être reliées aux périodes clés de formation des primordia inflorescentiels dans le bourgeon et corrélées au profil d'expression de gènes remarquables comme *VvMFT1*.

En 2014, Guilpart *et al.* (2014) ont démontré qu'un stress hydrique précoce pendant la floraison pouvait réduire jusqu'à 36% la fertilité potentielle apparente des bourgeons de l'année suivante. Cette période critique correspond exactement à la phase de basculement entre la période d'organogène et d'ontogenèse décrite dans les chapitres 3 et 4.

Les propriétés physiologiques de l'ABA au cours du cycle de croissance des plantes sont relativement bien connues et parmi les nombreux rôles qui lui sont attribués (i) la résistance au stress hydrique, (ii) la maturation des fruits non climactériques, (iii) l'induction et le prolongement de l'aoûtement et de la dormance sont les mieux documentés (Le Page-Degivry et Gaussen, 1970 ; Durand *et al.*, 1975 ; Le Page-Degivry et Bulard, 1979 ; Rinne *et al.*, 1994 ; Koussa *et al.*, 1998 ; Or *et al.*, 2000 ; Arora *et al.*, 2003 ; Akihiro *et al.*, 2005 ; Raven *et al.*, 2007 ; Zheng *et al.*, 2015 ; Vishwakarma *et al.*, 2017).

Il nous est donc paru naturel de nous demander si la modulation des teneurs en ABA dans les bourgeons pouvait expliquer les observations de Guilpart *et al.* (2014) quant à l'effet du stress hydrique. Ne pouvant pas, dans nos conditions d'expérimentation, induire un stress hydrique, nous avons choisi de modifier les teneurs en ABA des bourgeons par traitements exogènes et d'étudier les modifications associées afin de (i) caractériser plus précisément le rôle de ce régulateur hormonal dans les mécanismes étudiés et (ii) proposer un début d'explication physiologique aux observations de Guilpart *et al.* (2014). Pour cela, en 2016, des apports exogènes d'ABA et de fluridone (un inhibiteur de la synthèse d'ABA) ont été réalisés directement sur les bourgeons entre les stades 60 et 88JAD qui correspondent à la période critique décrite par Guilpart *et al.* (2014). Les effets de ces applications ont été évalués sur l'équilibre hormonal, l'expression des 6 gènes candidats et les teneurs en sucres.

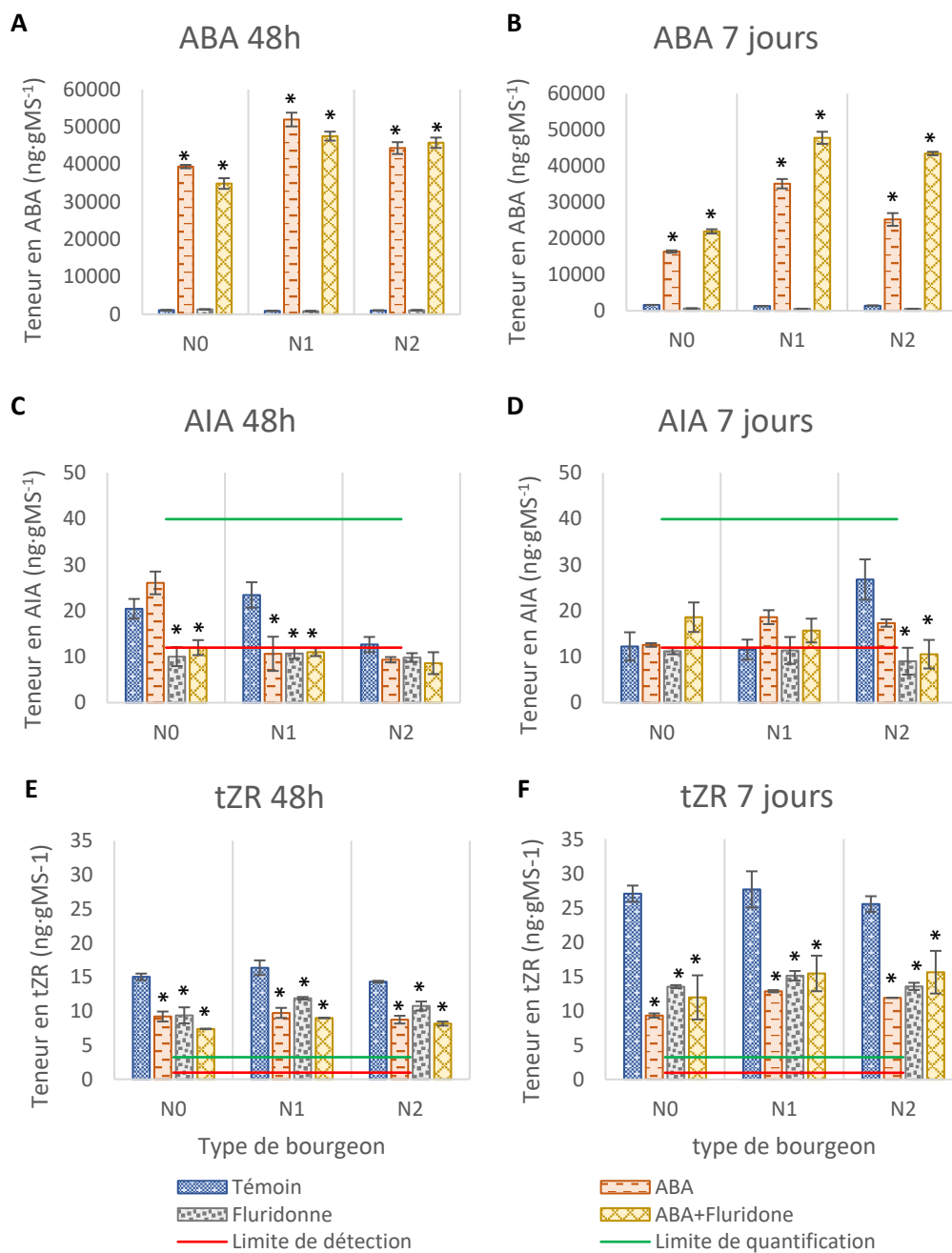


Figure 66 : Effets des traitements modifiant le métabolisme de l'ABA sur les teneurs en (A, B) ABA-libre, (C, D) AIA libre et (E, F) tZR dans les bourgeons 48h et 7 jours après l'application.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; * représente les différences significatives avec les témoins ($p < 0,05$) selon le test ANOVA.

I.1. Résultats

I.1.1. Effets des traitements sur les teneurs en ABA libre, AIA libre et cytokinines

48h après les traitements, l'apport d'ABA exogène entraîne une forte augmentation des teneurs en ABA dans les bourgeons (Figures 66A et 66B) alors que le traitement à base de fluridone ne modifie pas significativement les teneurs en ABA par rapport au témoin. Au bout de 7 jours, les teneurs en ABA se réduisent laissant supposer que l'ABA exogène absorbé est en partie métabolisé, mais les teneurs sont toujours plus importantes que dans le témoin. Aucune différence n'est constatée entre les types de bourgeons.

Les teneurs en AIA sont globalement très faibles, ne permettant pas de quantification (Figures 66C et 66D). Cependant, une diminution des teneurs en AIA 48h après les traitements est observée dans les bourgeons N0 et N1 et 7 jours après le traitement dans les bourgeons N2.

La seule forme détectée de CKs est tZR qui est une forme active (Figures 66E et 66F). Dans tous les cas, les traitements qui modifient le métabolisme de l'ABA provoquent une diminution marquée des teneurs par rapport aux témoins et ceci pour tous bourgeons. L'effet est particulièrement marqué 7 jours après l'application, par contre il n'y a aucune différence entre les bourgeons.

I.1.2. Effets des traitements sur l'expression des gènes remarquables *VvCLE25-1*, *VvTFL1a* et *VvMFT1*

Les effets des traitements modulant le métabolisme de l'ABA sur les trois gènes remarquables identifiés au chapitre précédent (*VvCLE25-1*, *VvTFL1a* et *VvMFT1*) sont présentés (Figure 67).

Quels que soient les traitements, leur application régule négativement l'expression de *VvCLE25-1* 48h après l'application (Figure 67A). Ces effets sont plus ou moins conservés 7 jours après et varient selon le traitement et le type de bourgeon (Figure 67B).

En revanche, les traitements impactent de manière positive l'expression du *VvTFL1a* 7 jours après l'application. Pour les trois bourgeons et les trois types de traitement, le niveau d'expression est augmenté alors qu'il n'avait pas varié 48h après les traitements (Figures 67C et 67D).

C'est l'expression du gène *VvMFT1* qui semble le plus fortement impacté par les traitements, que ce soit pour le niveau d'expression ou pour la conservation de l'effet. En effet, les trois traitements induisent une surexpression de *VvMFT1* 48h après le traitement qui est

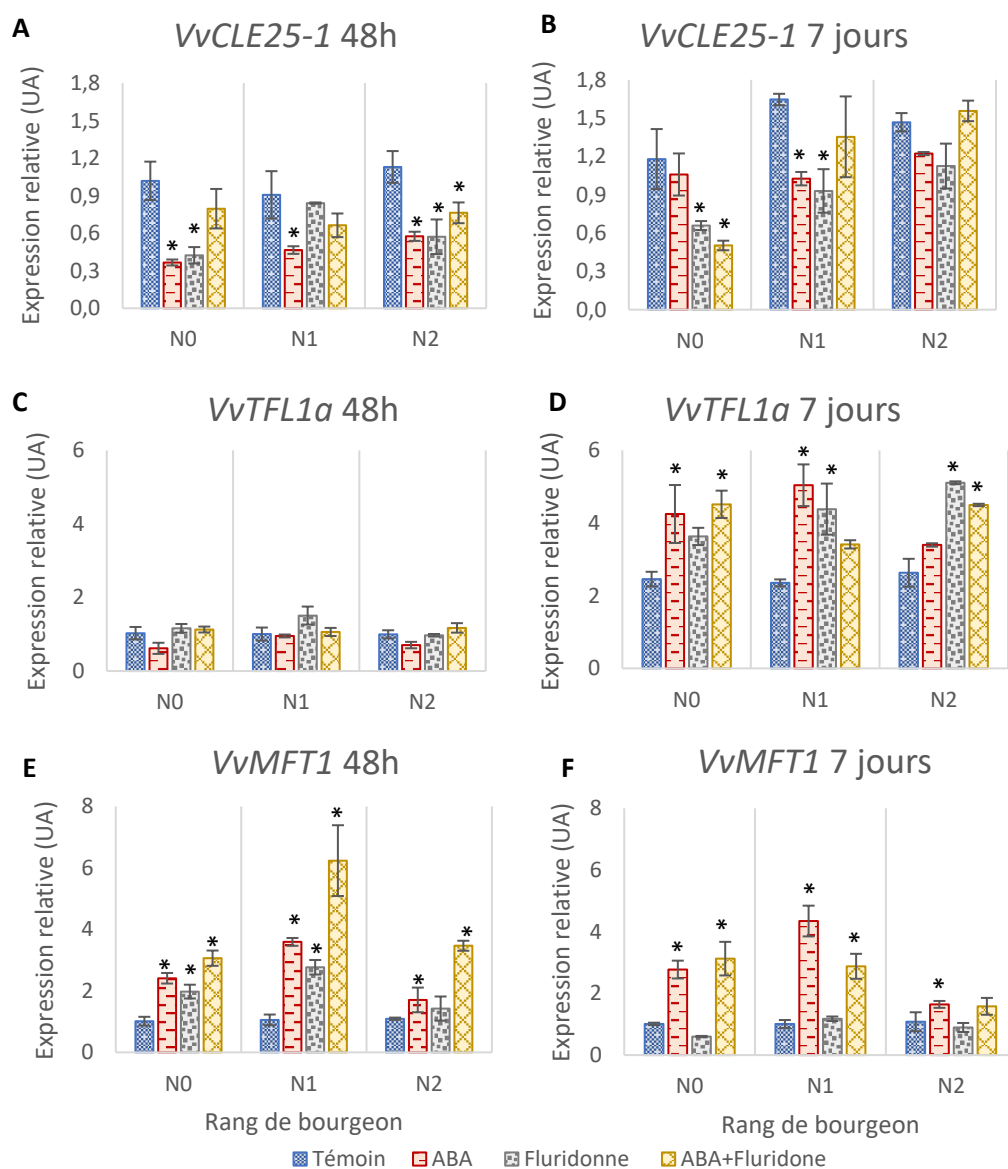


Figure 67 : Effets des traitements modifiant le métabolisme de l'ABA sur l'expression des gènes (A, B) *VvCLE25-1*, (C, D) *VvTFL1a* et (E, F) *VvMFT1* dans les bourgeons 48h et 7 jours après l'application.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; * représente les différences significatives avec les témoins ($p < 0,05$) selon le test ANOVA.

conservée 7 jours après. Les effets sont particulièrement importants et maintenus pour les deux traitements apportant de l'ABA exogène (Figures 67E et 67F).

I.1.3. Effets des traitements sur les teneurs en glucides

Les effets des traitements sur les teneurs des différents sucres sont présentés Figure 68.

Les différents traitements induisent, pour tous les bourgeons, une augmentation nette qui se maintient dans le temps des teneurs en D-glucose (Figures 68A et 68B). Cet effet est également observable, mais de manière moins significative, pour le D-fructose qui voit lui aussi ses teneurs augmenter après l'application d'ABA exogène (Figures 68C et 68D).

Le saccharose n'a pas été détecté à ce stade développement (entre 60 et 88JAD) conformément à ce qui avait déjà été observé au chapitre précédent.

Concernant l'amidon, seules des différences minimales et ponctuelles en fonction des traitements et des bourgeons peuvent être notées ne permettant pas d'interprétation fiable (Figures 68E et 68F).

I.2. Discussion

Dans les chapitres précédents, nous avons identifié une étape clé de basculement du bourgeon d'une phase d'organogenèse à une phase d'ontogenèse au stade 88JAD. La période avant ce stade (organogenèse) permettrait la formation du nombre de PI et la phase suivante (ontogenèse) conditionnerait la ramification des PI initiés, et donc la taille maximale des futures grappes. Une période remarquable et potentiellement critique a été estimée entre 60 et 88JAD, phase correspondant aussi à la période critique décrite par Guilpart *et al.* (2014) qui ont mis en évidence la corrélation entre l'état hydrique durant cette période et le rendement final de l'année suivante. Un stress hydrique précoce pendant cette période entraînerait une diminution de rendement (Guilpart *et al.*, 2014). En raison du rôle attribué à l'ABA dans la fermeture des stomates lors d'un stress hydrique (Cummins, 1973 ; Bray, 1988 ; Luan, 2002 ; Zhu, 2002 ; Zhang *et al.*, 2006 ; Zou *et al.*, 2010), nous pouvons nous demander comment l'ABA, supposé s'accumuler dans les organes végétatifs lors d'une limitation hydrique pourrait impacter les mécanismes de formation des primordia inflorescentiels dans le bourgeon et à terme la fertilité ?

Dans notre étude, nous avons essayé de moduler les teneurs en ABA par l'application de solutions contenant de l'ABA à forte dose pour augmenter les teneurs intrinsèques du bourgeon ou de solutions d'inhibiteur de la synthèse des caroténoïdes (fluridone) afin de réduire la teneur en ABA dans ces organes. Les traitements contenant de l'ABA exogène ont permis de moduler de manière importante les teneurs en ABA en les multipliant par 10 par rapport

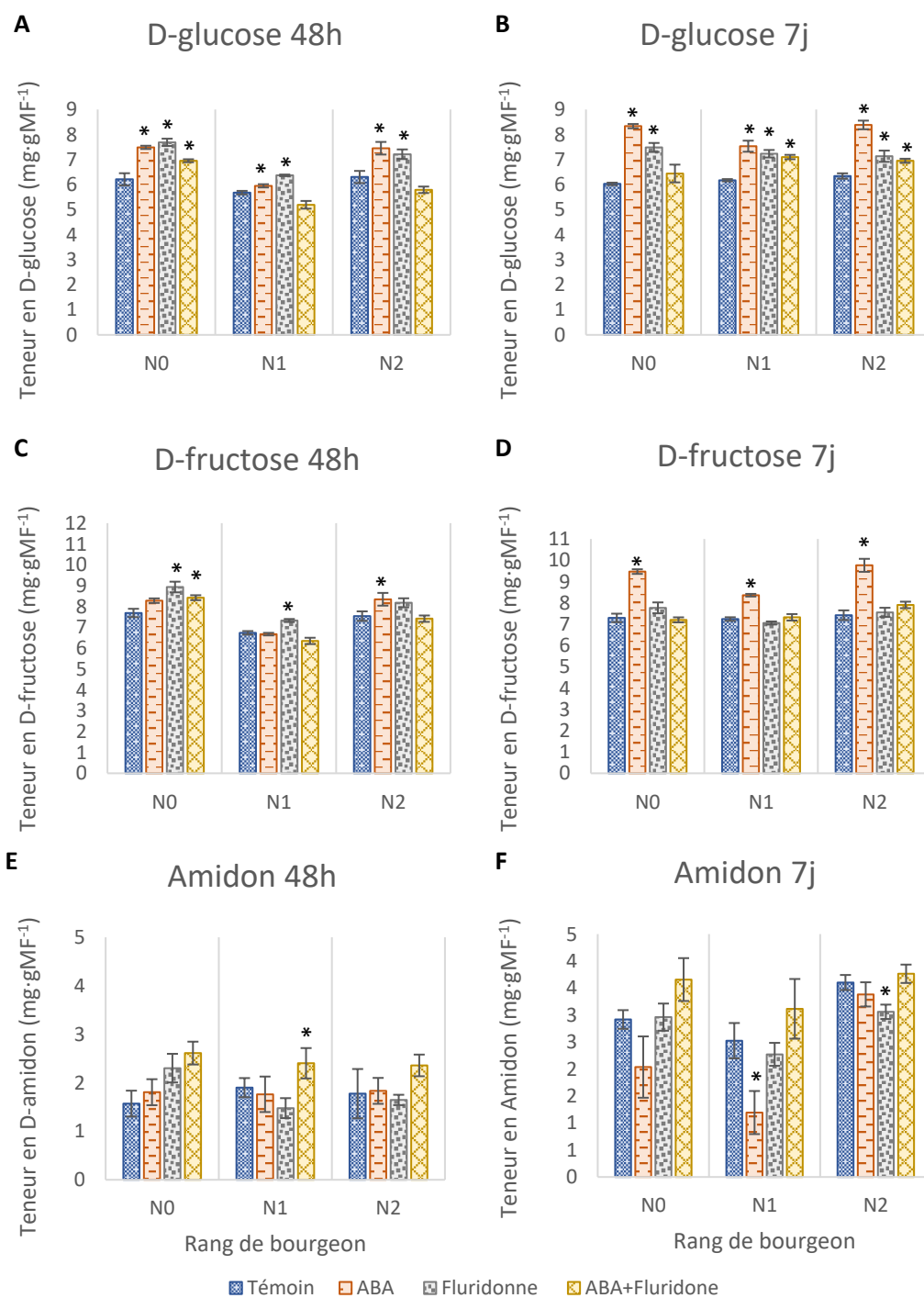


Figure 68 : Effets des traitements modifiant le métabolisme de l'ABA sur les teneurs en (A, B) D-glucose, (C, D) D-fructose et (E, F) amidon dans les bourgeons 48h et 7 jours après l'application.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; * représente les différences significatives avec les témoins ($p < 0,05$) selon le test ANOVA.

au témoin. Par contre, les traitements à base de fluridone, n'ont pas eu d'effet sur les teneurs en ABA, mais ont en revanche réduit l'AIA et les CKs. Ainsi, par nos traitements l'équilibre hormonal a été modifié de manière similaire à ce qui a déjà été rapporté dans la bibliographie. Du *et al.* (2013) ont démontré chez le riz, qu'un déficit en caroténoïdes ou l'application du fluridone (en tant qu'inhibiteur de la biosynthèse des caroténoïdes), pouvait induire une diminution des teneurs en AIA, supposant qu'une interaction pourrait avoir lieu au niveau des caroténoïdes entre les voies de biosynthèse de l'ABA et de l'AIA. Stetsenko *et al.* (2015) ont également montré que l'application d'ABA et de fluridone entraînait une diminution des teneurs en AIA libre, en augmentant la tolérance aux différents stress abiotiques chez *Mesembryanthemum crystallinum* L. Par contre, concernant les interactions entre ABA, fluridone et CKs, diverses études se contredisent. Chez *Triticum turgidum*, Vysotskaya *et al.* (2009) montrent que l'apport d'ABA peut induire la dégradation des CKs en augmentant l'activité de la cytokinine oxydase, et entraîner une diminution de certaines formes de CKs (notamment tZR). Ce même auteur indique qu'un traitement à base de fluridone aurait un effet inverse. Ce même effet est aussi rapporté par Goggin *et al.*, (2014) chez l'ivraie raide (*Lolium rigidum*). Par contre, d'autres auteurs pensent que l'ABA exogène augmenterait la teneur en CKs, alors que le fluridone induirait une forte diminution (Stetsenko *et al.*, 2015). Dans notre cas, les deux types de traitement réduisent les teneurs en CKs. Nos résultats ne permettent pas de conclure à un effet spécifique de la modulation des teneurs en ABA ou en caroténoïdes au vu des résultats contradictoires obtenus. Mais on peut supposer que l'apport d'ABA massif après les traitements ait provoqué un phénomène de rétrocontrôle de la voie des caroténoïdes comme le proposent Cutler et Krochko (1999). De ce fait, l'interaction entre les voies métaboliques reste très complexe, il est encore difficile de conclure sans avoir étudié les activités enzymatiques ou l'expression des gènes de ces voies. Dans tous les cas, **nos traitements ont modifié les équilibres hormonaux en provoquant (i) une forte augmentation des concentrations en ABA dans le cas des traitements apportant de l'ABA exogène et (ii) une diminution des concentrations en AIA et CKs dès lors que la voie de biosynthèse des caroténoïdes était affectée soit directement par l'effet du fluridone soit indirectement par un effet inhibiteur d'une concentration trop importante d'ABA.** Outre les effets doses qui peuvent avoir des effets promoteurs ou inhibiteurs sur la croissance de la plante comme discuté au chapitre précédent et démontré par Popova (1995), Khadri *et al.* (2006) ou Humplík *et al.* (2015), cet équilibre peut modifier le niveau d'expression des gènes ainsi que les teneurs en assimilats carbonés et influencer indirectement sur les mécanismes d'organogenèse et d'ontogenèse.

L'accumulation des sucres assimilables (D-glucose et D-fructose) est induite dans notre étude par l'apport d'ABA exogène. Cependant, le blocage de la voie de biosynthèse de l'ABA par l'application de fluridone a également entraîné une augmentation de la teneur en D-glucose. Etant donné les possibles effets rétroactifs des produits finis sur le début de leur voie de biosynthèse et les effets antagonistes de certains équilibres hormonaux, il est possible d'envisager deux hypothèses pour expliquer l'accumulation des sucres dans notre étude. **D'une part, l'apport d'ABA exogène à forte dose pourrait mimer un stress abiotique** qui régulerait positivement la teneur en sucres solubles afin d'augmenter la tolérance et la protection des cellules vis-à-vis de ce stress. De nombreuses études ont montré que les stress abiotiques, notamment le stress hydrique pouvaient induire une augmentation des teneurs en ABA ce qui favoriserait l'accumulation des sucres solubles comme molécules de tolérance aux stress (Creelman *et al.*, 1990 ; Kerepesi et Galiba, 2000 ; Carrari *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2004 ; Pospisilova *et al.*, 2005 ; Seki *et al.*, 2007 ; Yin *et al.*, 2010). Chez le blé (*Triticum aestivum*), l'apport précoce d'ABA exogène à la floraison augmente la teneur en chlorophylle et en sucres solubles induisant de plus une augmentation de rendement final (Travaglia *et al.*, 2007). Chez la vigne, Medici *et al.* (2014) également ont montré qu'un stress hydrique entraînait l'augmentation de D-glucose et de D-fructose induction de l'expression des gènes impliqués dans le transport des sucres solubles et régulés par l'ABA. Ainsi, on pourrait supposer que les bourgeons traités auraient subis un stress suffisamment important pour provoquer l'accumulation de sucres solubles comme réponse de protection. **D'autre part, l'accumulation des teneurs en sucres assimilables suite au traitement par le fluridone pourrait être plus liée au bouleversement provoqué au niveau de la voie des caroténoïdes qui affecte les teneurs en AIA et en CKs** (Du *et al.*, 2013 ; Stetsenko *et al.*, 2015). En effet, l'interaction entre les CK et les sucres solubles en lien avec différentes activités physiologiques a déjà été rapportée, et il semble qu'ils peuvent interagir de façon antagoniste en fonction des métabolismes considérés (Kushwah et Laxmi, 2014). Selon cet auteur, le glucose et les CKs agiraient de manière antagoniste lorsque les concentrations en glucose sont faibles et de manière synergique lorsque les concentrations en D-glucose sont élevées pour réguler la longueur des hypocotyles. D'un autre côté, on peut proposer qu'en réduisant les teneurs en cytokinines, la force des puits serait réduite ce qui limiterait l'utilisation des sucres qui alors s'accumuleraient. Cette hypothèse est d'une part étayée par celle de Roman *et al.* (2016) qui ont démontré que la lumière activait la biosynthèse des CKs en augmentant la force des puits activant les gènes clés du métabolisme des sucres. D'autre part, elle converge avec les données de Roitsch et Ehneß (2000) sur la stimulation des activités invertases par les cytokinines. Enfin, l'AIA et les CKs

pourraient également fonctionner de manière synergique dans contrôle de l'organogenèse en lien avec la modification des teneurs en sucres (Hirsch *et al.*, 1989). Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que les mutants insensibles à l'AIA présentent des teneurs en glucose toujours plus élevées induisant la formation des organes latéraux en lien avec l'augmentation des teneurs en cytokinines (Mishra *et al.*, 2009 ; Booker *et al.*, 2010). **Ainsi, l'apport d'ABA exogène et le blocage de la voie des caroténoïdes par le fluridone, induisent une accumulation des sucres solubles semblant pouvoir être soit (1) une réponse à un stress, (ii) soit liée à la réduction de l'utilisation des sucres par les organes du bourgeon en lien avec les faibles teneurs en cytokinines.** Dans tous les cas, ces deux types de réponse induisent une réduction possible des activités cellulaires et pourraient expliquer les observations de Guilpart *et al.* (2014). Malheureusement, le fait de ne pas avoir pu estimer le nombre et le volume des grappes en 2017, ne nous permet pas de confirmer cette hypothèse.

En ce qui concerne l'expression des gènes remarquables, nos résultats montrent pour la première fois chez la vigne que la modulation des teneurs en ABA peut moduler le niveau d'expression de *VvMFT1*, *VvTFL1a* et *VvCLE25-1*.

VvCLE25-1 est sous-exprimé à la fois par l'apport d'ABA exogène et du fluridone. Nous avons émis l'hypothèse dans le chapitre précédent que ce gène jouerait un rôle dans la régulation et le contrôle du développement en participant à la régulation et la différenciation cellulaire des méristèmes apicaux et latéraux. Ainsi, la surexpression de ce gène durant la phase d'ontogenèse favoriserait la différenciation et la ramification des méristèmes inflorescentiels (Clark *et al.*, 1995 ; Autran et Traas, 2001 ; Lenhard et Laux, 2003 ; Heidstra et Sabatini, 2014 ; Yang et Jiao, 2016 ; Morot-Gaudry *et al.*, 2017). **Dans le cas ici présent, la sous-expression de ce gène suite aux différents traitements au début de phase d'ontogenèse pourrait retarder la différenciation et la ramification des PI initiés et ainsi affecter leur taille définitive.** En raison de manque de données bibliographiques sur la régulation directe de l'ABA sur *VvCLE25-1*, il est difficile d'envisager une hypothèse sérieuse quant au mécanisme d'action de l'ABA sur *VvCLE25-1*. Cependant, certaines études ont montré chez *Arabidopsis thaliana* que les traitements par l'ABA pouvaient réguler négativement l'expression du gène *WUS*, qui présenterait une régulation rétroactive sur les gènes *CLV3* (Paulraj, 2013). De plus, il est admis que l'équilibre CKs/AIA jouerait un rôle important dans le basculement entre la prolifération et la différenciation cellulaire à travers la régulation rétroactive des gènes *CLV/WUS* contrôlant ainsi l'initiation et la différenciation des méristèmes (Leibfried *et al.*, 2005 ; Cheng *et al.*, 2010 ; Su *et al.*, 2011 ; Chandler et Werr, 2015 ; Azizi *et al.*, 2015). Ce qui nous laisse penser que, dans notre étude, **la modification du niveau d'expression de *VvCLE25-1* serait plutôt due à la modification des équilibres hormonaux ABA - AIA - CKs,**

voire d'autres phytohormones, qu'à un effet direct de l'ABA. Le fait que le traitement à base de fluridone puisse avoir les mêmes effets sur l'expression de *VvCLE25-1* que l'apport exogène d'ABA conforte cette hypothèse. Ainsi les effets sur l'expression de *VvCLE25-1* ne seraient pas induits uniquement par l'ABA exogène, mais aussi par la modification de la voie de biosynthèse des caroténoïdes entraînant des modifications d'équilibres AIA/CKs (Vysotskaya *et al.*, 2009 ; Du *et al.*, 2013 ; Stetsenko *et al.*, 2015).

