



HAL
open science

Effet de l'adaptation des pratiques culturales de la vigne en réponse au changement climatique (manipulation de la canopée, utilisation d'acide abscissique) sur le potentiel qualitatif de la baie de raisin : approches agronomique, analytique et transcriptomique : & Caractérisation fonctionnelle de VviAKR, enzyme potentiellement impliquée dans la voie de biosynthèse des méthoxypyrazines.

Eloïse Brouard

► **To cite this version:**

Eloïse Brouard. Effet de l'adaptation des pratiques culturales de la vigne en réponse au changement climatique (manipulation de la canopée, utilisation d'acide abscissique) sur le potentiel qualitatif de la baie de raisin : approches agronomique, analytique et transcriptomique : & Caractérisation fonctionnelle de VviAKR, enzyme potentiellement impliquée dans la voie de biosynthèse des méthoxypyrazines.. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0408 . tel-03494301

HAL Id: tel-03494301

<https://theses.hal.science/tel-03494301>

Submitted on 19 Dec 2021

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.

THESE PRESENTEE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPECIALITEE OENOLOGIE

Par **Eloïse BROUARD**

Effet de l'adaptation des pratiques culturelles de la vigne en réponse au changement climatique (manipulation de la canopée, utilisation d'acide abscissique) sur le potentiel qualitatif de la baie de raisin : Approches agronomique, analytique et transcriptomique.

&

Caractérisation fonctionnelle de *VviAKR*, enzyme potentiellement impliquée dans la voie de biosynthèse des méthoxypyrazines.

Sous la direction du Dr. Sabine GUILLAUMIE

Soutenue publiquement le 18 Décembre 2018

Membres du Jury :

| | | |
|-------------------------|---|--------------|
| M. Cornelis VAN LEEUWEN | Professeur, Bordeaux Sciences Agro | Président |
| M. Philippe HUGUENEY | Directeur de recherche, INRA Colmar | Rapporteur |
| Mme. Frédérique JOURJON | Professeure, ESA Angers | Rapporteuse |
| Mme. Nathalie GAVEAU | Maître de Conférences, Université de Reims | Examinatrice |
| Mme. Sabine GUILLAUMIE | Maître de Conférences, Université de Bordeaux | Directrice |
| M. Zhanwu DAI | Chargé de recherches, INRA Bordeaux | Invité |
| Mme. Cécile THIBON | Ingénieure de recherches, INRA Bordeaux | Invitée |

Remerciements

Ce manuscrit est l'aboutissement d'un travail d'équipe réalisé au sein du laboratoire Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne à l'INRA de Bordeaux coordonnée par Serge Delrot et Nathalie Ollat. Je les remercie de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire, pour la confiance qu'ils m'ont témoignée ; également mes financeurs, le CIVB, FranceAgriMer, la FRBIE ainsi que le château Couhins pour avoir permis l'expérimentation au vignoble, car sans eux rien n'aurait été possible.

Mais en tout premier lieu je tiens à remercier sincèrement Sabine Guillaumie, ma directrice de thèse, pour m'avoir encouragée, avoir été là pour moi quand j'en ai eu besoin, et malgré tout supporté mes innombrables fautes d'orthographe...

Merci également à Zhanwu Dai, pour les conseils scientifiques et pour avoir répondu à mes multiples questions sur R.

Je remercie Everard Edwards et Annette Boettcher pour l'accueil chaleureux au sein de leur laboratoire à Adélaïde.

Merci à Eric Gomès, Ghislaine Hilbert, Christel Renaud, Isabelle Merlin, Cécile Thibon, Claudine Trossat-Magnin et Duyen Prodhomme pour leur aide scientifique, leurs conseils et leur gentillesse. Merci à Philippe Gallusci pour les discussions et la bonne humeur.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Jean Pierre Petit, Nicolas Hocquard, Cyril Hevin, Willy Goupil et Claude Bonnet pour m'avoir aidée lors des expérimentations en serre, au vignoble ainsi qu'au laboratoire. Vous avez pu, à travers ces recherches précises et minutieuses, rendre ces trois années agréables en m'apportant joie et bonne humeur.

Merci à Catherine et Cathy pour leur soutien dans les démarches administratives et budgétaires qui ne sont vraiment pas simples ...

Je tiens à remercier tous les étudiants, qui au cours de leurs stages, ont contribué à l'avancement de ces travaux. Rémy, Jules, Roméo et Victorine merci.

Merci à mes collègues de bureau, Margot, Solène, Clément, Antoine, Amélie, Camille et particularly to Lina my twin of heart !!! Grâce à eux, à leur bonne humeur je n'ai pas vu passer ces trois dernières années... Excepté peut être les six derniers mois de rédaction...

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien quotidien de mes amis et de ma famille qui ont toujours été là pour moi. Merci à ma maman, mon frère et ma sœur pour tous vos encouragements et vos marques d'affection. Enfin, merci Sacha pour ton soutien et ton indéniable savoir-faire pour me rendre mon sourire et me faire rire.

Titre :

Effet de l'adaptation des pratiques culturales de la vigne en réponse au changement climatique (manipulation canopée, utilisation d'acide abscissique) sur le potentiel qualitatif de la baie de raisin : Approches agronomique, analytique et transcriptomique.

&

Caractérisation fonctionnelle de *VviAKR*, enzyme potentiellement impliquée dans la voie de biosynthèse des méthoxy-pyrazines.

Résumé

Les changements climatiques mondiaux ont déjà affecté et continueront d'affecter la physiologie de la vigne, en particulier le rendement et la composition des baies à la récolte, et donc, en définitive, la qualité et la typicité des vins produits. Parmi les différentes stratégies possibles d'adaptation de la viticulture au changement climatique (modifications de l'encépagement, création de nouvelles variétés mieux adaptées aux conditions futures,...), le contrôle de la composition des baies à la récolte par le biais d'une modification des pratiques culturales et notamment par des manipulations de la canopée (rapport feuilles/fruits (Fe/Fr), manipulation de l'exposition des grappes, échardage) est certainement celle qui serait la plus rapide à mettre en œuvre.

Ma thèse a pour but de rechercher le meilleur point de compromis entre diminution du taux de sucres et maintien de l'acidité, de l'accumulation des composés phénoliques et d'une complexité aromatique proche de l'actuelle, en réponse aux manipulations de canopée (rapport Fe/Fr, échardage) couplées ou non à l'application d'acide abscissique (ABA).

Différents ratio Fe/Fr ont ainsi été étudiés sur le cépage d'étude Cabernet-Sauvignon en conditions semi-contrôlées en serre sur boutures fructifères puis au vignoble au sein d'une parcelle de production. L'analyse de la composition des baies en métabolites primaires et secondaires, réalisée lors de ces deux expériences, a permis de déterminer que le ratio 6 feuilles restantes par grappe était la valeur seuil en dessous de laquelle un effet sur les métabolites primaires est visible. Une diminution du taux de sucres a notamment été observée, également associée à la diminution de la concentration en anthocyanes totales qui sont particulièrement importantes dans la définition de la typicité des vins de Bordeaux. L'application d'ABA exogène sur les baies avant la véraison a permis de diminuer les effets négatifs de la modification du ratio Fe/Fr sur l'accumulation des anthocyanes et n'a pas montré d'impact sur la typicité des vins lors des dégustations des microvinifications réalisées au cours de cette étude. Ces résultats analytiques obtenus ont été couplés à des analyses transcriptomiques de type RNAseq et PCR quantitative en temps réel (Fluidigm) afin d'identifier les gènes clefs associés aux voies métaboliques primaires et secondaires réagissant aux modulations du ratio Fe/Fr couplées ou non à l'ajout d'ABA. Ainsi, le couplage modulation du ratio Fe/Fr et application d'ABA exogène sur les baies serait une méthode potentiellement utilisable afin de réduire le taux de sucres et de maintenir une typicité bordelaise proche de l'actuelle.

La caractérisation fonctionnelle d'un gène potentiellement associé à la voie de biosynthèse des méthoxy-pyrazines, impliquées dans le caractère végétal du raisin et du vin, a également été mise en œuvre. Différentes approches, ont été testées et ont fourni des indices utiles, cependant les résultats obtenus sont encore en cours de confirmation.

Mots clés : Changement climatique, Baies de raisin, Canopée, Acide abscissique, Métabolites primaire et secondaires, Méthoxy-pyrazines

Title:

Effect of viticultural practice adaptation in response to climate change (canopy management, abscisic acid utilisation) on the qualitative potential of the grape berry: agronomic, analytical and transcriptomic approaches

&

Functional characterization of *VviAKR*, an enzyme potentially involved in the methoxypyrazines biosynthetic pathway.

Abstract:

Global climate changes have already affected and will continue to affect the physiology of grapevine, in particular the yield and berry composition at harvest, and thus ultimately the quality and typicality of the wines produced. Among the different possible strategies of adapting viticulture to climate change (changes varieties, creation of new varieties better adapted to future conditions,...), modulating berry composition at harvest through changing cultural practices, such as manipulations of the canopy (leaf / fruit ratio, grape exposure), may be a fast and efficient option as a short-term adaptation strategy.

My thesis aims to find the best point of compromise between reducing the sugar level and, maintaining the acidity, phenolic compounds, and the aromatic complexity by the canopy manipulations (leaves / fruits ratio, secondary shoot removal), coupled or not with the application of abscisic acid.

Different leaf / fruit ratios were studied on the Cabernet-Sauvignon cultivar in greenhouse and in vineyard within a plot of production. The berry composition analysis of primary and secondary metabolites, performed in these two experiments, made it possible to determine that the ratio of 6 leaves remaining per cluster was the threshold value below which an effect on the primary metabolites is visible. A decrease in the sugar content was especially observed, also associated with a decrease in the concentration of total anthocyanins which are particularly important in the definition of the typicality of Bordeaux wines. The application of exogenous abscisic acid to the berries before veraison permitted to reduce the negative effects of the modification of the leaf-to-fruit ratio on the accumulation of anthocyanins and did not affect the typicality of the wines during the tastings of the microvinifications carried out during this study. These analytical results were coupled with transcriptomic analyses of RNAseq and real-time quantitative PCR (Fluidigm) to identify key genes associated with the primary and secondary metabolic pathways reacting to modulations of leaf-to-fruit ratio coupled or not with the addition of abscisic acid. Thus, the coupling modulation of the leaf-to-fruit ratio to the application of exogenous abscisic acid on the berries would be a usable method to reduce the sugar content and maintain a typicality of Bordeaux wines close to the current one.

The functional characterization of a gene potentially associated with the biosynthetic pathway of methoxypyrazines, which are involved in vegetable character of grapes and wine, was also conducted. Different approaches have been tested and provided useful clues but the conclusive results are still under further confirmation.

Keywords : Climate change, Grape berry, Canopy, Abscisic acid, Primary and secondary metabolites, Methoxypyrazines

Table des matières

| | |
|--|----|
| Chapitre I : Synthèse bibliographique | 16 |
| Avant-propos..... | 17 |
| Etat de l'art..... | 20 |
| I. Changement climatique et impacts sur la viticulture | 20 |
| II. Leviers d'actions possibles | 24 |
| A) Pratiques à long terme | 24 |
| 1. Changement d'encépagement | 24 |
| 2. Implantation de nouveaux vignobles | 25 |
| B) Pratiques à court terme..... | 27 |
| 1. Manipulations de la canopée | 28 |
| 2. Utilisation d'hormones exogènes | 30 |
| III. La baie de raisin | 33 |
| A) Morphologie et anatomie | 33 |
| 1. La pellicule | 34 |
| 2. La pulpe..... | 34 |
| 3. Les pépins | 34 |
| B) Développement et maturation..... | 35 |
| C) Métabolites primaires et secondaires..... | 37 |
| 1. Métabolites primaires..... | 37 |
| 2. Métabolites secondaires | 45 |
| IV. Voie de biosynthèse des méthoxypyrazines | 56 |
| V. Objectifs de ma thèse..... | 59 |

Chapitre II : Minimiser les effets du changement climatique sur la composition biochimique et le transcriptome de la baie par manipulation de la canopée (Projet d'article) 62

| | | |
|------|--|-----|
| I. | Background..... | 65 |
| II. | Methods | 67 |
| | A) Plant material and sampling..... | 67 |
| | B) Thermal imaging of the bunch zone..... | 68 |
| | C) Leaf area measurement..... | 68 |
| | D) Berry biochemical composition | 68 |
| | E) Statistical analysis | 71 |
| | F) Fluidigm real-time PCR quantifications..... | 71 |
| | G) RNA-seq analysis..... | 73 |
| III. | Results | 75 |
| | A) Leaf area | 75 |
| | B) Temperature control | 75 |
| | C) Berry weight..... | 75 |
| | D) Soluble sugar and organic acid contents..... | 76 |
| | E) Anthocyanins content and composition | 78 |
| | F) Amino acids content..... | 79 |
| | G) Aroma and aroma precursors content | 80 |
| | 1. IBMP..... | 80 |
| | 2. Thiols precursors..... | 80 |
| | H) Metabolites interactions | 81 |
| | I) Gene expression kinetics in berries submitted to early LFR modulation | 83 |
| | 1. Hormone biosynthesis pathway and signal transduction | 83 |
| | 2. Carbohydrate metabolism and sugar transport..... | 84 |
| | 3. Anthocyanin biosynthesis genes | 87 |
| | 4. Aroma and aroma precursor metabolism genes | 88 |
| | J) Identification of candidate genes at mid-veraison related to early LFR reduction..... | 91 |
| | 1. Carbohydrate and energy metabolism related genes..... | 95 |
| | 2. Amino acid metabolism | 96 |
| | 3. Hormone signal transduction | 96 |
| IV. | Conclusions..... | 97 |
| V. | Additional files..... | 98 |
| VI. | References..... | 107 |

Chapitre III : Effet de l'utilisation d'acide abscissique exogène couplée à la modulation du ratio sources-puits sur le métabolisme de la baie de raisin : du transcriptome de la baie à l'analyse sensorielle du vin (Projet d'article) 110

| | | |
|-----|---|-----|
| I. | Introduction..... | 114 |
| II. | Material and Methods..... | 116 |
| | A) Location, vine material and experimental set up..... | 116 |

| | | |
|------|--|-----|
| B) | Agronomical measurement | 117 |
| C) | Environmental measurements | 118 |
| D) | Berry biochemical composition | 118 |
| E) | Microvinification and sensory evaluation | 121 |
| F) | Grape must composition | 121 |
| G) | Wine composition | 122 |
| H) | Statistical analysis | 122 |
| I) | RNA-seq analysis | 122 |
| J) | Fluidigm real-time PCR quantifications | 124 |
| III. | Results and discussion | 126 |
| A) | Agronomic and environmental measurements | 126 |
| B) | Berry weight | 126 |
| C) | Berry biochemical composition | 127 |
| 1. | Abscisic acid content | 127 |
| 2. | Primary metabolite contents | 129 |
| 3. | Anthocyanins contents | 131 |
| 4. | MPs and 1.8-cineole berry contents | 132 |
| 5. | Thiols precursors contents | 134 |
| D) | Metabolites interactions | 134 |
| E) | General composition in must | 136 |
| F) | General wine composition | 138 |
| G) | Wine sensory analysis | 141 |
| H) | Gene expression kinetics in berries in response to LFR modulation and ABA treatment | 143 |
| 1. | Hormone biosynthesis pathway and signal transduction | 144 |
| 2. | Carbohydrate metabolism and sugar transport | 146 |
| 3. | Anthocyanin related genes | 148 |
| 4. | Aroma and aroma precursor related genes | 150 |
| 5. | Detoxification related genes | 153 |
| I) | Identification of candidate genes differentially expressed at mid-veraison in response to source-sink modulation and ABA treatment | 154 |
| 1. | Photosynthesis-related genes | 157 |
| 2. | Carbohydrate metabolism | 159 |
| 3. | Amino acids metabolism | 161 |
| 4. | Hormone signal transduction | 163 |
| 5. | Secondary metabolites-related genes | 167 |
| 6. | Transcription factors | 171 |
| IV. | Conclusions | 174 |
| V. | Supplementary data | 175 |
| VI. | References | 187 |

| | |
|--|-----|
| Chapitre IV : Caractérisation fonctionnelle de <i>VviAKR</i>, enzyme potentiellement impliquée dans la voie de biosynthèse des méthoxypyrazines | 191 |
| I. Introduction..... | 193 |
| II. Matériels et méthodes | 198 |
| A) Clonage de l'ADNc pleine longueur de <i>VviAKR</i> | 198 |
| B) Clonage en système Gateway® (Invitrogen) | 199 |
| 1. <i>VviAKR</i> | 200 |
| 2. Doubles transformants : <i>VviAKR</i> et <i>VviOMT3</i> | 202 |
| 3. Hairy roots (HR) | 202 |
| C) Induction de l'Expression des Protéines Recombinantes | 203 |
| 1. <i>VviAKR</i> | 203 |
| 2. Doubles transformant <i>VviAKR</i> et <i>VviOMT3</i> | 204 |
| D) Electrophorèse Monodimensionnelle en Condition Dénaturante (SDS-PAGE) | 204 |
| E) Immunodétection de l'AKR par Western Blot..... | 205 |
| F) Purification des protéines Recombinantes | 205 |
| 1. Préparation des extraits de protéines totales de bactéries | 206 |
| 2. Etapes de purification par chromatographie d'affinité sur résine Protino Ni TED..... | 206 |
| G) Dosage des protéines par la méthode de Bradford | 207 |
| H) Mesure de l'activité alkénal réductase | 207 |
| I) Hairy roots : Agro-infiltration et repiquage des cals | 208 |
| J) Hairy roots : Vérification de l'intégration du plasmide et du transgène | 209 |
| K) Extraction d'ARNtotaux et analyse de l'expression du transgène <i>VviAKR</i> | 210 |
| L) Dosage des méthoxypyrazines par GC-MS..... | 211 |
| III. Résultats | 213 |
| A) Identification des variants alléliques de <i>VviAKR</i> | 213 |
| B) Production des Protéines Recombinantes par <i>E. coli</i> et optimisation..... | 220 |
| 1. Tampon d'extraction | 221 |
| 2. Tampon de lavage..... | 221 |
| C) Dosage MPS..... | 223 |
| 1. Doubles transformant : <i>VviAKR</i> et <i>VviOMT3</i> | 223 |
| 2. Hairy roots | 224 |
| IV. Conclusion et perspectives..... | 226 |
| Chapitre V : Conclusion Générale & Perspectives | 228 |
| Bibliographie : Chapitre I, IV, et V | 236 |
| Annexes | 251 |

Index des Figures

| | |
|---|----|
| Chapitre I : Synthèse bibliographique | 16 |
| Figure 1 : Prédiction des changements de température (Wolkovich et al. 2018)..... | 21 |
| Figure 2 : Sensibilité relative de la composition de la baie en fonction de la température (Combe 1987)..... | 23 |
| Figure 3 : Voie de stockage et de dégradation de l'ABA dans les plantes supérieures | 32 |
| Figure 4 : Anatomie d'une baie de raisin (Conde et al. 2007)..... | 33 |
| Figure 5 : Physiologie du développement de la baie de raisin (Adapté de Kennedy 2002) | 36 |
| Figure 6 : Transport de sucres à longue distance par le phloème (Conde et al. 2007) | 38 |
| Figure 7 : Voies métaboliques de la glycolyse et de la néoglucogenèse | 39 |
| Figure 8 : Schéma récapitulatif des processus de transport et de détection des sucres décrits dans la vigne (Lecourieux et al. 2014)..... | 41 |
| Figure 9 : Voie de biosynthèse du L-tartrate via le L-ascorbate (Cholet et al. 2016)..... | 42 |
| Figure 10 : Métabolisme de l'acide malique chez la vigne | 43 |
| Figure 11 : Voie de biosynthèse des acides aminés (Dai et al. 2015) | 44 |
| Figure 12 : Les couleurs visibles des différentes anthocyanidines d'après Ananga et al., (2013) | 46 |
| Figure 13 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des anthocyanes en mettant l'accent sur les proanthocyanidines et les anthocyanidines présentes dans le raisin adaptée de Jaakola (2002) | 47 |
| Figure 14 : Les trois thiols volatils majeurs et leurs précurseurs cystéinylés et glutathionylés adaptée de Roland (2010)..... | 50 |
| Figure 15 : Contenu en IBMP au cours du développement et de la maturation des baies des cépages Carménère et Petit Verdot d'après Guillaumie et al. (2013)..... | 55 |
| Figure 16 : Voie de biosynthèse hypothétique de l'IBMP adaptée de Guillaumie et al. (2013) | 56 |
| Figure 17 : Réduction sélective de la liaison α,β -insaturée du 2-alkénal catalysée par une alkénal 2-réductase (AKR) | 57 |
| Figure 18 : Structure tridimensionnelle en $(\alpha,\beta)_8$ de la famille des AKR..... | 57 |
| Chapitre II : Minimiser les effets du changement climatique sur la composition biochimique et le transcriptome de la baie par manipulation de la canopée (Projet d'article)..... | 63 |
| Figure 1 : Effect of source-sink modulation on leaf area of Cabernet-Sauvignon vines for the years 2015 and 2016 | 75 |
| Figure 2 : Effect of source-sink modulation on seasonal berry weight of Cabernet-Sauvignon vines for the years 2015 (a) and 2016 (b) | 76 |
| Figure 3 : Effect of source-sink modulation on seasonal soluble sugar (a-b) and organic acid (malic (c-d) and tartaric (e-f) acids) concentrations of Cabernet-Sauvignon vines for the years 2015 (a, c, d) and 2016 (b, d, f). | 77 |

Index des Figures (Suite)

| | |
|--|----|
| Figure 4 : Effect of source-sink modulation on total anthocyanin concentration and anthocyanin composition of Cabernet-Sauvignon vines for the years 2015 (a, c, e) and 2016 (b, d, f). | 78 |
| Figure 5 : Effect of source-sink modulation on proline and total amino acids concentration of Cabernet-Sauvignon vines for the years 2015 (a, c) and 2016 (b, d)..... | 79 |
| Figure 6 : Effect of source-sink modulation on IBMP concentration of Cabernet-Sauvignon vines for the years 2015 (a) and 2016 (b) | 80 |
| Figure 7 : Score plots of principal component analysis (a-b) showing metabolomics discrimination of the harvest kinetics for the years 2015 (a) and 2016 (b). Loading plots of 36 metabolites (c-d) for the first two principal components (PC1 and PC2) for the years 2015 (c) and 2016 (d) | 82 |
| Figure 8 : Hormone-related genes differentially expressed in response to source-sink modulation in <i>Vitis vinifera</i> cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development | 83 |
| Figure 9 : Carbohydrate metabolism and sugar transport related genes differentially expressed in response to source-sink modulation in <i>Vitis vinifera</i> cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development..... | 86 |
| Figure 10 : Anthocyanin related genes differentially expressed in response to source-sink modulation in <i>Vitis vinifera</i> cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development | 87 |
| Figure 11 : Effect of source-sink modulation on the expression profiles of methoxypyrazine related pathway genes in <i>Vitis vinifera</i> cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development | 88 |
| Figure 12 : Effect of source-sink modulation on the expression profiles of thiol precursor related genes in <i>Vitis vinifera</i> cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development | 89 |
| Figure 13 : Glutathione S-transferase genes differentially expressed in response to source-sink modulation in <i>Vitis vinifera</i> cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development | 90 |
| Figure 14 : Aroma related genes differentially expressed in response to source-sink modulation in <i>Vitis vinifera</i> cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development | 91 |
| Figure 15 : Score plot of principal component analysis showing transcriptomic discrimination of the different leaf-to-fruit ratio treatments in berries of <i>Vitis vinifera</i> cv. Cabernet-Sauvignon fruiting-cuttings harvested at 59 DAF in 2016..... | 92 |
| Figure 16 : Effect of source-sink modulation on gene expression in berries of <i>Vitis vinifera</i> cv. Cabernet-Sauvignon fruiting-cuttings harvested at mid-veraison in 2016..... | 93 |

| | |
|--|------------|
| Chapitre III : Effet de l'utilisation d'acide abscissique exogène couplée à la modulation du ratio sources-puits sur le métabolisme de la baie de raisin : du transcriptome de la baie à l'analyse sensorielle du vin (Projet d'article) | 110 |
| Figure 1 : Effect of source-sink modulation on seasonal berry weight for the vintages 2016 (A) and 2017 (B)..... | 127 |
| Figure 2 : Effect of source-sink modulation on seasonal ABA, ABA-GE, PA, DAP and Neo-PA concentrations in berries for the vintages 2016 (A, C) and 2017 (B, D). | 128 |
| Figure 3 : Effect of source-sink modulation on primary metabolite (sugars, malic acid, tartaric acid and total amino acids) concentrations in berries for the vintages 2016 (A, C, E, G) and 2017 (B, D, F, H)..... | 129 |
| Figure 4 : Effect of source-sink modulation on total, di- to tri- hydroxylated forms, glucosyl to acyl forms of anthocyanins in berries for the vintages 2016 (A, C, E) and 2017 (B, D, F)..... | 131 |
| Figure 5 : Loading plots of 42 primary and secondary metabolites analysed on berries at mature stage for the first two principal components (PC1 and PC2) for the vintages 2016 (A) and 2017 (B) | 135 |
| Figure 6 : Loading plots showing sensorial descriptors and aroma measured in wines obtained for the vintages 2016 (A) and 2017 (B) on the two first principal components (PC1 and PC2) | 142 |
| Figure 7 : Hormone-related genes differentially expressed in response to source-sink modulation throughout berry development | 144 |
| Figure 8 : Carbohydrate metabolism and sugar transport related genes differentially expressed in response to source-sink modulation throughout berry development..... | 147 |
| Figure 9 : Anthocyanin related genes differentially expressed in response to source-sink modulation throughout berry development | 149 |
| Figure 10 : Effect of source-sink modulation on the expression profiles of methoxypyrazine related pathway genes throughout berry development | 150 |
| Figure 11 : Effect of source-sink modulation on the expression profiles of thiol precursor related genes throughout berry development | 151 |
| Figure 12 : Aroma related genes differentially expressed in response to source-sink modulation throughout berry development | 153 |
| Figure 13 : Alkenal 2-reductase genes differentially expressed in response to source-sink modulation throughout berry development | 154 |
| Figure 14 : Score plot of principal component analysis showing transcriptomic discrimination of the different leaf-to-fruit ratio and ABA treatments in berries harvested at 64 DAF in 2017 | 155 |
| Figure 15 : Effect of source-to-sink modulation on gene expression in berries harvested at 64 DAF in 2017. (A) The Venn diagram indicates overlap of all differentially expressed genes obtained from each comparison between the PS6LC, PS12LC and PS12LC+SS LFR treatments (B) | 156 |

Index des Figures (Suite)

| | |
|--|-----|
| Chapitre IV : Caractérisation fonctionnelle de VviAKR, enzyme potentiellement impliquée dans la voie de biosynthèse des méthoxypyrazines | 191 |
| Figure 1: Principales méthoxypyrazines présentes au sein de la baie de raisin, du moût et du vin (Sala et al. 2004) | 194 |
| Figure 2 : Voie de biosynthèse potentielle de l'IBMP adaptée de Guillaumie et al. (2013) comprenant l'alkénal 2-réductase | 195 |
| Figure 3 : Démarche expérimentale de la caractérisation enzymatique de VviAKR..... | 197 |
| Figure 4: Vecteurs d'expression de type Gateway TM développés par Busso et al. (2005).. | 201 |
| Figure 5 : Carte du plasmide pH7WG2D.1 | 203 |
| Figure 6 : Liaison de la protéine recombinante étiquetée polyhistidine à la résine Protino® Ni-TED..... | 206 |
| Figure 7 : Développement des cals et hairy roots..... | 208 |
| Figure 8 : Observation d'hairy root au microscope Zeiss Axiozoom(x19.5) | 209 |
| Figure 9 : Hairy root en cours de multiplication | 210 |
| Figure 10: Migration électrophorétique après amplification PCR d'ADNc pleine longueur de VviAKR | 213 |
| Figure 11 : Structure des allèles du gène VviAKR présents chez CA, CS, SB | 214 |
| Figure 12 : Alignement multiple des protéines VviAKR prédites de CA/CS/SB, PN et PV..... | 215 |
| Figure 13 : Profils d'accumulation de l'IBMP au sein de baies récoltées au stade fermeture de la grappe de différents cépages possédant ou non l'allèle AKR de PN et PV | 217 |
| Figure 14 : Profils d'expression en quantité normalisé des gènes (A) VviOMT3 et (B) VviAKR au sein de baies de plusieurs cépages récoltées au stade fermeture de la grappe | 218 |
| Figure 15 : Analyse phylogénétique : VviAKRCA, VviAKRPN, VviAKRPV et leurs relations avec les autres AKRs de plantes publiées..... | 219 |
| Figure 16 : SDS-PAGE des différentes fractions protéiques obtenues lors de la purification sur colonne IMAC de AKR-MBP de Pinot noir | 220 |
| Figure 17 : SDS-PAGE des différentes fractions protéiques obtenues lors de la purification sur colonne IMAC de AKR-MBP de Pinot noir | 222 |
| Figure 18: Contenu en IBMP au sein des différentes constructions de Hairy roots étudiées dans le cadre du fond génétique de RGM..... | 225 |

Index des Tableaux

| | |
|---|-----|
| Chapitre I : Synthèse bibliographique | 16 |
| Tableau 1 : Classification de quelques cépages de <i>Vitis vinifera</i> basée sur la composition en monoterpènes (Mateo et Jiménez 2000)..... | 54 |
| | |
| Chapitre II : Minimiser les effets du changement climatique sur la composition biochimique et le transcriptome de la baie par manipulation de la canopée (Projet d'article) | 63 |
| Tableau 1 : Differential expressed genes at mid-veraison between the different leaf to fruit ratio treatments | 94 |
| | |
| Chapitre III : Effet de l'utilisation d'acide abscissique exogène couplée à la modulation du ratio sources-puits sur le métabolisme de la baie de raisin : du transcriptome de la baie à l'analyse sensorielle du vin (Projet d'article) | 110 |
| Tableau 1 : Effect of source-sink modulation and ABA treatment on IBMP and 1,8-cineole contents throughout the berry development..... | 133 |
| Tableau 2 : Effect of source-sink modulation and ABA treatment on must composition | 137 |
| Tableau 3 : Effect of source-sink modulation and ABA treatment on general wine composition..... | 139 |
| Tableau 4 : Effect of source-sink modulation and ABA treatment on some aromatic compounds in wine | 140 |
| Tableau 5 : Differentially expressed genes at mid-veraison between the different leaf-to-fruit ratio and ABA treatment investigated | 158 |
| | |
| Chapitre IV : Caractérisation fonctionnelle de VviAKR, enzyme potentiellement impliquée dans la voie de biosynthèse des méthoxypyrazines | 191 |
| Tableau 1 : Combinaisons des différentes constructions testées..... | 223 |
| Tableau 2 : Combinaisons des différentes transformations réalisées | 224 |

Abréviations

ABA : acide abscissique
ABA-GE : acide abscissique-glucose ester
ABA-GT : acide abscissique-glucosyltransférase
ADH2 : l'alcool déshydrogénase 2
ADP : adénosine diphosphate
ANS : anthocyanidine synthase
ATP : adénosine triphosphate
ATPase : adénosine triphosphatase
AKR : alkénal-2-réductase
A3MH : acétate 3-mercaptohexyle
A3SH : acétate de 3-sulfanylhexyle
BH: Benjamini and Hochberg method
CCD : carotenoid cleavage dioxygenase
CHI : chalcone flavanone isomérase
CHS : chalcone synthase
Cys-3SH : S-3-(hexan-1-ol)-l-cysteine
Cys-4MSP : S-3-(4-méthyl-4-sulfanyl-pentan-2-one)-cysteine
C4H : Cinnamate 4-hydroxylase
DAF: day after flowering
DFR : dihydroflavonol-4-reductase
DPA : acide dihydrophaséique
DHAP : Dihydroxyacétone phosphate
DMS : 7-diméthylsulfure
DW : dry weight
FPP : farnésyl diphosphate
FLS : flavonole synthase
F1,6BP : fructose-1,6-bisphosphate
F3H : flavonone-3-hydroxylase
F3'5'H : flavonoïde 3',5'-hydroxylase
F-6-P : fructose-6-phosphate
FW: fresh weight
GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate
GC: gas chromatography
GDP : guanosine disphosphate
GEO : Gene Expression Omnibus
GES : gaz à effet de serre
GIEC : groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat
GGPP : géranylgéranyl diphosphate
GLDH : L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase
Glut-3SH : S-3-(hexan-1-ol)-glutathion
Glut-4MSP : S-4-(4-méthylpentan-2-one)-L-glutathion

Abréviations (Suite)

GME : GDP-D-mannose-3,5-epimerase
GPP : géranyl diphosphate
GTP : Guanosine triphosphate
G6P : Glucose-6-phosphate
IBHP : 2-hydroxy-3-isobutyl-pyrazine
IBMP : 2-méthoxy-3-isobutylpyrazines
IPMP : 2-méthoxy-3-isopropylpyrazine
LC : leaves conserved per cluster per vine
LCR : leucoanthocyanidine réductase
LFC : \log_2 fold-change
LFR : leaf-to-fruit ratio
L-GalDH : L-galactose dehydrogenase
L-IdnDH : L-idonate dehydrogenase
MP : méthoxypyrazine
MS : mass spectrometry
MT : méthyltransferase
NAD/NADH : nicotinamide adénine dinucléotide oxydé/ réduit
NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCED : 9-cis-epoxycarotenoid dioxygénase
PA : acide phaséique
PAL : Phenylalanine ammonia-lyase
PEP : phosphoénolpyruvate carboxylase
Pi : phosphate inorganique
ppb : sous-parties par milliard
PPi : anion pyrophosphate
RPKM : reads per exon kilo base per million mapped sequence reads
SBMP : 2-méthoxy-3-sec-butyl-pyrazine
SD : standard deviation
SPME: solid phase microextraction
UFGT : UDP Glucose flavonoid 3-O -glucosyltransferase
VTC2 : GDP-L-galactose phosphorylase
VTC4 : L-lactose-I-phosphate phosphatase
1,3-BPG : 1,3-bisphosphoglycerate
2-BPG : 2-bisphosphoglycerate
3-BPG : 3-bisphosphoglycerate
3MH : 3-mercaptohexan-1-ol
3SH : 3-sulfanylhéxan-1-ol
4CL : coenzyme A ligase
4MSP : 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one
4MMP : 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one

CHAPITRE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Avant-propos

L'Unité Mixte de Recherche 1287 Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne (UMR1287 EGFV) au sein de laquelle j'ai eu le privilège d'effectuer ma thèse rassemble au sein de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) sur le centre INRA Bordeaux-Aquitaine, un ensemble de compétences pluridisciplinaires, allant de l'écophysiologie à la physiologie moléculaire, en passant par la biochimie et la génétique, pour étudier le fonctionnement de la vigne greffée et les déterminants de la qualité de la baie de raisin dans un contexte de changements climatique et agronomique.

Les changements globaux du climat actuellement en cours affectent déjà et continueront d'affecter dans les décennies à venir la physiologie de la vigne ; en particulier le rendement et la composition des raisins à la récolte, et donc au final la qualité et la typicité des vins produits comme détaillé chapitre I du manuscrit correspondant à l'état de l'art. Il est ainsi prédit qu'un décalage entre les maturités technologique d'une part et phénolique et aromatique d'autre part, déjà constaté lors des années très chaudes comme le millésime 2003, devrait se creuser au cours des 50 prochaines années. Un des enjeux majeurs pour la viticulture française sera donc de maintenir, dans les conditions climatiques futures, une production de raisins dont la composition permettra de continuer à obtenir des vins de qualité et présentant une typicité proche de l'actuelle. A côté des différentes pistes possibles d'adaptation de la viticulture au changement climatique (modifications de l'encépagement, création de nouvelles variétés mieux adaptées aux conditions futures, ...), le contrôle de la composition des baies à la récolte par le biais de modifications des techniques culturales et notamment par des manipulations de la canopée (rapport feuilles/fruits) est certainement celle qui serait la plus rapide et la moins coûteuse à mettre en œuvre. Elle présente également l'avantage d'avoir l'impact le plus faible sur la typicité des vins, en permettant de conserver, au moins à court et moyen terme, l'encépagement actuel.

Dans cette optique, le travail réalisé au cours de ma thèse en serre en conditions semi-contrôlées sur boutures fructifères (détaillé chapitre II de ce manuscrit) et au vignoble en conditions naturelles (détaillé chapitre III) a eu pour premier objectif de mieux comprendre les relations entre d'une part la diminution du taux de sucre par réduction du rapport surface foliaire/charge en fruits ; et d'autre part le maintien de la maturité phénolique et

aromatique en combinant ou non avec l'utilisation d'acide abscissique, afin de contrebalancer les effets prévisibles du changement climatique. Plus spécifiquement, il s'agissait de rechercher le meilleur point de compromis entre diminution du taux de sucre, maintien de l'acidité et accumulation des polyphénols, des arômes et précurseurs d'arômes en réponse aux manipulations de canopée et à l'utilisation combinée d'acide abscissique.

Ce projet a permis d'acquérir des informations à la fois détaillées et robustes sur l'impact des manipulations de canopée et d'ajout d'acide abscissique sur la composition des baies, et notamment sur les équilibres entre composés issus du métabolisme primaire et du métabolisme secondaire. Une analyse fine de la réponse du métabolisme du fruit aux valeurs du rapport feuilles/fruits et à l'utilisation de l'acide abscissique a été réalisée en collaboration avec le laboratoire du CSIRO Agriculture & Food, de l'équipe « The Wine and Horticulture Group » à Adélaïde (Australie) où j'ai eu le plaisir de me rendre afin d'effectuer les analyses d'acide abscissique pendant 1 mois. D'autres collaborations plus locales ont été réalisées notamment avec l'UR Oenologie EA 4577, USC 1366 INRA où j'ai effectué les analyses aromatiques et sensorielles; ou encore l'Unité Expérimentale Vigne et Vin Bordeaux Grande Ferrade ayant réalisé les microvinifications de l'expérimentation effectuée au vignoble et enfin le Château Couhins qui m'a permis de réaliser mon essai au vignoble au sein de l'appellation Pessac-Léognan.

Les résultats obtenus en serre, validés au vignoble sur deux millésimes, permettent de fournir une base physiologique, analytique et transcriptomique pour aider à l'adaptation des pratiques culturales en vert afin de contrebalancer les effets du changement climatique dans les vignobles à court et moyen terme. En effet, le traitement 6 feuilles restantes par grappe semble le plus pertinent afin de diminuer le taux de sucre sans pour autant trop modifier la composition des baies vis-à-vis des autres métabolites étudiés (acides organiques, acides aminés, anthocyanes, arômes variétaux et précurseurs d'arômes typiques de Cabernet-Sauvignon (méthoxy-pyrazines (MPs), précurseurs de thiols...) et nécessaire à la qualité organoleptique des vins. Par ailleurs, il a clairement été établi au cours de ma thèse que les MPs ne sont pas sensibles à la modification du rapport feuilles/fruits.

En parallèle, le deuxième objectif de ma thèse, faisant suite à mon projet de stage de Master 2 et détaillé chapitre IV de ce manuscrit a été la caractérisation fonctionnelle d'un gène potentiellement associé à la voie de biosynthèse des MPs et potentiellement impliqué dans

l'élaboration du caractère végétal des raisins et du vin. Pour cela, la production et la purification de protéines recombinantes ainsi que des dosages enzymatiques pour déterminer le substrat préférentiel de cette enzyme ont été réalisés n'apportant aucunes conclusions claires quant aux rôles de cette alkénal-2-réductase dû aux difficultés de son extractibilité (manque de solubilité).

Afin de mieux comprendre le contexte de mon étude voici maintenant détailler un état de l'art regroupant les impacts du changement climatique sur la viticulture et comment pouvons-nous essayer de limiter ses effets notamment sur l'augmentation du taux d'alcool des vins. Puis de façon non exhaustive, est détaillé le rôle des principaux métabolites primaires et secondaires de la baie analysés au cours de ce projet en réalisant un focus sur les méthoxypyrazines et plus particulièrement leur voie de biosynthèse correspondant au deuxième objectif de ma thèse.

Etat de l'art

I. Changement climatique et impacts sur la viticulture

Le changement climatique est une réalité actuelle et une problématique à venir. Une augmentation de la température annuelle moyenne, du rayonnement solaire et en particulier des UV-B et de la concentration en gaz à effet de serre ainsi qu'un changement dans les régimes de précipitations ont été observés depuis plusieurs années ; majoritairement imputée aux activités humaines modifiant la composition de l'atmosphère mondiale comme le rapporte le Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC, 2013). En effet, entre 1983 et 2012, chaque décennie a été successivement la plus chaude jamais enregistrée sur Terre (GIEC, 2014) du fait de l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre (GES). Aujourd'hui, les effets liés au changement climatique sont loin de s'atténuer et les prévisions pour les années à venir loin d'être optimistes. Certains scénarii du GIEC prévoient ainsi une montée de la température moyenne à la surface du globe d'environ 5°C d'ici la fin du XXI^e siècle (GIEC, 2013) avec 1.5°C d'augmentation de la température moyenne d'ici à 2040 (GIEC, 2018). Les modèles climatiques sont moins convergents concernant les évolutions possibles des précipitations. Celles-ci augmenteraient légèrement, mais avec une diminution en été dans les zones tempérées, notamment en zone méditerranéenne. Au-delà de ces évolutions moyennes, le changement climatique se traduit aussi par une variabilité spatiale et temporelle plus importante, et une plus grande probabilité d'événements extrêmes (Ollat and Touzard, 2014). Même s'il reste plus que jamais nécessaire de réduire les émissions de GES afin d'atténuer leurs effets sur le climat, il est maintenant clair que le changement climatique va se poursuivre en raison de l'inertie du système biophysique terrestre, des comportements routiniers ou opportunistes des entreprises et des consommateurs, et du recul des engagements politiques à l'échelle mondiale. L'adaptation est donc incontournable et doit être considérée, étudiée et accompagnée de manière complémentaire à l'atténuation des GES (Ollat and Touzard, 2014).

Concernant les effets du changement climatique sur la viticulture, la figure 1 présente une prédiction des changements de température pendant la saison de croissance d'ici 2070, par rapport au climat de 1970-2000 en utilisant le modèle général de circulation GFDL-CM3 et le

scénario d'émissions RCP8.5. Wolkovich *et al.*, (2018) ont ainsi estimé les changements de température au niveau mondial (Figure 1a) et au niveau européen (Figure 1b) et concluent que les régions viticoles actuelles couvrent ainsi des zones qui devraient connaître des sécheresses plus longues et plus fréquentes (Figure 1b). Ils ont aussi défini d'autres régions viticoles où les tempêtes changeantes pourraient entraîner des pluies plus importantes, et augmenteraient les risques de pourriture, de moisissure et de développement d'autres maladies fongiques favorisées par les conditions humides.

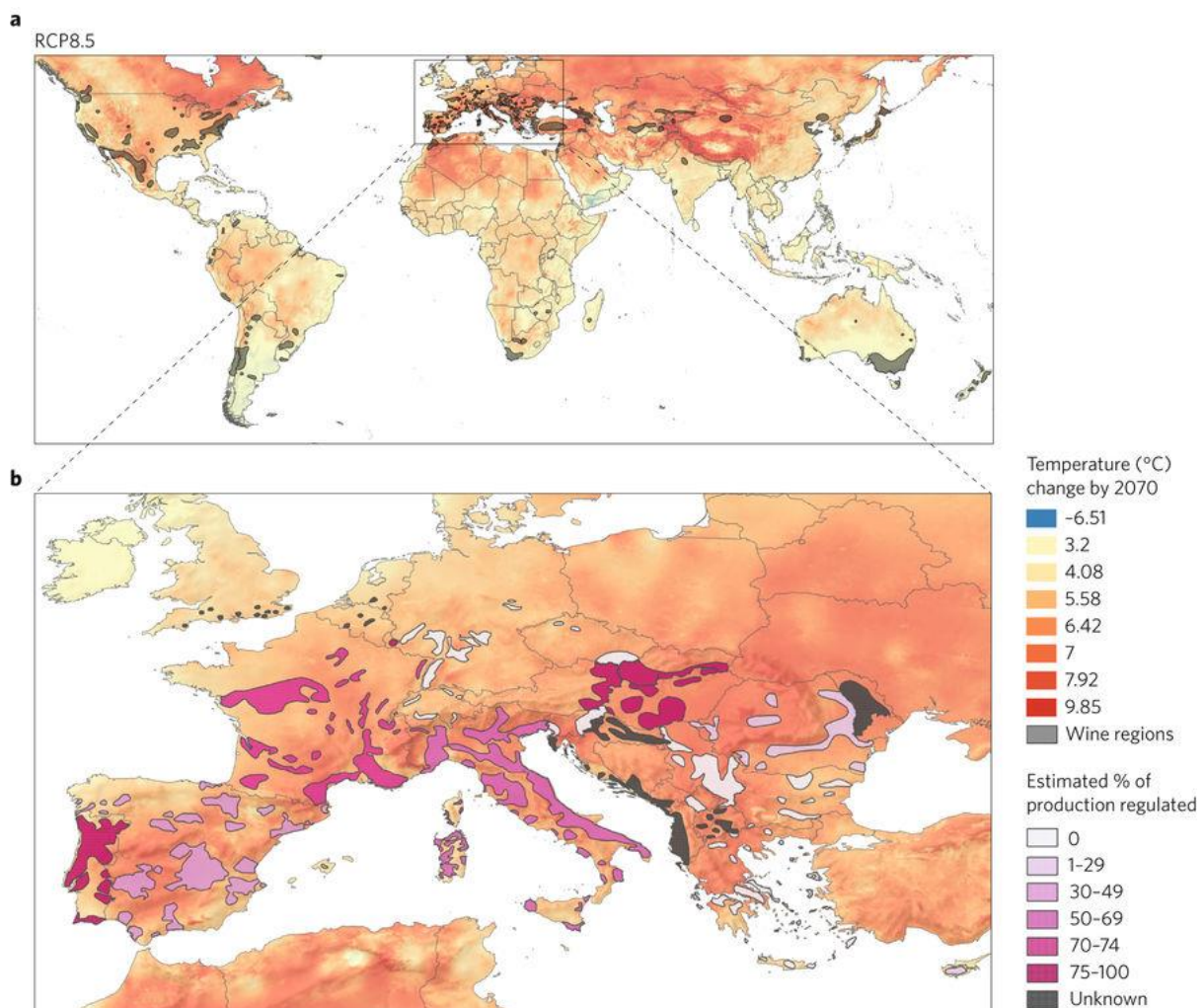


Figure 1 : Prédiction des changements de température (Wolkovich *et al.*, 2018).

Les régions viticoles sont ombrées en gris sur la carte globale de changement de température (a). Les zones délimitées sur la carte européenne (b) par une couleur blanche à rouge représentent la proportion estimée de la production de vin soumise à des restrictions variétales, basée sur des vins étiquetés par des indications géographiques protégées (évaluées au niveau national).

Il y a un accord général pour dire que tous les stades phénologiques seront avancés à l'avenir. Dans la seconde moitié du XXI^{ème} siècle, le débourrement pourrait être plus précoce de 3 à 18 jours, et la période de maturation de 20 à 40 jours par rapport aux 30 dernières

années (Duchêne *et al.*, 2010; Garcia de Cortazar Atauri, 2006; Pieri, 2010b; Webb *et al.*, 2007). L'avancée de la période de maturation vers des jours plus chauds augmente l'impact de la température sur la maturation. Garcia de Cortazar (2006) a montré que la période de maturation pourrait être caractérisée par des températures supérieures à ce qui est observé aujourd'hui, de 4-6 ° C dans le sud de la France et 6-8°C dans la moitié nord de la France.

Il est connu que les concentrations en métabolites primaires et secondaires contenus dans les baies varient en fonction de la température (Coombe, 1987). Le fait d'avoir des températures en moyenne plus froides induit par exemple une maturité incomplète avec un taux d'acides organiques plus élevé et une concentration en sucres plus faible contenue dans les baies (Figure 2). A l'inverse, des températures plus chaudes se traduisent par des teneurs en sucres plus élevées à maturité (Jones and Davis, 2000), et par conséquent par une augmentation du degré d'alcool allant jusqu'à 14% vol. voire 15% vol. dans le vin produit. Les concentrations en acides organiques seront elles plus faibles et, enfin, la maturation des fruits sera parfois trop rapide ce qui modifie directement la période de vendange (Bobeica *et al.*, 2015). Combinée à une augmentation de l'absorption de potassium, elle induit une augmentation du pH du jus du raisin (Coombe, 1987; Kliewer, 1971), avec des différences variétales (Sadras *et al.*, 2013).

La quantité de certains acides aminés au sein de la plante peut aussi être impactée par la hausse de la température. En effet, il a notamment été observé une augmentation de la quantité de proline dans certaines études lors d'un stress thermique (Lecourieux *et al.*, 2017; Sweetman *et al.*, 2014). Les variations de concentrations en acides aminés influencent la fermentation alcoolique car ils sont utilisés par les levures et confèrent par la suite certaines propriétés organoleptiques au vin (Callejón *et al.*, 2010).

Une forte chaleur se traduit aussi par une diminution importante de la production d'anthocyanines, et plus particulièrement les anthocyanes di-hydroxylées (Lecourieux *et al.*, 2017) ce qui influence par la suite la couleur et la qualité du produit final (Mori *et al.*, 2007). De plus, les interactions entre températures élevées et intensité lumineuse sont déterminantes pour ces derniers éléments (Tarara *et al.*, 2008).

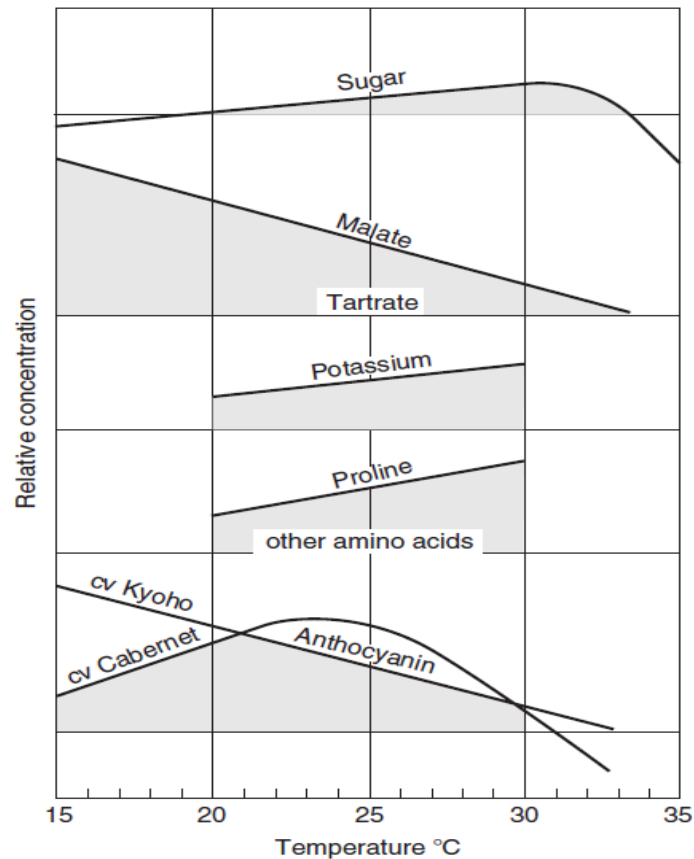


Figure 2 : Sensibilité relative de la composition de la baie en fonction de la température (Combe 1987)

Parmi les conséquences associées au réchauffement climatique, une modification des concentrations en arômes et précurseurs d'arômes variétaux de la baie de raisin impactant le potentiel aromatique de la baie et affectant la composition finale du vin est aussi notable (Mira de Orduña, 2010).

Un découplage serait ainsi induit entre les trois grands types de maturité i.e. technologique, phénolique et aromatique, pouvant être distingués selon la nature des constituants du raisin pris en considération (Keller, 2010a). La maturité technologique est atteinte lorsque l'accumulation de sucres est maximale. Elle est aussi évaluée par la concentration en acides organiques présents au sein de la baie de raisin. Les attributs sensoriels du vin définissant la maturité phénolique, sont la couleur, le corps, les sensations tactiles et gustatives, l'astringence et l'amertume, directement associés à la composition des anthocyanes et des proanthocyanidines (Arnold and Noble, 1978; Gawel, 1998; Kontoudakis *et al.*, 2011; Vidal *et al.*, 2003). La maturité aromatique détermine, quant à elle, le moment où les arômes variétaux du cépage sont les plus expressifs, chaque cépage ayant ses arômes types.

Au final, la durabilité de la filière viti-vinicole pourrait être compromise à terme si aucune mesure n'est prise (Hannah *et al.*, 2013; Schultz and Jones, 2010; van Leeuwen *et al.*, 2013).

II. Leviers d'actions possibles

Les viticulteurs ont envisagé depuis de nombreuses années de nouvelles méthodes de culture pouvant être utilisées et mise en place à plus ou moins long terme pour contrer les effets indésirables liés au changement climatique et plus particulièrement à l'augmentation de la température.

A) Pratiques à long terme

1. Changement d'encépagement

Parmi les pratiques envisagées, l'adaptation du matériel végétal et notamment la modification de l'encépagement est un outil majeur pouvant être utilisé afin d'atteindre cet objectif (Van Leeuwen et Darriet 2016). Cependant, cette adaptation à long terme ne doit pas impacter la qualité et la typicité du vin, qui est la résultante des interactions entre la plante, le sol, le climat et la vinification.

La maturité peut être retardée par l'usage de variétés à maturité tardive, variétés faisant partie des cépages traditionnels dans certaines régions viticoles. C'est par exemple le cas du Cabernet-Sauvignon à Bordeaux et du Mourvèdre en Languedoc-Roussillon. Lorsque le climat devient trop chaud pour le Merlot à Bordeaux et pour la Syrah en Languedoc, la proportion de Cabernet-Sauvignon et de Mourvèdre peut être respectivement augmentée dans ces régions et ceci sans altérer le style du vin.

À long terme, il pourrait aussi être nécessaire d'utiliser des variétés non locales pour se tourner vers d'autres cépages plus adaptés au climat des zones de cultures actuelles, plus tardives ou résistantes à la sécheresse (Duchêne *et al.*, 2010; Ollat *et al.*, 2013). Ces variétés doivent être choisies afin de modifier le moins possible la typicité du vin produit dans chaque région. Cette adaptation est évidemment plus facile à mettre en œuvre dans les nouvelles régions viticoles que dans les pays européens à appellations traditionnelles. Aujourd'hui, dans ces appellations, les producteurs ne peuvent utiliser que des variétés locales. Il pourrait être utile de commencer à expérimenter une petite proportion de variétés

non locales, afin d'accumuler assez d'expériences au moment où un changement majeur au sein des variétés traditionnelles d'appellation deviendra inévitable.

Parmi les initiatives mises en place afin de répondre à cette question, nous pouvons citer le projet VITADAPT développé au sein de l'UMR 1287 EGFV. Ce projet est basé sur l'étude de 52 cépages, issus de régions géographiques de production françaises et étrangères, et regroupés en une parcelle située dans le cadre d'un environnement bordelais (domaine INRA Grande Ferrade) sur sol graveleux et greffés sur un porte-greffe unique (Destrac Irvine, 2018; Garcia De Cortazar Atauri *et al.*, 2017). Il permet d'étudier le comportement de ces 52 cépages dans un contexte climatique changeant ainsi que l'adaptation, et le potentiel d'éventuels cépages candidats à une introduction dans l'encépagement bordelais. Plusieurs critères sont évalués à savoir la précocité, phénologie, qualité de la baie, réponse physiologique à la sécheresse...

Par ailleurs, de nouveaux porte-greffes ont récemment été sélectionnés et caractérisés pour une tolérance élevée à la sécheresse, comme par exemple les porte-greffes Börner (Pavlousek, 2011) et M4 (Meggio *et al.*, 2014) et pourraient se révéler être des alliés dans le cadre d'une adaptation de l'encépagement au changement climatique. Des études sur ces différences génétiques sont en cours (Marguerit *et al.*, 2012). La recherche de connaissances sur les mécanismes de tolérance à la sécheresse déclenchés par les porte-greffes devra continuer, en tenant compte des interactions entre porte-greffes et greffons (Serra *et al.*, 2014; Tsegay *et al.*, 2014).

Il est à noter que l'évolution des indices climatiques joue sur la répartition des variétés (Jones and Webb, 2010) et permet de simuler leurs aires potentielles de plantation (Pieri, 2010a). Ce dernier point pourra aussi se révéler utile dans le cadre de l'adaptation du matériel végétal au changement climatique.

2. Implantation de nouveaux vignobles

De plus en plus de vignobles sont implantés dans des régions où le climat et l'environnement sont devenus propices à la production de vin c'est-à-dire au sein de parcelles plus fraîches ou disposant de sols avec une réserve utile en eau plus importante. Ce sont principalement dans des zones plus élevées, en terme d'altitude, parfois seulement de quelques dizaines de

mètres sur un coteau qui sont privilégiées (Bonnefoy *et al.*, 2012), comme c'est le cas dans la région du Douro (Jones and Alves, 2012), mais aussi des zones avec des latitudes plus hautes que celles où se trouvent aujourd'hui les cultures.

Si la structure de l'encépagement et les pratiques ne changent pas, une partie des vignobles actuels se trouverait dans des situations très difficiles pour obtenir des qualités acceptables de raisins et de vins, voire même pour maintenir des vignes productives (Ollat and Touzard, 2014). A l'inverse, de nouvelles régions au Nord et à l'Est de l'Europe (Kenny and Harrison, 1992; Tatem, 2005) ou encore au Nord de la France deviendraient plus appropriées pour la viticulture (Malheiro *et al.*, 2010). Plusieurs études se concentrent sur quand et où les régions deviendront adaptées à la culture de la vigne (Ferrise *et al.*, 2014; Fraga *et al.*, 2012; Hannah *et al.*, 2013; Roehrdanz and Hannah, 2014). Il est à noter que ces changements géographiques pourraient avoir des effets indirects non négligeables sur les ressources en eau et les écosystèmes (Hannah *et al.*, 2013).

Pour que ces changements à long terme soient possibles en Europe, il est inévitable que des changements institutionnels aient lieu (Holland and Smit, 2010). L'évolution du système des appellations est une condition pour intégrer des modifications du matériel végétal utilisé ou du zonage. En effet, toutes les conditions d'élaborations des vins, ainsi que les aires géographiques délimitées, sont consignées dans un cahier des charges qui est homologué par décret du Ministère de l'Agriculture de la République française, et par la Commission Européenne (Laville, 1993). Tout est contrôlé avec minutie à savoir les caractéristiques géologiques, les facteurs naturels et humains... Il est important de préciser qu'avant l'achat par le consommateur d'une bouteille de vin d'appellation d'origine contrôlée ou d'indication géographique protégée celle-ci a été soumise à des analyses chimiques et organoleptiques par une commission de contrôle mandatée par l'Institut national de l'origine et de la qualité et ceci afin de garantir l'origine et la nature du vin acheté par les consommateurs. Dans les dernières décennies, la démonstration scientifique de l'effet du terroir sur la spécificité des productions a été faite de manière indiscutable pour certains vignobles de France et d'Italie (Falcetti *et al.*, 1990; Lebon, 1993; Morlat, 1989). Paradoxalement en France, pays possédant un «droit des appellations d'origine», les décisions de délimitation sont très difficiles à réviser même si elles sont agronomiquement invalides faute d'un terroir suffisamment identifié ou renommé à l'époque de la délimitation. Cette situation paradoxale est source de

bien des difficultés pour les appellations d'origine. Elle s'explique en partie par l'inquiétude des producteurs bénéficiaires d'une appellation d'origine ancienne. Ils pensent ainsi perdre des avantages économiques qu'elle leur procure si l'étude objective de leur aire d'appellation montre qu'elle ne correspond pas à un terroir véritablement différent des appellations voisines.

Ces pratiques seront donc bel et bien des pratiques envisageables à long terme, mais comment limiter les effets du changement climatique en cours plus rapidement?

B) Pratiques à court terme

Les modes de conduite de la vigne, de taille ou de palissage (pergola, lyre, gobelet..) offrent aussi toute une gamme de changements possibles pouvant être utilisés en première intention pour raisonner la protection des grappes ou le microclimat, ce dernier étant basé sur l'effet de la composition mais aussi de l'intensité lumineuse ainsi que sur l'effet conjoint de la température (Schultz and Stoll, 2010). La taille tardive peut ainsi être utilisée afin de retarder le débourrement (Coombe, 1964 ; Friend and Trought, 2007).

Pour améliorer la qualité du vin, la récolte pourrait être effectuée plus tôt dans la saison ce qui permettrait d'éviter de récolter des raisins présentant une surmaturité et dont la composition biochimique ne serait plus correctement équilibrée entre la maturité technologique (taux de sucres et d'acidité), la maturité phénolique (quantité et qualité des composés phénoliques) et la maturité aromatique (Alem *et al.*, 2018; Van Leeuwen and Darriet, 2016).

Certaines manipulations physiologiques de la vigne peuvent aussi réduire les effets indésirables associés aux changements climatiques notamment les manipulations de canopée basée sur la compétition nutritionnelle entre les différents organes vis-à-vis de la ressource en carbone (rapport feuilles/fruits). Le rapport feuilles/fruits est connu pour régler finement l'équilibre entre qualité et rendement, et donc pour ajuster au mieux la composition chimique des baies à la récolte (Keller, 2010a). En effet, ces manipulations de canopée sont déjà couramment utilisées au vignoble par le biais des techniques de rognage/écimage ainsi que d'échardage durant la saison végétative. Les viticulteurs réduisent également le nombre de grappe par pied par le biais des vendanges vertes afin

d'adapter leur rendement au besoin selon les millésimes (Poni et Lombard, 1993 ; Poni *et al.*, 1993 ; Kliewer et Dokoozlian, 2005 ; Keller *et al.*, 2008).