Contrairement à *VvCLE25-1*, *VvTFL1a* est surexprimé dans les bourgeons traités avec de l'ABA exogène et du fluridone. *VvTFL1a* est connu pour son implication dans le maintien du MAC et la répression de la différenciation des méristèmes et de la floraison (Boss *et al.*, 2006 ; Carmona *et al.*, 2007 ; Yao *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2011 ; Crane *et al.*, 2012). **Ainsi, la surexpression de ce gène après un apport d'ABA exogène réprimerait la différenciation et la ramification des PI et semble donc être bien en cohérence avec la sous-expression de *VvCLE25-1* observée.** En revanche, la surexpression de ce gène après un traitement à base de fluridone semble indiquer que comme *VvCLE25-1*, *VvTFL1a* ne serait pas régulé directement par l'ABA mais via les équilibres hormonaux CKs/AIA et CKs/GA (Boss *et al.*, 2006 ; Randoux *et al.*, 2012 ; Crane *et al.*, 2012 ; Mimida *et al.*, 2013). Les données bibliographiques sont diverses et confuses en raison des types de traitement, des concentrations appliquées ou des stades pour émettre une hypothèse fiable quant au mode de régulation par telle ou telle hormone. Dans notre cas, il semblerait donc que ce gène soit principalement régulé par la diminution de l'AIA, des cytokinines ou des deux comme cela a pu être démontré chez *Arabidopsis thaliana*, le pommier et la vigne (Guan *et al.*, 2006 ; Crane *et al.*, 2012 ; Mimida *et al.*, 2013).

Les gènes *MFT* sont connus en tant qu'homologues de *FT/TFL1*, et semblent jouer aussi un rôle dans l'induction de la floraison en favorisant la transition du méristème végétal en méristème floral dans nombre de plantes (Yoo *et al.*, 2004 ; Carmona *et al.*, 2007 ; Hedman *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2012 ; Randoux *et al.*, 2012). **Dans notre étude, l'expression de *VvMFT1* est fortement induite par l'ABA exogène.** Contrairement à *VvCLE25-1* et *VvTFL1a*, le traitement avec du fluridone ne semble pas avoir d'effets sur *VvMFT1* montrant bien que ***VvMFT1* pourrait être régulé positivement et directement par l'ABA** comme cela a déjà été rapportée dans plusieurs études chez *Arabidopsis thaliana*, *Hevea brasiliensis*, *Jatropha curcas* et le peuplier (Mohamed *et al.*, 2010 ; Xi *et al.*, 2010 ; Tao *et al.*, 2014 ; Bi *et al.*, 2016). Ainsi, pour la première fois, nous avons montré les effets de l'ABA sur *VvMFT1* chez la vigne, ce qui conforte les travaux décrivant les modes de régulation de la famille des FT chez les autres plantes. Cependant, les conséquences exactes de la surexpression de *VvMFT1* induite

par l'ABA durant cette phase d'ontogenèse sur la différenciation et la ramification des PI restent difficiles à établir par le manque de mesures postérieures de la fertilité des bourgeons.

Ainsi, nous venons de montrer que l'augmentation des teneurs en ABA dans le bourgeon modifiait de manière plus ou moins significative les marqueurs d'induction, d'initiation et de ramification identifiés au chapitre précédent et pouvait avoir un impact potentiel sur la fertilité réelle apparente et le rendement final. Malheureusement, en raison de l'application de ces traitements sur des rameaux qui n'ont pas pu être gardés à la taille, il nous a été impossible de réaliser les mesures de fertilité et de rendement. Néanmoins cette étude préliminaire, nous permet d'apporter quelques données nouvelles, via les mécanismes de régulation par l'ABA, pour émettre une hypothèse sur la diminution de rendement en année N+1 induite par un stress hydrique durant la phase d'ontogenèse des PI comme décrit par Guilpart *et al.* (2014). **En cas de stress hydrique, cette hormone s'accumulerait de manière suffisante pour (i) réduire les teneurs en cytokinines et auxines limitant ainsi la force de puits des organes préformés dans le bourgeon et (ii) induire une sous-expression de *VvCLE25-1* et une surexpression de *VvTFL1a* limitant ainsi les capacités d'ontogenèse des primordia inflorescentiels.**

II. Effets de la « mise à l’obscurité des bourgeons » sur l’initiation, la différenciation et la ramification des primordia inflorescentiels

Depuis plus de 50 ans, de nombreux auteurs s’accordent pour dire que la lumière, notamment son intensité est un facteur externe primordial du contrôle de l’initiation et de la différenciation des PI et pourrait impacter considérablement la fertilité des bourgeons (Antcliff *et al.*, 1955 ; May et Antcliff, 1963 ; Baldwin, 1964 ; Buttrose, 1970 ; Kliewer, 1982 ; Dry, 2000). Cependant, la plupart des études portant sur les effets de la lumière a été réalisée en conditions contrôlées et les mécanismes de régulation de la fertilité des bourgeons par l’intensité lumineuse restent encore peu compris.

Dans notre étude, d’éventuels indicateurs et marqueurs de l’initiation, la différenciation et la ramification des PI, ont été identifiés et présentés dans les chapitres précédents. Certains d’entre eux comme les cytokinines, les sucres et les gènes impliqués dans les mécanismes de ramification sont donnés dans la bibliographie comme fortement régulés par la lumière (Choubane *et al.*, 2012 ; Demotes-Mainard *et al.*, 2016 ; Huché-Théliet *et al.*, 2016 ; Roman *et al.*, 2016), mais aucuns travaux sur vigne cultivée en plein champ n’ont jamais reporté ces effets.

Pour cela nous avons mener une expérimentation visant à évaluer indirectement les effets de la lumière par la mise à l’obscurité des bourgeons sur les indicateurs et marqueurs mis en évidence dans le chapitre précédent. Trois dates de mise à l’obscurité ont été réalisées :

- Obs35, correspondant à une mise à l’obscurité précoce à 35JAD au début de la phase d’organogenèse, pour une durée de 124 jours de noir,
- Obs60 correspondant à une mise à l’obscurité à 60JAD au milieu de la phase d’organogenèse et début de la phase d’ontogenèse, pour une durée de 99 jours
- Obs103 correspondant à une mise à l’obscurité tardive à 103JAD à la fin de la phase d’ontogenèse, pour une durée de 56 jours.

Cette expérimentation menée en 2016 sur la même parcelle de Merlot a eu pour objectif de (i) confirmer le rôle potentiel de régulation de la lumière sur les indicateurs précédemment identifiés, (ii) d’évaluer l’impact de l’absence de lumière sur les mécanismes de l’initiation, de la différenciation et de la ramification des PI, (iii) d’apporter les premières explications sur l’effet de certaines pratiques culturales capables de modifier la luminosité de la vigne pendant le développement des bourgeons au cours de leur première année de développement.

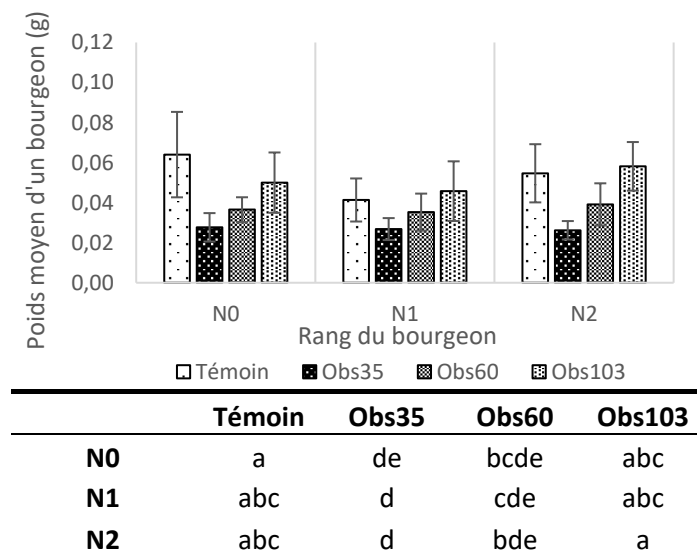


Figure 69 : Effets de la durée de mise à l'obscurité sur le poids moyen des bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de quinze répétitions indépendantes ; le tableau représente les différences significatives ($p < 0,05$) selon le test de Kruskal-Wallis : a, b, c, d, e pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre les groupes de moyennes

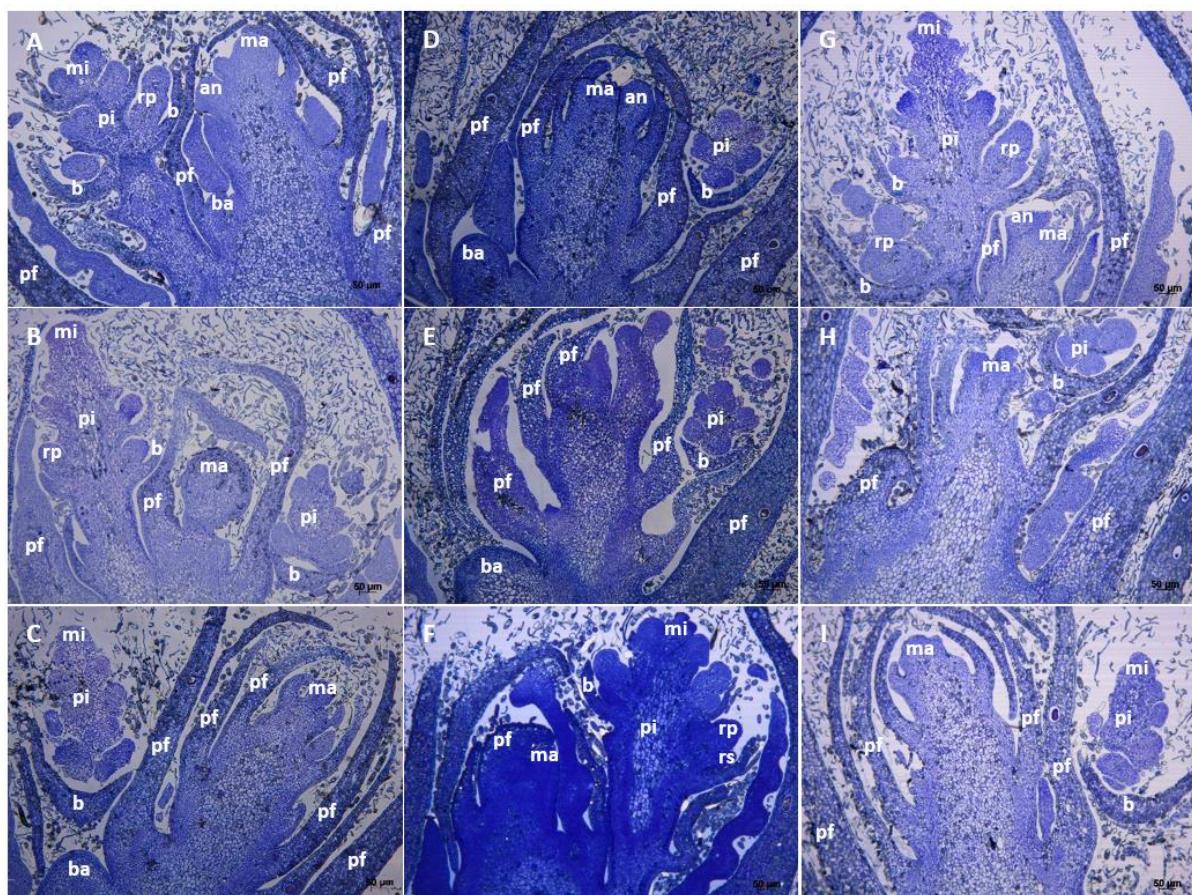


Figure 70 : Comparaison microscopique des primordia formés dans les bourgeons N0, N1 et N2 en fonction de la date de mise à l'obscurité en 2016. (A-C) : témoins ; (D-F) : Obs60 et (G-I) : Obs103.

ma : méristème d'apex ; **mi** : méristème inflorescentiel ; **an** : anlage ; **pf** : primordium foliaire ; **pi** : primordium inflorescentiel ; **b** : bractée ; **rp** : ramification primaire ; **rs** : ramification secondaire ; **ba** : bourgeon axillaire

II.1. Résultats

II.1.1. Effets de la mise à l'obscurité sur le poids moyen et l'organisation ontogénique des bourgeons

La Figure 69 montre les effets de la mise à l'obscurité sur le poids moyen des bourgeons en fin de période de développement. Les mesures de poids réalisées montrent que la mise à l'obscurité, la période et la durée de la mise à l'obscurité impactent le poids final du bourgeon. Plus la mise à l'obscurité est précoce et/ou longue, plus le poids est diminué. La dernière mise à l'obscurité au stade 103JAD, correspondant à 56 jours d'obscurité, ne modifie plus le poids. Ces effets sont similaires quel que soit le type de bourgeon considéré.

Les effets de la mise à l'obscurité sont également visibles sur l'organisation ontogénique des bourgeons (Figure 70). Les coupes microscopiques réalisées dans les différents bourgeons montrent des différences d'organisation des PI en fonction de la période et de la durée de mise à l'obscurité. Le développement des PI initiés dans les bourgeons mis au noir au stade 60JAD, soit pendant 99 jours, est réduit et celui-ci reste à l'état juvénile par rapport aux témoins, notamment dans les bourgeons N0 (Figures 70D et 70E). Lorsque la mise à l'obscurité est appliquée plus tardivement, au stade 103JAD à la fin de l'ontogénèse, les effets sont moins marqués et les PI présentent un degré de ramification peu différent de celui des témoins (Figures 70G et 70I).

II.1.2. Effets de la mise à l'obscurité sur les teneurs en ABA libre, AIA libre et cytokinines

La mise à l'obscurité des bourgeons module de manière plus ou moins importante les teneurs des hormones étudiées (Figure 71).

L'ABA libre n'est absolument pas impacté (Figure 71A).

L'effet sur les teneurs en AIA est relativement délicat à expliquer en raison des teneurs très faibles à ce stade, à la limite du seuil de quantification (Figure 71B). Néanmoins, il semblerait que les bourgeons N0 et N1 voient leurs teneurs en AIA libre chuter et ceci pour les trois durées de traitement (Figure 71B).

Enfin, concernant les CKs, la seule forme détectée au stade de prélèvement des bourgeons est tZ9G, la forme inactive. Aucune différence n'est constatée dans les bourgeons traités par rapport aux témoins, ni entre les différents types de bourgeons (Figure 71C).

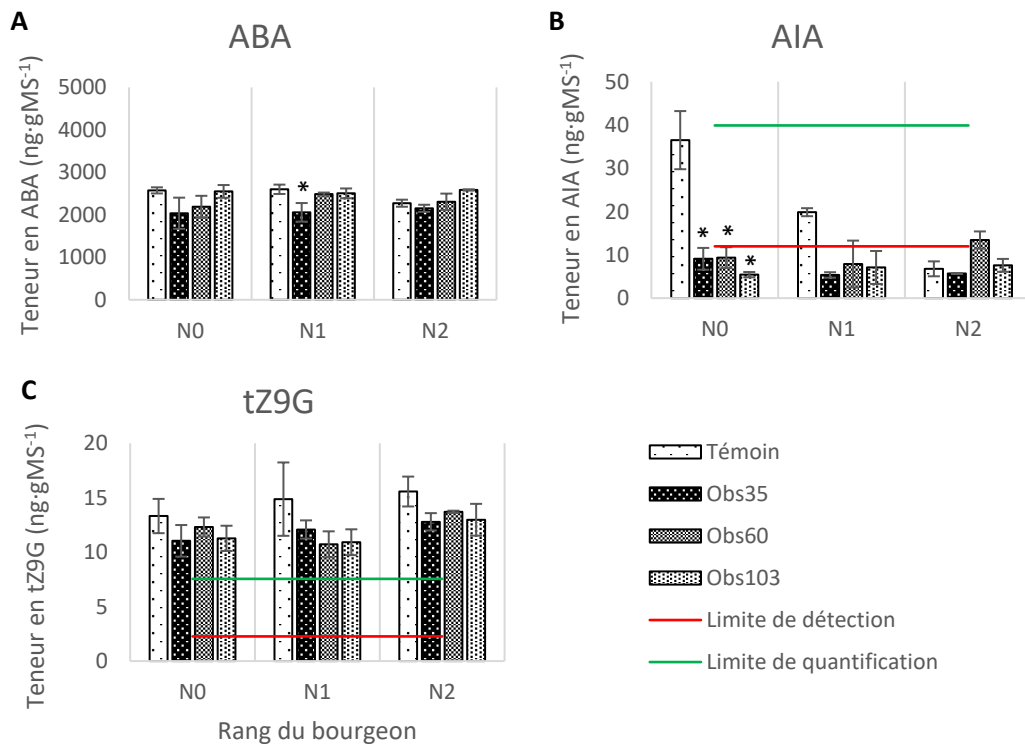


Figure 71 : Effets de la mise à l'obscurité sur les teneurs en (A) ABA libre, (B) AIA libre et (C) tZ9G dans les bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; * représente les différences significatives avec les témoins ($p < 0,05$) selon le test ANOVA.

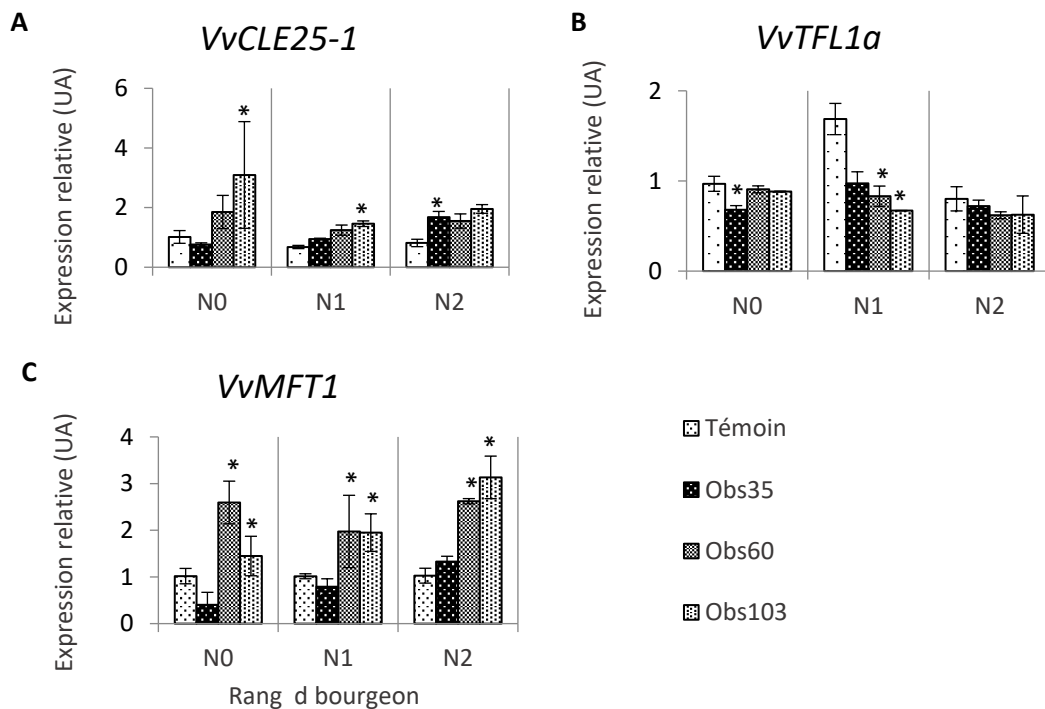


Figure 72 : Effets de la mise à l'obscurité sur l'expressions des gènes (A) *VvCLE25-1*, (B) *VvTFL1a* et (C) *VvMFT1* dans les bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; * représente les différences significatives avec les témoins ($p < 0,05$) selon le test ANOVA.

II.1.3. Effets de la mise à l'obscurité sur l'expression des gènes remarquables *VvCLE25-1*, *VvTFL1a* et *VvMFT1*

Les effets de la mise à l'obscurité sur l'expression des gènes remarquables identifiés précédemment sont présentés dans la Figure 72.

VvMFT1 et *VvCLE25-1* sont plus ou moins surexprimés et de manière conservée pour les mises au noir à 60JAD et 103JAD (Figures 72A et 72C). Par contre, l'effet inverse est observé lorsque la mise à l'obscurité est réalisée précocément avec une sous expression de ces gènes pour les bourgeons N0.

En revanche, *VvTFL1a* semble moins impacter sauf pour les bourgeons N1 dont le niveau d'expression est diminué pour toutes les dates de traitement (Figure 72B).

II.1.4. Effets de la mise à l'obscurité sur les teneurs en glucides

La Figure 73 présente les effets de la mise à l'obscurité des bourgeons sur les teneurs en sucres.

Les teneurs en sucres assimilables (D-glucose et D-fructose) sont faiblement impactées par la mise à l'obscurité. Néanmoins, les sucres solubles ont tendance à diminuer dans les bourgeons mis au noir précocément au stade 35JAD, et à augmenter dans les bourgeons mis au noir plus tardivement aux stades 60JAD et 103JAD (Figures 73A et 73B).

Par contre, le saccharose voit ses teneurs fortement augmenter (parfois tripler) lorsque les bourgeons sont mis au noir au cours de la phase d'organogenèse à 35JAD et 60JAD (Figure 73C).

En ce qui concerne l'amidon, les teneurs ne sont modifiées que pour le bourgeons N1, avec pour les trois dates/durée de mise à l'obscurité un effet positif sur l'accumulation de ce sucre de réserve (Figure 73D).

II.2. Discussion

Depuis plus de 50 ans, de nombreux auteurs s'accordent pour dire que la lumière, notamment son intensité est un facteur externe primordial du contrôle de l'initiation et de la différenciation des PI et pourrait impacter considérablement la fertilité des bourgeons (Antcliff *et al.*, 1955 ; May et Antcliff, 1963 ; Baldwin, 1964 ; Buttrose, 1970 ; Kliewer, 1982 ; Dry, 2000). Cependant, la plupart des études portant sur les effets de la lumière ont été réalisés en conditions contrôlées et les mécanismes de régulation de la fertilité des bourgeons par l'intensité lumineuse restent encore peu compris. En arboriculture et viticulture, les nombreuses pratiques culturales comme le rognage, l'échardage ou l'effeuillage modifient la forme et la

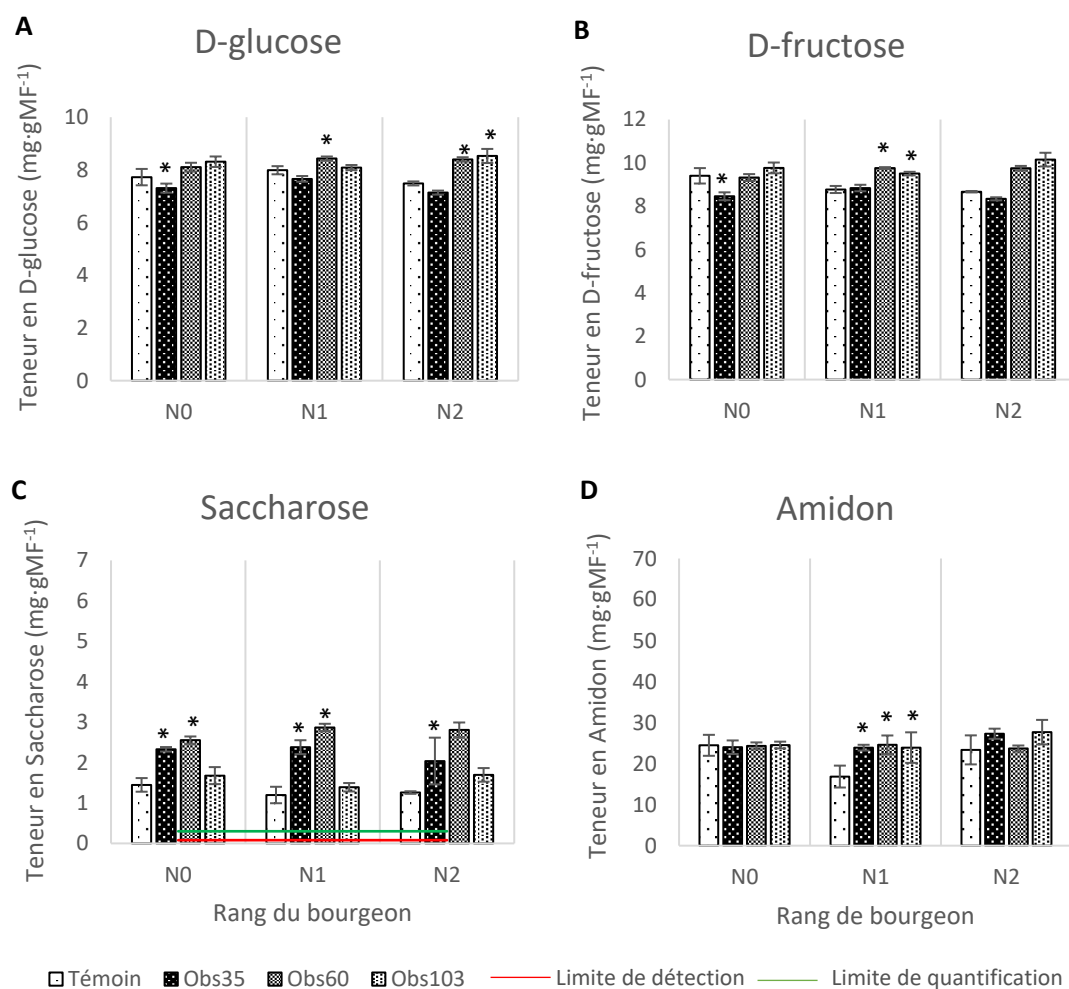


Figure 73 : Effets de la mise à l'obscurité sur les teneurs en (A) D-glucose, (B) D-fructose, (C) saccharose et (D) amidon dans les bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; * représente les différences significatives avec les témoins ($p < 0,05$) selon le test ANOVA.

taille de la canopée, pouvant entraîner des changements au niveau de la filtration de la lumière solaire et ainsi la perception de l'intensité lumineuse par les bourgeons (Stephan, 2007 ; Carbonneau *et al.*, 2015).

Pour la première fois en plein champ, nous mettons en évidence que l'absence de lumière peut modifier les mécanismes de construction des pièces inflorescentielles en impactant de manière plus ou moins importante l'équilibre hormonal, l'expression des gènes remarquables de cette phase et la répartition des assimilats carbonés ; induisant ainsi une modification de la structure des PI.

La mise à l'obscurité plus ou moins longue et plus ou moins précoce a modifié considérablement le poids des bourgeons et la taille des PI. **Plus la mise à l'obscurité est précoce, plus l'impact est important, ce qui laisse supposer que pendant la phase d'organogenèse se met en place un ensemble de mécanismes cellulaires qui conditionneront les activités ontogéniques réduisant ainsi la fertilité du bourgeon** comme l'ont déjà démontré Antcliff *et al.* (1955), May et Antcliff (1963), Baldwin (1964), Buttrose (1969a), Kliwer (1982), Petrie et Clingeleff (2005), Sanchez et Dokoozlian (2005) et Greven *et al.* (2005). La lumière peut agir sur les mécanismes cellulaires de deux manières : soit directement en stimulant l'expression de gènes clés (Almada *et al.*, 2009 ; Roman *et al.*, 2016) ou les teneurs en hormones comme les cytokinines (Roman *et al.*, 2016) soit indirectement via l'activité photosynthétique (Buttrose, 1968 ; Morgan *et al.*, 1985 ; Dry, 2000 ; Sanchez et Dokoozlian, 2005 ; Vasconcelos *et al.*, 2009).

Dans notre cas, il est assez difficile de faire des parallèles directs avec les travaux cités précédemment car seuls les bourgeons ont été mis au noir, ce qui n'affecte en rien l'activité photosynthétique et le bilan carbone de la plante entière. En revanche, il est possible d'orienter notre discussion vers les effets directs sur les acteurs du métabolisme du bourgeon lui-même.

En ce qui concerne les hormones, **la mise à l'obscurité n'affecte que ponctuellement les teneurs des régulateurs de croissance étudiés et seul l'AIA voit ses teneurs diminuer.** Mais en raison des très faibles teneurs détectées il convient de rester prudent vis-à-vis des résultats obtenus et des interprétations possibles malgré l'importance de la bibliographie sur ce sujet.

Pour les sucres, les effets varient selon la date/durée de mise à l'obscurité : **la mise à l'obscurité précoce provoque une diminution des sucres solubles et une augmentation du saccharose, la mise à l'obscurité à 60JAD entraîne une augmentation des sucres solubles**

et de saccharose alors que la mise à l'obscurité tardive n'induit qu'une augmentation des sucres solubles sans modifier les teneurs en saccharose. Ces réponses variées semblent être directement liées à la période d'application et pourraient être soit la résultante d'un stress provoqué par l'absence de lumière, soit la résultante d'une mauvaise utilisation des sucres solubles. En raison de la non modification des concentrations en régulateurs hormonaux il est difficile d'orienter notre discussion plus vers une hypothèse que l'autre. D'un côté, il a été rapporté chez la pomme de terre (Chincinska *et al.*, 2008) que le saccharose pouvait augmenter dans les feuilles en absence de lumière en raison de la diminution de l'activité du transporteur SUT4 ; ce qui permettrait d'expliquer les évolutions inverses des sucres solubles et du saccharose pour la mise à l'obscurité précoce. Pour Roman *et al.* (2016), la lumière activerait la biosynthèse des CKs ce qui augmenterait la force des puits et activerait les gènes clés du métabolisme des sucres, ceci convergeant avec les données de Roitsch et Ehneß (2000) sur la stimulation des activités invertases par les cytokinines. Ainsi, dans notre cas, l'accumulation du saccharose pourrait aussi être due à ces mécanismes, mais nous n'avons pas pu observer de diminution significative de cytokinines (du moins au moment où nous avons réalisé le prélèvement). D'un autre côté, de nombreux travaux comme ceux de Roldan *et al.* (1999), démontrent que **le stress induit par l'obscurité peut limiter la morphogenèse et entraîner une mobilisation du saccharose par non utilisation des sucres solubles**. Cette hypothèse conforte nos observations pour la mise à l'obscurité précoce mais pas pour la mise à l'obscurité à 60JAD où les teneurs en sucres solubles et en saccharose augmentent. On pourrait alors penser que **la mise à l'obscurité à 60JAD provoquerait à ce moment là un stress plus important** en raison peut être de l'activité cellulaire intense liée à l'organogénèse et l'ontogénèse, comme l'ont démontré plusieurs auteurs, **il se produirait alors une augmentation en sucres solubles comme molécules de tolérance aux stress** (Creelman *et al.*, 1990 ; Kerepesi et Galiba, 2000 ; Carrari *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2004 ; Pospisilova *et al.*, 2005 ; Seki *et al.*, 2007 ; Yin *et al.*, 2010). Dans tous les cas, les deux hypothèses s'accordent pour expliquer le fait que l'augmentation du saccharose peut être la conséquence d'une plus faible disponibilité en sucres solubles réduisant les activités cellulaires et pouvant expliquer pourquoi les PI formées dans les bourgeons mis au noir précocement sont moins ramifiées.

Enfin, ces variations pourraient aussi être reliées aux modifications du niveau d'expression des gènes. La surexpression de *VvMFT1* peut être reliée à l'accumulation de saccharose comme le proposent Sun *et al.* (2017) qui viennent de démontrer chez le chrysanthème que certains gènes de la famille des *MFT/FT/TFL* pouvaient être régulés positivement par le saccharose. Il semblerait également que les gènes de la famille

MFT/FT/TFL pourraient être régulés par la photopériode dans le cadre de la coordination de la floraison (Kobayashi *et al.*, 1999 ; Yoo *et al.*, 2004 ; Kikuchi *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2014) et donc voir leur niveau d'expression modifié en fonction de la durée de la période nocturne. Enfin, pour *Physcomitrella patens*, Hedman *et al.* (2009) ont rapporté que les niveaux d'expression des gènes *MFT2*, 3 et 4 varient au cours de la période d'obscurité de manière oscillatoire. De même, chez *Hevea brasiliensis*, le gène *MFT1* présente des variations de niveau d'expression dans les conditions d'obscurité, laissant les auteurs supposer que ce gène répondrait fortement aux conditions lumineuses, et jouerait un rôle dans le contrôle du timing de la floraison (Bi *et al.*, 2016). **Ces hypothèses permettent d'illustrer les modifications d'expression de VvMFT1 et de VvCLE25-1 en lien avec l'augmentation des teneurs en saccharose pour la mise à l'obscurité à 60JAD et 103JAD.**

Dans le chapitre précédent nous avons montré que ces deux gènes joueraient un rôle dans la régulation et le contrôle du développement en participant à la régulation et la différenciation cellulaire des méristèmes apicaux et latéraux. Ainsi, leur surexpression durant la phase d'ontogenèse favoriserait la différenciation et la ramification des méristèmes inflorescentiels (Clark *et al.*, 1995 ; Autran et Traas, 2001 ; Lenhard et Laux, 2003 ; Heidstra et Sabatini, 2014 ; Yang et Jiao, 2016 ; Morot-Gaudry *et al.*, 2017). Au contraire, **lorsque le bourgeon est mis au noir au début de l'organogenèse, ces deux gènes sous exprimés (surtout dans N0) pourraient alors réduire la formation et la ramification des PI** induisant ainsi la diminution du poids et des ramifications comme observé. Comme nous l'avons également montré lors des expérimentations utilisant l'ABA exogène, ces gènes semblent être régulés par les équilibres hormonaux, ce que nous n'avons pas pu vérifier en raison d'un seul prélèvement en fin de cycle. Des prélèvements tout au long du cycle de développement nous auraient vraisemblablement permis d'observer des variations d'équilibre hormonal et d'expression de gène.

Ainsi la réponse au manque de lumière pourrait varier selon la période et/ou la durée de mise à l'obscurité. Nos expérimentations ne nous permettent pas d'évaluer si les effets observés sur la morphologie, les teneurs en assimilats carbonés et l'expression des gènes sont dus à la période ou à la durée d'application. Pour étudier ces effets, nous aurions dû réaliser trois types d'expérimentations supplémentaires en appliquant à des dates différentes la même durée d'obscurité. Mais dans tous les cas, nous pouvons affirmer que **l'absence de lumière induit une limitation de la formation des primordia inflorescentiels qui se traduit par une diminution du poids des bourgeons et une moindre ramification des PI. Ces altérations des mécanismes d'ontogenèse et d'organogenèse semblent être directement liées aux teneurs en sucres et à deux gènes remarquables que sont VvMFT1 et VvCLE25-1 tous**

deux impliqués dans les mécanismes de ramification des PI. La mise à l'obscurité précoce pendant la formation des PI réduit l'expression de ces gènes et limite la disponibilité en sucres solubles provoquant la forte chute du poids du bourgeon et le blocage du passage de la phase d'organogenèse à l'ontogenèse. Une régulation hormonale semble être privilégiée mais demande à être confirmée. La mise à l'obscurité à la fin de la phase d'organogenèse entraîne au contraire une surexpression de ces deux gènes avec accumulation de sucres solubles et saccharose mais de manière insuffisante pour permettre au PI de se ramifier correctement. Outre une possible régulation par les régulateurs hormonaux, une régulation par le saccharose semble plus appropriée. Enfin, la mise à l'obscurité tardive en fin de phase d'ontogenèse augmente également l'expression de *VvMFT1* et *VvCLE25-1* mais aussi les teneurs en sucres solubles sans induire à priori de stress, permettant ainsi de rattraper partiellement le retard de ramification.

III. Effets de l'effeuillage sur l'initiation, la différenciation et la ramification des primordia inflorescentiels des bourgeons latents de vigne

L'effeuillage est une pratique viticole qui consiste à enlever une partie des feuilles situées dans la zone fructifère afin d'améliorer l'état sanitaire et la maturation des grappes en favorisant l'aération et l'ensoleillement des fruits. Généralement effectuée entre nouaison et véraison, cette pratique est courante dans la région bordelaise et systématiquement utilisée dans notre vignoble expérimental. Si les effets positifs sur l'amélioration de l'état sanitaire et la maturation des fruits sont largement démontrés (Beauchet *et al.*, 2014), le risque principal de cette technique est une surexposition des fruits pouvant induire une dégradation précoce des précurseurs aromatiques ou des phénomènes d'échaudage. De plus, Candolfi-Vasconcelos et Koblet (1990), Lebon *et al.* (2005) et Vaillant-Gaveau *et al.* (2014) ont démontré qu'après un effeuillage précoce autour de la floraison- nouaison, la croissance et les performances de la vigne étaient significativement impactées les années suivantes. Enfin, de nombreux travaux ont également prouvé que l'effeuillage précoce pouvait réduire le compactage des grappes (Poni *et al.*, 2006). Aujourd'hui, le contexte de changement climatique oblige les viticulteurs à réfléchir leurs pratiques viticoles et notamment l'effeuillage.

Les résultats obtenus dans la partie II de ce chapitre ont mis en évidence l'importance de la lumière sur les mécanismes de production et de formation des primordia inflorescentiels. En éliminant partiellement ou totalement les feuilles dans la zone fructifère entre nouaison et véraison, les bourgeons qui se situent dans cette zone voient leur exposition à la lumière augmenter. On peut donc se poser la question de l'impact de cette pratique ou au contraire de son absence, sur la formation des primordia inflorescentiels dans les bourgeons. Pour cette raison, une expérimentation visant à comparer la composition de bourgeons issus de plantes effeuillées et non effeuillées a été mise en place sur la parcelle de Merlot déjà étudiée. La pratique courante du viticulteur étant l'effeuillage d'une face au stade petit pois (103JAD), les souches effeuillées seront considérées comme « témoin » en comparaison des souches non effeuillées.

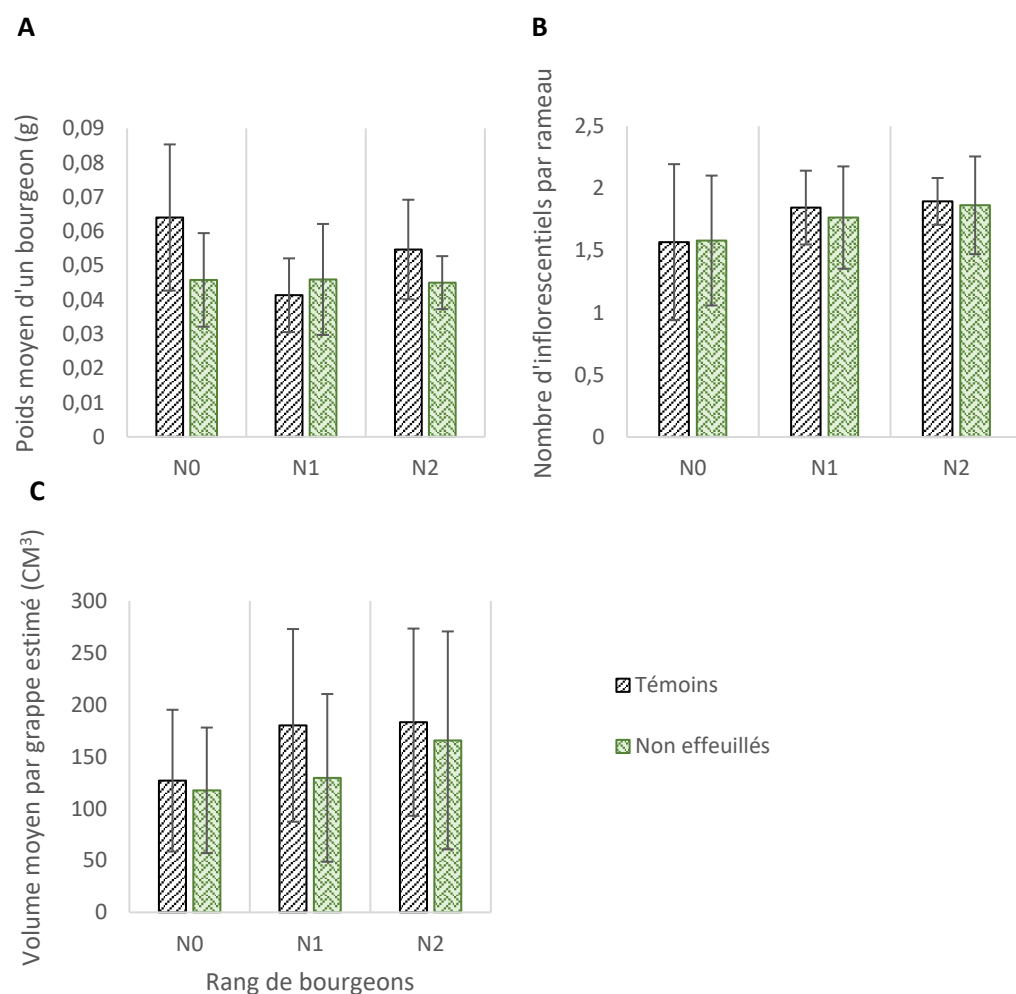


Figure 74 : Effets de l'effeuillage sur (A) le poids moyen d'un bourgeon, (b) la fertilité potentielle apparente en 2017 et (C) le rendement estimé en 2017.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de (A) 15 répétitions, (B) et (C) 40 répétitions ; * représente les différences significatives avec les témoins ($p < 0,05$) selon le test ANOVA.

III.1. Résultats

III.1.1. Effets de l'effeuillage sur le poids moyen des bourgeons, la fertilité apparente et le volume des grappes

Les effets de l'effeuillage sur le poids moyen des bourgeons, la fertilité potentielle apparente et le volume des grappes sont présentés, et aucune différence significative n'a été observée (Figure 74).

Nous tenons à préciser ici, que ces mesures sont à relativiser puisqu'elles ont été réalisées en 2017 après l'épisode de gel qui a pu impacter le développement des inflorescences même si notre parcelle ne présentait pas de syndrômes sévères de gel.

III.1.2. Effets de l'effeuillage sur les teneurs en ABA libre, AIA libre et cytokinines

Les modifications des teneurs en ABA libre, AIA libre et CKs dans les bourgeons suite à un effeuillage sont présentées (Figure 75).

Nos résultats démontrent que le maintien du feuillage entraîne une augmentation significative des teneurs en ABA dans les bourgeons en fin de cycle (Figure 75A) contrairement aux teneurs en AIA qui diminuent dans ces même bourgeons (Figure 75B).

A l'image de l'ABA, les teneurs des deux formes actives de CKs détectées (tZR et tZROG) sont réduites dans les bourgeons issus de plantes effeuillées. Les effets sont particulièrement nets pour les bourgeons situés sur les noeuds N0 (Figures 75C et 75D).

III.1.3. Effets de l'effeuillage sur l'expression des gènes remarquables *VvCLE25-1*, *VvTFL1a* et *VvMFT1*

Les modifications d'expression des gènes suite à l'effeuillage sont représentées Figure 76.

Le non effeuillage, provoque une surexpression massive de *VvCLE25-1* (de 5 à 10 fois) pour l'ensemble des bourgeons (Figure 76A) ainsi qu'une augmentation plus faible mais significative du niveau d'expression de *VvMFT1* dans le bourgeon N2 (Figure 76C).

Au contraire, *VvTFL1a* voit son niveau d'expression réduit dans les bourgeons issus de plantes non effeuillées (Figure 76B), sans différence significative entre les types de bourgeon.

III.1.4. Effets de l'effeuillage sur les teneurs en glucides

L'effeuillage provoque également des modifications de teneur en glucides dans les bourgeons (Figure 77).

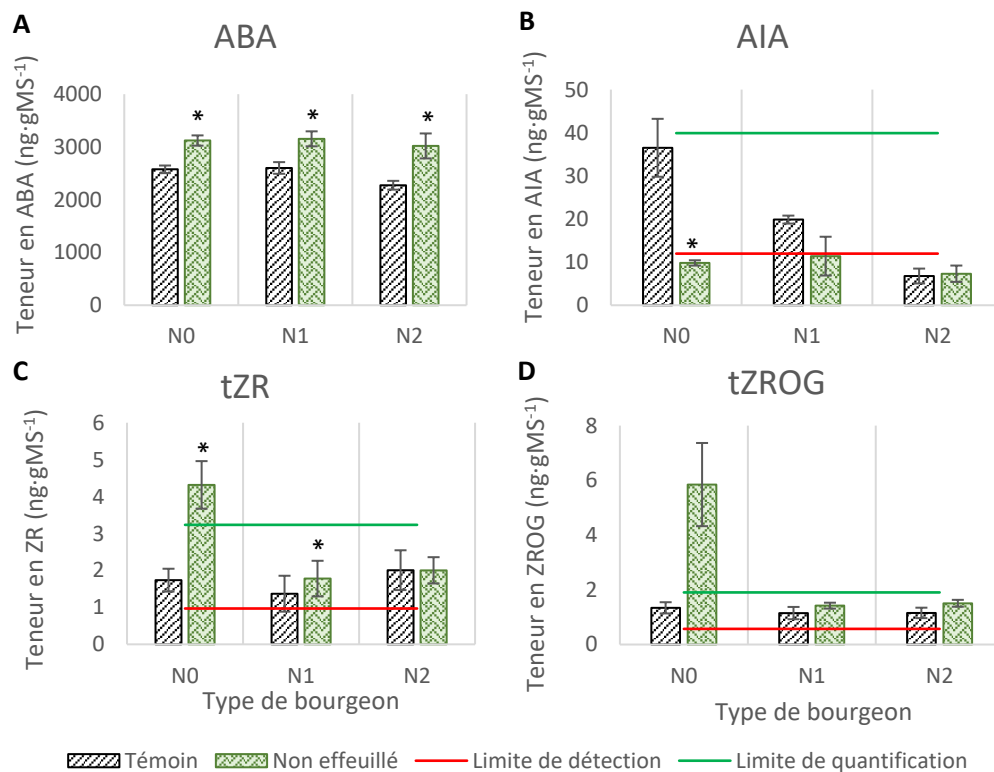


Figure 75 : Effets de l'effeuillage sur les teneurs en (A) ABA libre, (B) AIA libre, (C) tZR et (D) tZROG dans les bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; * représente les différences significatives avec les témoins ($p < 0,05$) selon le test ANOVA.

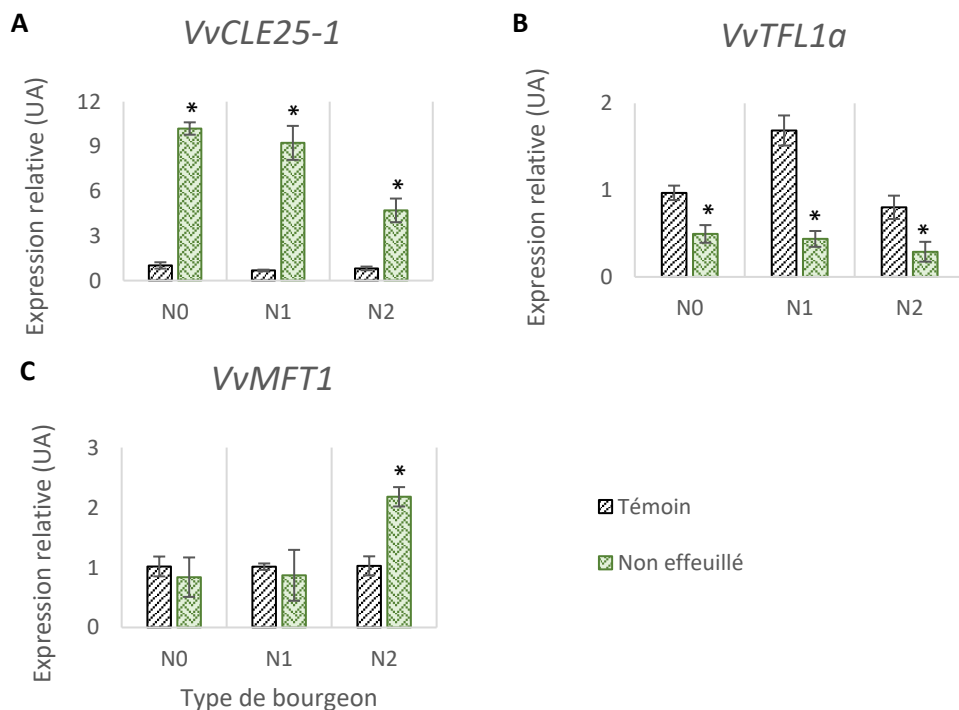


Figure 76 : Effets de l'effeuillage sur l'expression des gènes (A) *VvCLE25-1*, (B) *VvTFL1a* et (C) *VvMFT1* dans les bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; * représente les différences significatives avec les témoins ($p < 0,05$) selon le test ANOVA.

Le D-Glucose et le D-Fructose voient leurs teneurs augmenter dans les bourgeons issus de plantes non effeuillées (Figures 77A et 77B), alors qu'aucun effet significatif n'est observable pour le saccharose (Figure 77C) et l'amidon (Figure 77D).

III.2. Discussion

L'impact de l'effeuillage sur le rendement de l'année en cours et de l'année suivante est un sujet qui intéresse de nombreux chercheurs depuis presque 30 ans. Diverses études ont rapporté qu'en fonction de la période et de l'intensité de l'opération (effeuillage sur une face ou double face), l'effeuillage a un impact plus ou moins important sur le rendement de l'année en affectant essentiellement le poids des baies (Candolfi-Vasconcelos et Koblet, 1990 ; Koblet *et al.*, 1994 ; Howell *et al.*, 1994 ; Caspari *et al.*, 1998 ; Bennett *et al.*, 2005). En revanche, si les effets de l'effeuillage sur le rendement de l'année en cours sont relativement convergents, ils sont beaucoup plus controversés en ce qui concerne la fertilité potentielle apparente des bourgeons latents et le rendement de l'année suivante. Pour certains auteurs, les effets de l'effeuillage sur la fertilité potentielle apparente des bourgeons sont nuls (Zoecklein *et al.*, 1992 ; Howell *et al.*, 1994 ; Koblet *et al.*, 1994 ; Poni *et al.*, 2006), pour d'autres, ils sont négatifs en réduisant les activités photosynthétiques, et donc la disponibilité en glucides assimilables et de réserve (Candolfi-Vasconcelos et Koblet, 1990 ; Bennett *et al.*, 2005) et enfin pour une autre catégorie, positifs en modifiant le microclimat (température, lumière, humidité relative) de la zone fructifère (Bledsoe *et al.*, 1988 ; Kliwer et Smart, 1989 ; Reynolds *et al.*, 1996 ; Sanchez et Dokoozlian, 2005). De ce fait, les effets de l'absence ou de la présence de feuilles n'ont pas réellement été étudiés sur les mécanismes régulant les phases d'ontogenèse et d'organogenèse en lien notamment avec l'effet de la luminosité.

L'objectif de cette expérimentation était, grâce aux résultats obtenus dans la partie précédente de ce chapitre, d'identifier un lien potentiel entre la pratique de l'effeuillage (ou du non effeuillage) et la modification potentielle de la luminosité sur le bourgeon.

Dans notre étude, l'effeuillage qui est la pratique témoin a été effectué sur une face, coté nord à 103JAD, soit en pleine phase d'ontogenèse et correspondant au stade phénologique « petit pois ». Le non effeuillage à ce stade-là n'affecte pas significativement le poids moyen des bourgeons, la fertilité potentielle apparente et le rendement estimé de l'année suivante, corroborant les observations de Zoecklein *et al.* (1992), Howell *et al.* (1994), Koblet *et al.* (1994) et Poni *et al.* (2006).

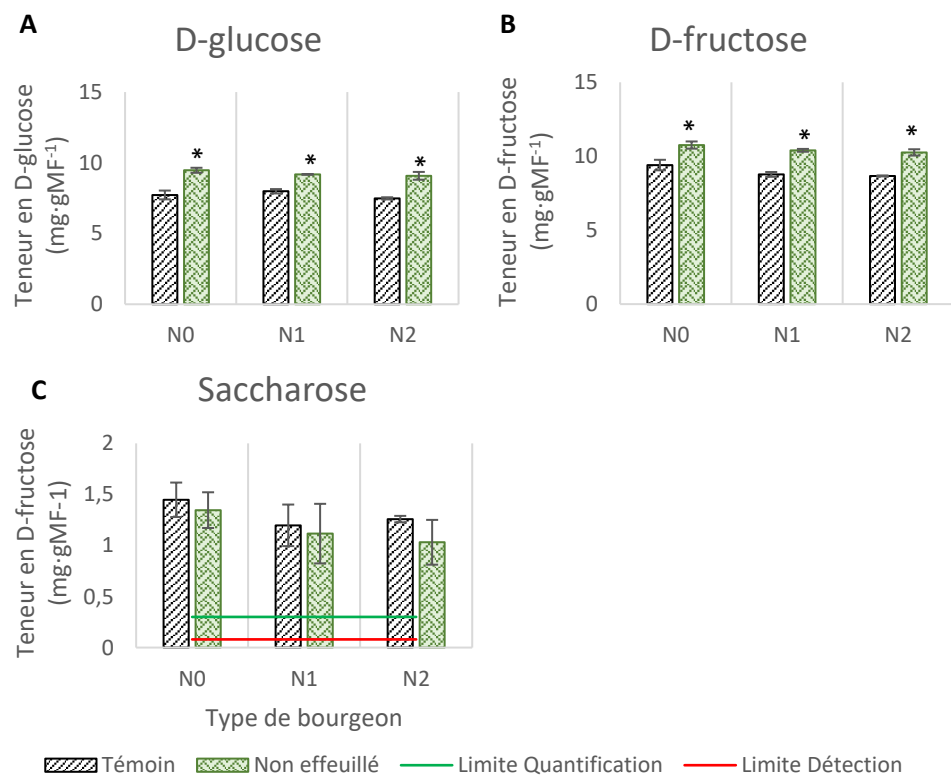


Figure 77 : Effets de l'effeuillage sur les teneurs en (A) D-glucose, (B) D-fructose, (C) saccharose et (D) amidon dans les bourgeons N0, N1 et N2 en 2016.

Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart-type moyen de trois répétitions ; * représente les différences significatives avec les témoins ($p < 0,05$) selon le test ANOVA.

Cependant, le maintien des feuilles induit des effets importants sur les teneurs en hormones, en sucres solubles ainsi que sur l'expression des gènes, et ceci de manière plus marquée que le traitement de mise à l'obscurité appliqué au même stade laissant supposer que ces effets ne seraient pas en lien avec la diminution de la luminosité induite par la présence de feuilles.

Lorsque le feuillage est maintenu, les sucres solubles sont augmentés ainsi que les teneurs en cytokinines et en acide abscissique alors que l'AIA voit ses teneurs réduites. En ce qui concerne l'expression des gènes, *VvTFL1a* est réprimé alors que *VvCLE25-1* est surexprimé. Au regard des résultats obtenus dans les chapitres précédents, l'évolution de tous ces indicateurs nous laissent penser que le maintien du feuillage favoriserait la ramification des PI grâce à une meilleure disponibilité des sucres (Zapata *et al.*, 2004 ; Lebon *et al.*, 2006 ; Lebon *et al.*, 2008 ; Vaillant-Gaveau *et al.*, 2014), une diminution des phénomènes de dominance apicale en raison de la chute de l'AIA (Bessis 1965) et une stimulation de la division cellulaire par les cytokinines actives (Roman *et al.*, 2016), les sucres (King et Evans, 1991 ; Heyer *et al.*, 2004 ; Turnbull, 2011 ; King, 2012) et la surexpression de *VvCLE25-1* en lien avec la répression de *VvTFL1a* (Pearce *et al.*, 1991 ; Clark *et al.*, 1995 ; Joly *et al.*, 2004 ; Boss *et al.*, 2006 ; Yao *et al.*, 2010 ; Tominaga-Wada *et al.*, 2013 ; Morot-Gaudry *et al.*, 2017).

Par contre, nos résultats ne nous permettent pas réellement d'émettre une hypothèse sur le mode de fonctionnement de ces mécanismes entre eux, plusieurs niveaux de régulation pouvant être envisagés. Comme démontré précédemment, la surexpression de *VvCLE25-1* et la sous-expression de *VvTFL1a* seraient toutes les deux impliquées dans le contrôle méristématiques en favorisant la différenciation et la ramification des primordia inflorescentiels, en réprimant la maintenance du MAC et des primordias non différenciés (Pearce *et al.*, 1991 ; Clark *et al.*, 1995 ; Joly *et al.*, 2004 ; Boss *et al.*, 2006 ; Yao *et al.*, 2010 ; Tominaga-Wada *et al.*, 2013 ; Morot-Gaudry *et al.*, 2017). Les sucres solubles, outre leur rôle nutritif, pourraient intervenir dans les mécanismes de régulation de ces gènes et les voies de signalisation de la transition florale (King et Evans, 1991 ; Heyer *et al.*, 2004 ; Turnbull, 2011 ; King, 2012). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'activité photosynthétique pourrait même réguler l'expression du gène *FT* (King *et al.*, 2008) et chez la vigne, un traitement avec du saccharose régule négativement l'expression de *VvTFL1a* (Yang *et al.*, 2011), confortant nos observations. Même si les sucres doivent être considérés comme des facteurs essentiels de régulation de ces mécanismes, nous devons aussi envisager le rôle possible des régulateurs hormonaux dont les teneurs varient de manière importante. En effet, il est bien connu que l'AIA et les cytokinines fonctionnent de

manière antagoniste dans le bourgeon, les auxines supportant l'activité méristématique, alors que les cytokinines actives comme tZR et tZROG sont impliquées majoritairement dans le contrôle des mécanismes de différenciation (Moubayidin *et al.*, 2009). Dans notre cas, cette relation antagoniste est parfaitement démontrée dans les bourgeons N0 avec une inversion très nette des équilibres AIA/CKs actives entre les essais effeuillés et non effeuillés. Roman *et al.* (2016), ont démontré que l'augmentation des CKs améliorerait la force des puits en activant les gènes clés du métabolisme des sucres et qu'il existait une relation positive entre ces deux types de familles de molécules, ce qui confirme nos observations. Mais pour ces auteurs, cette activation était liée à une meilleure exposition à la lumière, ce qui n'est pas le cas dans nos travaux puisque ce sont les bourgeons issus des plantes non effeuillées (donc potentiellement qui sont moins éclairées) qui voient évoluer de manière similaire sucres et CKs. On peut donc imaginer, qu'ici cela ne soit pas un effet de la lumière mais peut être un effet des équilibres organe sources/organes puits. En effet, en laissant le feuillage, l'activité photosynthétique est tout simplement plus importante favorisant alors l'accumulation des sucres et donc celles des cytokinines. En revanche, il nous est difficile d'expliquer pourquoi dans ces bourgeons les teneurs en ABA sont plus importantes et pourquoi contrairement aux résultats obtenus au paragraphe I de ce chapitre, l'accumulation d'ABA n'entraîne pas une sous-expression de *VvCLE25-1* et une surexpression de *VvTFL1a*.

Les effets du maintien du feuillage sont donc complexes car même s'ils diminuent la luminosité des bourgeons, les résultats obtenus ne sont que partiellement similaires aux essais de mise à l'obscurité (effets similaires sur l'expression des gènes à la mise à l'obscurité tardive). Ils sont aussi parfois contradictoires avec ceux obtenus lors des applications d'ABA. L'hypothèse du rôle des feuilles en tant que régulateur des relations organe source/organe puit et du rôle des sucres comme signal des équilibres hormonaux et régulation de l'expression des gènes semble privilégiée. Cette hypothèse peut être étayée par le fait que nous observons des effets en fonction de la présence de l'organe oppositifolié. En effet, Xing *et al.* (2015) ont montré dans le cas de la pomme (*Malus domestica* Borkh.) que le changement des équilibres hormonaux et des teneurs en glucides étaient dynamiques au cours des différents stades de différenciation des bourgeons floraux. De même, Lebon *et al.* (2006) montrent que le contenu glucidique des inflorescences variait selon les cépages et selon l'activité glucidiques de feuilles. De ce fait, il nous semble possible de supposer que le comportement spécifique du bourgeon N0 serait lié à l'absence de l'organe oppositi-folié modifiant ainsi les équilibres sources/puits, le bourgeon latent pourrait alors devenir un puit prioritaire au niveau de ce noeud.

Ces premiers résultats, montrent que le fait de réaliser un effeuillage au niveau de la zone des grappes impacte les équilibres hormonaux, glucidiques et moléculaires. En 2016, dans le cas de notre étude sur le Merlot à Bordeaux, il semble que l'effeuillage a impacté plutôt négativement les molécules et régulateurs de la différenciation des PI. La présence d'un organe oppositifolié semble également important dans la modulation de ces effets. Mais en raison du gel de 2017 nous n'avons pas pu observer de différences significatives sur le rendement entre les plantes effeuillées ou non. Ces résultats restent cependant intéressants dans le contexte de la réflexion autour de l'effeuillage et il semble nécessaire de recommencer cette expérimentation en incluant des modalités d'effeuillage plus précoce afin de mieux comprendre l'impact des relations sources/puits et de l'origine des glucides (réserves ou photosynthèse), notamment pour la compréhension de l'induction de l'ontogenèse.