L'utilisation d'hormones exogènes est encore une autre solution afin d'accélérer la maturité phénolique par exemple par pulvérisation d'acide abscissique (Ferrara *et al.*, 2015; Jeong *et al.*, 2004, Koyama *et al.*, 2014) ou bien de la retarder par pulvérisation d'auxine, ou d'acide salicylique par exemple, (Palliotti *et al.*, 2014, Symons *et al.*, 2006).

Au sein de notre étude nous nous sommes concentrés sur l'utilisation de la compétition nutritionnelle entre les différents organes vis-à-vis de la source carbonée couplée ou non à l'ajout d'acide abscissique par pulvérisation sur les baies. Ainsi, je vais maintenant détailler de façon plus approfondie ces deux techniques culturales.

1. Manipulations de la canopée

Enlever les feuilles autour des grappes est une stratégie puissante et largement utilisée pour contrôler l'ensoleillement des baies et la température, bien que l'impact dépende du moment du traitement. L'effeuillage améliore généralement le contenu aromatique des baies et diminue le risque phytosanitaire (Duncan *et al.*, 1995). En effet, il a déjà été démontré dans la littérature que les concentrations en caroténoïdes, C13-norisoprenoïdes et en terpinéols augmente suite à un effeuillage dû à une exposition directe des baies aux radiations solaires pour le cépage Sauvignon blanc par exemple (Alem *et al.*, 2018; Young *et al.*, 2010).

Ainsi, la défoliation peut être mise en œuvre à tout moment entre la pré-floraison et la véraison, avec des conséquences différentes. Comme le décrivent Pastore *et al.*, en 2013, l'élimination des feuilles basales avant la floraison affecte significativement l'équilibre source-puits, réduisant les rendements et améliorant la qualité des baies dans de nombreux cultivars et environnements viticoles (Diago *et al.*, 2009; Poni *et al.*, 2006; Risco *et al.*, 2013). L'élimination précoce des feuilles basales (5 à 6 feuilles retirées), comme à la pré-floraison ou à la nouaison augmente la teneur en anthocyanes (Pastore *et al.*, 2013; Risco *et al.*, 2013; Tardaguila *et al.*, 2008). Il est possible que le microclimat des fruits soit amélioré par la défoliation. Le fait que la défoliation soit appliquée tôt dans la saison et uniquement sur les feuilles basales conduirait à des conditions de lumière plus favorables, tout en n'augmentant que légèrement la température des baies. De plus, les baies issues des traitements de

défoliation présenteraient une variation thermique quotidienne supérieure à celle des vignes témoins, la température nocturne des baies étant plus élevée pour les vignes témoins (Risco *et al.*, 2013). Ceci est probablement dû à la plus grande quantité de feuillage que les vignes témoins présentes dans la zone des fruits, ce qui augmenterait vraisemblablement la résistance à l'échange de chaleur entre les baies et le milieu environnant. Une température nocturne plus faible des baies pourrait favoriser la coloration des baies (Kliewer and Torres, 1972). L'élimination des feuilles basales à pré-véraison réduit le pourcentage et le taux de croissance des baies, réduisant ainsi les rendements et permettant la repousse des feuilles sur les rameaux secondaires au cours de la même saison végétative, entraînant un réalignement complexe de la croissance et des paramètres physiologiques (Poni *et al.*, 2008). La biosynthèse des flavonoïdes dans les baies est l'un des processus les plus altérés par la défoliation, mais le résultat semble dépendre du moment de la défoliation et du génotype. En revanche, l'activité photosynthétique des feuilles basales à la véraison est plus faible que celle des feuilles intermédiaires et apicales, de sorte que la défoliation à ce stade a un fort impact sur l'exposition à la lumière et à la température mais un impact limité sur l'équilibre source-puits (Pastore *et al.*, 2013). En effet, lors d'un effeuillage modéré, l'élimination de 6 feuilles basale à pré-véraison (Pastore *et al.*, 2017) n'a montré aucun impact sur les anthocyanes et les sucres mais une augmentation de la concentration en flavonols. Cependant, lors d'un effeuillage drastique (élimination des feuilles basales et intermédiaires) et tardif (pré-véraison), un impact significatif sur l'accumulation des sucres et d'anthocyanes totales au cours de la maturation des raisins a pu être noté (Bobeica *et al.*, 2015; Edwards *et al.*, 2017). Les vignes présentant un faible rapport source/puits montre un rapport entre les anthocyanes et les sucres trois fois plus faible comparé à celui de vignes présentant un fort rapport source/puits (Bobeica *et al.*, 2015). Par ailleurs, les sucres semblent plus affectés par la limitation en source de carbone que les acides organiques (Bobeica *et al.*, 2015; Parker *et al.*, 2015). La modification du microclimat pourrait également provoquer une baisse de la concentration en arômes végétaux due en partie à la présence de MPs, puisque leur concentration diminue au fil de la maturité, au moment où les grappes sont plus exposées au soleil (Mozzon *et al.*, 2016; Šuklje *et al.*, 2012). Ainsi, la quantité de molécules comme la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazines (IBMP), la 2-méthoxy-3-isopropylpyrazine (IPMP) et la 2-méthoxy-3-sec-butyl-pyrazine (sBMP), qui sont des arômes indésirables dans les vins rouges, semble diminuer en réponse à l'augmentation de l'exposition à la lumière lors d'un

effeuillage (Martin *et al.*, 2016). En effet, il a été montré que les baies ombragées ont une concentration plus importante en IBMP comparée au contrôle non ombragé concernant le cépage Cabernet-Sauvignon (Dunlevy *et al.*, 2013b). Un traitement d'ombrage des baies après le début de la maturation n'a cependant pas d'impact sur la concentration en IBMP pour le cépage Cabernet Franc (Alem *et al.*, 2018; Ryona *et al.*, 2008). Un effeuillage précoce avant ou à fermeture de grappe (période d'accumulation maximale des MPs) pourrait être une solution envisagée pour limiter leur accumulation.

Les études menées à ce jour se sont surtout focalisées sur quelques composants majeurs de la récolte, à savoir le rendement, le taux de sucres et la concentration totale en acides organiques, sans prendre trop en compte les composés secondaires d'intérêt pour la qualité des vins (polyphénols, arômes et précurseurs d'arômes) (Parker *et al.*, 2015). De plus, seul un nombre réduit de valeurs du rapport surface foliaire/charge en fruits ont été testés (Poni *et al.*, 2013). Bien que certains travaux montrent clairement un effet de la diminution de la surface foliaire sur le taux de sucres des baies, l'effet sur les anthocyanes est moins clair (Dai *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013), indiquant que la sensibilité des métabolismes primaires et secondaires aux manipulations de canopées est différente. Enfin, la réponse du métabolisme des acides aminés, qui sont partie intégrante du potentiel œnologique des baies, ainsi que des arômes et précurseurs d'arômes ont été peu étudiés.

Afin de compléter ces connaissances fondamentales, nous avons donc suivis les effets de la modification du rapport feuille/fruit appliqué soit au stade petit pois soit au stade pré-véraison sur un large panel de métabolites primaires (sucres, acides organiques, acides aminés), et secondaires (anthocyanes, composés aromatiques variétaux du Cabernet-Sauvignon) de la baie.

2. Utilisation d'hormones exogènes

Parmi les pratiques culturales, l'utilisation de régulateurs de croissance peut aussi être envisagée (Pallioti *et al.*, 2014). En effet, l'application d'acide abscissique (ABA) ou encore de jasmonate de méthyle est connu pour avoir une réponse positive sur le métabolisme secondaire (Alem *et al.*, 2018; Ju *et al.*, 2016; Murcia *et al.*, 2017)

L'ABA est un sesquiterpène (15 carbones) dérivé de la famille des caroténoïdes. Comme de nombreux tétraterpénoïdes (C40) végétaux, l'ABA est synthétisé par la voie plastidique du 2-

C-methyl-d-erythritol-4-phosphate. La 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) est l'enzyme responsable du clivage des composés C40 en xanthoxine (C14), et est considérée comme une étape limitante de la voie de biosynthèse de l'ABA (Nambara and Marion-Poll, 2005). La xanthoxine ainsi produite est convertie en aldéhyde intermédiaire dans le cytosol par une déshydrogénase, puis en ABA par une oxydase (abscisic aldehyde oxidase). Une fois produite, l'hormone peut être stockée sous forme glycosylée inactive (ABA-GE) dans les vacuoles, puis être remobilisée très rapidement par hydrolyse enzymatique par la β -D-glucosidase comme décrit Figure 3.

Le catabolisme de l'ABA se fait principalement par l'oxydation du composé en acide phaséique (PA) et dihydrophaséique (DPA) grâce à l'activité du cytochrome P450 du groupe CYP707A (Figure 3) (Le *et al.*, 2011).

L'ABA s'accumule dans les baies à partir de la véraison (Baydar and Harmankaya, 2005; Coombe and Hale, 1973; Deytieux-Belleau *et al.*, 2007; Okamoto *et al.*, 2004) et jouerait un rôle déterminant dans le développement de la baie de raisin, et plus particulièrement dans le déclenchement de la maturation de la baie (Davies *et al.*, 1997; Deytieux-Belleau *et al.*, 2007; Giribaldi *et al.*, 2010; Levine *et al.*, 2009).

Des études antérieures ont démontré que l'ABA et les sucres ont des actions concertées sur la régulation de divers processus physiologiques (Finkelstein and Gibson, 2002; Gazzarrini and McCourt, 2001; Giribaldi *et al.*, 2010; Rook *et al.*, 2006). En effet, l'ABA augmente l'action promotrice des sucres sur l'accumulation des composés phénoliques et notamment des anthocyanes dans les baies (Cantín *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2004; Lacampagne *et al.*, 2009; Owen *et al.*, 2009; Wheeler *et al.*, 2009). Il induit également la transcription d'un régulateur transcriptionnel (*VviMSA*) contrôlant l'expression d'un transporteur d'hexoses (Cakir *et al.*, 2003), celle d'une protéine kinase stimulant l'expression de plusieurs transporteurs d'hexoses (Lecourieux *et al.*, 2010) et celle d'une invertase acide (Giribaldi *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2005). Une étude protéomique suggère que l'ABA agirait par le biais de protéines impliquées dans le processus de maturation, via l'alcool déshydrogénase (ADH2), une xyloglucan endo-transglycosylase et des enzymes de la biosynthèse des anthocyanes telles que la chalcone isomérase (CHI), la dihydroflavonol-4-réductase (DFR) et l'anthocyanidine réductase (ANR) (Giribaldi *et al.*, 2010).

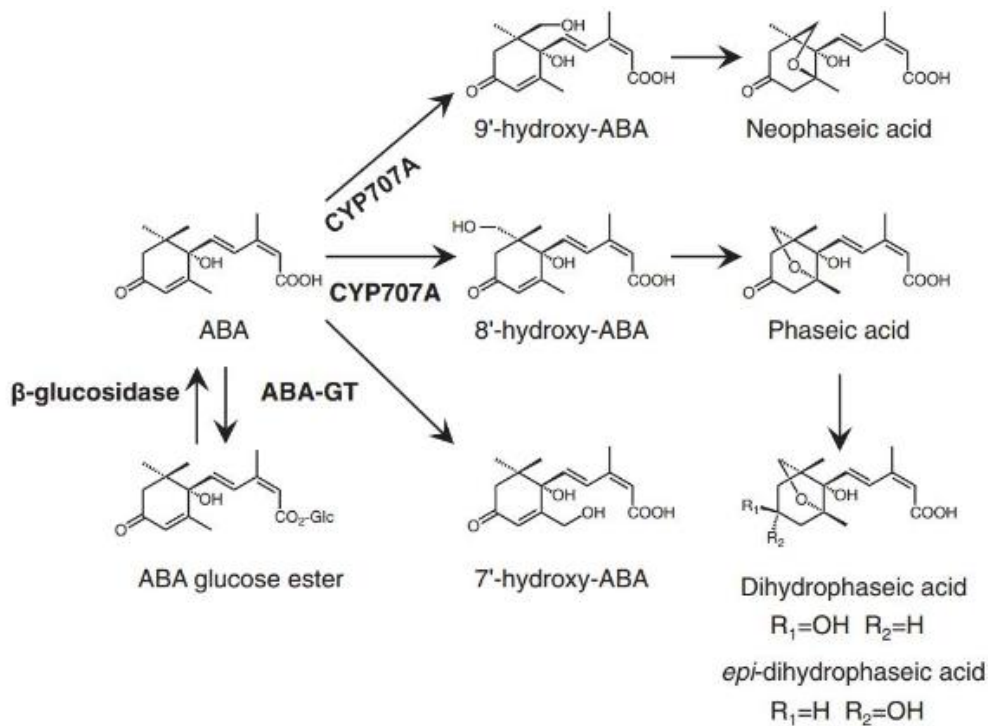


Figure 3 : Voie de stockage et de dégradation de l'ABA dans les plantes supérieures.

Dans les voies d'hydroxylation, l'ABA 8'-hydroxylation est considérée comme une voie catabolique majeure. L'ABA est également inactivé en ABA-glucosyl ester (ABA-GE) par l'ABA-glucosyltransférase (ABA-GT), mais l'ABA-GE est converti en ABA libre par la β -glucosidase (Endo et al., 2014)

Il a été montré que des pulvérisation d'ABA autour de la véraison sur les baies de différents cépages de table apyrènes, à savoir le Crimson seedless, le Rubi ou le Flame seedless, augmente la concentration en anthocyanes totales (Ferrara et al., 2015; Koyama et al., 2014; Neto et al., 2017; Peppi et al., 2006), et permettraient d'améliorer l'accumulation des sucres en augmentant le transport des assimilats (Balint and Reynolds, 2012; Düring and Alleweldt, 1980; Murcia et al., 2017). D'autres publications ont montré que l'ajout d'ABA sur les baies influence positivement principalement la couleur plutôt que l'accumulation des sucres (Wheeler et al., 2009). Si cette hypothèse se révèle être exacte, il sera envisageable de modifier l'équilibre entre les sucres et les anthocyanes en combinant modification du rapport feuilles/fruits et traitement à l'ABA. Il a aussi été noté que l'ABA affecte la biosynthèse des tannins (Lacampagne et al., 2010). Par ailleurs, Ju et al., ont montré en 2016 que la pulvérisation d'ABA ou de jasmonate de méthyle à pré-véraison augmente l'activité lipoxigénase (LOX) ainsi que la concentration en composés C6 dans les baies de Cabernet-Sauvignon. Les LOX catalysent principalement les acides linoléique et linoléique en conjugués hydroperoxides. Ces conjugués sont alors transformés par différentes réactions

enzymatiques, les produits ainsi formés sont directement liés aux arômes fruités que sont les aldéhydes et alcools en C6 ou C9 (Farmer and Ryan, 1992; Whitehead *et al.*, 1995).

Pour répondre à cet enjeu de durabilité précédemment évoqué, il est nécessaire de mieux connaître et comprendre les processus associés au développement de la baie de raisin ainsi que les mécanismes de régulation de l'accumulation des différents composés primaires et secondaires liés à la qualité des baies, afin de pouvoir promouvoir des pratiques culturales innovantes permettant de conserver une production de raisins à haut potentiel œnologique dans les conditions climatiques futures.

Je vais donc maintenant effectuer un rapide rappel de la morphologie de la baie et des mécanismes impliqués dans sa maturation. Puis je vais détailler de façon plus approfondie les processus d'accumulation connus à ce jour des différents métabolites analysés dans notre étude.

III. La baie de raisin

A) Morphologie et anatomie

Le raisin est un fruit non-climactérique, charnu et à pépins. D'un point de vue anatomique, la baie de raisin est constituée de différentes parties à savoir la pellicule ou exocarpe, la pulpe ou mésocarpe, l'endocarpe ainsi que des pépins dont leurs compositions respectives influenceront les propriétés organoleptiques du vin (Figure 4).

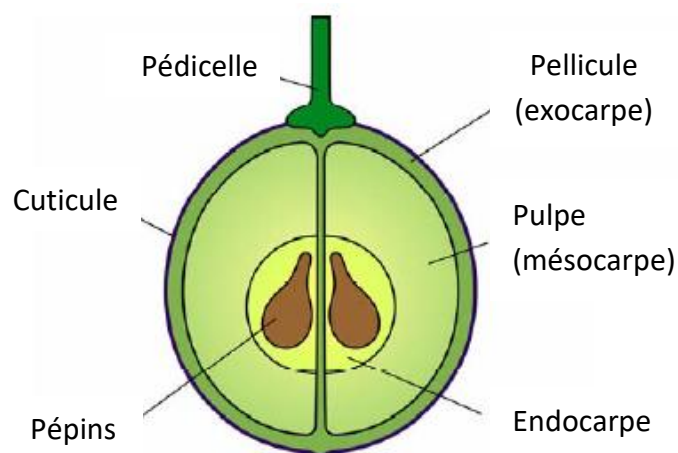


Figure 4 : Anatomie d'une baie de raisin (Conde *et al.*, 2007)

3. La pellicule

La pellicule représente 6 à 9 % de la masse du raisin et est composée d'un épiderme et d'une dizaine d'assises cellulaires sous-jacentes correspondant à l'hypoderme. Elle est recouverte d'une matière cireuse, appelée pruine, qui la rend imperméable et peut être colonisée par diverses levures (Reynier, 2007). Elle a un rôle très important lors de la vinification car ses cellules accumulent notamment dans leurs vacuoles des métabolites secondaires tels que les anthocyanes et des composés aromatiques responsables de l'arôme variétal du vin (Hardie *et al.*, 1996). La pellicule contient également à maturité des sucres en faible quantité, des acides aminés et des acides organiques.

4. La pulpe

La pulpe représente à maturité 75 à 85 % du grain entier et est composée essentiellement d'eau (70-80%), de sucres (10-30%) principalement sous forme de glucose et fructose, et d'acides organiques (1-3%) qui s'accumulent au sein des cellules parenchymateuses de l'exocarpe. Les sucres contenus dans la pulpe se retrouveront par la suite dans le moût et seront transformés en alcool lors de la vinification.

5. Les pépins

Les pépins représentent 3 à 6 % du poids total de la baie. Ils sont situés au centre de la baie, entourés par l'endocarpe et alimentés en sèves brute et élaborée par les faisceaux conducteurs de la baie. Les pépins contiennent principalement des lipides, des substances azotées et des matières minérales. Ils sont riches en composés phénoliques et peuvent contenir jusqu'à 55% des polyphénols totaux de la baie. Il a été prouvé que les pépins ont un rôle très important comme source de leucoanthocyanes et par conséquent de tanins pour les vins rouges (Ribéreau-Gayon, 1959).

Certaines substances contenues dans les téguments du pépin, composés phénoliques, matières azotées, phosphate, sont partiellement solubilisées lors de la vinification en rouge. Par contre, les tannins condensés contenus par les pépins donnent une sensation

d'amertume et d'astringence au vin ; l'écrasement des pépins est ainsi évité pour cette raison lors des étapes de foulage et de pressurage.

B) Développement et maturation

La croissance et le développement de la baie de raisin s'effectuent selon une double sigmoïde détaillée figure 5 et s'accompagnent de modifications portant sur la taille, la composition, la couleur, la texture, la saveur et la sensibilité aux pathogènes.

La première période de croissance correspond à la phase herbacée ou de formation de la baie. Elle débute après la floraison et dure 5 à 7 semaines. Elle est caractérisée par d'intenses divisions et par un grandissement cellulaire, associé à la différenciation de ces cellules, aussi bien dans le péricarpe (pellicule et pulpe) que dans les pépins. A la fin de la période herbacée, les baies de raisin sont vertes, dures et acides et les pépins ont atteint leur taille finale. Elle voit une accumulation importante en acides organiques (principalement les acides malique et tartrique) mais aussi en composés aromatiques (MPs) et phénoliques (acides hydroxycinnamiques et tanins) (Figure 5).

A la fin de cette période, une courte phase de latence de 8 à 12 jours environ et caractérisée par un ralentissement de la croissance cellulaire est observée (Coombe and McCarthy, 2000). Au cours de celle-ci, les pépins commencent à changer de couleur (brunissement).

La seconde période de croissance ou phase de maturation de la baie de raisin débute à la véraison, qui a lieu environ 60 jours après la floraison, et se caractérise par un ramollissement de la baie suivi par un changement progressif de pigmentation de la pellicule des baies ainsi que par le doublement de la taille des baies, qui induit un phénomène de dilution des composés accumulés lors de la première phase de croissance de la baie.

Au cours de la maturation, le changement au niveau visuel perçu facilement pour les cépages rouges est principalement dû à l'accumulation des anthocyanes au niveau de la pellicule. Cinq types d'anthocyanes sont rencontrés dans les baies de raisin qui sont chacune glucosylées en position 3 de leur cycle carboné (cf paragraphe C) 2.a). La partie glucoside peut aussi être estérifiée avec des composés acétylés ou coumaroylés (Mazza, 1995) ce qui impactera par la suite la stabilité de ces composés (He *et al.*, 2010). C'est également à partir de la véraison que la proportion en acides organiques va diminuer, principalement pour le malate. La teneur en sucres réducteurs va, quant à elle, augmenter à

partir de la véraison puisque ces derniers vont commencer à être transportés à partir des organes sources réalisant la photosynthèse dans les baies et à s'accumuler au sein de la pulpe. Les concentrations de la majorité des arômes et précurseurs d'arômes vont également être en augmentation à cette période (Kuhn *et al.*, 2014) à l'exception des MPs par exemple qui atteignent leur pic d'accumulation à la fin de la phase de croissance herbacée et vont diminuer au cours de la maturation. Les sucres accumulés ici pourront servir d'indicateur de la maturité des baies et seront également déterminants dans la concentration finale en alcool après la fermentation (Dai *et al.*, 2011). La phase de maturation se poursuit jusqu'à ce que la concentration en anthocyanes et en sucres soient à leurs maximums (Conde *et al.*, 2007).

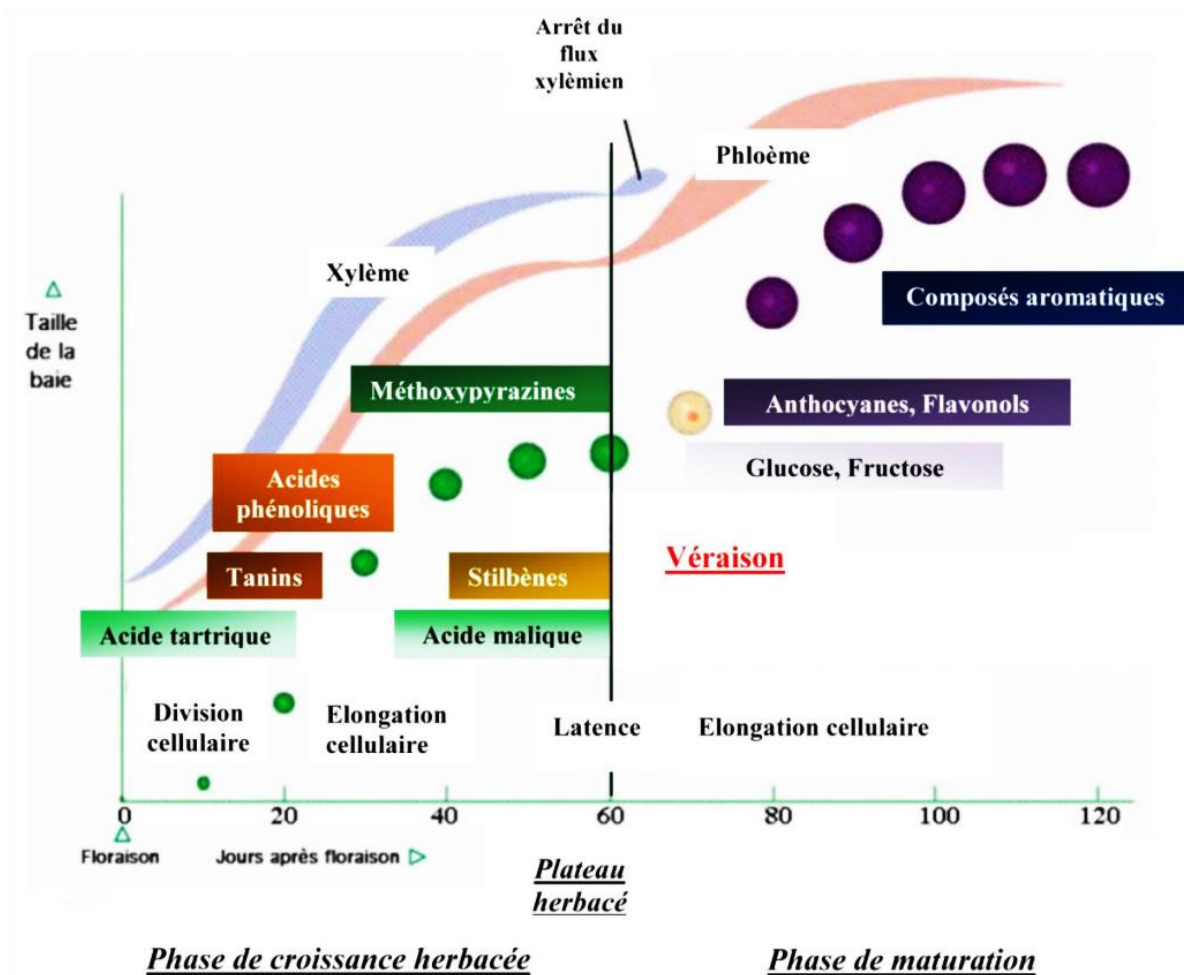


Figure 5 : Physiologie du développement de la baie de raisin (Adapté de (Kennedy, 2002). Les flux xylémiens et phloémiens sont respectivement représentés par les aires bleue et rose. La taille et la couleur relative des baies sont représentées tous les 10 jours à partir de la floraison.

C) Métabolites primaires et secondaires

Les cinétiques d'accumulation des différents métabolites primaires et secondaires qui sous-tendent la qualité des baies (sucres, acides, polyphénols, arômes, etc...) entretiennent des relations complexes, liés à des réseaux métaboliques fortement interconnectés (Dai *et al.*, 2013). Ainsi, les teneurs en sucres dans les baies montrent une corrélation positive avec les taux de polyphénols totaux (Dai *et al.*, 2014; Vitrac *et al.*, 2000), mais une corrélation négative avec l'accumulation des acides organiques a également été observée (Keller, 2010b).

6. Métabolites primaires

a) *Les sucres*

Les baies de raisin, en tant qu'organes puits typiques, reposent sur l'utilisation de ressources en carbohydrates. Lors des premiers stades phénologiques du développement des baies de raisin, la concentration totale en sucres est très faible (Possner and Kliewer, 1985). Les composés carbonés sont synthétisés lors de la photosynthèse au sein des chloroplastes pour soutenir la croissance et le développement de la plante. Au cours du développement de la baie de raisin, la principale ressource carbonée transportée des feuilles vers les baies de raisin via le phloème est le saccharose (Swanson and El-Shishiny, 1958). Le transport et l'allocation des sucres entre les organes sources photosynthétiques et les organes puits sont des déterminants majeurs influençant le développement de la plante et la productivité de celle-ci (Kingston-Smith, 2001). Le transport du saccharose, détaillé Figure 6, se fait via la sève élaboré au sein du phloème qui se déplace sous la pression hydrostatique vers les tissus/organes puits. Une fuite passive peut avoir lieu le long de la trajectoire indiquée figure 6 par des flèches bleues. Une fois dans la baie, il sera transformé en glucose et en fructose (Davies and Robinson, 1996). À maturité, les concentrations de glucose et de fructose sont similaires dans la baie, entre 70 et 130 g L⁻¹ (Ribereau-Gayon *et al.*, 2000).

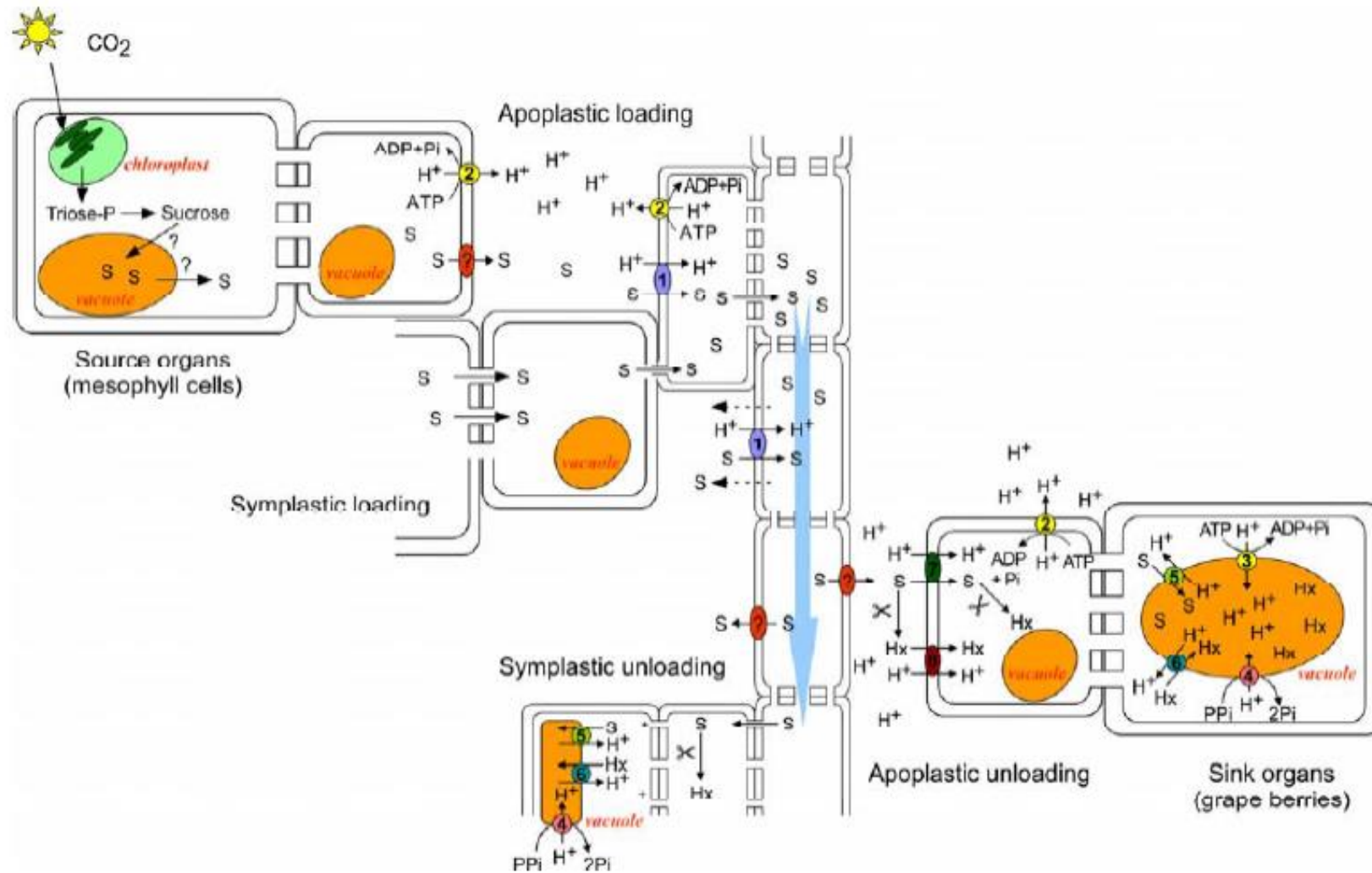


Figure 6 : Transport de sucres à longue distance par le phloème (Conde et al., 2007).
 Source de saccharose/symport H^+ ; (2) Membrane plasmique H^+ ATPase; (3) Tonoplaste H^+ ATPase; (4) Pyrophosphatase; (5) Saccharose/antiport H^+ ; (6) Hexose/antiport H^+ ; (7) Source de saccharose/symport H^+ ; (8) Hexose/symport H^+ ; (?) Invertase.

Les molécules organiques simples créées, tel que le glucose, peuvent ensuite être employées comme source d'énergie via la glycolyse par exemple (Figure 7) ou pour les réactions anaboliques telle que la synthèse des parois cellulaires des baies avant véraison, alors que pour des baies en cours de maturation le surplus d'hexoses est transporté dans la vacuole où le stock de malate provenant de la respiration peut aider à satisfaire les besoins énergétiques (Ruffner, 1982).

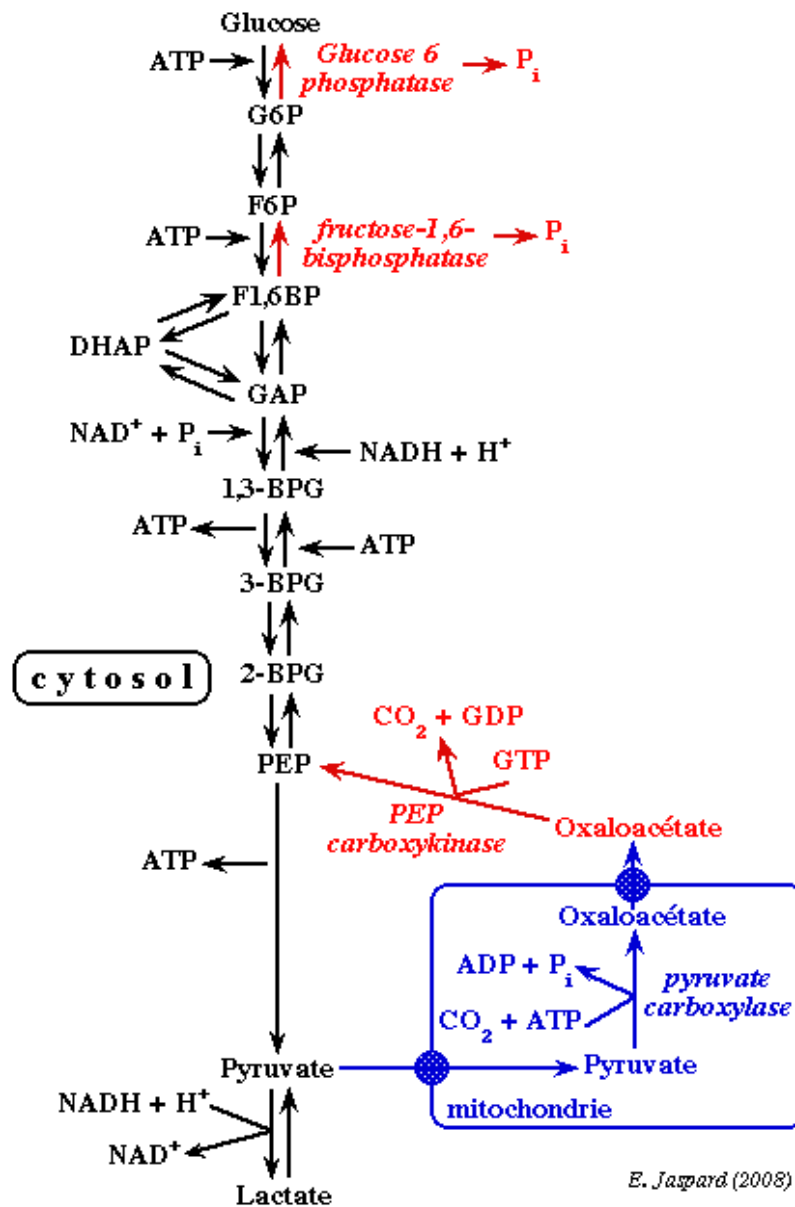


Figure 7 : Voies métaboliques de la glycolyse et de la néoglucogenèse

L'ensemble des composés organiques plus ou moins complexes ainsi formés sont finement régulés par de nombreuses voies métaboliques formant ainsi un réseau très complexe. Comme le décrivent Lecourieux *et al.*, 2014, les acteurs moléculaires conduisant à l'accumulation de fortes concentrations en glucose et en fructose dans les vacuoles des cellules de la pulpe sont encore trop peu caractérisés. Les connaissances actuelles concernant le lien entre le transport des sucres et sa régulation chez la vigne est résumé Figure 8. Le contrôle des transporteurs par les sucres, peut être positif ou négatif, en fonction de la concentration en sucres, et peut impliquer une voie dépendante ou indépendante de l'hexokinase (Afoufa-Bastien *et al.*, 2010, Agasse *et al.*, 2009; Jaillon *et al.*, 2007, Lecourieux *et al.*, 2010, Samson *et al.*, 2004), ainsi qu'une régulation au niveau transcriptionnel et protéique ce qui met en évidence les rôles majeurs des sucres en tant que nutriments et signaux, ainsi que l'importance de la mise en réserve de carbone pour la plante. Au-delà du transport, le statut en sucres affecte directement ou indirectement d'autres activités cellulaires telles que le métabolisme des phénylpropanoïdes (Ferri *et al.*, 2011), le métabolisme de la paroi cellulaire, l'homéostasie des auxines (Kohno *et al.*, 2012), le mûrissement et finalement la croissance des baies, ainsi que le mûrissement lié à l'adaptation aux stress (Kanehisa and Goto, 2000). Les interactions entre les sucres et la voie de signalisation de l'ABA jouent un rôle clé, également souligné par l'accumulation parallèle de sucres et d'ABA dans la baie après la véraison. Dans de nombreuses études, les résultats obtenus l'ont été grâce à l'utilisation de suspensions cellulaires de *Vitis vinifera* plutôt que directement sur baies (Cakir *et al.*, 2003, Dominguez *et al.*, 2013). La pertinence physiologique de ces résultats doit être systématiquement contrôlée au sein des baies et nécessitent que des études sur baies entières soient développées. Bien que la plupart des études sur la détection des sucres au sein de la vigne aient été menées avec du saccharose, du glucose et du fructose, des données récentes indiquent que d'autres sucres tels que le galactinol et le tréhalose pourraient également jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme, de la maturation et de l'adaptation au stress des baies. Leur présence est donc indispensable à l'équilibre métabolique de la plante et donc de la baie de raisin.

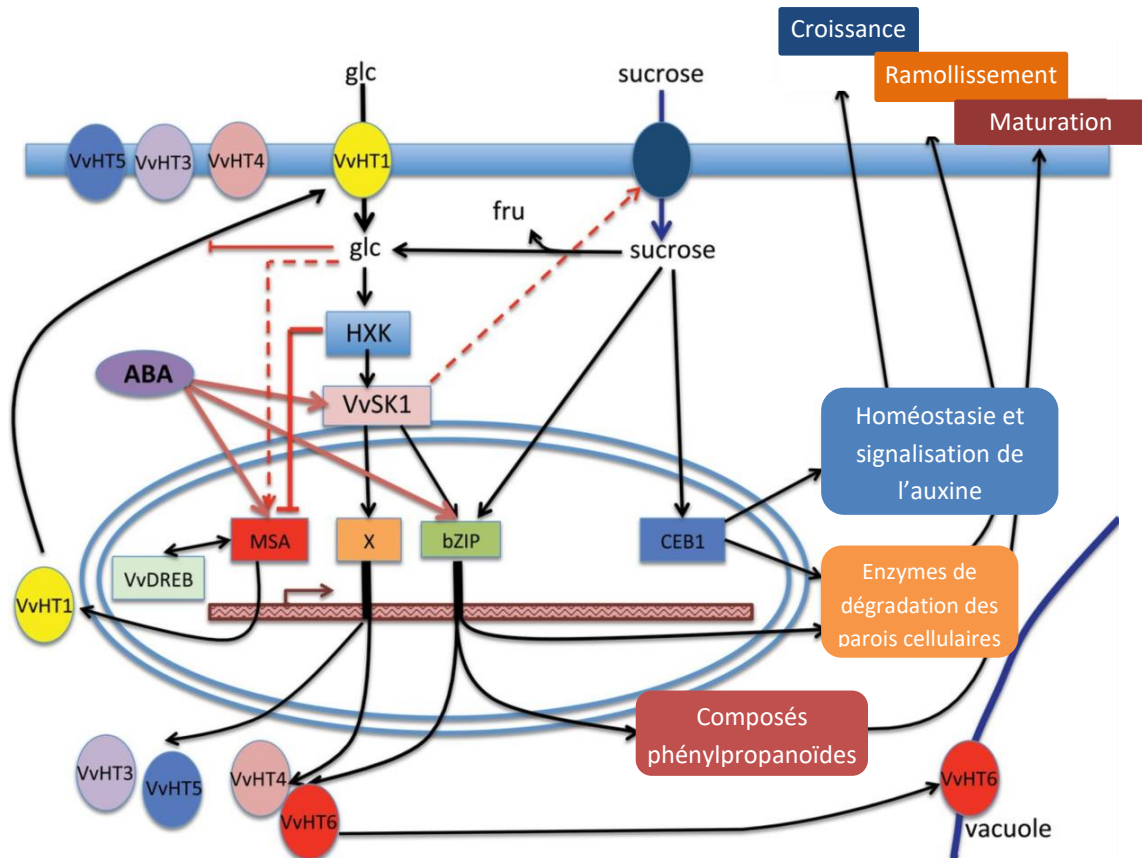


Figure 8 : Schéma récapitulatif des processus de transport et de détection des sucres décrits dans la vigne. (Lecourieux et al., 2014) bZIP, basic leucine zipper; CEB1, cell elongation bHLH protein 1; DREB, drought responsive element binding protein; HXK, hexokinase; MSA, maturation stress abscisic acid gene (famille ASR); VvHT1–VvHT6, transporteur d'hexose 1–VvHT6; VvSK1: glycogen synthase kinase 3 protein kinase 1; X, intermédiaire inconnu.

b) Acides organiques

La présence de teneurs adéquates d'acides organiques dans les baies est un facteur clé pour déterminer si le moût a le potentiel de produire un vin stable et de qualité.

Les acides tartrique et malique sont les principaux acides organiques de la baie de raisin, représentant environ 90% de l'acidité totale des fruits, complétés par de petites quantités d'acide citrique (Kliwer, 1967; Soyer *et al.*, 2003). Les acides organiques présents dans la pulpe et la pellicule, sont nécessaires pour de nombreux aspects du métabolisme cellulaire telle que la respiration par exemple (Coombe and McCarthy, 2000; Possner and Kliwer, 1985).

Contrairement à la plupart des acides organiques présents dans le raisin, l'origine métabolique de l'acide tartrique se situe en dehors du métabolisme oxydatif des sucres (Loewus and Stafford, 1958). La biosynthèse de l'acide tartrique commence par l'acide L-

ascorbique provenant lui-même du métabolisme du fructose et du mannose comme décrit figure 9 (Cholet *et al.*, 2016).

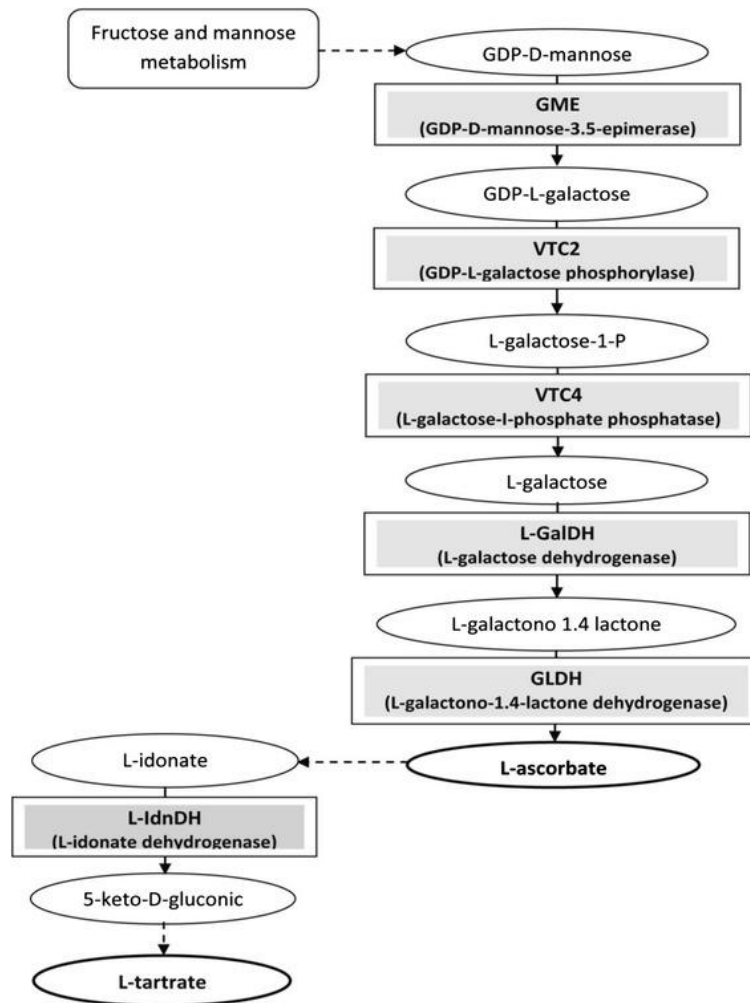


Figure 9 : Voie de biosynthèse du L-tartrate via le L-ascorbate (Cholet *et al.*, 2016; DeBolt *et al.*, 2006; Ford, 2012; Melino *et al.*, 2009)

La diminution de concentration en acide tartrique après véraison est principalement due à une augmentation de la taille des baies.

Contrairement à l'acide tartrique, le contenu en acide malique varie au cours du développement des baies. L'acide malique est accumulé dans les cellules de la pulpe à la fin de la phase de croissance herbacée, atteignant sa concentration maximale juste avant la véraison. Il est produit à la fois dans les feuilles et les baies immatures, principalement par la β -carboxylation du phosphoénolpyruvate (Hawker, 1969; Meynhardt, 1965; Ribereau-Gayon, 1968). La phosphoénolpyruvate carboxylase catalyse de manière irréversible cette étape. L'oxaloacétate résultant est ensuite réduit en malate par une malate déshydrogénase cytosolique (Hawker, 1969; Meynhardt, 1965), selon la réaction détaillée figure 10 (Conde *et al.*, 2007).

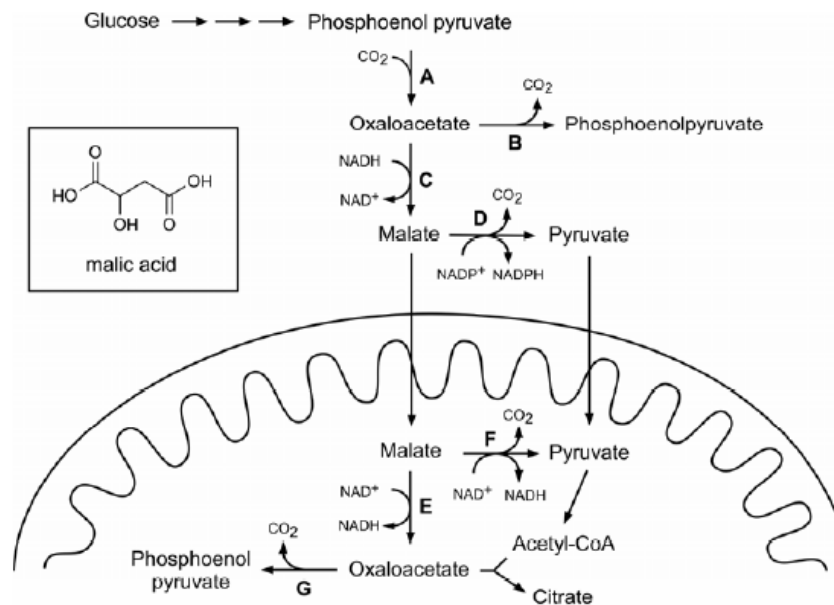


Figure 10 : Métabolisme de l'acide malique chez la vigne.

(A) Phosphoenolpyruvate carboxylase; (B) Phosphoenolpyruvate carboxykinase cytosolique; (C) Malate déshydrogénase cytosolique; (D) Enzyme malique cytosolique; (E) Malate déshydrogénase mitochondriale; (F) Enzyme malique mitochondriale ; (G) Phosphoenolpyruvate carboxykinase mitochondriale (Conde *et al.*, 2007).

Il est admis que les isoformes cytosolique et mitochondriale de la malate déshydrogénase participent respectivement à la synthèse et au catabolisme du malate en réponse aux changements métaboliques survenant au cours du développement du raisin (Taureilles-Saurel *et al.*, 1995). La diminution de l'acide malique au cours de la maturation est le résultat de la réduction de la synthèse du malate en combinaison avec un taux catabolique accéléré. Cependant, d'autres voies telles qu'une translocation réduite des feuilles jusqu'aux baies pourrait également jouer un rôle important (Conde *et al.*, 2007).

Malgré leur similitude structurale, les acides tartrique et malique sont synthétisés et dégradés par des processus biochimiques nettement différents.

c) Acides aminés

Les concentrations et les proportions d'acides aminés libres dans les baies de raisin varient selon les cultivars, les combinaisons porte-greffes / greffons, la gestion des éléments nutritifs de la vigne, le vignoble considéré et la saison de croissance (Bell and Henschke, 2005; Gump *et al.*, 2002; Huang and Ough, 1989). Dans le raisin, les acides aminés libres sont les principales sources d'azote pour la levure pendant la vinification (Marcy *et al.*, 1981). Au cours de la vinification, l'azote total dans le moût peut varier de 100 à 1200 mg L⁻¹, dont 20 à 50% d'acides aminés (Conde *et al.*, 2007). Les acides aminés servent également de sous-

unités dans la production d'enzymes et de protéines et sont présents comme précurseurs de certains composés aromatiques (Jackson, 2008; Kliewer, 1970). Les oligopeptides peuvent également jouer un rôle dans la perception du caractère velouté des vins (Desportes *et al.*, 2001).

La teneur en protéines est également d'importance économique car elle affecte grandement la clarté (translucidité) du vin (Ferreira *et al.*, 2001) c'est pour cela que souvent elles sont précipitées par le vinificateur à l'aide de bentonite (Conde *et al.*, 2007). La voie de biosynthèse des acides aminés est rappelée Figure 11.

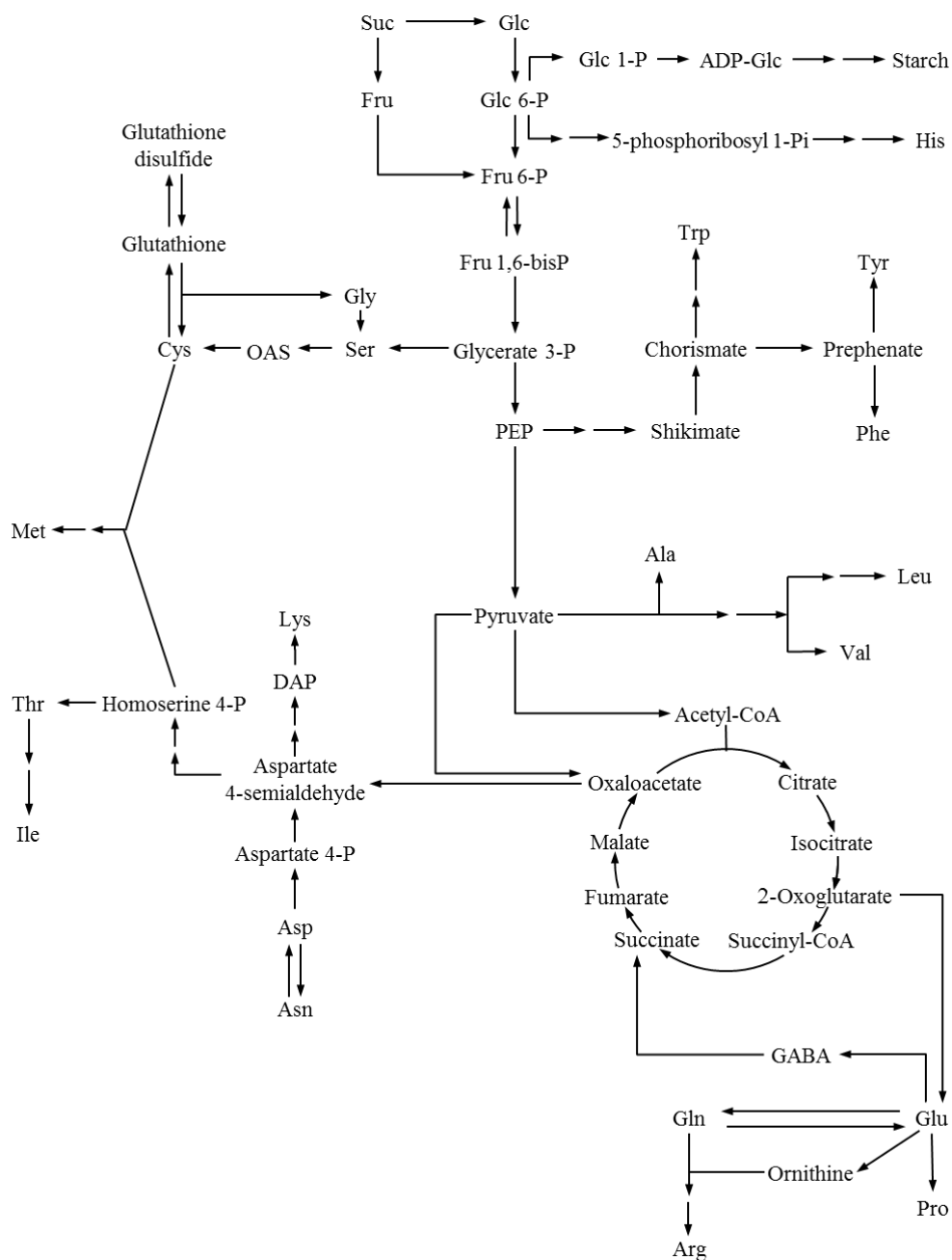


Figure 11 : Voie de biosynthèse des acides aminés (Dai *et al.*, 2015)

7. Métabolites secondaires

a) Anthocyanes

La concentration et la composition en anthocyanes au niveau de la pellicule sont responsables de la couleur des baies de raisin des cépages rouges (Liang *et al.*, 2008; Pomar *et al.*, 2005). L'accumulation d'anthocyanes, commence à la véraison et se poursuit tout au long de la maturation, et est fréquemment utilisée comme empreinte digitale pour la reconnaissance des cultivars (Kuhn *et al.*, 2014). En effet, la biosynthèse des anthocyanes est déterminée par des facteurs génétiques (Fournier-Level *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2007), et deux clones de la même variété peuvent présenter des concentrations en anthocyanes différentes (van Leeuwen *et al.*, 2012). La biosynthèse des anthocyanes est également influencée par les facteurs environnementaux les principaux étant la lumière (Guan *et al.*, 2015; Jackson and Lombard, 1993) et les pratiques viticoles (Berli *et al.*, 2010; Castellarin *et al.*, 2007; Hilbert *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2005; Soubeyrand *et al.*, 2014). Parallèlement, la biosynthèse des anthocyanes est également régulée par des hormones végétales, comme l'ABA et l'éthylène (El-Kereamy *et al.*, 2003; Wheeler *et al.*, 2009).

Dans les cellules de la vigne, les anthocyanes sont synthétisées à la surface cytosolique du réticulum endoplasmique par un complexe multienzymatique via la voie des flavonoïdes comme détaillé Figure 2 (Xie *et al.*, 2015). Il y a cinq anthocyanidines chez *V. vinifera*, la cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine, et la malvidine, qui sont majoritairement glucosylées en position 3 (monoglucosides) ; alors qu'il y a beaucoup plus d'anthocyanidine 3,5-diglucosides dans les autres espèces et hybrides de *Vitis* (Liang *et al.*, 2008) ou acylées (acétylées ou coumaroylées) (Kuhn *et al.*, 2014). La couleur des anthocyanes en solution dépend du nombre de groupements hydroxyles attachés sur leurs cycles. Avec l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles, la couleur des molécules en solution passe de l'orange au violet (Figure 123) (Ananga *et al.*, 2013; Andersen *et al.*, 2005; Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2008).

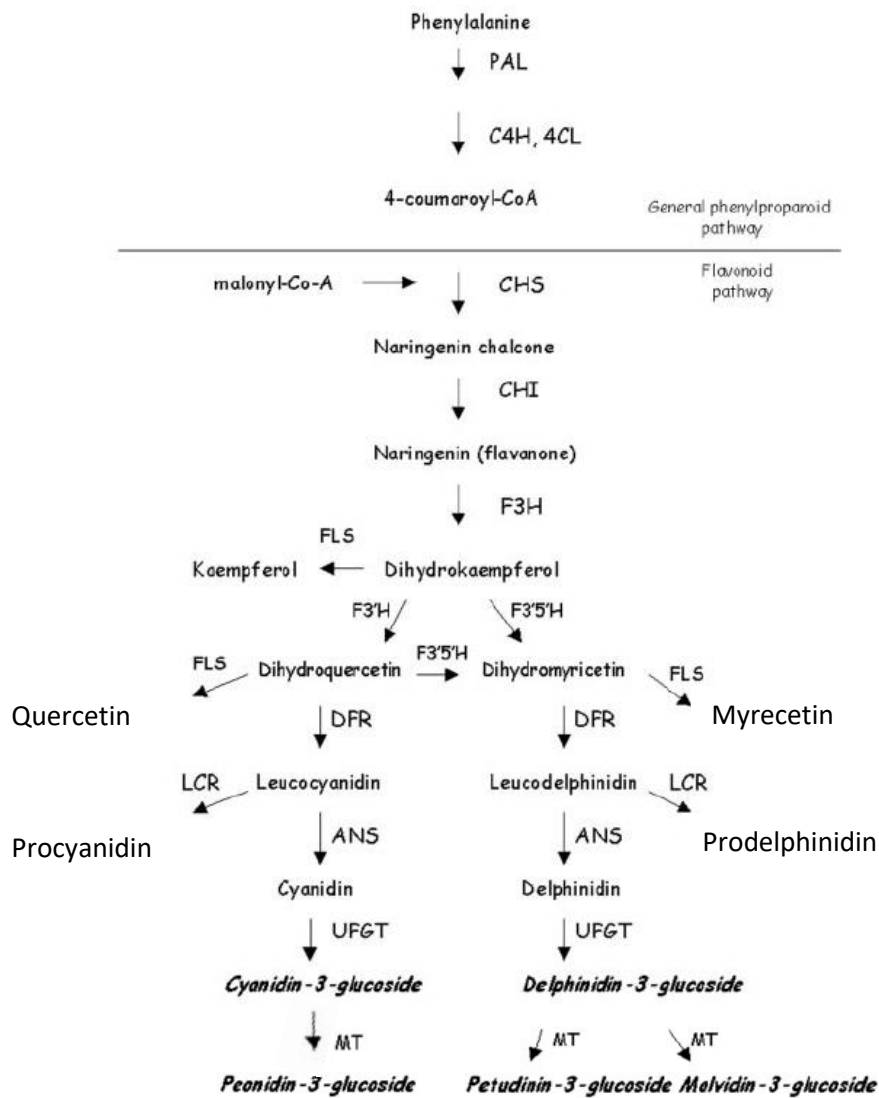


Figure12 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des anthocyanes en mettant l'accent sur les proanthocyanidines et les anthocyanidines présentes dans le raisin adaptée de (Jaakola, 2002).

Abréviations: C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumaroyl:CoA ligase; CHI, chalcone isomérase; F3'H, flavonoïde 3' hydroxylase; F3'5'H, flavonoïde 3'5' hydroxylase; LCR, leucoanthocyanidine réductase; UFGT, UDP Glc-flavonoïde 3-O-glucosyle transférase; MT, méthyltransférase.

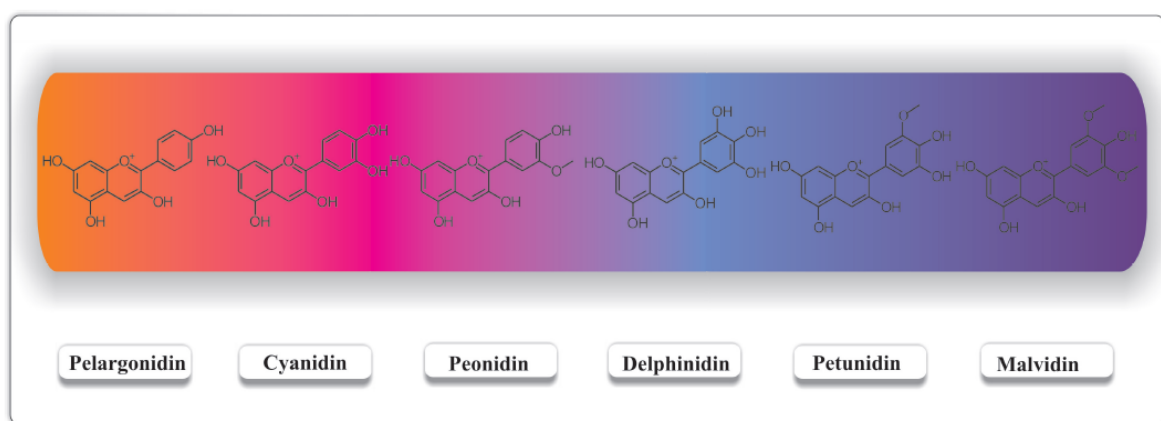


Figure 123 : Les couleurs visibles des différentes anthocyanidines (d'après Ananga *et al.*, 2013)

Les dérivés de la malvidine sont les principales anthocyanes des cultivars de *V. vinifera*, à l'exception du cépage Graciano composé principalement des dérivés de la cyanidine (Liang *et al.*, 2008; Núñez *et al.*, 2004). Les sucres les plus communément attachés aux anthocyanidines sont le glucose, le rhamnose, le xylose, le lactose (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2008). Ces sucres peuvent être modifiés par les acides acétique, *o*-coumarique, caféique et férulique. La plupart des anthocyanes ne se combinent pas avec des acides organiques chez *V. vinifera*. Par exemple, le Pinot noir produit uniquement des anthocyanes non acylées (Mazza *et al.*, 1999). Concernant les anthocyanes se combinant avec les acides organiques, les dérivés *p*-coumaryles sont dominants (Liang *et al.*, 2008; Núñez *et al.*, 2004).

b) *Arômes et précurseurs d'arômes*

En 1974, Drawert a proposé une classification des arômes en trois familles selon l'origine (bio)génétique des composés à savoir les arômes variétaux dit aussi arômes primaires, les arômes fermentaires ou arômes secondaires, et enfin les arômes de vieillissement ou arômes tertiaires.

Mon sujet de thèse étant focalisé sur le potentiel qualitatif de la baie de raisin, la suite de mon manuscrit de thèse ne sera consacrée qu'aux arômes primaires et à leurs précurseurs présents au sein de la baie de raisin.