IV. Discussion générale et conclusion

Les deux premiers chapitres de résultats nous ont permis de caractériser les phases clés du développement du bourgeon et d'identifier certains métabolismes pouvant moduler le nombre de PI et la taille des futures inflorescences. Au cours de chacune de ces phases, les métabolismes identifiés semblent être modulés par la lumière, l'équilibre hormonal et la disponibilité en sucres. Dans le cadre de la culture de la vigne, ces facteurs peuvent varier selon les conditions climatiques, les pratiques culturales ou la pression phytosanitaire et impacter fortement le rendement (Zapata *et al.*, 2004 ; Lebon *et al.*, 2006 ; Lebon *et al.*, 2008 ; Vaillant-Gaveau *et al.*, 2014 ; Guilpart *et al.*, 2014), mais les mécanismes d'action restent encore mal identifiés.

Dans ce chapitre, nous avons évalué les effets de trois facteurs (équilibre hormonal, absence de lumière et pratique de l'effeuillage) sur les mécanismes de formation des PI afin de mieux comprendre leur rôle physiologique et d'estimer leur impact sur les premières étapes de la construction du rendement.

Les observations de Guilpart *et al.* (2014) sur le rendement et la détermination d'une période critique entre 400 et 700°CJ ainsi que les résultats obtenus au cours du suivi hormonal du bourgeon, nous ont amené à supposer que l'ABA pouvait être un facteur important de régulation de la fertilité des bourgeons, notamment dans le cas d'un stress hydrique par son rôle dans la tolérance au stress hydrique (Cummins, 1973 ; Bray, 1988 ; Luan, 2002 ; Zhu, 2002, Zhang *et al.*, 2006 ; Zou *et al.*, 2010). Ainsi en s'accumulant dans la plante en raison d'une limitation en eau, l'ABA pourrait modifier les équilibres et donc moduler les mécanismes cellulaires dans le bourgeon.

Dans notre cas, l'apport exogène d'ABA ou de fluridone (inhibiteur de la voie de biosynthèse des caroténoïdes) a totalement perturbé les équilibres hormonaux, carbonés et moléculaires. L'augmentation artificielle des teneurs en ABA a induit une chute des teneurs en CKs et AIA limitant les activités cellulaires. Ces modifications se sont également accompagnées d'une accumulation des teneurs en sucres assimilables qui pourraient soit être une réponse au stress induit par l'ABA à forte dose induisant une augmentation des sucres solubles comme molécules de tolérance au stress (Creelman *et al.*, 1990 ; Kerepesi et Galiba, 2000 ; Carrari *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2004 ; Pospisilova *et al.*, 2005 ; Seki *et al.*, 2007 ; Yin *et al.*, 2010) , soit être relié à la diminution des CKs dont on connaît le lien avec les teneurs en sucres assimilables (Roitsch et Ehneß, 2000 ; Mishra *et al.*, 2009 ; Booker *et al.*, 2010 ;

Kushwah et Laxmi, 2014). Ces modifications biochimiques s'accompagnent également de variation de l'expression des gènes avec une sous-expression de *VvCLE25-1* et une surexpression de *VvTFL1a*, semblant pouvoir retarder la différenciation et la ramification des PI. Pour ces deux gènes, l'ABA ne semblerait pas avoir une action directe sur leur niveau d'expression qui serait plutôt lié à l'équilibre CKs/AIA. En revanche, en ce qui concerne *VvMFT1*, nous avons montré que l'accumulation d'ABA entraînait une surexpression de *VvMFT1*, illustrant le rôle positif de l'ABA sur le gène *MFT* comme déjà rapporté dans la littérature et pour d'autres espèces (Mohamed *et al.*, 2010 ; Xi *et al.*, 2010 ; Tao *et al.*, 2014 ; Bi *et al.*, 2016). Mais en raison, du manque de données de rendement en 2017, nos résultats ne permettent que d'émettre des hypothèses. Cette expérimentation doit être obligatoirement reconduite avec mesure des rendements finaux et observations microscopiques pour valider notre hypothèse. Il serait également intéressant d'évaluer dans des conditions de stress hydrique les teneurs en ABA et les indicateurs du métabolisme de formation des PI afin d'apporter des explications physiologiques aux observations de Guilpart *et al.* (2014).

Pour la première fois, notre étude permet d'affirmer que l'augmentation des teneurs en ABA dans le bourgeon au cours de la phase critique a entraîné des effets indéniables sur l'ensemble des métabolismes impliqués dans la formation des PI et donc potentiellement sur le rendement de l'année N+1.

L'analyse ACP a révélé la lumière comme facteur environnemental commun et important dans la caractérisation de chaque étape du développement du bourgeon. Ce facteur est déjà considéré primordial dans les mécanismes de formation du bourgeon depuis plus de 50 ans (Antcliff *et al.*, 1955 ; May et Antcliff, 1963 ; Baldwin, 1964 ; Buttrose, 1970 ; Kliwer, 1982 ; Dry, 2000), mais pour la première fois il a été évalué en plein champ pour la vigne.

Notre étude vient de démontrer que l'absence de lumière impactait les mécanismes d'initiation, de différenciation et de ramification des PI en réduisant le poids des bourgeons et en alternant le développement des structures secondaires des PI initiés. Cet effet est d'autant plus marqué que la mise à l'obscurité des bourgeons est précoce et touche principalement le métabolisme des sucres et le niveau d'expression des gènes étudiés. Pour les sucres, plusieurs cas de figures sont observés en fonction de la période de mise à l'obscurité. Lorsqu'elle est précoce (entre 35JAD et 60JAD) le saccharose s'accumule alors que les sucres solubles diminuent, au contraire lorsqu'elle est plus tardive (après la phase d'organogenèse les teneur en sucres assimilables (D-glucose et D-fructose) ont tendance à s'accumuler. En ce qui

concerne les gènes étudiés, la mise à l'obscurité précoce entraîne de manière générale dans les bourgeons N0 une sous expression des *VvCLE25-1*, *VvMFT1* et *VvTFL1a* laissant supposer un fort impact négatif sur l'ensemble des mécanismes de formation cellulaire. Plus tard, la mise à l'obscurité entraîne une sous-expression de *VvTFL1a* alors que *VvCLE25-1* et *VvMFT1* sont surexprimés pouvant alors moduler les orientations cellulaires selon la date/durée de la mise à l'obscurité. Mais en raison d'absence d'effets observés sur les indicateurs hormonaux, il est encore difficile de proposer une hypothèse visant à expliquer les mécanismes de modulation des activités cellulaires du bourgeon par le manque de lumière, mais trois hypothèses en fonction de la date/durée de la mise à l'obscurité des bourgeons pourraient être proposées en faisant la comparaison de nos résultats avec les données de la littérature pour d'autres plantes. Au tout début de l'organogenèse (à 35JAD), l'absence de lumière pourrait induire une diminution des activités cellulaires en raison de la sous expression de l'ensemble des gènes et du blocage de transporteurs de saccharose comme cela a été proposé par Chincinska *et al.* (2008). Cette hypothèse est illustrée dans notre cas par une forte diminution du poids des bourgeons, du nombre et de la ramification des PI traduisant le mauvais fonctionnement cellulaire, une baisse de teneur en sucres assimilables et une accumulation de saccharose. Par la suite, la mise à l'obscurité à la fin de la phase d'organogenèse, période où les activités cellulaires atteindraient leur optimum, produirait un effet différent avec induction d'un stress se traduisant par une accumulation des sucres solubles pour leur rôle dans la tolérance au stress (Creelman *et al.*, 1990 ; Kerepesi et Galiba, 2000 ; Carrari *et al.*, 2004 ; Seki *et al.*, 2007 ; Yin *et al.*, 2010). Les organes ayant engagés leur différenciation méristématique pourraient poursuivre leur ramification grâce aux sucres disponibles et à la surexpression de *VvMFT1* alors que le second PI encore dans sa phase d'initiation serait bloqué par l'état de stress. Cette hypothèse est confortée par nos observations microscopiques puisque nous pouvons noter que le 1^{er} PI formé est ramifié mais que le second a du mal à se former, pouvant ainsi réduire partiellement le poids des bourgeons. Enfin, la mise à l'obscurité des bourgeons tardive (à 103JAD) n'a plus beaucoup d'effets sur la fertilité des bourgeons. Pourtant, les glucides assimilables ainsi que *VvCLE25-1* et *VvMFT1* répondent à ce facteur environnemental, ce qui nous fait penser que le ralentissement des activités cellulaires durant cette période pourrait entraîner un système de « rattrapage partiel » du retard de ramification.

Cependant, nous n'avons pas pu établir l'impact réel de la mise à l'obscurité sur le rendement final en année N+1 en raison du gel de 2017 et on ne peut donc le lier qu'aux observations microscopiques des bourgeons en fin de cycle. De plus, notre expérimentation ne nous permet pas de confirmer si la diminution de la fertilité des bourgeons observée en fin de

cycle est due à la date ou à la durée de l'absence de lumière, il est donc indispensable de répéter l'expérimentation en faisant varier date et durée de mise à l'obscurité.

Comme pour de nombreux métabolismes, la lumière est un facteur essentiel. Nous montrons ici, que la suppression de lumière impacte fortement les mécanismes cellulaires de formation des primordia inflorescentiels en modulant préférentiellement le métabolisme des sucres et l'expression des gènes clés. Plus la mise à l'obscurité est précoce et/ou longue, plus le bourgeon présente des défauts d'organisation morphogénique pouvant impacter le rendement final.

Enfin, au regard des résultats préliminaires obtenus dans le cadre de l'expérimentation de mise à l'obscurité et des données nouvelles apportées sur le rôle des sucres en tant que molécule énergétique ou signal, il nous est apparu intéressant d'essayer d'évaluer les effets de l'effeuillage qui peut moduler à la fois la luminosité du bourgeon et les équilibres sources/puits.

Dans le cadre de notre expérimentation où l'on compare des souches non effeuillées et des souches effeuillées à la fin de la phase d'organogenèse sur une face, coté soleil levant, nos résultats montrent que le maintien du feuillage modifie l'ensemble des métabolismes étudiés vers un meilleur fonctionnement des bourgeons, facilitant la formation et la ramification des PI. Ainsi, le maintien du feuillage entraîne une augmentation des teneurs en sucres solubles, des CKs actives et de l'ABA, alors que les teneurs en AIA diminuent. Le maintien du feuillage provoque également une repression de *VvTFL1a* et une surexpression de *VvCLE25-1* favorisant la ramification. Ces résultats convergent avec ceux de Moubayidin *et al.* (2009) et Crane *et al.* (2012), qui avaient montré qu'en cas d'orientation de l'équilibre CKs/AIA en faveur des CKs, la différenciation et la ramification des PI seraient facilitées en augmentant la force « puit » des bourgeons par activation des gènes clés du métabolisme des sucres (Roman *et al.*, 2016) ; ceci entraînant des teneurs en sucres disponibles plus importantes. De ce fait, le maintien du feuillage semblerait modifier la relation sources/puits des bourgeons et favoriserait ainsi la ramification des PI grâce à une meilleure disponibilité des sucres (Zapata *et al.*, 2004 ; Lebon *et al.*, 2006 ; Lebon *et al.*, 2008 ; Vaillant-Gaveau *et al.*, 2014). De plus, *VvTFL1a* qui pourrait jouer un rôle important dans le maintien des méristèmes indifférenciés (Joly *et al.*, 2004 ; Boss *et al.*, 2006 ; Crane *et al.*, 2012) pourrait être régulé négativement par le saccharose (Yang *et al.*, 2011). L'augmentation de la teneur en saccharose et la sous-expression de ce gène confirmeraient cette hypothèse. Ceci est aussi accompagné de la surexpression de *VvCLE25-1*, qui réprimerait le maintien du MAC et favoriserait aussi la différenciation et la ramification des PI (Clark *et al.*, 1995 ; Morot-Gaudry *et al.*, 2017).

Cependant, les effets du maintien du feuillage sur les indicateurs identifiés n'interfèrent pas sur le poids moyens des bourgeons, ni sur leur fertilité et le rendement estimé de l'année N+1. Certains effets paraissent même contradictoires quand on essaye de relier les résultats de cette expérimentation avec ceux obtenus dans le cadre de l'application d'ABA exogène (peut-être en raison d'effets de concentration) ou de la mise à l'obscurité qui est peut-être trop éloignée de la diminution de luminosité dans le cadre du maintien du feuillage. Dans tous les cas, nos résultats ont montré que l'effeuillage pouvait impacter les équilibres hormonaux, glucidiques et moléculaires. Il serait intéressant de répéter les essais afin de vérifier nos premières observations, mais aussi d'étudier l'impact de la date d'effeuillage et de pouvoir évaluer les équilibres sources/puits entre les feuilles et les bourgeons situés à leur aisselle.

Les pratiques culturales et l'action du viticulteur sur la souche modifient de manière importante la physiologie de la plante entière mais également le fonctionnement intrinsèque des organes.

Dans le cas du bourgeon, nous venons de montrer que la suppression d'une partie du feuillage module les équilibres sources/puits et hormonaux avec un fort impact sur la disponibilité des sucres à la fin de la phase d'organogénèse semblant limiter les processus de ramification des futures inflorescences.

Dans ce chapitre, nous avons pu apporter des données préliminaires permettant de confirmer les phases clés de développement du bourgeon, valider des marqueurs physiologiques, biochimiques, hormonaux ou moléculaires et commencer à évaluer l'occurrence de certains facteurs sur la formation des primordia inflorescentiels.

Néanmoins, le fait de n'avoir pu réaliser ces essais que sur une seule année et de ne pas avoir pu finaliser les mesures du rendement final en raison du gel de 2017, ne permet pas à ce jour d'émettre des hypothèses finales sur le mode d'action de ces facteurs et leur impact réel pour le viticulteur.

De nombreux indicateurs convergent pour donner des tendances, mais il est plus que nécessaire de réitérer l'ensemble de ces essais au moins une année.

Conclusion générale et perspectives

Dans un contexte de modification climatique et de variabilité du rendement inter-millésime de plus en plus marqué (Clingeleffer et Krstic, 2001 ; Vasconcelos *et al.*, 2009 ; Clingeleffer, 2010 ; Guilpart *et al.*, 2014), une meilleure compréhension des mécanismes précoces de la construction du rendement s'avère plus que nécessaire. Le viticulteur doit pouvoir posséder des outils lui permettant d'évaluer précocement son potentiel de récolte afin de piloter ses pratiques culturales. Mais le développement de ces outils nécessite de mieux comprendre les mécanismes physiologiques impliqués lors des étapes de la formation du bourgeon, de l'inflorescence, de la fleur et de la baie. A ce jour, alors que les dernières phases de la construction du rendement (floraison, nouaison, formation de la baie) sont bien renseignées, celles concernant la formation et le développement du bourgeon sont restées peu étudiées chez la vigne depuis les années 1970. En effet, Carolus (1970) et Alsaidi (1975) avaient parfaitement décrit le rythme des phases de formation des primordia inflorescentiels pour le Merlot à Bordeaux à cette époque, mais depuis aucuns travaux n'ont repris ces aspects avec une approche physiologique.

L'objectif de notre travail a donc été de :

- caractériser à nouveau le processus de formation des primordia inflorescentiels dans les bourgeons latents de vigne du Merlot de la région bordelaise au regard de la modification climatique depuis 40 ans
- apporter des données nouvelles pour mieux comprendre les interactions physiologiques qui peuvent exister entre certaines voies métaboliques qui favorisent ou non les processus d'induction, d'initiation, de différenciation et de ramification des primordia inflorescentiels
- évaluer l'impact de certains facteurs biotiques et abiotiques sur les processus de formation des primordia inflorescentiels et sur le rendement potentiel
- identifier des marqueurs physiologiques précoces des étapes de formation des primordia inflorescentiels afin de les intégrer dans la construction d'un modèle de prédiction du rendement.

Pour répondre à ces objectifs, nous sommes les premiers à avoir réalisé une étude intégrative en plein champ sur le cépage Merlot en combinant des approches multi-échelles et multi-disciplines, et en utilisant des techniques micro-macroscopiques, moléculaires, hormonales et biochimiques. Les résultats obtenus nous semblent essentiels pour une meilleure compréhension de certains mécanismes impliqués dans les processus de construction du rendement, en particulier ceux participant à la formation des primordia inflorescentiels au

cours de la première année du cycle reproducteur de la vigne, et devraient permettre à terme de proposer au viticulteur des outils d'aide à la décision lui permettant de mieux évaluer précocement son rendement.

La modification du climat bordelais depuis 40 ans a décalé et rallongé la période de formation des primordia inflorescentiels.

La première partie de notre travail a eu pour objectif de réactualiser les travaux de Carolus (1970) sur le Merlot à Bordeaux. Cet auteur et l'équipe du Pr Bouard ont en effet parfaitement caractérisé les étapes de développement de formation des organes du bourgeon ainsi que leur rythme de formation pour le Merlot. Depuis cette période-là, aucuns travaux n'ont porté sur ce sujet pour les cépages bordelais alors que d'autres auteurs (Buttrose, 1970 ; Kasimatis *et al.*, 1975 ; Zelleke et Kliwer, 1979 ; Dunn et Martin, 2000 ; Petrie et Clingeffer, 2005, Jones *et al.*, 2009), pour d'autres cépages et d'autres régions viticoles, ont démontré que les variations climatiques pouvaient fortement moduler ces étapes, le rythme de ces étapes impactant alors la fertilité et le rendement futurs.

Nos travaux confirment l'impact du changement climatique sur cette phase qui débute maintenant 15 jours plus tôt et se termine 15 jours plus tard que ce qui avait été décrit par Carolus (1970). L'analyse des données climatiques permet de montrer que cette précocité peut être reliée à la température moyenne des six premiers mois de l'année, qui est 1,7°C plus élevée pour la dernière décennie en comparaison de la décennie 1960-1970 (source : www.meteo-bordeaux.fr). **Il en ressort que la période actuelle d'initiation, de différenciation et de ramification des PI chez le Merlot s'étend sur une durée plus longue que celle décrite dans les années 1970, en débutant en moyenne 2 semaines plus tôt et se terminant plus de 15 jours après.**

Ce décalage dans le temps et cet allongement de la période des activités physiologiques et cellulaires modifient les données couramment décrites dans la bibliographie et doivent être prises en compte dans la gestion du fonctionnement des flux dans la plante entière pour assurer la formation correcte des différents organes du bourgeon. De plus, à l'image du Merlot, il semble maintenant nécessaire de confirmer ce décalage pour les autres cépages bordelais.

Le rendement potentiel est lié aux étapes clés de formation des primordia inflorescentiels dans le bourgeon.

Au-delà de la période de la formation des primordia inflorescentiels, notre travail a également permis de déterminer deux étapes clés pour les mécanismes de formation des PI, qui conditionneraient ensuite le nombre et la taille des inflorescences :

- une **phase d'organogenèse** précoce pouvant durer jusqu'à environ 3 mois après le débourrement (88JAD) pour les bourgeons de la base du rameau, correspondant à une période d'augmentation rapide du volume des bourgeons et permettant l'initiation des deux premiers PI et la ramification du premier PI ;
- une **phase d'ontogenèse** se poursuivant jusqu'à environ 4 mois après le débourrement (118JAD) pour les bourgeons de la base, correspondant à une phase de faible augmentation du volume du bourgeon et favorisant la ramification du second PI et l'initiation d'un troisième PI capable de se ramifier pour donner une troisième grappe.

A l'interface de ces deux phases, **une période remarquable, entre 60 et 88JAD** et au cours de laquelle les processus d'organogenèse et d'ontogenèse semblent se superposer, a été identifiée comme potentiellement critique pour la formation des PI et le rendement potentiel.

Une phase d'organogenèse au cours des trois premiers mois après le débourrement (35 à 88JAD) pour initier la formation des deux premiers primordia inflorescentiels dans les bourgeons de la base

La première étape de construction du rendement est l'étape d'initiation des anlagen. Cette phase que nous avons appelée phase d'organogenèse est observable très tôt dans les bourgeons de la base du rameau, environ un mois après le débourrement (35JAD). Elle correspond au stade F défini par Carolus en 1970 et est observée 15 jours plus tôt que ce qu'avait décrit cet auteur. Puis, dès que le premier anlage à deux bras est visible, le second commence à être initié. Lorsque celui-ci présente deux bras, nous pouvons commencer à observer les ramifications secondaires du premier anlage, environ 60 jours après le débourrement (60JAD) soit 7 jours plus tôt que les stades G-I définis par Carolus. Cette précocité semble en lien direct avec l'évolution climatique et l'augmentation des températures moyennes de fin d'hiver et de printemps (Nazemille, 1977 ; García de Cortázar-Atauri *et al.*, 2010) et pourrait conditionner le nombre de futures inflorescences ainsi que la taille de la première grappe.

Nos résultats montrent que la précocité de cette période est un facteur clé dans la détermination de la fertilité potentielle réelle des bourgeons car (1) elle permet d'initier le nombre final des primordia inflorescentiels et (2) elle conditionne le début des ramifications

du premier PI formé. Ainsi, la précocité de l'induction de la phase d'organogenèse stimulerait l'initiation précoce du 3^{ème} PI qui aurait plus de temps pour se ramifier et ainsi devenir une inflorescence (Jones *et al.*, 2009 ; Watt *et al.*, 2010) mais également permettrait au premier PI de se ramifier de manière plus importante donnant alors des grappes plus grosses (Mullins *et al.*, 1992 ; Cheema *et al.*, 1996 ; Watt *et al.*, 2010 ; Crane *et al.*, 2012). Nos résultats supportent cette hypothèse dans la mesure où nous avons observé que l'initiation des PI en 2015 était plus précoce qu'en 2014, et que le volume des grappes en 2016 était plus important qu'en 2015 avec notamment en 2016 un pourcentage plus important de très grosses grappes et la présence de très petites grappes provenant essentiellement des 3^{ème} PI différenciés et ramifiés.

Durant cette phase d'organogenèse, le MAC est à l'origine de la formation de tous les primordia du bourgeon (Bessis, 1965). La transition de la phase végétative à la phase reproductrice a lieu dans ce méristème et se décompose en deux étapes : (i) la transition du méristème végétatif en méristème inflorescentiel et (ii) la transition du méristème inflorescentiel en méristème floral (Battey et Tooke, 2002 ; Barbier *et al.*, 2015). Divers facteurs glucidiques, hormonaux et moléculaires seraient impliqués dans le mécanisme de ces transitions en contrôlant division, prolifération et différenciation cellulaires (Battey et Tooke, 2002 ; Mouradov *et al.*, 2002).

Nos travaux ont montré que cette phase d'organogenèse était caractérisée par des teneurs élevées en AIA et en CKs actives, avec un ratio AIA/CKs important entre 35JAD et 60JAD qui s'inversait entre 60JAD et 88JAD. Ces résultats nous permettent de confirmer les rôles positifs de ces deux régulateurs hormonaux dans l'activation de la prolifération, l'expansion et la différenciation des cellules et donc dans l'initiation puis le début de différenciation des PI comme déjà décrit dans la littérature (Champagnat, 1965 ; Bessis, 1965 ; Iwahori, 1967 ; Gea *et al.*, 1994 ; Heller *et al.*, 2000 ; Raven *et al.*, 2005). Le ratio AIA/CKs semble être un marqueur essentiel de transition entre les mécanismes d'initiation et de différenciation : l'AIA jouerait un rôle essentiel pour l'activation de la division et la prolifération des cellules en favorisant la taille du MAC nécessaire à la formation des deux bras des anlagen, puis les CKs permettraient la transition du méristème nécessaire à la ramification (Moubayidin *et al.*, 2009 ; Roman *et al.*, 2016). Au-delà de cet équilibre AIA/CKs, l'ABA en fonction de ses teneurs semble jouer également un rôle positif dans la morphogenèse comme c'est le cas pour *Spirodela*, *Chenopodium rubrum*, la tomate et *Arabidopsis thaliana* (Van Staden et Bornman, 1969 ; Teltscherová et Seidlova, 1977 ; Sharp *et al.*, 2000 ; Barrero *et al.*, 2005 ; Humplik *et al.*, 2015). Les mécanismes de cette action ne sont pas encore clairement identifiés, mais nos travaux visant à modifier les teneurs en ABA par traitements exogènes

montrent que la modulation du métabolisme de l'ABA impacte de manière assez marquée l'équilibre AIA/CKs et que ces modifications d'équilibres hormonaux pourraient avoir des effets promoteurs ou inhibiteurs sur la croissance de la plante, mais aussi sur celle des bourgeons (Popova, 1995 ; Khadri *et al.*, 2006 ; Humplik *et al.*, 2015).

Au cours de cette phase, les changements hormonaux sont accompagnés de modifications importantes des teneurs en glucides, avec une augmentation des teneurs en sucres solubles (D-glucose et D-fructose) alors que celles en saccharose et amidon restent faibles. Comme cela a déjà été décrit dans la littérature, les sucres solubles sont nécessaires à l'initiation des anlagen (Roman *et al.*, 2016) et nos résultats montrent qu'en cas de déficit en glucides solubles (expérimentation de mise à l'obscurité à 35JAD) le nombre de PI formé est diminué. Ainsi l'intensité de l'activité cellulaire dans le bourgeon pourrait dépendre du métabolisme carboné de la plante au cours de cette période et ceci en lien avec les équilibres sources/puits (Sachs et Hackett, 1977 ; Duchêne *et al.*, 2003a ; Vaillant-Gaveau *et al.*, 2014 ; Rubio *et al.*, 2016) ou en lien avec la mobilisation des réserves (Koussa *et al.*, 2004 ; Lebon *et al.*, 2005). Nos travaux ne portant ni sur le débourrement, ni sur la levée de dormance, ne nous permettent pas d'apporter des données nouvelles sur cet aspect. Néanmoins, nos résultats tendent à démontrer qu'il pourrait y avoir un lien entre la teneur en amidon des bourgeons au dernier stade de prélèvement et la fertilité potentielle apparente l'année suivante.

Enfin, cette phase semble également être caractérisée par un ensemble de gènes dont les rôles (où ceux de leurs homologues) ont déjà été décrits dans le contrôle de la transition méristématique et donc pour leur implication potentielle dans l'initiation des PI. Dans notre cas, l'initiation des anlagen semblerait être sous la dépendance de *VvCLE25-1*, *VvCLE-TDIF* et *VvL1L*. *VvCLE25-1*, sous-exprimé durant cette phase, serait un gène impliqué dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire et la taille du MAC en réprimant la prolifération cellulaire (Clark *et al.*, 1995 ; Autran et Traas, 2001 ; Heidstra et Sabatini, 2014 ; Yang et Jiao, 2016), tandis que *VvCLE-TDIF*, surexprimé, pourrait inhiber la différenciation des cellules procambiales dans les bourgeons (Clark *et al.*, 1997 ; Fletcher *et al.*, 1999 ; Ogawa *et al.*, 2008 ; Hirakawa *et al.*, 2010 ; Yaginuma *et al.*, 2011) permettant ainsi l'initiation des anlagen sans que ces derniers commencent à se ramifier. *VvL1L*, dont le niveau des transcrits est élevé pendant l'organogenèse, semble pouvoir aussi jouer un rôle positif dans l'initiation précoce des anlagen par son implication dans l'élongation cellulaire et la morphogenèse de l'hypocotyle (Kwong *et al.*, 2003 ; Alemanno *et al.*, 2008 ; Junker *et al.*, 2012).

En complément, des gènes normalement décrits comme participant à la transition florale (cas de *VvTFL1a*, *VvMADS8* et *VvMFT1*) pourraient également intervenir dans la phase

d'organogenèse. En effet, *VvTFL1a*, comme son homologue *TFL*, est connu pour son rôle dans l'induction des mécanismes de division et de prolifération cellulaires ainsi que dans le maintien des méristèmes indifférenciés, réprimant ainsi la floraison (Shannon et Meeks-Wagner, 1991 ; Joly *et al.*, 2004 ; Boss *et al.*, 2006 ; Danilevskaya et Meng, 2010 ; Iwata *et al.*, 2014). *VvMADS8*, quant à lui, même s'il est moins bien connu, pourrait jouer un rôle dans le développement précoce des inflorescences (Sreekantan et Thomas, 2006 ; Almada *et al.*, 2009 ; Diaz-Riquelman *et al.*, 2012). Enfin, *VvMFT1*, gène peu documenté, semble être un inducteur de la floraison et pourrait jouer un rôle positif dans la transition des méristèmes floraux (Yoo *et al.*, 2004 ; Hedman *et al.*, 2009). De ce fait, la surexpression de *VvTFL1a* et de *VvMADS8*, accompagnée de la très faible expression de *VvMFT1* pendant la phase d'organogenèse pourraient en partie favoriser les activités cellulaires dans les anlagen néoformés et augmenter leur taille.

L'implication de ces gènes est pour la première fois rapportée chez la vigne mais à eux seuls, ils ne peuvent expliquer totalement les processus de formation des anlagen et leur nombre.

- **Une phase remarquable d'organogenèse et d'ontogenèse au cours de troisième mois après le débourrement (60 à 88JAD) pour initier la formation du troisième primordium inflorescentiel et assurer le début de ramification du premier PI dans les bourgeons de la base**

Lorsque les deux premiers PI sont initiés, le premier PI commence à se ramifier. Cette étape pendant laquelle sont observables des processus d'organogenèse et d'ontogenèse semble se dérouler dans les bourgeons de la base du rameau au cours du troisième mois après le débourrement (60 à 88JAD).

Au cours de cette phase, les processus moléculaires, biochimiques et hormonaux mis en place précédemment sont fortement perturbés : l'équilibre AIA/CKs s'inverse au profit des cytokinines, les sucres solubles qui s'accumulaient voient leurs teneurs se stabiliser alors que le saccharose tend à s'accumuler, les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la régulation de la floraison (*VvMADS8*, *VvTFL1a* et *VvMFT1*) sont modifiés. Cet également au cours de cette période que les traitements hormonaux et la mise à l'obscurité modifient le plus l'ensemble de ces processus. Cette période correspond aussi à celle décrite par Guilpart *et al.* (2014) comme étant la période la plus sensible à une limitation hydrique et azotée dans le cadre des mécanismes de construction du rendement.

La deuxième étape de transition méristématique, permettant le début de la ramification des anlagen formés, est marquée par une forte modification des niveaux d'expression des gènes. Alors que *VvL1L*, *VvCLE-TDIF* étaient surexprimés et *VvCLE25-1* sous-exprimé pendant la phase d'organogenèse pour favoriser la prolifération cellulaire du MAC et l'initiation des PI, leur profil d'expression s'inverse entre 60 et 88JAD permettant alors de « libérer » les mécanismes de différenciation et de ramification des PI qui contrôlèrent la taille des PI différenciés. Ainsi, nous pouvons observer à partir de ce moment-là (1) une surexpression de *VvMADS8* qui semblerait favoriser le développement précoce des inflorescences (Sreekantan et Thomas, 2006 ; Almada *et al.*, 2009 ; Diaz-Riquelman *et al.*, 2012), (2) une surexpression de *VvTFL1a* connu pour son rôle dans l'induction de la prolifération cellulaire et le maintien du méristème indifférencié (Shannon et Meeks-Wagner, 1991 ; Joly *et al.*, 2004 ; Boss *et al.*, 2006 ; Danilevskaya et Meng, 2010 ; Iwata *et al.*, 2012), et (3) une sous-expression de *VvMFT1* qui pourrait favoriser la précocité de la floraison (Yoo *et al.*, 2004 ; Hedman *et al.*, 2009). L'ensemble de ces modulations de niveau d'expression participerait ainsi à la transition des méristèmes végétatifs en inflorescentiels et permettrait le début de ramification des PI formés.

Il est connu, que la famille des gènes *MFT/FT/TFL* pouvait être régulée par la teneur en saccharose, ou par la durée d'obscurité chez de nombreuses plantes comme le chrysanthème, *Physcomitrella patens* ou *Hevea brasiliensis* (Kobayashi *et al.*, 1999 ; Hedman *et al.*, 2009 ; Kikuchi *et al.*, 2009 ; Bi *et al.*, 2016 ; Sun *et al.*, 2017). Dans notre cas, l'évolution des niveaux d'expression de *VvMFT1* est corrélée à l'accumulation de saccharose à cette période et notre expérimentation de mise à l'obscurité à 60JAD confirme cette hypothèse dans la mesure où le traitement induit une accumulation forte de saccharose et une surexpression du gène *VvMFT1*.

A ce stade-là, les sucres et notamment le saccharose auraient alors un rôle primordial comme molécule signal et pourrait, comme pour la tomate ou le rosier, être impliqués dans le mécanisme de la transition florale et la production des primordia en fonction de la concentration (Corbesier *et al.*, 1998 ; King et Ben-Tal, 2001 ; Dielen *et al.*, 2001 ; Rabot *et al.*, 2012 ; Roman *et al.*, 2016).

Enfin, cette phase est fortement marquée par une inversion des équilibres AIA/CKs avec une accumulation marquée des CKs. Ainsi, l'inversion de l'équilibre AIA/CKs entre le début et la fin de la phase d'organogenèse semble en adéquation avec les rôles attribués à chaque famille. Le faible ratio CKs/AIA à 35JAD met en évidence le rôle de l'AIA dans

l'activation de la division cellulaire et l'organogenèse, alors que le ratio très important de CKs/AIA à 60JAD conforte le rôle de CKs actives dans la prolifération et la différenciation cellulaire permettant le début de la ramification des PI préalablement initiés (Moubayidin *et al.*, 2009 ; Roman *et al.*, 2016). Cette hypothèse est parfaitement illustrée grâce à notre expérimentation visant à moduler les teneurs en régulateurs hormonaux. En effet, l'apport exogène d'ABA a d'une part entraîné une forte diminution des teneurs en AIA et CKs (tZR) sans provoquer le basculement AIA/CKs et d'autre part une accumulation importante de sucres solubles, une diminution du saccharose et une sous-expression de *VvCLE25-1* associée à une surexpression de *VvTFL1a*. L'ensemble de ces modifications s'accordent toutes pour laisser penser qu'il existe des voies de régulations entre sucres, régulateurs hormonaux et expression des gènes pouvant impacter le début de la différenciation et de la ramification des PI en altérant les mécanismes de différenciation cellulaire durant cette phase (entre 60JAD et 88JAD). Néanmoins, nos résultats ne nous permettent pas de proposer des modes de fonctionnement interactif entre ces régulateurs en raison de la complexité de voies de régulations existantes, ainsi que des effets contradictoires décrits dans la littérature, mais nos résultats corroborent certaines descriptions de la littérature (Cutler et Krochko, 1999 ; Du *et al.*, 2013 ; Stetsenko *et al.*, 2015).

Ainsi, pour la première fois, une période remarquable de modification biochimique, hormonale et moléculaire a été caractérisée dans le bourgeon de vigne. Cette période, du fait de ces profonds changements marquerait le « basculement » du bourgeon d'une phase d'organogenèse vers une phase d'ontogenèse, à l'image du passage de l'hétérotrophie à l'autotrophie décrite pour la plante entière par Zapata *et al.* (2004) et Lebon *et al.* (2006). Cette phase correspondrait à la période critique impactant le plus fortement le rendement décrite par Guilpart *et al.* (2014). L'analyse ACP à la fin de cette période (88JAD) confirme cette phase de transition physiologique avec la dispersion des variables.

- **Une phase d'ontogenèse d'une durée d'environ un mois, 3 mois après le débourrement, pour assurer la fin de ramification des primordia infloresciels formés (entre 88 et 118JAD)**

La phase d'ontogenèse correspond à la période de différenciation et de ramification des deux premiers PI initiés et conditionnerait la taille maximale des futures inflorescences.

Cette phase est caractérisée par la poursuite de la transition des méristèmes inflorescentiels en méristèmes floraux des deux premier PI qui vont alors se ramifier ainsi que par la transition du méristème végétatif en méristème reproducteur pour le troisième PI si la phase d'ontogenèse a été précocement initiée. Ainsi, au cours de cette période, le volume

du bourgeon va peu augmenter mais les PI formés font se complexifier. Nos expérimentations de mise à l'obscurité et d'effeuillage réalisées au cours de cette période se traduisent par une réduction de complexité des PI et de taille des inflorescences sans modifier le nombre de PI formés.

Au cours de cette période, le « basculement » observé précédemment au niveau hormonal, biochimique et moléculaire se poursuit avec intensification des signaux associés aux mécanismes de différenciation et de ramification des organes.

L'équilibre AIA/CKs au profit des CKs se maintient avec une prépondérance des formes inactives de CKs pouvant limiter l'action de l'AIA sur le contrôle de l'élongation. Dans certains types de bourgeon et pour un millésime (2015), nous observons un pic d'AIA au cours de cette phase (103JAD) que nous avons pu relier à la présence d'un 3^{ème} PI différencié. Au vu de l'implication de l'AIA dans l'architecture méristématique des inflorescences, nous pouvons penser qu'il pourrait être une cause des différents rendements estimés entre les rangs de bourgeons (Xu *et al.*, 2005 ; Wu et Mcsteen, 2007 ; Barazesh et McSteen, 2008 ; Gallavotti *et al.*, 2008 ; Shimizu-Sato *et al.*, 2009).

A partir du début de cette période, les teneurs en glucides solubles restent importantes traduisant le besoin énergétique du bourgeon en lien avec la pleine activité photosynthétique (Lebon *et al.*, 2004 ; Zapata *et al.*, 2004). Les teneurs en saccharose restent également élevées liées au rôle de molécule favorisant la régulation de la différenciation (Roman *et al.*, 2016).

En ce qui concerne les gènes étudiés, l'évolution de leur niveau d'expression confirme les hypothèses établies précédemment pour le contrôle de transition des méristèmes. *VvL1L* présente maintenant une sous-expression marquée à partir de 88JAD, ce qui favoriserait la différenciation et la ramification des PI, et confirmerait son éventuel rôle positif dans l'organogenèse précoce en stimulant l'élongation cellulaire (Kwong *et al.*, 2003 ; Gaj *et al.*, 2005 ; Chiappetta *et al.*, 2009). *VvMADS8* et de *VvTFL1a* voient également leur expression diminuer rapidement et définitivement durant cette phase. Leur sous-expression durant cette phase marquerait la phase finale d'organogenèse, et réprimerait le maintien des méristèmes en favorisant leur différenciation et ramification (Joly *et al.*, 2004 ; Sreekantan et Thomas, 2006 ; Carmona *et al.*, 2007 ; Almada *et al.*, 2009 ; Crane *et al.*, 2012). Enfin, l'augmentation continue du niveau d'expression de *VvMFT1* relèverait ainsi la transition active des méristèmes inflorescentiels en méristèmes floraux et contrôlerait le timing de la floraison (Yoo *et al.*, 2004 ; Iwata *et al.*, 2012 ; Randoux *et al.*, 2012).

Ainsi, 3 mois après le débourrement, les bourgeons de la base auraient acquis leur

fertilité potentielle réelle et le nombre de futures inflorescences serait définitivement fixé. Par contre, au cours de cette phase, les processus de ramification qui vont se dérouler sur plusieurs semaines seront plus ou moins intenses pouvant ainsi moduler la taille de la future grappe. L'expérimentation de mise à l'obscurité à 106JAD illustre bien cette affirmation puisque seule une simplification de l'organisation des PI est observée. Néanmoins, les effets sur nos marqueurs sont plus complexes car nous observons une surexpression de *VvCLE25-1* et *VvMFT1*. De nombreux auteurs (Clark *et al.*, 1995 ; Autran et Traas, 2001 ; Lenhard et Laux, 2003 ; Heidstra et Sabatini, 2014 ; Yang et Jiao, 2016 ; Morot-Gaudry *et al.*, 2017) ont démontré que l'absence de lumière impactait fortement ces gènes avec des effets très variables et notamment des niveaux d'expression qui peuvent osciller. Le fait d'avoir réalisé uniquement un prélèvement à la fin du cycle, ne nous permet pas d'illustrer ces variations de niveau d'expression qui pourraient expliquer la moins bonne ramification.

L'étude des effets de l'effeuillage ou de l'absence d'effeuillage a été aussi réalisée en pleine phase d'ontogenèse à 103JAD. La suppression des feuilles pendant cette période-là modifie également certains équilibres : les teneurs en CKs diminuent, le niveau d'expression de *VvTFL1a* est plus important que dans le cas d'un non effeuillage alors que c'est le contraire pour *VvCLE25-1*, les teneurs en sucres solubles sont réduites. Selon les rôles établis pour ces indicateurs, il nous semble possible de supposer que la maintien du feuillage pourrait favoriser la différenciation et la ramification des PI durant la phase d'ontogenèse, en lien vraisemblablement avec un ensemble de mécanismes provoquant un changement de relation sources/puits et entraînant une meilleure disponibilité en sucres, sachant que l'absence de lumière durant cette phase n'a pas d'effets sur la fertilité réelle des bourgeons (Zapata *et al.*, 2004 ; Lebon *et al.*, 2006 ; Lebon *et al.*, 2008 ; Vaillant-Gaveau *et al.*, 2014). L'ensemble de ces observations laisse supposer un impact potentiel de la pratique de l'effeuillage sur la taille des inflorescences, mais en raison du gel de 2017 nos résultats ne permettent pas de le démontrer significativement. Cet impact pourrait varier en fonction de la période d'application, des répétitions de l'expérimentation, ainsi que l'application d'effeuillage à différentes dates (précoce ou tardive) ; ces aspects doivent donc être envisagées pour évaluer de façon complète les effets de cette pratique culturale.

- **Une phase de ralentissement des activités pour aller jusqu'à l'entrée en dormance (118JAD – 159JAD) mais permettant au 3^{ème} PI de se ramifier**

La fertilité potentielle apparente des bourgeons, déterminée en grande partie par les deux phases primordiales d'organogenèse et d'ontogenèse des bourgeons, pourrait être réévaluée au cours cette phase finale qui coïncide avec l'entrée en dormance des bourgeons.

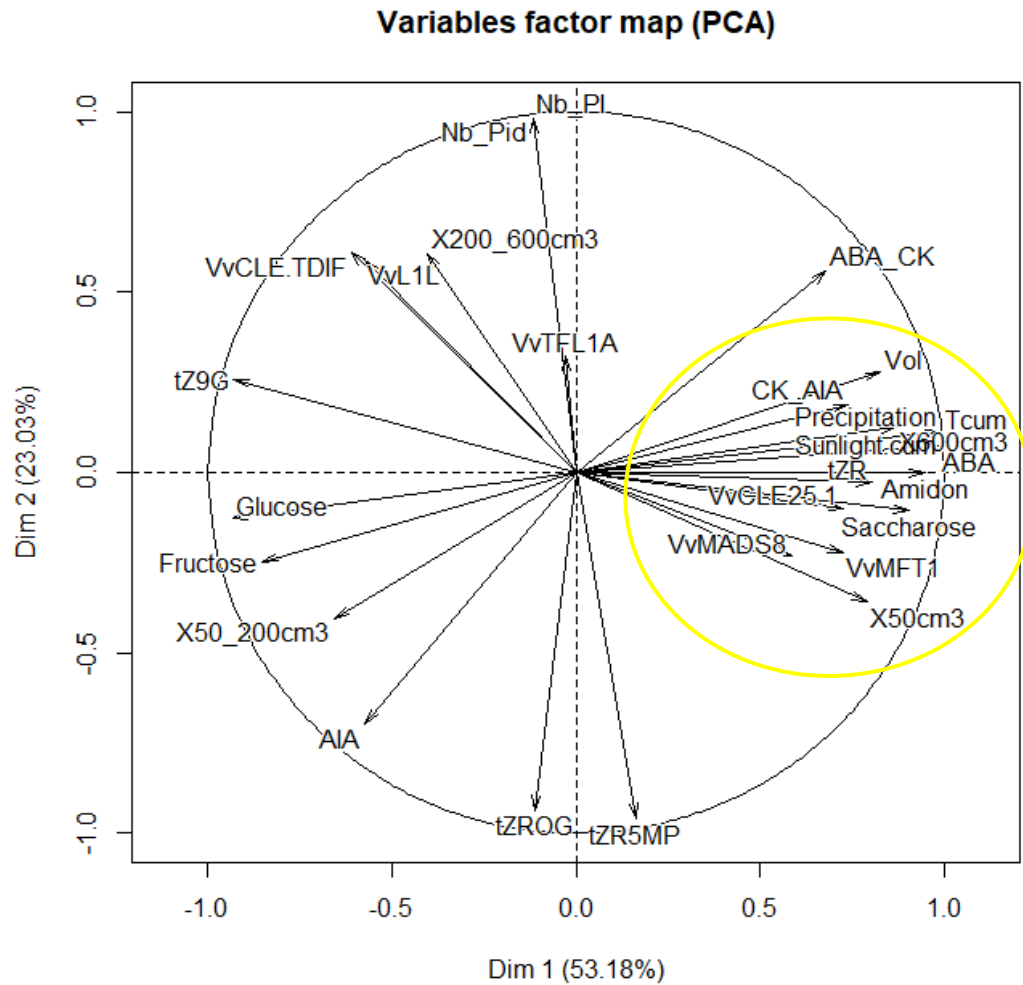


Figure 78 : Représentation ACP des différentes variables suivies à 159JAD durant la première année de développement des bourgeons en 2015 et 2016 incluant la fertilité potentielle apparente des bourgeons et le rendement estimé.

Tcum : température moyenne journalière cumulée à 159JAD ; **Sunlight.cum** : ensoleillement journalier cumulé à 159JAD ; **Nb_PI** : nombre de PI ; **Nb_Pid** : nombre de PI différenciés ; **ABA_CK** : ratio ABA/CKs actives ; **CK_AIA** : ratio CKs actives/AIA

Nos travaux ont montré qu'à la fin de cette phase pour le Merlot à Bordeaux, la fertilité potentielle réelle ne dépassait pas 3 PI par bourgeon pour les 3 millésimes étudiés, par contre le rendement final et la taille des grappes en N+1 variait d'une année à l'autre. Deux PI sont toujours bien ramifiés et deviendront des grappes, alors que le troisième peut rester à l'état d'anlage ou peut évoluer en future grappe selon la précocité de son initiation et sa capacité de ramification au cours de cette dernière phase terminale. Ainsi, pour le Merlot le rendement final semble être plus lié au degré de ramification des PI qu'au nombre de grappes.

Au cours de cette phase, les indicateurs de la fin des mécanismes de transition méristématique et des mécanismes liés à l'entrée en dormance apparaissent comme majoritaires.

Les teneurs en AIA restent très faibles, confirmant la fin de la croissance du MAC. Les CKs actives ne sont plus détectables, alors que tZ9G est à son maximum, ce qui marquerait un ralentissement des activités cellulaires en raison des phénomènes de *N*-glycosylation (Hou *et al.*, 2004). L'ABA libre évolue également de manière similaire à celle décrite par Koussa *et al.* (2004) au moment de l'entrée en dormance des bourgeons, suggérant une accumulation d'ABA-GE nécessaire à l'accumulation du saccharose et de l'amidon comme nous avons pu l'observer. Cet amidon, accumulé dans les primordia foliaires, dont le rôle est à ce jour inconnu durant cette phase, semble par contre essentiel pour la qualité du débourrement et le début de la phase d'organogenèse des bourgeons l'année suivante (Duchêne *et al.*, 2003b ; Lebon *et al.*, 2005 ; Vaillant-Gaveau *et al.*, 2014 ; Rubio *et al.*, 2016). Un lien entre la teneur en amidon des bourgeons au moment de l'entrée en dormance et le nombre d'inflorescences ainsi que leur taille l'année suivante a pu être mis en évidence par l'analyse ACP (Figure 78) ; ceci est confirmé aussi par une forte corrélation entre la teneur en amidon et le nombre des PI différenciés ($r=0,74$; $p\text{-value}<0,001$) (Annexe 1), mais la poursuite d'investigations sur les relations mise en réserve et qualité du débourrement est nécessaire.

La fin du cycle est aussi marquée par des variations d'expression des gènes étudiés. Les gènes favorisant le maintien du fonctionnement méristématique sont globalement sous-exprimés (*VvL1L*, *VvTFL1a* et *VvMADS8*), alors que les gènes impliqués plutôt positivement dans le contrôle de la transition, la différenciation et la ramification des méristèmes voient leur expression continuer à augmenter (*VvCLE25-1* et *VvMFT1*). Ainsi, plus ces gènes seraient longtemps exprimés plus la ramification du troisième PI pourrait être importante, favorisant alors l'augmentation du rendement. Au cours de cette phase, il semblerait que *VvTFL1a* et *VvMFT1* puissent être contrôlés respectivement par les CKs et l'ABA comme cela a déjà été

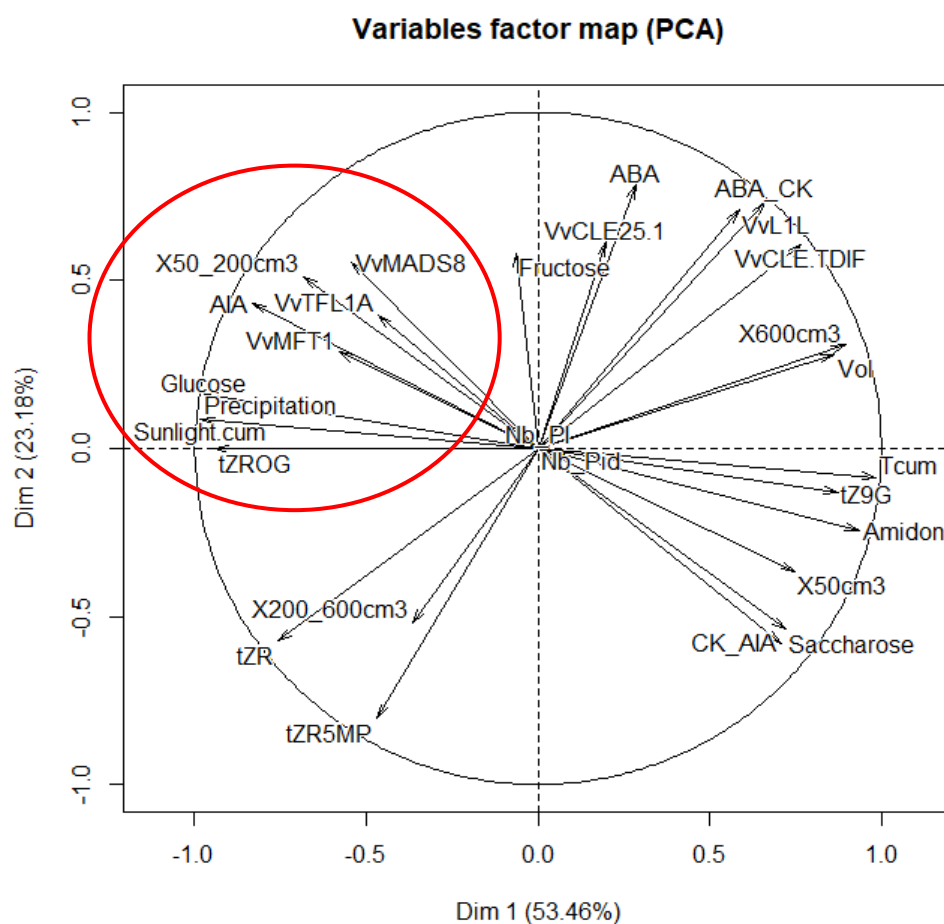


Figure 79 : Représentation ACP des différentes variables suivies à 35JAD durant la première année de développement des bourgeons en 2015 et 2016 incluant la fertilité potentielle apparente des bourgeons et le rendement estimé.

Tcum : température moyenne journalière cumulée à 35JAD ; **Sunlight.cum** : ensoleillement journalier cumulé à 35JAD ; **Nb_PI** : nombre de PI ; **Nb_Pid** : nombre de PI différenciés ; **ABA_CK** : ratio ABA/CKs actives ; **CK_AIA** : ratio CKs actives/AIA

démontré (Xi *et al.*, 2010 ; Crane *et al.*, 2012 ; Mimida *et al.*, 2013). Ces observations sont confortées par les résultats obtenus lors des expérimentations avec les traitements hormonaux dans la mesure où l'apport exogène d'ABA, réduit les teneurs en CKs et induit une augmentation du niveau d'expression de *VvMFT1* tout en limitant l'expression de *VvTFL1a*. Le maintien d'un niveau suffisant d'expression de *VvMFT1* pourrait ensuite favoriser la formation précoce des pièces florales pour l'année suivante.

Les étapes de développement des primordia inflorescentiels caractérisées par de nouveaux marqueurs susceptibles d'être utilisés dans un modèle prédictif précoce du rendement.

L'analyse ACP aux stades clés de développement de bourgeons a pu mettre en évidence un ensemble de marqueurs pouvant être reliés à la fertilité et au rendement (Figures 78 et 79).

La fertilité potentielle réelle et le nombre de PI qui se construisent au cours de la phase d'organogenèse semblent pouvoir être qualifiés par l'équilibre AIA/CKs au profit de l'AIA, la surexpression de *VvTFL1a* et la sous expression de *VvCLE25-1* ainsi que la disponibilité en sucres solubles.

La fertilité potentielle apparente et le nombre de grappes au-delà de 2 par bourgeon semble se définir au cours de la période critique de basculement de la phase d'organogène à la phase d'ontogenèse. Plus ce basculement serait précoce, plus la formation de la troisième grappe semble favorisée. Ce basculement physiologique est peu caractérisé par les indicateurs étudiés mis à part le basculement AIA/CKs au profit des CKs et l'accumulation ponctuelle de saccharose.

Le nombre et la taille finale des grappes l'année suivante semblent quant à eux fonction de la précocité et de la durée de la phase d'organogenèse. Les indicateurs remarquables de cette phase sont l'accumulation d'ABA, d'amidon, de saccharose et la modification des niveaux d'expression des gènes *VvMFT1*, *VVCLE25-1* qui sont sur-exprimés alors que *VvTFL1a* est sous exprimé. Ces marqueurs sont bien corrélés avec le nombre de très grosses grappes mais également de toutes petites grappes issues du 3^{ème} PI.

Les facteurs climatiques qualifiés dans notre travail (somme des températures et ensoleillement cumulés) semblent pouvoir également jouer un rôle important dans le contrôle ou l'induction des mécanismes physiologiques étudiés. En effet, l'analyse ACP (Figure 79) montre que les variables identifiées comme impliquées dans la phase d'organogenèse fonctionneraient avec la lumière cumulée. L'importance de la lumière a aussi été confirmé par

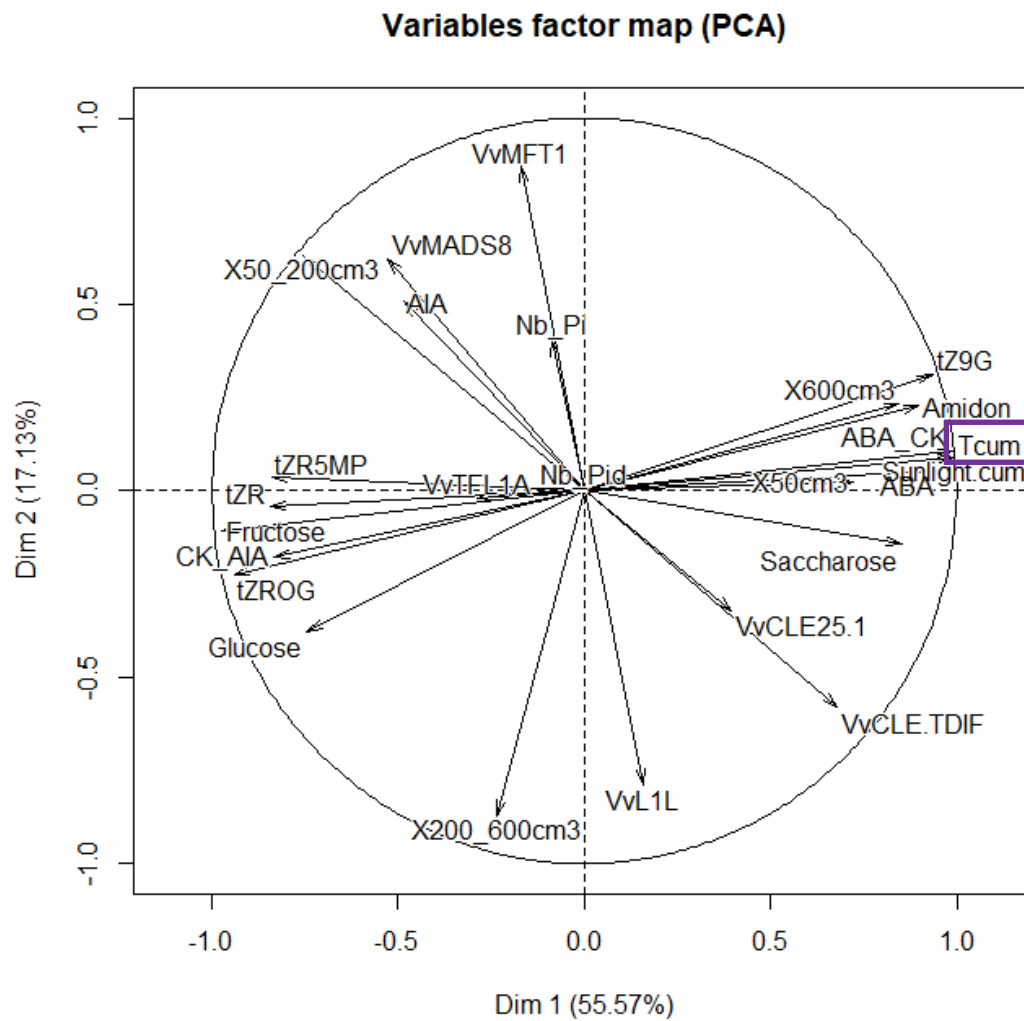


Figure 80 : Représentation ACP des différentes variables suivies à 60JAD durant la première année de développement des bourgeons en 2015 et 2016 incluant la fertilité potentielle apparente des bourgeons et le rendement estimé.

Tcum : température moyenne journalière cumulée à 35JAD ; **Sunlight.cum** : ensoleillement journalier cumulé à 35JAD ; **Nb_PI** : nombre de PI ; **Nb_Pid** : nombre de PI différenciés ; **ABA_CK** : ratio ABA/CKs actives ; **CK_AIA** : ratio CKs actives/AIA

nos expérimentations de mise à l'obscurité qui ont permis de mettre en évidence un impact majeur de l'absence de lumière lors de la phase d'organogenèse avec réduction du nombre de PI. Le début de l'organogenèse serait moins impacté par les températures journalières cumulées, qui ne commenceraient à jouer un rôle important sur l'initiation et la différenciation des PI qu'à partir de 60JAD (Figure 80). En revanche, au cours de la phase d'ontogenèse la lumière et la somme des températures journalières ont pu être mises en relation avec les indicateurs de cette période, laissant supposer comme Jones *et al.* (2005) que les activités cellulaires impliquées dans le développement des bourgeons pourraient continuer à fonctionner même après la dormance en cas de température élevée. La quantité d'amidon accumulée au moment de l'aoutement serait alors un facteur essentiel à la poursuite du fonctionnement des méristèmes du bourgeon.

Dans nos conditions, la pluviométrie n'a pas pu être corrélée à un groupe de variables, semblant indiquer qu'en condition hydrique non limitante ce facteur n'est pas discriminant. Néanmoins, notre expérimentation visant à augmenter les teneurs en ABA (pouvant se produire dans le cas d'un stress hydrique) semble indiquer que ce régulateur hormonal impacte les mécanismes physiologiques et cellulaires dans le bourgeon au moment de la phase critique de basculement de la phase d'organogenèse à la phase d'ontogenèse. Afin de conforter les observations de Guilpart *et al.* (2014) et d'apporter une explication physiologique de l'effet du stress hydrique sur le rendement, la poursuite de ces travaux dans des conditions hydriques limitante semble nécessaire.

Nos résultats ont pour la première fois mis en évidence un ensemble de mécanismes participant au contrôle conjoint des différentes phases de formation des primordia inflorescentiels dans les bourgeons latents de vigne.