En effet, les arômes variétaux proviennent du raisin, sont caractéristiques du cépage considéré et sont responsables en grande partie de la typicité des vins. Ces arômes peuvent être présents au sein de la baie sous forme libre directement perceptible dans le fruit ou sous forme conjuguée non perceptible mais révélée lors de la fermentation alcoolique ou malolactique. Le terme de précurseurs d'arôme est alors utilisé.

(1) Arômes primaires conjugués

Les arômes primaires sous forme conjuguée et libérés à partir de précurseurs regroupent : les alcools en C6, les C13-norisoprénoides, présents tous deux dans la baie sous forme de précurseurs glycosidiques, les thiols ou encore le furanéol.

(a) Les aldéhydes et les alcools en C6

Les aldéhydes et les alcools en C6 sont des molécules odorantes volatiles qui peuvent contribuer à l'arôme herbacé. Ils sont principalement générés par la dégradation enzymatique des acides gras polyinsaturés en C18 contenus dans les membranes des plantes (Mozzon *et al.*, 2016). Leurs concentrations dans le moût peuvent être de l'ordre de plusieurs centaines de $\mu\text{g L}^{-1}$ (Moreno and Peinado, 2012) ou même de plus de $13000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ferreira *et al.*, 2000) avec des seuils de détection variable ($400-800 \mu\text{g L}^{-1}$) (Guth, 1997). Leur arôme d'herbes coupées est l'odeur caractéristique des feuilles vertes fraîchement endommagées (Harsch *et al.*, 2013). Les alcools en C6 que l'on trouve fréquemment dans les raisins comprennent l'hexanol, le (Z)-3-hexénol et le (E)-2-hexénol. De plus, le (E)-2-hexénol et le (E)-3-hexénol peut aussi être détecté dans les vins à des concentrations proches de quelques $\mu\text{g L}^{-1}$ (Gigot *et al.*, 2010).

(b) Les C13 norisoprénoides

Les norisoprénoides sont constitués d'un cycle carboné à 9, 10, 11 ou 13 atomes. Les C13-norisoprénoides sont les plus présents chez la vigne, on retrouve par exemple la 2,2,6-triméthylcyclohexanone aussi appelé TCH, la vitispirane, l'actinidiol, la 1,1,6-triméthyl-1,2-dihydronaphtalène ou TDN, la β -damascénone ou encore la β -ionone. La formation de C13-

norisoprénoïdes dans la baie de raisin entraîne une dégradation des caroténoïdes. Il a été proposé que les caroténoïdes puissent être dégradés par des mécanismes chimiques, photochimiques ou couplés à une oxydase (Kanasawud and Crouzet, 1990). Au cours des dernières années, d'autres études ont soutenu l'hypothèse de l'implication d'une oxygénase régiospécifique dans la formation de C13-norisoprénoïdes (Baumes *et al.*, 2002; Mathieu *et al.*, 2005). Bien que les réactions enzymatiques impliquées n'aient pas encore été entièrement découvertes, une famille d'enzymes a été identifiée comme étant capable de cliver les caroténoïdes. Il s'agit des carotenoid cleavage dioxygenase (CCD) qui produisent des apocaroténoïdes, comme par exemple, les C13-norisoprénoïdes (Mathieu *et al.*, 2005; Walter and Strack, 2011; Young *et al.*, 2012). Les C13-norisoprénoïdes constituent une partie importante des composés aromatiques volatils non-floraux des raisins de Cabernet-Sauvignon (Bindon *et al.*, 2007), de Syrah (Pineau *et al.*, 2007) de Sauvignon blanc (Marais *et al.*, 1995) et de Pinot noir (Fang and Qian, 2006). En effet, la β -damascénone et la β -ionone sont connues pour être impliquées dans l'arôme fruité des vins même à de très faibles concentrations (Crupi *et al.*, 2010; Fang and Qian, 2006; Loscos *et al.*, 2007).

(c) Thiols volatiles et leurs précurseurs

Les thiols volatils ne sont pas présents dans les baies de raisin mais sont libérés pendant la fermentation sous action de la levure (Murat *et al.*, 2001) à partir de précurseurs inodores dont les premiers ont été identifiés comme étant des S-conjugués (Tominaga *et al.*, 1998a). Les levures ont ainsi pu être sélectionnées en fonction de leur performance à produire des formes de thiols libres, afin d'augmenter la présence de ces arômes du vin (Belda *et al.*, 2016; Thibon *et al.*, 2011; Thibon *et al.*, 2008). Cette conversion reste faible, typiquement moins de 5% des formes cystéinylés sont transformées en forme libres (Peña-Gallego *et al.*, 2012). La présence dans les fruits de précurseurs aromatiques pouvant agir comme sources d'arômes latents ou potentiels est un fait bien connu depuis de nombreuses années (Hewitt *et al.*, 1956; Weurman, 1961). Beaucoup de thiols (mercaptans) provoquent des arômes défectueux, mais tous les composés soufrés - ni même tous les thiols - ne sont pas nuisibles à la qualité du vin. Depuis le début des années 1990, les thiols hautement odorants ont été découverts telle que la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP) anciennement nommée la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP) qui évoque une

odeur de buis et de genêt. Son seuil de perception est de 0,8 ng L⁻¹ en solution modèle (Darriet *et al.*, 1995). Le 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH) correspondant au 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) est associé à l'odeur de pamplemousse et de fruit de la passion son seuil de perception est de 60 ng L⁻¹ (Tominaga and Dubourdieu, 1997). L'acétate de 3-sulfanylhexyle (A3SH) ou anciennement nommé l'acétate 3-mercaptohexyle (A3MH) évoque quant à lui l'odeur de buis et de fruit de la passion, son seuil de perception est de 4 ng L⁻¹ (Tominaga *et al.*, 1996). La 4MSP, le 3SH et l'A3SH ont été identifiés comme ayant un impact positif important dans les vins de Sauvignon blanc (Tominaga *et al.*, 1996; Tominaga *et al.*, 1998a; Tominaga *et al.*, 1998b), les deux derniers peuvent également participer à la nuance fruitée des vins rouges comme pour le Merlot, le Cabernet Franc et le Cabernet-Sauvignon (Blanchard *et al.*, 1999; Blanchard *et al.*, 2004; Bouchilloux *et al.*, 1998; Murat *et al.*, 2001). Les premières formes de précurseurs ont été identifiées par Tominaga *et al.*, en 1998. Ils ont montré que le 3SH et la 4MSP étaient présents dans le moût sous forme de *S*-conjugués à la cystéine : le *S*-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine et la *S*-4-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine décrits respectivement comme précurseurs du 3SH et de la 4MSP (Figure 14) (Helwi, 2015). Puis en 2002, la présence du précurseur glutathionylé du 3SH, le *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathion (Glut-3SH) a été mise en évidence dans le moût (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002). Dans cette même étude, il a été supposé que la forme cystéinylée du précurseur du 3SH (Cys-3SH) proviendrait du catabolisme du Glut-3SH. Une forme glutathionylée de la 4MSP a également été retrouvée dans les moûts de Sauvignon blanc (Fedrizzi *et al.*, 2009).

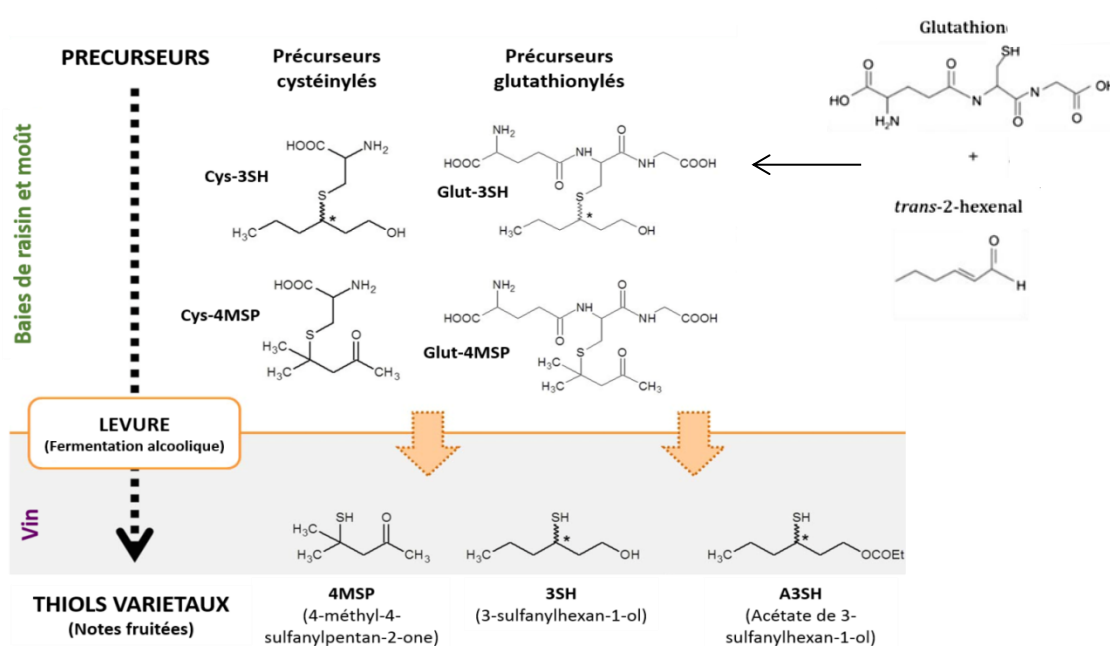


Figure 13 : Les trois thiols volatils majeurs et leurs précurseurs cystéinylés et glutathionylés (adaptée de (Roland, 2010).

Les voies de biosynthèse des précurseurs des thiols volatils sont encore loin d'être totalement élucidées. D'après Kobayashi *et al.*, (2011), la réaction d'addition du *trans*-2-hexenal au glutathion permettant de générer Glut-3SH serait réalisée par une Glutathion-S-transférase (GST). La synthèse du Cys-3SH à partir du Glut-3SH nécessite la présence de deux autres enzymes : la γ -glutamyltranspeptidase (GGT) qui catalyse la réaction d'élimination de l'acide glutamique et une carboxypeptidase responsable de l'élimination de la glycine afin de produire le Cys-3SH. Kobayashi *et al.*, (2011) ont identifié trois gènes, *VviGST3*, *VviGST4* et *VviGGT*, comme étant des gènes clés codant des enzymes indispensables dans la voie de biosynthèse du 3SH. Kobayashi *et al.*, (2010) ont signalé l'existence du précurseur 3SH-cystéineglycine (Cysgly-3SH) comme étant un intermédiaire entre le précurseur glutathionylé et le précurseur cystéinylé. La présence d'un intermédiaire aldéhyde (Glut3SHAl) résultant de la conjugaison du *trans*-2-hexenal et du glutathion a aussi été mis en évidence par Capone *et al.*, (2011) et par Thibon *et al.*, (2016). D'autres gènes candidats potentiellement associés à la voie de biosynthèse des précurseurs de thiols ont pu être identifiés par Helwi *et al.*, (2016) par le biais une approche de transcriptomique à haut débit et notamment le gène *VviOPT1*, codant un oligopeptide transporteur pouvant être impliqué dans le transport du glutathion.

(d) Furanéol

Le furanéol ou 2,5-diméthyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (HDMF) est une furanone dont l'odeur évoque la fraise cuite lorsqu'elle est diluée et le caramel à de plus fortes concentrations (Rapp *et al.*, 1980). Les vins issus de vignes américaines et de leurs hybrides sont très riches en furanéol ($> 10 \text{ mg L}^{-1}$), dépassant ainsi son seuil de perception olfactive défini à $10,5 \mu\text{g L}^{-1}$ dans un milieu synthétique de moût par Lucile Allamy, (2015). Elle a également prouvé qu'en solution hydroalcoolique, les seuils de perception du furanéol oscillent entre 46 et $49 \mu\text{g L}^{-1}$ en fonction du pH et n'est donc pas dépendant du pH. Les travaux de Kotseridis *et al.*, (2000) montrent qu'il est retrouvé dans les vins rouges de Cabernet-Sauvignon et de Merlot et mettent en évidence une corrélation entre l'intensité des nuances de caramel retrouvées dans ces vins et les teneurs en furanéol. Une étude sur les vins italiens a également mis en évidence l'implication du furanéol dans l'arôme des vins de Refosco et Primitivo (également connu sous le nom de Zinfandel aux Etats Unis)

(Genovese *et al.*, 2005). Dans les vins de *Vitis vinifera*, le furanéol serait issu du métabolisme des sucres. En 2008, Wang et Ho ont mis en évidence, en conditions de laboratoire (tampon phosphate 0,5 M, 1 heure à 120°C), que le méthyl glyoxal pourrait être un intermédiaire des réactions de Maillard impliquant le glucose et la glycine et pourrait figurer ainsi comme précurseur du furanéol. Cette voie de synthèse hypothétique a été renforcée par les travaux de thèse de Lucile Allamy (2015) qui confirme que les réactions de Maillard peuvent être une voie expliquant sa formation dans les moûts et au final dans les raisins. Bien que des arguments militent pour sa présence dans le raisin (Guedes de Pinho and Bertrand, 1995; Ségurel, 2005), aucune identification formelle d'un précurseur glycosidique n'a été démontrée.

Un homologue du furanéol, l'homofuranéol, évoquant le sucre cuit tout comme le furanéol, peut contribuer à l'arôme des vins rouges de Cabernet-Sauvignon et de Merlot (Kotseridis, 1999; Kotseridis *et al.*, 2000), des vins rosés de Grenache comme exhausteur de l'arôme du fruit en synergie avec le furanéol (Ferreira *et al.*, 2002). Son seuil de perception est de 5,5 µg L⁻¹ dans un milieu synthétique de moût (Allamy, 2015) et est dépendant du pH en milieu hydroalcoolique. L'homofuraneol est issu des réactions de Maillard (Blank *et al.*, 1997) impliquant un pentose (xylose) et un acide aminé (alanine).

(2) Arômes variétaux libres

Les arômes libres dans le raisin sont représentés uniquement par trois classes de molécules : les terpénoïdes dans le cas des cépages muscatés, la rotundone (Wood *et al.*, 2008) identifiée dans les raisins et vins de Syrah provenant d'Australie et les pyrazines (2-alkyl-3-méthoxypyrazines) notamment pour les vins de Cabernet (Siebert *et al.*, 2008).

(a) Les terpénoïdes

Les composés de la famille des terpènes ont des structures très variées, et ont tous en commun d'être constitués de multiples sous unités d'isoprène (C₅H₈) d'où l'appellation d'isoprénoïdes donnée également aux terpènes. La formation du squelette carboné de tous ces terpènes est catalysée par des enzymes : les terpènes synthases. Ainsi, les terpènes formés par les terpènes synthases sont classés par rapport au nombre d'unités en C₅ qui les

constituent. Les qualificatifs de monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes sont respectivement employés pour les molécules en C₁₀, C₁₅ et C₂₀ formées à partir des substrats prényl-diphosphates suivants : géranyl diphosphate (GPP), farnésyl diphosphate (FPP) et géranylgéranyl diphosphate (GGPP). De nombreux composés monoterpéniques ont été détectés dans le moût et le vin de différents cépages. Ces cépages peuvent être séparés en trois groupes différents selon leur concentration en monoterpènes : les variétés muscatées pouvant atteindre des concentrations supérieures à 6mg L⁻¹, les variétés non-muscatées présentant une concentration en monoterpènes comprise entre 1 et 4mg L⁻¹, et enfin les variétés neutres comme le Cabernet-Sauvignon dont la concentration en terpènes joue uniquement un rôle minime dans la détermination des arômes variétaux (Tableau 1) (Mateo and Jiménez, 2000). Les monoterpènes détectés dans les raisins sont de trois types : les composés aromatiques libres tel que le linalol (arôme de coriandre), le géraniol et le nérol (notes résineuses ou de feuilles de géranium) ou l' α -terpinéol (Marais, 2017); les formes polyhydroxylées et les formes conjuguées glucosylées qui ne jouent pas un rôle direct dans l'arôme primaire des baies. Des études antérieures ont montré que le α -terpinéol peut être transformé en 4-(2-hydroxypropyl)-1-méthylcyclohexanol (hydrate de terpine ou 1,8-terpine) (Pakdel *et al.*, 2001) lui-même transformé en 1,8-cinéole (Farina *et al.*, 2005) responsable de l'arôme mentholé des vins rouges (Herve *et al.*, 2003; Saliba *et al.*, 2009). Le seuil de détection du 1,8-cinéole est extrêmement bas de 1,1 ppb et son seuil de perception est de 3,2 ppb dans le vin de Merlot californien (Herve *et al.*, 2003). Des valeurs seuils similaires ont été également observées en Uruguay pour le vin issu du cépage Tannat (Farina *et al.*, 2005). La concentration en 1,8 cinéole trouvée dans le vin blanc est apparemment faible, 1ppb pour le Gewürztraminer (Girard *et al.*, 2002), et ne devrait pas jouer un rôle aussi important sur le plan de la perception que les niveaux trouvés dans le vin rouge mais celle-ci ne peut pas être exclue (Saliba *et al.*, 2009).

| Variétés muscatées | Variétés non muscatées | Variétés neutres |
|-----------------------------|------------------------|---------------------|
| Canada Muscat | Traminer | Aryan |
| Gewurztraminer | Huxel | Bacchus |
| Muscat of Alexandria | Kerner | Bobal |
| Muscat de Frontignan | Morio-Muskat | Cabernet-Sauvignon |
| Moscato Bianco del Piemonte | Müller-Thurgau | Carignan |
| Muscat Hamburg | Riesling | Cencibel |
| Muscat Ottonel | Schurebe | Chardonnay |
| Moscato italiano | Schonburger | Chasselas |
| | Siegebe | Chenin Blanc |
| | Sylvaner | Cinsault |
| | Wurzer | Clairette |
| | | Dattier de Bevrouth |
| | | Doradillo |
| | | Forta |
| | | Merlot |
| | | Nobling |
| | | Rkaziteli |
| | | Ruländer |
| | | Sauvignon Blanc |
| | | Semillon |
| | | Shiraz |
| | | Sultana |
| | | Terret |
| | | Trebbiano |
| | | Verdelho |
| | | Viognier |

Tableau 1 : Classification de quelques cépages de *Vitis vinifera* basée sur la composition en monoterpènes (Mateo and Jiménez, 2000).

(b) Rotundone

Des études ont montré que certains sesquiterpènes (15 atomes de carbones) ont une forte contribution à l'arôme du vin comme, par exemple, la rotundone (Allamy, 2015; Coelho, 2006; Parker *et al.*, 2007; Schreier *et al.*, 1976). Cette dernière est responsable d'odeurs de poivre noir, grain de poivre ou encore de notes épicées. Elle possède un seuil de perception olfactif de l'ordre de 16 ng L⁻¹ dans le vin rouge et de 8 ng L⁻¹ dans l'eau. Elle est notamment responsable du caractère poivré des vins de Syrah (Wood *et al.*, 2008).

(c) Méthoxyypyrazines (MPs)

Les MPs sont une catégorie particulière de pyrazines retrouvée uniquement chez les végétaux. Des expériences de greffage ont montré que la production d'IBMP dans les baies dépend du génotype du fruit et non du génotype du porte-greffe ce qui suggère que ce composé n'est pas transporté à partir de tissus végétatifs associés au porte-greffe (Koch *et al.*, 2010). Les MPs les plus importantes identifiées dans le vin sont l'IPMP, la sBMP et l'IBMP

qui sont associées au caractère végétal du vin et respectivement responsables des arômes de type asperge, pois et poivron vert du vin (Annexe 1). Les MPs contribuent aux caractéristiques sensorielles végétales des vins issus de Cabernet-Sauvignon, de ses parents, Cabernet Franc et Sauvignon blanc (Bowers and Meredith, 1997) et d'un petit nombre d'autres cépages comme le Merlot (Hashizume *et al.*, 2001a) ou la Carménère (Belancic and Agosin, 2007). Le caractère végétal associé à la présence de MPs serait perçu de manière négative dans les vins rouges, et contribuerait positivement jusqu'à un certain seuil au caractère variétal des vins néozélandais issus de Sauvignon blanc. Bien que les trois MPs aient été détectées dans la baie, l'IBMP est la MP majoritaire. Son seuil de perception se situe entre 4 et 8 ng L⁻¹ dans le vin blanc et est de 15 ng L⁻¹ dans le vin rouge (Allen *et al.*, 1991; Roujou de Boubée *et al.*, 2000). La teneur en MPs dans le vin serait directement corrélée à celle dans les baies à la récolte (Bogart and Bisson, 2006).

Les MPs sont synthétisées au cours de la phase de croissance herbacée de la baie, avant la véraison. Elles atteignent un pic d'accumulation à la fermeture de la grappe et sont dégradées pendant la phase de maturation de la baie (Dunlevy *et al.*, 2010; Guillaumie *et al.*, 2013; Ryona *et al.*, 2010), comme illustré Figure 14.

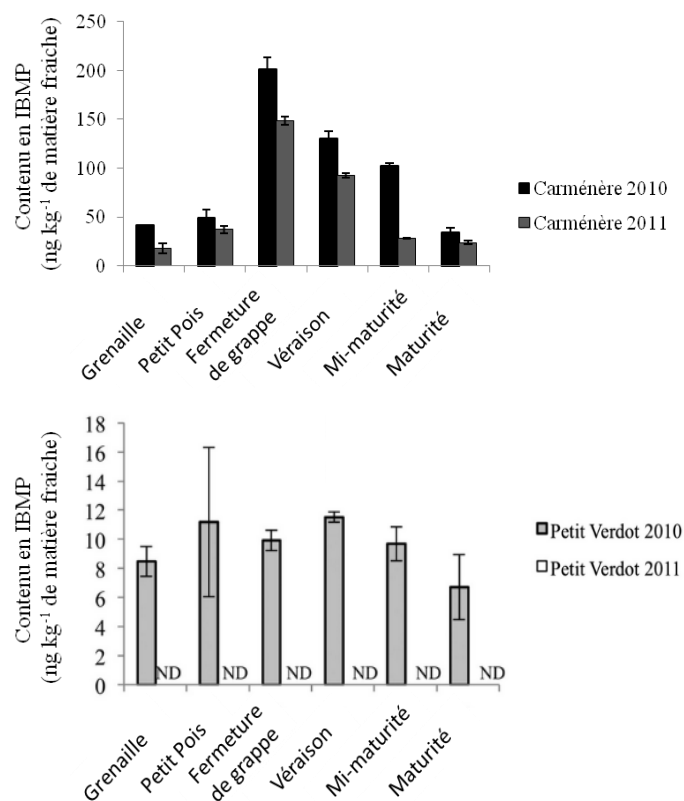


Figure 14 : Contenu en IBMP au cours du développement et de la maturation des baies des cépages Carménère et Petit Verdot (d'après (Guillaumie *et al.*, 2013).

Carménère et Petit Verdot sont respectivement considérés comme cépage fort et faible producteur d'IBMP.

IV. Voie de biosynthèse des méthoxy-pyrazines

La voie de biosynthèse hypothétique des MP chez la vigne est inspirée de la biosynthèse d'isopropyl méthoxy-pyrazines chez les bactéries *Pseudomonas taetrolens* et *Pseudomonas perolens* (Cheng *et al.*, 1991; Gallois *et al.*, 1988).

Elle débiterait par une amidation d'un acide aminé approprié (leucine ou valine selon les MP) suivie d'une condensation avec du glyoxal (dialdéhyde) ou une forme plus complexe comme le méthylglyoxal par exemple. Enfin, la méthylation de l'IBHP conduit à la synthèse de l'IBMP (Hashizume *et al.*, 2001a; Hashizume *et al.*, 2001b; Murray and Whitfield, 1975). Ainsi, le précurseur initial de l'IBMP serait la leucine. La totalité des étapes de cette voie de biosynthèse n'est pas encore établie. Seule la dernière étape a été caractérisée chez la vigne et est maintenant connue comme étant réalisée par une *O*-méthyltransférase (OMT) codée par le gène *VviOMT3*, gène présent sur le chromosome 3 du génome de la vigne (Dunlevy *et al.*, 2013a; Guillaumie *et al.*, 2013).

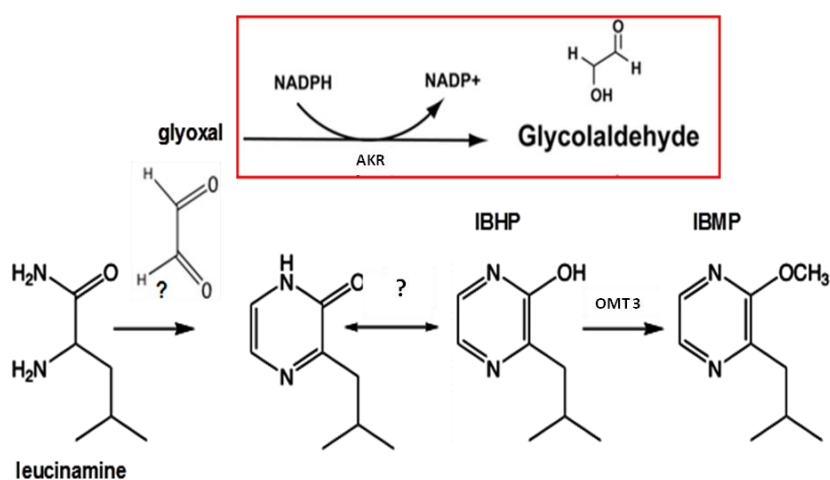


Figure 15 : Voie de biosynthèse hypothétique de l'IBMP adaptée de Guillaumie *et al.*, (2013)

IBHP, 2-hydroxy-3-isobutylpyrazine; IBMP, 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine; AKR, alkénal 2-réductase; OMT, *O*-méthyltransférase.

VviOMT3 a été identifié par une approche associant génétique quantitative et transcriptomique à haut débit (Guillaumie *et al.*, 2013). Lors de cette étude, un autre gène *VviAKR*, codant une alkénal 2-réductase non encore caractérisée de manière fonctionnelle, et situé sur le chromosome 5 de la vigne à l'aplomb d'un locus à effet quantitatif (QTL) de teneur en IBMP a été identifié. L'hypothèse a été formulée que ce gène pourrait intervenir

de manière précoce dans la voie de biosynthèse de l'IBMP. Une voie de biosynthèse potentielle a ainsi été imaginée (Figure 16, encadré rouge). Le glyoxal, ou une forme alkénal plus complexe issue de la peroxydation des lipides (Figure 16), nécessaire à la synthèse de l'IBMP serait dans le cas de cette hypothèse utilisé comme substrat par une alkénal 2-réductase empêchant ainsi la synthèse de l'IBMP aux sein des cépages faibles producteurs de MPs. Cette hypothèse pourrait expliquer la différence de production de MP chez les cépages forts ou faibles producteurs d'IBMP et reste à être validée par le biais de la caractérisation fonctionnelle du gène *VviAKR* qui donnera lieu au chapitre 4 de ce manuscrit.

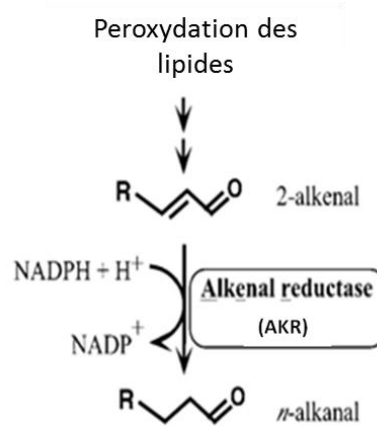


Figure 16 : Réduction sélective de la liaison α,β -insaturée du 2-alkénal catalysée par une alkénal 2-réductase (AKR)

Les Alkénal 2-réductases (AKR) constituent une superfamille de protéines conservées au cours de l'évolution de la bactérie à l'homme (Hyndman *et al.*, 2003; Jez *et al.*, 1997). Les AKR sont des oxidoréductases NAD(P)H dépendante réduisant préférentiellement les aldéhydes et les cétones puis dans un second temps les alcools (Flynn, 1982; Penning, 2004). Elles présentent une structure $(\alpha,\beta)^8$ caractéristique de cette famille d'enzymes (Figure 17).

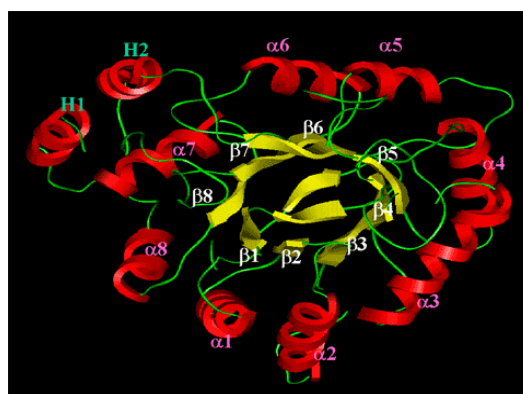


Figure 17 : Structure tridimensionnelle en $(\alpha,\beta)^8$ de la famille des AKR (Perelman School of Medicin)

Elles sont le plus souvent rencontrées sous forme monomérique exception faite de la famille AKR7 qui est constituée par les formes dimériques d'AKR des mammifères et de la xylose réductase de la levure (Kavanagh *et al.*, 2002; Kozma *et al.*, 2002).

Largement étudiées au niveau humain et animal, les AKR ont un rôle bien défini de détoxification d'un grand nombre de produits pharmaceutiques ou médicamenteux mais aussi vis-à-vis de xénobiotiques (Barski *et al.*, 2008). Les AKR étant connues pour leurs propriétés détoxifiantes (Jin and Penning, 2007), il peut être supposé qu'elles interviendraient chez les plantes en réponse aux stress.

Chez les végétaux, les AKR constituent une famille à part entière nommée AKR4. Cependant quelques AKR de plantes font partie de la famille AKR2 ou encore AKR6 (Mindnich and Penning, 2009). Différents substrats ont pu être associés aux membres de cette famille d'enzymes tels que la chalcone (CHR) pour les légumineuses (Ayabe S. *et al.*, 1988), la codéinone chez *Papaver somniferum* (Unterlinner *et al.*, 1999), et l'acide D-galacturonique pour la fraise (Agius *et al.*, 2003).

Les enzymes AKR4C14 du riz (Narawongsanont *et al.*, 2012) et AKR4C9 et AKR4C10 d'*Arabidopsis thaliana* (Simpson *et al.*, 2009) ont été caractérisées de manière fonctionnelle. Elles sont capables de réduire de nombreux substrats de façon plus ou moins spécifique tel que le méthylglyoxal, le trans-2-hexenal, le glyceraldéhyde, le xylose, le glutaraldéhyde... De plus, la structure tridimensionnelle de AAB41555.1, AKR de luzerne, capable de lier la CHR au cofacteur NADPH₂ a été rapportée (Bomati *et al.*, 2005). Ainsi, l'ensemble de ces structures peuvent servir de modèle pour les autres membres de la famille des AKR4.

V. Objectifs de ma thèse

Pour rappel, ma thèse s'articule autour de deux projets principaux.

Le premier vise à déboucher sur des stratégies d'adaptation à court et moyen terme afin de limiter les effets du changement climatique dont les problématiques viticoles sont entre autres l'augmentation du taux d'alcool des vins, et un découplage des maturités technologique, phénolique et aromatique pouvant impacter la typicité des vins obtenus.

Pour répondre à cette problématique, nous nous sommes appuyées sur les connaissances déjà acquises et précédemment détaillées dans l'état de l'art sur l'effet de la modification du rapport source carboné (feuilles) / puits (fruits).

Les différents verrous scientifiques identifiés mettent en évidence un manque de données complètes et obtenues au sein d'une même expérimentation, sur une même série de plantes et alliant à la fois analyses agronomiques, analytiques, transcriptomiques et sensorielles.

Par ailleurs, il a été établi qu'une diminution de la concentration en anthocyanes est positivement corrélée à la diminution de la concentration en sucres lors de la réduction de la surface foliaire. Or comment réduire la concentration en sucres sans réduire celle des anthocyanes nécessaires à la qualité organoleptique des vins ?

Ainsi notre hypothèse de travail est de coupler l'utilisation d'hormones exogènes telle que l'acide abscissique (ABA), connu pour être impliqué dans les voies de biosynthèse des sucres et des anthocyanes, à la réduction du rapport feuilles/fruit afin de voir l'impact sur les concentrations en métabolites primaires et secondaires de la baie et la typicité du vin en résultant. L'effet de l'utilisation exogène d'acide abscissique (ABA) sur la régulation de la biosynthèse et de l'accumulation des anthocyanes au cours de la maturation des baies de raisin pourra ainsi être étudié tout comme les relations croisées entre acide abscissique et voie de biosynthèse des sucres.

Au final, notre objectif est de déterminer le rapport feuilles/fruit optimum afin de réduire la concentration en sucres des baies et donc le degré d'alcool potentiel des vins sans pour autant trop modifier les qualités organoleptiques des baies de *Vitis vinifera* (concentration

en anthocyanes par exemple connu pour être carbone dépendant) et ceci de manière couplée ou non à l'ajout d'acide abscissique (ABA).

Pour répondre à cet objectif de façon originale nous avons couplé différentes approches agronomique, analytique, transcriptomique et sensorielle. Un comparatif a été effectué entre plusieurs modalités de rapport feuilles/fruits, elles-mêmes réalisées à différents stades de développement des baies. Cette étude a été réalisée au cours de deux millésimes en conditions semi-contrôlées en serre sur boutures fructifères et au vignoble au sein d'une parcelle de production à Bordeaux. Le cépage Cabernet-Sauvignon a été utilisé dans les deux cas comme modèle d'étude. Des microvinifications ont été aussi réalisées afin d'étudier l'impact de ces pratiques sur la typicité du vin. Cette part de mon travail de thèse sera plus particulièrement détaillée au sein des chapitres 2 et 3 de ce manuscrit.

Ainsi nous avons pu :

- 1) analyser de façon fine la réponse de la composition des baies (sucres, acides organiques, acides aminés, composés phénoliques, composés aromatiques) aux manipulations du rapport source/puits couplées ou non à l'utilisation d'acide abscissique

- 2) étudier les mécanismes physiologiques et moléculaires sous-tendant la sensibilité de la composition de la baie de raisin (sucres, acides organiques, acides aminés, polyphénols, composés aromatiques) aux modifications du rapport feuilles/fruits couplées ou non à l'utilisation d'acide abscissique et notamment par une étude du transcriptome global de la baie

- 3) améliorer les connaissances sur gènes et/ou enzymes clefs associés à la composition de la baie de raisin et impliqués dans la réponse de la plante aux pratiques culturales que sont la modulation du rapport sources/puits couplée ou non à l'utilisation d'acide abscissique.

- 4) évaluer l'impact de la modulation du rapport feuilles/fruits couplée ou non à l'utilisation d'acide abscissique sur la typicité du vin.

Mon second projet de thèse a pour objectif de poursuivre les travaux de caractérisation de la voie de biosynthèse des méthoxypyrazines impliquées dans l'élaboration du caractère végétal des raisins et du vin.

Cette étude vise à répondre à plusieurs objectifs :

1) caractériser de manière fonctionnelle le gène *VviAKR*

2) valider ou non l'implication potentielle de ce gène dans la voie de biosynthèse des méthoxypyrazines

Cette étude a été réalisée par le biais d'approches de génomique fonctionnelle à savoir clonage des allèles de *VviAKR*, production des protéines recombinantes associées et dosages enzymatiques visant à déterminer le substrat préférentiel de cette enzyme. Une co-expression de *VviOMT3* et *VviAKR* en système hétérologue chez *E. coli* ainsi qu'une sur-expression de *VviAKR* en système homologue de type "hairy roots" a aussi été réalisée afin de fournir des informations sur l'implication ou non de *VviAKR* dans la voie de biosynthèses des MPs.

Cette part de mon travail de thèse donnera lieu au chapitre 4 de ce manuscrit.

CHAPITRE II: Minimiser les effets du changement climatique sur la composition biochimique et le transcriptome de la baie par management de la canopée

Le chapitre 2 de ce manuscrit se compose d'un projet de publication pour BMC Plant Biology. Cet article présente l'impact de la modification du ratio Fe/Fr chez *Vitis vinifera* cv. Cabernet-sauvignon en milieu semi-contrôlé sur (i) la composition biochimique de la baie de raisin en métabolites primaires et secondaires ainsi que sur (ii) le transcriptome de la baie de raisin. Ce second point permettra l'étude de l'impact transcriptomique de la modulation du ratio Fe/Fr de façon ciblée au cours du développement de la baie aux travers des analyses de qPCR en temps réel de type Fluidigm effectuées sur les millésimes 2015 et 2016 ; et de façon plus large à mi-véraison de part une analyse du transcriptome global de la baie à l'aide d'une approche de type RNAseq réalisée sur le millésime 2016.

Cet article permet de conclure sur l'intérêt de l'effeuillage dans la lutte contre le réchauffement climatique. En effet, modifier le ratio Fe/Fr en diminuant le nombre de feuilles restantes par grappe permet de retarder la maturation des baies de raisin de façon significative à partir de 6F restantes par grappe.

De plus, ce travail a permis de confirmer l'implication de certains gènes dans le métabolisme du carbone et énergétique tels que la fructose 1,6-bisphosphatase, la phosphoribulokinase, la famille de gènes *SWEET*, mais aussi des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des anthocyanes (*VviF3'H* et *VviUFGT*).

Parallèlement à cela, nous avons pu nous rendre compte que les boutures fructifères sont un outil intéressant et efficace pour suivre le métabolisme des méthoxypyrazines ainsi que celui des précurseurs de thiols au sein de la baie de raisin. Leurs profils d'accumulation en serre, en milieu semi-contrôlé suivent les mêmes profils d'accumulation que ceux observés au vignoble sur plantes greffées.

Title page:

Mitigating the effects of climate change on grape berry composition and transcriptome by canopy management

E. Brouard ^{1,*}, L. Wang ^{1,*}, C. Thibon², C. Keime³, G. Hilbert¹, R. Viannais ¹, I Merlin¹, C. Renaud ¹, C. Trossat-Magnin¹, Y. Gibon^{4,5}, S. Delrot¹, P. Darriet², E. Gomès¹, Z. Dai¹, S. Guillaumie¹.

¹ : UMR1287 Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne, Bordeaux Sciences Agro, INRA, Université de Bordeaux, ISVV, 33882 Villenave d'Ornon ;

² : EA 4577/USC 1366 Oenologie, Université de Bordeaux, INRA, ISVV, 33882 Villenave d'Ornon;

³ : Univ. de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBGMC), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U 964, Centre National de Recherche Scientifique UMR 7104, 67404 Illkirch, France.

⁴ : UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie, INRA, Université de Bordeaux, 33882 Villenave d'Ornon;

⁵ : Plateforme Métabolome du Centre de Génomique Fonctionnelle Bordeaux, MetaboHUB, INRA, 33882 Villenave d'Ornon

Keywords

Vitis vinifera cv. Cabernet-Sauvignon, canopy management, leaf-to-fruit ratio, berry composition, Fluidigm real-time PCR, RNAseq

I-Background

It is well known that global warming will lead to an increase in temperature of about 5°C by the end of the century [1]. This temperature increase already impacts the viticulture by changing grapevine phenology and physiology [2-4]. These modifications will consequently affect berry composition as well as wine quality and typicity, challenging the sustainability of viticulture. To mitigate the effect of global climate change on viticulture, various strategies are possible in more or less long terms. In the long term, the adaptation of the plant material and in particular the modification of the varieties is a major tool to reach this objective [4]. Another solution is to move the vineyards in cooler regions, or higher areas, in terms of altitude [5]. In the short term, vineyard managements strategies also offer a range of possible changes at more short term, for example the protection of clusters or the manipulation of their microclimate [6].

For example, modulation of leaf-to-fruit ratio (LFR) can be easily implemented at various time between pre-bloom and veraison, with different consequences. As described by Pastore *et al.* [7], the elimination of basal leaves before flowering significantly affects the source-sink balance, reducing yields and improving berry quality of berries in many cultivars and viticultural environments [8-11]. These responses reflect the strict association between fruit set and the number of source leaves on the shoot during flowering [12]. Removal of pre-veraison basal leaves reduces the number and rate of growth of berries, reducing yields and allowing regrowth of leaves on secondary shoots during the same growing season, resulting in a complex realignment of growth and physiological parameters [13]. The biosynthesis of flavonoids in berries is one of the processes that is the most affected by defoliation, but the result seems to depend on the timing of defoliation and genotype. Early removal of basal leaves (5-6 leaves removed), as well as pre-blooming or fruit set leaf removal increases anthocyanin content [10, 11, 14]. It is possible that the microclimate of the fruits is improved by the defoliation. The fact that defoliation is applied early in the season and only on basal leaves would lead to more beneficial light conditions, while only slightly increasing the temperature of the berries.

The photosynthetic activity of the basal leaves at veraison is weaker than the one that of the intermediate and apical leaves, so that defoliation at this stage has a strong impact on

cluster exposure to light and temperature but an impact limited on source-sink equilibrium [11]. In fact, during a moderate leaf stripping, the elimination of 6 pre-veraison basal leaves showed no impact on anthocyanins and sugars but an increase in the concentration of flavonol [7]. However, during a drastic (basal and intermediate leaves removal) and late (pre-veraison) leaf removal, a significant impact on the accumulation of total sugars and anthocyanins during ripening of the grapes could be noted [15, 16]. Vines with a low LFR ratio show a much lower ratio of anthocyanins to sugars compared to vines with a high LFR [15]. In addition, sugars appear to be more affected by carbon source limitation than organic acids [15, 17]. Modification of cluster microclimate may also cause a decrease in the concentration of plant aromas due in part to the presence of methoxypyrazines (MPs), since their concentration decreases over maturity, when clusters are more exposed to the sun [18, 19]. Thus, the amount of molecules such as 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP), 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPMP) and 3-sec-butyl-2-methoxypyrazine (SBMP), which are undesirable aromas in red wines, appears to decrease by increasing exposure to light [20]. In addition, early leaf stripping before or after bunch closure (period of maximum MP accumulation) may be a solution considered to limit their accumulation.

Studies conducted to date have focused mainly on a few major components of the harvest quality, namely the yield, the sugar content and the total concentration of organic acids, and paid little attention to the secondary metabolites of interest for the quality of the wines, i.e. (polyphenols, aromas and aroma precursors) [17]. In addition, only a small number of LFR values have been tested [21]. Although some studies have clearly shown an effect of leaf area decrease on berry sugar levels, the effect on anthocyanins is less clear [2, 22]. Finally, the response of amino acid metabolism, which is an integral part of the oenological potential of berries, have not been studied in depth.

The aim of this study was to investigate the effect of a decrease of LFR on soluble sugars, organic acids, anthocyanins, amino acids, MPs and thiol precursor contents in Cabernet-Sauvignon fruiting-cuttings under semi-controlled greenhouse culture conditions. Both metabolite profiling and transcriptome remodelling have been analysed to provide a comprehensive view of the effects of LFR modulation on berry biochemical composition.

II-Methods

A) Plant material and sampling

The experimental study was conducted in 2015 and 2016 on fruiting-cuttings in Villenave d'Ornon (France). Fruiting-cuttings made of one vertical shoot bearing one grape cluster of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon were prepared as described in Mullins and Rajasekaran [23] and grown in a naturally lighted and semi-controlled greenhouse. Environmental conditions in greenhouse i.e. air temperature and hygrometry were recorded hourly throughout the experiment (Supplementary Fig. 1 and 2).

In 2015, 48 homogeneous fruiting-cuttings were divided in four leaf-to-fruit ratios (LFRs) at 20 days after flowering (DAF). These four treatments were six, eight, ten and twelve leaves conserved per cluster per vine (LC) and named for the rest of this study as 6LC, 8LC, 10LC and 12LC. The 12LC treatment was considered as the control treatment. We pre-treated all the plants at twelve leaves, and then the removed leaves were the basal ones from the bunch to the top depending of each treatment. In 2016, we had one more LFR which was two LC (2LC). The remaining leaves and all secondary shoots were removed over the measurement period for each year. The plants were randomly assigned to three blocks of each treatment, and each block was composed of four plants.

Berries were sampled six times at 20, 34, 52, 64, 85 and 96 DAF in 2015 and at 27, 41, 59, 74, 90 and 101 DAF in 2016. Mid-veraison was determined as the time when 50 % of the berries were soft and corresponded to 52 and 59 DAF in 2015 and 2016 respectively. At each sampling date, between 15 and 30 berries were sampled in randomized way from the top, the middle and the bottom of the four clusters which represented one biological replicate. Three biological replicates were obtained for each treatment at each sampling date. At maturity (96 and 101 DAF in 2015 and 2016, respectively with a Brix degree of 12LC control treatment $\geq 25^\circ$), all remaining berries were sampled.

All berries were frozen immediately in liquid nitrogen, counted and weighed. They were after ground and stored at -80°C until further analysis.

B) Thermal imaging of the bunch zone

The bunch zone temperature of each treatment was evaluated during the development and maturation of the berries by the use of an infra-red thermal imaging camera FLIR T450sc (FLIR[®] Systems). The thermal images obtained were analysed according to the manufacturer's instructions by using FLIR TOOLS.

C) Leaf area measurement

All leaves were harvested at maturity (96 DAF in 2015 and 101 DAF in 2016) and a measure of the leaf area was made for the different treatments, by relating the dry mass of leaves to a surface in cm² determined for each treatment.

D) Berry biochemical composition

The primary and secondary metabolite content of harvested berries was evaluated.

- Sugars, organic acids and amino acids

Aliquots of 500 mg fresh weight (FW) of frozen powdered berry material were used to perform the extraction of primary metabolites according to Torres and al. (2017) [24] protocol with minor modifications. The extractions of primary metabolites were done by 2mL of 80% ethanol at 80°C for 15 min, centrifuged 10 min at 5000 g and followed to another extraction using 2 mL of 50% ethanol. The extracts were respectively, dried in Speed-Vac, and re-dissolved in ultrapure water and were used for determinations of sugars, organic acids and amino acids.

Glucose and fructose contents were measured enzymatically with an automated micro-plate reader (Elx800UV, Biotek Instruments Inc.) using the Glucose/Fructose kit from BioSenTec (Torres and al 2017) [24]. Malic acid was determined using an enzyme-coupled spectrophotometric method that measures the change in absorbance at 340 nm from the reduction of NAD⁺ to NADH. Tartaric acid was assessed by using a colorimetric method based on ammonium vanadate reactions. Both compounds were quantified with a Bran and Luebbe TRAACS 800 autoanalyzer (Bran & Luebbe) according to Torres et al. (2017) [24].

Free amino acids were measured according to Torres and al (2017) after derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl-carbamate (AccQ-Tag derivatization reagent,

Waters,) according to Hilbert and al. 2003 [24, 25]. Amino acids were analysed using an UltiMate 3000 UHPLC system (Thermo Electron SAS) equipped with an FLD-3000 Fluorescence Detector (Thermo Electron SAS). Separation was performed on a AccQ•Tag Ultra column, 2.1 x 100 mm, 1.7 μm (Waters) at 37°C with elution at 0.5 ml min⁻¹ (eluent A, sodium acetate buffer, 140mM at pH 5.7 ; eluent B, acetonitrile ; eluent C, water) according to the gradient described by Torres et al. (2017) [24]. Chromatograms corresponding to excitation at 250 nm and emission at 395 nm were recorded. To maintain consistent retention time and a stable baseline, a control was performed before each run of 18 samples. Chromeleon software, version 7.1 (Thermo Electron SAS) was used to calculate peak area. A standard of 20 amino acids (Alanine, Arginine, Aspartic acid, Asparagine, Cysteine, GABA, Glycine, Glutamic acid, Glutamine, Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Proline, Serine, Threonine, Tyrosine, Valine) purchased from Sigma was used after the control and in the middle of each run to calibrate amino acid quantification.

- Anthocyanins

Another aliquot of 500 mg FW of frozen powdered berry material were lyophilized during 72h. The extraction was done using 1 mL of methanol, 0.1% HCl (v/v). Extracts were filtered through a 0.45 μm polypropylene syringe filter (Pall Gelman Corp.) for UHPLC analysis. Each individual anthocyanin-3-glucoside forms and acetyl derivatives of delphinidin, cyanidin, peonidin, petunidin and malvidin, and *p*-coumaroyl derivatives of delphinidin, cyanidin, peonidin and petunidin were analysed as described in Torres et al. (2017) and Acevedo De la Cruz and al. (2012) using an UltiMate 3000 UHPLC system (Thermo Electron SAS) equipped with DAD-3000 diode array detector operating at 520 nm and at 360 nm (Thermo Electron SAS) [24, 26]. Separation was performed on a Synchronis C18, 2.1 x 100 mm, 1.7 μm Column (Thermo Fisher Scientific) at 25°C with elution at 0.368 ml min⁻¹ according to the following gradient (v/v): 0 min 92.2% A 7.8% B, 9.6 min 73% A 27% B, 14.1 min 70 % A 30% B, 14.8 min 92.2% A 7.8% B (eluent A, water and formic acid, 90/10 v/v; eluent B, acetonitrile). Identification and peak assignment of phenolic compounds were based on comparison of their retention times and UV-Vis spectrometric data with that of pure standards (Extrasynthese). Data processing was carried out by Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS) software, version 7.1 (Thermo Electron SAS). The concentration of individual

flavonoids was calculated in milligrams per gram (mg g^{-1}) of dry weight (DM) using malvidin-3-O-glucoside as external standard for all the quantified anthocyanins (at 520 nm).

- Methoxypyrazines (MP)

MP were quantified in whole grape berries by a stable isotope dilution assay using headspace solid phase microextraction coupled to a gas chromatograph and a mass spectrometer (SIDA-SPME-GC-MS) according to Helwi et al. (2015) [27]. An aliquot of 1 g FW of frozen powdered berry material were dissolved in 6 mL of deionized water into brown 20 mL SPME vials along with 4 g of sodium chloride (NaCl). An internal standard, $^2\text{H}_3$ -IBMP, was also added to yield a final concentration of 100 ng L^{-1} . Samples were submitted to agitation (500 rpm for 5 s, stop for 2 s) for 5 min at 50°C and then to the extraction with the SPME fiber for 40 min at 50°C . A three-phase divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane fiber (DVB/CAR/PDMS 50/30 μm thickness, 24 gauge, Supelco Bellefonte, PA, USA) was inserted, and the vial was agitated at 500 rpm for 40 min at 50°C . SPME injection was then implemented in splitless mode for 10 min with a desorption temperature of 240°C .

As described by Helwi et al. (2015), an automated GC-MS analysis was carried out on a 6890 N gas chromatograph (Agilent Technologies) equipped with a Combi PAL autosampler (CTC Analytics) [27]. The GC was coupled to an HP 5973N mass selective detector (Agilent Technologies) functioning in electron impact mode at 70 eV. The analyses were performed on a Carbowax 20 M capillary column (BP20, 50 m, 0.25 mm internal diameter, 0.25 μm film thickness, Scientific Glass Engineering).

Helium 6.0 (LINDE) was used as a carrier gas at a flow rate of 0.9 mL min^{-1} . The temperature program was as follows: initial hold for 5 min at 45°C , followed by a 3°C min^{-1} ramp to 140°C and then a ramp at $30^\circ\text{C min}^{-1}$ to 240°C , and a 10 min hold. The injector port was at 240°C .

During the elution of MP, the GC-MS was switched to single-ion monitoring mode and tuned to measure m/z values of 95, 127 and 154 ions for $^2\text{H}_3$ -IBMP, of 94, 124 and 151 ions for IBMP, of 124, 137, 152 ions for IPMP and of 124, 138, 151 ions for SBMP (quantifying ions are underlined). Data processing was carried out by MSD Chemstation software (5973n Data Analysis, Agilent Technologies). Results were reported on a per weight basis of ng per kg of FW.

- Thiols precursors

The extraction and the quantification of 3SH precursors in grape berries were adapted from Helwi et al. (2016) [33]. In brief, the extraction was carried on a mix of 250mg of frozen berry powder by 750 μ L of acidified methanol (99.9% Methanol/0.1% acid formic) containing a final concentration of 100 μ g L⁻¹ of deuterated form of the glutathionylated S-conjugate of 3SH ((3-S-hexan-1-ol)-glutathione-d₃). Analysis was done using an Accela UHPLC (Thermo Fisher Scientific) connected in series to Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with a heated ESI ion source in positive mode. The separation was performed on a Synchronis aQ column (100 \times 2.1 mm i.d., 1.7 μ m, Synchronis aQ, Thermo Scientific) with a flow rate of 300 μ L min⁻¹ of solvent A (0.1 % aqueous formic acid) and solvent B (0.1 % formic acid in acetonitrile).

E) Statistical analysis

All data analysis were conducted with R software [28]. Differences between the treatments were tested for significance by applying the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test (p value < 0.05).

Principal component analysis was conducted on the mean-centered and scaled data in order to investigate the discriminations of the 36 primary and secondary metabolites investigated in our study.

F) Fluidigm real-time PCR quantifications

- RNA extraction

Total RNA of 12LC, 6LC and 2LC berries harvested in 2015 and 2016 were extracted using GenElute™ Total RNA Purification Kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions from around 90mg of ground frozen powdered berries. Only the last five points of the harvest kinetics were used for total RNA extraction. The DNase I treatment and total RNA quantification were performed as mentioned above. 0.5 μ g of DNA-free total RNA was used to synthesize cDNAs using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

- Specific target preamplification

An aliquot of 1.25 μ l of cDNA was pre-amplified in a 5 μ l reaction using the Fluidigm PreAmp Master Mix Kit (Fluidigm Corporation, CA, USA) with a pool of all 95 pairs of gene specific primers at a final concentration of 50 nM per primer. The PCR conditions were 95°C for 2 min, followed by 12 cycles of 95°C (15 sec) and 60°C (4 min). The pre-amplified products were then treated for 30 min at 37°C in the presence of 4 U/ μ l Exonuclease I (New England BioLabs) followed by 15 min at 80°C for enzyme inactivation. After fivefold dilution using DNA suspension buffer (TEKnova), pre-amplified products were stored at -20°C until use for quantitative real time PCR.

- Massive parallel quantitative real time PCR

Real time PCR was carried out with the Fluidigm Biomark HD System using 96.96 Dynamic Array™ IFCs for Gene Expression according to the manufacturer's instructions. Briefly, sample mixtures were prepared by mixing 3.15 μ l of each diluted pre-amplified product with 3.5 μ l of 2X SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX (BioRad) and 0.35 μ l of 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm). In parallel, assay mixtures were prepared by mixing 0.6 μ l of each 50 μ M mixed forward and reverse primers with 3 μ l of 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm) and 2.4 μ l DNA suspension buffer (TEKnova). The dynamic array was first primed with control line fluid and then loaded with sample and assay mixtures using the BioMark IFC Controller HX according to manufacturer's instructions. The array was then transferred in the Biomark HD for 30 cycles of PCR according to the protocol GE Fast 96x96 PCR + Melt v2.pcl. The data were analysed with real-time PCR analysis software in the Biomark HD system using the following parameter settings: Quality Threshold at 0.65, Linear derivative as Baseline Correction Method and Auto (Global) Ct Threshold Method.

- Internal controls and inter-array calibrators for quantitative real time PCR

Each 96x96 Dynamic Array™ interrogates a total of 91 test samples and 5 control samples. These later controls include a no DNA template (NTC) and a reference sample containing a pool of all 269 cDNA samples. The pool was subjected to specific target preamplification, exonuclease treatment and a fivefold dilution as for test samples (dilution 1). Additional serial ½ dilutions were performed in TE buffer pH 8.0 with low EDTA (Invitrogen) plus 0.25%

de Tween 20 (Thermo Scientific Pierce) from dilutions 2 to 8, where dilution 2 correspond to $\frac{1}{2}$ of dilution 1, dilution 3 to $\frac{1}{4}$ of dilution 1... The 8 dilutions were loaded on array 1 while, arrays 2 received only dilution 1 to 4. This reference sample was used as inter-array calibrators for compensation of signal variations between Biomark HD runs.

- Data normalization and calculation of delta Ct

The measurement Ct values obtained as output of the Fluidigm software were normalized and delta Ct values were calculated for further analyses. Then the normalized relative quantity was calculated based on Hellemans et al. 2006 [29].

G) RNA-seq analysis

- RNA extraction

Total RNA of 12LC, 6LC and 2LC sampled berries, harvested at mid-veraison (59 DAF) in 2016, were extracted according to the procedure described by Reid et al. (2006) [30] from 1 g of ground frozen. Samples Total RNAs were treated by a DNase I according to the manufacturer's instructions (Ambion TURBO DNA-Free DNase, Life technologies) to remove all traces of genomics DNA. Total RNAs were quantified using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific) and checked for integrity on a 1.8% agarose gel.

- RNA-seq library construction and sequencing

RNA-Seq libraries were generated from 500 ng of total RNA using TruSeq Stranded mRNA LT Sample Preparation Kit (Illumina), according to manufacturer's instructions. Briefly, following purification with poly-T oligo attached magnetic beads, the mRNA was fragmented using divalent cations at 94°C for 2 min. The cleaved RNA fragments were copied into first strand cDNA using reverse transcriptase and random primers. Strand specificity was achieved by replacing dTTP with dUTP during second strand cDNA synthesis using DNA Polymerase I and RNase H. Following addition of a single 'A' base and subsequent ligation of the adapter on double stranded cDNA fragments, the products were purified and enriched with PCR (30 sec at 98°C; [10 sec at 98°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 72°C] x 12 cycles; 5 min at 72°C) to create the cDNA library. Surplus PCR primers were further removed by purification using AMPure XP beads (Beckman-Coulter) and the final cDNA libraries were checked for quality and quantified using capillary electrophoresis. These libraries were then sequenced on the

Illumina HiSeq 4000 as paired-end 50 base reads following Illumina's instructions. The RNA-seq library construction and sequencing was realized by the platform "GenomEast" in Strasbourg, France.

- Analysis of Illumina reads

Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Reads were mapped onto the 12X assembly of *Vitis vinifera* genome (http://genomes.cribi.unipd.it/DATA/GENOME_12X/Genome12X.tar.gz) using Tophat v2.0.14 [31] and bowtie2 v2.1.0 aligner (with options : --no-coverage-search --read-realign-edit-dist 0). Gene expression was quantified using HTSeq v0.6.1 [32] with the intersection nonempty mode and CRIBI V1 gene annotations (<http://genomes.cribi.unipd.it/DATA/GFF/V1.tar.gz>). Top Blast hits were downloaded from <http://genomes.cribi.unipd.it/DATA/V2/annotation/TopBlast.txt>.

Normalization and differential gene expression analysis were performed using R and the DESeq2 v1.14.1 Bioconductor library [33]. The gene expression level was calculated by using RPKM (reads per exon kilo base per million mapped sequence reads). Adjustment for multiple testing was performed with the Benjamini and Hochberg (BH) method [34]. The \log_2 (Fold-Change) (LFC) was estimated using the method proposed by Love et al. [33]. To increase the robustness of the data, only the genes that had reads more than 10 at least in one of the libraries were considered for further analyses. Genes of interest were defined by their bin code from Ath_AGI_TAIR9_Jan2010 using MapMan interface [35]. Best identity descriptions of genes were defined from annotation results available on the CRIBI website (<http://genomes.cribi.unipd.it/DATA>). The gene function descriptions and the definition of related pathways used were obtained from WikiGene description and KEGG pathway through Biomart software on the Ensembl Plants website (<https://plants.ensembl.org/biomart/martview>). Differentially expressed genes with a p value ≤ 0.05 and an absolute value of |LFC| ratio ≥ 0.6 were used as the thresholds to judge the significance of gene expression difference. Three biological replicates for each condition were included in this analysis. The RNA-seq dataset was deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO), National Center for Biotechnology Information under the accession number

GSE120359. Venn diagram analysis was done through the Venny 2.1 version (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

III-Results

A) Leaf area

As expected, our treatments gradually reduced the total leaf area per vine in 10LC, 8LC, 6LC and especially in 2LC treatment in comparison to that of the 12LC control in Cabernet-Sauvignon fruiting-cuttings for both years of experiment (Fig. 1).

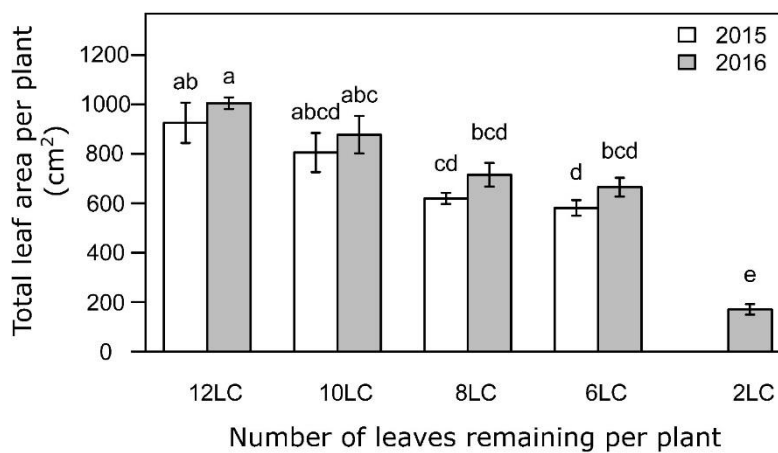


Fig. 1 Effect of source-sink modulation on leaf area of Cabernet-Sauvignon vines for the years 2015 and 2016. All data are presented as mean of three independent biological replicates. Vertical bars indicate standard error (SE). Different letters indicate significant differences according to Anova test results followed by Tukey tests (p value < 0.05), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

B) Temperature control

The bunch zone temperature of each treatment was evaluated by the use of the infra-red thermal imaging camera FLIR T450sc (FLIR® Systems). The results confirmed that leaf removal did not significantly impact the bunch zone temperature (Supplementary Fig. 3) under semi-controlled climate conditions in greenhouse.

C) Berry weight

Modulation of leaf to fruit ratios (LFR) hardly modified berry fresh weight (FW) in both years from 70 DAF until the maturity in comparison to the 12LC control treatment (Fig. 2). In 2015, berry FW of the 8LC and 6LC were significantly lower than the other treatments at mature stage (Fig. 2a). In 2016, the same tendency was visible for the FW of the 2LC treatment (Fig.