Bien que les modes de fonctionnement et les interactions fonctionnelles entre ces différents mécanismes restent encore à définir, nos résultats nous permettent de démontrer l'impact de deux facteurs environnementaux à Bordeaux (lumière et température) sur les processus d'organogenèse et d'ontogenèse, qui participent au contrôle des fluctuations précoce du rendement final.

La Figure 81 vise à résumer ces modes d'interaction en fonction des périodes clés identifiées.

Parmi les mécanismes étudiés, nous avons pu mettre en évidence des marqueurs potentiels de la fertilité réelle, apparente et de la taille des futures grappes (Figures 78 et

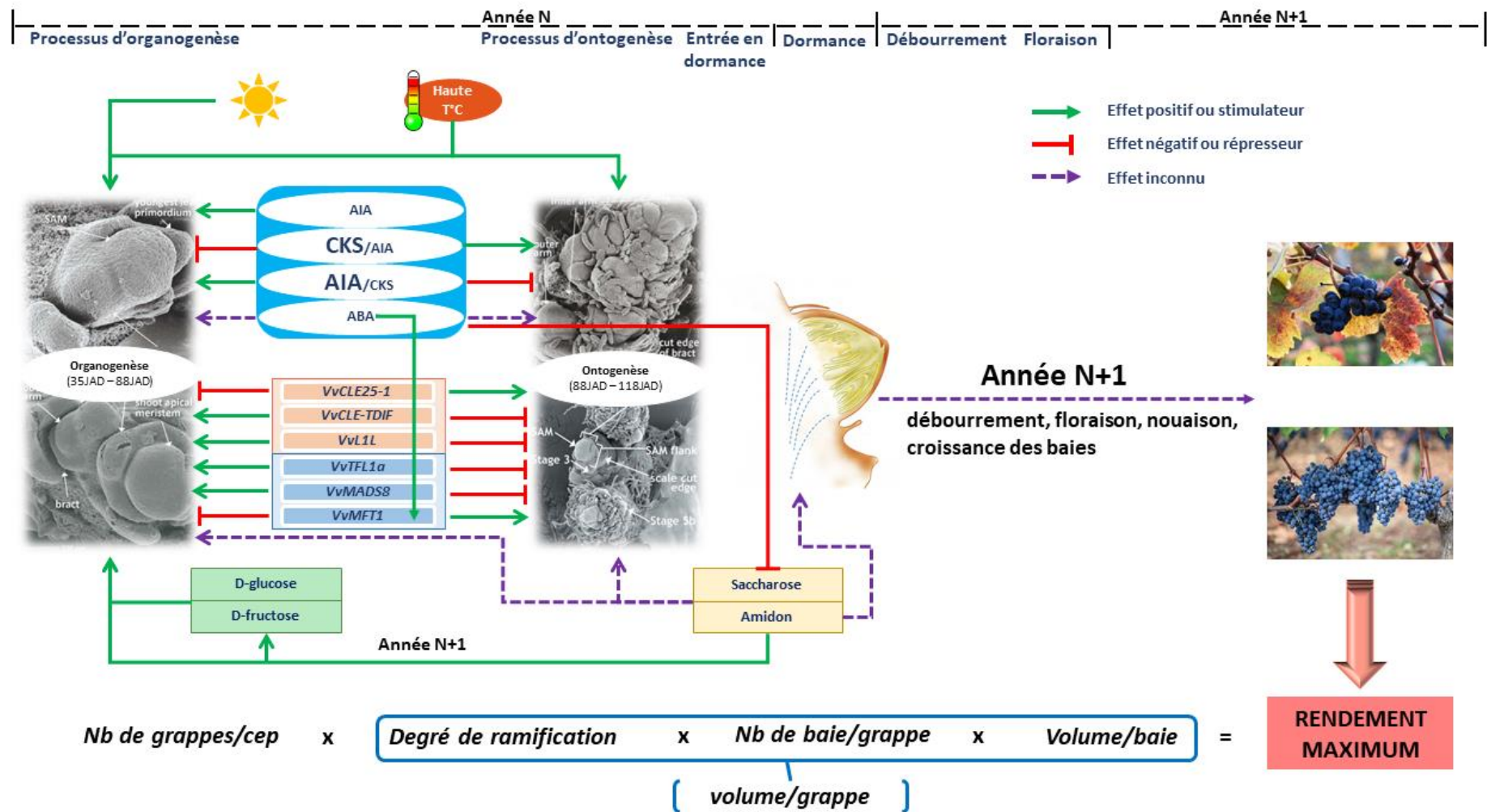


Figure 81 : Schéma bilan des relations observées entre les marqueurs biochimiques, hormonaux et moléculaires au cours des différentes phases de développement du bourgeon latent de vigne lors de la première année du cycle reproducteur.

79). Parmi ces indicateurs, certains semblent pouvoir être utilisés pour qualifier les phases de formation du bourgeon et être intégrés dans un futur modèle prédictif d'évaluation précoce du rendement. Ainsi il semble intéressant de considérer deux périodes : la période précoce d'ontogenèse fixant le nombre de PI et la fin de la phase d'organogenèse pouvant être le reflet de la future taille des inflorescences et une certaine capacité au débourrement. La construction d'un modèle prédictif pourrait intégrer en plus des données de rendement : la teneur en glucides solubles, le rapport AIA/CKs et la lumière cumulée à 35JAD pour l'évaluation du nombre d'inflorescence et les teneurs en amidon, en ABA et les facteurs lumière et température (à 159JAD) pour l'évaluation de la taille des futures grappes.

Perspectives

Notre étude a permis d'apporter des éléments nouveaux pour une meilleure compréhension du fonctionnement des bourgeons latents, mais de nombreuses questions restent en suspens, nécessitant la poursuite d'études approfondies au niveau fondamental ou appliqué. Quelques pistes de recherche peuvent être envisagées.

Les gènes étudiés ont été choisis à partir des données bibliographiques en fonction de leurs rôles dans les différents processus physiologiques impliquant des mécanismes similaires à l'initiation et la différenciation des PI. Cependant, le seul pool des 6 gènes ne permet pas de comprendre l'ensemble des interactions et leurs liens avec les hormones et les glucides. L'étude de gènes complémentaires sera indispensable pour la construction d'un modèle de fonctionnement. Parmi les gènes à étudier on peut citer les gènes des familles *WUS*, *CLV1*, *SAM* et *BRC* impliqués dans le contrôle méristématique du MAC et l'initiation des primordia, mais aussi *FD*, *FT*, *AP1* et *LFY* intervenant dans l'induction et le timing de la floraison. Notre étude a démontré également que certaines pratiques culturales pourraient impacter les équilibres sources/puits et ainsi avoir un effet sur la fertilité des bourgeons. De ce fait, des gènes impliqués dans la régulation des glucides seraient aussi intéressants à étudier, comme par exemple les gènes *VI* codant pour les invertases vacuolaires et régulés par la lumière (Rabot *et al.*, 2012). Pour cela, une approche RNAseq a été entreprise pour le millésime 2015. Bien que le séquençage ait été réalisé, les données n'ont pas encore été traitées, mais une première analyse rapide des profils de gènes identifiés a confirmé l'importance des 6 gènes choisis. Il est maintenant nécessaire d'entamer l'analyse de l'ensemble des séquences obtenues afin d'identifier de nouveaux gènes ou de nouvelles familles de gènes susceptibles d'être

impliqués dans le processus de formation des bourgeons latents de vigne, mais également dans la réponse vis-à-vis des différents facteurs environnementaux en lien avec la fertilité. Enfin, ces études moléculaires devraient être complétées par des études enzymatiques qui pourraient nous aider à comprendre les régulations post-transcriptionnelles des gènes et ainsi établir un lien entre gènes et régulateurs hormonaux et glucidiques.

Les indicateurs remarquables identifiés dans cette étude devront également être suivis dans le temps, mais aussi dans d'autres régions viticoles et pour d'autres cépages, dans l'objectif de (i) vérifier la robustesse de nos indicateurs pour l'évaluation précoce du rendement pour d'autres cépages et sous différentes conditions environnementales et (ii) de récolter plus de données permettant dans le futur de construire à grande échelle un modèle de prédiction précoce de la fertilité potentielle réelle des bourgeons et du rendement final pour que les viticulteurs puissent adapter la conduite du vignoble en fonction de leur objectif de production.

En ce qui concerne l'impact de la lumière, du stress hydrique et de l'effeuillage, les résultats obtenus permettent d'émettre des hypothèses mais il est nécessaire de réitérer ces expérimentations sur un autre millésime en veillant à pouvoir mesurer le taux de débourrement, le nombre et la taille des grappes l'année suivante, ce qui nous a manqué en 2017 en raison du gel. Il semble également important de pouvoir appliquer ces traitements à différentes périodes du développement de bourgeon afin de vérifier si la période critique que nous avons définie (60 à 88JAD) est la période la plus sensible à ces facteurs. Cette approche en champ, devrait être complétée par une approche en serre pour un meilleur contrôle des différentes intensités lumineuses, des variations thermiques et du niveau de stress hydrique.

Enfin, nous avons démontré que le processus d'initiation et la différenciation des PI dans les bourgeons latents du Merlot de la région bordelaise s'étendait sur une période beaucoup plus longue que dans les années 1970. Selon certains auteurs, les activités cellulaires pourraient continuer à être observées dans les bourgeons pendant la phase de dormance en cas d'hiver doux (Jones *et al.*, 2009). Notre étude laisse également supposer que la mise en réserve d'amidon pourrait être un facteur important impactant la disponibilité en sucres assimilables pour le début de la phase d'organogenèse. De ce fait, dans le cadre du changement climatique mis en évidence dans notre région, il semble maintenant nécessaire de suivre les processus de formation des bourgeons et des grappes durant un cycle complet c'est-à-dire sur deux millésimes. Dans ce cadre, la prise en compte des relations sources/puits et l'importance de l'existence de l'organe oppositifolié semble indispensable comme cela a déjà pu être démontré pour d'autres espèces végétales.

Références bibliographiques

- Akihiro T, Mizuno K & Fujimura T (2005). Gene expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and starch contents in rice cultured cells are cooperatively regulated by sucrose and ABA. *Plant and Cell Physiology* **46**, 937–946.
- Alemanno L, Devic M, Niemenak N, Sanier C, Guillemainot J, Rio M, Verdeil J-L & Montoro P (2008). Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Planta* **227**, 853–866.
- Alleweldt G (1963). Die Umweltabhängigkeit des vegetativen Wachstums, der Wachstumsruhe und der Blütenbildung von Reben (Vitis Speciesf). *Vitis* **4**, 11–41.
- Alleweldt G (1965). Balkema Über die Anlage von Inflorescenz-und Blütenprimorden in den Winterknospen der Rebe. *Z Acker- u Pflanzenbau* **123**, 59–74.
- Alleweldt G & Ilter E (1969). Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Blütenbildung und Triebwachstum bei Reben. *Vitis* **8**, 286–313.
- Almada R, Cabrera N, Casaretto JA, Ruiz-Lara S & Villanueva EG (2009). VvCO and VvCOL1, two CONSTANS homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds. *Plant Cell Reports* **28**, 1193–1203.
- Al-Obeed RS, Kassem HA & Ahmed MA (2010). Effect of grapevine varietal differences on bud fertility, yield and fruit quality under arid environments and domestic wastewater irrigation. *Am-Eur J Agric Environ Sci* **9**, 248–255.
- Alsaidi I (1975). Recherches physiologiques, histologiques et cytologiques sur les bourgeons de la Vigne (*Vitis vinifera* L. var. Ugni blanc) au cours de leur cycle végétatif. *Thèse troisième cycle*, Université de Bordeaux.
- Antcliff AJ, Webster WJ & May P (1955). Studies on the sultana vine. III. Pruning experiments with constant number of buds per vine, number and length of cane varied inversely. *Australian Journal of Agricultural Research* **6**, 823–832.
- Antolín MC, Baigorri H, Luis ID, Aguirrezábal F, Geny L, Broquedis M & Sánchez-Díaz M (2003). ABA during reproductive development in non-irrigated grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo). *Australian Journal of Grape and Wine Research* **9**, 169–176.
- Arora R, Rowland LJ & Tanino K (2003). Induction and release of bud dormancy in woody perennials: a science comes of age. *HortScience* **38**, 911–921.
- Autran D & Traas J (2001). Plant stem cells organisation and function: The shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Medecine Sciences* **17**, 836–844.
- Azizi P, Rafii MY, Maziah M, Abdullah SNA, Hanafi MM, Latif MA, Rashid AA & Sahebi M (2015). Understanding the shoot apical meristem regulation: a study of the phytohormones, auxin and cytokinin, in rice. *Mechanisms of Development* **135**, 1–15.
- Baigorri H, Antolin C, De Luis I, Geny L, Broquedis M, Aguirrezábal F & Sánchez-Díaz M (2001). Influence of training system on the reproductive development and hormonal levels of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo. *American Journal of Enology and Viticulture* **52**, 357–363.
- Baldwin JG (1964). The relation between weather and fruitfulness of the Sultana vine. *Australian Journal of Agricultural Research* **15**, 920–928.
- Baldwin JG (1966). The effect of some cultural practices on nitrogen and fruitfulness in the Sultana vine. *American Journal of Enology and Viticulture* **17**, 58–62.
- Baltatu G. (1956). Coefficient real de fertilitate, un nou principiu util în viticultura. *Stud Cerc Sti, Biol Sti Agric, Iasi* **7**, 181–185.

- Barazesh S & McSteen P (2008). Hormonal control of grass inflorescence development. *Trends in Plant Science* **13**, 656–662.
- Barbier F, Péron T, Lecerf M, Perez-Garcia M-D, Barrière Q, Rolčík J, Boutet-Mercey S, Citerne S, Lemoine R & Porcheron B (2015). Sucrose is an early modulator of the key hormonal mechanisms controlling bud outgrowth in *Rosa hybrida*. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2569–2582.
- Barnard C & Thomas JE (1933). Fruit bud studies. II. The Sultana: Differentiation and development of the fruit buds. *J Counc Sci Ind Res Aust* **5**, 285–294.
- Barrero JM, Piqueras P, González-Guzmán M, Serrano R, Rodríguez PL, Ponce MR & Micol JL (2005). A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2071–2083.
- Batley NH & Tooke F (2002). Molecular control and variation in the floral transition. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 62–68.
- Beauchet S, Renaud-Gentié C, Cariou V, Thiollot-Scholtus M, Siret R & Jourjon F (2014). Analyses multivariées pour une meilleure compréhension des pratiques viticoles et des facteurs du milieu afin d’expliquer la qualité du raisin. In *37th World Congress of Vine and Wine and 12th General Assembly of the OIV (Part 2)*, p. 05008. EDP Sciences.
- Benlloch R, Berbel A, Ali L, Gohari G, Millán T, & Madueño F (2015). Genetic control of inflorescence architecture in legumes. *Frontiers in Plant Science* **6**, 543.
- Bennett J, Jarvis P, Creasy GL & Trought MC (2005). Influence of defoliation on overwintering carbohydrate reserves, return bloom, and yield of mature Chardonnay grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* **56**, 386–393.
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A & Lejeune P (1993). Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell* **5**, 1147.
- Bessis R (1960). Sur divers modes d’expression quantitative de la fertilité chez la vigne, *CR Acad. Agric* **46**, 826–832.
- Bessis R (1965). Recherches sur la fertilité et les corrélations de croissance entre bourgeons chez la vigne (*Vitis vinifera* L.). *Thèse troisième cycle*, Université de Dijon.
- Bi Z, Li X, Huang H & Hua Y (2016). Identification, functional study, and promoter analysis of HbMFT1, a homolog of MFT from rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 247.
- Blazquez MA, Ferrandiz C, Madueno F & Parcy F (2006). How floral meristems are built. *Plant Molecular Biology* **60**, 855–870.
- Bledsoe AM, Kliewer WM & Marois JJ (1988). Effects of timing and severity of leaf removal on yield and fruit composition of Sauvignon blanc grapevines. *Am J Enol Vitic* **39**, 49–54.
- Bonhomme M, Peuch M, Ameglio T, Rageau R, Guilliot A, Decourteix M, Alves G, Sakr S & Lacointe A (2010). Carbohydrate uptake from xylem vessels and its distribution among stem tissues and buds in walnut (*Juglans regia* L.). *Tree Physiology* **30**, 89–102.
- Booker KS, Schwarz J, Garrett MB & Jones AM (2010). Glucose attenuation of auxin-mediated bimodality in lateral root formation is partly coupled by the heterotrimeric G protein complex. *PLOS One* **5**, e12833.
- Boss PK, Buckeridge EJ, Poole A & Thomas MR (2003). New insights into grapevine flowering. *Functional Plant Biology* **30**, 593–606.

- Boss PK, Sreekantan L & Thomas MR (2006). A grapevine TFL1 homologue can delay flowering and alter floral development when overexpressed in heterologous species. *Functional Plant Biology* **33**, 31–41.
- Boss PK & Thomas MR (2000). Tendrils, inflorescences and fruitfulness: a molecular perspective. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 168–174.
- Boss PK & Thomas MR (2002). Association of dwarfism and floral induction with a grape ‘green revolution’ mutation. *Nature* **416**, 847–850.
- Böttcher C, Keyzers RA, Boss PK & Davies C (2010). Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *Journal of Experimental Botany* **61**, 3615–3625.
- Bouard J (1966). Recherches physiologiques sur la vigne et en particulier sur l’aoûtement des sarments. *Thèse troisième cycle*. Université de Bordeaux.
- Bouard J (1971). Tissus et organes de la vigne. In *Traite d’Ampelologie : Sciences et Techniques de la Vigne*. Dunod, Paris.
- Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R & Coen E (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* **275**, 80–83.
- Bramley RGV (2005). Understanding variability in winegrape production systems 2. Within vineyard variation in quality over several vintages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**, 33–42.
- Bramley RGV & Hamilton RP (2004). Understanding variability in winegrape production systems. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **10**, 32–45.
- Branas J, Bernon G & Levadoux I (1943). La sortie. *Prog Agri Vitic* **18–19**, 134–138.
- Brand U, Fletcher JC, Hobe M, Meyerowitz EM & Simon R (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**, 617–619.
- Bray EA (1988). Drought-and ABA-induced changes in polypeptide and mRNA accumulation in tomato leaves. *Plant Physiology* **88**, 1210–1214.
- Breen KC (2016). Effects of canopy manipulation and environment on carbon resource allocation to flowering and fruit set in apple. *Thesis*, University of Tasmania.
- Broquedis M (1987). Interconversion of the beta-D-glucopyranose abscissate in free abscissic acid during the stratification of grape seeds. In 3. *Symposium International sur la Physiologie de la Vigne, Bordeaux (France), 24-27 Jun 1986*. OIV.
- Bugnon F & Bessis R (1968). *Biologie de la vigne : acquisitions récentes et problèmes actuels*. Masson et Cie.
- Buttrose MS (1968). Some effects of light intensity and temperature on dry weight and shoot growth of grape-vine. *Annals of Botany* **32**, 753–765.
- Buttrose MS (1969a). Fruitfulness in grapevines: Effects of changes in temperature and light regimes. *Botanical Gazette* **130**, 173–179.
- Buttrose MS (1969b). Fruitfulness in grapevines: effects of daylength. *Vitis* **8**, 188–190.
- Buttrose MS (1969c). Fruitfulness in grapevines: Effects of light intensity and temperature. *Botanical gazette* **130**, 166–173.
- Buttrose MS (1969d). Under controlled temperature and light intensity. *Vitis* **8**, 280–285.

- Buttrose MS (1970). Fruitfulness in grapevines: development of leaf primordia in buds in relation to bud fruitfulness. *Botanical gazette* **131**, 78–83.
- Buttrose MS (1974a). Climatic factors and fruitfulness in grapevines. In *Horticultural Abstracts*, pp. 319–326.
- Buttrose MS (1974b). Fruitfulness in grapevines: Effects of water stress. *Vitis* **12**, 299–305.
- Cadot Y, Castelló MM & Chevalier M (2006). Flavan-3-ol compositional changes in grape berries (*Vitis vinifera* L. cv Cabernet Franc) before veraison, using two complementary analytical approaches, HPLC reversed phase and histochemistry. *Analytica Chimica Acta* **563**, 65–75.
- Calonje M, Cubas P, Martínez-Zapater JM & Carmona MJ (2004). Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant Physiology* **135**, 1491–1501.
- Candolfi-Vasconcelos MC & Koblet W (1990). Yield, fruit quality, bud fertility and starch reserves of the wood as a function of leaf removal in *Vitis vinifera*-Evidence of compensation and stress recovering. *Vitis* **29**, 199–221.
- Carbonneau A (1976). Principes et méthodes de mesure de la surface foliaire. Essai de caractérisation des types de feuilles dans le genre *Vitis*. In *Annales de l'Amélioration des Plantes*.
- Carbonneau A (1992). Contrôle de la vigueur de la production par la taille en sec et la taille en vert. *CR IV Sympo Inter Physio Vigne*, 69–74.
- Carbonneau A & Casteran P (1979). Irrigation-depressing effect on floral initiation of Cabernet Sauvignon grapevines in Bordeaux area. *American Journal of Enology and Viticulture* **30**, 3–7.
- Carbonneau A, Deloire A & Jaillard B (2007). *Viticulture : La vigne : Physiologie, terroir, culture*. Dunod, Paris.
- Carbonneau A, Deloire A, Torregrosa L, Pellegrino A, Jaillard B, Méta A, Ojeda H, Lebon E & Abbal P (2015). *Traité de la vigne-2e éd : Physiologie, terroir, culture*. Dunod.
- Carles CC & Fletcher JC (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends in Plant Science* **8**, 394–401.
- Carmona MJ, Calonje M & Martínez-Zapater JM (2007). The FT/TFL1 gene family in grapevine. *Plant Molecular Biology* **63**, 637–650.
- Carmona MJ, Chaïb J, Martínez-Zapater JM & Thomas MR (2008). A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2579–2596.
- Carmona MJ, Cubas P & Martínez-Zapater JM (2002). VFL, the grapevine FLORICAULA/LEAFY ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. *Plant Physiology* **130**, 68–77.
- Carolus M (1970). Recherches sur l'organogenèse et l'évolution morphologique du bourgeon latent de la vigne (*Vitis vinifera* L. var. Merlot). *Thèse troisième cycle*, Université de Bordeaux.
- Carrari F, Fernie AR & Iusem ND (2004). Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. *Trends in Plant Science* **9**, 57–59.
- Caspari HW, Lang A & Alspach P (1998). Effects of girdling and leaf removal on fruit set and vegetative growth in grape. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**, 359–366.
- Caspari HW, Neal S, Naylor A, Trought MCT, Tannock S, Henick Kling T, Wolf TE & Harkess EM (1997). Use of cover crops and deficit irrigation to reduce vegetative vigor of Sauvignon blanc grapevines in a humid climate. In *Proceedings of the 4th International Symposium for Cool Climate Enology and Viticulture*. T. Henick-Kling et al. (Eds.), pp. II, pp. 63–66.

- Champagnat P (1954). Recherches sur les rameaux anticipés des végétaux ligneux. *Revue de Cytologie et de biologie végétales* **15**, 1–51.
- Champagnat P (1965). Physiologie de la croissance et de l'inhibition des bourgeons : dominance apicale et phénomènes analogues. In *Differenzierung und Entwicklung/Differentiation and Development*, pp. 1106–1164. Springer.
- Champagnat P (1969). La notion de facteurs de préséances entre bourgeons. *Bulletin de la Société Botanique de France* **116**, 323–348.
- Chandler JW & Werr W (2015). Cytokinin–auxin crosstalk in cell type specification. *Trends in Plant Science* **20**, 291–300.
- Chaumont M, Morot-Gaudry J-F & Foyer CH (1994). Seasonal and diurnal changes in photosynthesis and carbon partitioning in *Vitis vinifera* leaves in vines with and without fruit. *Journal of Experimental Botany* **45**, 1235–1243.
- Cheema SS, Torregrosa L, Domergue P & Carbonneau A (1996). A comparative study of the differentiation of inflorescence and flower of *Vitis vinifera* L. cv. Syrah in situ and under greenhouse conditions. *Progres Agricole et Viticole (France)* **113**, 279–285.
- Chen Y, Jiang P, Thammannagowda S, Liang H & Wilde HD (2013). Characterization of peach TFL1 and comparison with FT/TFL1 gene families of the Rosaceae. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **138**, 12–17.
- Cheng ZJ, Zhu SS, Gao XQ & Zhang XS (2010). Cytokinin and auxin regulates WUS induction and inflorescence regeneration in vitro in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* **29**, 927–933.
- Chiappetta A, Fambrini M, Petrarulo M, Rapparini F, Michelotti V, Bruno L, Greco M, Baraldi R, Salvini M & Pugliesi C (2009). Ectopic expression of LEAFY COTYLEDON1-LIKE gene and localized auxin accumulation mark embryogenic competence in epiphyllous plants of *Helianthus annuus* × *H. tuberosus*. *Annals of Botany* **103**, 735–747.
- Chincinska IA, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B & Kühn C (2008). Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiology* **146**, 515–528.
- Chira K (2009). *Structures moléculaire et perception tannique des raisins et des vins (Cabernet-Sauvignon, Merlot) du Bordelais*. Thèse troisième cycle, Université de Bordeaux 2.
- Choubane D, Rabot A, Mortreau E, Legourrier J, Péron T, Foucher F, AHCÈNE Y, Pelleschi-Travier S, Leduc N & Hamama L (2012). Photocontrol of bud burst involves gibberellin biosynthesis in *Rosa* sp. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1271–1280.
- Christensen P (1975). Long-term responses of 'Thompson Seedless' vines to potassium fertilizer treatment. *American Journal of Enology and Viticulture* **26**, 179–183.
- Clark SE, Running MP & Meyerowitz EM (1995). CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. *Development* **121**, 2057–2067.
- Clark SE, Williams RW & Meyerowitz EM (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575–585.
- Clement C, Burrus M & Audran J-C (1996). Floral organ growth and carbohydrate content during pollen development in *Lilium*. *American Journal of Botany* **459–469**.
- Clement C, Chavant L, Burrus M & Audran JC (1994). Anther starch variations in *Lilium* during pollen development. *Sexual Plant Reproduction* **7**, 347–356.

- Cline MG (1991). Apical dominance. *The Botanical Review* **57**, 318–358.
- Clingeleffer PR (1984). Production and growth of minimal pruned Sultana vines. *Vitis* **23**, 42–54.
- Clingeleffer PR. (2010). Plant management research: status and what it can offer to address challenges and limitations. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **16**, 25–32.
- Clingeleffer PR & Krstic M (2001). Crop Development, Crop Estimation and Crop Control to Secure Quality and Production of Major Wine Grape Varieties: A National Approach: Final Report to Grape and Wine Research & Development Corporation. *Grape and Wine Research & Development Corporation*.
- Cock JM & McCormick S (2001). A large family of genes that share homology with CLAVATA3. *Plant Physiology* **126**, 939–942.
- Cook NC, Bellstedt DU & Jacobs G (2001). Endogenous cytokinin distribution patterns at budburst in Granny Smith and Braeburn apple shoots in relation to bud growth. *Scientia Horticulturae* **87**, 53–63.
- Coombe B & Iland P (2004). *Grape berry development and winegrape quality*. Winetitles Pty Ltd.
- Coombe BG (1967). Effects of growth retardants on *Vitis vinifera* L. *Vitis* **6**, 278–287.
- Corbesier L, Lejeune P & Bernier G (1998). The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* **206**, 131–137.
- Crane O, Halaly T, Pang X, Lavee S, Perl A, Vankova R & Or E (2012). Cytokinin-induced VvTFL1A expression may be involved in the control of grapevine fruitfulness. *Planta* **235**, 181–192.
- Creelman RA, Mason HS, Bensen RJ, Boyer JS & Mullet JE (1990). Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings analysis of growth, sugar accumulation, and gene expression. *Plant Physiology* **92**, 205–214.
- Cummins WR (1973). The metabolism of abscisic acid in relation to its reversible action on stomata in leaves of *Hordeum vulgare* L. *Planta* **114**, 159–167.
- Cutler AJ & Krochko JE (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* **4**, 472–478.
- Danilevskaya ON, Meng X & Ananiev EV (2010). Concerted modification of flowering time and inflorescence architecture by ectopic expression of TFL1-like genes in maize. *Plant Physiology* **153**, 238–251.
- Dantec CF, Vitasse Y, Bonhomme M, Louvet J-M, Kremer A & Delzon S (2014). Chilling and heat requirements for leaf unfolding in European beech and sessile oak populations at the southern limit of their distribution range. *International journal of biometeorology* **58**, 1853–1864.
- Demotes-Mainard S, Péron T, Corot A, Bertheloot J, Le Gourrierc J, Pelleschi-Travier S, Crespel L, Morel P, Huché-Thélier L & Boumaza R (2016a). Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany* **121**, 4–21.
- Diaz-Riquelme J, Grimplet J, Martínez-Zapater JM & Carmona MJ (2012). Transcriptome variation along bud development in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology* **12**, 181.
- Dielen V, Lecouvet V, Dupont S & Kinet J-M (2001). In vitro control of floral transition in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), the model for autonomously flowering plants, using the late flowering uniflora mutant. *Journal of Experimental Botany* **52**, 715–723.