2b). The same analyses were performed on berry dry weight (DW) for all treatments. In 2015, results showed that the berry DW of 6LC and 8LC treatments were also significantly lower than the berry DW of the other treatments at mid-veraison (64 DAF) and maturity. In 2016, the berry DW of 2LC was significantly lower than the other treatments throughout berry development, with about 0.05 mg less at maturity.

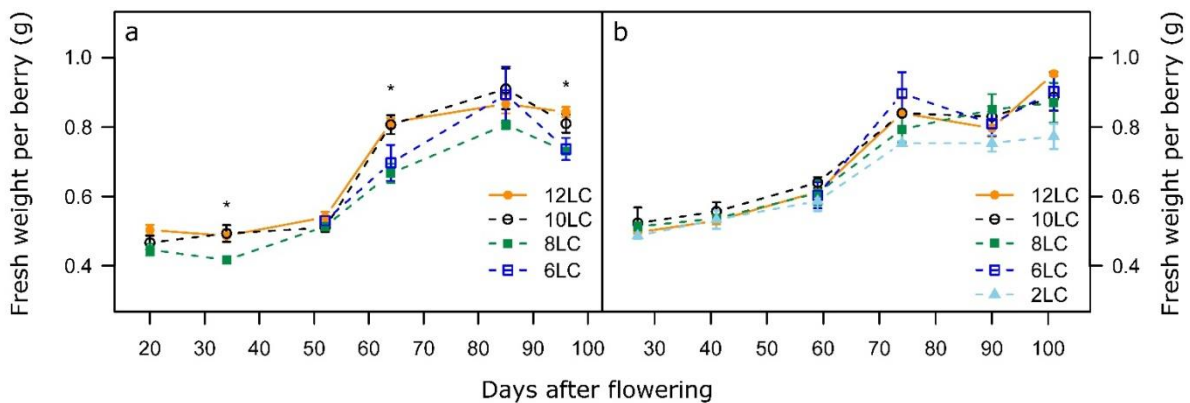


Fig. 2 Effect of source-sink modulation on seasonal berry weight of Cabernet-Sauvignon vines for the years 2015 (a) and 2016 (b).

All data are presented as mean of three independent biological replicates. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

D) Soluble sugar and organic acid contents

The aim of this study was to investigate the impact of LFR on the Cabernet-Sauvignon berry biochemical composition and especially on major primary and secondary metabolites. The amount of soluble sugars observed for 12LC treatment was equivalent to other assays performed in previous studies [15]. The results of the soluble sugar assays did not show significant differences between the different LFR treatments in both vintages. Only 2LC treatment had a significantly lower amount of soluble sugars from 40 DAF to harvest in 2016 (Fig. 3b). At maturity, a loss of 49% of the total amount of sugars was noticed in 2LC treatment in comparison to the control (12LC). These results are in agreement with the results obtained in previous studies [36].

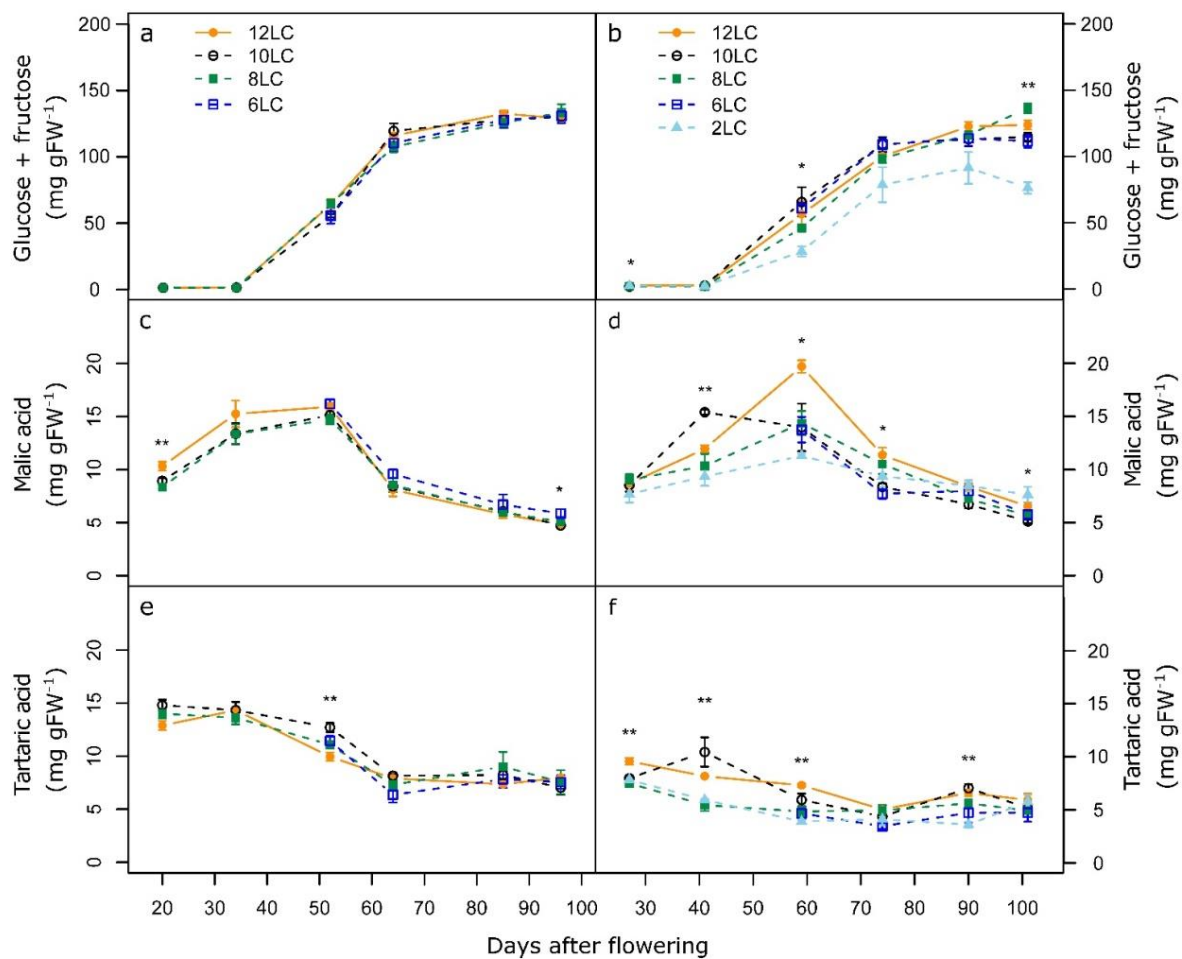


Fig. 3 Effect of source-sink modulation on seasonal soluble sugar (**a-b**) and organic acid (malic (**c-d**) and tartaric (**e-f**) acids) concentrations of Cabernet-Sauvignon vines for the years 2015 (**a, c, d**) and 2016 (**b, d, f**). All data are presented as mean of three independent biological replicates. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05; **, p value < 0.01; ***, p value < 0.001), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

The LFR may be positively related with the accumulation profiles of malic acid. Effectively the concentration of malic acid before veraison in 2015 and 2016 was higher for a high LFR. The degradation of malic acid was faster for a high LFR as PS12LC than for a low LFR as PS2LC. Furthermore, the change in the LFR induces a significant change in the final concentration of malic acid at maturity (Fig. 3c-d). Indeed, a drastic decrease in this ratio (2LC) induces higher malate content after 100 DAF. The tartaric acid concentration was not impacted by the LFR at harvest, but exhibited significant differences at earlier stages, particularly in 2016 (Fig. 3e-f).

E) Anthocyanins content and composition

The results showed anthocyanin synthesis in berries is highly sensitive to LFR variations (Fig. 4a-b). Anthocyanin malvidin-3-glc is predominant as already reported [15]. In addition, the proportion of malvidin-3-glc increased about two times (from 28% to 43%) between the 12LC and 2LC treatments, in relation with the decrease in the number of leaves.

Total anthocyanin results indicated a significant influence of LFRs. Indeed, at maturity the 2LC treatment caused a decrease of 40% compared to the control (12LC) (Fig. 4b). These results confirm the results obtained by Bobeica et al., [15].

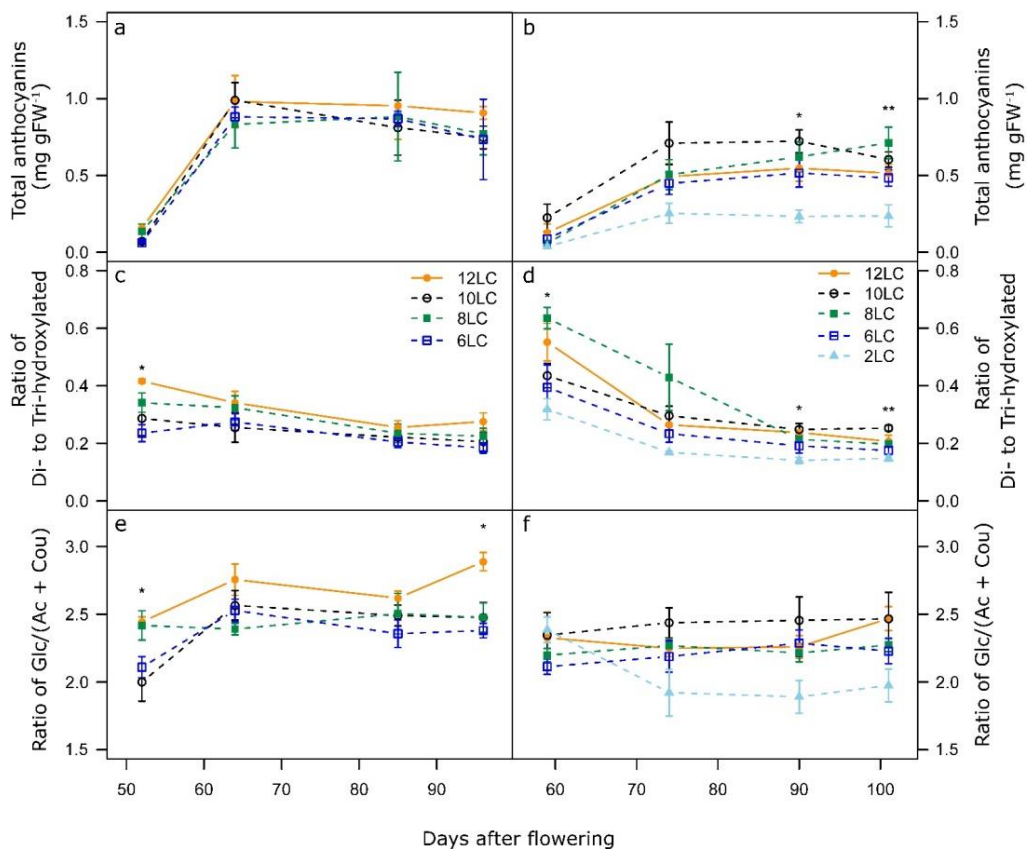


Fig. 4 Effect of source-sink modulation on total anthocyanin concentration and anthocyanin composition of Cabernet-Sauvignon vines for the years 2015 (a, c, e) and 2016 (b, d, f).

All data are presented as mean of three independent biological replicates. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), N=3 biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

In berries, the amount of tri-hydroxylated anthocyanins was higher than the di-hydroxylated ones (data not shown). The comparison of anthocyanins revealed that the treatments caused a greater decrease of the di-hydroxylates than the tri-hydroxylates, which causes a decrease in the ratio with the decrease in the number of leaves, particularly for the 2015 berries (Fig. 4c-d). The proportion of non-acylated anthocyanins (glucosylated forms) on

acylates (coumaroyled and acetylated forms) was also influenced by LFR treatments. In fact, the non-acylated forms decreased more significantly than the acylated forms with the decrease in the number of leaves, which causes an increase in the proportion of acylated anthocyanins and therefore a decrease in the non-acylated / acylated ratio (Fig. 4e-f).

F) Amino acids content

Amino acids analysis showed that individual amino acid exhibited different responses to LFR variations. The amount of some amino acids had a tendency to decrease with increasing LFR such as arginine or glycine (data not shown). In contrast, the proline for example increased with increasing LFR (Fig. 5a-b). In addition, the results indicated that the major amino acid in the berries was the proline which was confirmed in many studies [37, 38]. The final amino acid content is significantly impacted by a modulation of LFR only for the vintage 2016 (Fig. 5d), effectively the concentration of total amino acid is positively related to the number of leaf per bunch (Fig. 5c-d). This result is in agreement with a precedent study done on Riesling on the field [39].

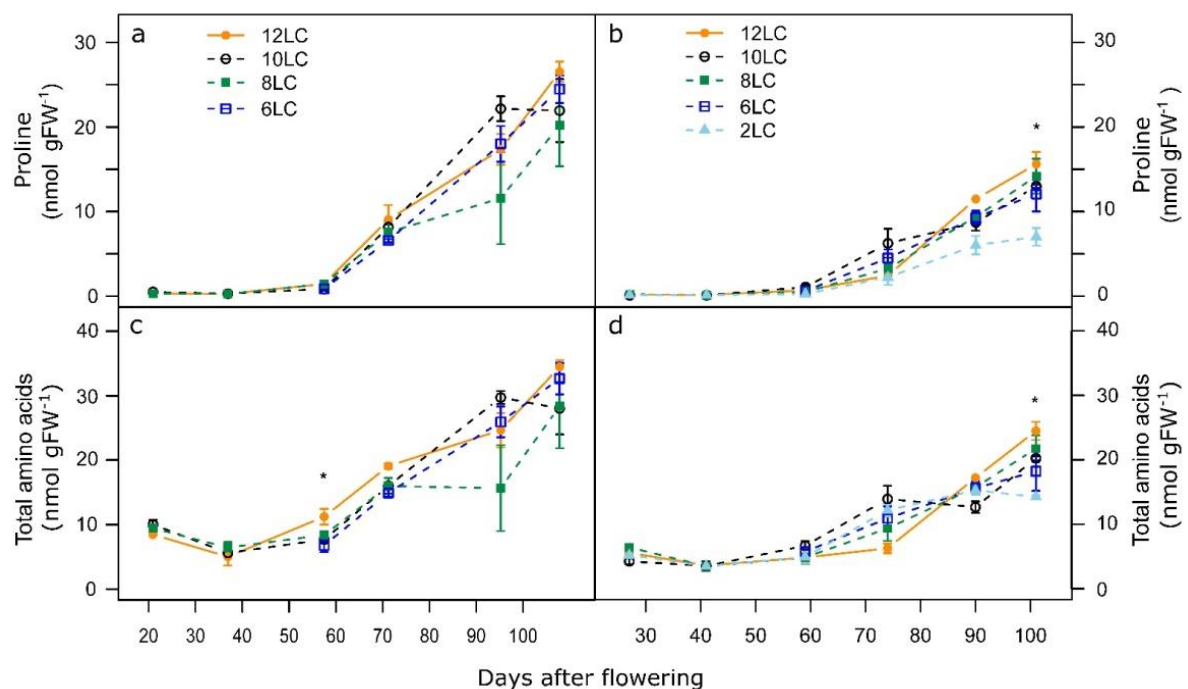


Fig. 5 Effect of source-sink modulation on proline and total amino acids concentration of Cabernet-Sauvignon vines for the years 2015 (a, c) and 2016 (b, d).

All data are presented as mean of three independent biological replicates. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05; **, p value < 0.01; ***, p value < 0.001), N=3 biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

G) Aroma and aroma precursors content

1- IBMP

IBMP is synthesized during the herbaceous growth phase of the berry before veraison. It reaches a peak of accumulation in berries at bunch closure stage and are degraded throughout the maturation phase [40-42], as illustrated in Fig. 6a and b [41]. IBMP concentration largely depends on ambient temperature and bunch exposure to light [43, 44]. Reduced LFR at pea-size stage did not influence the concentration of IBMP, regardless of the berry stage in our experiment (Fig. 6a-b). As we are in a semi-controlled climate condition, the impact of bunch microclimate on IBMP content is limited, which may explain the absence of difference between the different treatments. In this case, we can conclude that modification of carbon supply level do not have significant impact on MPs content in the berry. It is interesting to note that the concentration obtained around 100 DAF was only few ng per berry and was close to the threshold of perception for this molecule in the wine.

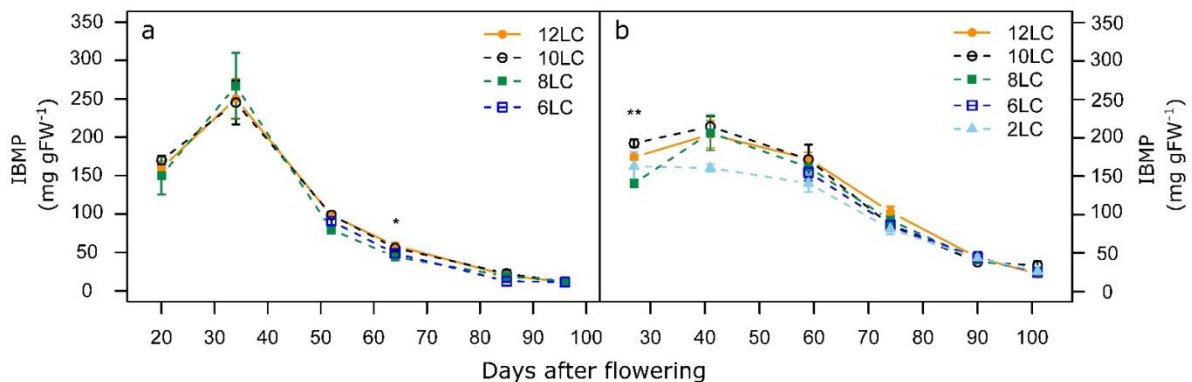


Fig. 6 Effect of source-sink modulation on IBMP concentration of Cabernet-Sauvignon vines for the years 2015 (a) and 2016 (b).

All data are presented as mean of three independent biological replicates. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

2- Thiol precursors

Three forms of thiols precursors were analysed in our study, the S-3-(hexan-1-ol)-glutathion (Pgsh3SH-Al), the S-3-(hexan-1-ol)-glutathion (Pgsh-3SH), and the S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine (Pcys-3SH). The results did not show any significant difference between the different LFR treatments for the two years analysed (data not shown). We can conclude that the contents of thiol precursors in the berry are not dependent on the carbon supply level.

H) Metabolite interactions

To know the different interactions between the metabolites analysed in our study a PCA was done. The percentage of explained variance is 88 and 83% for the three first dimensions for the 2015 and 2016 vintages respectively (data not shown). Berry metabolic contents in the berries can discriminate the different samples per vintage (data not shown) and per stage of development of the berries (Fig. 7a-b). Indeed, a clear discrimination was observed between developmental stages by the first PC. This dimension is positively explained by anthocyanin content, and negatively mostly by IBMP, tartaric acid and tyrosine content (Fig. 7c-d). Berries grown under different LFRs were mainly discriminated by the PC2, which corresponds mostly to the free amino acid content and the type of anthocyanin molecules (Fig. 7c-d).

PCA analyses on samples and variables permit to conclude that berries at the PS and BC stages were richer in IBMP, organic acids and contents of only few amino acids. With the beginning of ripening process, at mid-veraison the berries anthocyanins, sugar and amino acids contents begin to increase whereas the organic acids content begins to decrease. Finally, at mid-maturity and maturity stages, the concentrations in anthocyanins, sugar and amino acids is always increased to reach their maximum levels.

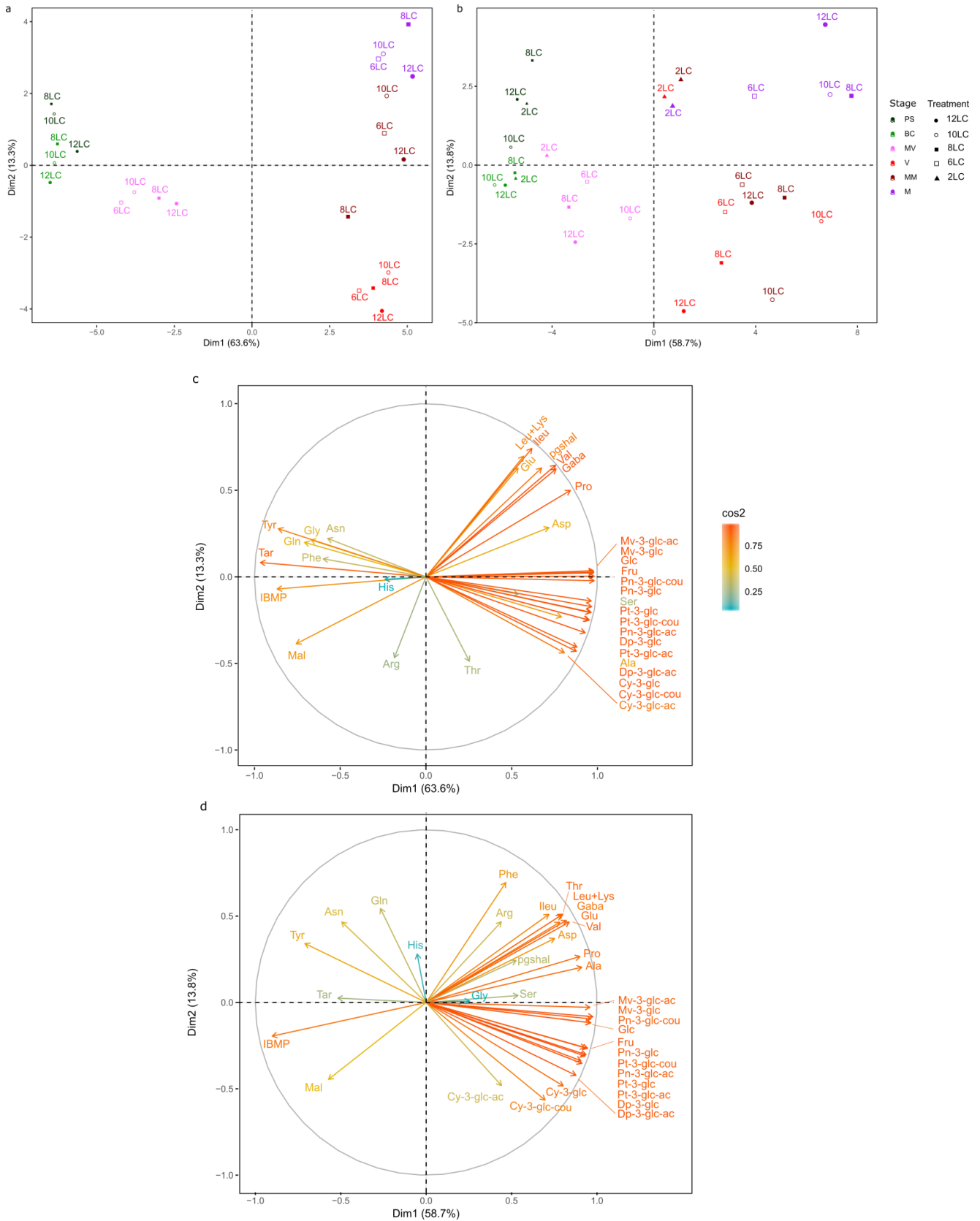


Fig. 7 Score plots of principal component analysis (**a-b**) showing metabolomics discrimination of the harvest kinetics for the years 2015 (**a**) and 2016 (**b**). Loading plots of 36 metabolites (**c-d**) for the first two principal components (PC1 and PC2) for the years 2015 (**c**) and 2016 (**d**).

a-b. The size of the treatment symbols represents the berry size during the growing season. PS, Pea-size; BC, bunch closure; LC, leaves conserved per cluster per vine; MV, 50% veraison; V, 100% veraison; MM, mid-maturity; M, maturity

c-d. The percentages represent the variation explained by each principal component.

Ala, alanine; Arg, arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartic acid; Cy-3-glc, Cyanidin-3-O-glucoside; Cy-3-glc-ac, Cy-3-(6'-acetylglucoside); Cy-3-glc-cou, Cy-3-(6'-p-coumaroylglucoside); Dp-3-glc, Delphinidin-3-O-glucoside; Dp-3-glc-ac, Dp-3-(6'-

acetylglucoside); Fru, fructose; Gaba, γ -aminobutyric acid; Glc, glucose; Gln, glutamine; Glu, glutamic acid; Gly, glycine; His, histidine; IBMP, 3-Isobutyl-2-methoxypprazine; Ileu, isoleucine; Leu+lys, leucine and lysine; Mal, malic acid; Mv-3-glc, Malvidin-3-O-glucoside; Mv-3-glc-ac, Mv-3-(6''-acetylglucoside); pgshal, S-3-(hexan-1-yl)-glutathione; Phe, phenylalanine; Pn-3-glc, Peonidin-3-O-glucoside; Pn-3-glc-ac, Pn-3-(6''-acetylglucoside); Pn-3-glc-cou, Pn-3-(6''-p-coumaroylglucoside); Pro, proline; Pt-3-glc, Petunidin-3-O-glucoside; Pt-3-glc-ac, Pt-3-(6''-acetylglucoside); Pt-3-glc-cou, Pt-3-(6''-p-coumaroylglucoside); Ser, serine; Tar, Tartaric acid; Thr, threonine; Tyr, Tyrosine; Val, valine.

I) Gene expression kinetics in berries submitted to early LFR modulation

To obtain high-quality gene expression profiles, a targeted analysis based on Fluidigm technology was performed on 92 genes known as involved in the biosynthesis pathways of primary and secondary metabolites and detailed in Supplementary Table 1. The obtained data showed the impact of LFR reduction on the expression of 12 genes involved in hormone, sugar, anthocyanin and aroma biosynthesis pathways, respectively.

1- Hormone biosynthesis pathway and signal transduction

Reducing the LFR increased transcript abundance of a key gene of the ABA pathway, *VviNCED2*, with a maximum around mid-veraison at 52 and 59 DAF for 2015 and 2016 respectively (Fig. 8a-b). This gene is known to be up-regulated in case of drought or salt stress [45], so putatively this gene can also be up-regulated after a physiological stress as applied in our study.

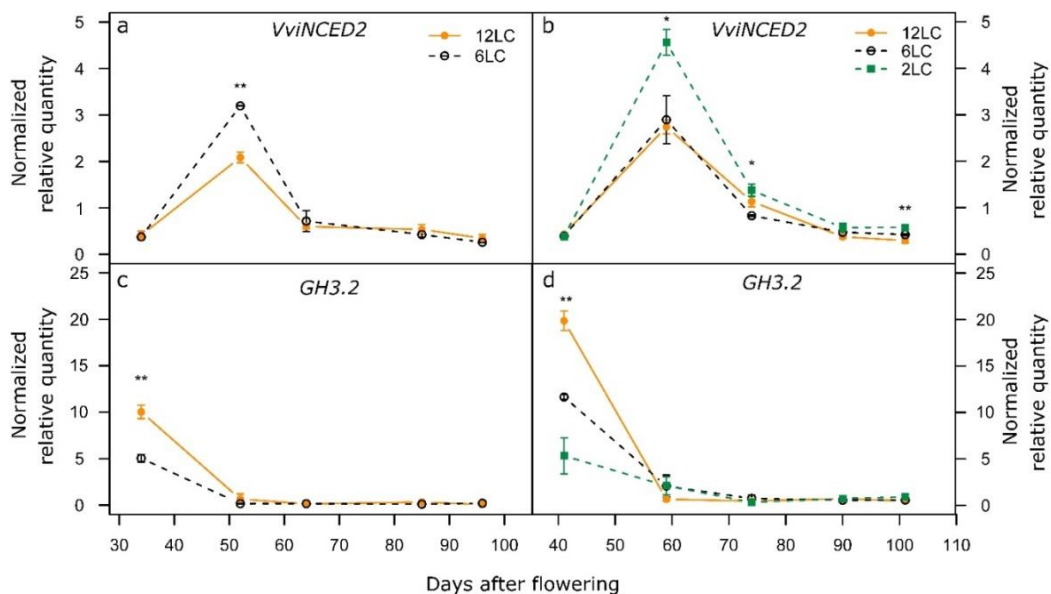


Fig. 8 Hormone-related genes differentially expressed in response to source-sink modulation in *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development. The expression profiles of *VviNCED2* (a-b), *VviGH3.2* (c-d) genes for the year 2015 (a, c) and 2016 (b, d) are shown.

Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four references genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), N=3 biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

The normalized relative quantity (NRQ) of *GH3.2* transcripts was maximal at 34 and 41 DAF in 2015 and 2016 respectively, and decreased progressively until to be no detectable after 60 DAF (Fig. 8c-d). This expression profile is typical of this gene family involved in controlling auxin-related plant developmental processes and confirmed the previous studied described in the berry by Böttcher et al. in 2011 [46]. The *GH3.2* expression profile was related to the LFR modulation for both years, which comforted the hypothesis that GH3.2 is possibly responsible for the variations in ripening delay [46].

2- Carbohydrate metabolism and sugar transport

As described in the literature, genes encoding the fructose 1,6-bisphosphatase (*VIT_08s0007g01570*) involved in glycolysis/gluconeogenesis and the phosphoribulokinase (*VIT_02s0109g00080*) involved in the Calvin cycle were expressed during berry development, around veraison, and a down-regulation was noticed during the later stages of berry maturation [47]. In our study, these two genes were significantly up-regulated for a low LFR (2LC) in 2016 from 59 DAF to the end of maturation (Fig. 9a-b). The increased transcript abundance of these two genes can be explained by the fact that the 2LC grape berries tried to compensate for the lack of energy of the plant due to the suppression of leaves, by up-regulating the expression of genes involved in the production of energy directly in the berries.

The *SWEET* gene family is known to be involved in the sugar transport. Seven genes are expressed in the berry i.e. *VviSWEET2a*, *4*, *7*, *10*, *11*, *15* and *17d* and especially throughout maturation phase [48]. In our study, we chose to follow the effect of modulating LFR on the gene expression profiles of the three *SWEET* genes known to be highly expressed in berries after veraison i.e. *VviSWEET4*, *7* and *15* [48]. Two types of expression profiles were obtained in response to LFR modulation. At the mid-veraison stage, *VviSWEET4* and *VviSWEET7* had a peak of expression for both years (52 and 59 DAF for 2015 and 2016 respectively), and *VviSWEET7* was significantly up-regulated by the decrease of LFR (Fig. 9e-h). This peak in expression for *VviSWEET7* could be explained by the adaptation of the berry transcriptome to a lack of soluble sugar in response to a low LFR (6LC and 2LC) (Fig. 9e-f). *VviSWEET4* expression profile showed also a down-regulation for a low LFR (6LC and 2LC) in comparison to the control treatment during maturation at 85 and 90 DAF in 2015 and 2016 respectively.

A different type of expression profile was obtained for *VviSWEET15*, which showed an increase of transcript abundance from mid-veraison to the end of maturation in 2015 and 2016 (Fig. 9i-j). *VviSWEET15* expression was significantly down-regulated from mid-veraison in 2016 by a low LFR (2LC) (Fig. 9j). These differences in expression profiles between the three investigated *VviSWEET* genes could be explained by existence of different clades in multigenic family [48, 49]. *VviSWEET4* and *VviSWEET7* are members of the clade II, whereas *VviSWEET15* belongs to clade III. *VviSWEET7* expression is probably more important at the onset of maturation for the storage of soluble sugar in the berry whereas the transcript abundance of *VviSWEET4* and *15* could be considered as fundamental during the rest of the maturation phase. These results were in agreement with the amount of soluble sugars observed in berries in response to LFR modulations and provided new insights into the complex transcriptional regulation of *SWEET* family genes. To complete the knowledge about this sugar transport family, it will be interesting to evaluate the gene expression profiles of the four other members expressed in the berry i.e. *VviSWEET2a*, *10* and *11* and *17d*.

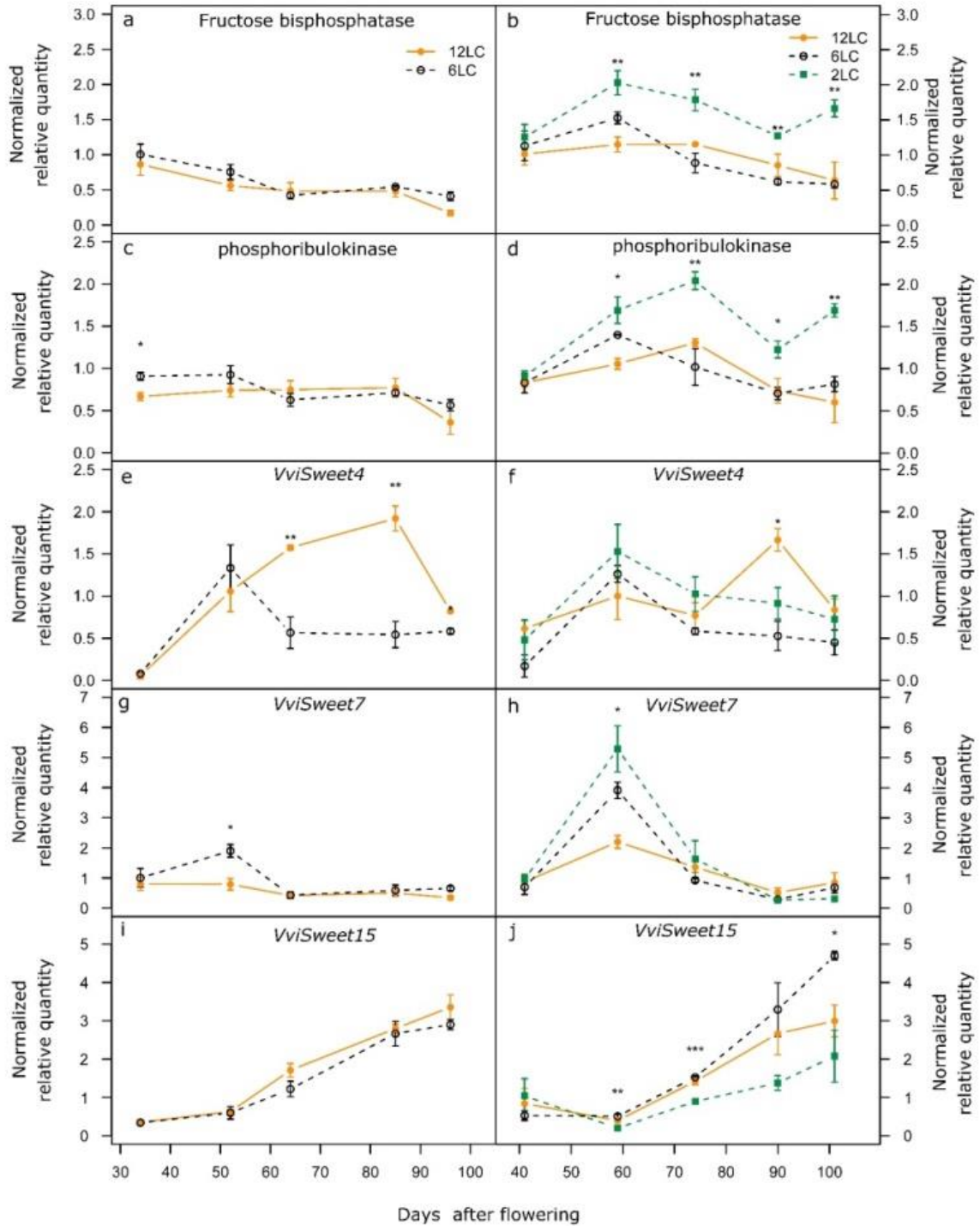


Fig. 9 Carbohydrate metabolism and sugar transport related genes differentially expressed in response to source-sink modulation in *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development. The expression profiles of fructose biphosphatase (a-b), phosphoribulokinase (c-d), VviSweet4 (e-f), VviSweet7 (g-h), VviSweet15 (i-j) genes for the year 2015 (a, c, e, g, i) and 2016 (b, d, f, h, j) are shown.

Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four references genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

3- Anthocyanin biosynthesis genes

In the anthocyanin biosynthesis pathway, flavonoid 3',5'-hydroxylases (F3'5'Hs) and flavonoid 3'-hydroxylases (F3'Hs) are known to competitively control the synthesis of delphinidin and cyanidin, the precursors of tri-hydroxylated (blue) and di-hydroxylated (red) anthocyanins respectively [50]. In our study, the expression profile of *VviF3'5'H* throughout berry development and ripening was similar to the expression profile obtained in other studies [51-53] but not for *VviF3'H* [53]. *VviF3'5'H* was not impacted by the LFR (data not shown), whereas *VviF3'H* was down-regulated by a low LFR (2LC and/or 6LC) during maturation for both years (85 and 90 DAF for 2015 and 2016 respectively) (Fig. 10a-b). *VviUFGT* has a similar profile of expression than in other studies [54] and was up-regulated with a low LFR (2LC) at 74DAF in 2016 (Fig. 10c-d). These expression profiles were in agreement with the increased proportion of malvidin-3-glc noticed in berries of fruiting-cuttings subjected to a low LFR.

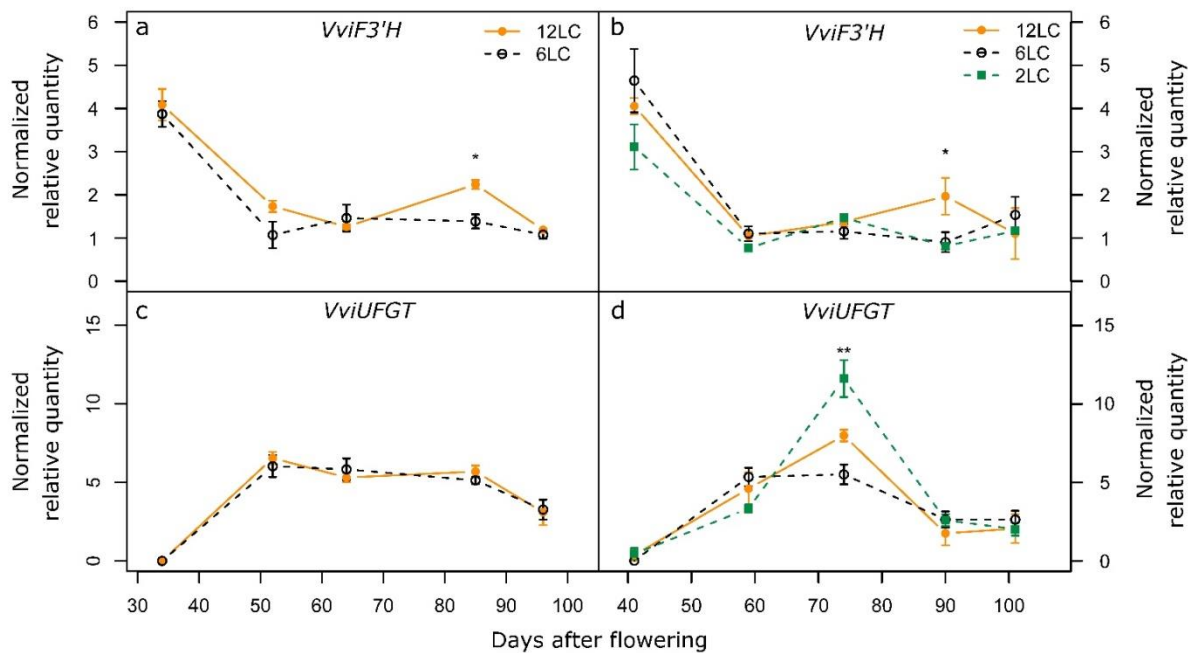


Fig. 10 Anthocyanin related genes differentially expressed in response to source-sink modulation in *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development. The expression profiles of *VviF3'H* (a-b), *VviUFGT* (c-d) for the year 2015 (a, c) and 2016 (b, d) are shown.

Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four references genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

4- Aroma and aroma precursor metabolism genes

The *VviOMT1*, *VviOMT2*, *VviOMT3* and *VviOMT4* genes were known to be involved in MPs biosynthesis pathway [40, 41, 55]. The expression profiles of these four genes were not impacted by the different LFR treatments (Fig. 11) in agreement with the results obtained for the methoxy-pyrazines analysis of the berries.

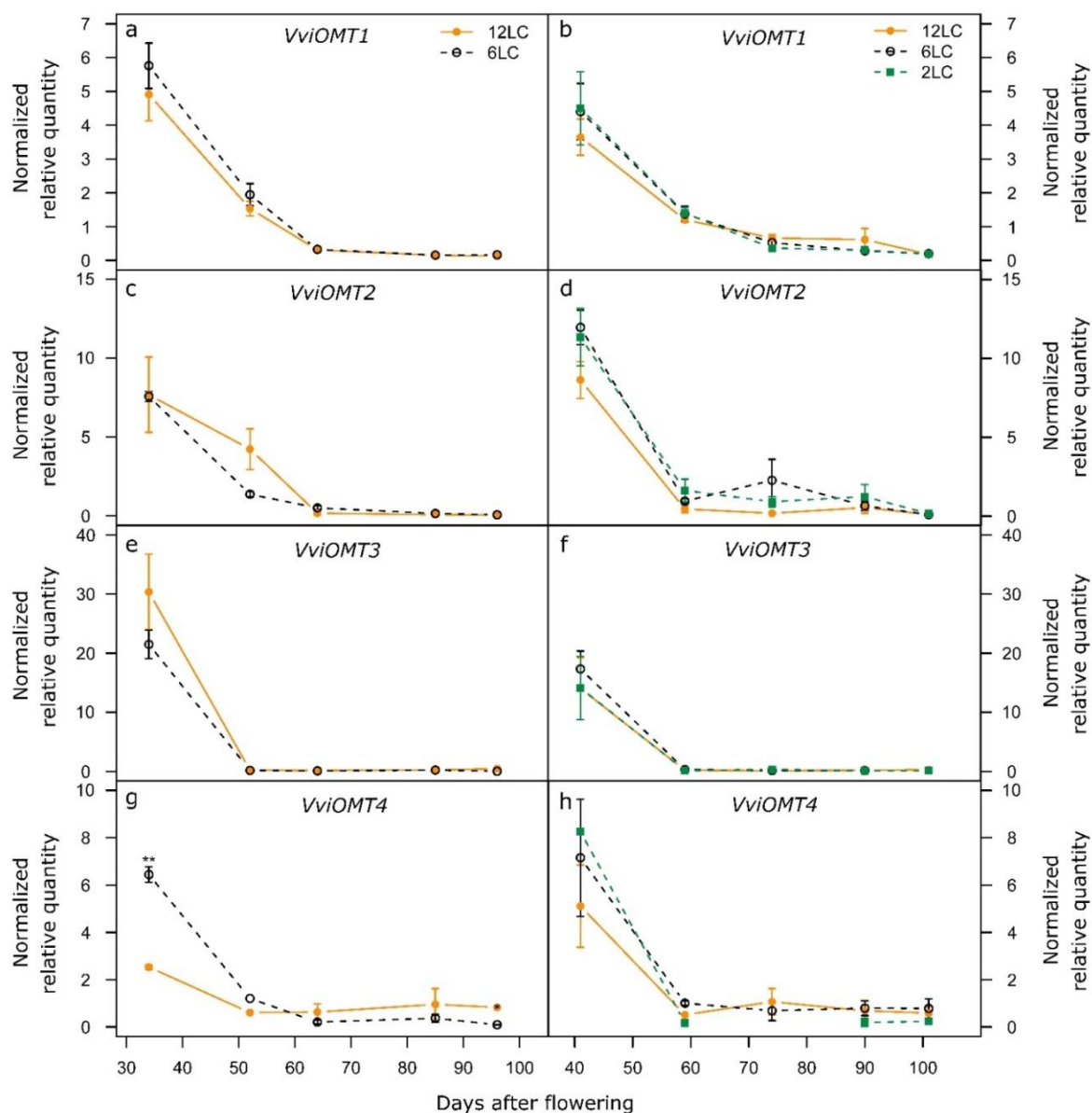


Fig. 11 Effect of source-sink modulation on the expression profiles of methoxy-pyrazine related pathway genes in *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development. The expression profiles of *VviOMT1* (a-b), *VviOMT2* (c-d), *VviOMT3* (e-f), *VviOMT4* (g-h) for the year 2015 (a, c, e, g) and 2016 (b, d, f, h) are shown.

Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four references genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

The biosynthesis genes of thiol precursors described by Kobayashi *et al.*, and Thibon *et al.*, [56, 57], modulating LFR did not have a significant impact on the expression profiles of *VviLOXC*, *VviGST3*, *VviGST4*, *VviGGT* (Fig. 12) and confirmed the results obtained for thiol precursors analysis on the berries. The transcript level of *VviLOXA* increased at 73 DAF and 92 DAF in 2016 with a low LFR (PS2LC) and did not affect the thiol precursors pathways but other metabolism processes. Effectively Podolyan *et al.*, (2010) showed that *VviLOXA* was preferentially expressed on the berry skin, and predicted as having a chloroplastic location [58]. *VviLOXA* is probably linked to important processes such as plastid turnover and membrane metabolism associated with the switch to berry ripening and subsequent changes in berry structure and metabolism.

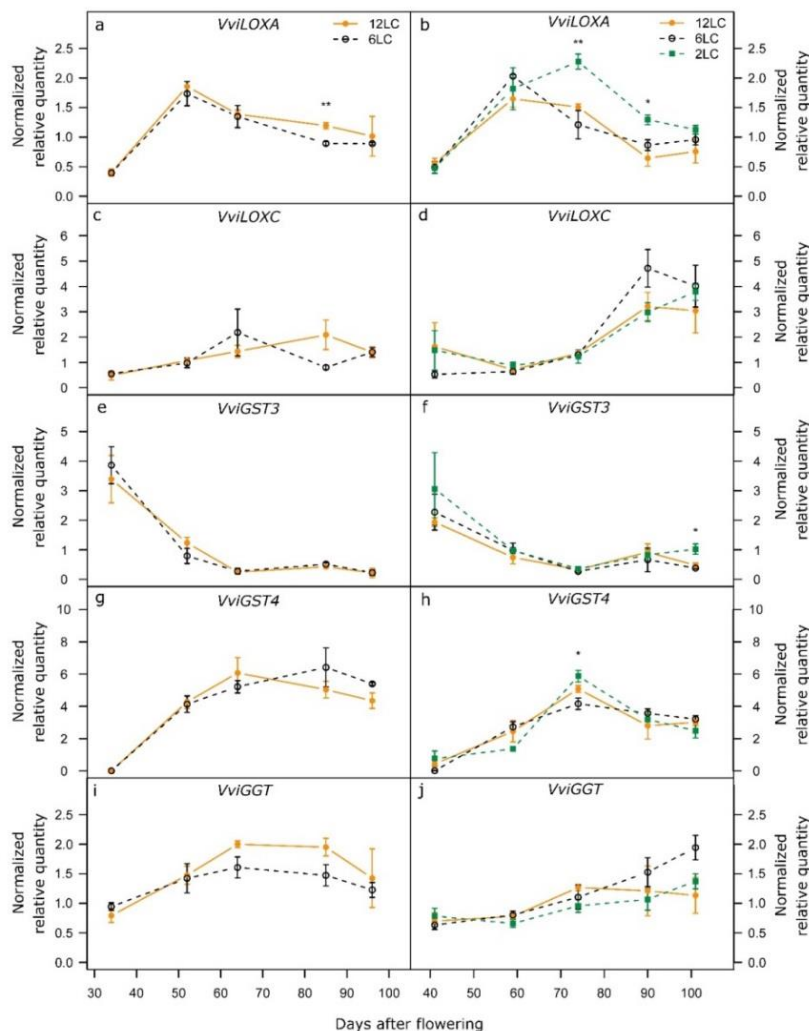


Fig. 12 Effect of source-sink modulation on the expression profiles of thiol precursor related genes in *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development. The expression profiles of *VviLOXA* (a-b), *VviLOXC* (c-d), *VviGST3* (e-f), *VviGST4* (g-h), *VviGGT* (i-j) for the year 2015 (a, c, e, g, i) and 2016 (b, d, f, h, j) are shown.

Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four references genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

The gene expression profiles of two other uncharacterized Glutathione S-transferases (GST) were evaluated and appeared to be impacted by the reduction of LFR (Fig. 13). The NRQ of *VviGST7* transcripts increased significantly for a low LFR (Fig. 13a-b) and an opposite profile was shown for NRQ of *VviGST23-like* transcripts in 2016 (Fig. 13c-d).

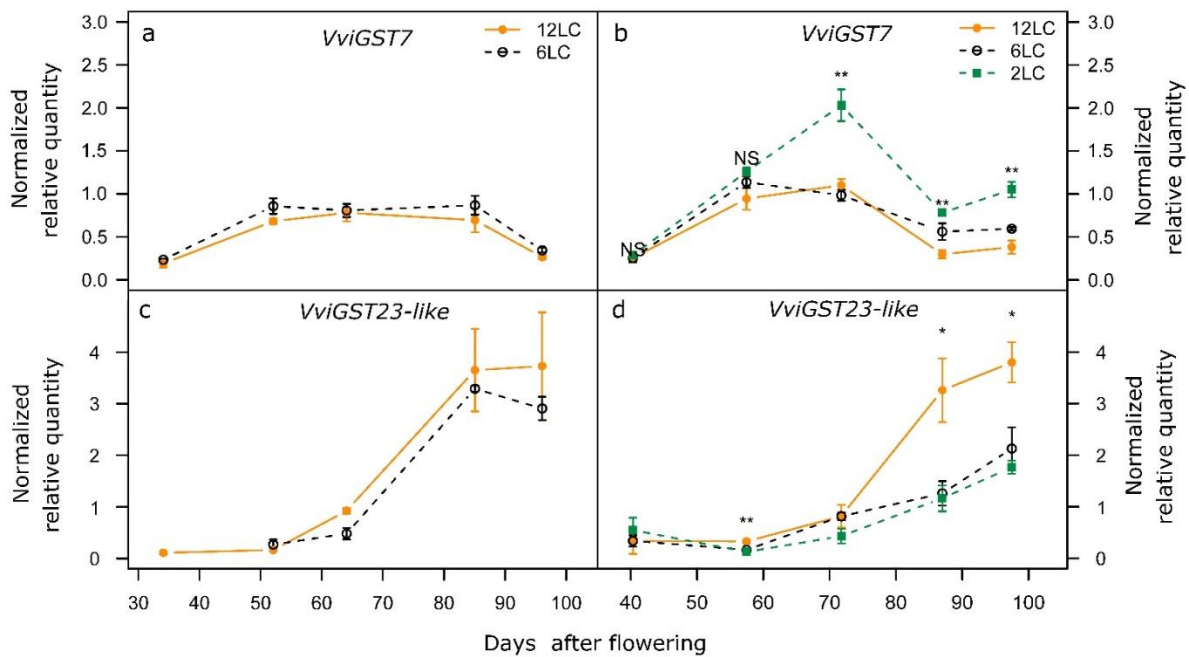


Fig. 13 Glutathione S-transferase genes differentially expressed in response to source-sink modulation in *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development. The expression profiles of *VviGST7* (a-b) and *VviGST23-like* (c-d) for the year 2015 (a, c) and 2016 (b, d) are shown.

Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four references genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), N=3 biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

The expression profiles of two other genes related to aroma and aroma precursors were evaluated in response to modulation of LFR i.e. *VviGerD* encoding a sesquiterpene synthase and a gene encoding a benzoate carboxyl methyltransferase-like (*VIT_04s0023g02280*) expressed since veraison until maturity (Fig. 14) [59, 60]. These two aroma-related genes may play an important role in specific aroma production at early stages of berry ripening. In our study, these two genes are down-regulated for a low LFR.

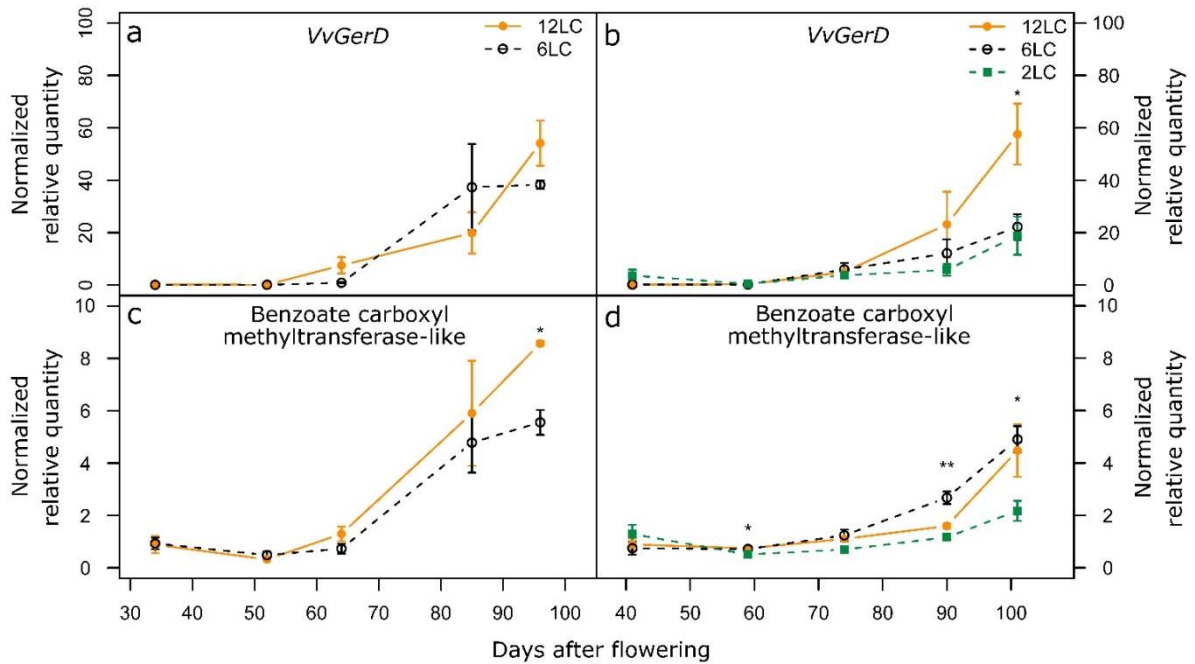


Fig. 14 Aroma related genes differentially expressed in response to source-sink modulation in *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon berries throughout their development. The expression profiles of *VviGerD* (a-b) and a benzoate carboxyl methyltransferase-like gene (c-d) for the year 2015 (a, c) and 2016 (b, d) are shown. Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four reference genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), N=3 biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine.

J) Identification of candidate genes at mid-veraison related to early LFR reduction

To complete our data about the berry transcriptome response to a LFR modulation, an RNAseq analysis was done on berry samples harvested at mid-veraison in 2016. An enrichment of genes related to primary and secondary metabolism pathways was expected with this untargeted approach.

The PCA on the gene expression results obtained by RNAseq showed a clear separation of the 2LC from the other treatments 6LC and 12LC on the second principal component axis (Fig. 15) than between 6LC and 12LC, and the same trend was visible on the first principal component.

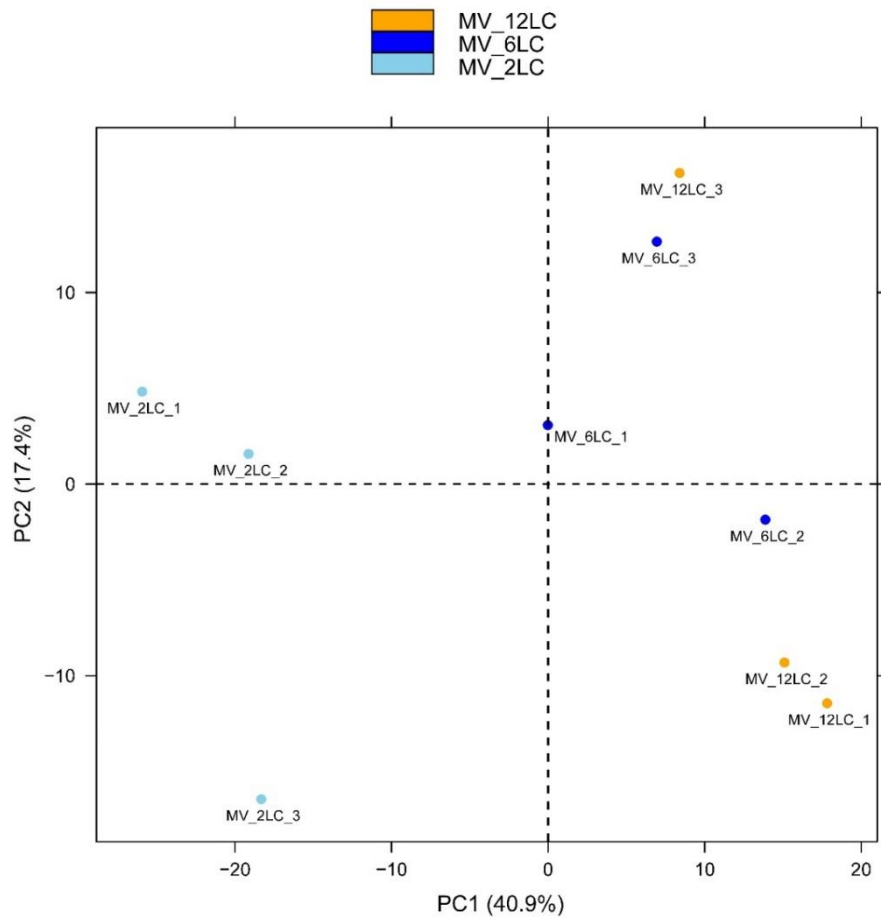


Fig. 15 Score plot of principal component analysis showing transcriptomic discrimination of the different leaf-to-fruit ratio treatments in berries of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon fruiting-cuttings harvested at 59 DAF in 2016.

Genes were considered as differentially expressed between LFR treatments when an absolute value of $|LFC|$ ratio ≥ 0.6 with an adjusted p value ≤ 0.05 was obtained (Fig. 16, Supplementary Table 2).

As represented in Venn diagram, 330 genes were up-regulated and 90 genes were down-regulated by reducing LFR at mid-veraison. No gene was deemed to be differentially expressed in all of the three LFR treatment comparisons (Fig. 16). One hundred and sixty-six genes were up-regulated and 8 genes were down-regulated in both 2LC vs 12LC and 2LC vs 6LC comparisons (Fig. 16).

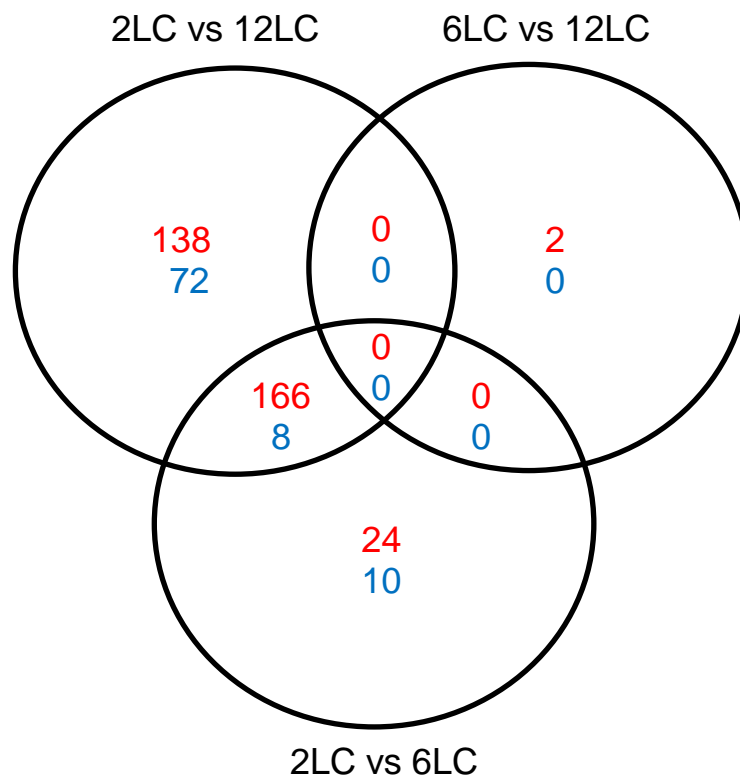


Fig. 16 Effect of source-sink modulation on gene expression in berries of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon fruiting-cuttings harvested at mid-veraison in 2016.

The Venn diagram indicates overlap of all differentially expressed genes obtained from each comparison between 2LC, 6LC and 12LC LFR treatments. The numbers of up-regulated genes and down-regulated genes are given in red and in blue, respectively. LC, leaves conserved per cluster per vine.

Among these genes, 46 genes were selected as potentially interesting targets to widen our results obtained by the Fluidigm approach and are detailed in Table 1. These 46 genes are related to carbohydrate, energy and amino acid metabolism, plant hormone signal transduction, biosynthesis of secondary metabolites and transcription factors.

Table 1: Differential expressed genes at mid-veraison between the different leaf to fruit ratio treatments

| Gene ID (V1) | Gene function description | LFC | | |
|--|--|-------------|-------------|------------|
| | | 2LC vs 12LC | 6LC vs 12LC | 2LC vs 6LC |
| Carbohydrate metabolism | | | | |
| VIT_16s0013g00330 | Ribulose-bisphosphate carboxylase | 2.59 | ns | ns |
| VIT_07s0031g03000 | 3-phospho-D-glycerate carboxy-lyase | 3.03 | ns | 2.37 |
| VIT_07s0129g00790 | 3-phospho-D-glycerate carboxy-lyase | 2.95 | ns | 2.27 |
| VIT_11s0052g01250 | probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23-like | 1.56 | ns | ns |
| VIT_01s0011g05380 | pectinesterase | -2.02 | ns | ns |
| VIT_10s0116g00590 | pectinesterase 2.2-like | -0.81 | ns | ns |
| VIT_12s0035g01900 | pectin methylesterase PME1 | -0.90 | ns | ns |
| VIT_08s0056g00190 | pyruvate kinase | -0.65 | ns | ns |
| VIT_10s0071g01060 | pyruvate kinase, cytosolic isozyme-like | -0.70 | ns | ns |
| VIT_07s0005g01040 | probable galacturonosyltransferase-like 7-like | -0.77 | ns | ns |
| Energy metabolism | | | | |
| VIT_00s0246g00200 | photosystem I 9 kDa protein | 3.64 | ns | 3.19 |
| VIT_12s0059g02430 | photosystem I assembly protein Ycf4 | 3.17 | ns | 2.77 |
| VIT_00s0332g00110 | photosystem II reaction center subunit X | 3.52 | ns | 2.98 |
| VIT_00s0396g00010 | photosystem II 43 kDa protein | 2.62 | ns | ns |
| VIT_13s0019g02630 | photosystem II protein D1 | 3.18 | ns | 2.32 |
| VIT_04s0043g01010 | violaxanthin de-epoxidase, chloroplastic-like | 0.71 | ns | ns |
| VIT_14s0036g01270 | ATP synthase F0 subunit 6 | 2.54 | ns | 2.33 |
| VIT_00s0246g00220 | ATP phosphohydrolase | 3.39 | ns | 2.84 |
| VIT_00s0332g00060 | ATP phosphohydrolase (H ⁺ -transporting) | 3.36 | ns | 2.69 |
| VIT_00s0733g00010 | ATP phosphohydrolase | 2.95 | ns | 2.40 |
| VIT_14s0068g01700 | ATP phosphohydrolase | 2.61 | ns | ns |
| VIT_17s0053g00440 | ATP phosphohydrolase | 2.78 | ns | 2.75 |
| VIT_01s0146g00390 | ATPase subunit 8 | 3.26 | ns | 2.61 |
| VIT_00s0438g00020 | ATPase subunit 9 | 3.51 | ns | 2.64 |
| VIT_00s0873g00020 | NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 | 2.37 | ns | ns |
| VIT_01s0011g04110 | putative NADH:ubiquinone reductase (H ⁺ -translocating) | 2.80 | ns | 2.74 |
| VIT_00s0332g00140 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2-like | 2.19 | ns | 1.81 |
| VIT_00s0246g00010 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2-like | 2.73 | ns | ns |
| VIT_00s0396g00020 | NADH dehydrogenase subunit 1 | 3.48 | ns | 2.84 |
| VIT_14s0108g01640 | NADH dehydrogenase subunit 2 | 3.35 | ns | 2.81 |
| VIT_08s0056g00590 | heme-binding protein | 3.54 | ns | 2.98 |
| VIT_00s0438g00010 | cytochrome c oxidase subunit 2 | 2.14 | ns | 1.64 |
| VIT_09s0002g07880 | pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump 1-like | -0.89 | ns | ns |
| Amino acid metabolism | | | | |
| VIT_00s0211g00120 | serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial-like | 0.73 | ns | ns |
| VIT_07s0151g00510 | amino-acid acetyltransferase-like | 0.75 | ns | ns |
| VIT_18s0001g15100 | flavin-containing monooxygenase YUCCA10-like | ns | ns | -2.85 |
| VIT_06s0009g01140 | vacuolar amino acid transporter 1-like | ns | ns | -1.08 |
| VIT_13s0064g01760 | beta-glucosidase 13-like | -1.08 | ns | -1.40 |
| VIT_08s0007g05000 | S-adenosylmethionine synthase 3 | -0.81 | ns | ns |
| Plant hormone signal transduction | | | | |
| VIT_04s0044g02010 | gibberellin 3-beta-dioxygenase 4-like | ns | ns | -1.05 |
| VIT_08s0040g01230 | probable auxin efflux carrier component 1c-like | -1.01 | ns | ns |
| VIT_05s0077g01860 | ethylene-responsive transcription factor RAP2-3-like | -0.83 | ns | -0.77 |
| Biosynthesis of other secondary metabolites | | | | |
| VIT_17s0000g07750 | peroxidase 65-like | -2.34 | ns | ns |
| VIT_03s0038g01460 | chalcone synthase A-like | -1.87 | ns | -1.77 |
| VIT_04s0023g02200 | benzoate carboxyl methyltransferase-like | -0.64 | ns | ns |
| Transcription factors | | | | |
| VIT_01s0011g05970 | heat stress transcription factor A-8-like | -0.85 | ns | ns |

p value ≤ 0.05 and $|LFC| \geq 0.6$. ns not significant

1- Carbohydrate and energy metabolism related genes

Four genes (*VIT_16s0013g00330*, *VIT_07s0031g03000*, *VIT_11s0052g01250* and *VIT_07s0129g00790*) related to carbohydrate metabolism and 22 genes (except *VIT_09s0002g07880*) related to energy metabolism were significantly up-regulated in the comparison of 2LC vs 12LC. The functions of these genes were related to the Calvin cycle and photosynthesis, indicating the intensity of photosynthesis in 2LC treatment berries was stronger than in other LFR treatments. In a previous study of leaf-removal treatment to *Vitis vinifera* cv. Sauvignon blanc grapes in the bunch zone at early stage, the genes involved in the protection of the photosynthetic machinery were significantly up-regulated from the stage of pea-sized to veraison [61]. Among them, a gene encoding an enzyme of non-photochemical quenching (violaxanthin de-epoxidase; *VIT_04s0043g01010*), and a gene encoding an enzyme of reversible photoinhibition (photosystem II protein D1; *VIT_13s0019g02630*) were also significantly up-regulated by a low LFR (2LC) in comparison to 6LC and 12LC control treatments, which means carbon source limitation from leaves induced an intensifying fruit photosynthesis.

During grape berry ripening, softening occurs concomitantly and involves significant changes of cell wall modifying enzymes. Based on gene functional annotations, six genes involved in cell wall modification processes (*VIT_01s0011g05380*, *VIT_12s0035g01900*, *VIT_10s0116g00590*, *VIT_07s0005g01040*, *VIT_17s0000g07750*, *VIT_11s0052g01250*) were down-regulated in response to the LFR modulation with exception of one gene encoding a xyloglucan endotransglucosylase (*VIT_11s0052g01250*). The increasing in the solubility of pectin polysaccharides was a major change in cell walls during ripening of grapes [62]. The up-regulated expression of genes encoding two pectinesterases and a pectin methylesterase (*VIT_01s0011g05380*, *VIT_10s0116g00590*, *VIT_12s0035g01900*) might contribute to this change, which means LFR treatments might result to softening delaying.

Only one gene (*VIT_09s0002g07880*) related to energy metabolism was down-regulated at mid-veraison in 2LC vs 12LC comparison. This gene belongs to type I VHPs which are the critical factor in the regulation of cell turgor and one of type I VHPs (*VvVHP1;2*) was reported to promotes anthocyanin accumulation via glucose signal in berry skin [63].

2- Amino acid metabolism

Four genes involved to amino acid metabolism were down-regulated in response to LFR modulation and the two other genes were up-regulated in 2LC vs 12LC comparison. They were involved multiple amino acid metabolic pathways and one of them (*VIT_06s0009g01140*) was a vacuolar amino acid transporter. There was no obvious trend for the genes related to amino acid metabolism pathway. This may explain that the total amino acids were not significantly different among the treatments at 59 DAF in 2016.

3- Hormone signal transduction

Various hormones play important roles in berry development and ripening. In grapevine, biological active concentrations of gibberellin (GAs) and auxin were found to be high during early berry development but dropping to lower levels throughout the subsequent berry development [64]. Besides, ethylene also increased a slight at pre-veraison [65]. There were three genes (*VIT_04s0044g02010*, *VIT_08s0040g01230* and *VIT_05s0077g01860*) down-regulated in response to LFR treatment related to hormone signal transduction. These genes are involved in GAs, auxin and ethylene signalling pathway respectively.

Moreover, three other genes related to secondary metabolites are down-regulated in 2LC berries in comparison to 12LC or 6LC treatments at mid-veraison.

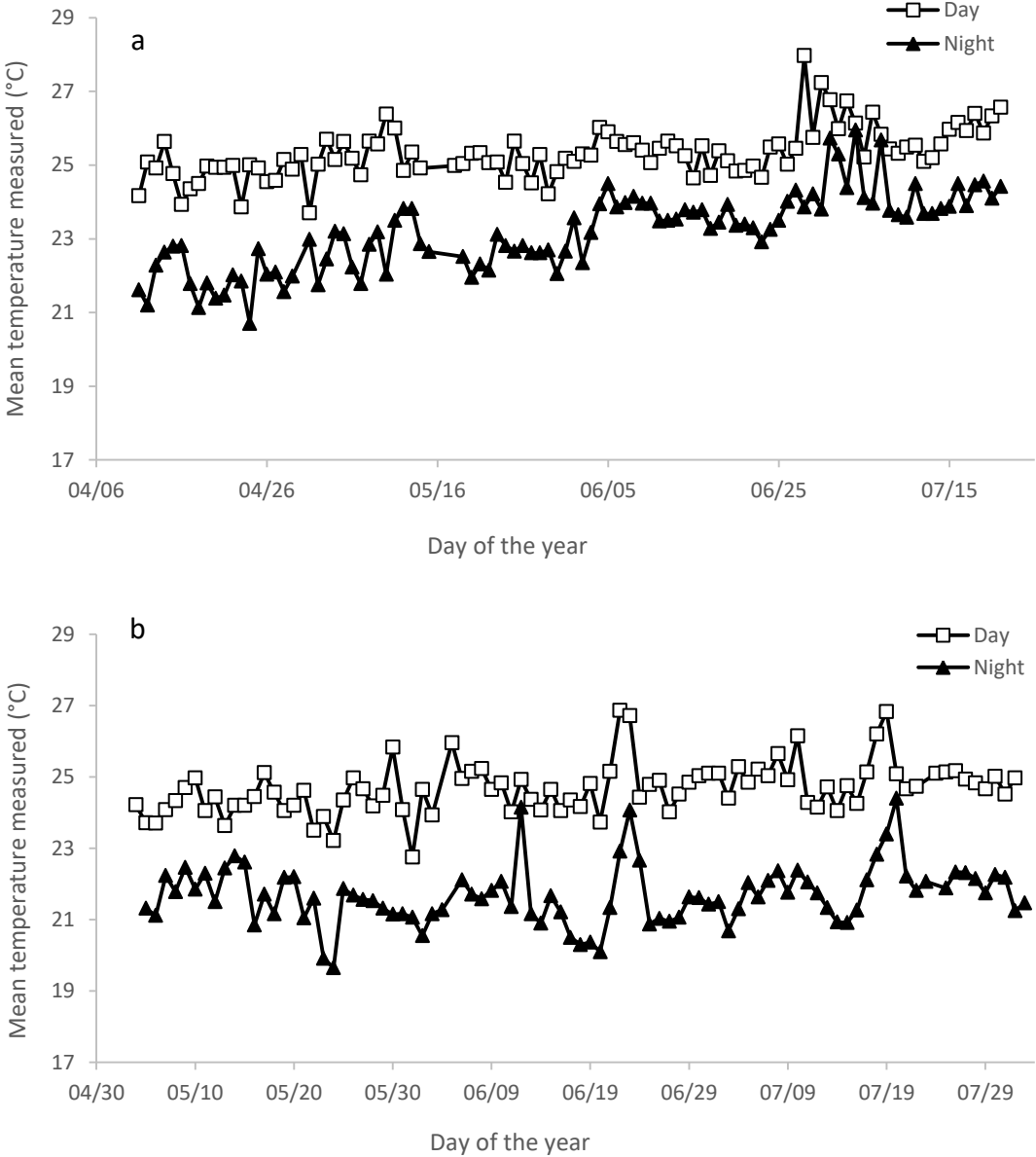
Taken together, it seemed that LFR treatment resulted to the delay of berry development especially for 2LC.

IV- Conclusions

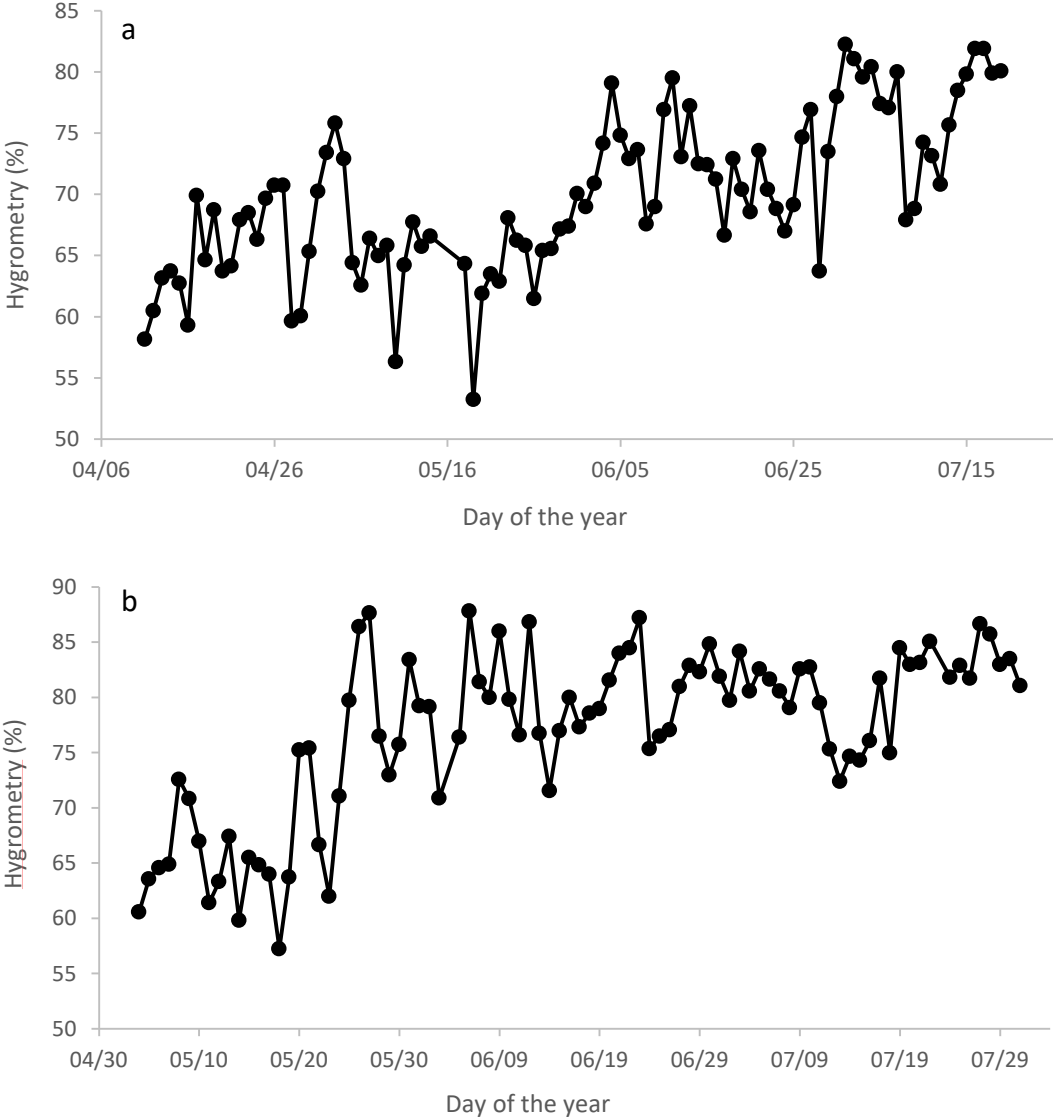
The effect of LFR modulation on *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon fruiting-cuttings was investigated by combining analytic and transcriptomic approaches. Following the statistical analyses carried out, it appears that a range of broad LFR treatments makes it possible to better highlight the parameters most influenced by leaf stripping. This decrease in leaf area inducing a decrease in the concentration of sugars in the berries is also linked to a sharp drop in the primary and secondary metabolites that contribute to the typicality and organoleptic qualities of the wines. As a result, the anthocyanin content falls quite correlatively with the decrease in leaf area. Similarly, the reduction in leaf area causes a decrease in the content of proline, valine, and isoleucine in ripe berries (data not shown). An increase in the concentration of malic acid was also observed with a low LFR. Finally, lowering LFR did not have an impact on the concentration of the aromatic compounds associated with the vegetal character of the wine, namely MPs and also on precursors of thiols, involved in the fruity character of wines. Lowering LFR involved a correlative differential expression of numerous genes especially related to carbohydrate and energy metabolisms (fructose 1,6-bisphosphatase, phosphoribulokinase, *SWEET* family genes, cell-wall modifying genes), to anthocyanin biosynthesis pathway (*VviF3'H*, *VviUFGT*) or to hormone signal transduction. They might be used directly or indirectly as potential indicators of the effects of leaf area modulation on berry biochemical composition for optimal wine quality.

V- Additional files

Supplementary Figure 1. Seasonal trends of air temperature in 2015 (a) and 2016 (b) measured in the semi-controlled greenhouse used to maintain Cabernet-Sauvignon fruiting-cuttings from flowering to maturity.

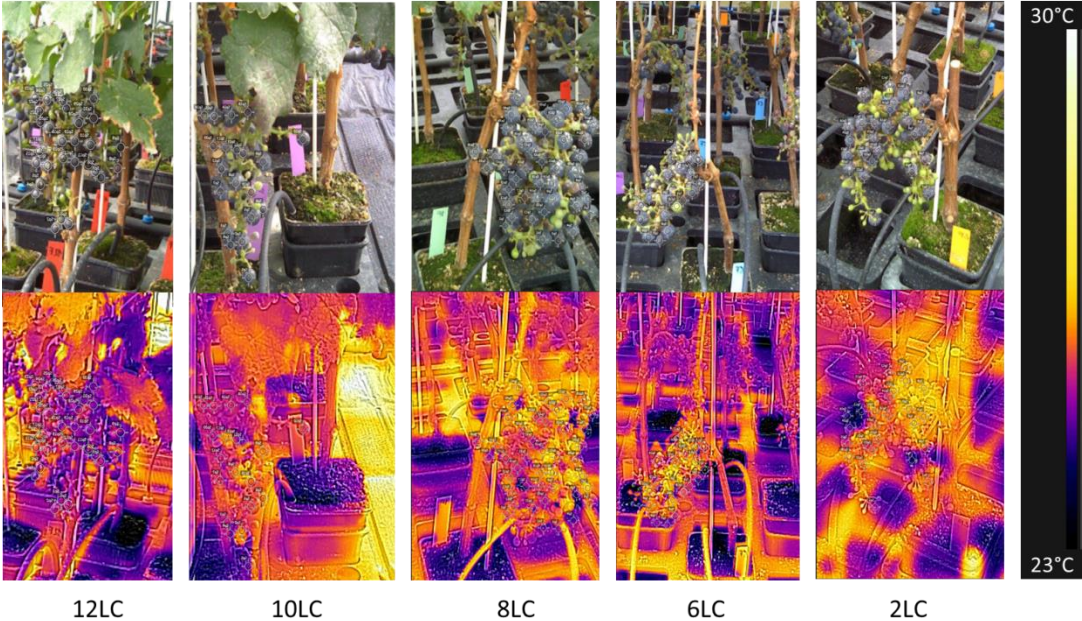


Supplementary Figure 2. Seasonal trends of hygrometry percentage in 2015 (a) and 2016 (b) measured in the semi-controlled greenhouse used to maintain Cabernet-Sauvignon fruiting-cuttings from flowering to maturity.

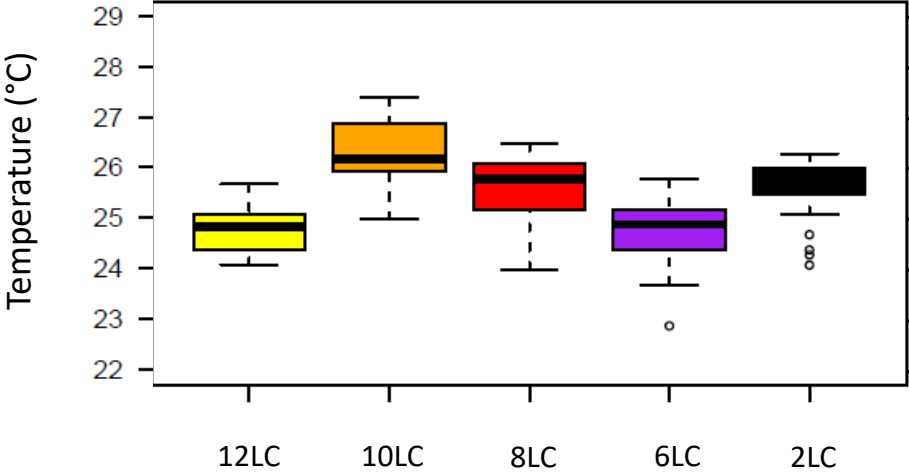


Supplementary Figure 3. Bunch zone temperature of Cabernet-Sauvignon fruiting-cuttings measured in the semi-controlled greenhouse by thermal camera FLIR T450sc (FLIR[®] Systems) in 2016 (a) and a boxplot of the berry temperature determined after images analysed by FLIR tools software (b).

a



b



Sup table 1: Primers used for fluidigm real-time PCR analysis and related gene descriptions

| Gene ID | Gene Potential Function | Pathway Description | Forward primer 5'-3' | Reverse primer 5'-3' | References related |
|--|--|--|----------------------------|--------------------------|--------------------|
| Primary metabolites | | | | | |
| VIT_00s0304g00080 | trehalose-phosphate phosphatase-like (TPP) | Starch and sucrose metabolism | CCCAAGGATACCTCTGCATCT | ATTTCTTCTGCTTTACACCCTG | |
| VIT_00s2527g00010 | acid beta-fructofuranosidase-like | Starch and sucrose metabolism | ACTCCTTGGGACTGGGTCA | AGGCTGTTGAGGGTACAGA | |
| VIT_01s0146g00260 | bidirectional sugar transporter (SWEET 15) | Starch and sucrose metabolism | TCGAACCAAGAGCGCTCGAAT | ACACTTCAACAGACCAGCAGA | |
| VIT_02s0025g02080 | bidirectional sugar transporter (SWEET4-like) | Starch and sucrose metabolism | AGCTTAACAATTAACGGCTATGAC | TTTAAGGAAGAGAGATGACGCTG | |
| VIT_03s0038g04570 | glucose-1-phosphate adenyltransferase large subunit 1-like | Starch and sucrose metabolism | AAGCAAGCAGAGGTGGACTC | GCCAACTGACTAACCCAAAC | |
| VIT_04s0044g00710 | UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase-like (UGPase) | Starch and sucrose metabolism | TTGAAGCTAAGGCTGGGGTG | AGGCCCGTTACAGTGGTT | |
| VIT_14s0060g01910 | bidirectional sugar transporter (SWEET16-like) | Starch and sucrose metabolism | CTGGCGGCTTACTTGTCT | AAAGCCAACATCCAACFCG | [48] |
| VIT_14s0066g01420 | bidirectional sugar transporter (SWEET6b-like) | Starch and sucrose metabolism | GGCTCGGACTGTGATGGTA | ACATCAGTTCATCACTGTGG | [48] |
| VIT_18s0001g08210 | sucrose transporter-like (SUC11) | Starch and sucrose metabolism | ATCTTGGCTATCTCCGATCTA | TAACATTTAACCCCATATTGA | |
| VIT_18s0076g00250 | sucrose transporter-like (SUC27) | Starch and sucrose metabolism | GGAGTTAGCCAAGCTTCTTCAG | GCAACGCCATCCGAAGCT | |
| VIT_08s0007g01570 | fructose-1,6-bisphosphatase | Pentose phosphate pathway | CGGAAGCAGAGCAAGAAG | ATCAATACACCGCTTCT | |
| VIT_10s0071g01060 | pyruvate kinase (PK) | Pentose phosphate pathway | GCCTGTGGACTTGAAGCTGGAA | CAGTGTCTCGCAACGGCATCT | |
| VIT_12s0057g00940 | glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PDH) | Pentose phosphate pathway | ATCTCTGACGGAAGATCACATGC | CGCCGCAACTGTTATGCTGAGA | |
| VIT_12s0057g01030 | glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PDH) | Pentose phosphate pathway | GTTCTGTCTTGGACTGAGATGG | TCTACAGCTCTAATAGCAGCTCT | |
| VIT_16s0100g00290 | L-iditol 2-dehydrogenase | Pentose and glucuronate interconversions | ATCTATTGTTTGGGAGACCGATA | TGAGGATGATTGTTTATTACC | |
| VIT_04s0008g00520 | 6-phosphofructokinase 3-like | Fructose and mannose metabolism | CAGGTTACTGGCTTCAAGATGG | GTTCCGCTCTATTGATCGGATGG | |
| VIT_04s0023g03170 | GDP-mannose 4,6 dehydratase 2-like | Fructose and mannose metabolism | GGCAGGATGGCTGATCTA | ATTGAGGCTGGGTATTGA | |
| VIT_11s0016g03070 | hexokinase-1-like (HXK1) | Fructose and mannose metabolism | GGCCATTGATTTTGGTCT | CCAACCGCATATGATCC | |
| VIT_11s0037g00930 | putative GDP-L-fucose synthase 2-like | Fructose and mannose metabolism | TCGTTCTACTCCGTTCTC | CTTAGCGGATTGTTGGAAA | |
| VIT_19s0085g00370 | phosphoglycerate kinase | Glycolysis glycolysis | CCAACTTATCTCGCCCTCT | ATCCGCCCTTCAAGTACATC | |
| VIT_01s0011g05370 | phosphoglucomutase (PGM) | Sucrose biosynthesis | GGTGGCCCTTCTGATGGTATG | TGGCCTACTCTGGCAACTCC | |
| VIT_04s0044g01490 | 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase | Propanoate metabolism | TGTGTTGGTGGCTTGGAAA | GCATCTGGTCTTGCAGAT | |
| VIT_02s0109g00080 | phosphoribulokinase | Carbon fixation in photosynthetic organisms | AGCATCAGCCCAACATCA | GGAAACAGAGAAACACACTAAA | |
| VIT_01s0011g00690 | UDP-glucose 6-dehydrogenase | Amino sugar and nucleotide sugar metabolism | TGCCGATGATCCAAGTCTG | CTTGTGTTGGGGTCAGAA | |
| VIT_05s0020g04510 | GDP-mannose 3,5-epimerase 1-like | Amino sugar and nucleotide sugar metabolism | CGTGCTGCTGATGTAAGA | TCCATACCCAGGTATCCAT | |
| VIT_01s0011g02740 | phosphoenolpyruvate carboxylase 4-like | Pyruvate metabolism | ATGACGGACACCAGATGA | CTGCAACACTCGTTGAGAA | |
| VIT_01s0244g00140 | aspartokinase 1 | Lysine biosynthesis | GTCCGCATTCTTCTCTG | CGTCTCACTCGCTTCTCT | |
| VIT_10s0116g01540 | aminomethyltransferase | Glycine, serine and threonine metabolism | GGCCATAGGGGAAGAAGA | GAAGAGAAGAAGCCGACAG | |
| VIT_11s0016g02830 | gamma-glutamyltransferase 1-like (GGT) | Taurine and hypotaurine metabolism | TGGCAACAGCTTAGAGGCGATA | CCCACCTGCCTTCTCACAT | [66] |
| VIT_19s0014g01800 | homogentisate 1,2-dioxygenase-like | Tyrosine metabolism | AACTACGGTGGAAAGCTGTG | CATATCATGCCGAAGGAT | |
| Biosynthesis of secondary metabolites | | | | | |
| VIT_04s0044g01740 | hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) | Terpenoid backbone biosynthesis | TGCCACTGCCTCTACCTT | TACGGATCTTCTCCCTCAA | |
| VIT_01s0011g05380 | pectinesterase | Terpenoid backbone biosynthesis | TTGGGCTGATTGTTGGAG | TGACCGCTGAGTATGAGAG | |
| VIT_15s0046g03600 | (+)-neomenthol dehydrogenase | Monoterpenoid biosynthesis | AAGCCCTGAGATGGGCTC | CCGAGATTATCAAGGCTAT | |
| VIT_18s0001g04780 | Gewürztraminer (E)- α -Bergamotene Syn (GwaBer) | Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis | CCTAGCATTTGGGGCAATA | CCGTGACACTGATCAGTAA | |
| VIT_18s0001g04280 | Gewürztraminer Germacrene D Syn (GwGerD) | Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis | ACTCCGAGGACGAGGTAAC | ACGTTGCACAGATCGTAA | |
| VIT_18s0001g04080 | Gewürztraminer (E)- β -Caryophyllene Syn (GwEcar3) | Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis | AAATCGTCAAAGGAGGCTC | CTGATGCTACATGCCCTTCT | |
| VIT_19s0014g04930 | (-)-germacrene D synthase (GerD) | Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis | TGCTGTGGCTTGTAGTACC | AGCATCTCCATTCCACAAA | |
| VIT_12s0059g01790 | O-methyltransferase (OMT1) | Methoxyppyrazines biosynthesis | GAGAAGCGAGGTGGAATG | TGAGATGATTACTGGATATGC | [41] |
| VIT_12s0059g01750 | O-methyltransferase (OMT2) | Methoxyppyrazines biosynthesis | CCGAGTGTGAATGGAAGAA | AATGACAACAGATGATGATTA | [41] |
| VIT_03s0038g03090 | O-methyltransferase (OMT3) | Methoxyppyrazines biosynthesis | ATGATGGCTCATACTACTA | CTAATTTGCTGCTCAATG | [67] |
| VIT_03s0038g03080 | O-methyltransferase (OMT4) | Methoxyppyrazines biosynthesis | GATGGCACATACTACTACA | GGGATTACCTTGGCGATA | [67] |
| VIT_15s0048g02480 | caffeic acid 3-O-methyltransferase | Phenylpropanoid biosynthesis | CTGGGAACCACTTACGAT | CAGGAACGCCACAGCAT | |
| VIT_07s0005g04880 | glutathione transferase (GST 23-like) | Glutathione metabolism | TTGATTGGCAGACATAGCC | GCGAGGGAACCTATCATCT | |
| VIT_01s0026g01340 | glutathione S-transferase U17-like | Glutathione metabolism | TTAAGTGGAGTGGGATGG | TGTTGACAGGAGGAATAGC | |
| VIT_04s0079g00690 | glutathione S-transferase (GST4) | Glutathione metabolism | AGTCACTTCCGGCCATCAG | CTCCCACTGCACCTCACAT | [66] |
| VIT_12s0028g00920 | glutathione S-transferase 3 (GST3) | Glutathione metabolism | TGCAAGGTGTTGGACATCTATG | TGTGAATGGAAGTGGCTAAGA | [66] |
| VIT_04s0023g02200 | benzoate carboxyl methyltransferase-like | Volatile ester biosynthesis | AAGGAGGAGGACGACACAT | ACAGCAGTGAACGCTACAA | |
| VIT_02s0087g00930 | probable carotenoid cleavage dioxygenase 4 (CCD4b) | Carotenoid biosynthesis | GTGAAGCTGGAGTATCACGA | CTCTCTGCCTGGATTGTC | |
| VIT_03s0063g00050 | abscisate beta-glucosyltransferase-like | Carotenoid biosynthesis | CGCATCCTGGAGATTCTGACT | CTTCTACTCTCCACGCTCTTCT | |
| VIT_07s0031g00620 | zeaxanthin epoxidase (ZEP/ZEP1) | Carotenoid biosynthesis | TACCGGATTTTTGGGACA | CTTCTCATCCGTTGCAAGT | [68] |
| VIT_14s0006g01460 | benzyl alcohol O-benzoyltransferase | Volatile benzenoid and benzoic acid biosynthesis | AGGGTGTGGAGGAGTGTG | TGAGCAGATGACGAGGTGA | |
| VIT_06s0004g01510 | lipoxigenase (LOXA) | Jasmonic acid biosynthesis | GCAAAATCAAGGGACAACGCTGATGG | TGCTTCCACTGGCGTCTCC | [69] |
| VIT_14s0128g00780 | lipoxigenase (LOXC) | Linoleic acid metabolism | TGGTGAAGGAGTCAAGGAAGAG | TGGCGGTTTGGGAGGTAGC | [69] |
| VIT_00s0361g00040 | anthocyanidin reductase (ANR) | Anthocyanin biosynthesis | GCAGTGTGGACTTGTCTTCC | CCTACTCTTGGAATTGCTGCTG | |
| VIT_01s0010g03510 | anthocyanin O-methyltransferase (FAOMT) | Anthocyanin biosynthesis | CTCTGCAGGCGCTCTATTA | CCCAAAACAGAGTCTGGACA | [70] |
| VIT_02s0025g04720 | leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) | Anthocyanin biosynthesis | AGGGAAGGAAAACAGTAG | ACTCTTGGGGATTGACTGG | [71] |
| VIT_02s0033g00410 | MYB1 | Anthocyanin biosynthesis | TAGTACCACCTTCAAAGG | GAATGTGTTGGGTTTATC | [71] |
| VIT_06s0009g03010 | flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) | Anthocyanin biosynthesis | GCCTAGCTACTATATGGCATGGAT | ATGTTGATGAGAACTCCCAAT | |
| VIT_14s0060g01280 | H ⁺ -pyrophosphatase (VHP1;1) | Anthocyanin biosynthesis | ACCTGAGCCGTTCTGTGG | CGTGAATAATCGCGGATCATC | [63] |
| VIT_16s0039g02230 | UDP-glucose:flavonoid 3-o-glucosyltransferase (UGFT) | Anthocyanin biosynthesis | CCCTCTTCCGCTGCTCG | GTTGGATTGGTGTGCTGAAG | |
| VIT_16s0098g00870 | WD-repeat 1 (WDR1) | Anthocyanin biosynthesis | GCATTCTGAGGAGATGGTG | TCCGAATCAAGAACAAGC | [70] |
| VIT_16s0039g01100 | phenylalanine ammonia-lyase (PAL 1) | Phenylpropanoid biosynthesis | GCAGTGAAGTGGTGTGGAGAG | CCAGCATTTCAAGAACCTGATGAG | |
| VIT_19s0014g02370 | 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase-like | Phenylalanine metabolism | TTACACAGGACCAACATCC | GTAGACGTTGCGAGCACCA | |
| VIT_17s0000g07200 | flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H) | Leucopelargonidin and leucocyanidin biosynthesis | GCCTCGTGTGCTGCTGAT | GAGAAGAGTGGAGGAGCAATC | [53] |

Sup table 1: Primers used for fluidigm real-time PCR analysis and related gene descriptions (continuous from previous page)

| Gene ID | Gene Potential Function | Pathway Description | Forward primer 5'-3' | Reverse primer 5'-3' | References related |
|------------------------------|--|--|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| Abscisic acid related | | | | | |
| VIT_01s0011g00760 | beta-glucosidase (BG1) | Coumarin biosynthesis | TGAACCTTACATAGTTGCCACCAT | AATCCCCATACATCAGAGGGTCAAT | [72] |
| VIT_14s0006g01790 | beta-glucosidase 44-like | Coumarin biosynthesis | GCCGCAGAATAGTAGAAGACTTTGC | GCAATATAAGGCTCGGTTGATGAGT | [72] |
| VIT_07s0129g00660 | probable indole-3-acetic acid-amido synthetase (GH3.2) | Auxin signaling pathway | CTGGAGATAAGGGTGGTGAAA | CTGGGCTGAAGTAGGTGGAG | |
| VIT_04s0008g03950 | rd22-c protein | ABA signaling pathway | TTTCACTCCTACCCATCCT | CAACATTTACACCACCTTCC | |
| VIT_07s0005g00390 | beta-glucosidase 11-like | ABA signaling pathway | GGGAACCTCCTAACAGAGGC | TGGACCAAGAGTCTATAGCCA | |
| VIT_07s0197g00080 | serine/threonine-protein kinase (SnRK2.5) | ABA signaling pathway | GGCAAGAATACGATGGCAAG | GGAAGTCCTGGGTTTCATCA | |
| VIT_09s0002g05590 | ABC transporter G family-like | ABA signaling pathway | AGGGTTCCTCGTTTCGTGT | TCCTCACCAGAGTTCCTCCAT | |
| VIT_10s0003g03750 | 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2 (NCED2) | ABA signaling pathway | AGTCCATACGGGTTTCATGGG | CCATTTTCCAAATCCAGGGTGT | [68] |
| VIT_10s0003g04390 | ABC transporter C family-like | ABA signaling pathway | TGTGGCGGTTACTGGAAAGGA | ATCACCACCAGGCAGTAAGTCAAGG | |
| VIT_14s0128g00890 | sucrose nonfermenting 4-like | ABA signaling pathway | CTGGCGGATCTAACATGGAT | ATACACGATGGCGAGAGACC | |
| VIT_16s0022g02210 | probable protein phosphatase 2C 75-like | ABA signaling pathway | AAAGAGAGGCGAGGATGAGTGT | AAAGCAAGGCGGGTGAGA | |
| VIT_18s0001g10500 | abscisic acid 8'-hydroxylase 4-like (Hvd4) | ABA signaling pathway | ATGGACTTCCAGCCAGATTG | GGACATCTCTCAACCAGAGA | [73] |
| VIT_19s0093g00550 | 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED1/NCED3) | ABA signaling pathway | GAGACCCCACTCTGGCAGG | AAGTGCCGTGGAATCCATAG | [68] |
| Miscellaneous | | | | | |
| VIT_05s0049g01130 | aldo-keto reductase | Metabolic processes and stress defense | TACGCGTTTGAGCATGGGAT | ATTCAGCCAACCTGGCGATG | |
| VIT_05s0077g01300 | aldo-keto reductase | Metabolic processes and stress defense | TGTGCGAGGTGTTTGAGGTT | TGCTCTCGTACAGTCCATGTT | |
| VIT_08s0007g01040 | aldo-keto reductase family 4 member C9-like | Metabolic processes and stress defense | CTTGAGCCCTACAAGACTGTT | GACAATTTGGCCGACAGATTC | |
| VIT_05s0094g01250 | 2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent) | Metabolic processes and stress defense | CTACTGCCTTACATCAGAGA | TGCTTGACATTCCTTCAATC | |
| VIT_05s0062g00980 | probable aldo-keto reductase 2 | Metabolic processes and stress defense | CTCCAAGCCAGAACAAAGAC | CCGTAGATGTCGGAGGTGTC | |
| VIT_02s0154g00260 | nitrate transporter 1.1-like | Nitrogen metabolism | CAGTTCTTATTGGTGGGTGC | CCCTAATGAAAGTGTGCTCAA | [74] |
| VIT_01s0026g01570 | nitrate transporter 1.2-like | Nitrogen metabolism | GGTCTAGTCTTCTCCATTATAGCC | TGTTCAAGTGGAGTCGATTAGC | |
| VIT_14s0066g00850 | high affinity nitrate transporter 2.5-like | Nitrogen metabolism | CCACCTTCGCCATTCTCTCTT | ACACGCCGTACCCATCGCTAAA | |
| VIT_00s0203g00070 | MYB 102-like | Transcription factor | TGGCTATGAAAACCTGGAGGACACTT | CAGCAATGGCAGACCATTGTTACC | |
| VIT_15s0046g00170 | MYBPA1 protein | Transcription factor | ATCGCAGGTAGGCTCCAGGTC | CCTCCGCCATTGTTGTTCTTGT | |
| VIT_08s0007g08920 | cis-zeatin O-glucosyltransferase | Zeatin biosynthesis | TGTGGCTGTGGTATGATGT | CTTGGCTTGGTTGATGTGG | |
| Reference genes | | | | | |
| VIT_17s0000g10430 | GAPDH | | CCACAGACTTCATCGGTGACA | TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA | [30] |
| VIT_04s0044g00580 | Actin | | CTTGATCCCTCAGCACCTT | TCCTGTGACAATGGATGGA | [30] |
| VIT_12s0035g01130 | EF1γ | | CAAGAGAAACAATCCCTAGCTG | TCAATCTGTCTAGGAAAGGAAG | [30] |
| VIT_16s0098g01190 | Ubiquitin | | AACCTCAATCCAGTCATCTAC | GTGGTATTATTGAGCCATCCTT | [30] |

Supplementary Table 2. Total genes differentially expressed at mid-veraison among of the different leaf-to-fruit ratio treatment at 59 DAF for 2016

| Gene ID | Gene function description | PS2LC vs PS12LC | PS6LC vs PS12LC | PS2LC vs PS6LC |
|-------------------|---|-----------------|-----------------|----------------|
| VIT_00s0125g00020 | | 2.9587 | NS | 2.218983279 |
| VIT_00s0125g00030 | | 3.7165 | NS | 3.23299528 |
| VIT_00s0125g00040 | | 3.2240 | NS | 3.092816337 |
| VIT_00s0125g00050 | | 2.8620 | NS | 2.5956196 |
| VIT_00s0125g00070 | | 2.4461 | NS | NS |
| VIT_00s0169g00040 | | 1.3834 | NS | NS |
| VIT_00s0173g00170 | 30S ribosomal protein S7 | 2.8651 | NS | 2.45453608 |
| VIT_00s0174g00330 | | -1.4531 | NS | NS |
| VIT_00s0198g00020 | | 2.4168 | NS | 2.729380642 |
| VIT_00s0198g00150 | | -0.9474 | NS | NS |
| VIT_00s0204g00070 | | -0.9419 | NS | NS |
| VIT_00s0204g00080 | | 2.2228 | NS | 2.008457014 |
| VIT_00s0211g00120 | serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial-like | 0.7340 | NS | NS |
| VIT_00s0225g00030 | | 2.1708 | NS | NS |
| VIT_00s0246g00010 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2-like | 2.7368 | NS | NS |
| VIT_00s0246g00050 | | 3.7806 | NS | 3.054605723 |
| VIT_00s0246g00060 | | 2.5181 | NS | 2.31645346 |
| VIT_00s0246g00070 | | 2.8481 | NS | 2.268716065 |
| VIT_00s0246g00080 | | 2.6574 | NS | 2.227421107 |
| VIT_00s0246g00090 | | 2.2622 | NS | 1.753842747 |
| VIT_00s0246g00120 | | 3.2948 | NS | 2.597688022 |
| VIT_00s0246g00130 | | 2.4436 | NS | 2.538786469 |
| VIT_00s0246g00140 | | 2.9160 | NS | 2.838613244 |
| VIT_00s0246g00150 | | 4.2656 | NS | 3.645124923 |
| VIT_00s0246g00160 | ribosomal protein L32 | 2.4636 | NS | 2.368824803 |
| VIT_00s0246g00170 | cytochrome c biogenesis protein | 2.3343 | NS | NS |
| VIT_00s0246g00180 | | 3.4838 | NS | 3.110966751 |
| VIT_00s0246g00190 | | 4.3076 | NS | 3.992140362 |
| VIT_00s0246g00200 | photosystem I iron-sulfur center | 3.6440 | NS | 3.195240281 |
| VIT_00s0246g00210 | | 2.1064 | NS | 1.744094191 |
| VIT_00s0246g00220 | | 3.3964 | NS | 2.846138561 |
| VIT_00s0246g00230 | | 2.8381 | NS | 2.498019691 |
| VIT_00s0270g00040 | | 2.1308 | NS | NS |
| VIT_00s0275g00030 | | 3.7218 | NS | 2.918002808 |
| VIT_00s0291g00090 | uncharacterized LOC100259633 | 0.8180 | NS | NS |
| VIT_00s0332g00010 | maturase | 2.5224 | NS | 2.092275218 |
| VIT_00s0332g00060 | | 3.367651714 | NS | 2.69296028 |
| VIT_00s0332g00110 | PSII reaction center subunit X | 3.52330504 | NS | 2.987193146 |
| VIT_00s0332g00130 | | 2.727435786 | NS | 2.172472006 |
| VIT_00s0332g00140 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2-like | 2.191804838 | NS | 1.817258979 |
| VIT_00s0332g00160 | | 3.32975273 | NS | 2.742792383 |
| VIT_00s0332g00170 | | 1.908255964 | NS | NS |
| VIT_00s0335g00010 | | 1.837006059 | NS | NS |
| VIT_00s0379g00020 | uncharacterized LOC100263199 | 0.842515993 | NS | 1.667875492 |
| VIT_00s0396g00010 | PSII 43 kDa protein | 2.622740315 | NS | NS |
| VIT_00s0396g00020 | NADH dehydrogenase subunit 1 | 3.489499753 | NS | 2.848044006 |
| VIT_00s0396g00030 | | 3.551535468 | NS | 2.787553101 |
| VIT_00s0396g00050 | ribosomal protein S4 | 2.626595491 | NS | NS |
| VIT_00s0396g00060 | | 3.638457189 | NS | 3.187117347 |
| VIT_00s0404g00030 | | 1.100340673 | NS | NS |
| VIT_00s0429g00040 | aspartic proteinase nepenthesin-2-like | -0.869353384 | NS | NS |
| VIT_00s0438g00010 | | 2.142286334 | NS | 1.6410402 |
| VIT_00s0438g00020 | ATPase subunit 9 | 3.51297402 | NS | 2.640942925 |
| VIT_00s0438g00030 | | 2.542581048 | NS | NS |
| VIT_00s0504g00010 | | 4.014999142 | NS | 3.569200292 |
| VIT_00s0505g00030 | | 2.195310213 | NS | 1.848112358 |
| VIT_00s0505g00040 | | 2.263953305 | NS | 2.118350248 |
| VIT_00s0505g00050 | | 2.888354913 | NS | 2.511132774 |
| VIT_00s0629g00010 | | 2.442484166 | NS | NS |
| VIT_00s0629g00020 | | 2.813502183 | NS | 2.338587235 |
| VIT_00s0733g00010 | | 2.953543208 | NS | 2.403933158 |
| VIT_00s0753g00020 | probable histone H2A. 4-like | 1.364160309 | NS | NS |
| VIT_00s0854g00040 | | 2.499016861 | NS | 2.373876958 |
| VIT_00s0866g00010 | | 2.376370122 | NS | NS |
| VIT_00s0873g00010 | ribosomal protein S12 | 2.52874889 | NS | NS |
| VIT_00s0873g00020 | NADH dehydrogenase subunit 3 | 2.379546607 | NS | NS |
| VIT_00s1211g00020 | uncharacterized LOC100241640 | -0.773405736 | NS | NS |
| VIT_00s1351g00020 | | 1.592225098 | NS | NS |
| VIT_00s1562g00010 | | 0.747953205 | NS | NS |
| VIT_00s1644g00010 | | 0.769701226 | NS | NS |
| VIT_00s1707g00010 | | 3.612328296 | NS | 2.982611683 |
| VIT_00s1739g00010 | | 2.903662241 | NS | 2.302872939 |
| VIT_00s1830g00010 | probable receptor-like protein kinase At1g67000 | 1.063633004 | NS | NS |
| VIT_00s2377g00010 | | 0.894691657 | NS | NS |
| VIT_00s2440g00010 | | 2.61317123 | NS | 2.400971159 |
| VIT_00s2512g00010 | | 4.487490425 | NS | 3.831018325 |
| VIT_00s2608g00010 | | 3.440761451 | NS | 2.765325322 |
| VIT_00s2608g00020 | | 2.419084228 | NS | NS |
| VIT_01s0010g00630 | putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g13630-like | 0.937274791 | NS | 0.877819783 |
| VIT_01s0010g02310 | | 2.682889056 | NS | 1.880546535 |
| VIT_01s0011g00930 | FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 3, chloroplastic-like | 1.075069279 | NS | NS |
| VIT_01s0011g01860 | | 0.860995468 | NS | NS |
| VIT_01s0011g02170 | endoglucanase 5-like | -0.938953911 | NS | NS |
| VIT_01s0011g02860 | protein CHUP1, chloroplastic-like | 0.835882532 | NS | NS |
| VIT_01s0011g03490 | 3-ketoacyl-CoA synthase 6-like | -0.640426495 | NS | NS |
| VIT_01s0011g03940 | | 3.583436786 | NS | 2.744795125 |
| VIT_01s0011g04100 | | 2.091235309 | NS | NS |
| VIT_01s0011g04110 | | 2.809585758 | NS | 2.744210033 |
| VIT_01s0011g04190 | uncharacterized LOC100855409 | 1.598505081 | NS | NS |
| VIT_01s0011g05260 | GAI1 | -0.832235044 | NS | NS |
| VIT_01s0011g05380 | | -2.021676741 | NS | NS |
| VIT_01s0011g05390 | | -0.6736809 | NS | -0.976828042 |
| VIT_01s0011g05970 | heat stress transcription factor A-8-like | -0.853580577 | NS | NS |
| VIT_01s0026g00770 | | 2.540191364 | NS | 2.242977833 |
| VIT_01s0146g00390 | ATPase subunit 8 | 3.268405492 | NS | 2.616952852 |
| VIT_02s0012g00240 | | 2.500478608 | NS | 2.805829566 |
| VIT_02s0012g00250 | | 2.956820835 | NS | 3.606780971 |
| VIT_02s0012g00270 | | 3.062298535 | NS | 2.746559453 |
| VIT_02s0012g03140 | | 3.001931784 | NS | 2.282908641 |
| VIT_02s0025g00700 | | -1.050111087 | NS | NS |
| VIT_02s0025g00810 | cation/H(+) antiporter 18-like | -1.466366838 | NS | -1.236776451 |
| VIT_02s0025g01170 | | 0.734692751 | NS | NS |
| VIT_02s0025g02960 | naringenin, 2-oxoglutarate 3-dioxygenase-like | 0.855118282 | NS | NS |
| VIT_02s0025g03320 | cytochrome P450 86A2-like | -0.901715718 | NS | NS |
| VIT_02s0033g00030 | | 1.063192632 | NS | NS |
| VIT_02s0033g00310 | | 1.006632328 | NS | NS |
| VIT_02s0033g00980 | | 2.067618791 | NS | NS |
| VIT_02s0154g00050 | | 0.737220486 | NS | NS |

p value ≤ 0.05 and | LFC | ≥ 0.6. ns, not significant

Supplementary Table 2. Total genes differentially expressed at mid-veraison among of the different leaf-to-fruit ratio treatment at 59 DAF for 2016 (Continous from previous page)

| Gene ID | Gene function description | PS2LC vs PS12LC | PS6LC vs PS12LC | PS2LC vs PS6LC |
|-------------------|--|-----------------|-----------------|----------------|
| VIT_03s0017g02390 | | 1.215596387 | NS | 1.872581354 |
| VIT_03s0038g01280 | auxin-induced protein 15A-like | 0.820850742 | NS | NS |
| VIT_03s0038g01460 | chalcone synthase A-like | -1.879047092 | NS | NS |
| VIT_03s0038g01510 | uncharacterized LOC100243519 | 1.005413993 | NS | NS |
| VIT_03s0038g01880 | | 1.062309065 | NS | 2.754195956 |
| VIT_03s0038g02780 | 50S ribosomal protein L23 | 2.578250716 | NS | 2.260580794 |
| VIT_03s0038g02790 | | 3.160634195 | NS | 2.700337539 |
| VIT_03s0038g02900 | | 0.627138173 | NS | NS |
| VIT_03s0063g00590 | uncharacterized LOC100854943 | 0.816416055 | NS | NS |
| VIT_03s0063g01140 | polyneuridine-aldehyde esterase-like | 0.71479574 | NS | NS |
| VIT_03s0063g01740 | | 2.226584269 | NS | 2.439462304 |
| VIT_03s0063g01790 | vegetative incompatibility protein HET-E-1-like | -0.930014788 | NS | NS |
| VIT_03s0063g02230 | putative pentatricopeptide repeat-containing protein At3g18840-like | 1.480168444 | NS | 1.899765344 |
| VIT_03s0063g02670 | uncharacterized LOC100853961 | 2.26124451 | NS | NS |
| VIT_03s0091g01220 | | 1.696739164 | NS | 2.365145912 |
| VIT_03s0110g00190 | | 2.329749176 | NS | NS |
| VIT_04s0008g04360 | | 1.432454063 | NS | 2.42546129 |
| VIT_04s0008g05770 | CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 25-like | -0.952879953 | NS | NS |
| VIT_04s0008g06190 | | 1.823112309 | NS | 1.878176923 |
| VIT_04s0023g02200 | benzoate carboxyl methyltransferase-like | -0.644756695 | NS | NS |
| VIT_04s0023g03900 | | -0.684879574 | NS | NS |
| VIT_04s0043g00600 | | 3.1681382 | NS | 3.163195513 |
| VIT_04s0043g01010 | violaxanthin de-epoxidase, chloroplastic-like | 0.716730268 | NS | NS |
| VIT_04s0044g01160 | probable cysteine desulfurase-like | -1.81700749 | NS | -1.956979426 |
| VIT_04s0044g02010 | gibberellin 3-beta-dioxygenase 4-like | -0.188304765 | NS | -1.055971249 |
| VIT_04s0069g01150 | | 2.829132915 | NS | 2.438985502 |
| VIT_04s0079g00620 | | 2.299954013 | NS | 2.366751654 |
| VIT_04s0210g00140 | putative acyl-CoA synthetase Yngl-like | 0.878771568 | NS | NS |
| VIT_05s0020g02000 | | 2.931673238 | NS | 2.558910451 |
| VIT_05s0020g04600 | uncharacterized LOC100252711 | 1.021428844 | NS | NS |
| VIT_05s0029g00260 | | 1.394831634 | NS | 1.978215084 |
| VIT_05s0029g00540 | | 2.139046699 | NS | 2.234408709 |
| VIT_05s0029g01040 | | 2.208850302 | NS | 2.817091132 |
| VIT_05s0029g01260 | | 1.937217092 | NS | 2.49331062 |
| VIT_05s0049g00790 | proline-rich 33 kDa extensin-related protein-like | NS | 2.697995236 | 2.293665191 |
| VIT_05s0049g00800 | uncharacterized LOC100259740 | NS | NS | -1.504442457 |
| VIT_05s0049g00840 | proline-rich 33 kDa extensin-related protein-like | -0.697786438 | NS | -1.071223139 |
| VIT_05s0049g01590 | | 2.67314954 | NS | NS |
| VIT_05s0049g01830 | | -1.070981001 | NS | NS |
| VIT_05s0062g00680 | | 2.083254218 | NS | NS |
| VIT_05s0077g01860 | ethylene-responsive transcription factor RAP2-3-like | -0.838859153 | NS | -0.774498006 |
| VIT_05s0094g00650 | | 0.643480198 | NS | NS |
| VIT_06s0004g00080 | | 1.229557465 | NS | 1.417912188 |
| VIT_06s0004g00370 | | 2.098140761 | NS | 1.988679868 |
| VIT_06s0004g01780 | serine/threonine-protein kinase OX11-like | -1.158189176 | NS | NS |
| VIT_06s0004g02440 | | 2.006234993 | NS | NS |
| VIT_06s0004g02570 | | NS | NS | 1.609404899 |
| VIT_06s0004g02600 | | 1.536101532 | NS | 1.607967787 |
| VIT_06s0004g03050 | fasciclin-like arabinogalactan protein 11-like | 2.010214502 | NS | NS |
| VIT_06s0004g03390 | uncharacterized LOC100260311 | -0.662171425 | NS | NS |
| VIT_06s0004g03530 | nitrate excretion transporter 1-like | 0.744497754 | NS | NS |
| VIT_06s0004g04550 | putative E3 ubiquitin-protein ligase XBAT31-like | -0.909802858 | NS | -0.779242149 |
| VIT_06s0004g05250 | uncharacterized LOC100244977 | -2.373852692 | NS | -3.265629207 |
| VIT_06s0004g05580 | | 3.801101116 | NS | 2.989750564 |
| VIT_06s0004g07410 | | 2.836270297 | NS | 2.62391271 |
| VIT_06s0009g00310 | | -1.24199307 | NS | NS |
| VIT_06s0009g01140 | vacuolar amino acid transporter 1-like | NS | NS | -1.081778855 |
| VIT_06s0009g01550 | | 3.384487544 | NS | 3.01124728 |
| VIT_06s0009g02080 | | 3.404094752 | NS | 3.757392046 |
| VIT_06s0009g03510 | pentatricopeptide repeat-containing protein At5g01110-like | 1.941745664 | NS | 1.328479457 |
| VIT_06s0061g00170 | | 1.200793112 | NS | NS |
| VIT_06s0061g00290 | | 0.620458937 | NS | NS |
| VIT_06s0080g00090 | cytochrome P450 94A1-like | -2.242369784 | NS | NS |
| VIT_06s0080g00720 | germin-like protein 9-3 | 0.641223869 | NS | NS |
| VIT_06s0080g01160 | aspartic proteinase nepenthesin-2-like | -1.479301432 | NS | NS |
| VIT_07s0005g00330 | | 0.633765145 | NS | NS |
| VIT_07s0005g00350 | uncharacterized LOC100853306 | 1.759146992 | NS | NS |
| VIT_07s0005g01040 | probable galacturonosyltransferase-like 7-like | -0.774507306 | NS | NS |
| VIT_07s0005g01430 | protein PROLIFERA-like | -1.774916527 | NS | NS |
| VIT_07s0005g03120 | RING-H2 finger protein ATL1-like | 0.777389597 | NS | NS |
| VIT_07s0005g03590 | | 4.376159419 | NS | 4.144208144 |
| VIT_07s0031g01060 | | 2.798341357 | NS | 3.271101516 |
| VIT_07s0031g01590 | | 0.692966533 | NS | NS |
| VIT_07s0031g01830 | | 3.152806389 | NS | 2.743530239 |
| VIT_07s0031g01950 | | 1.213692743 | NS | NS |
| VIT_07s0031g02600 | | 3.093146865 | NS | 3.400063985 |
| VIT_07s0031g03000 | | 3.037240219 | NS | 2.373083602 |
| VIT_07s0104g00070 | | 1.843925407 | NS | NS |
| VIT_07s0104g00480 | uncharacterized LOC100256371 | 0.625174472 | NS | NS |
| VIT_07s0104g00780 | transmembrane 9 superfamily member 2-like | NS | NS | -2.650888883 |
| VIT_07s0104g00980 | | 2.480384609 | NS | 2.228683713 |
| VIT_07s0104g01280 | | -0.674517634 | NS | NS |
| VIT_07s0129g00370 | | 1.149934521 | NS | NS |
| VIT_07s0129g00790 | | 2.951044862 | NS | 2.270698345 |
| VIT_07s0141g00700 | | 0.762477123 | NS | 0.849342528 |
| VIT_07s0141g01030 | putative disease resistance RPP13-like protein 1-like | 1.313555126 | NS | 1.110905816 |
| VIT_07s0151g00510 | amino-acid acetyltransferase-like | 0.752083702 | NS | NS |
| VIT_07s0191g00200 | | NS | NS | 2.182679125 |
| VIT_08s0007g00390 | | 2.274129666 | NS | 2.648746736 |
| VIT_08s0007g00760 | thaumatin-like protein-like | -1.355129987 | NS | NS |
| VIT_08s0007g01600 | uncharacterized LOC100242619 | -0.67433651 | NS | NS |
| VIT_08s0007g02260 | GDSL esterase/lipase CPRD49-like | 1.009828355 | NS | NS |
| VIT_08s0007g04300 | GDSL esterase/lipase At5g03820-like | -1.554082853 | NS | NS |
| VIT_08s0007g04340 | probable FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1, chloroplastic-like | 0.799346346 | NS | NS |
| VIT_08s0007g05000 | | -0.811758653 | NS | NS |
| VIT_08s0007g06880 | uncharacterized LOC100255639 | -0.631689847 | NS | NS |
| VIT_08s0007g07440 | uncharacterized LOC100250413 | -0.612217145 | NS | NS |
| VIT_08s0007g08600 | | 1.152138648 | NS | 1.318350857 |
| VIT_08s0007g08620 | | NS | NS | 1.089546741 |
| VIT_08s0032g00630 | | 3.268228275 | NS | 3.20127293 |
| VIT_08s0032g00950 | uncharacterized LOC100854533 | -1.601873396 | NS | NS |
| VIT_08s0040g00640 | | 3.120469118 | NS | 2.415632089 |
| VIT_08s0040g01230 | probable auxin efflux carrier component 1c-like | -1.012873706 | NS | NS |
| VIT_08s0040g02140 | | 2.952373192 | NS | 2.287493239 |
| VIT_08s0056g00190 | pyruvate kinase | -0.652609636 | NS | NS |
| VIT_08s0056g00590 | heme-binding protein | 3.542379173 | NS | 2.982691512 |
| VIT_08s0056g00860 | putative pentatricopeptide repeat-containing protein At3g2330-like | 1.319261559 | NS | 1.437985367 |
| VIT_08s0056g01050 | | 2.79492263 | NS | 2.556322027 |
| VIT_08s0056g01060 | | 2.325241986 | NS | NS |

p value ≤ 0.05 and | LFC | ≥ 0.6. ns, not significant

Supplementary Table 2. Total genes differentially expressed at mid-veraison among of the different leaf-to-fruit ratio treatment at 59 DAF for 2016 (Continous from previous page)