- Dry PR (2000). Canopy management for fruitfulness. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 109–115.
- Dry PR & Loveys BR (1998). Factors influencing grapevine vigour and the potential for control with partial rootzone drying. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **4**, 140–148.
- Du H, Wu N, Chang Y, Li X, Xiao J & Xiong L (2013). Carotenoid deficiency impairs ABA and IAA biosynthesis and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* **83**, 475–488.
- Duchêne E, Jaegli N & Salber R (2003a). Effects of the leaf/fruit ratio during a year N on the bud fertility in the year N+ 2: results for Pinot noir and Gewurztraminer grapevines (*Vitis vinifera* L.) in the greenhouse. *OENO One* **37**, 257–260.
- Duchêne E, Monamy C, Langellier F, Jaegli N, Salber R, Meluc D & Panigai L (2003b). Effects of the ripening conditions in the vineyard on growth and yield components in the following season. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **37**, 103–106.
- Dun EA, de Saint Germain A, Rameau C & Beveridge CA (2012). Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiology* **158**, 487–498.
- Dunn GM & Martin SR (2000). Do temperature conditions at budburst affect flower number in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon? *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 116–124.
- Dunn GM & Martin SR (2007). A functional association in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon between the extent of primary branching and the number of flowers formed per inflorescence. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **13**, 95–100.
- Durand M, Thévenot C & Côme D (1975). Role des cotyledons dans la germination et la levée de dormance de l'axe embryonnaire du pommier, après traitement par l'acide abscissique. *Physiologie végétale*.
- Düring H & Alleweldt G (1973). Der jahresgang der Abscisinsäure in vegetativen Organen von Reben. *Vitis* **12**, 26–32.
- Durquety PM, Naude E & Blanchard P (1982). La prévision de récolte sur Petit Manseng basée sur les courbes-niveaux de la fertilité et les températures durant une période critique. *Prog Agric Vitic* **99**, 440–469.
- Eltom M, Winefield CS & Trought MCT (2014). Effect of pruning system, cane size and season on inflorescence primordia initiation and inflorescence architecture of *Vitis vinifera* L. Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **20**, 459–464.
- Ezzili B (1993). Modification du programme floral après la mise en place des inflorescences dans les bourgeons latents principaux chez *Vitis vinifera*. L *Bulletin de L'OIV* **66**, 5–17.
- Fallah F & Kahrizi D (2017). Effect of light spectrum and intensity on growth of grape (*Vitis vinifera*) under in vitro conditions. *Journal of Applied Biotechnology Reports* **3**, 495–499.
- Field SK, Smith JP, Holzapfel BP, Hardie WJ & Emery RN (2009). Grapevine response to soil temperature: xylem cytokinins and carbohydrate reserve mobilization from budbreak to anthesis. *American Journal of Enology and Viticulture* **60**, 164–172.
- Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R & Meyerowitz EM (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911–1914.
- Fournioux JC & Bessis R (1984). Shoot growth on grapevines in the presence or absence of leaves. *Vitis* **23**, 231–241.

- Gaj MD, Zhang S, Harada JJ & Lemaux PG (2005). Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta* **222**, 977–988.
- Galet P (1957). *Cépages et vignobles de France: Les cépages des cuves*. Paul Déhan.
- Gallavotti A, Yang Y, Schmidt RJ & Jackson D (2008). The relationship between auxin transport and maize branching. *Plant Physiology* **147**, 1913–1923.
- Galuszka P, Spíchal L, Kopečný D, Tarkowski P, Frébortová J, Šebela M & Frébort I (2008). Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. *Studies in Natural Products Chemistry* **34**, 203–264.
- Gambino G, Navarro B, Vallania R, Gribaudo I & Di Serio F (2011). Somatic embryogenesis efficiently eliminates viroid infections from grapevines. *European Journal of Plant Pathology* **130**, 511–519.
- Ganter P & Jollès G (1970). *Histologie normale et pathologique*. Ed. Gauthier Villar.
- García de Cortázar-Atauri I, Daux V, Garnier E, Yiou P, Viovy N, Seguin B, Boursiquot JM, Parker AK, Van Leeuwen C & Chuine I (2010). Climate reconstructions from grape harvest dates: methodology and uncertainties. *The Holocene* **20**, 599–608.
- Garcia-Luis A, Fornes F & Guardiola JL (1995). Leaf carbohydrates and flower formation in *Citrus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**, 222–227.
- Gea L, Normand L, Vian B & Gay G (1994). Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. formed by an IAA-overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési. *New Phytologist* **128**, 659–670.
- Geny-Denis L (2015). Maîtriser la production et assurer la pérennité du vignoble. *Compte-Rendu de la 12ème Journée Technique du CIVB*.
- Geny-Denis L & Dubourdieu D (2015). *La lettre du millésime 2014*. Bordeaux, France.
- Geny-Denis L & Dubourdieu D (2016). *La lettre du millésime 2015*. Bordeaux, France.
- Goggin DE, Emery RN, Kurepin LV & Powles SB (2014). A potential role for endogenous microflora in dormancy release, cytokinin metabolism and the response to fluridone in *Lolium rigidum* seeds. *Annals of Botany* **115**, 293–301.
- Gonçalves BHL, Leonel S, Souza JMA, Tecchio MA, Arruda LL & de Souza Silva M (2016). Carbohydrate levels in “douradao” peach tree grown under subtropical conditions. *Australian Journal of Crop Science* **11**, 1635.
- Greven M, Green S, Neal S, Clothier B, Neal M, Dryden G & Davidson P (2005). Regulated deficit irrigation (RDI) to save water and improve Sauvignon Blanc quality? *Water Science and Technology* **51**, 9–17.
- Guan CM, Zhu SS, Li XG & Zhang XS (2006). Hormone-regulated inflorescence induction and TFL1 expression in *Arabidopsis* callus in vitro. *Plant Cell Reports* **25**, 1133–1137.
- Guan Y, Li S-G, Fan X-F & Su Z-H (2016). Application of somatic embryogenesis in woody plants. *Front Plant Sci* **7**, 938.
- Guilpart N, Metay A & Gary C (2014). Grapevine bud fertility and number of berries per bunch are determined by water and nitrogen stress around flowering in the previous year. *European Journal of Agronomy* **54**, 9–20.

- Hall A, Lamb DW, Holzapfel BP & Louis JP (2011). Within-season temporal variation in correlations between vineyard canopy and winegrape composition and yield. *Precision Agriculture* **12**, 103–117.
- Hamman RA, Dami I-E, Walsh TM & Stushnoff C (1996). Seasonal carbohydrate changes and cold hardiness of Chardonnay and Riesling grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* **47**, 31–36.
- Hardie WJ & Considine JA (1976). Response of grapes to water-deficit stress in particular stages of development. *American Journal of Enology and Viticulture* **27**, 55–61.
- He D, Mathiason K & Fennell A (2012). Auxin and cytokinin related gene expression during active shoot growth and latent bud paradormancy in *Vitis riparia* grapevine. *Journal of Plant Physiology* **169**, 643–648.
- Hedman H, Källman T & Lagercrantz U (2009). Early evolution of the MFT-like gene family in plants. *Plant Molecular Biology* **70**, 359–369.
- Heide OM & Prestrud AK (2005). Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear. *Tree Physiology* **25**, 109–114.
- Heidstra R & Sabatini S (2014). Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 301–312.
- Heller R, Esnault R & Lance C (2000). *Physiologie végétale*. Dunod.
- Hendrickson L, Ball MC, Wood JT, Chow WS & Furbank RT (2004). Low temperature effects on photosynthesis and growth of grapevine. *Plant, Cell & Environment* **27**, 795–809.
- Henry C, Rabot A, Laloi M, Mortreau E, Sigogne M, Leduc N, Lemoine R, Sakr S, Vian A & Pelleschi-Travier S (2011). Regulation of RhSUC2, a sucrose transporter, is correlated with the light control of bud burst in *Rosa* sp. *Plant, Cell & Environment* **34**, 1776–1789.
- Heyer AG, Raap M, Schroeder B, Marty B & Willmitzer L (2004). Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **39**, 161–169.
- Hirakawa Y, Kondo Y & Fukuda H (2010). TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the WOX4 homeobox gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**, 2618–2629.
- Hirakawa Y, Shinohara H, Kondo Y, Inoue A, Nakanomyo I, Ogawa M, Sawa S, Ohashi-Ito K, Matsubayashi Y & Fukuda H (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 15208–15213.
- Hirsch AM, Bhuvaneswari TV, Torrey JG & Bisseling T (1989). Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 1244–1248.
- Hopping ME (1977). Effect of light intensity during cane development on subsequent bud break and yield of ‘Palomino’ grape vines. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* **5**, 287–290.
- Hou B, Lim E-K, Higgins GS & Bowles DJ (2004). N-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**, 47822–47832.
- Howell GS, Candolfi-Vasconcelos MC & Koblet W (1994). Response of Pinot noir grapevine growth, yield, and fruit composition to defoliation the previous growing season. *American Journal of Enology and Viticulture* **45**, 188–191.

- Hu Y, Gao Y-R, Wei W, Zhang K & Feng J-Y (2016). Strawberry MOTHER OF FT AND TFL1. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **126**, 343–352.
- Huché-Théliér L, Crespel L, Le Gourrierc J, Morel P, Sakr S & Leduc N (2016). Light signaling and plant responses to blue and UV radiations—Perspectives for applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany* **121**, 22–38.
- Huglin P (1960). Causes determinant les alterations de la floraison de la vigne. *Ann Amelior Plant* **10**, 351–358.
- Huglin P & Schneider C (1998). *Biologie et écologie de la vigne*. Ed Lavoisier.
- Humplík JF, Bergougnoux V, Jandová M, Šimura J, Pěňčík A, Tomanec O, Rolčík J, Novák O & Fellner M (2015). Endogenous abscisic acid promotes hypocotyl growth and affects endoreduplication during dark-induced growth in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plos One* **10**, e0117793.
- Igasaki T, Watanabe Y, Nishiguchi M & Kotoda N (2008). The flowering locus T/Terminal Flower 1 family in Lombardy poplar. *Plant and Cell Physiology* **49**, 291–300.
- Ihaka R & Gentleman R (1996). R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**, 299–314.
- Ito-Inaba Y, Masuko-Suzuki H, Maekawa H, Watanabe M & Inaba T (2016). Characterization of two PEBP genes, SrFT and SrMFT, in thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). *Scientific Reports* **6**, 29440.
- Iwahori S (1967). Auxin of tomato fruit at different stages of its development with a special reference to high temperature injuries. *Plant and Cell Physiology* **8**, 15–22.
- Iwata H, Gaston A, Remay A, Thouroude T, Jeauffre J, Kawamura K, Oyant LH-S, Araki T, Denoyes B & Foucher F (2012). The TFL1 homologue KSN is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *The Plant Journal* **69**, 116–125.
- Izawa T, Oikawa T, Sugiyama N, Tanisaka T, Yano M & Shimamoto K (2002). Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes & Development* **16**, 2006–2020.
- Jackson DI & Coombe BG (1988). Early bunch stem necrosis in grapes—a cause of poor fruit set. *Vitis* **27**, 57–61.
- Jackson RS (1994). Grapevine species and varieties. *Wine Science: Principles and Application* **11**–31.
- Jako N (1976). The relationship between nitrogen phosphorus, potassium and magnesium nutrition and growth of grapevines and cytokinin production by the roots. *Szoleszet Borazet* **1**, 35–47.
- Joly D, Perrin M, Gertz C, Kronenberger J, Demangeat G & Masson JE (2004). Expression analysis of flowering genes from seedling-stage to vineyard life of grapevine cv. Riesling. *Plant Science* **166**, 1427–1436.
- Jones GV & Davis RE (2000). Climate influences on grapevine phenology, grape composition, and wine production and quality for Bordeaux, France. *American Journal of Enology and Viticulture* **51**, 249–261.
- Jones GV, White MA, Cooper OR & Storchmann K (2005). Climate change and global wine quality. *Climatic change* **73**, 319–343.
- Jones JE, Menary RC & Wilson SJ (2009). Continued development of *V. vinifera* inflorescence primordia in winter dormant buds. *Vitis* **48**, 103–105.

- Junker A, Mönke G, Rutten T, Keilwagen J, Seifert M, Thi TMN, Renou J-P, Balzergue S, Viehöver P & Hähnel U (2012). Elongation-related functions of LEAFY COTYLEDON1 during the development of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **71**, 427–442.
- Kappel C (2010). Biologie intégrative du métabolisme de la baie du raisin. *Thèse troisième cycle*, Université de Bordeaux 2, Bordeaux, France.
- Kasimatis AN, Lider LA & Kliwer WM (1975). Influence of Trellising on Growth and Yield of Thompson Seedless Vines. *American Journal of Enology and Viticulture* **26**, 125–129.
- Keller M (2010). Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: a climate change primer for viticulturists. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **16**, 56–69.
- Keller M, Hess B, Schwager H, Schärer H & Koblet W (1995). Carbon and nitrogen partitioning in *Vitis vinifera* L.: Responses to nitrogen supply and limiting irradiance. *Vitis* **34**, 19–26.
- Keller M & Koblet W (1995a). Dry matter and leaf area partitioning, bud fertility and second season growth of *Vitis vinifera* L.: responses to nitrogen supply and limiting irradiance. *Vitis* **34**, 77–83.
- Keller M & Koblet W (1995b). Stress-induced development of inflorescence necrosis and bunch-stem necrosis in *Vitis vinifera* L. in response to environmental and nutritional effects. *Vitis* **34**, 145–150.
- Keller M, Kummer M & Vasconcelos MC (2001). Reproductive growth of grapevines in response to nitrogen supply and rootstock. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **7**, 12–18.
- Keller M, Tarara JM & Mills LJ (2010). Spring temperatures alter reproductive development in grapevines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **16**, 445–454.
- Keller R (2009). L'architecture des arbres à l'Arboretum du vallon de l'Aubonne. *Bulletin du Cercle Vaudois de Botanique* **38**, 51–62.
- Kennedy J (2002). Understanding grape berry development. *Practical Winery & Vineyard* **4**, 1–5.
- Kerepesi I & Galiba G (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science* **40**, 482–487.
- Khadri M, Tejera NA & Lluch C (2006). Alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris*) by exogenous abscisic acid supply. *Journal of Plant Growth Regulation* **25**, 110–119.
- Khanduja SD & Balasubrahmanyam VR (1972). Fruitfulness of grape vine buds. *Economic Botany* **26**, 280–294.
- Kikuchi A, Sanuki N, Higashi K, Koshiba T & Kamada H (2006). Absciscic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta* **223**, 637–645.
- Kikuchi R, Kawahigashi H, Ando T, Tonooka T & Handa H (2009). Molecular and functional characterization of PEBP genes in barley reveal the diversification of their roles in flowering. *Plant Physiology* **149**, 1341–1353.
- King RW (2012). Mobile signals in day length-regulated flowering: gibberellins, flowering locus T, and sucrose. *Russian Journal of pPlant Physiology* **59**, 479–490.
- King RW & Ben-Tal Y (2001). A florigenic effect of sucrose in *Fuchsia hybrida* is blocked by gibberellin-induced assimilate competition. *Plant Physiology* **125**, 488–496.

- King RW & Evans LT (1991). Shoot apex sugars in relation to long-day induction of flowering in *Lolium temulentum* L. *Functional Plant Biology* **18**, 121–135.
- King RW, Hisamatsu T, Goldschmidt EE & Blundell C (2008). The nature of floral signals in *Arabidopsis*. I. Photosynthesis and a far-red photoresponse independently regulate flowering by increasing expression of FLOWERING LOCUS T (FT). *Journal of Experimental Botany* **59**, 3811–3820.
- Kliewer WM (1975). Effect of root temperature on budbreak, shoot growth, and fruit-set of Cabernet Sauvignon grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* **26**, 82–89.
- Kliewer WM (1982). Vineyard canopy management: A review. *Grape and Wine Centennial Proceedings*, University of California, 342–352.
- Kliewer WM & Dokoozlian NK (2005). Leaf area/crop weight ratios of grapevines: influence on fruit composition and wine quality. *American Journal of Enology and Viticulture* **56**, 170–181.
- Kliewer WM & Smart RE (1989). Canopy manipulation for optimizing vine microclimate, crop yield and composition of grapes.
- Kobayashi A, Yukinaga H & Nii N (1965). Studies on the thermal conditions of grapes. IV. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **34**, 77–84.
- Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M & Araki T (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**, 1960–1962.
- Koblet W (1985). Einfluß des Lichtes auf die Knospenfruchtbarkeit bei Reben. *Schweiz Z Obst-Weinbau* **121**, 381–385.
- Koblet W, Candolfi-Vasconcelos MC, Zweifel W & Howell GS (1994). Influence of leaf removal, rootstock, and training system on yield and fruit composition of Pinot noir grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* **45**, 181–187.
- Koussa T, Broquedis M & Bouard J (1994). Importance de l'acide abscissique dans le developpement des bourgeons latents de vigne (*Vitis vinifera* L. var. Merlot) et plus particulièrement dans la phase de levee de dormance. *Vitis* **33**, 63–67.
- Koussa T, Cherrad M, Bertrand A & Broquedis M (1998). Comparaison de la teneur en amidon, en glucides solubles et en acide abscissique des bourgeons latents et des entre-noeuds au cours du cycle végétatif de la vigne. *Vitis* **37**, 5–10.
- Koussa T, Colin L & Broquedis M (2004). Endogenous levels of abscisic acid in various organs of *Vitis vinifera* L. (cv. Cabernet Sauvignon) between flower buds separated and grape closed stages. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **38**, 141–146.
- Koussa T, Rifai LA & Cherrad M (2005). Annual variations of alpha-amylase and invertases activities in buds and internodes of grapevines and their relation with carbohydrates and abscisic acid contents. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **39**, 129–136.
- Kracke H, Cristofori G & Marangoni B (1981). Hormonal changes during the rooting of hardwood cuttings of grapevine rootstocks. *American Journal of Enology and Viticulture* **32**, 135–137.
- Krizek BA & Fletcher JC (2005). Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Reviews Genetics* **6**, 688–698.
- Kushwah S & Laxmi A (2014). The interaction between glucose and cytokinin signal transduction pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **37**, 235–253.

- Kwong RW, Bui AQ, Lee H, Kwong LW, Fischer RL, Goldberg RB & Harada JJ (2003). LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *The Plant Cell* **15**, 5–18.
- Lacampagne S, Gagné S & GénY L (2010). Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *Journal of Plant Growth Regulation* **29**, 81–90.
- Langeron M (1942). *Précis de microscopie*. Ed. Masson et Cie.
- Laporte M (1937). Remarques sur la fertilité des yeux de la vigne. *Riv Vitis* **86**, 215–219.
- Larsen RP (1963). Effect of potassium and magnesium fertilizers on the nutritional status and yield of a Concord grape vineyard. Q. *Bull Michigan State University Agric Exp Station* **45**, 376–386.
- Lavee S & May P (1997). Dormancy of grapevine buds-facts and speculation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **3**, 31–46.
- LE Page-Degivry MT & Bulard C (1979). Acide abscissique lié et dormance embryonnaire chez *Pyrus malus*. *Physiologia Plantarum* **46**, 115–120.
- Le Page-Degivry MT & Gaussen H (1970). Acide abscissique et dormance chez les embryons de *Taxus baccata* L. *Acad Sci Paris CR Ser D*.
- Leasure CD & He Z-H (2012). CLE and RGF family peptide hormone signaling in plant development. *Molecular Plant* **5**, 1173.
- Lebon E, Pellegrino A, Louarn G & Lecoeur J (2006). Branch development controls leaf area dynamics in grapevine (*Vitis vinifera*) growing in drying soil. *Annals of Botany* **98**, 175–185.
- Lebon E, Pellegrino A, Tardieu F & Lecoeur J (2004). Shoot development in grapevine (*Vitis vinifera* L.) is affected by the modular branching pattern of the stem and intra-and inter-shoot trophic competition. *Annals of Botany* **93**, 263–274.
- Lebon G, Duchêne E, Brun O, Magné C & Clément C (2004). Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sexual Plant Reproduction* **17**, 71–79.
- Lebon G, Duchêne E, Brun O & Clément C (2005). Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. *Annals of Botany* **95**, 943–948.
- Lebon G, Wojnarowicz G, Holzapfel B, Fontaine F, Vaillant-Gaveau N & Clément C (2008). Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany* **59**, 2565–2578.
- Leduc N, Roman H, Barbier F, Péron T, Huché-Thélier L, Lothier J, Demotes-Mainard S & Sakr S (2014). Light signaling in bud outgrowth and branching in plants. *Plants* **3**, 223–250.
- Lee J & Lee I (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2247–2254.
- Legave JM, Blanke M, Christen D, Giovannini D, Mathieu V & Oger R (2013). A comprehensive overview of the spatial and temporal variability of apple bud dormancy release and blooming phenology in Western Europe. *International Journal of Biometeorology* **57**, 317–331.
- Leibfried A, To JP, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ & Lohmann JU (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**, 1172–1175.

- Lenhard M & Laux T (2003). Stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. *Development* **130**, 3163–3173.
- Letham DS & Palni LMS (1983). The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* **34**, 163–197.
- Li C, Junttila O, Ernstsén A, Heino P & Palva ET (2003). Photoperiodic control of growth, cold acclimation and dormancy development in silver birch (*Betula pendula*) ecotypes. *Physiologia Plantarum* **117**, 206–212.
- Li Q, Fan C, Zhang X, Wang X, Wu F, Hu R & Fu Y (2014). Identification of a soybean MOTHER OF FT AND TFL1 homolog involved in regulation of seed germination. *PLOS One* **9**, e99642.
- Li R, Wang A, Sun S, Liang S, Wang X, Ye Q & Li H (2012). Functional characterization of FT and MFT ortholog genes in orchid (*Dendrobium nobile* Lindl) that regulate the vegetative to reproductive transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **111**, 143–151.
- Li-Mallet A, Rabot A & Geny L (2016). Factors controlling inflorescence primordia formation of grapevine: their role in latent bud fruitfulness? A review. *Botany* **94**, 147–163.
- Liu F, Jensen CR & Andersen MN (2004). Pod set related to photosynthetic rate and endogenous ABA in soybeans subjected to different water regimes and exogenous ABA and BA at early reproductive stages. *Annals of Botany* **94**, 405–411.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408.
- Livne A & Vaadia Y (1972). Water deficits and hormone relations. *Water Deficits and Plant Growth* **3**, 255–275.
- Lombard PJ, Cook NC & Bellstedt DU (2006). Endogenous cytokinin levels of table grape vines during spring budburst as influenced by hydrogen cyanamide application and pruning. *Scientia Horticulturae* **109**, 92–96.
- Lombard PB, Price SF & Ibacache AE (1991). Girdling and shading affect inflorescences necrosis, fruit set and tissue ammonium in Pinot Noir grapevines. In *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines, American Society for Enology and Viticulture (ED)*, pp. 278–281.
- Louarn G (2005). Analyse et modélisation de l'organogénèse et de l'architecture du rameau de vigne (*Vitis vinifera* L.) Thèse troisième cycle. École Nationale Supérieure Agronomique (Montpellier).
- Loveys BR, Dry PR, Stoll M & McCarthy MG (2000). Using plant physiology to improve the water use efficiency of horticultural crops. *Acta Horticulturae* **537**, 187–197.
- Loveys BR, Kriedemann PE & Törökfalvy E (1973). Is abscisic acid involved in stomatal response to carbon dioxide? *Plant Science Letters* **1**, 335–338.
- Luan S (2002). Signalling drought in guard cells. *Plant, Cell & Environment* **25**, 229–237.
- MacGregor CA (2000). Cool climate crop size estimation: Site specific. In *Fifth International Symposium on Cool Climate Viticulture and Oenology*. Melbourne, Australia [published on CD, 2002].

- Macknight R, Bancroft I, Page T, Lister C, Schmidt R, Love K, Westphal L, Murphy G, Sherson S & Cobbett C (1997). FCA, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* **89**, 737–745.
- Maillot P, Lebel S, Schellenbaum P, Jacques A & Walter B (2009). Differential regulation of SERK, LEC1-Like and pathogenesis-related genes during indirect secondary somatic embryogenesis in grapevine. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 743–752.
- Mandel MA, Bowman JL, Kempin SA, Ma H, Meyerowitz EM & Yanofsky MF (1992). Manipulation of flower structure in transgenic tobacco. *Cell* **71**, 133–143.
- Mansfield TK & Howell GS (1981). Response of soluble solids accumulation, fruitfulness, cold resistance, and onset of bud growth to differential defoliation stress at véraison in Concord grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* **32**, 200–205.
- Marchadier E & Hetherington AM (2014). Involvement of two-component signalling systems in the regulation of stomatal aperture by light in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **203**, 462–468.
- Matthews MA & Anderson MM (1989). Reproductive development in grape. *Vitis* **40**, 52–56.
- May P (1965). Reducing inflorescence formation by shading individual Sultana buds. *Australian Journal of Biological Sciences* **18**, 463–474.
- May P (1987). The grapevine as a perennial, plastic and productive plant. In *Proceedings of the Sixth Australian Wine Industry Technical Conference*. TH Lee (Ed.), pp. 40–49.
- May P (2000). From bud to berry, with special reference to inflorescence and bunch morphology in *Vitis vinifera* L. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 82–98.
- May P & Antcliff AJ (1963). The effect of shading on fruitfulness and yield in the Sultana. *Journal of Horticultural Science* **38**, 85–94.
- May P, Clingeleffer PR & Brien CJ (1976). Sultana (*Vitis vinifera* L.) canes and their exposure to light. *Vitis* **14**, 273–238.
- McManus JFA (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* **23**, 99–108.
- Medici A, Laloi M & Atanassova R (2014). Profiling of sugar transporter genes in grapevine coping with water deficit. *FEBS Letters* **588**, 3989–3997.
- Meziere D, Gary C, Barbier JM, Bernos L, Clement C, Constant N, Deliere L, Forget D, Grosman J & Molot B (2009). Ecophyto R&D. Vers des systèmes de culture économes en pesticides. Volet 1. Tome III : analyse comparative de différents systèmes en viticulture. Ed INRA, France.
- Mimida N, Komori S, Suzuki A & Wada M (2013). Functions of the apple TFL1/FT orthologs in phase transition. *Scientia Horticulturae* **156**, 106–112.
- Mishra BS, Singh M, Aggrawal P & Laxmi A (2009). Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. *PLOS one* **4**, e4502.
- Mohamed HB, Vadel AM, Geuns JM & Khemira H (2012). Carbohydrate changes during dormancy release in Superior Seedless grapevine cuttings following hydrogen cyanamide treatment. *Scientia Horticulturae* **140**, 19–25.
- Mohamed R, Wang C-T, Ma C, Shevchenko O, Dye SJ, Puzey JR, Etherington E, Sheng X, Meilan R & Strauss SH (2010). *Populus* CEN/TFL1 regulates first onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release in *Populus*. *The Plant Journal* **62**, 674–688.

- Moon J, Suh S-S, Lee H, Choi K-R, Hong CB, Paek N-C, Kim S-G & Lee I (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **35**, 613–623.
- Morgan DC, Stanley CJ & Warrington IJ (1985). The effects of simulated daylight and shade-light on vegetative and reproductive growth in kiwifruit and grapevine. *Journal of Horticultural Science* **60**, 473–484.
- Morot-Gaudry J-F, Prat R, Bohn-Courseau I, Jullien M, Parcy F, Perrot-Rechenmann C, Reisdorf-Cren M, Savouré A & Richard L (2017). *Biologie végétale : Croissance et développement-3e éd.* Dunod.
- Motomura Y (1993). ¹⁴C-assimilate partitioning in grapevine shoots: effects of shoot pinching, girdling of shoot, and leaf-halving on assimilates partitioning from leaves into clusters. *American Journal of Enology and Viticulture* **44**, 1–7.
- Moubayidin L, Di Mambro R & Sabatini S (2009). Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends in Plant Science* **14**, 557–562.
- Mouradov A, Cremer F & Coupland G (2002). Control of flowering time interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell* **14**, S111–S130.
- Müller D & Leyser O (2011). Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany* **107**, 1203–1212.
- Mullins MG (1967). Morphogenetic effects of roots and of some synthetic cytokinins in *Vitis vinifera* L. *Journal of Experimental Botany* **18**, 206–214.
- Mullins MG, Bouquet A & Williams LE (1992). *Biology of the grapevine*. Cambridge University Press.
- Nakamura S, Abe F, Kawahigashi H, Nakazono K, Tagiri A, Matsumoto T, Utsugi S, Ogawa T, Handa H & Ishida H (2011). A wheat homolog of MOTHER OF FT AND TFL1 acts in the regulation of germination. *The Plant Cell* **23**, 3215–3229.
- Nazemille A (1977). Variation de la fertilité des bourgeons pendant le repos végétatif chez le cépage Merlot (*Vitis vinifera* L.). *OENO One* **11**, 195–205.
- Nishikawa F, Endo T, Shimada T, Fujii H, Shimizu T & Omura M (2008). Isolation and characterization of a *Citrus* FT/TFL1 homologue (CuMFT1), which shows quantitatively preferential expression in *Citrus* seeds. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **77**, 38–46.
- Noyce PW, Harper JD, Steel CC & Wood RM (2015). A New Description and Rate of Development of Inflorescence Primordia over a Full Season in *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay. *American Journal of Enology and Viticulture*, ajev–2015.
- Obbink JG, Alexander DM & Possingham JV (1973). Use of nitrogen and potassium reserves during growth of grape vine cuttings. *Vitis* **12**, 207–213.
- Ogawa M, Shinohara H, Sakagami Y & Matsubayashi Y (2008). *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* **319**, 294–294.
- Olivain C & Bessis R (1987). L'organogenèse inflorescentielle dans les bourgeons anticipés de vigne (*Vitis vinifera* L. cépage Pinot). *Vitis* **26**, 98–106.
- Ollat N, Carde J-P, Gaudillère J-P, Barrieu F, Diakou-Verdin P & Moing A (2002). Grape berry development: a review. *OENO One* **36**, 109–131.