| Gene ID | Gene function description | P52LC vs P512LC | P56LC vs P512LC | P52LC vs P56LC |
|-------------------|--|-----------------|-----------------|----------------|
| VIT_09s0002g00310 | | 2.782290037 | NS | NS |
| VIT_09s0002g04540 | | 2.829223693 | NS | 2.444803354 |
| VIT_09s0002g07880 | pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump-like | -0.895778322 | NS | NS |
| VIT_09s0002g08330 | | 3.160309974 | NS | 2.641971012 |
| VIT_09s0002g08340 | | 3.134543881 | NS | 3.592556485 |
| VIT_09s0018g00880 | | 2.138420601 | NS | 2.291720708 |
| VIT_09s0018g02120 | | 0.884900636 | NS | NS |
| VIT_09s0054g00350 | | 2.415031009 | NS | NS |
| VIT_09s0054g00430 | uncharacterized LOC100246222 | 1.565998292 | NS | NS |
| VIT_09s0054g00520 | hypothetical chloroplast RF1 | 2.599181904 | NS | 2.52611399 |
| VIT_09s0054g00760 | | NS | NS | 1.545389889 |
| VIT_09s0070g00450 | | 2.090726097 | NS | NS |
| VIT_09s0070g00850 | | NS | NS | 2.713215701 |
| VIT_09s0070g00890 | | 3.887914107 | NS | 3.586556197 |
| VIT_09s0070g00920 | | 0.698039023 | NS | NS |
| VIT_10s0003g00290 | | NS | NS | 2.084431038 |
| VIT_10s0003g00350 | NAC domain-containing protein 8-like | -0.899156464 | NS | NS |
| VIT_10s0003g01460 | nucleobase-ascorbate transporter 2-like | -0.919154943 | NS | NS |
| VIT_10s0003g02680 | phytochrome E | 0.944773928 | NS | NS |
| VIT_10s0003g04310 | | 3.97404461 | NS | 3.209206224 |
| VIT_10s0003g05060 | | 2.460770812 | NS | NS |
| VIT_10s0042g00240 | | 1.398376507 | NS | NS |
| VIT_10s0071g01060 | pyruvate kinase, cytosolic isozyme-like | -0.703251073 | NS | NS |
| VIT_10s0092g00090 | ribose-5-phosphate isomerase A-like | 0.955153226 | NS | NS |
| VIT_10s0092g00760 | | 2.698350047 | NS | 2.359174491 |
| VIT_10s0092g00770 | cytochrome c biogenesis C | 3.507947745 | NS | 2.939570253 |
| VIT_10s0092g00780 | | 2.825476745 | NS | NS |
| VIT_10s0116g00060 | | 2.168940225 | NS | NS |
| VIT_10s0116g00100 | protein STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 8-like | -0.948116852 | NS | NS |
| VIT_10s0116g00490 | | NS | NS | 2.1237901 |
| VIT_10s0116g00590 | pectinesterase 2.2-like | -0.81314833 | NS | NS |
| VIT_10s0116g00690 | | 1.994804918 | NS | NS |
| VIT_11s0016g00120 | | 1.07487581 | NS | NS |
| VIT_11s0016g01080 | | 0.941603413 | NS | 0.567455549 |
| VIT_11s0016g02030 | | 3.811989904 | NS | 3.530508594 |
| VIT_11s0016g05520 | umecyanin-like | 0.789859895 | NS | NS |
| VIT_11s0037g00670 | | 0.702077275 | NS | NS |
| VIT_11s0037g00840 | uncharacterized LOC100257033 | 1.345679967 | NS | 1.386553631 |
| VIT_11s0037g01170 | | 2.849657592 | NS | 2.395563363 |
| VIT_11s0052g00910 | | 2.128156611 | NS | NS |
| VIT_11s0052g01250 | probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23-like | 1.566303942 | NS | NS |
| VIT_11s0052g01670 | | 2.652864512 | NS | NS |
| VIT_11s0103g00100 | | 3.589756561 | NS | 2.999775997 |
| VIT_11s0103g00110 | | 3.159119215 | NS | 2.855240839 |
| VIT_11s0103g00370 | cadmium/zinc-transporting ATPase 3-like | -1.39332277 | NS | NS |
| VIT_11s0118g00700 | probable protein phosphatase 2C 27-like | -0.729370321 | NS | NS |
| VIT_11s0149g00100 | | NS | NS | 2.118993697 |
| VIT_12s0028g02450 | | 2.705898939 | NS | 2.502012473 |
| VIT_12s0035g00480 | | 1.279077948 | NS | NS |
| VIT_12s0035g01550 | | 2.960872283 | NS | 2.44769272 |
| VIT_12s0035g01820 | probable peptide/nitrate transporter At1g59740-like | -0.639820806 | NS | NS |
| VIT_12s0035g01900 | pectin methyltransferase PME1 | -0.906424158 | NS | NS |
| VIT_12s0055g00080 | | 2.252666228 | NS | NS |
| VIT_12s0055g00090 | | 3.710707438 | NS | 2.529812089 |
| VIT_12s0055g00530 | | 3.299725094 | NS | 2.783900078 |
| VIT_12s0057g00180 | | -1.000617132 | NS | NS |
| VIT_12s0057g00310 | uncharacterized LOC100247755 | -0.90872072 | NS | NS |
| VIT_12s0059g01100 | uncharacterized LOC100246609 | -0.60262007 | NS | NS |
| VIT_12s0059g02430 | photosystem I assembly protein Ycf4 | 3.172276262 | NS | 2.770275265 |
| VIT_12s0134g00050 | | 3.861342199 | NS | 3.655219616 |
| VIT_13s0019g02630 | photosystem II protein D1 | 3.181962759 | NS | 2.326429607 |
| VIT_13s0047g00690 | | 2.466290433 | NS | 2.467903834 |
| VIT_13s0064g01200 | | 1.396887519 | NS | 1.297383265 |
| VIT_13s0064g01760 | beta-glucosidase 13-like | -1.087298526 | NS | -1.400339071 |
| VIT_13s0064g01790 | | 1.773853108 | NS | NS |
| VIT_13s0067g00790 | probable disease resistance protein RDL6/RF9-like | 0.74259579 | NS | NS |
| VIT_13s0067g01850 | | 4.688207661 | NS | 3.904355468 |
| VIT_13s0067g02300 | uncharacterized LOC100267335 | -1.14971987 | NS | -1.162148311 |
| VIT_13s0067g02560 | uncharacterized LOC100241651 | 0.909757883 | NS | NS |
| VIT_13s0067g03310 | | 2.289133261 | NS | NS |
| VIT_13s0067g03670 | | NS | NS | 2.341593845 |
| VIT_13s0073g00180 | | 1.045463471 | NS | NS |
| VIT_13s0101g00200 | | 2.259129847 | NS | NS |
| VIT_13s0101g00210 | | 3.412095852 | NS | 2.480119157 |
| VIT_13s0139g00030 | | 1.525339378 | NS | 1.668005203 |
| VIT_13s0156g00150 | uncharacterized LOC100266637 | 1.019798099 | NS | NS |
| VIT_13s0156g00580 | G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase RLK1 | 2.125477624 | NS | 2.70136051 |
| VIT_13s0158g00210 | putative disease resistance protein At3g14460-like | 1.283685083 | NS | 1.663674414 |
| VIT_13s0158g00260 | | NS | NS | 1.466720436 |
| VIT_13s0158g00300 | | 0.789083989 | NS | NS |
| VIT_14s0006g02190 | uncharacterized LOC100266816 | 1.646989802 | NS | 2.179879171 |
| VIT_14s0006g02300 | | 2.533740725 | NS | 2.361475312 |
| VIT_14s0006g03170 | | 1.991054883 | NS | 2.203145309 |
| VIT_14s0030g00680 | ribosomal protein S4 | 3.052977185 | NS | 2.845884696 |
| VIT_14s0030g01570 | | 1.314180582 | NS | NS |
| VIT_14s0036g01260 | | 0.617138434 | NS | NS |
| VIT_14s0036g01270 | ATP synthase F0 subunit 6 | 2.541431093 | NS | 2.337987421 |
| VIT_14s0060g00980 | uncharacterized LOC100263153 | 0.89816847 | NS | NS |
| VIT_14s0060g01360 | pentatricopeptide repeat-containing protein At1g09190-like | -1.138633345 | NS | NS |
| VIT_14s0066g00610 | uncharacterized LOC100264483 | 1.366988561 | NS | 0.975227336 |
| VIT_14s0066g02590 | probable peptide/nitrate transporter At5g62680-like | -1.270553867 | NS | NS |
| VIT_14s0068g01700 | | 2.618561319 | NS | NS |
| VIT_14s0108g00420 | transcription factor bHLH135-like | -0.656760322 | NS | NS |
| VIT_14s0108g01350 | | 0.983353721 | NS | NS |
| VIT_14s0108g01640 | NADH dehydrogenase subunit 2 | 3.351087676 | NS | 2.816587034 |
| VIT_14s0171g00350 | | 3.710109087 | NS | 3.313611823 |

p value ≤ 0.05 and | LFC | ≥ 0.6. ns, not significant

Supplementary Table 2. Total genes differentially expressed at mid-veraison among of the different leaf-to-fruit ratio treatment at 59 DAF for 2016 (Continious from previous page)

| Gene ID | Gene function description | PS2LC vs PS12LC | PS6LC vs PS12LC | PS2LC vs PS6LC |
|-------------------|---|-----------------|-----------------|----------------|
| VIT_15s0021g01700 | | 1.406141266 | NS | 2.147881014 |
| VIT_15s0021g01930 | | 0.691598694 | NS | NS |
| VIT_15s0021g02540 | | 2.389413338 | NS | NS |
| VIT_15s0021g02570 | | NS | NS | 2.093906988 |
| VIT_15s0024g00090 | | 2.325512615 | NS | 2.147145988 |
| VIT_15s0024g00130 | | 3.342724022 | NS | 2.846768212 |
| VIT_15s0024g00160 | | 2.584906614 | NS | 2.532389558 |
| VIT_15s0024g00200 | | NS | NS | 2.404001177 |
| VIT_15s0024g01960 | | 3.160190241 | NS | 2.591500369 |
| VIT_15s0046g00470 | dynamain-related protein 5A-like | -0.712873353 | NS | NS |
| VIT_15s0046g01100 | | 3.072730317 | NS | 2.718219032 |
| VIT_15s0046g02380 | cytochrome P450 86A2-like | -1.332540821 | NS | NS |
| VIT_15s0046g03210 | | 0.614147599 | NS | NS |
| VIT_15s0046g03540 | | 4.619196121 | NS | 3.76093296 |
| VIT_15s0048g01900 | | 2.13900616 | NS | NS |
| VIT_15s0048g02490 | quercetin 3-O-methyltransferase 1-like | -2.157541389 | NS | NS |
| VIT_15s0048g02500 | thylakoid membrane phosphoprotein 14 kDa, chloroplastic-like | 1.089870686 | NS | NS |
| VIT_15s0048g02660 | NAC domain-containing protein 43-like | -2.046269465 | NS | NS |
| VIT_15s0107g00470 | | NS | NS | 1.78762994 |
| VIT_16s0013g00330 | | 2.593326448 | NS | NS |
| VIT_16s0013g01520 | | 2.265031149 | NS | 2.710796528 |
| VIT_16s0022g00030 | CCR4-NOT transcription complex subunit 1-like | 3.134133213 | NS | 2.771815009 |
| VIT_16s0022g00160 | | 2.983498246 | NS | 2.629338307 |
| VIT_16s0039g00130 | | 2.938779694 | NS | 2.153382168 |
| VIT_16s0039g00380 | 30S ribosomal protein S14 | 3.716678104 | NS | 3.318325463 |
| VIT_16s0039g02350 | | 1.047160723 | NS | NS |
| VIT_16s0039g02360 | | 0.719484098 | NS | NS |
| VIT_16s0039g02530 | | 1.041337818 | NS | NS |
| VIT_16s0098g00260 | | 2.326647904 | NS | NS |
| VIT_16s0098g01250 | metal-nicotianamine transporter YSL3-like | -0.710134573 | NS | NS |
| VIT_16s0115g00110 | | 2.159108883 | NS | 1.956800158 |
| VIT_16s0115g00120 | | 3.740969435 | NS | 4.5041289 |
| VIT_16s0115g00130 | | 3.176877728 | NS | 2.491140109 |
| VIT_16s0115g00470 | | 0.725662332 | NS | NS |
| VIT_17s0000g00060 | | 2.116924045 | NS | NS |
| VIT_17s0000g01620 | uridine kinase-like protein 1, chloroplastic | -1.146339283 | NS | NS |
| VIT_17s0000g02610 | ribosomal protein L22 | 4.063962359 | NS | 3.483069915 |
| VIT_17s0000g02850 | | 0.670605469 | NS | NS |
| VIT_17s0000g03480 | | 1.711431106 | NS | NS |
| VIT_17s0000g03990 | aspartic proteinase nepenthesin-2-like | -0.811967961 | NS | NS |
| VIT_17s0000g04030 | carbin catabolite repressor protein 4 homolog 3-like | 0.700867061 | NS | NS |
| VIT_17s0000g04270 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like | 1.068908494 | NS | NS |
| VIT_17s0000g04470 | | 0.60681855 | NS | NS |
| VIT_17s0000g04590 | | -1.710869933 | NS | -1.570149571 |
| VIT_17s0000g04690 | | 0.641097704 | NS | NS |
| VIT_17s0000g05170 | | NS | NS | 2.372115891 |
| VIT_17s0000g05700 | uncharacterized LOC100262158 | -1.298481427 | NS | NS |
| VIT_17s0000g06990 | | 3.641573266 | NS | 3.093272046 |
| VIT_17s0000g07240 | | 2.084605229 | NS | 2.70888307 |
| VIT_17s0000g07750 | peroxidase 65-like | -2.342010625 | NS | NS |
| VIT_17s0000g08250 | | 2.975961321 | NS | 2.334659212 |
| VIT_17s0000g08310 | | NS | NS | 2.092910046 |
| VIT_17s0000g08320 | | 2.905478014 | NS | 2.577484095 |
| VIT_17s0000g08350 | | 2.555546113 | NS | 2.912881894 |
| VIT_17s0000g09030 | | -1.12020311 | NS | -0.762723277 |
| VIT_17s0000g10020 | | 3.084481776 | NS | 2.645612127 |
| VIT_17s0053g00440 | | 2.780832831 | NS | 2.75959919 |
| VIT_17s0053g00810 | | 1.203264291 | NS | NS |
| VIT_17s0119g00280 | miraculin-like | NS | 2.774045837 | -3.525309388 |
| VIT_18s0001g01740 | uncharacterized LOC100245350 | 1.95522803 | NS | 2.203622577 |
| VIT_18s0001g02140 | | -1.270558024 | NS | NS |
| VIT_18s0001g02580 | | 0.618741691 | NS | NS |
| VIT_18s0001g03090 | | -2.229312293 | NS | NS |
| VIT_18s0001g05400 | | -0.693507655 | NS | NS |
| VIT_18s0001g06230 | | 4.075203342 | NS | NS |
| VIT_18s0001g08390 | | 0.663392066 | NS | 3.689374994 |
| VIT_18s0001g08620 | | 2.794144981 | NS | 2.395252866 |
| VIT_18s0001g09110 | F-box/kelch-repeat protein At5g43190-like | 1.867898897 | NS | 1.669818998 |
| VIT_18s0001g10630 | | 2.247339808 | NS | NS |
| VIT_18s0001g10640 | | 1.994547969 | NS | NS |
| VIT_18s0001g10850 | patatin group A-3-like | -0.665834723 | NS | NS |
| VIT_18s0001g11550 | | 3.054593936 | NS | 2.661878662 |
| VIT_18s0001g11600 | vegetative incompatibility protein HET-E-1-like | -1.017050694 | NS | NS |
| VIT_18s0001g12650 | | -1.734735566 | NS | NS |
| VIT_18s0001g15100 | flavin-containing monooxygenase YUCCA10-like | NS | NS | -2.853528034 |
| VIT_18s0001g15570 | uncharacterized LOC100267803 | 0.948089734 | NS | 0.892326178 |
| VIT_18s0041g00050 | | 0.740544688 | NS | NS |
| VIT_18s0041g01270 | amino acid permease 2-like | -0.754683268 | NS | NS |
| VIT_18s0041g01560 | | 0.840373756 | NS | NS |
| VIT_18s0041g02400 | | 1.847449451 | NS | NS |
| VIT_18s0076g00100 | | 2.832384561 | NS | 2.88309117 |
| VIT_18s0089g00090 | | 2.141747908 | NS | NS |
| VIT_18s0089g00100 | | 0.796650765 | NS | 0.74425508 |
| VIT_18s0089g00600 | | 2.320769262 | NS | 2.867581704 |
| VIT_18s0117g00180 | pentatricopeptide repeat-containing protein At5g57250, mitochondrial-like | NS | NS | 1.221871189 |
| VIT_18s0117g00250 | pentatricopeptide repeat-containing protein At5g55840-like | 2.272318606 | NS | 2.016847652 |
| VIT_18s0122g00390 | | -1.896181327 | NS | NS |
| VIT_19s0014g00360 | | -0.965715188 | NS | NS |
| VIT_19s0014g01580 | | 1.337638178 | NS | NS |
| VIT_19s0014g02510 | | 4.031427448 | NS | 2.86043209 |
| VIT_19s0014g02520 | 50S ribosomal protein L14 | 3.009104582 | NS | 2.598906482 |
| VIT_19s0015g00670 | | 2.299638654 | NS | 2.478520267 |
| VIT_19s0015g02800 | | 2.887137257 | NS | 2.481417954 |
| VIT_19s0027g00800 | | 3.07495253 | NS | 2.598927894 |
| VIT_19s0085g00110 | | 2.889970321 | NS | 2.55296214 |
| VIT_19s0085g00320 | | 2.122441824 | NS | NS |
| VIT_19s0085g00430 | | 1.559410756 | NS | NS |
| VIT_19s0085g00530 | | -1.152841743 | NS | NS |
| VIT_19s0085g00800 | | 0.830819368 | NS | NS |
| VIT_19s0085g01210 | protein SOMBRERO-like | NS | NS | -2.612282825 |
| VIT_19s0090g01180 | brain protein 44-like | 1.245561444 | NS | NS |
| VIT_19s0135g00230 | secologanin synthase-like | 0.721908179 | NS | NS |
| VIT_19s0138g00110 | | NS | NS | 1.996504072 |
| VIT_19s0140g00040 | uncharacterized LOC100853081 | 2.883259984 | NS | 2.246741701 |
| VIT_19s0177g00090 | | -1.108149784 | NS | NS |

p value ≤ 0.05 and |LFC| ≥ 0.6. ns, not significant

VII- References

1. GIEC: **IPCC : Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.** Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA 2013:1535.
2. Dai ZW, Ollat N, Gomès E, Decroocq S, Tandonnet J-P, Bordenave L, Pieri P, Hilbert G, Kappel C, van Leeuwen C *et al*: **Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: a review.** *American Journal of Enology and Viticulture* 2011, **62**(4):413-425.
3. Webb LB, Watterson I, Bhend J, Whetton PH, Barlow EWR: **Global climate analogues for winegrowing regions in future periods: projections of temperature and precipitation.** *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2013, **19**(3):331-341.
4. Van Leeuwen C, Darriet P: **The Impact of Climate Change on Viticulture and Wine Quality.** *Journal of Wine Economics* 2016, **11**(01):150-167.
5. Bonnefoy C, Quenol H, Bonnardot V, Barbeau G, Madelin M, Planchon O, Neethling E: **Temporal and spatial analyses of temperature in a French wine-producing area: the Loire Valley.** *International Journal of Climatology* 2012, **33**(8):1849-1862.
6. Schultz H, Stoll M: **Some critical issues in environmental physiology of grapevines: future challenges and current limitations.** *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2010, **16**:4-24.
7. Pastore C, Allegro G, Valentini G, Muzzi E, Filippetti I: **Anthocyanin and flavonol composition response to veraison leaf removal on Cabernet Sauvignon, Nero d'Avola, Raboso Piave and Sangiovese Vitis vinifera L. cultivars.** *Scientia Horticulturae* 2017, **218**:147-155.
8. Diago M, Martinez De Toda F, Poni S, Tardaguila J: **Early leaf removal for optimizing yield components, grape and wine composition in Tempradillo (Vitis vinifera L) Sixteenth symposium of the group of international experts of vitivinicultural systems for cooperation 2009, University of California, Davis:1113-1118.**
9. Poni S, Casalini L, Bernizzoni F, Civardi S, Intrieri C: **Effects of early defoliation on shoot photosynthesis, yield components, and grape composition.** *American Journal of Enology and Viticulture* 2006, **57**(4):397-407.
10. Risco D, Pérez D, Yeves A, Castel JR, Intrigliolo DS: **Early defoliation in a temperate warm and semi-arid Tempranillo vineyard: vine performance and grape composition.** *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2013, **20**(1):111-122.
11. Pastore C, Zenoni S, Fasoli M, Pezzotti M, Tornielli G, Filippetti I: **Selective defoliation affects plant growth, fruit transcriptional ripening program and flavonoid metabolism in grapevine.** *BMC Plant Biology* 2013, **13**:30.
12. Coombe B: **The effect of removing leaves, flowers and shoot tips on fruit-set in Vitis vinifera L.** *J Hort Sci* 1962, **37**:1 - 15.
13. Poni S, Bernizzoni F, Civardi S: **The effect of early leaf removal on whole-canopy gas exchange and vine performance of Vitis vinifera L Sangiovese.** *Vitis* 2008, **47**(1):1 - 6.
14. Tardaguila J, Diago MP, De Martinez Toda F, Poni S, Vilanova M: **Effects of timing of leaf removal on yield, berry maturity, wine composition and sensory properties of CV. grenache grown under non irrigated conditions.** *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin* 2008, **42**(4):221-229.
15. Bobeica N, Poni S, Hilbert G, Renaud C, Gomès E, Delrot S, Dai Z: **Differential responses of sugar, organic acids and anthocyanins to source-sink modulation in Cabernet Sauvignon and Sangiovese grapevines.** *Frontiers in Plant Science* 2015, **6**:382.
16. Edwards EJ, Smith J, Walker A, Barril C, Boettcher A, Foster D: **Targeted manipulation of vine balance : does vine balance directly affect fruit composition ?** *Proceedings - Sixteenth Australian Wine Industry Technical Conference* 2017:96-100.
17. Parker AK, Hofmann RW, van Leeuwen C, McLachlan ARG, Trought MCT: **Manipulating the leaf area to fruit mass ratio alters the synchrony of total soluble solids accumulation and titratable acidity of grape berries.** *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2015, **21**(2):266-276.
18. Mozzon M, Savini S, Boselli E, Thorngate JH: **The herbaceous character of wines.** *Italian Journal of Food Science* 2016, **28**:190-207.
19. Šuklje K, Lisjak K, Baša Česnik H, Janeš L, Du Toit W, Coetzee Z, Vanzo A, Deloire A: **Classification of Grape Berries According to Diameter and Total Soluble Solids To Study the Effect of Light and Temperature on Methoxypyrazine, Glutathione, and Hydroxycinnamate Evolution during Ripening of Sauvignon blanc (Vitis vinifera L.).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012, **60**(37):9454-9461.
20. Martin D, Grose C, Fedrizzi B, Stuart L, Albright A, McLachlan A: **Grape cluster microclimate influences the aroma composition of Sauvignon blanc wine.** *Food Chemistry* 2016, **210**:640-647.
21. Poni S, Gatti M, Bernizzoni F, Civardi S, Bobeica N, Magnanini E, Palliotti A: **Late leaf removal aimed at delaying ripening in cv. Sangiovese: physiological assessment and vine performance.** *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2013, **19**(3):378-387.
22. Wu B-H, Niu N, Li J-H, Li S-H: **Leaf:fruit ratio affects the proteomic profile of grape berry skins.** *Journal of the American Society for Horticultural Science* 2013, **138**(6):416-427.
23. Mullins MG, Rajasekaran K: **Fruiting cuttings:revised method for producing test plants of grapevine cultivars.** *American Journal of Enology and Viticulture* 1981, **32**:35-40.

24. Torres N, Hilbert G, Goicoechea N, Antolin C: **Berry metabolite profiling on *Vitis vinifera* L. cv Tempranillo subjected to deficit irrigation under elevated temperatures.** *Reviewed by Journal of Food Composition and Analysis* 2017(62):51-62.
25. Hilbert G, Soyer JP, Molot C, Giraudon J, Milin S, Gaudillere JP: **Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot.** *Vitis* 2003, **42**(2):69-76.
26. Acevedo De la Cruz A, Hilbert G, Rivière C, Mengin V, Ollat N, Bordenave L, Decroocq S, Delaunay J-C, Delrot S, Mérillon J-M *et al*: **Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. accessions by using LC-MS and LC-NMR.** *Analytica Chimica Acta* 2012, **732**(0):145-152.
27. Helwi P, Habran A, Guillaumie S, Thibon C, Hilbert G, Gomes E, Delrot S, Darriet P, van Leeuwen C: **Vine Nitrogen Status Does Not Have a Direct Impact on 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in Grape Berries and Wines.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2015, **63**(44):9789-9802.
28. **R: A language and environment for statistical computing.** [<http://www.R-project.org/>]
29. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J: **qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data.** *Genome Biology* 2007, **8**(2):R19.
30. Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST: **An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development.** *BMC Plant Biology* 2006, **6**.
31. Kim D, Perteau G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL: **TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions.** *Genome Biology* 2013, **14**(4):R36.
32. Anders S, Pyl PT, Huber W: **HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data.** *Bioinformatics* 2014, **31**(2):166-169.
33. Love MI, Huber W, Anders S: **Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.** *Genome Biology* 2014, **15**(12).
34. Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.** *Journal of the Royal Statistical Society Serie B (Methodological)* 1995, **57** (1):289-300.
35. Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbig J, Muller L, Rhee S, Stitt M: **MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes.** *Plant Journal* 2004, **37**:914 - 939.
36. Kliewer WM, Dokoozlian NK: **Leaf area/crop weight ratios of grapevines: influence on fruit composition and wine quality.** *American Journal of Enology and Viticulture* 2005, **56**(2):170-180.
37. Kliewer WM: **Changes in the concentration of free amino acids in grape berries during maturation.** *American Journal of Enology and Viticulture* 1968, **19**(3):166-174.
38. lafourcade L, Guimberteau: **Proline Accumulation in Developing Grapevine Fruit Occurs Independently of Changes in the Levels of Delta¹-Pyrroline-5- Carboxylate Synthetase mRNA or Protein¹.** *Plant Physiology* 1999, **120**:923-931.
39. Friedel M, Stoll M, Patz CD, Will F, Dietrich H: **Impact of light exposure on fruit composition of white 'Riesling' grape berries (*Vitis vinifera* L.).** *Vitis-Journal of Grapevine Research* 2015, **54**(3):107-116.
40. Dunlevy J, Soole K, Perkins M, Dennins E, Keyzers R, Kalua C, Boss P: **Two O-methyltransferases involved in the biosynthesis of methoxy-pyrazines: grape-derived aroma compounds important to wine flavour.** *Plant Mol Biol* 2010, **74**:77-89.
41. Guillaumie S, Ilg A, Réty S, Brette M, Trossat-Magnin C, Decroocq S, Léon C, Keime C, Ye T, Baltenweck-Guyot R *et al*: **Genetic analysis of the biosynthesis of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, a major grape-derived aroma compound impacting wine quality.** *Plant Physiology* 2013, **162**(2):604-615.
42. Ryona I, Leclerc S, Sacks GL: **Correlation of 3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazine to 3-Isobutyl-2-hydroxypyrazine during Maturation of Bell Pepper (*Capsicum annuum*) and Wine Grapes (*Vitis vinifera*).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010, **58**(17):9723-9730.
43. Belancic A, Agosin E: **Methoxy-pyrazines in grapes and wines of *Vitis vinifera* cv. Carmenere.** *Am J Enol Vitic* 2007, **58**:462-469.
44. Scheiner JJ, Sacks GL, Pan B, Ennahli S, Tarlton L, Wise A, Lerch SD, Vanden Heuvel JE: **Impact of Severity and Timing of Basal Leaf Removal on 3-Isobutyl-2-Methoxy-pyrazine Concentrations in Red Winegrapes.** *American Journal of Enology and Viticulture* 2010, **61**(3):358-364.
45. Xiong L, Zhu J-K: **Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis.** *Plant Physiology* 2003, **133**(1):29-36.
46. Böttcher C, Boss PK, Davies C: **Acyl substrate preferences of an IAA-amido synthetase account for variations in grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening caused by different auxinic compounds indicating the importance of auxin conjugation in plant development.** *Journal of Experimental Botany* 2011, **62**(12):4267-4280.
47. Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, Tillett RL, Quilici DR, Osborne C, Schooley DA, Schlauch KA, Cushman JC, Cramer GR: **Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development.** *BMC Genomics* 2007, **8**(1):429.
48. Chong J, Piron M-C, Meyer S, Merdinoglu D, Bertsch C, Mestre P: **The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*.** *Journal of Experimental Botany* 2014, **65**(22):6589-6601.
49. Lecourieux F, Kappel C, Lecourieux D, Serrano A, Torres E, Arce-Johnson P, Delrot S: **An update on sugar transport and signalling in grapevine.** *Journal of Experimental Botany* 2014, **65**(3):821-832.

50. Falginella L, Castellarin SD, Testolin R, Gambetta GA, Morgante M, Di Gaspero G: **Expansion and subfunctionalisation of flavonoid 3',5'-hydroxylases in the grapevine lineage.** *BMC Genomics* 2010(11):562.
51. Falginella L, Castellarin S, Testolin R, Gambetta G, Morgante M, Di Gaspero G: **Expansion and subfunctionalisation of flavonoid 3',5'-hydroxylases in the grapevine lineage.** *BMC Genomics* 2010, **11**(1):562.
52. Bogs J, Ebadi A, McDavid D, Robinson S: **Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development.** *Plant Physiology* 2006, **140**:279 - 291.
53. Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, Esaka M: **Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*).** *Plant Science* 2006, **170**:61-69.
54. Castellarin S, Di Gaspero G: **Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines.** *BMC Plant Biology* 2007, **7**(1):1-10.
55. Dunlevy JD, Dennis EG, Soole KL, Perkins MV, Davies C, Boss PK: **A methyltransferase essential for the methoxypyrazine-derived flavour of wine.** *The Plant Journal* 2013, **75**(4):606-617.
56. Thibon C, Cluzet S, Mérillon JM, Darriet P, Dubourdieu D: **3-Sulfanylhexanol Precursor Biogenesis in Grapevine Cells: The Stimulating Effect of *Botrytis cinerea*.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011, **59**(4):1344-1351.
57. Kobayashi H, Takase H, Kaneko K, Tanzawa F, Takata R, Suzuki S, Konno T: **Analysis of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-l-cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines.** *American Journal of Enology and Viticulture* 2010, **61**(2):176-185.
58. Podolyan A, White J, Jordan B, Winefield C: **Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of Sauvignon Blanc.** *Functional Plant Biology* 2010, **37**(8):767-784.
59. Effmert U, Saschenbrecker S, Ross J, Negre F, Fraser CM, Noel JP, Dudareva N, Piechulla B: **Floral benzenoid carboxyl methyltransferases: From in vitro to in planta function.** *Phytochemistry* 2005, **66**(11):1211-1230.
60. Hugueney P, Provenzano S, Verriès C, Ferrandino A, Meudec E, Batelli G, Merdinoglu D, Cheyner V, Schubert A, Ageorges A: **A novel cation-dependent O-methyltransferase involved in anthocyanin methylation in grapevine.** *Plant Physiology* 2009, **150**:2057-2070.
61. du Plessis K, Young PR, Eyéghé-Bickong HA, Vivier MA: **The Transcriptional Responses and Metabolic Consequences of Acclimation to Elevated Light Exposure in Grapevine Berries.** *Frontiers in Plant Science* 2017, **8**.
62. Nunan KJ, Sims IM, Bacic A, Robinson SP, Fincher GB: **Changes in cell wall composition during ripening of grape berries.** *Plant Physiology* 1998, **118**:783-792.
63. Sun T, Xu L, Sun H, Yue Q, Zhai H, Yao Y: **VvVHP1; 2 Is Transcriptionally Activated by VvMYBA1 and Promotes Anthocyanin Accumulation of Grape Berry Skins via Glucose Signal.** *Frontiers in Plant Science* 2017, **8**:1-14.
64. Zhang XR, Luo GG, Wang RH, Wang J, Hilmerick DG: **Growth and developmental responses of seeded and seedless grape berries to shoot girdling.** *J Am Soc Hort Sci* 2003, **128**.
65. Sun L, Zhang M, Ren J, Qi J, Zhang G, Leng P: **Reciprocity between abscisic acid and ethylene at the onset of berry ripening and after harvest.** *BMC Plant Biology* 2010, **10**:257.

CHAPITRE III: Effet de l'utilisation d'acide abscissique exogène couplée à la modulation du ratio sources-puits sur le métabolisme de la baie de raisin : du transcriptome de la baie à l'analyse sensorielle du vin.

Le chapitre 3 de ce manuscrit se compose d'un projet de publication pour le journal JExBot.

Cet article présente l'impact de la modification du ratio Fe/Fr couplée ou non à l'utilisation d'ABA sur la baie de raisin chez *Vitis vinifera* cv. Cabernet-sauvignon au sein d'une parcelle de production de 30 ans du Château Couhins (appellation Pessac-Léognan) lors des millésimes 2016 et 2017.

Compte tenu du gel tardif survenu au mois de Mai 2017 sur la région bordelaise, un changement du dispositif expérimental a dû avoir lieu entre les deux millésimes et a eu pour conséquence un changement de parcelles ainsi que du porte-greffe associé (porte-greffe Fercal en 2016; et porte-greffes Fercal, 4010 Cl et 101-14 MGt en 2017). Compte tenu de la différence de porte-greffes entre les deux millésimes et au sein du millésime 2017, une variabilité importante lors de nos analyses aurait pu être observée mais cela n'a pas été le cas. Ce gel tardif nous aura aussi empêché de voir l'effet cumulatif au vignoble sur deux millésimes des traitements de modulation du ratio sources-puits couplés ou non à l'ajout d'ABA exogène ; ce qui était initialement notre objectif.

Ce travail a permis une analyse complète de l'impact de la modulation du ratio Fe/Fr couplée ou non à l'ajout d'ABA exogène sur les baies réalisé avant la véraison vis-à-vis (i) de la physiologie de la plante, (ii) de la composition biochimique de la baie de raisin en métabolites primaires et secondaires, (iii) de la typicité des vins obtenus via une analyse sensorielle des vins produits ainsi que (iv) de l'impact sur le transcriptome de la baie. Ce dernier point a été évalué à la fois de façon globale via une analyse de type RNAseq réalisée sur les baies à mi-véraison pour le millésime 2017 ; et de manière plus ciblée au cours du développement de la baie aux travers des analyses de qPCR en temps réel de type Fluidigm effectuées sur les millésimes 2016 et 2017 et ceci afin d'identifier l'impact de la modulation du ratio sources-puits et/ou de l'ajout ABA sur le transcriptome de la baie. Deux stades de modulation du ratio Fe/Fr ont aussi été comparés à savoir stade petit pois (EL 31) et pré-véraison.

Cette étude confirme les résultats obtenus en serre concernant l'effet de l'effeuillage sur les métabolites primaires et secondaires (sucres, acides organiques, acides aminés, anthocyanes) et prouve par ailleurs que l'ajout d'ABA couplé à la modulation du ratio Fe/Fr permet de lutter contre la diminution de concentration en anthocyanes, relative à la modification du ratio Fe/Fr au sein des baies, sans pour autant modifier la typicité du vin produit.

De plus, de nouveaux gènes candidats relatifs à la photosynthèse, au métabolisme du carbone tel que la phosphoribulokinase, au métabolisme secondaire (*VviLDOX*, *VviUFGT*, *VviFAOMT*, (+)-neomenthol dehydrogenase, AKR (*VIT_08s0007g01040*)) ou à la transduction de signal par les hormones ont été identifiés comme marqueurs potentiels pouvant expliquer les modifications observées au niveau biochimique sur baies, moûts et vins obtenus en réponse à la modulation du ratio Fe/Fr.

D'autres marqueurs d'expression potentiels ont également été identifiés en réponse à l'ajout d'ABA exogène suite à l'analyse des données de RNAseq obtenues à mi-véraison. Plus particulièrement, des gènes relatifs aux voies de biosynthèses des flavonoïdes et des anthocyanes tels que l'UDP-glucose flavonoïde 3-O-glucosyltransferase 6-like (*VIT_12s0034g00130*), au encore liés aux voies de biosynthèse des stilbènes et des arômes. Les données des analyses plus ciblées effectuées par qPCR en temps réel via la méthode Fluidigm concernant l'effet de l'ABA sur la cinétique d'expression de gènes clefs au cours du développement et de la maturation de la baie sont quant à elles toujours en cours d'analyse et d'interprétation compte tenu de l'obtention tardive de ces résultats.

Effect of exogenous abscisic acid and source-sink modulation on berry metabolism from transcriptome remodelling to wine perception.

E. Brouard ¹, L. Wang ¹, C. Thibon², G. Hilbert¹, C. Keime³, I Merlin¹, C. Renaud ¹, J. Cosson¹, C. Trossat-Magnin¹, Y. Gibon^{4,5}, S. Delrot¹, P. Darriet², E. Gomès¹, Z. Dai¹, S. Guillaumie¹.

¹ : UMR1287 Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne, Bordeaux Sciences Agro, INRA, Université de Bordeaux, ISVV, 33882 Villenave d'Ornon ;

² : EA 4577/USC 1366 Oenologie, Université de Bordeaux, INRA, ISVV, 33882 Villenave d'Ornon;

³ : Univ. de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBGMC), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U 964, Centre National de Recherche Scientifique UMR 7104, 67404 Illkirch, France.

⁴ : UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie, INRA, Université de Bordeaux, 33882 Villenave d'Ornon;

⁵ : Plateforme Métabolome du Centre de Génomique Fonctionnelle Bordeaux, MetaboHUB, INRA, 33882 Villenave d'Ornon

Keywords: *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon, typicality, canopy management, leaf-to-fruit ratio, abscisic acid, berry composition, Fluidigm real-time PCR, RNAseq, microvinification, sensory analysis

I-Introduction

The effects of climate change are far from diminishing and forecasts for the coming years are far from optimistic. Some IPCC scenarios predict a rise in global average temperature of about 5°C by the end of the 21st century with 1.5°C increase in average temperature by 2040 (GIEC, 2018). The wine producing regions will be affected by climate change, which will generally induce physiological changes in the vines but also influence the number of days between flowering and maturity (Dai *et al.*, 2011; Van Leeuwen and Darriet, 2016; Webb *et al.*, 2013). In order to counteract the increase in temperature, wine growers have been developing novel methods of cultivation, for example the use of growth regulators (Palliotti *et al.*, 2014) such as abscisic acid (ABA). ABA has several known roles such as promoting the onset of berry ripening (Deytieux-Belleau *et al.*, 2007), berry coloring and enhancing anthocyanin accumulation (Gambetta *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2004), and sugar accumulation triggering (Lecourieux *et al.*, 2010). To improve the quality of the wine, harvesting can be done earlier in the season, which avoids collecting over-ripe grapes whose biochemical composition is no longer properly balanced (Van Leeuwen and Darriet, 2016). Some physiological manipulations of the vine can also reduce the undesirable effects. This is the case of leaf-stripping, for example, which consists in reducing the canopy by leaving only a certain number of leaves on the vines (Palliotti *et al.*, 2014). These different practices may also impact the amount of metabolites synthesized during berry growth and maturation (Parker *et al.*, 2016).

Impacts of leaf-to-fruit ratio (LFR) modulation on sugars correlated with other grape berry metabolites have not been extensively described or not wide enough (taking into account primary metabolites, as sugar, anthocyanins, organic acid and amino acids, and also secondary metabolite, as aromas) in the same study.

Recently the complexity involved in the reprogramming of berry transcriptome during the growth and ripening has been progressively described in different grapevine cultivars (Agudelo-Romero *et al.*, 2013; Anesi *et al.*, 2015; Balic *et al.*, 2018; Dal Santo *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2015; Sweetman *et al.*, 2012; Zenoni *et al.*, 2010). However little is known about the effect of canopy management on berry transcriptome. To the best of our knowledge, only

one RNAseq transcriptome study focused on pre-flowering leaf defoliation was related to the effect of leaf-stripping practice on berry transcriptome (Zenoni *et al.*, 2017).

It is also known that grape berry development involves the integration of multiple hormonal signals such as the abscisic acid (ABA). ABA seems to play a stronger role during ripening and its crosstalk with other growth regulators has been proposed at different berry stages (Fortes *et al.*, 2015). Using exogenous ABA was shown and used to promote anthocyanin biosynthesis and increased expression of flavonoid synthesis genes in table grapes (Ferrara *et al.*, 2015; Koyama *et al.*, 2014; Koyama *et al.*, 2018; Neto *et al.*, 2017; Peppi *et al.*, 2006). Despite the amount of information already reported, hormonal control in grape ripening is still poorly understood. Thus, only one genome-wide transcriptome analysis focused on ABA signalling network in berry was performed (Pilati *et al.*, 2017).

In this context, the identification of molecular markers, addressing the question of the link between LFR modulation, ABA utilisation and favourable metabolic changes in berry represents a huge challenge.

The aim of the present study was to establish if modulating the LFR could be a technical practice in order to reduce sugar content (alcohol content in wines) without altering quality and wine typicality, an outstanding challenge for wine industry. Furthermore, the impact of ABA coupled with the manipulation of the canopy was studied and compared to the methods and stages of leaf-stripping performed. This study was focused on the agronomic, physiological, biochemical and transcriptome remodelling mechanisms that occurred during canopy modification and ABA treatment. The final aim was to increase the actual knowledge and have a better understanding of relationships between berry gene expression, biochemical composition, and after on the wine composition in response to canopy modification associated or not to ABA utilisation to provide an adaptation strategy at short and mid-terms to maintain a qualitative berry and wine production coping with climate change issues. Both metabolite profiling, transcriptome remodelling, wine sensory analysis have been quantified to provide a comprehensive view of the effects of LFR modulation coupled or not to ABA use on berry biochemical composition and wine typicality.

II- Materiel and Methods

A) Location, vine material and experimental set up

Experiments were set up in a commercial vineyard (Château Couhins) located in Pessac-Léognan area (Bordeaux, France) with a planting density of 6667 vines ha⁻¹. The experimental study was conducted on *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon vines in 2016 and 2017 planted in 1986 (clone 337 grafted on Fercal in 2016, and clone 337 grafted on Fercal, 4010 Cl and 101-14 MGt in 2017).

On each plot, four treatments of leaf-to-fruit (LFR) ratios were compared. Each treatment was repeated by at least three randomized replicates of 5 vines each. In 2016, 55 plants were divided in three source-to-sink ratios at 28 days after flowering (DAF) corresponding to the pea-size stage (PP) and one source-to-sink ratio modification was done at 61 DAF corresponding to pre-veraison stage (PV). At 28 DAF, the three treatments were two times six leaves conserved per cluster (LC), two times twelve leaves, and one time twelve leaves with secondary shoots conserved per cluster and named as PS6LC, PS12LC and PS12LC+SS (Sup Fig 1). At 55 DAF, a modification of the source-to-sink ratio was done on one repetition of the PS12LC treatment to obtain 6LC and named PV6LC (Sup Fig 2.B). At PV stage, we sprayed ABA at 400mg L⁻¹ on bunches of the 6LC treatments done at PS stage (PS6LC_ABA) and PV stage (PV6LC_ABA) (Sup Fig 2). To summarize five treatments were obtained: PS12LC, PS12LC+SS, PS6LC, PS6LC_ABA and PV6LC_ABA. The leaves removed were the upper leaves depending of each treatment. The PS12LC treatment was considered as the control one.

In 2017, a change of vines used has to be done due to a frost period in May. The same protocol of source-to-sink ratio treatments was developed at pea-size stage (21DAF) and at pre-veraison stage (56DAF) on 47 plants of another plot adjoining the vines used in 2016 (Sup Fig 1 and 2). ABA was sprayed two times in 2017, at 56 and 61 DAF because of rain after the first treatment.

The remaining leaves and all secondary shoots were removed over the measurement trust period for each year. The plants were randomly assigned to three blocks and each block composed of three to five plants of each treatment.

Berries were sampled eight times at 33, 40, 61, 70, 80, 90, 100, 110 DAF in 2016 and at 22, 35, 55, 64, 76, 89, 102, 112 DAF in 2017. Mid-veraison was determined at the time when 50 % of the berries were soft and corresponded to 70 and 64 DAF in 2016 and 2017 respectively. At each sampling date, approximately 50 berries were sampled in a randomized way from the top, the middle and the bottom of all the clusters which represented one biological replicate. Three biological replicates were obtained for each treatment at each sampling date. At maturity (110 and 112 DAF in 2016 and 2017 respectively with a Brix degree of the PS12LC control treatment $\geq 20^\circ$), all remaining berries were sampled.

All berries were frozen immediately in liquid nitrogen, counted and weighed. They were after ground and stored at -80°C until further analysis.

B) Agronomic measurements

- Leaf area

The number of leaves and the number of primary shoot per plant were evaluated, then ten leaves by treatment by replicate were measured (length and width) except for the PS12LC+SS treatment. For this treatment, the plants were photographed on a red background. The images obtained are still being analyzed. Data obtained were used to determine the leaf area (LA) per leaf and the LA per primary shoot and per bunch (Montero *et al.*, 2000).

- Vine Water Status

Vine water status was assessed three times during each vintage by means of leaf water potential measurements. Measures were carried out before the sunrise with a pressure chamber on one leaf per biological replicates (Turner, 1988).

We also measured the water status of the plant at maturity by carbon isotopic discrimination in grape sugars at harvest ($\delta^{13}\text{C}$). This is an integrated assessment of water status during ripening (Van Leeuwen *et al.*, 2009).

Yield was determined for each treatment at harvest by weighing all bunches per vine per replicate.

- Dualex measurement

One measure of Dualex was done on the grape leaves to compare the effect of LFR on polyphenols contents (anthocyanins and flavonols) in the epidermis, chlorophyll content in leaves, and calculated the nitrogen status with the Nitrogen Balance Index (NBI) which is the ratio Chlorophyll/Flavonols (related to Nitrogen/Carbon allocation) (Cerovic *et al.*, 2015; Goulas *et al.*, 2004).

C) Environmental measurements

The bunch zone temperature of each treatment was registered by the use of temperature captors put along the grape stalk for both years and within the berries in 2017.

D) Berry biochemical composition

Primary and secondary metabolite contents of harvested berries were evaluated.

- Abscisic acid

Aliquots of 250 mg fresh weight (FW) of frozen powdered berry material were dried and used to perform the extraction of abscisic acid (ABA). The extraction was done as described by Speirs *et al.* (2013) overnight at 4 °C in 500 µl 20% aqueous methanol. After centrifugation, a deuterated internal standard (300 µl, containing D3-7',7',7'-PA and - dihydrophaseic acid, D5-4,5,8',8',8'-ABA-GE and D6-3',5',5',7',7',7'-ABA, all at a concentration of 10ng mL⁻¹) was added to the supernatants. Phenomenex SPE columns (60mg mL⁻¹: 8B-S100-UAK) were equilibrated with 1mL methanol and 1mL nanopure water as per the manufacturer's instructions. The samples were loaded onto the columns, washed with 20% aqueous methanol (1mL), and eluted with 90% aqueous methanol (1mL). The eluate was dried in a vacuum centrifuge and dissolve in 30µL of 70% aqueous methanol and an aliquot of 20µL was used for analysis into LC-MS-MS.

- Sugars, organic acids and amino acids

Aliquots of 500mg FW of frozen powdered berry material were used to perform the extraction of primary metabolites according to Torres *et al.* (2017) protocol with minor modifications. The extractions of primary metabolites were done by 2mL of 80% ethanol at 80°C for 15 min, centrifuged 10 min at 5000 g and followed to another extraction using 2 mL

of 50% ethanol. The extracts were respectively, dried in Speed-Vac, and re-dissolved in ultrapure water and were used for determinations of sugars, organic acids and amino acids.

Glucose and fructose contents were measured enzymatically with an automated micro-plate reader (Elx800UV, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) using the Glucose/Fructose kit from BioSenTec (Torres et al., 2017). Malic acid was determined using an enzyme-coupled spectrophotometric method that measures the change in absorbance at 340 nm from the reduction of NAD⁺ to NADH. Tartaric acid was assessed by using a colorimetric method based on ammonium vanadate reactions. Both compounds were quantified with a Bran and Luebbe TRAACS 800 autoanalyzer (Bran & Luebbe) according to Torres *et al.*, (2017).

Free amino acids were measured according to Torres *et al.* (2017) after derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl-carbamate (AccQ-Tag derivatization reagent, Waters,) according to Hilbert *et al.* (2003). Amino acids were analysed using an UltiMate 3000 UHPLC system (Thermo Electron SAS) equipped with an FLD-3000 Fluorescence Detector (Thermo Electron SAS). Separation was done on a AccQ•Tag Ultra column, 2.1 x 100 mm, 1.7 µm (Waters) at 37°C with elution at 0.5 ml min⁻¹ (eluent A, sodium acetate buffer, 140mM at pH 5.7 ; eluent B, acetonitrile ; eluent C, water) according to the gradient described by Torres *et al.* (2017). Chromatograms corresponding to excitation at 250 nm and emission at 395 nm were recorded. To maintain consistent retention time and a stable baseline, a control was done before each run of 18 samples. Chromeleon software, version 7.1 (Thermo Electron SAS) was used to calculate peak area. A standard of 20 amino acids (Alanine, Arginine, Aspartic acid, Asparagine, Cysteine, GABA, Glycine, Glutamic acid, Glutamine, Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Proline, Serine, Threonine, Tyrosine, Valine) purchased from Sigma was used after the control and in the middle of each run to calibrate amino acid quantification.

- Anthocyanins

Another aliquot of 500 mg FW of frozen powdered berry material were lyophilized during 72h. The extraction was done using 1 mL of methanol, 0.1% HCl (v/v). Extracts were filtered through a 0.45 µm polypropylene syringe filter (Pall Gelman Corp.) for UHPLC analysis. Each individual anthocyanin-3-glucoside forms and acetyl derivatives of delphinidin, cyanidin, peonidin, petunidin and malvidin, and *p*-coumaroyl derivatives of delphinidin, cyanidin,

peonidin and petunidin were analysed as described in Torres *et al.* (2017) and Acevedo De la Cruz *et al.* (2012) using using an UltiMate 3000 UHPLC system (Thermo Electron SAS) equipped with DAD-3000 diode array detector operating at 520 nm and at 360 nm (Thermo Electron SAS). Separation was done on a Synchronis C18, 2.1 x 100 mm, 1.7 μ m Column (Thermo Fisher Scientific) at 25°C with elution at 0.368 ml min⁻¹ according to the following gradient (v/v): 0 min 92.2% A 7.8% B, 9.6 min 73% A 27% B, 14.1 min 70 % A 30% B, 14.8 min 92.2% A 7.8% B (eluent A, water and formic acid, 90/10 v/v; eluent B, acetonitrile). Identification and peak assignment of phenolic compounds were based on comparison of their retention times and UV-Vis spectrometric data with that of pure standards (Extrasynthese). Data processing was carried out by Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS) software, version 7.1 (Thermo Electron SAS). The concentration of individual flavonoids was calculated in milligrams per gram (mg g⁻¹) of dry weight (DM) using malvidin-3-O-glucoside as external standard for all the quantified anthocyanins (at 520 nm).

- Methoxypyrazines and 1.8-Cineole

An aliquot of 1g of frozen powdered berry material were used to perform the extraction of methoxypyrazines (MP) and 1.8-cineole with 4g of sodium chloride (NaCl) and 6mL of water according to Helwi *et al.* (2015). The MP and 1.8-Cineole extraction and assay method was described by Helwi *et al.* (2015) and Poitou *et al.* (2017). An internal standard, ²H₃-IBMP, was also added to yield a final concentration of 100 ng L⁻¹. During the elution of MP and 1.8-Cineole, the GC-MS was switched to single-ion monitoring mode and tuned to measure m/z values of 95, 127 and 154 ions for ²H₃-IBMP, of 94, 124 and 151 ions for IBMP, of 124, 137, 152 ions for IPMP, of 124, 138, 151 ions for SBMP and of 108, 154, 139 ions for 1.8-cineole (quantifying ions are underlined). Data processing was carried out by MSD Chemstation software (5973n Data Analysis, Agilent Technologies). Results were reported on a per weight basis of ng kgFW⁻¹ or on a per berry basis of ng berry⁻¹.

- Thiol precursors

The extraction and the quantification of 3SH precursors in grape berries were adapted from Helwi *et al.* (2016). In brief, the extraction was carried on a mix of 250 mg of frozen berry powder by 750 μ L of acidified methanol (99.9% Methanol/0.1% acid formic) containing a final concentration of 100 μ g L⁻¹ of deuterated form of the glutathionylated S-conjugate of 3SH

((3-S-hexan-1-ol)-glutathione-d₃). Analysis was done using an Accela UHPLC (Thermo Fisher Scientific) connected in series to Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with a heated ESI ion source in positive mode. The separation was done on a Synchronis aQ column (100 × 2.1 mm i.d., 1.7 μm, Synchronis aQ, Thermo Scientific) with a flow rate of 300 μL min⁻¹ of solvent A (0.1 % aqueous formic acid) and solvent B (0.1 % formic acid in acetonitrile).

E) Microvinification and sensory evaluation

Microvinifications were conducted from each treatment in biological triplicates for both vintages. In 2016 and 2017, 4 and 2.5 kg of grapes respectively were de-stemmed and de-stalked mechanically by FOUBABMI model 1.5t/h. Berries were then crushed and put in microvinification tank. For each treatment, 5 g hL⁻¹ SO₂ was added and the juice is cold-settled for 12 hours at 4°C. An aliquot of must from each treatment and biological triplicates was taken for analyses. Must turbidity was adjusted to 200-210 NTU. The must was then inoculated with F33 yeast strain (Laffort, final concentration of 15 g hL⁻¹). Running off and pressing were done manually. At the end of the alcoholic fermentation, lactic acid bacteria (LALVIN VP41 strain, Lallemand) were added. At the end of the fermentation, 5g hL⁻¹ of SO₂ was added and stored at 5°C during 1 month. Filtration at 2 μm was done before bottling and an aliquot was stored at 4°C before analysis of volatile compounds. The three biological triplicates were mixed because of their too low volume and wines were conserved at 16°C before sensorial analyses which was done 10 months later. Wine sensory evaluation was done by a panel of experienced tasters according to the methodology described by Larson-Powers and Pangborn (1978). The tasters conducted a sensory analysis and a triangular test for both vintage without to be trained by us before these tastings.

F) Grape must composition

Probable alcohol, titratable acidity and pH were analysed on musts of each replicate of LFR treatments. Probable alcohol was expressed as % (v/v) and quantified by using an electronic ANTON PAAR densimeter. Titratable acidity was expressed as gH₂SO₄ L⁻¹.

The content of thiol precursors was also quantified on musts with the method previously described by using 500 μL of must.

G) Wine composition

Alcohol, titratable acidity, volatile acidity, pH, total polyphenol index (IPT), tannin and anthocyanin contents were quantified on wines of each replicate of LFR treatments. Alcohol, titratable acidity, volatile acidity, tannin and anthocyanin contents were expressed as % (v/v), $\text{gH}_2\text{SO}_4 \text{ L}^{-1}$, $\text{gH}_2\text{SO}_4 \text{ L}^{-1}$, g L^{-1} and mg L^{-1} respectively.

The content of MP were also analysed in wines with the method previously described by using an aliquot of 2.5 mL of wine diluted in 7.5 mL of deionized water with 4 g of sodium chloride (NaCl).

The quantification of thiols, lactones, furanones, and aldehyde was carried out according to the protocol described in Thibon *et al.*, 2015, modified for the simultaneous quantification of thiols (E2SA, 3SH), furanones, homofuraneol, phenylacetaldehyde, methional and lactones (massoia lactone, γ -octalactone, γ -nonalactone, γ -decalactone) (C. Thibon, personal communication, publication in progress).

H) Statistical analysis

All data analysis were conducted with R software (R Development Core Team, 2010). Differences between the treatments were tested for significance by applying the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test (p value < 0.05).

Principal component analysis was conducted on the mean-centered and scaled data in order to investigate the discriminations of the primary and secondary metabolites investigated in our study.

I) RNA-seq analysis

- Total RNA extraction

Total RNA of PS12LC, PS12LC+SS, PS6LC and PS6LC_ABA sampled berries, harvested at mid-veraison (64 DAF) in 2017, were extracted according to the procedure described by Reid *et al.* (Reid *et al.*, 2006) from 1 g of ground frozen. Total RNA were treated by a DNase I according to the manufacturer's instructions (Ambion TURBO DNA-Free DNase, Life technologies) to remove all traces of genomic DNA. They were quantified using a Nanodrop

2000c spectrophotometer (Thermo Scientific) and checked for integrity on a 1.8% agarose gel.

- RNA-seq library construction and sequencing

RNA-Seq libraries were generated from 500 ng of total RNA using TruSeq Stranded mRNA LT Sample Preparation Kit (Illumina), according to manufacturer's instructions. Briefly, following purification with poly-T oligo attached magnetic beads, the mRNA was fragmented using divalent cations at 94°C for 2 min. The cleaved RNA fragments were copied into first strand cDNA using reverse transcriptase and random primers. Strand specificity was achieved by replacing dTTP with dUTP during second strand cDNA synthesis using DNA Polymerase I and RNase H. Following addition of a single 'A' base and subsequent ligation of the adapter on double stranded cDNA fragments, the products were purified and enriched with PCR (30 sec at 98°C; [10 sec at 98°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 72°C] x 12 cycles; 5 min at 72°C) to create the cDNA library. Surplus PCR primers were further removed by purification using AMPure XP beads (Beckman-Coulter) and the final cDNA libraries were checked for quality and quantified using capillary electrophoresis. These libraries were then sequenced on the Illumina HiSeq 4000 as paired-end 50 base reads following Illumina's instructions. The RNA-seq library construction and sequencing was realized by the platform "GenomEast" in Strasbourg, France.

- Analysis of Illumina reads

Image analysis and base calling were done using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Reads were mapped onto the 12X assembly of *Vitis vinifera* genome (http://genomes.cribi.unipd.it/DATA/GENOME_12X/Genome12X.tar.gz) using Tophat v2.0.14 (Kim *et al.*, 2013) and bowtie2 v2.1.0 aligner (with options : --no-coverage-search --read-realign-edit-dist 0). Gene expression was quantified using HTSeq v0.6.1 (Anders *et al.*, 2014) with the intersection nonempty mode and CRIBI V1 gene annotations (<http://genomes.cribi.unipd.it/DATA/GFF/V1.tar.gz>). Normalization and differential gene expression analysis were done using R and the DESeq2 v1.14.1 Bioconductor library (Love *et al.*, 2014). The gene expression level was calculated by using RPKM (reads per exon kilo base per million mapped sequence reads). Adjustment for multiple testing was done with the Benjamini and Hochberg (BH) method (1995). The log₂ (Fold-Change) (LFC) was estimated

using the method proposed by Love et al. (Love *et al.*, 2014). The function descriptions of genes and the definition of related pathways were from WikiGene description and KEGG pathway through biomaRt software on the Ensembl Plants website (<https://plants.ensembl.org/biomart/martview>). The gene set enrichment analysis (GSEA) was done by software GSEA 3.0 version (Mootha *et al.*, 2003; Subramanian, 2005) with 1000 number of permutations. Significantly different pathways were chosen with a p value ≤ 0.01 and FDR q value ≤ 0.1 . Differentially expressed genes with a p value ≤ 0.05 and an absolute value of $|\text{LFC}|$ ratio ≥ 1 were used as the thresholds to judge the significance of gene expression difference. Three biological replicates for each condition were included in this analysis. To increase the robustness of the data, only the genes that had more than 10 reads at least in one of the libraries were considered further. Venn diagram analysis was done through the Venny 2.1 version (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

J) Fluidigm real-time PCR quantifications

- RNA extraction

Total RNA of PS12LC, PS12LC+SS, PS6LC, PS6LC_ABA and PV6LC_ABA berries harvested in 2016 and 2017 were extracted using GenElute™ Total RNA Purification Kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions from around 90mg of ground frozen powdered berries. Only the six points of the harvest kinetics were used for total RNA extraction i.e. 40, 61, 70, 80, 90, 110 DAF in 2016 and 35, 55, 64, 76, 89, 112 DAF in 2017. The DNase I treatment and total RNA quantification were done as mentioned above. DNA-free RNA (0.5 to 1.5 μg) was used to synthesize cDNAs using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

- Specific target preamplification:

An aliquot of 1.25 μl of cDNA was pre-amplified in a 5 μl reaction using the Fluidigm PreAmp Master Mix Kit (Fluidigm Corporation, CA, USA) with a pool of all 95 pairs of gene specific primers at a final concentration of 50 nM per primer. The PCR conditions were 95°C for 2 min, followed by 12 cycles of 95°C (15 sec) and 60°C (4 min). The pre-amplified products were then treated for 30 min at 37°C in the presence of 4 U/ μl Exonuclease I (New England BioLabs) followed by 15 min at 80°C for enzyme inactivation. After fivefold dilution using

DNA suspension buffer (TEKnova), pre-amplified products were stored at -20°C until use for quantitative real time PCR.

- Massive parallel quantitative real time PCR

Real time PCR was carried out with the Fluidigm Biomark HD System using 96.96 Dynamic Array™ IFCs for Gene Expression according to the manufacturer's instructions. Briefly, sample mixtures were prepared by mixing 3.15 µl of each diluted pre-amplified product with 3.5 µl of 2X SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX (BioRad) and 0.35 µl of 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm). In parallel, assay mixtures were prepared by mixing 0.6 µl of each 50 µM mixed forward and reverse primers with 3 µl of 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm) and 2.4 µl DNA suspension buffer (TEKnova). The dynamic array was first primed with control line fluid and then loaded with sample and assay mixtures using the BioMark IFC Controller HX according to manufacturer's instructions. The array was then transferred in the Biomark HD for 30 cycles of PCR according to the protocol GE Fast 96x96 PCR + Melt v2.pcl. The data were analysed with real-time PCR analysis software in the Biomark HD system using the following parameter settings: Quality Threshold at 0.65, Linear derivative as Baseline Correction Method and Auto (Global) Ct Threshold Method.

- Internal controls and inter-array calibrators for quantitative real time PCR

Each 96x96 Dynamic Array™ interrogates a total of 91 test samples and 5 control samples. These later controls include a no DNA template (NTC) and a reference sample containing a pool of all 269 cDNA samples. The pool was subjected to specific target preamplification, exonuclease treatment and a fivefold dilution as for test samples (dilution 1). Additional serial ½ dilutions were done in TE buffer pH 8.0 with low EDTA (Invitrogen) plus 0.25% de Tween 20 (Thermo Scientific Pierce) from dilutions 2 to 8, where dilution 2 correspond to ½ of dilution 1, dilution 3 to ¼ of dilution 1 etc... The 8 dilutions were loaded on array 1 while, arrays 2 received only dilution 1 to 4. This reference sample was used as inter-array calibrators for compensation of signal variations between Biomark HD runs.

- Data normalization and calculation of delta Ct

The measurement Ct values obtained as output of the Fluidigm software were normalized and delta Ct values were calculated for further analyses. Then the normalized relative quantity was calculated based on Hellemans *et al.* 2006.

III-Results and discussion

A) Agronomic and environmental measurements

Decreasing LFR reduced as expected the total leaf area per shoot and per bunch for both vintages (Sup Table 1). It resulted in a significant reduction by half between the 6LC treatments in comparison to PS12LC control in 2016 and 2017. The first estimation, showed that total leaf area of PS12LC+SS treated plant was around 7 times higher than the control treatment (PS12LC). Combining analysis of leaf base water potential at three dates throughout berry development and $\delta^{13}\text{C}$ measurements at berry maturity did not show any water stress on vines for both vintages and for all LFR and ABA treatments (Sup Table 1). Moreover, no significant difference was observed on the vine water status between the investigated LFR and ABA treatments.

The measures realised with the Dualex scientificTM tool in 2017 did not show any significant impact of the LFR modification and ABA on polyphenols and chlorophyll indicators in leaf (Sup Table 1).

The microclimate of berry was not significantly impacted in terms of temperature as shown Sup Fig. 3 for both vintages.

B) Berry weight

The modulation of the LFR did not significantly modify the proportions of skin, pulp and seed content relative to the total weight of the berry. However, the increase of the LFR for the PS12LC+SS treatment induced a berry weight greater than for the PS12LC control treatment after 40 DAF for both vintages (Fig. 1A-B). This observation also applied to the dry weight of berries.

However, the spray of exogenous ABA and the berry stage defined (PS or PV) to modulate LFR did not induce significant variations of the berry weights (Fig. 1A-B).

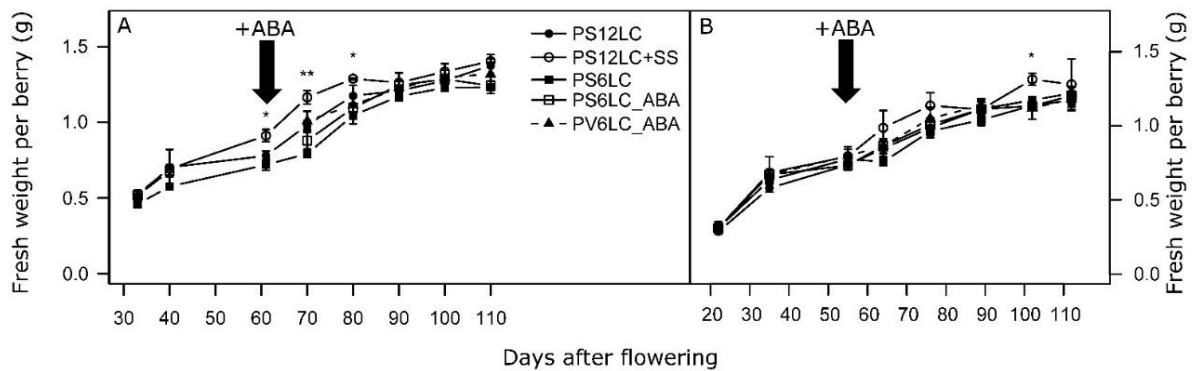


Fig. 1 Effect of source-sink modulation on seasonal berry weight for the vintages 2016 (A) and 2017 (B).

The solid arrow indicates date of ABA sprays. Vertical bars indicate SE ($n = 3$), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05; **, p value < 0.01; ***, p value < 0.001). ABA, abscisic acid. LC, leaves conserved per cluster per vine. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

C) Berry biochemical composition

The berry composition was evaluated at several DAF for both vintages throughout the herbaceous and maturation phases for the ABA, sugars, organic acids, amino acids, anthocyanins, MPs, 1.8-cineole and thiol precursor contents. With regard to the statistical data and standard errors obtained for all primary and secondary metabolites analysis performed, the potential effect related to the different rootstocks present in plot used in 2017 in vineyard may be neglected.

1- Abscisic acid content

In plant growth and development, the ABA level increases during grape berry ripening possibly independent of osmotic stress as described by Rattanakon *et al.*, (2016). Several ABA forms were identified in whole berries. ABA glucose ester (ABA-GE) is the most important storage form of ABA and the most widespread ABA conjugate whereas phaseic acid (PA), dihydrophaseic acid (DPA) and neo-phaseic acid (Neo PA) are products of ABA catabolism. The amount of leaves remaining on the shoot had a significant effect at PV stage on the ABA, ABA-GE, PA, DPA and Neo-PA concentrations in 2016 and on the concentrations of ABA, ABA-GE and Neo-PA in 2017 (Fig. 2). After 61 and 55 DAF in 2016 and 2017, no effect of LFR modulation was shown on the contents of the different ABA forms except for PA. However, comparing the modalities with or without spray of ABA, the 6LC_ABA conditions showed a significant increase in free ABA and ABA-GE contents compared to the PS6LC condition from 61 and 55 DAF in 2016 and 2017 respectively to mature stage for both

vintages (Fig. 2A-D). In 2017, same results were obtained for the forms PA, DPA and Neo-PA (Fig. 2F, H, J). The extent of difference was even more significant in 2017, which could be explained by the two sprays conducted at 5 days apart in 2017 in comparison with one spray in 2016.

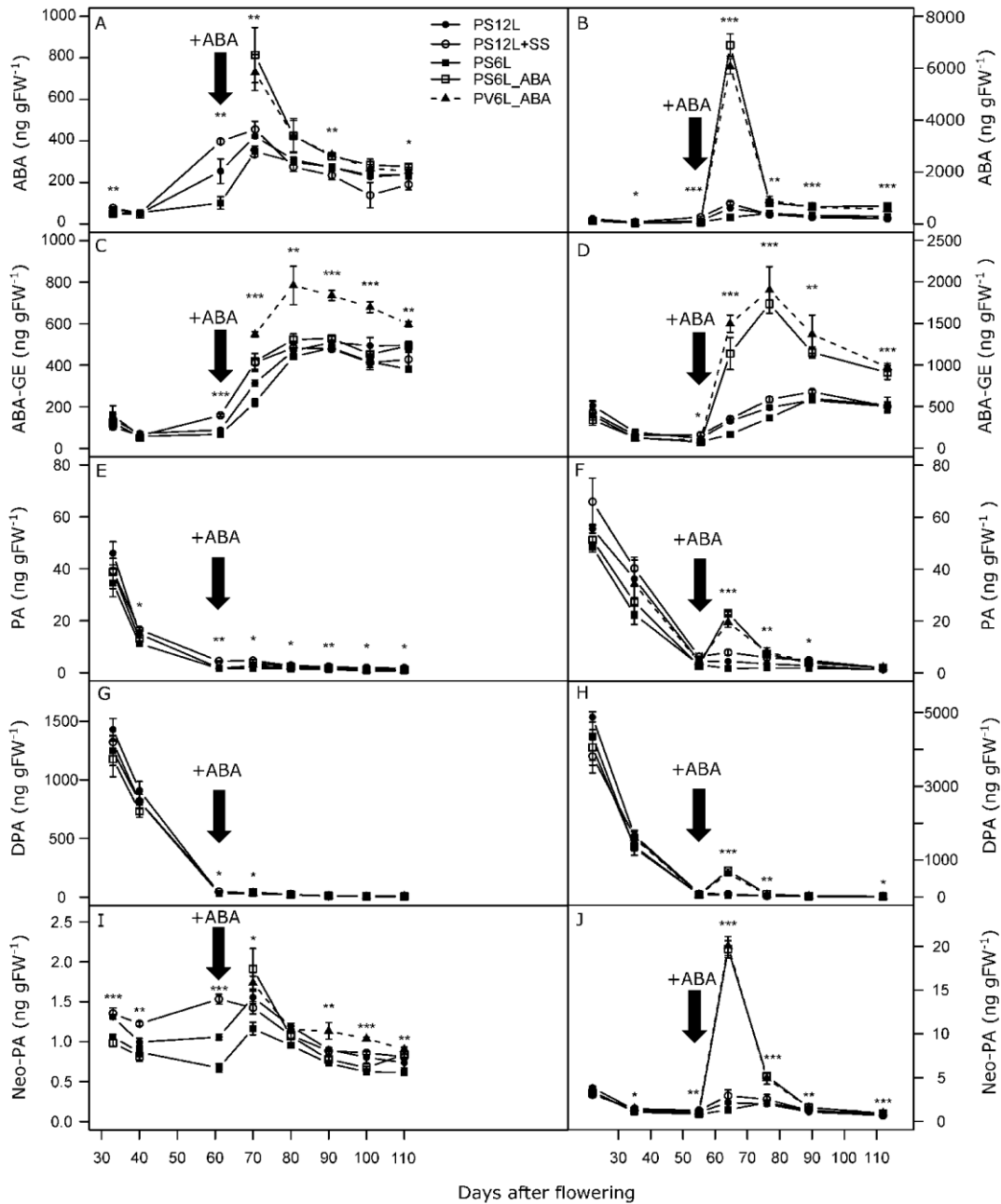


Fig. 2 Effect of source-sink modulation on seasonal ABA, ABA-GE, PA, DAP and Neo-PA concentrations in berries for the vintages 2016 (A, C) and 2017 (B, D).

The solid arrow indicates date of ABA sprays. Vertical bars indicate SE ($n = 3$), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05; **, p value < 0.01; ***, p value < 0.001). ABA, abscisic acid. DPA, dihydrophaseic acid. FW, fresh weight. LC, leaves conserved per cluster per vine. Neo-PA, neo-phaseic acid. PA, phaseic acid. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

2- Primary metabolite contents

The amount of leaves remaining on the shoot influenced the concentration of primary metabolites in the berries. Effectively the sugar content was reversely proportional to the number of leaves by bunch. When the LFR decreased (PS6LC) the final sugar quantity was lower than the control one (PS12LC) (Fig. 3A-B) and conversely fructose and glucose concentrations were the highest observed for the treatment PS12LC+SS (Fig. 3A-B) for both vintages.

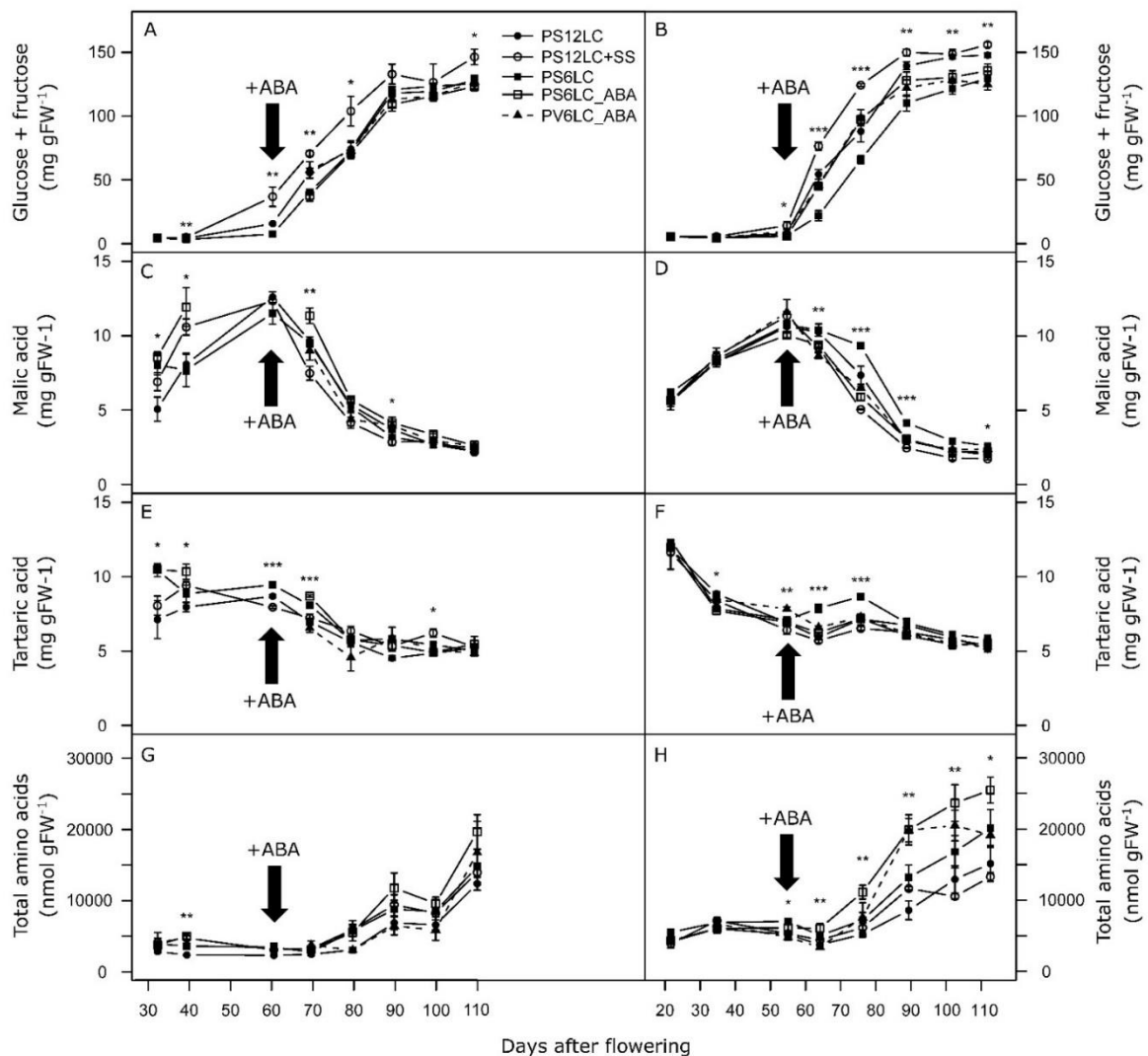


Fig. 3 Effect of source-sink modulation on primary metabolite (sugars, malic acid, tartaric acid and total amino acids) concentrations in berries for the vintages 2016 (A, C, E, G) and 2017 (B, D, F, H).

The solid arrow indicates date of ABA sprays. Vertical bars indicate SE ($n = 3$), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05; **, p value < 0.01; ***, p value < 0.001). ABA, abscisic acid. FW, fresh weight. LC, leaves conserved per cluster per vine. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

This observation is consistent with the studies of Bobeica *et al.*, (2015) and Parker *et al.*, (2015), thus suggesting that limiting the carbon source will induce the reduction of the transport of sugars to mature berries. In addition, adding ABA had a marginal effect on the fructose and glucose contents in the berries.

The final concentrations of organic acids were less influenced by the change in the source-sink ratio, especially when compared with sugar content, as shown by Bobeica *et al.*, (2015) and Parker *et al.*, (2016). Moreover, these authors showed that the amount of organic acids was decreased when the LFR was higher. These results were also demonstrated by Pastore *et al.*, (2013), which focused on the microclimate effects. Similarly, in our study the amount of malic acid was increased between 65 and 89 DAF when the LFR decreased (PS6LC compared to PS12LC) (Fig. 3C-F), and the differences diminished around maturity. The change in the LFR did not induce a significant modification in the final concentration of tartaric acid (Fig. 3E-F).

In 2016, the decrease of LFR did not have any significant effects on the total amino acid concentrations (Fig. 3G). There was only a trend showing that from 80 DAF the total amino acids were slightly higher with a low LFR (Fig. 3G-H). This trend became more evident in 2017, with a significant difference (Fig. 3H) and confirmed the results already observed on grape must by Verdenal *et al.*, (2016). The amount of proline, the major amino acid in the berries, was increased as the number of remaining leaves decreased (Sup Table 2).

ABA slightly increased the amount of sugar contained in the berries up to 110 DAF by comparing PS6LC_ABA treatment to PS6LC and PV6LC_ABA treatment to PS12LC. This effect was clearer in 2017 where the ABA treatment was repeated two times (Fig. 3A-B). In contrast, the spray of ABA did not impact significantly the organic acids content for both vintages (Fig. 3C-F). The addition of ABA coupled with leaf stripping also induced an increase in amino acid concentration for both 6LC_ABA treatments versus PS6LC and for PV6LC_ABA treatment compared to PS12LC, with more significant effects for the vintage 2017 (Fig. 3G-H).

Finally, the stage of leaf removal, at PS or at PV, did not impact the sugar and organic acid contents in berries (Fig. 3A-F). In contrast, removing the leaves earlier in the season at

PS6LC_ABA increased the total amino acid concentration at maturity compared to PV6LC_ABA (Fig. 3G-H).

3- Anthocyanins content

As expected the total anthocyanin content was significantly affected by the LFRs from veraison to maturity in both vintages (Fig. 4A-B). PS12LC+SS treatment had significantly higher total anthocyanins than the control, PS12LC. In 2017, the accumulation rate of anthocyanins was also significantly reduced by decreasing LFR (PS6LC vs PS12LC). A comparison can also be made on the amounts of di-hydroxylated anthocyanins (cyanidin and peonidin) relative to the tri-hydroxylated ones (delphinidin, petunidin and malvidin) to verify if LFR modulation can also influence the composition of anthocyanins. The increase of LFR (PS12LC+SS) induced a greater increase in the ratio of di- to tri-hydroxylated anthocyanins in comparison with the control (Fig. 4C-D).

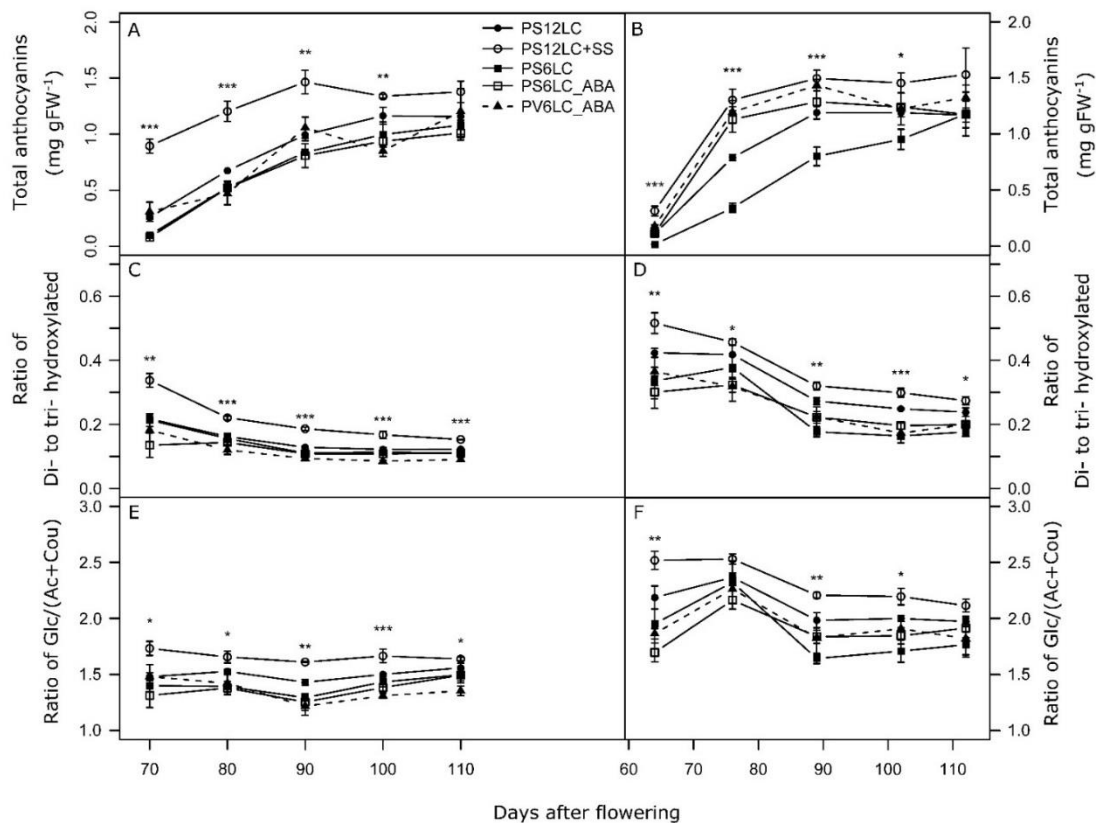


Fig. 4 Effect of source-sink modulation on total, di- to tri- hydroxylated forms, glucosyl to acyl forms of anthocyanins in berries for the vintages 2016 (A, C, E) and 2017 (B, D, F).

Vertical bars indicate SE ($n = 3$), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05; **, p value < 0.01; ***, p value < 0.001). ABA, abscisic acid. Ac, acetyl. Cou, coumaroyl. FW, fresh weight. Glc, glucosyl. LC, leaves conserved per cluster per vine. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

In addition, this ratio decreased during the growth of the berries due to the increase in the proportion of di-hydroxylated anthocyanins compared to tri-hydroxylated anthocyanins. As regards to the glucosylated and acylated compounds (acetyl + coumaroyl) and the Glc / (Ac + Cou) ratios were also higher with a low LFR. These ratios tended to decrease because the glycosylated form was more strongly increased than the acylated form until 90 DAF, after which the differences diminished (Fig. 4E-F).

The effect of ABA spraying was different between the two vintages. In 2016, ABA spraying did not significantly affect total anthocyanins for both PS6LC-ABA and PV6LC_ABA (Fig. 4A-B). In contrast, ABA spraying significantly increased total anthocyanins for PS6LC-ABA in comparison with PS6LC in 2017. Moreover, ABA spraying at PS or PV stages under 6LC could compensate the low LFR induced decrease in total anthocyanins in comparison with PS12LC in 2017 (Fig. 4B). This significant effect of ABA was most likely due to the fact that ABA was sprayed two times in 2017 while it was only sprayed one time in 2016. On the other hand, the ratios di- to tri- and Glc / (Ac + Cou) were not affected by ABA spraying (Fig. 4C to F).

The stages of LFR modulation influenced the amount of total anthocyanins. Berries of treatments conducted at PV stage had higher total concentration of anthocyanins than those for PS treatment (Fig. 4A-B).

4- MPs and 1,8-cineole berry contents

The modification of LFR did not significantly affect the IBMP and 1,8-cineole contents for both vintages during the berry development. Same result was obtained if the IBMP and 1,8-cineole contents were expressed indifferently as ng of kgFW⁻¹ or as ng per berry (Table 1). In the literature, a high LFR was shown to promote the shading of bunches and to limit the degradation of the IBMP by the light without temperature effect (Bennett *et al.*, 2013; Dunlevy *et al.*, 2013b; Martin *et al.*, 2016). Except one punctually significant difference for the IBMP content of PS12LC+SS treatment expressed as ng of kgFW⁻¹ at 112DAF in 2017, the accumulation and degradation of IBMP in berries were not impacted by LFR treatments. The absence of effect on IBMP content between PS12LC and PS6LC, which had the same microclimate for their bunches in our experimental condition (Sup Table 1), proved that the IBMP is not sensitive to carbon supply level.

Table 1: Effect of source-sink modulation and ABA treatment on IBMP and 1,8-cineole contents throughout the berry development

| Year | Treatment | DAF | ng kgFW ⁻¹ | | ng per berry | |
|------|-----------|-----|-----------------------|----------------------|---------------|-----------------|
| | | | IBMP | 1.8-Cineole | IBMP | 1.8-Cineole |
| 2016 | PS12LC | 33 | 138.94 ± 8.19 a | 33569.91 ± 373.36 a | 0.07 ± 0.00 a | 17.14 ± 0.18 a |
| | PS12LC+SS | | 126.98 ± 5.39 a | 28300.90 ± 986.25 b | 0.06 ± 0.00 a | 14.75 ± 0.82 a |
| | PS6LC | | 152.00 ± 7.07 a | 37112.60 ± 938.98 a | 0.06 ± 0.00 a | 17.08 ± 0.49 a |
| | PS6LC_ABA | | 162.48 ± 13.0 a | 36337.36 ± 628.47 a | 0.08 ± 0.00 a | 18.80 ± 0.52 a |
| | PV6LC_ABA | | | | | |
| | PS12LC | 80 | 58.86 ± 1.08 a | 619.74 ± 21.85 a | 0.06 ± 0.00 a | 0.72 ± 0.00 ab |
| | PS12LC+SS | | 61.49 ± 0.19 a | 737.81 ± 16.47 a | 0.07 ± 0.00 a | 0.63 ± 0.02 a |
| | PS6LC | | 60.00 ± 2.69 a | 484.62 ± 40.48 a | 0.06 ± 0.00 a | 0.50 ± 0.04 ab |
| | PS6LC_ABA | | 74.00 ± 3.88 a | 648.10 ± 51.96 a | 0.08 ± 0.00 a | 0.70 ± 0.06 ab |
| | PV6LC_ABA | | 65.81 ± 0.36 a | 370.70 ± 32.94 a | 0.07 ± 0.00 a | 0.42 ± 0.04 b |
| | PS12LC | 110 | 33.70 ± 1.54 a | 282.12 ± 3.86 a | 0.04 ± 0.00 a | 0.38 ± 0.01 ab |
| | PS12LC+SS | | 42.33 ± 0.56 a | 290.88 ± 10.90 a | 0.05 ± 0.00 a | 0.40 ± 0.01 a |
| | PS6LC | | 40.60 ± 1.81 a | 175.27 ± 38.07 ab | 0.04 ± 0.00 a | 0.22 ± 0.05 abc |
| | PS6LC_ABA | | 39.11 ± 0.15 a | 149.68 ± 11.69 ab | 0.04 ± 0.00 a | 0.18 ± 0.01 bc |
| | PV6LC_ABA | | 39.63 ± 3.61 a | 30.15 ± 14.21 b | 0.05 ± 0.00 a | 0.04 ± 0.02 c |
| 2017 | PS12LC | 35 | 86.27 ± 4.03 a | 28391.49 ± 787.88 a | 0.05 ± 0.00 a | 16.36 ± 0.52 a |
| | PS12LC+SS | | 90.84 ± 6.92 a | 22842.94 ± 746.02 a | 0.06 ± 0.00 a | 15.27 ± 0.87 a |
| | PS6LC | | 108.68 ± 2.42 a | 28618.66 ± 1374.41 a | 0.06 ± 0.00 a | 17.95 ± 0.67 a |
| | PS6LC_ABA | | 93.56 ± 3.35 a | 25568.55 ± 1165.70 a | 0.06 ± 0.00 a | 16.93 ± 0.65 a |
| | PV6LC_ABA | | 93.53 ± 6.72 a | 24598.05 ± 902.38 a | 0.06 ± 0.00 a | 16.31 ± 0.23 a |
| | PS12LC | 76 | 42.39 ± 1.67 a | 1284.29 ± 111.87 a | 0.04 ± 0.00 a | 1.23 ± 0.06 a |
| | PS12LC+SS | | 45.71 ± 4.10 a | 1148.07 ± 105.79 a | 0.05 ± 0.00 a | 1.71 ± 0.04 a |
| | PS6LC | | 48.84 ± 2.29 a | 1923.57 ± 176.65 a | 0.04 ± 0.00 a | 1.83 ± 0.16 a |
| | PS6LC_ABA | | 48.58 ± 0.28 a | 1761.02 ± 12.67 a | 0.04 ± 0.00 a | 1.76 ± 0.02 a |
| | PV6LC_ABA | | 46.59 ± 2.18 a | 1148.07 ± 105.79 a | 0.04 ± 0.00 a | 1.22 ± 0.14 a |
| | PS12LC | 112 | 13.38 ± 0.27 ab | 190.42 ± 9.11 a | 0.01 ± 0.00 a | 0.23 ± 0.00 a |
| | PS12LC+SS | | 17.12 ± 0.68 a | 277.17 ± 9.87 a | 0.02 ± 0.00 a | 0.36 ± 0.03 a |
| | PS6LC | | 12.23 ± 0.14 ab | 215.31 ± 16.04 a | 0.01 ± 0.00 a | 0.24 ± 0.01 a |
| | PS6LC_ABA | | 11.29 ± 0.31 b | 194.88 ± 13.02 a | 0.01 ± 0.00 a | 0.23 ± 0.01 a |
| | PV6LC_ABA | | 14.08 ± 0.87 ab | 261.29 ± 9.31 a | 0.01 ± 0.00 a | 0.31 ± 0.01 a |

All data are presented as mean ± Standard Error (SE) of three biological replicates. Different and non-overlapping I .

Statistical significance was determined by Anova test results followed by Tukey tests (p value < 0.05). DAF, days after flowering. FW, fresh weight.

The period of treatment PS or PV did not affect significantly the IBMP and 1,8-cineole content for both vintages and both units (ng kgFW⁻¹ or ng per berry) although the IBMP content in ng of kgFW⁻¹ of PS6LC_ABA was significantly lower than PV6LC_ABA in 2017 at 112DAF and the 1,8-cineole content in ng of kgFW⁻¹ of PS6LC_ABA was higher than PV6LC_ABA in 2016 at 112DAF, this last tendency was not confirmed in 2017 at 110DAF. The stage to apply the LFR treatment did not show any impact on the IBMP and 1,8-cineole contents.

Spraying ABA did not significantly affect the IBMP and 1,8-cineole contents for both vintages and both units although, in 2017, the IBMP content in ng of kgFW⁻¹ of PS6LC_ABA was significantly lower than PS6LC at 112DAF. The same tendency was visible in 2016 at 110DAF.

5- Thiol precursors content

Three forms of thiols precursors were analyzed in our study, S-3-(hexan-1-yl)-glutathione (Pgsh3SH-Al), S-3-(hexan-1-yl)-glutathione (Pgsh-3SH), and S-3-(hexan-1-yl)-L-cysteine (Pcys-3SH). No significant difference was observed on thiol precursors contents for both vintages in the case of LFR modifications (data not shown), and this, whatever the stage (PS or PV) of LFR treatment. Concerning the samples which received the spray of ABA, results may not be interpreted because ABA created a probable interference with the internal standards used for the quantification of thiol precursors.

D) Metabolite interactions

A PCA was done at mature stage to evidence the different interactions between the primary and secondary metabolites analysed in our study. The percentage of explained variance was 91.3 and 93.7% for the three first dimensions for the 2016 and 2017 vintages respectively (data not shown). Only the two first dimensions were conserved Fig. 5. The first dimension was positively explained by free amino acids and organic acids contents and negatively by the anthocyanins, sugars and 1,8-cineole contents for 2016 and 2017 (Fig. 5A-B). The second dimension was positively explained by the major molecules involved in the ABA metabolism for both vintages and negatively by the glycine (Gly) and methyl salicylate (Fig. 5A).

PCA analyses on samples and variables permitted to conclude for both vintages, when the LFR decreased, the total amount of anthocyanin was reduced. Moreover, the amount of amino

acids increased, more particularly the glycine content, and also the malic acid concentration for PS6LC (Fig. 5).

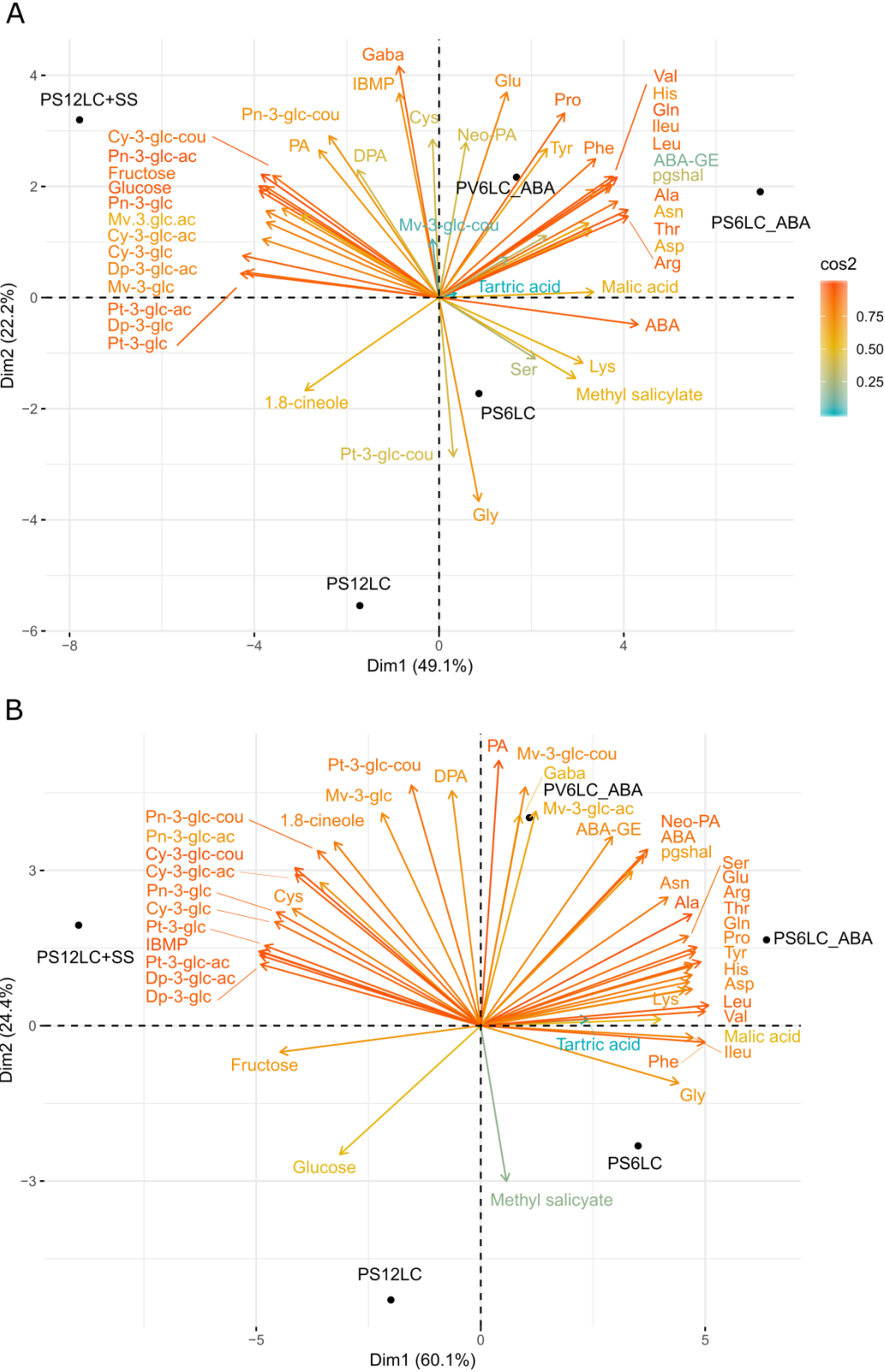


Fig. 5 Loading plots of 42 primary and secondary metabolites analysed on berries at mature stage for the first two principal components (PC1 and PC2) for the vintages 2016 (A) and 2017 (B). The percentages represent the variation explained by each principal component. ABA, abscisic acid. ABA-GE, abscisic acid glucosyl ester. Ala, alanine. Arg, arginine. Asn, asparagine. Asp, aspartic acid. cos2, quality of variable representation on the

principal component. Cy-3-glc, Cyanidin-3-O-glucoside. Cy-3-glc-ac, Cy-3-(6''-acetylglucoside). Cy-3-glc-cou, Cy-3-(6''-p-coumaroylglucoside). Cys, cysteine. Dp-3-glc, Delphinidin -3 - O - glucoside. Dp-3-glc-ac, Dp-3-(6''-acetylglucoside). DPA, dihydrophaseic acid. FW, fresh weight. Gaba, γ -aminobutyric acid. Glc, glucosyl. Gln, glutamine. Glu, glutamic acid. Gly, glycine. His, histidine. IBMP, 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine. Ileu, isoleucine. LC, leaves conserved per cluster per vine. Leu, leucine. Lys, lysine. Mv-3-glc, Malvidin-3-O-glucoside. Mv-3-glc-ac, Mv-3-(6''-acetylglucoside). Mv-3-glc-cou, Mv-3-(6''-p-coumaroylglucoside). Neo-PA, neo-phaseic acid. PA, phaseic acid. pgsal, S-3-(hexan-1-yl)-glutathione. Phe, phenylalanine. Pn-3-glc, Peonidin-3-O-glucoside. Pn-3-glc-ac, Pn-3-(6''-acetylglucoside). Pn-3-glc-cou, Pn-3-(6''-p-coumaroylglucoside). Pro, proline. PS, pea-size. Pt-3-glc, Petunidin-3-O-glucoside. Pt-3-glc-ac, Pt-3-(6''-acetylglucoside). PV, pre-veraison. Ser, serine. SS, secondary shoots. Tart, Tartaric acid. Thr, threonine. Tyr, Tyrosine. Val, valine.

Modulation of LFR at PS stage for PS6LC_ABA induced an increase in amino acids content compared to the modification of LFR done at PV stage (PV6LC_ABA) and also a decrease of the anthocyanin and sugar contents (Fig. 5).

Spraying ABA tend to increase the amount of total amino acids and molecules involved in the ABA metabolism (Fig. 5).

E) General composition in must

Results obtained for must composition confirmed conclusions from the berry composition. As expected, the percentage of probable alcohol by volume in must was significantly affected by LFR modulation in 2016 and 2017 and reversely proportional to the number of leaves by bunch (Table 2) and ABA sprayed did not impact for both vintages the percentage of probable alcohol by volume in must.

Titrateable acidity and pH were not sensitive in must composition to carbon supply level, stage of LFR modulation and ABA treatment (Table 2). This observation is consistent with results obtained on berries. Titrateable acidity is typically used to express an acidity of musts that contain several organic acids but mostly tartaric acid, which was not affected by LFR and ABA in berries as reported above.

Table 2: Effect of source-sink modulation and ABA treatment on must composition

| Year | Treatment | Probable alcohol (% vol) | Titrateable acidity (gH ₂ SO ₄ L ⁻¹) | pH | Pcys-3SH (µg L ⁻¹) | Pgsh3SH-AI (µg L ⁻¹) | Pgsh-3SH (µg L ⁻¹) |
|------|-----------|--------------------------|--|---------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 2016 | PS12LC | 12.03 ± 0.05 b | 3.66 ± 0.06 a | 3.45 ± 0.00 a | 15.24 ± 0.70 a | 3133.56 ± 84.72 a | 121.84 ± 3.71 b |
| | PS12LC+SS | 13.06 ± 0.01 a | 3.46 ± 0.01 a | 3.49 ± 0.00 a | 21.13 ± 0.49 a | 615.87 ± 82.17 b | 166.86 ± 3.33 a |
| | PS6LC | 11.26 ± 0.06 cd | 3.63 ± 0.05 a | 3.40 ± 0.01 a | 15.32 ± 1.62 a | 488.93 ± 72.08 b | 57.11 ± 2.37 c |
| | PS6LC_ABA | 11.53 ± 0.04 bc | 3.66 ± 0.02 a | 3.47 ± 0.01 a | 18.76 ± 0.65 a | 311.53 ± 45.88 b | 103.26 ± 2.65 b |
| | PV6LC_ABA | 10.90 ± 0.07 d | 3.76 ± 0.04 a | 3.43 ± 0.01 a | 20.40 ± 1.10 a | 734.85 ± 74.81 b | 116.32 ± 4.90 b |
| 2017 | PS12LC | 11.60 ± 0.04 a | 4.26 ± 0.07 a | 3.13 ± 0.00 a | 29.95 ± 2.14 a | 49.23 ± 12.33 ab | 144.95 ± 11.38 ab |
| | PS12LC+SS | 11.26 ± 0.27 a | 4.61 ± 0.05 a | 3.09 ± 0.00 a | 34.69 ± 0.99 a | 20.22 ± 1.68 b | 165.04 ± 4.97 ab |
| | PS6LC | 10.10 ± 0 b | 4.87 ± 0.00 a | 3.11 ± 0.00 a | 24.79 ± 2.19 a | 68.31 ± 5.15 ab | 101.69 ± 9.79 b |
| | PS6LC_ABA | 10.16 ± 0.13 b | 4.26 ± 0.05 a | 3.14 ± 0.00 a | 40.65 ± 5.39 a | 149.22 ± 24.04 a | 213.45 ± 16.94 ab |
| | PV6LC_ABA | 10.13 ± 0.04 b | 4.45 ± 0.06 a | 3.14 ± 0.00 a | 44.94 ± 1.93 a | 71.18 ± 9.50 ab | 235.70 ± 4.16 a |

All data are presented as mean ± Standard Error (SE) of three biological replicates.

Different and non-overlapping letters indicate significant differences between treatments (p value < 0.05).

Statistical significance was determined by Anova test results followed by Tukey tests (p value < 0.05).

3SH, 3-sulfanyhexan-1-ol. Pcys-3SH, S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine. Pgsh3SH-AI, S-3-(hexan-1-ol)-glutathion.

About thiol precursors, the results did not show any significant difference for Pcys-3SH content between the LFR treatments, the stage of LFR treatments (PS or PV) and the spray of ABA for the two vintages analyzed (Table 2). The Pgsh3SH-Al content did not shown for both vintages the same profiles concerning the LFR modulation, the stage of LFR treatments, and the spray of ABA. It was concluded that Pgsh3SH-Al was not significantly impacted by these three treatments. Conversely, the Pgsh-3SH content may be related to the LFR modulation for both years. Removing leaves was significantly related to a reduction of the Pgsh-3SH content in 2016 and confirmed in 2017. Pgsh-3SH was also significantly sensitive to an ABA spray for both vintages. Effectively the Pgsh-3SH content increased with a spray of ABA (Table 2). Removing leaves at PV stage increased also the Pgsh-3SH content in must. This last result was only a tendency on 2016 but is significant in 2017.

We may conclude that the contents of Pcys-3SH and Pgsh3SH-Al in must were not dependent on the carbon supply level, whatever the stage of LFR treatment, and on ABA supply, whereas an opposite effect was shown for the content of Pgsh-3SH in must for both vintages.

F) General wine composition

The percentage of alcohol by volume was significantly reduced in response to the LFR decrease in 2016 and the same tendency was observed in 2017 (Table 3). However, the spray of ABA did not have an effect on the percentage of alcohol by volume of wine. The titratable acidity, pH and volatile acidity were not affected by LFR modulation and ABA spray for both vintages (Table 3). Tannins were analysed only in 2016 and were significantly and positively related to LFR but not to ABA utilisation.

Table 3: Effect of source-sink modulation and ABA treatment on general wine composition

| Year | Treatment | Alcohol (% vol) | Titrateable acidity (gH ₂ SO ₄ L ⁻¹) | pH | Volatile acidity (gH ₂ SO ₄ L ⁻¹) | Tannins (g L ⁻¹) |
|------|-----------|-----------------|--|---------------|---|------------------------------|
| 2016 | PS12LC | 11.96 ± 0.11 b | 3.51 ± 0.10 a | 3.90 ± 0.02 a | 0.34 ± 0.01 a | 2.06 ± 0.03 b |
| | PS12LC+SS | 13.3 ± 0.00 a | 3.35 ± 0.10 a | 4.02 ± 0.03 a | 0.44 ± 0.02 a | 2.46 ± 0.03 a |
| | PS6LC | 11.23 ± 0.06 c | 3.67 ± 0.06 a | 3.82 ± 0.00 a | 0.26 ± 0.00 a | 1.7 ± 0.04 c |
| | PS6LC_ABA | 11.3 ± 0.00 c | 3.67 ± 0.06 a | 3.86 ± 0.02 a | 0.42 ± 0.00 a | 1.7 ± 0 c |
| | PV6LC_ABA | 10.7 ± 0.07 c | 3.43 ± 0.00 a | 3.87 ± 0.00 a | 0.40 ± 0.02 a | 1.86 ± 0.03 bc |
| 2017 | PS12LC | 11.9 | 4.17 | 3.64 | 0.17 | 7.93 ± 0.06 ab |
| | PS12LC+SS | 12.7 | 4.90 | 3.61 | 0.21 | 8.16 ± 0.24 a |
| | PS6LC | 9.9 | 4.51 | 3.55 | 0.33 | 4.93 ± 0.10 c |
| | PS6LC_ABA | 10.4 | 4.04 | 3.64 | 0.33 | 5.81 ± 0.30 bc |
| | PV6LC_ABA | 10.4 | 4.04 | 3.65 | 0.33 | 5.01 ± 0.22 c |

All data are presented as mean ± Standard Error (SE) of three biological replicates.

Different and non-overlapping letters indicate significant differences between treatments (p value < 0.05).

Statistical significance was determined by Anova test results followed by Tukey tests (p value < 0.05).

Table 4: Effect of source-sink modulation and ABA treatment on some aromatic compounds in wine

| Year | Treatment | IBMP (ng L ⁻¹) | 1.8-cineole (ng L ⁻¹) | Methyl salicylate (ng L ⁻¹) | E2SA (ng L ⁻¹) | 3SH (ng L ⁻¹) | Methional (µg L ⁻¹) | Phenylacetaldehyde (µg L ⁻¹) |
|------|-----------|----------------------------|-----------------------------------|---|----------------------------|---------------------------|---------------------------------|--|
| 2016 | PS12LC | 2.80 ± 0.11 ab | 21.0 ± 0.65 a | 2.97 ± 0.29 ab | 56.2 ± 2.78 a | 301. ± 30.4 a | 4.34 ± 0.36 a | 13.1 ± 0.32 a |
| | PS12LC+SS | 3.26 ± 0.04 a | 24.6 ± 0.55 a | 2.41 ± 0.02 b | 42.1 ± 3.35 a | 220. ± 24.2 a | 3.45 ± 0.22 a | 12.8 ± 1.05 a |
| | PS6LC | 2.46 ± 0.16 ab | 21.3 ± 0.05 a | 5.38 ± 0.12 b | 60.8 ± 4.40 a | 242. ± 17.2 a | 4.80 ± 0.09 a | 11.3 ± 0.19 a |
| | PS6LC_ABA | 2.40 ± 0.07 ab | 23.3 ± 0.87 a | 5.36 ± 0.45 a | 31.2 ± 2.06 a | 224. ± 10.8 a | 5.40 ± 0.27 a | 7.76 ± 0.74 a |
| | PV6LC_ABA | 2.18 ± 0.05 b | 13.3 ± 0.82 b | 5.05 ± 0.30 ab | 36.0 ± 3.95 a | 310. ± 20.3 a | 4.76 ± 0.55 a | 15.1 ± 1.48 a |
| 2017 | PS12LC | 3.51 ± 0.09 a | 12.8 ± 0.53 a | 1.58 ± 0.11 a | 115. ± 10.1 a | 371. ± 39.4 a | 3.93 ± 0.21 a | 19.6 ± 1.59 a |
| | PS12LC+SS | 5.67 ± 0.44 a | 18.3 a | 1.18 ± 0.09 a | 66.4 ± 4.87 a | 300. ± 2.32 a | 2.66 ± 0.13 a | 16.1 ± 0.15 a |
| | PS6LC | 4.00 ± 0.05 a | 10.9 ± 0.12 a | 2.61 ± 0.10 a | 84.2 ± 17.0 a | 192. ± 10.6 a | 3.85 ± 0.18 a | 17.2 ± 0.76 a |
| | PS6LC_ABA | 3.79 ± 0.16 a | 13.7 ± 2.49 a | 1.14 ± 0.10 a | 47.0 ± 1.61 a | 309. ± 14.5 a | 3.04 ± 0.17 a | 13.6 ± 1.09 a |
| | PV6LC_ABA | 3.22 ± 0.38 a | 9.44 ± 1.92 a | 2.02 ± 0.33 a | 73.8 ± 12.2 a | 215. ± 3.18 a | 2.49 ± 0.10 a | 11.0 ± 0.43 a |

| Year | Treatment | Furaneol (µg L ⁻¹) | Homofuraneol (µg L ⁻¹) | γ-octalactone (µg L ⁻¹) | γ-nonolactone (µg L ⁻¹) | γ-decalactone (µg L ⁻¹) | Massoia lactone (µg L ⁻¹) |
|------|-----------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 2016 | PS12LC | 20.1 ± 1.15 ab | 12.1 ± 0.27 ab | 2.33 ± 0.03 ab | 10.4 ± 0.17 a | 1.48 ± 0.07 a | 11.4 ± 0.77 c |
| | PS12LC+SS | 11.9 ± 0.51 b | 9.63 ± 0.51 abc | 2.13 ± 0.17 b | 11.0 ± 0.47 a | 1.50 ± 0.02 a | 14.0 ± 0.58 bc |
| | PS6LC | 21.2 ± 0.51 ab | 11.6 ± 0.54 ab | 2.62 ± 0.11 ab | 10.3 ± 0.26 a | 1.63 ± 0.05 a | 15.7 ± 0.59 bc |
| | PS6LC_ABA | 18.9 ± 2.02 ab | 7.19 ± 0.62 bc | 3.01 ± 0.13 ab | 9.27 ± 0.29 a | 2.05 ± 0.11 a | 25.9 ± 0.60 a |
| | PV6LC_ABA | 23.8 ± 0.71 a | 5.90 ± 0.16 c | 3.27 ± 0.06 a | 9.31 ± 0.13 a | 1.85 ± 0.06 a | 19.2 ± 0.58 b |
| 2017 | PS12LC | 30.5 ± 1.14 bc | 17.3 ± 1.97 a | 1.79 ± 0.04 b | 6.28 ± 0.30 a | 1.02 ± 0.05 a | 2.94 ± 0.14 b |
| | PS12LC+SS | 22.8 ± 0.03 c | 12.6 ± 0.69 a | 1.68 ± 0.06 b | 6.56 ± 0.23 a | 1.02 ± 0.05 a | 2.98 ± 0.14 b |
| | PS6LC | 35.9 ± 0.28 ab | 14.0 ± 0.37 a | 1.88 ± 0.01 ab | 5.51 ± 0.04 a | 1.03 ± 0.03 a | 3.67 ± 0.53 ab |
| | PS6LC_ABA | 37.0 ± 1.60 ab | 14.2 ± 0.10 a | 2.55 ± 0.08 a | 7.66 ± 0.47 a | 1.39 ± 0.01 a | 6.28 ± 0.47 a |
| | PV6LC_ABA | 43.9 ± 1.44 a | 13.0 ± 0.83 a | 1.91 ± 0.08 ab | 8.05 ± 0.34 a | 0.97 ± 0.00 a | 3.88 ± 0.06 ab |

All data are presented as mean ± Standard Error (SE) of three biological replicates.

Different and non-overlapping letters indicate significant differences between treatments (p value < 0.05).

Statistical significance was determined by Anova test results followed by Tukey tests (p value < 0.05).

E2SA, Ethyl-2-sulfanylacetate. 3SH, 3-sulfanylhexan-1-ol.

G) Wine sensory analysis

A sensory analysis was performed for both vintages to distinguish wines elaborated with berries harvested from PS12LC, PS6LC, PS12LC+SS, PS6LC_ABA and PV6LC_ABA treatments (Fig. 6A-B). For each growing season studied, triangular tests were conducted and an evaluation of wines was done with visual, olfactive and taste descriptors relative to Bordeaux wines typicity. Results were compared to aroma content analyses (Table 4).

The triangular tests revealed significant differences (p value < 0.05) for the colour descriptor between the PS12LC+SS wines and the other ones of the two growing seasons. A significant difference for wine colour was also shown for the vintage 2017 between the PS12LC treatment and the PS6LC, PS6LC_ABA and PV6LC_ABA ones. An additional significant difference was evidenced between wines of PS6LC and PS6LC_ABA treatments. Triangular tests demonstrated that wines elaborated from all LFR and ABA treatments were not significantly different on the base of other descriptors used ("olfactive typicity", "olfactive vegetal character", "olfactive fresh fruits", "olfactive cooked fruits", "taste typicity", and "taste acidity") and exhibited typical olfactive and gustatory properties of Bordeaux wines made with Cabernet-Sauvignon cultivar.

Among the primary or varietal aromas, the family of "herbaceous" or "vegetal" aromas is important to consider because of its perceptual antagonism with the fruity nuances of red wines (Hein *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2011). The herbaceous character was explained in part by the presence of IBMP and 1.8-cineole, those were not totally positively correlated to the olfactory vegetal character for both vintages (Fig. 6A-B). Furthermore, IBMP and 1.8-cineole were well opposed to the olfactory cooked fruit character.

The cooked fruit character was positively correlated to the furaneol and lactones contents for both vintages, as previously characterized (Allamy, 2015; Pons *et al.*, 2017; Rapp *et al.*, 1980) (Fig. 6A-B). The homofuraneol which is also known to participate to the cooked fruit character (Kotseridis, 1999; Kotseridis *et al.*, 2000) was not positively correlated to this descriptor for any years in our study (Fig. 6A-B).

Concerning the fresh fruit character, it was not really well represented by the two first components in 2016 (Fig. 6A). However for both vintages, the 3SH was correlated to the fresh

fruit character (Fig. 6A-B), as previously identified (Roland *et al.*, 2011). Although the concentration of 3SH was not significantly different between the LFR treatments (Table 4), the olfactory typicity of Bordeaux wine is habitually positively correlated to fresh fruit olfactory character as obtained in 2017. Whereas our panel of tasters defined the typicity of Bordeaux wine as correlated to 1.8-cineole in 2016, this result may be explained by a lack of experience of our panel of tasters in 2016 and by the fact that the olfactory fresh fruit character was poorly represented by the two first principal components.

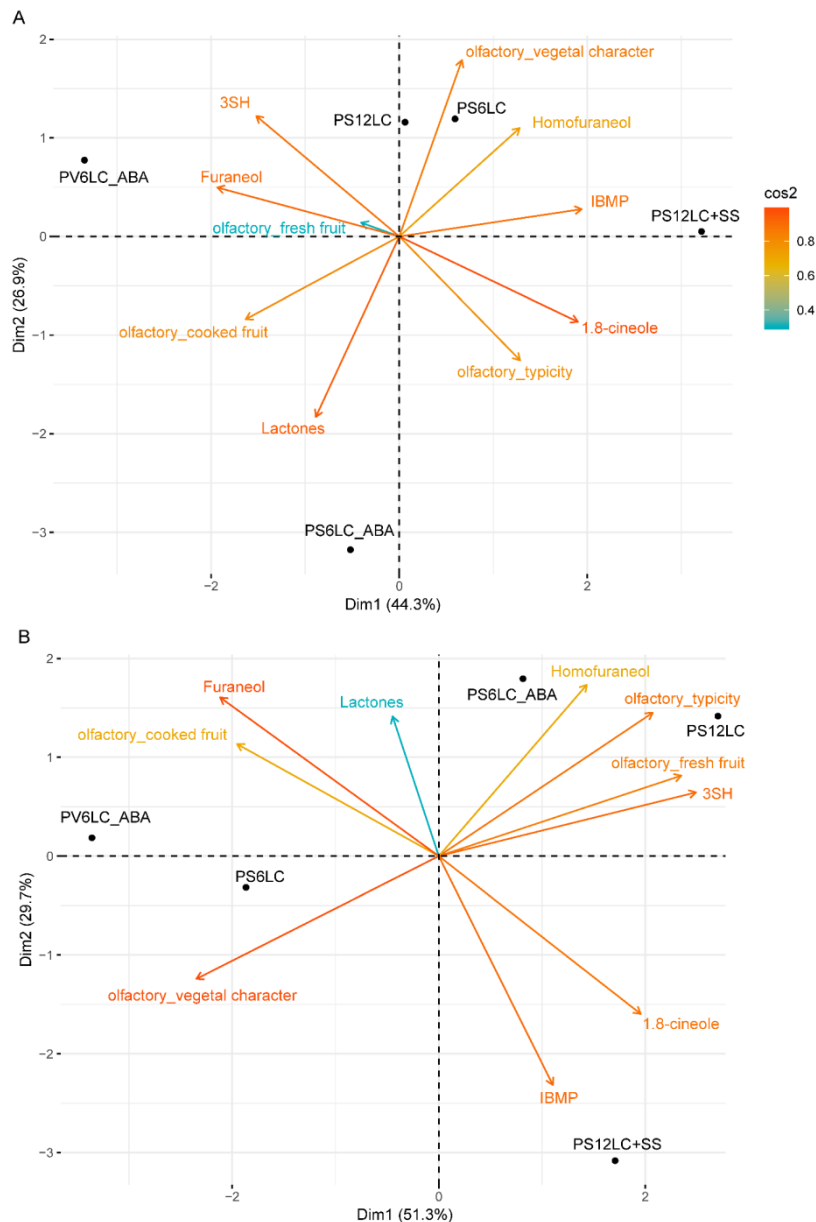


Fig. 6 Loading plots showing sensorial descriptors and aroma measured in wines obtained for the vintages 2016 (A) and 2017 (B) on the two first principal components (PC1 and PC2).

The percentages represent the variation explained by each principal component. 3SH, 3-S-hexan-1-ol. ABA, abscisic acid. \cos^2 , quality of variable representation on the principal component. FW, fresh weight. IBMP, 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine. Lactones, sum of γ -octalactone, γ -nonalactone, γ -decalactone and massoia lactone. LC, leaves conserved per cluster per vine. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

Wines of PS12LC+SS treatment were positively correlated to the IBMP and 1.8-cineole contents (Fig. 6A-B). They were effectively higher in wines for both vintages for the PS12LC+SS treatment but not significantly as shown Table 4. Moreover, the PS12LC+SS treatment was negatively correlated to the furaneol content (Fig. 6A-B). Indeed, it was significantly lower in PS12LC+SS wines compared to the others (Table 4) which meant the furaneol content was negatively correlated to the carbon supply for both vintages.

PS6LC and PS12LC wines were not defined by the same descriptors for the two years of harvest which can be explained by a vintage effect. The stage of performing LFR treatment i.e. PS or PV had an impact on description of wines for both vintages. A LFR treatment done at PS stage increased the lactones contents in PS6LC_ABA wines in comparison to PV6LC_ABA ones (Fig. 6A-B and Table 4). The sensory evaluation of PS6LC_ABA wines was effectively closer to the olfactory typicality of Bordeaux wines than the PV6LC_ABA wines (Fig. 6A-B).

Spraying ABA on berries had an impact on wine composition for both vintages by increasing Bordeaux wine typicality character in PS6LC_ABA wines compared to PS6LC ones.

Concerning the other aromas analysed (Table 4) and not used for the PCA (Fig. 6A-B), the contents of methyl salicylate, E2SA, methional and phenylacetaldehyde were not significantly different in response to the modulation of carbon supply level and ABA treatment for both vintages.

H) Gene expression kinetics in berries in response to LFR modulation and ABA treatment

To obtain high-quality gene expression profiles, a targeted analysis based on Fluidigm technology was done on 88 genes known as involved in the biosynthesis pathways of primary and secondary metabolites and detailed in Sup table 3. Data obtained showed the impact of LFR reduction on the expression of 29 genes involved in hormone, sugar, anthocyanin and aroma biosynthesis pathways. An effect of ABA treatment on the expression profiles of 11 genes involved in sugar transport, ABA, anthocyanins and aromas biosynthesis pathway was also shown (not detailed for the moment in the present paper).

1- Hormone biosynthesis pathway and signal transduction

As described by Seo and Koshiba in 2002, the first step of ABA pathway is the two-step epoxidation of zeaxanthin to form all-trans-violaxanthin catalysed by ZEP in *Arabidopsis thaliana* (Marin *et al.*, 1996). In our study, the NRQ transcript abundance of a ZEP showed a peak in expression around PV at 61 and 55 DAF for 2016 and 2017 respectively (Fig. 7A-B).

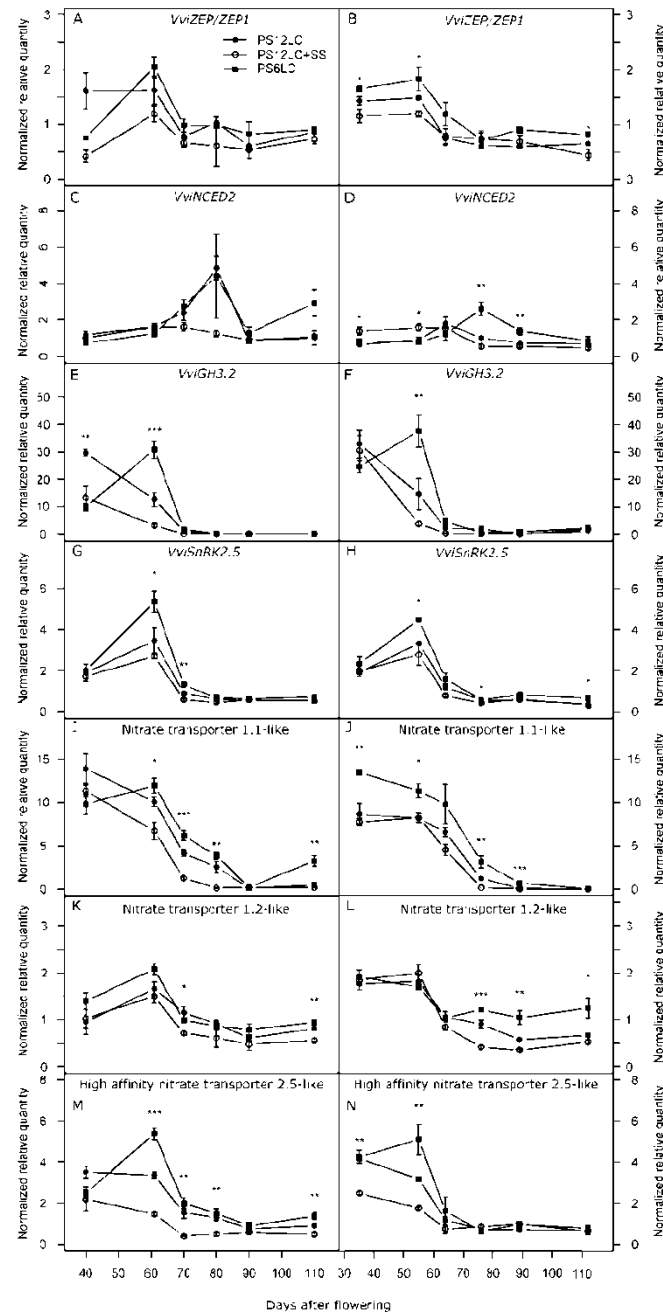


Fig. 7 Hormone-related genes differentially expressed in response to source-sink modulation throughout berry development. The gene expression profiles for the vintages 2016 (A, C, E, G, I, K, M) and 2017 (B, D, F, H, J, L, N) are shown. Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four references genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

This peak of expression may be related to the seed development in the berries (Seo and Koshiba, 2002) and was also obtained in a previous study (Wheeler *et al.*, 2009). Furthermore, the ZEP transcript level increased significantly with a low LFR at PV which cannot be explained by the light exposition of the berries. Effectively, ZEP is known to be involved in the photoprotection of photosystems by dissipating excess excitation energy. In condition of low light intensity this involves epoxidation of zeaxanthin to violaxanthin catalyzed by ZEP (Baumes *et al.*, 2002). However in our study, the NRQ profiles were perfectly opposite to the light stress responses (Fig. 7A-B). Moreover, the light exposition of the berries between PS12LC and PS6LC was identical. Finally this difference of expression between the treatments may be only due to level supply of carbon source.