- Onouchi H, Igeño MI, Périlleux C, Graves K & Coupland G (2000). Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. *The Plant Cell* **12**, 885–900.
- Ophir R, Pang X, Halaly T, Venkateswari J, Lavee S, Galbraith D & Or E (2009). Gene-expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy-release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene-ABA interplay and cell enlargement. *Plant Mol Biol* **71**, 403.
- Or E, Belausov E, Popilevsky I & Bental Y (2000). Changes in endogenous ABA level in relation to the dormancy cycle in grapevines grown in a hot climate. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **75**, 190–194.
- Pallas B, Louarn G, Christophe A, Lebon E & Lecoœur J (2008). Influence of intra-shoot trophic competition on shoot development in two grapevine cultivars (*Vitis vinifera*). *Physiologia Plantarum* **134**, 49–63.
- Pantin F, Monnet F, Jannaud D, Costa JM, Renaud J, Muller B, Simonneau T & Genty B (2013). The dual effect of abscisic acid on stomata. *New Phytologist* **197**, 65–72.
- Parcy F, Bomblies K & Weigel D (2002). Interaction of LEAFY, AGAMOUS and TERMINAL FLOWER1 in maintaining floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 2519–2527.
- Parish MPD (1996). The role of ammonium, calcium, and ethylene in the development of the physiological disorder early bunch-stem necrosis of *Vitis vinifera* L. cv 'Cabernet Sauvignon'. *Thesis for the degree of Master*, Lincoln University.
- Parker CW & Letham DS (1974). Regulators of cell division in plant tissues. *Planta* **115**, 337–344.
- Paulraj S (2013). The role of abscisic acid in *Arabidopsis thaliana* shoot organogenesis. *Thesis*. University of Calgary.
- Pearce G, Strydom D, Johnson S & Ryan CA (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**, 895–899.
- Peer WA, Blakeslee JJ, Yang H & Murphy AS (2011). Seven things we think we know about auxin transport. *Molecular Plant* **4**, 487–504.
- Pérez FJ, Kühn N & Vergara R (2011). Expression analysis of phytochromes A, B and floral integrator genes during the entry and exit of grapevine-buds from endodormancy. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1659–1666.
- Perrone C & Felicini GP (1974). Dominance apicale et morphogénèse chez *Petroglossum nicaeense* (Duby) Schotter (Rhodophyceae). *Phycologia* **13**, 187–194.
- Peterson BG, Carl P, Boudt K, Zivot E, Bennett R, Ulrich J, Lestel M, Balkissoon K & Wuertz D (2013). *Econometric tools for performance and risk analysis*.
- Petit A-N, Vaillant N, Boulay M, Clément C & Fontaine F (2006). Alteration of photosynthesis in grapevines affected by esca. *Phytopathology* **96**, 1060–1066.
- Petrie PR & Clingeffer PR (2005). Effects of temperature and light (before and after budburst) on inflorescence morphology and flower number of Chardonnay grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**, 59–65.
- Poitras E & Houde A (2002). La PCR en temps réel : principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* **2**, 2–11.

- Poni S, Casalini L, Bernizzoni F, Civardi S & Intrieri C (2006). Effects of early defoliation on shoot photosynthesis, yield components, and grape composition. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**, 397–407.
- Popova L (1995). Effect of fluridone on plant development and stress-induced ABA accumulation in *Vicia faba* L. *Bulg. J. Plant Physiol* **21**, 42-50
- Pospisilova J, Vagner M, Malbeck J, Travnickova A & Batkova P (2005). Interactions between abscisic acid and cytokinins during water stress and subsequent rehydration. *Biologia Plantarum* **49**, 533–540.
- Pouget R (1963). Recherches physiologiques sur le repos végétatif de la vigne (*Vitis vinifera* L.) : la dormance des bourgeons et le mécanisme de sa disparition. *Thèse troisième cycle*, Institut National de la Recherche Agronomique.
- Pouget R (1966). Relations entre la dormance et le rythme végétatif chez la vigne. *Bulletin de la Société Botanique de France* **113**, 101–109.
- Pouget R (1981). Action de la température sur la différenciation des inflorescences et des fleurs durant les phases de pré-débourrement et de post-débourrement des bourgeons latents de la vigne. *OENO One* **15**, 65–79.
- Pratt C (1971). Reproductive anatomy in cultivated grapes-a review. *American Journal of Enology and Viticulture* **22**, 92–109.
- Prusinkiewicz P, Crawford S, Smith RS, Ljung K, Bennett T, Ongaro V & Leyser O (2009). Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 17431–17436.
- Pryke JA & Bernier G (1978). Acid invertase activity in the apex of *Sinapis alba* during transition to flowering. *Annals of Botany* **42**, 747–749.
- Rabot A, Henry C, Ben Baaziz K, Mortreau E, Azri W, Lothier J, Hamama L, Boummaza R, Leduc N & Pelleschi-Travier S (2012). Insight into the role of sugars in bud burst under light in the rose. *Plant and Cell Physiology* **53**, 1068–1082.
- Rameau C, Bertheloot J, Leduc N, Andrieu B, Foucher F & Sakr S (2015). Multiple pathways regulate shoot branching. *Frontiers in Plant Science* **5**, 741.
- Randoux M, Davière J-M, Jeauffre J, Thouroude T, Pierre S, Toualbia Y, Perrotte J, Reynoird J-P, Jammes M-J & Oyant H-S (2014). RoKSN, a floral repressor, forms protein complexes with RoFD and RoFT to regulate vegetative and reproductive development in rose. *New Phytologist* **202**, 161–173.
- Randoux M, Jeauffre J, Thouroude T, Vasseur F, Hamama L, Juchaux M, Sakr S & Foucher F (2012). Gibberellins regulate the transcription of the continuous flowering regulator, RoKSN, a rose TFL1 homologue. *Journal of Experimental Botany* **63**, 6543–6554.
- Ratcliffe OJ, Bradley DJ & Coen ES (1999). Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development* **126**, 1109–1120.
- Raven P, Johnson G-B, Losos J, Singer S & Mamecier A (2007). *Biologie*, 1ère. De Boeck, Bruxelles.
- Raven PH, Evert RF & Eichhorn SE (2005). *Biology of Plants*. W. H. Freeman.
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, & Lund ST (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology* **6**, 27.

- Remay A, Lalanne D, Thouroude T, Le Couviour F, Hibrand-Saint Oyant L & Foucher F (2009). A survey of flowering genes reveals the role of gibberellins in floral control in rose. *Theoretical and Applied Genetics* **119**, 767–781.
- Reynier A (2011). *Manuel de viticulture : Guide technique du viticulteur*. Lavoisier.
- Reynolds AG, Wardle DA & Naylor AP (1996). Impact of training system, vine spacing, and basal leaf removal on Riesling. Vine performance, berry composition, canopy microclimate, and vineyard labor requirements. *American Journal of Enology and Viticulture* **47**, 63–76.
- Rinne P, Saarelainen A & Junttila O (1994). Growth cessation and bud dormancy in relation to ABA level in seedlings and coppice shoots of *Betula pubescens* as affected by a short photoperiod, water stress and chilling. *Physiologia Plantarum* **90**, 451–458.
- Roitsch T & Ehneß R (2000). Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation* **32**, 359–367.
- Roland JC (1974). Cytochimie des polysaccharides végétaux : détection et extraction sélectives. *Journal de Microscopie* **21**, 233–244.
- Roldán M, Gómez-Mena C, Ruiz-García L, Salinas J & Martínez-Zapater JM (1999). Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. *The Plant Journal* **20**, 581–590.
- Roman H, Girault T, Barbier F, Péron T, Brouard N, Pěnčík A, Novák O, Vian A, Sakr S & Lothier J (2016). Cytokinins are initial targets of light in the control of bud outgrowth. *Plant Physiology* **172**, 489–509.
- Rubio S, Dantas D, Bressan-Smith R & Pérez FJ (2016). Relationship between endodormancy and cold hardiness in grapevine buds. *Journal of Plant Growth Regulation* **35**, 266–275.
- Rubio S, Donoso A & Pérez FJ (2014). The dormancy-breaking stimuli “chilling, hypoxia and cyanamide exposure” up-regulate the expression of α -amylase genes in grapevine buds. *Journal of Plant Physiology* **171**, 373–381.
- Sachs RM & Hackett WP (1977). Chemical control of flowering. In *International Symposium on Flower Formation in Ornamentals* **68**, pp. 29–50.
- Sakakibara H (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 431–449.
- Sanchez LA & Dokoozlian NK (2005). Bud microclimate and fruitfulness in *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture* **56**, 319–329.
- Schellenbaum P, Jacques A, Maillot P, Bertsch C, Mazet F, Farine S & Walter B (2008). Characterization of VvSERK1, VvSERK2, VvSERK3 and VvL1L genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports* **27**, 1799–1809.
- Scholefield PB, Sedgley M & Alexander DM (1985). Carbohydrate cycling in relation to shoot growth, floral initiation and development and yield in the avocado. *Scientia Horticulturae* **25**, 99–110.
- Seki M, Umezawa T, Urano K & Shinozaki K (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 296–302.
- Serrano E, Gontier L, Dufourcq T & Roussel S (2005). Estimation précoce du rendement de la vigne : corrélation entre le volume de la grappe de *Vitis vinifera* en cours de croissance et son poids à la récolte. *Compte-rendu de recherche, IFV*.

- Shannon S & Meeks-Wagner DR (1991). A mutation in the *Arabidopsis* TFL1 gene affects inflorescence meristem development. *The Plant Cell* **3**, 877–892.
- Sharma VK, Carles C & Fletcher JC (2003). Maintenance of stem cell populations in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 11823–11829.
- Sharp RE, LeNoble ME, Else MA, Thorne ET & Gherardi F (2000). Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1575–1584.
- Shaulis NJ & Smart RE (1974). Grapevine canopies: management, microclimate and yield responses. In *Proceedings XIX International Horticultural Congress, Warsaw, Poland*, pp. 255–265.
- Shimizu-Sato S, Tanaka M & Mori H (2009). Auxin–cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology* **69**, 429–435.
- Skinner PW & Matthews MA (1989). Reproductive development in grape (*Vitis vinifera* L.) under phosphorus-limited conditions. *Scientia Horticulturae* **38**, 49–60.
- Smart RE, Dick JK, Gravett IM & Fisher BM (1990). Canopy management to improve grape yield and wine quality - principles and practices. *South African Journal of Enology and Viticulture* **11**, 3–17.
- Smart RE, Shaulis NJ & Lemon ER (1982). The effect of Concord vineyard microclimate on yield. I. The effects of pruning, training, and shoot positioning on radiation microclimate. *American Journal of Enology and Viticulture* **33**, 99–108.
- Sohn EJ, Rojas-Pierce M, Pan S, Carter C, Serrano-Mislata A, Madueño F, Rojo E, Surpin M & Raikhel NV (2007). The shoot meristem identity gene TFL1 is involved in flower development and trafficking to the protein storage vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 18801–18806.
- Southey JM & Jooste JH (1991). The effect of grapevine rootstock on the performance of *Vitis vinifera* L. (cv. Colombard) on a relatively saline soil. *South African Journal of Enology and Viticulture* **12**, 32–41.
- Sreekantan L & Thomas MR (2006). VvFT and VvMADS8, the grapevine homologues of the floral integrators FT and SOC1, have unique expression patterns in grapevine and hasten flowering in *Arabidopsis*. *Functional Plant Biology* **33**, 1129–1139.
- Srinivasan C & Mullins MG (1976). Reproductive anatomy of the grape-vine (*Vitis vinifera* L.): Origin and development of the anlage and its derivatives. *Annals of Botany* **40**, 1079–1084.
- Srinivasan C & Mullins MG (1978). Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) Formation of inflorescences in vitro by isolated tendrils. *Plant Physiology* **61**, 127–130.
- Srinivasan C & Mullins MG (1979). Flowering in *Vitis*: conversion of tendrils into inflorescences and bunches of grapes. *Planta* **145**, 187–192.
- Srinivasan C & Mullins MG (1980a). Effects of temperature and growth regulators on formation of anlagen, tendrils and inflorescences in *Vitis vinifera* L. *Annals of Botany* **45**, 439–446.
- Srinivasan C & Mullins MG (1980b). Flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.): histochemical changes in apices during the formation of the anlage and its derivatives. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **97**, 299–308.
- Srinivasan C & Mullins MG (1981a). Physiology of flowering in the grapevine—a review. *American Journal of Enology and Viticulture* **32**, 47–63.

- Srinivasan C & Mullins MG (1981b). Induction of precocious flowering in grapevine seedlings by growth regulators. *Agronomie* **1**, 1–5.
- Srinivasan C, Muthukrishnan CR & Shivashankara KT (1972). Influence of the nutrients on the size of cluster primordial in grape buds (*Vitis vinifera* L.). *Potash Review* **29**, 1–4.
- Stephan J (2007). Architecture 3D et microclimat lumineux de l'arbre. Comparaison de cultivars de pommier soumis à des manipulations de conduite. *Thèse troisième cycle*, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II ; Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I.
- Stetsenko LA, Vedenicheva NP, Likhnevsky RV & Kuznetsov VV (2015). Influence of abscisic acid and fluridone on the content of phytohormones and polyamines and the level of oxidative stress in plants of *Mesembryanthemum crystallinum* L. under salinity. *Biology Bulletin* **42**, 98–107.
- Strabala TJ, O'Donnell PJ, Smit A-M, Ampomah-Dwamena C, Martin EJ, Netzler N, Nieuwenhuizen NJ, Quinn BD, Foote HC & Hudson KR (2006). Gain-of-function phenotypes of many CLAVATA3/ESR genes, including four new family members, correlate with tandem variations in the conserved CLAVATA3/ESR domain. *Plant Physiology* **140**, 1331–1344.
- Su Y-H, Liu Y-B & Zhang X-S (2011). Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant* **4**, 616–625.
- Sugiura A, Utsunomiya N & Kobayashi A (1975). Effects of day-length and temperature on growth and bunch differentiation of grapevines. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **43**, 387–392.
- Sun J, Wang H, Ren L, Chen S, Chen F & Jiang J (2017). *CmFTL2* is involved in the photoperiod- and sucrose-mediated control of flowering time in chrysanthemum. *Horticulture Research* **4**, 17001.
- Svendsen E, Wilen R, Stevenson R, Liu R & Tanino KK (2007). A molecular marker associated with low-temperature induction of dormancy in red osier dogwood (*Cornus sericea*). *Tree Physiology* **27**, 385–397.
- Swanepoel JJ & Archer E (1988). The ontogeny and development of *Vitis vinifera* L. cv. Chenin blanc inflorescence in relation to phenological stages. *VITIS-Journal of Grapevine Research* **27**, 133.
- Tan H, Yang X, Zhang F, Zheng X, Qu C, Mu J, Fu F, Li J, Guan R & Zhang H (2011). Enhanced seed oil production in canola by conditional expression of *Brassica napus* LEAFY COTYLEDON1 and LEC1-LIKE in developing seeds. *Plant Physiology* **156**, 1577–1588.
- Tao Y-B, Luo L, He L-L, Ni J & Xu Z-F (2014). A promoter analysis of MOTHER OF FT AND TFL11 (JcMFT1), a seed-preferential gene from the biofuel plant *Jatropha curcas*. *Journal of Plant Research* **127**, 513–524.
- Teltscheev A L & Seidlov A F (1977). The differential effect of abscisic acid on *Chenopodium rubrum* L. in dependence on growth and developmental state. *Biologia Plantarum* **19**, 377–380.
- Thiéry J (1967). Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal de Microscopie* **6**, 987–1018.
- Tombesi S, Nardini A, Frioni T, Soccolini M, Zadra C, Farinelli D, Poni S & Palliotti A (2015). Stomatal closure is induced by hydraulic signals and maintained by ABA in drought-stressed grapevine. *Scientific Reports* **5**, 12449.
- Tominaga-Wada R, Nukumizu Y, Wada T, Sawa S & Tetsumura T (2013). CLAVATA3-like genes are differentially expressed in grape vine (*Vitis vinifera*) tissues. *Journal of Plant Physiology* **170**, 1379–1383.

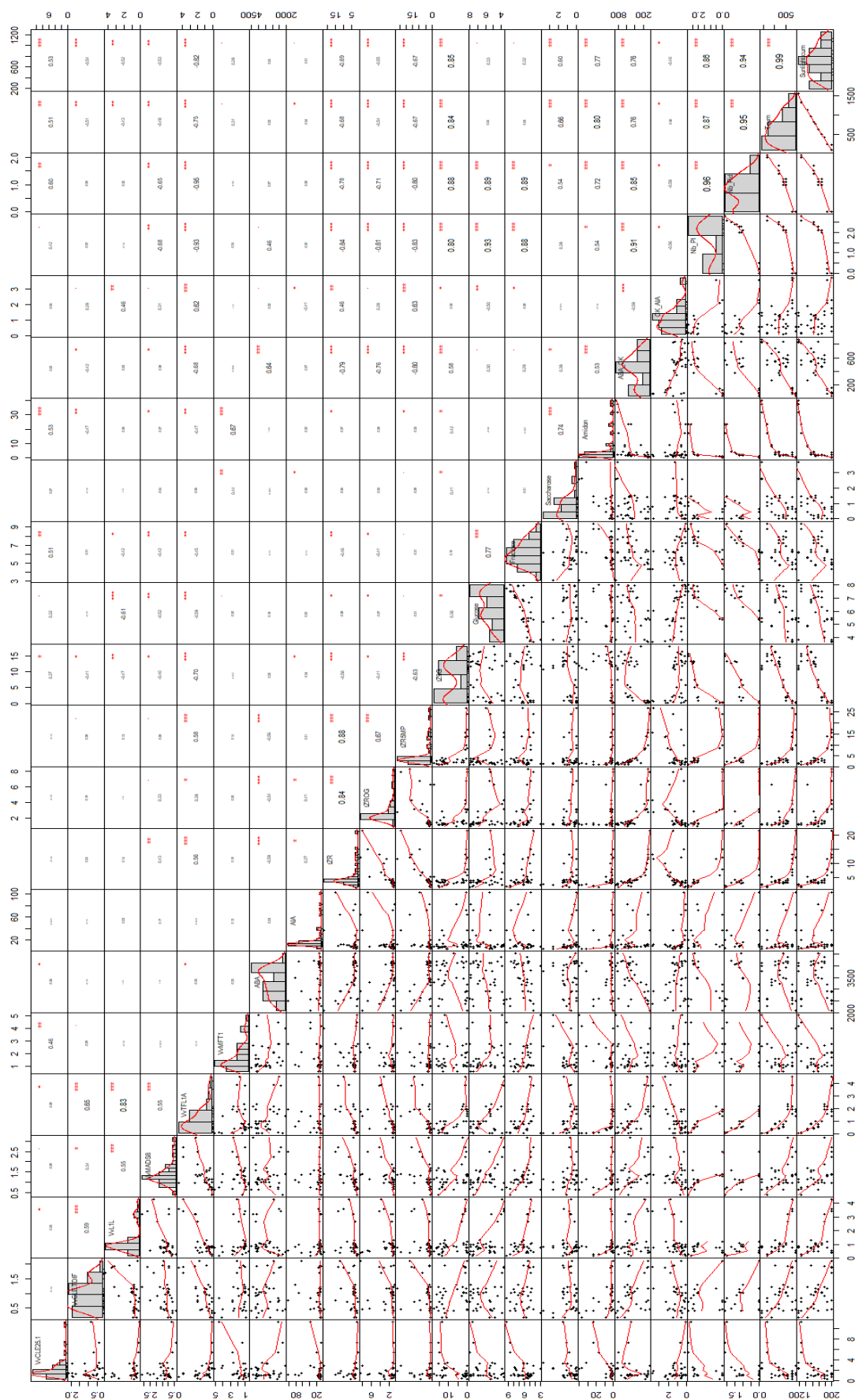
- Travaglia C, Cohen AC, Reinoso H, Castillo C & Bottini R (2007). Exogenous abscisic acid increases carbohydrate accumulation and redistribution to the grains in wheat grown under field conditions of soil water restriction. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 285–289.
- Tromp J & Ova JC (1971). Spring mobilization of storage nitrogen in isolated shoot section of apple. *Physiologia Plantarum* **25**, 16–22.
- Tsukamoto A, Hirai T, Chin DP, Mii M, Mizoguchi T, Mizuta D, Yoshida H, Olsen JE, Ezura H & Fukuda N (2016). The FT-like gene PehFT in petunia responds to photoperiod and light quality but is not the main gene promoting light quality-associated flowering. *Plant Biotechnology* **33**, 297–307.
- Turnbull C (2011). Long-distance regulation of flowering time. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4399–4413.
- Vaadia Y & Kasimatis AN (1961). Vineyard irrigation trials. *American Journal of Enology and Viticulture* **12**, 88–98.
- Vaillant-Gaveau N, Wojnarowicz G, Petit A-N, Jacquens L, Panigai L, Clement C & Fontaine F (2014). Relationships between carbohydrates and reproductive development in chardonnay grapevine: impact of defoliation and fruit removal treatments during four successive growing seasons. *OENO One* **48**, 219–229.
- Van Leeuwen C, Friant P, Chone X, Tregoat O, Koundouras S & Dubourdieu D (2004). Influence of climate, soil, and cultivar on terroir. *American Journal of Enology and Viticulture* **55**, 207–217.
- Van Staden J & Bornman CH (1969). Inhibition and promotion by abscisic acid of growth in *Spirodela*. *Planta* **85**, 157–159.
- Van Zyl JL (1984). Response of Colombar grapevines to irrigation as regards quality aspects and growth. *S Afr J Enol Vitic* **5**, 19–28.
- Vasconcelos MC, Greven M, Winefield CS, Trought MC & Raw V (2009). The flowering process of *Vitis vinifera*: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* **60**, 411–434.
- Vishwakarma K, Upadhyay N, Kumar N, Yadav G, Singh J, Mishra RK, Kumar V, Verma R, Upadhyay RG, Pandey M & Sharma S (2017). Absciscic Acid signaling and abiotic stress tolerance in alants: a review on current knowledge and future prospects. *Front Plant Sci* **8**, 161
- Vysotskaya LB, Korobova AV, Veselov SY, Dodd IC & Kudoyarova GR (2009). ABA mediation of shoot cytokinin oxidase activity: assessing its impacts on cytokinin status and biomass allocation of nutrient-deprived durum wheat. *Functional Plant Biology* **36**, 66–72.
- Watt AM, Dunn GM, May PB, Crawford SA & Barlow EWR (2008). Development of inflorescence primordia in *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay from hot and cool climates. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **14**, 46–53.
- Watt J, Hackett S & Holzapfel B (2010). Root dynamics and carbohydrate reserves in rootstocks. *Grapevine Management Guide*, 33–35.
- Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, Yanofsky MF & Meyerowitz EM (1992). LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**, 843–859.
- Williams LE (2000). Bud development and fruitfulness of grapevines. *Raisin Production Manual LP Christensen (Ed)*, 24–29.
- Williams LE & Ayars JE (2005). Water use of Thompson seedless grapevines as affected by the application of gibberellic acid (GA 3) and trunk girdling-practices to increase berry size. *Agricultural and Forest Meteorology* **129**, 85–94.

- Wu X & McSteen P (2007). The role of auxin transport during inflorescence development in maize (*Zea mays*, Poaceae). *American Journal of Botany* **94**, 1745–1755.
- Xi W, Liu C, Hou X & Yu H (2010). MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**, 1733–1748.
- Xing L-B, Zhang D, Li Y-M, Shen Y-W, Zhao C-P, Ma J-J, An N & Han M-Y (2015). Transcription profiles reveal sugar and hormone signaling pathways mediating flower induction in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant and Cell Physiology* **56**, 2052–2068.
- Xu M, Zhu L, Shou H & Wu P (2005). A PIN1 family gene, OsPIN1, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant and Cell Physiology* **46**, 1674–1681.
- Yaginuma H, Hirakawa Y, Kondo Y, Ohashi-Ito K & Fukuda H (2011). A novel function of TDIF-related peptides: promotion of axillary bud formation. *Plant and Cell Physiology* **52**, 1354–1364.
- Yang M & Jiao Y (2016). Regulation of axillary meristem initiation by transcription factors and plant hormones. *Frontiers in Plant Science* **7**, 183.
- Yang Y, Yao A, Wang J & Hu J (2011). The effect of sucrose on the expression of the VvTFL1 and VFL genes during flower development in the “Xiangfei” grapevine. *Scientia Horticulturae* **129**, 299–305.
- Yao A, Wang J, Zhang S, Yang Y, Zhou L & Hu J (2012). The expression patterns of the genes VvTFL1, VFL, VAP1, VvAG1 and VvSEP3 during bud and flower development in the Xiangfei grapevine (*Vitis vinifera* L.). *African Journal of Agricultural Research* **7**, 240–249.
- Yao A, Yang Y, Liao K, Zhang L & Hu J (2010). The expression of VFL and VvTFL1 genes in relation to the effects of gibberellins in different organs of “Xiangfei” grapevine. *African Journal of Biotechnology* **9**, 2748–2755.
- Yin Y-G, Kobayashi Y, Sanuki A, Kondo S, Fukuda N, Ezura H, Sugaya S & Matsukura C (2010). Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. ‘Micro-Tom’) fruits in an ABA-and osmotic stress-independent manner. *Journal of Experimental Botany* **61**, 563–574.
- Yoo SY, Kardailsky I, Lee JS, Weigel D & Ahn JH (2004). Acceleration of flowering by overexpression of MFT. *Mol Cells* **17**, 95–101.
- Zapata C, Deléens E, Chaillou S & Magné C (2004). Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Plant Physiology* **161**, 1031–1040.
- Zeevaart JA (1976). Physiology of flower formation. *Annual Review of Plant Physiology* **27**, 321–348.
- Zelleke A & Kliewer WM (1979). Influence of root temperature and rootstock on budbreak, shoot growth, and fruit composition of Cabernet Sauvignon grapevines grown under controlled conditions. *American Journal of Enology and Viticulture* **30**, 312–317.
- sZhang J, Jia W, Yang J & Ismail AM (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research* **97**, 111–119.
- Zheng C, Halaly T, Acheampong AK, Takebayashi Y, Jikumaru Y, Kamiya Y & Or E (2015). Absciscic acid (ABA) regulates grape bud dormancy, and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism. *Journal of Experimental Botany* **66**, 1527–1542.
- Zhu J-K (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 247–273.

- Zhu S, Wang J, Ye J, Zhu A-D, Guo W & Deng X (2014). Isolation and characterization of LEAFY COTYLEDON 1-LIKE gene related to embryogenic competence in *Citrus sinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **119**, 1–13.
- Zimmermann J (1954.). Sprosshistologie und Holzreife bei Rebe. *Mitt Klosterneuburg* **4**, 101–119.
- Zoecklein BW, Wolf TK, Duncan NW, Judge JM & Cook MK (1992). Effects of fruit zone leaf removal on yield, fruit composition, and fruit rot incidence of Chardonnay and white Riesling (*Vitis vinifera* L.) grapes. *Am J Enol Vitic* **43**, 139–148.
- Zou J-J, Wei F-J, Wang C, Wu J-J, Ratnasekera D, Liu W-X & Wu W-H (2010). *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid-and Ca²⁺-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiology* **154**, 1232–1243.

Annexes

Annexe 1 : Matrice des corrélations de l'ensemble des variables selon le test de Pearson ; les étoiles présentent les différences significatives en fonction de p-value (*) p-value < 0,001 ; ** 0,001<p-value < 0,01 ; * 0,01<p-value<0.05).**



Mieux contrôler les fluctuations de rendement grâce à une meilleure compréhension des mécanismes d'initiation et de différenciation des primordia inflorescentiels du bourgeon latent de Vigne

Résumé : Le déterminisme de la formation de la grappe reste parmi les phénomènes les moins bien précisés de la physiologie de la Vigne. La question a été abordée de plusieurs façons mais les éléments de réponse obtenus ne permettent pas encore de se faire une idée synthétique des mécanismes fondamentaux qui produisent l'apparition des primordia inflorescentiels (PI) en année N-1 et qui pourraient régir jusqu'à 65 à 70% du rendement final en année N. Notre étude s'est donc focalisée sur (i) la caractérisation du processus de formation des PI dans les bourgeons latents de vigne (*Vitis vinifera* L. Merlot) et la redéfinition de la constitution du rendement, (ii) la compréhension des mécanismes d'initiation et de différenciation des PI et (iii) l'évaluation des impacts de différents facteurs (ABA exogène, lumière et effeuillage) sur ces mécanismes.

Cette étude intégrale combinant des approches multi-échelles et multi-disciplinaires a permis dans un premier temps de mettre en évidence le déterminisme de la phase d'induction inflorescentielle dans la construction du rendement en identifiant trois phases clés du processus de formation des PI et en y intégrant une nouvelle notion qu'est le « degré de ramification des PI » ; puis dans un second temps, de proposer certains modes de régulation des mécanismes d'initiation et de différenciation des PI en identifiant trois types de marqueurs précoces de la fertilité potentielle : des marqueurs moléculaires (VvCLE25-1, VvTFL1a et VvMFT1), biochimiques (équilibre CKs/AIA, D-glucose et amidon), et environnementaux (ensoleillement et température journaliers cumulés).

L'ensemble des résultats pourra contribuer au développement d'un outil prédictif précoce de la « fertilité potentielle » (et donc du rendement probable maximum) afin de mieux guider et gérer la taille et les pratiques culturales.

Mots clés : Vigne, Bourgeon latent, Primordia inflorescentiels, Initiation et différenciation, Rendement

Better control yield fluctuations by understanding the initiation and differentiation mechanisms of inflorescence primordia in grapevine latent buds

Abstract: The grape cluster formation determinism remains the one of the undefined phenomena in grapevine physiology process. The topic has been tackled in multiple ways. However, based on all the known information, we still are not allowed to get a synthetic idea of the fundamental mechanisms that produce the appearance of inflorescential primordia in year N-1 and which could govern up to 65 to 70 % of final yield in year N. Our study focuses thus on (i) the characterization of IP formation process in grapevine latent buds (*Vitis vinifera* L. Merlot) and the redefinition of yield constitution, (ii) understanding IP initiation and differentiation mechanisms, and (iii) evaluating the impacts of different factors (exogenous ABA, light and leaf removal) on these mechanisms.

This comprehensive study, which combines multi-scale and multi-disciplinary approaches, firstly allowed us to highlight the determinism of inflorescence induction phase in yield construction by identifying three key phases in IP formation process and by incorporating a new notion which is "IP branching degree". Secondly, it proposed certain modes of regulation of IP initiation and differentiation mechanisms by identifying three types of early markers of bud fruitfulness: molecular markers (VvCLE25-1, VvTFL1a and VvMFT1), biochemical markers (CKs/IAA balance, D-glucose and starch), and environmental markers (cumulative daily sunshine and temperature).

The all-inclusive results contribute to the development of an early predictive tool of "bud fruitfulness" (and thereby the probable maximum yield) to better guide and manage the grapevine training and other cultural practices.

Keywords: Grapevine, Latent bud, Inflorescence primordia, Initiation and differentiation, Yield

Unité de Recherche

Univ Bordeaux, ISVV, EA 4577 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France INRA, ISVV,
USC 1366 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France