Reducing the LFR increased transcript abundance of another key gene of the ABA pathway, *VvINCED2* until a maximum around veraison at 80 and 76 DAF for both vintages respectively (Fig. 7C-D). This gene is known to be up-regulated in case of drought or salt stress (Xiong and Zhu, 2003), so putatively this gene may also be up-regulated after a physiological stress as applied in our study and confirmed the results obtained previously in semi-controlled conditions on fruiting-cuttings by Brouard *et al.* (in preparation).

The normalized relative quantity (NRQ) of *GH3.2* transcripts was maximal at 40 and 35 DAF for PS12LC and PS12+SS conditions and decreased progressively until to be no detectable after 70 and 64 DAF in 2016 and 2017 respectively (Fig. 7 E-F). These expression profiles confirmed the results obtained in our previous study in greenhouse on fruiting-cuttings (Brouard *et al.*, in preparation). This expression profile was typical of this gene family involved in controlling auxin-related plant developmental processes (Böttcher *et al.*, 2011a). As for the PS6LC treatment, the NRQ of transcript showed a peak at 61 and 55 DAF around PV in 2016 and 2017 respectively. Finally, the peak of expression for *GH3.2* was delayed with a decrease of LFR.

The *GH3.2* expression profile was related to the LFR modulation for both years, which comforted the hypothesis that GH3.2 is possibly responsible for the variations in ripening delay (Böttcher *et al.*, 2011a).

Post-translational modifications such as phosphorylation, ubiquitination, and nitrosylation have been found to be involved in ABA signaling pathways (Lumba *et al.*, 2014).

Phosphorylation is a key process for ABA to trigger downstream targets. SnRK2 protein kinase is able to autophosphorylation and then phosphorylates other transcription factors (TFs), such as members of the bZIP/ABRE, NAC, MYC/MYB, and AP2/ERF TF families (Rattanakon *et al.*, 2016). *VviSnRK2.5* was expressed around PV on the berries, and a down-regulation was noticed during the veraison. This gene was negatively correlated to the LFR, effectively for a low LFR (PS6LC) the expression of *VviSnRK2.5* was up-regulated compared to the others treatment PS12LC and PS12LC+SS (Fig. 7G-H).

The gene expression profiles of three hypothetical nitrate transporters encoding a nitrate transporter 1.1-like (*VIT_02s0154g00260*), a nitrate transporter 1.2-like (*VIT_01s0026g01570*) and a high affinity nitrate transporter 2.5-like (*VIT_14s0066g00850*) were also affected by a modification in carbon supply, These three genes showed the same expression profiles, with a peak of expression during the herbaceous phase of berry development, before PV, and a down-regulation was noticed during the later stages of berry maturation. The gene expression profiles of these three hypothetical nitrate transporters were negatively related with the LFR. Effectively, for a low LFR these genes were up-regulated in comparison to the PS12LC and PS12+SS treatments (Fig. 7I-N).

2- Carbohydrate metabolism and sugar transport

Among the eight structural genes related to carbohydrate metabolism and evidenced as differentially expressed in response to LFR modulation, four different profiles were shown. As described in the literature, the gene encoding the fructose 1,6-bisphosphatase (*VIT_08s0007g01570*) involved in glucolysis/gluconeogenesis, *VviG6PDH* (*VIT_12s0057g00940*) and the gene encoding the phosphoribulokinase (*VIT_02s0109g00080*) involved in the Calvin cycle were expressed during berry development, around veraison, and a down-regulation was noticed during the later stages of berry maturation (Deluc *et al.*, 2007). The NRQ of transcripts were negatively related for these three genes to LFR modulation, effectively they were up-regulated with a low LFR (PS6LC) compared to other treatments PS12LC and PS12+SS (Fig. 8 A-B, E-F and M-N).

The second group of genes sharing the same expression profile, was composed of two genes encoding a GDP-mannose 4,6 dehydratase 2-like (*VIT_04s0023g03170*) and an UDP-glucose 6-dehydrogenase (*VIT_01s0011g00690*).

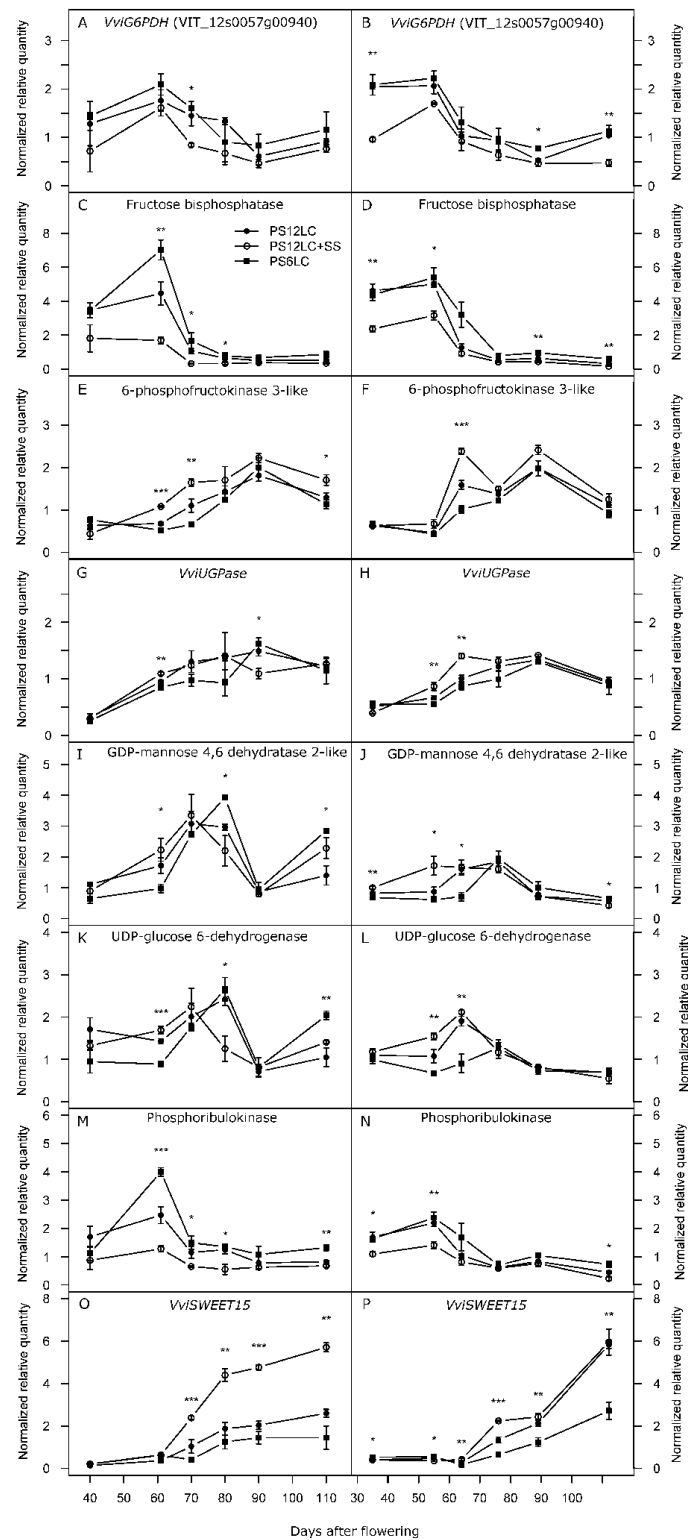


Fig. 8 Carbohydrate metabolism and sugar transport related genes differentially expressed in response to source-sink modulation throughout berry development. The gene expression profiles for the vintages 2016 (A, C, E, G, I, K, M, O) and 2017 (B, D, F, H, J, L, N, P) are shown.

Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four reference genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), N=3 biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

These two genes were also expressed during berry development, around veraison, and a down-regulation was noticed during the later stages of berry maturation. But these expression profiles were positively related to LFR modulation in contrast to the first three genes mentioned (Fig. 8I-L). These two genes (*VIT_04s0023g03170* and *VIT_01s0011g00690*) showed a shift of few days positively correlated to the LFR. Effectively the peak of expression for the PS6LC compared to the other treatments PS12LC and PS12LC+SS was approximately shift of 10 days later for both vintages (Fig. 8I-L).

Another group of expression profiles was composed of the two genes encoding a 6-phosphofruktokinase 3-like (*VIT_04s0008g00520*) and a *VviUGPase*. Their expression profiles showed two peaks of expression during the growing season. The first one was at mid-veraison and the second one at 90 and 89 DAF in 2016 and 2017 respectively (Fig. 8C-D and G-H). The expression profiles of these two genes were positively related to the LFR modulation throughout all the berry development, except for *VviUGPase* in 2016 (Fig. 8G).

The last gene expression profile was shown for *VviSWEET15*, a member of the *SWEET* gene family known to be involved in the sugar transport (Chong *et al.*, 2014). *VviSWEET15* showed an increase of transcript abundance from mid-veraison to the end of maturation in both vintages (Fig. 8O-P). The *VviSWEET15* expression was positively related to LFR. Effectively, for a low LFR *VviSWEET15* was down regulated compared to the PS12LC and PS12LC+SS treatments for both vintages. These expression profiles confirmed the results obtained in our previous study in greenhouse on fruiting-cuttings (Brouard *et al.*, in preparation).

3- Anthocyanin related genes

VviLDOX, *VviUFGT* and *VviFAOMT* were known to be involved in anthocyanin biosynthesis and accumulation pathway (Fujita *et al.*, 2005; Hugueney *et al.*, 2009; Maugé *et al.*, 2010). In our study, these three genes had similar profiles of expression than in the literature: they were expressed during berry development, around mid-veraison, and a down-regulation was noticed during the later stages of berry maturation (Bogs *et al.*, 2005; Castellarin and Di Gaspero, 2007; Katayama-Ikegami *et al.*, 2016) (Fig. 9). *VviLDOX*, *VviUFGT* and *VviFAOMT* were

significantly down-regulated with a low LFR from 61 and 55 DAF in 2016 and 2017 to mid-veraison at 70 and 64 DAF respectively for both vintages (Fig. 9). *VviLDOX*, *VviUFGT* and *VviFAOMT* showed NRQ profiles completely opposite after veraison. Effectively these three genes were up-regulated with a low LFR (6LC) compared to other treatments but not significantly. These expression profiles may show a shift of few days in the anthocyanins gene expressions in the PS6LC berries compared to the other treatments PS12LC and PS12+SS (Fig. 9).

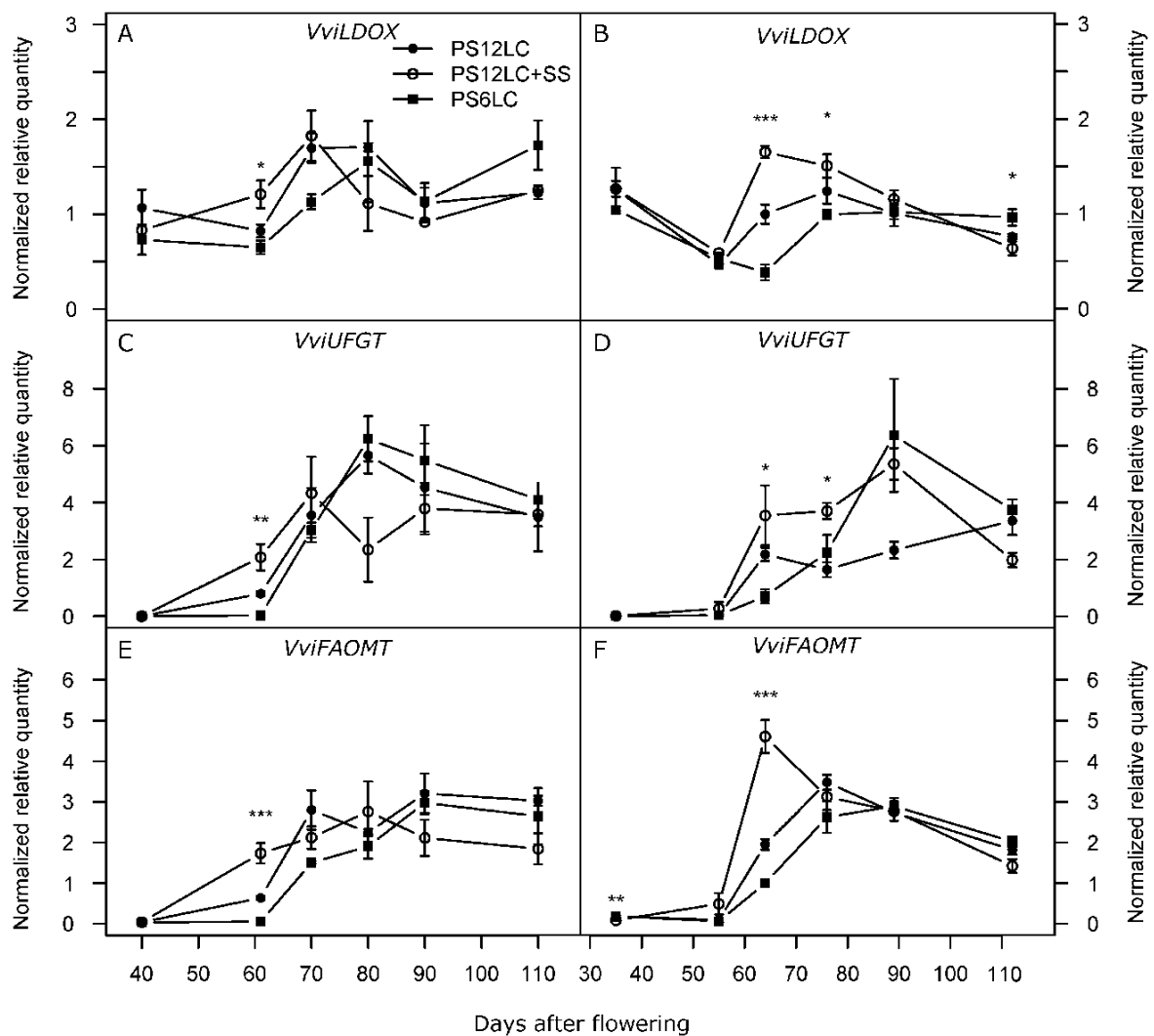


Fig. 9 Anthocyanin related genes differentially expressed in response to source-sink modulation throughout berry development. The gene expression profiles for the vintages 2016 (A, C, E) and 2017 (B, D, F) are shown. Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four reference genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

4- Aroma and aroma precursor related genes

The *VviOMT1*, *VviOMT2*, *VviOMT3* and *VviOMT4* genes were known to be involved in methoxypyrazines pathway (Dunlevy *et al.*, 2010; Dunlevy *et al.*, 2013a; Guillaumie *et al.*, 2013). The expression profiles of these four genes were not affected by the different LFR treatments for both vintages (Fig. 10) and validated results shown above on IBMP content in berries and wines (Tables 1 and 4).

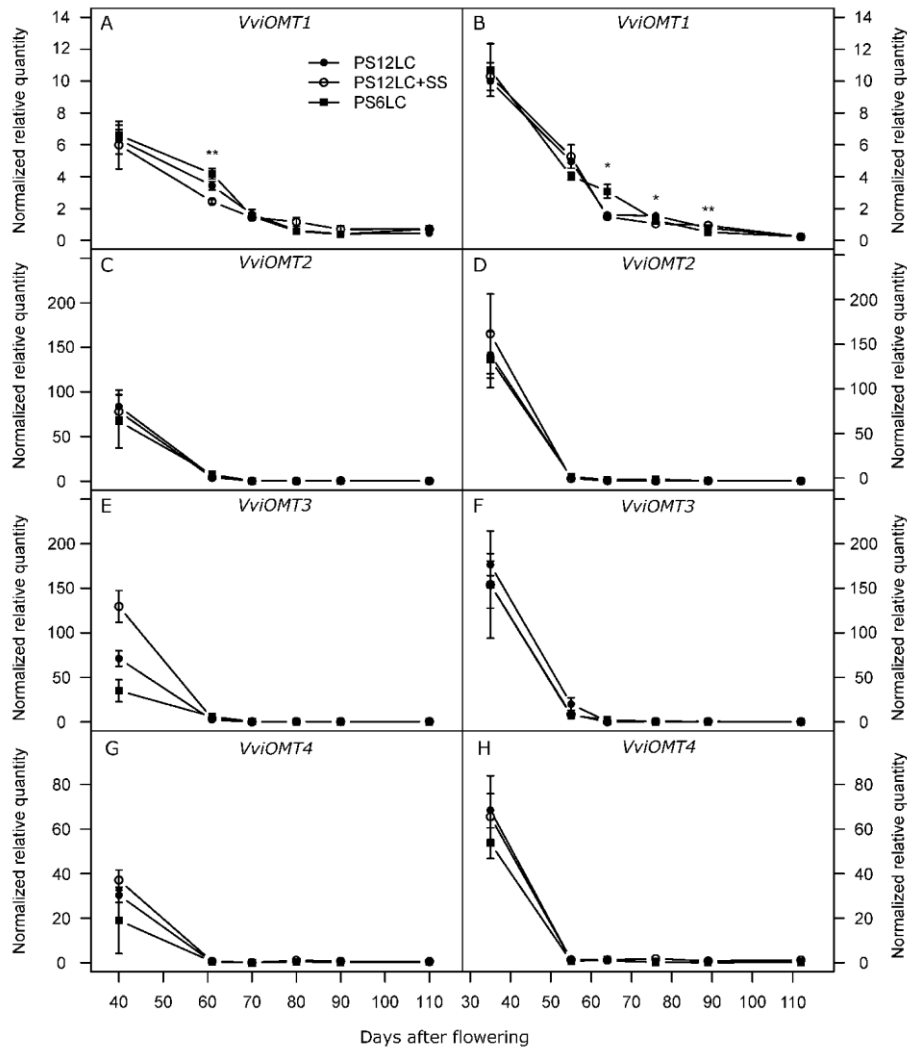


Fig. 10 Effect of source-sink modulation on the expression profiles of methoxypyrazine related pathway genes throughout berry development. The expression profiles of *VviOMT1* (A-B), *VviOMT2* (C-D), *VviOMT3* (E-F), *VviOMT4* (G-H) for the vintages 2016 (A, C, E, G) and 2017 (B, D, F, H) are shown.

Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four references genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

About the biosynthesis pathway of thiol precursors as described by Kobayashi *et al.*, (2010) and Thibon *et al.*, (2011) modulating LFR had different effects depending to the genes and the vintages (Fig. 11).

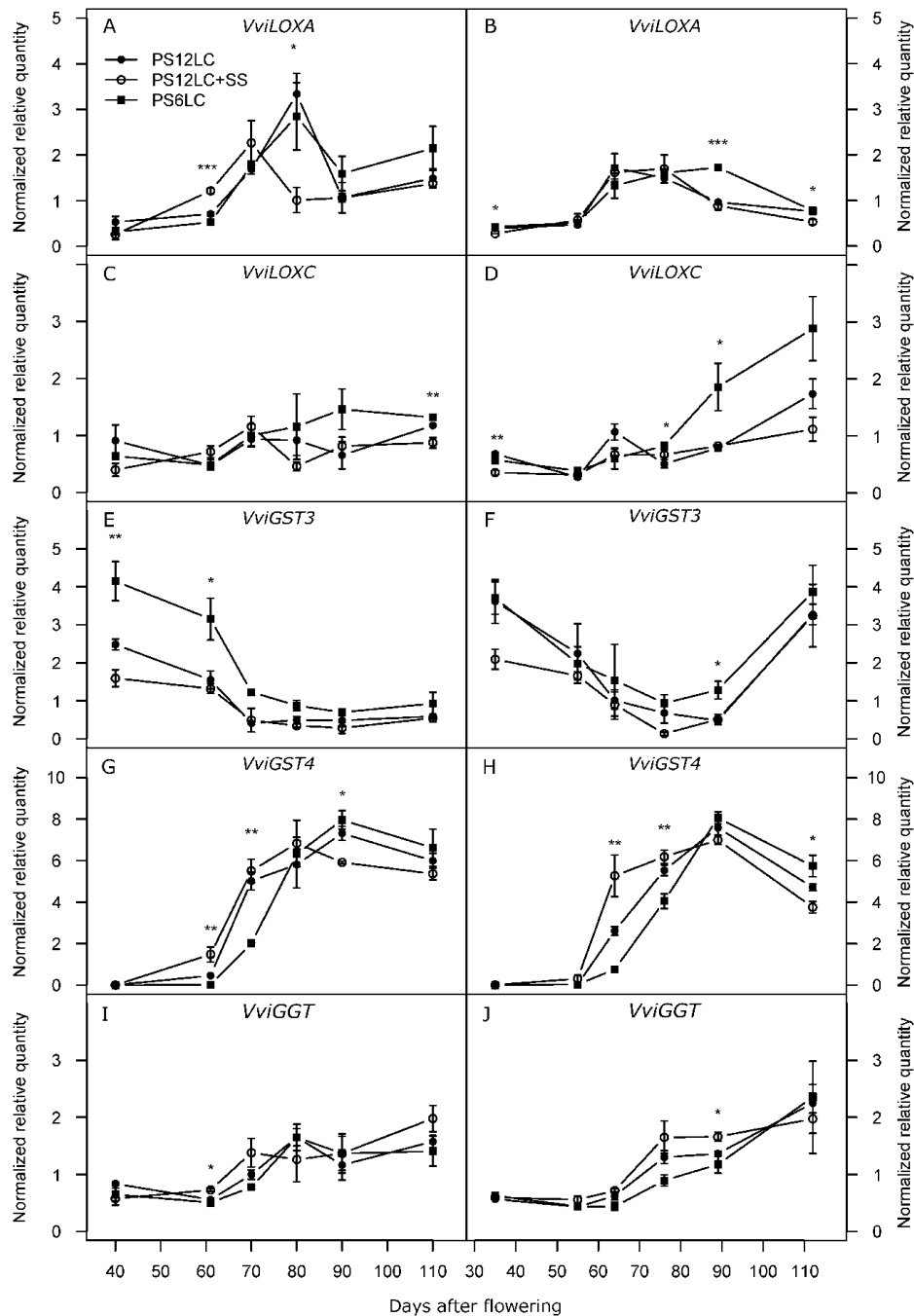


Fig. 11 Effect of source-sink modulation on the expression profiles of thiol precursor related genes throughout berry development. The expression profiles of *VviLOXA* (A-B), *VviLOXC* (C-D), *VviGST3* (E-F), *VviGST4* (G-H), *VviGGT* (I-J) for the vintages 2016 (A, C, E, G, I) and 2017 (B, D, F, H, J) are shown. Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four references genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

VvLOXA exhibited a similar pattern of expression than in a precedent study, which was characterised by an increase in expression around veraison (Podolyan *et al.*, 2010). Effectively in 2016, *VviLOXA*, *VviLOXC* and *VviGGT* had an earlier peak of expression for the PS12LC+SS around mid-veraison (70DAF) compare to lower LFR treatments PS6LC and PS12LC which had a peak of expression at 80DAF (Fig. 11A to D). This observation was not detected in 2017 and may be due to a vintage effect. However after veraison, the relative transcript abundance of *VviLOXA* and *VviLOXC* was higher for PS6LC modality for both vintages. The NRQ of *VviGST4* was significantly increased with a high LFR around mid-veraison at 70 and 64 DAF respectively for both vintages (Fig. 11G-H). After veraison for both vintages, the NRQ of *VviGST4* was higher for PS6LC and promoted the hypothesis of a shift of few days on gene expression for a low LFR. As for *VviGST4*, the NRQ of *VviGST3* was positively related to the decrease of LFR in 2016 during the berry herbaceous phase, whereas in 2017 a tendency was only observed (Fig. 11E-F). To conclude, the only expression profile obtained for *VviGGT* was similar to the analytical measure of Pgsh-3SH done in the must (Table 2).

The expression profiles of three other genes related to aroma and aroma precursors were evaluated in response to modulation of LFR. Among them, one gene encoding a benzoate carboxyl methyltransferase-like (*VIT_04s0023g02280*) and the *VviGerD* gene encoding a sesquiterpene synthase were expressed since veraison until maturity (Fig. 12A to D) (Effmert *et al.*, 2005; Lückner *et al.*, 2004). These two aroma-related genes may play an important role in specific aroma production at early stages of berry ripening. In our study, these two genes are down-regulated for a low LFR. The third aroma-related gene identified in our study encodes a (+)-neomenthol dehydrogenase (*VIT_15s0046g03600*) and is putatively involved in menthol biosynthesis pathway, a volatile monoterpenoid (Agudelo-Romero *et al.*, 2014). The expression profiles of this gene showed a peak of expression around veraison for both vintages (Fig. 12E-F). A significant decrease of the NRQ transcripts was observed for a low LFR for both vintages at mid-veraison. This tendency was conserved during the berry development until mid-maturity.

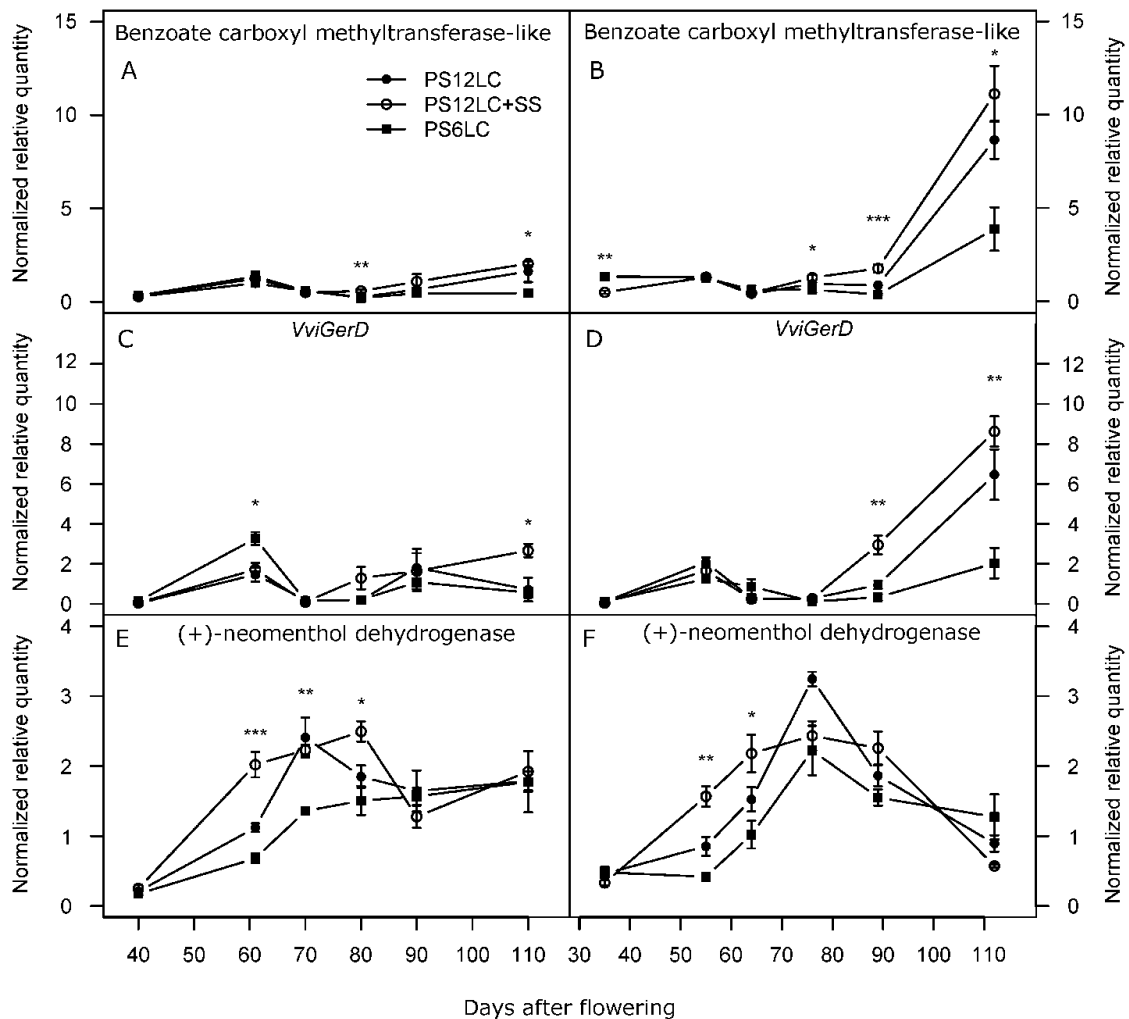


Fig. 12 Aroma related genes differentially expressed in response to source-sink modulation throughout berry development. The gene expression profiles for the vintages 2016 (A, C, E) and 2017 (B, D, F) are shown. Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four references genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), N=3 biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

5- Detoxification related genes

Three aldo-keto-reductase (AKR) genes putatively involved in detoxification in response to plant stress were differentially expressed (Kanayama *et al.*, 2014; Mudalkar *et al.*, 2016). Two of them (*VIT_05s0049g01130* and *VIT_08s0007g01040*) had a peak of expression at PV stage (Fig. 13A-D). They were significantly up-regulated for a low LFR for both vintages which may promote the hypothesis of their roles in physiological stress response. However the third AKR gene (*VIT_05s0077g01300*) showed an increasing NRQ of transcripts until maturity (Fig. 13E-F). This last AKR gene was down-regulated for a low LFR for both vintages and may be not involved in the carbon stress response.

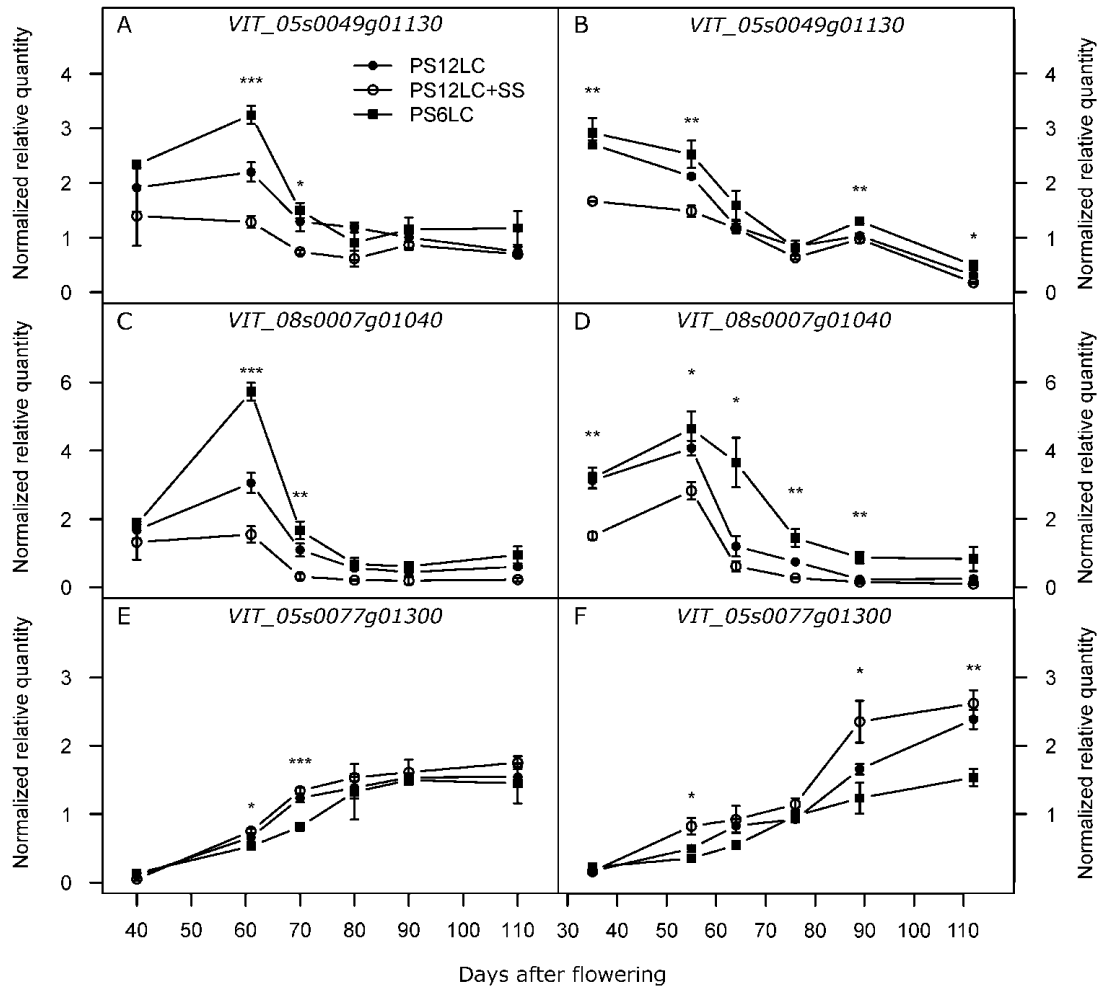


Fig. 13 Alkenal 2-reductase genes differentially expressed in response to source-sink modulation throughout berry development. The gene expression profiles for the vintages 2016 (A, C, E) and 2017 (B, D, F) are shown. Data are expressed as Normalised Relative Quantity (NRQ) to expression of four reference genes. Vertical bars indicate standard error (SE), the stars on the bars represent the Anova test results followed by Tukey tests (*, p value < 0.05 ; **, p value < 0.01 ; ***, p value < 0.001), $N=3$ biological replicates. LC, leaves conserved per cluster per vine. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

I) Identification of candidate genes differentially expressed at mid-veraison in response to source-sink modulation and ABA treatment

All the major events during grape berry ripening such as changing color, soften, sugar accumulation and organic acid content reduction start with the veraison. To expect an enrichment of genes related to the trigger of ripening and responding to LFR modulation and ABA treatment, a RNA-seq analysis was done on berries harvested at mid-veraison stage (64 DAF) in 2017 of the PS6LC, PS12LC, PS12LC+SS and PS6LC_ABA treatments.

The PCA on RNAseq results showed a clear separation on the first principal component axis of the PS6LC from the other treatments PS12LC and PS12LC+SS (Fig. 14), than between PS12LC and PS12LC+SS. PS6LC_ABA and PS12LC samples were not clearly separated by the first principal component axis. However, on the second principal component axis, PS6LC_ABA treatment was clearly separated to the others treatments PS6LC, PS12LC, PS12LC+SS (Fig. 14).

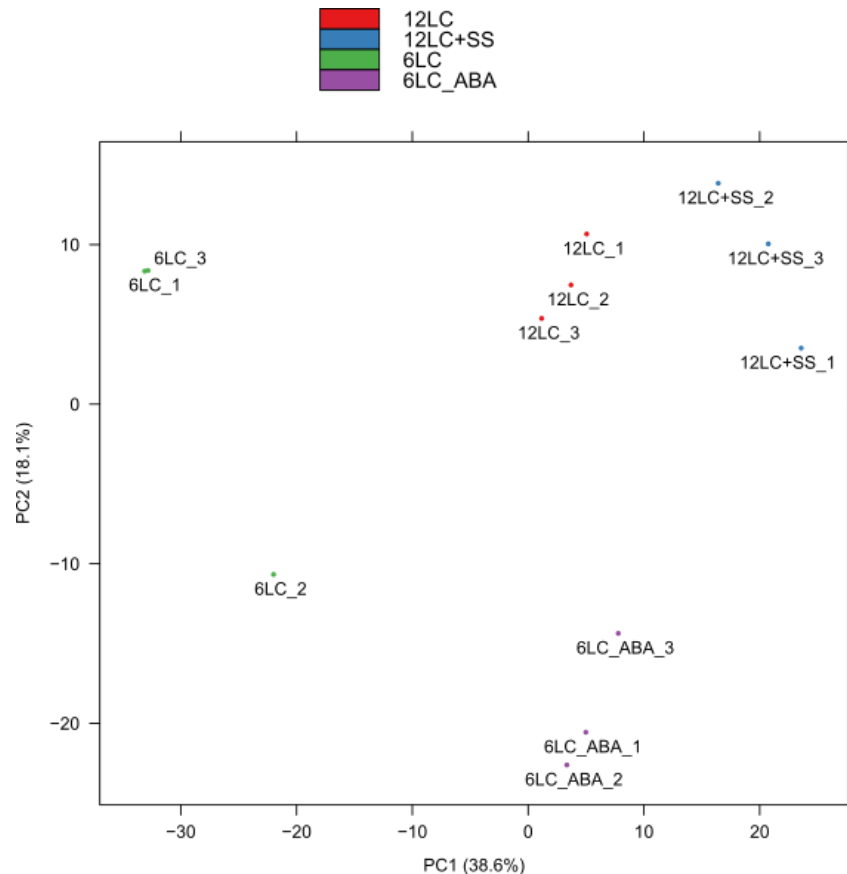


Fig. 14 Score plot of principal component analysis showing transcriptomic discrimination of the different leaf-to-fruit ratio and ABA treatments in berries harvested at 64 DAF in 2017. LC, leaves conserved per cluster per vine. SS, secondary shoots.

As presented in the Venn diagram, 6 and 40 genes were consistently down-regulated or up-regulated in all LFR investigated comparisons (Fig 15A; Table 5). The lowest number of differentially expressed genes (DEGs) was shown for the PS12LC vs PS12LC+SS comparison. Thus, 701, 1588 and 79 genes were differentially expressed in the PS6LC vs PS12LC, PS6LC vs PS12LC+SS and PS12LC vs PS12LC+SS comparisons respectively. Based on this result, it could be hypothesized that secondary shoot removal had a limited effect on transcript abundances between PS12LC and PS12LC+SS LFR treatments at mid-veraison. On the contrary of LFR modulation on primary shoot (PS6LC treatment) had a higher effect on the berry transcriptome.

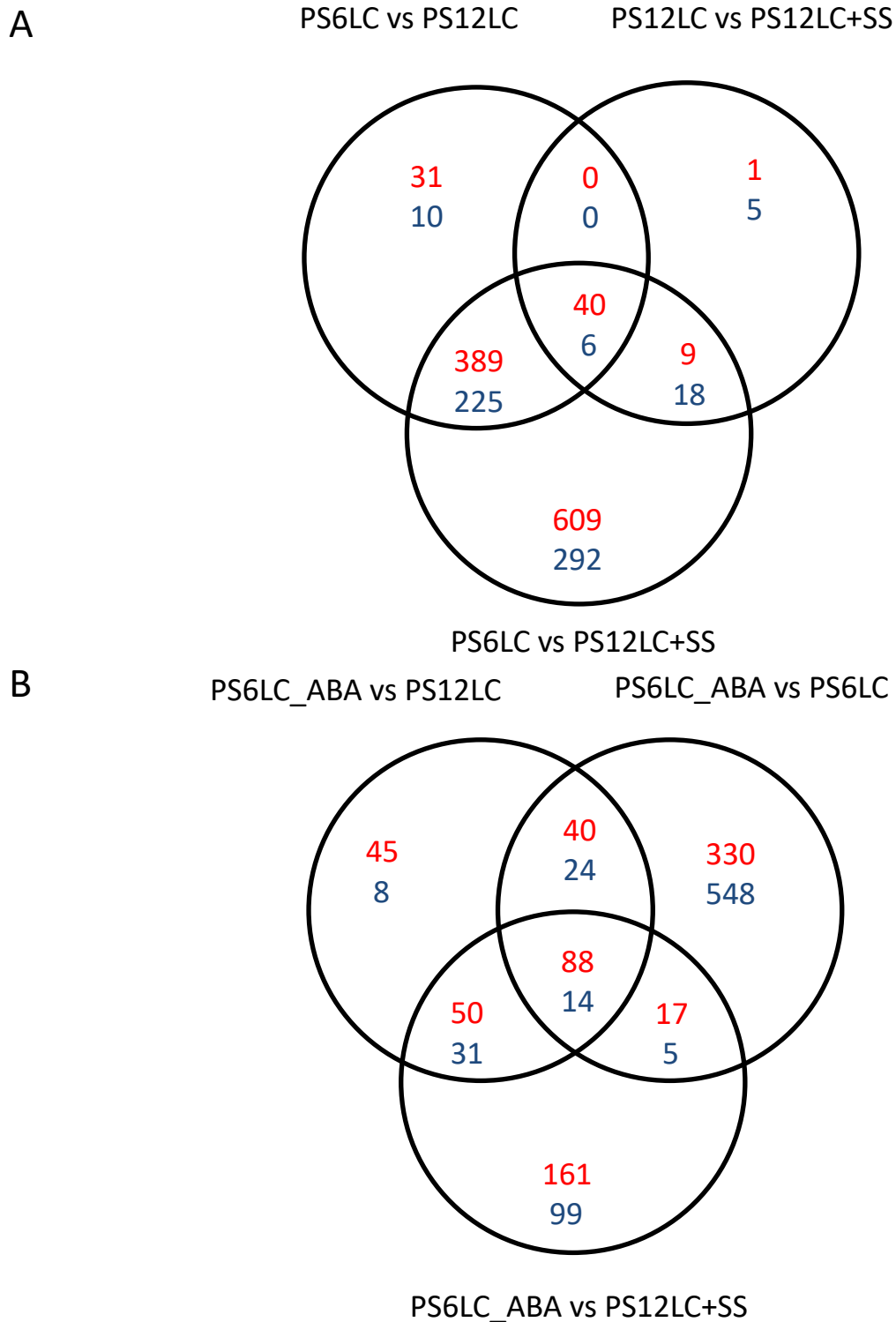


Fig. 15 Effect of source-to-sink modulation on gene expression in berries harvested at 64 DAF in 2017. (A) The Venn diagram indicates overlap of all differentially expressed genes obtained from each comparison between the PS6LC, PS12LC and PS12LC+SS LFR treatments. (B)

The Venn diagram indicates overlap of all differentially expressed genes obtained from each comparison between the PS6LC_ABA, PS6LC, PS12LC and PS12LC+SS LFR and ABA treatments. The numbers of up-regulated genes and down-regulated genes are given in red and in blue, respectively. LC, leaves conserved per cluster per vine. PS, pea-size. PV, pre-veraison. SS, secondary shoots.

In the Venn diagram dedicated to exogenous ABA treatment, 14 and 88 genes were consistently down-regulated or up-regulated in all ABA-related comparisons (Fig 15B; Table 6).

Two to three times less genes were differentially expressed in PS6LC_ABA vs PS12LC, PS6LC_ABA vs PS12LC+SS analysis in comparison to PS6LC_ABA vs PS6LC treatments. Thus, 300, 465 and 1066 genes were differentially expressed in the PS6LC_ABA vs PS12LC, PS6LC_ABA vs PS12LC+SS and PS6LC_ABA vs PS6LC comparisons respectively. Moreover, two times to three times less genes were differentially expressed between the PS6LC_ABA vs PS12LC and PS6LC vs PS12LC comparisons and between the PS6LC_ABA vs PS12LC+SS and PS6LC vs PS12LC+SS comparisons. These results showed the effect of using exogenous ABA on berry transcriptome of vines subjected to LFR modulation.

DEGs in at least two comparisons shown in Venn diagrams were chosen for deeper insight (except genes without known functions). These genes belong to six functional categories, including photosynthesis-, carbohydrates-, amino acids, secondary metabolites- or hormone signal transduction-related genes and transcription factors (Table 5).

1- Photosynthesis-related genes

Based on previous research, berries also contain functional chloroplasts and have the ability to photosynthesize but with a different way to the leaf (Blanke and Lenz, 1989). Veraison is the developmental stage during which the berry begins to transition from being a photosynthesizing organ toward becoming a senescing organ (du Plessis *et al.*, 2017). After LFR treatment, 25 photosynthesis-related genes were all up-regulated in PS6LC relative to PS12LC and PS12LC+SS treatments at mid-veraison stage (Table 5), which means the berries harvested on vines with less leaves maintained a high photosynthesis for a longer period. We supposed a severe defoliation resulted in less carbon input into berries, and berries supplied this kind of loss by staying for a longer period at an herbaceous stage. After exogenous ABA treatment, 14 of 25 photosynthesis-related genes were down-regulated in PS6LC_ABA berries compared with PS6LC ones. In comparison to PS12LC treatment, there was no gene related to photosynthesis significantly differentially expressed in PS6LC_ABA berries. Moreover, 11 photosynthesis-related genes were up-regulated in PS6LC_ABA berries in comparison to PS12LC+SS ones. This result indicated that ABA treatment could result to reduce the photosynthesis in PS6LC_ABA berries to the level obtained with the PS12LC control treatment without reaching the photosynthesis of PS12LC+SS berries.

Table 5: Differentially expressed genes at mid-veraison between the different leaf-to-fruit ratio and ABA treatment investigated

| Gene ID | Gene function description | PS6LC vs PS12LC | PS12LC vs PS12LC+SS | PS6LC vs 12LC+SS | PS6LC_ABA vs PS12LC | PS6LC_ABA vs PS6LC | PS6LC_ABA vs PS12LC+SS |
|-----------------------|--|--------------------|------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Photosynthesis | | | | | | | |
| VIT_15s0024g00040 | chlorophyll a/b binding protein | 1.20 | NS | 1.78 | NS | NS | 1.07 |
| VIT_17s0000g06350 | chlorophyll a/b-binding protein | 1.24 | NS | 1.93 | NS | NS | 1.01 |
| VIT_11s0016g00730 | chlorophyll a-b binding protein | 1.81 | 1.02 | 2.84 | NS | -2.03 | NS |
| VIT_01s0010g03620 | chlorophyll a-b binding protein | 1.06 | NS | 1.68 | NS | NS | NS |
| VIT_07s0005g02220 | chlorophyll a-b binding protein 1B | 2.11 | 1.43 | 3.55 | NS | -2.10 | 1.44 |
| VIT_18s0001g10550 | chlorophyll a-b binding protein 4 | 1.73 | NS | 2.73 | NS | -2.42 | NS |
| VIT_13s0019g04140 | chlorophyll a-b binding protein 6A | 1.13 | NS | 1.66 | NS | NS | NS |
| VIT_19s0014g03660 | chlorophyll a-b binding protein 13 | 1.61 | NS | 2.51 | NS | -1.50 | 1.00 |
| VIT_00s0181g00180 | chlorophyll a-b binding protein 13 | 1.15 | NS | 1.89 | NS | -1.38 | NS |
| VIT_19s0014g00160 | chlorophyll a-b binding protein 40 | 1.22 | 1.16 | 2.39 | NS | NS | 1.42 |
| VIT_10s0003g02890 | chlorophyll a-b binding protein 40 | 1.17 | NS | 1.78 | NS | NS | 1.12 |
| VIT_10s0003g02900 | chlorophyll a-b binding protein 40 | 1.56 | NS | 2.45 | NS | -1.25 | 1.20 |
| VIT_12s0055g01110 | chlorophyll a-b binding protein CP24 10A | 1.16 | NS | 2.02 | NS | -1.14 | NS |
| VIT_18s0001g14450 | ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme | 1.12 | NS | 1.59 | NS | -1.45 | NS |
| VIT_18s0001g11710 | oxygen-evolving enhancer protein 1 | 1.38 | 1.08 | 2.46 | NS | NS | 1.57 |
| VIT_19s0014g05080 | oxygen-evolving enhancer protein 3-1 | 1.11 | NS | 1.49 | NS | -1.72 | NS |
| VIT_00s0904g00010 | oxygen-evolving enhancer protein 3-2 | 1.17 | NS | 1.87 | NS | NS | NS |
| VIT_07s0151g01000 | photosystem I reaction center subunit II | 1.67 | NS | 1.63 | NS | -1.54 | NS |
| VIT_00s0125g00280 | photosystem I reaction center subunit III | 1.03 | NS | 1.74 | NS | NS | 1.01 |
| VIT_04s0044g01410 | photosystem I reaction center subunit N-like | 1.49 | NS | 2.33 | NS | -1.41 | NS |
| VIT_10s0003g04350 | photosystem I reaction center subunit psaK | 1.18 | NS | 1.74 | NS | -1.11 | NS |
| VIT_04s0023g00410 | photosystem I reaction center subunit XI | 1.19 | NS | 2.02 | NS | -1.20 | NS |
| VIT_06s0080g00920 | photosystem I subunit O | 1.34 | NS | 2.14 | NS | -1.03 | 1.10 |
| VIT_01s0137g00210 | photosystem II core complex proteins psbY | 1.13 | NS | 1.83 | NS | NS | 1.02 |
| VIT_07s0141g00570 | photosystem II reaction center W protein | 1.09 | NS | 1.42 | NS | NS | NS |

p value ≤ 0.05 and $|LFC| \geq 1$. NS: not significant

2- Carbohydrate metabolism

Thirty-one genes related to carbohydrate metabolism including starch and sucrose metabolism, cell wall modification, glycolysis and gluconeogenesis and amino sugar and nucleotide sugar metabolism were differentially expressed in our study. Among these genes, 16 genes related to cell wall modification response to the modulation of LFR (Table 5). Among them, two genes functionally annotated as cellulose synthases (*VIT_12s0059g00990* and *VIT_07s0005g02470*) were up-regulated in PS6LC vs PS12LC and PS12LC+SS treatments, which indicated a low LFR was helpful to maintain primary cell wall integrity (Desprez *et al.*, 2007). Besides, one gene probably encoding a pectinesterase / pectinesterase inhibitor (*VIT_05s0062g01160*) and a gene encoding a pectate lyase (*VIT_08s0007g04820*) all other DEGs involved in the loosening of cell wall structure were down-regulated in response to LFR modulation. This result indicated that softening happened later in PS6LC compared with PS12LC or PS12LC+SS.

Seven genes involved in glycolysis or gluconeogenesis (*VIT_03s0038g00670*, *VIT_08s0007g01570*, *VIT_04s0023g03010*, *VIT_19s0015g01720*, *VIT_02s0109g00080*, *VIT_05s0020g02880* and *VIT_03s0088g01190*) were all up-regulated in response to LFR reduction with, among them, the phosphoribulokinase (*VIT_02s0109g00080*) already tested in Fluidigm real-time PCR analysis. Throughout berry herbaceous growth phase, genes encoding enzymes related to Calvin cycle, including phosphoribulokinase, were considered as highly expressed genes and then their transcript abundances declined after veraison (Deluc *et al.*, 2007), which indicated that LFR treatment may delay the berry development. However, the four DEGs (*VIT_15s0046g01590*, *VIT_05s0094g00340*, *VIT_05s0094g00350*, *VIT_05s0094g00330*) involved in amino sugar and nucleotide sugar metabolisms were down-regulated in PS6LC condition in comparison to PS12LC and PS12LC+SS treatments. Thus, we hypothesized when carbon source was reduced the carbon supply for amino sugar and nucleotide sugar metabolisms was firstly affected. After an exogenous ABA treatment, we found that four genes related to galactose, starch and sucrose metabolisms (*VIT_14s0066g00810*, *VIT_05s0020g00330*, *VIT_05s0077g00430* and *VIT_18s0001g05300*) were up-regulated in PS6L_ABA berries, as well as the four genes related to amino sugar and nucleotide sugar metabolisms.

Table 5: Differentially expressed genes at mid-veraison between the different leaf-to-fruit ratio and ABA treatment investigated (Continued from previous page)

| Gene ID | Gene function description | PS6LC vs PS12LC | PS12LC vs PS12LC+SS | PS6LC vs 12LC+SS | PS6LC_ABA vs PS12LC | PS6LC_ABA vs PS6LC | PS6LC_ABA vs PS12LC+SS |
|---|--|--------------------|------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Carbohydrate metabolism | | | | | | | |
| Galactose, starch and sucrose metabolism | | | | | | | |
| VIT_14s0066g00810 | galactinol--sucrose galactosyltransferase-like | NS | NS | NS | 1.30 | 1.01 | 1.50 |
| VIT_05s0020g00330 | glycogenin-1-like | NS | NS | NS | 1.42 | 1.41 | 1.33 |
| VIT_05s0077g00430 | glycogenin-2-like | -1.49 | NS | -1.90 | 1.08 | 2.57 | NS |
| VIT_18s0001g05300 | trehalose-phosphate phosphatase-like | NS | NS | NS | 1.04 | 1.42 | NS |
| Cell wall metabolism | | | | | | | |
| VIT_05s0062g01160 | probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 35-like | 2.01 | NS | 2.41 | NS | -2.83 | NS |
| VIT_11s0016g00330 | probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 54-like | -1.28 | NS | -1.34 | -1.15 | NS | -1.21 |
| VIT_12s0059g00990 | cellulose synthase-like protein H1-like | NS | NS | 1.16 | 1.47 | 1.13 | 2.29 |
| VIT_07s0005g02470 | probable cellulose synthase A catalytic subunit 8 [UDP-forming]-like | 1.03 | NS | 1.84 | NS | -1.68 | NS |
| VIT_15s0048g00510 | pectinesterase 2-like | NS | NS | NS | 2.35 | 2.03 | 2.79 |
| VIT_09s0002g00320 | pectinesterase 3-like | -1.08 | NS | -1.04 | NS | NS | NS |
| VIT_08s0007g04820 | pectate lyase-like protein 3 | 1.16 | NS | 1.06 | NS | -1.16 | NS |
| VIT_13s0019g04900 | probable pectate lyase 13-like | -1.12 | NS | -1.68 | NS | 1.00 | NS |
| VIT_07s0005g05520 | probable pectate lyase 15-like | NS | NS | NS | 1.12 | 1.54 | NS |
| VIT_07s0005g00740 | cellulase CEL1-like | -1.39 | NS | -2.26 | NS | NS | -1.80 |
| VIT_02s0025g02650 | cellulase CEL2-like | NS | NS | NS | 1.75 | 1.78 | 1.71 |
| VIT_07s0185g00050 | putative xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 1-like | -1.25 | NS | -1.54 | NS | NS | NS |
| VIT_10s0116g00520 | probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 8-like | -1.37 | NS | -1.67 | -1.73 | NS | -2.02 |
| VIT_11s0052g01220 | probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23-like | NS | -1.03 | -1.70 | NS | NS | -1.01 |
| VIT_05s0062g00480 | xyloglucan endotransglycosylase XET1-like | -1.90 | NS | -2.18 | -1.36 | NS | -1.64 |
| VIT_01s0150g00460 | xyloglucan endotransglycosylase XET2 | NS | NS | NS | -1.14 | NS | -1.04 |
| Glycolysis / Gluconeogenesis | | | | | | | |
| VIT_03s0038g00670 | probable fructose-bisphosphate aldolase 1 | 1.52 | NS | 2.52 | NS | -1.54 | NS |
| VIT_08s0007g01570 | fructose-1,6-bisphosphatase | 1.26 | NS | 2.03 | NS | -1.25 | NS |
| VIT_04s0023g03010 | probable fructose-bisphosphate aldolase 2 | 1.31 | NS | 2.10 | NS | -1.56 | NS |
| VIT_19s0015g01720 | fructose-bisphosphate aldolase | 1.09 | NS | 1.96 | NS | NS | 1.10 |
| VIT_02s0109g00080 | phosphoribulokinase, chloroplastic-like | 1.09 | NS | 1.78 | NS | -1.02 | NS |
| VIT_05s0020g02880 | glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1 | 1.77 | 1.25 | 3.02 | NS | -2.46 | NS |
| VIT_03s0088g01190 | NAD-malate dehydrogenase | 1.14 | NS | 1.56 | NS | -1.19 | NS |
| Amino sugar and nucleotide sugar metabolism | | | | | | | |
| VIT_15s0046g01590 | rRNA-processing protein FCF1 homolog | NS | NS | -1.28 | 1.28 | 2.10 | NS |
| VIT_05s0094g00340 | class IV endochitinase | -1.20 | NS | -1.52 | NS | 1.72 | NS |
| VIT_05s0094g00350 | chitinase 5-like | -1.18 | NS | -1.80 | NS | 1.12 | NS |
| VIT_05s0094g00330 | chitinase 5-like | -1.24 | NS | -1.78 | NS | 1.91 | NS |

p value ≤ 0.05 and $|LFC| \geq 1$. NS: not significant

The genes involved in glycolysis/ gluconeogenesis process were down-regulated in PS6LC compared with PS6LC_ABA but not significantly differentially expressed in comparison with PS12LC and PS12LC+SS. It seemed that ABA promoted the transformation of the carbon source from primary metabolites.

3- Amino acids metabolism

Twenty-four genes related to amino acids metabolism were differentially expressed in our study (Table 5). Amino acids are important compounds having a pivotal position in grapevine berry metabolism. The genes related to biosynthesis of amino acids were down-regulated in PS6LC, and the transcript abundances of these genes increased after ABA treatment, except for the gene encoding a vacuolar amino acid transporter 1-like (*VIT_19s0027g01890*). Among the genes related to amino acids metabolism, four genes involved in providing carbon units available to the cell (*VIT_00s0211g00120*, *VIT_02s0012g01120*, *VIT_18s0001g14980* and *VIT_17s0000g08070*) were up-regulated in response to carbon source limitation related to a low LFR. Among these genes, one DEG encoding a glycine cleavage system H protein (*VIT_02s0012g01120*), one unit of the glycine cleavage system that is triggered in response to high concentrations of the amino acid glycine (Kikuchi, 1973), was down-regulated after ABA treatment. However, two genes related to aldehyde dehydrogenase family (*VIT_01s0026g00220*, *VIT_17s0000g08070*), which catalyse the oxidation of toxic aldehydes accumulated as a result of side reactions of ROS with lipids and proteins (Kirch *et al.*, 2004), were also up-regulated one after LFR treatment and the other one after ABA treatment. Four genes involved in *D*-glutamine and *D*-glutamate metabolism (*VIT_05s0020g02480* and *VIT_08s0007g07400*) and in glutathione metabolism (*VIT_19s0093g00220* and *VIT_02s0025g03590*) were also up-regulated in response to LFR modulation and down-regulated after ABA treatment. However, the genes involved in lysine degradation and tyrosine metabolism were down-regulated in PS6LC treatment. Besides, the GST gene (*VIT_04s0079g00690*) involved in glutathione metabolism was down-regulated in PS6LC treatment. After ABA treatment, the three GST genes (*VIT_08s0007g01420*, *VIT_07s0104g01800* and *VIT_04s0079g00690*) were up-regulated. Glutathione S-transferases have been proposed to be involved in flavonoid transport (Pérez-Díaz *et al.*, 2016).

Table 5: Differentially expressed genes at mid-veraison between the different leaf-to-fruit ratio and ABA treatment investigated (Continued from previous stage)

| Gene ID | Gene function description | PS6LC vs PS12LC | PS12LC vs PS12LC+SS | PS6LC vs 12LC+SS | PS6LC_ABA vs PS12LC | PS6LC_ABA vs PS6LC | PS6LC_ABA vs PS12LC+SS |
|---------------------------------|--|-----------------|---------------------|------------------|---------------------|--------------------|------------------------|
| Amino acids metabolism | | | | | | | |
| VIT_00s0211g00120 | serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial-like | 1.01 | NS | 1.40 | NS | NS | NS |
| VIT_02s0012g01120 | glycine cleavage system H protein, mitochondrial-like | 1.68 | NS | 2.41 | NS | -2.02 | NS |
| VIT_18s0001g14980 | 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial-like | 1.35 | NS | 1.57 | NS | NS | NS |
| VIT_01s0026g00220 | aldehyde dehydrogenase family 2 member B4, mitochondrial-like | NS | NS | NS | 1.14 | 1.69 | 1.10 |
| VIT_17s0000g08070 | aldehyde dehydrogenase family 2 member B4, mitochondrial-like | 1.00 | NS | 1.37 | NS | NS | NS |
| VIT_05s0020g02480 | glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic-like | 1.28 | NS | 1.87 | NS | -1.38 | NS |
| VIT_08s0007g07400 | GDHB glutamate dehydrogenase | 1.25 | NS | 1.84 | NS | -1.62 | NS |
| VIT_04s0069g00860 | probable sarcosine oxidase | -1.07 | NS | -1.26 | NS | NS | NS |
| VIT_00s0480g00030 | polyphenol oxidase, chloroplastic-like | NS | NS | NS | 1.76 | 2.32 | 1.57 |
| VIT_05s0020g03280 | primary amine oxidase-like | NS | NS | NS | NS | 1.75 | 1.77 |
| VIT_04s0044g01120 | alcohol dehydrogenase 1-like | -1.95 | NS | -1.89 | NS | 1.57 | NS |
| VIT_00s0480g00040 | polyphenol oxidase, chloroplastic-like | NS | NS | NS | 1.78 | 2.11 | 1.76 |
| VIT_19s0093g00220 | probable glutathione S-transferase-like | 1.02 | NS | 1.13 | NS | NS | NS |
| VIT_02s0025g03590 | probable glutathione peroxidase 8-like | 1.55 | NS | 2.27 | NS | -1.69 | NS |
| VIT_08s0007g01420 | glutathione S-transferase U8-like | NS | NS | NS | 1.63 | 1.12 | 1.37 |
| VIT_07s0104g01800 | glutathione S-transferase F13-like | NS | NS | NS | 1.16 | 1.48 | 1.02 |
| VIT_04s0079g00690 | glutathione S-transferase 4 | -1.83 | NS | -2.66 | NS | 2.33 | NS |
| VIT_06s0009g03120 | phenylalanine N-monooxygenase | -1.60 | -1.17 | -2.77 | NS | 1.65 | -1.12 |
| VIT_18s0001g08430 | branched-chain-amino-acid aminotransferase 2, chloroplastic-like | 1.20 | NS | 1.65 | NS | NS | NS |
| Amino acids biosynthesis | | | | | | | |
| VIT_08s0007g05000 | S-adenosylmethionine synthase | -1.04 | NS | -1.27 | NS | 1.59 | NS |
| VIT_01s0010g02460 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like | -1.64 | NS | -2.21 | NS | 1.55 | NS |
| VIT_19s0015g01290 | probable amino acid permease 7-like | NS | NS | NS | 1.11 | 1.59 | 1.11 |
| VIT_19s0027g01890 | vacuolar amino acid transporter 1-like | 1.79 | NS | 2.54 | NS | -2.45 | NS |
| VIT_08s0058g01000 | aspartate aminotransferase, mitochondrial-like | -1.21 | NS | -1.43 | NS | NS | NS |

p value ≤ 0.05 and $|LFC| \geq 1$. NS: not significant

Compared with PS12LC and PS12LC+SS treatments, the flavonoid accumulation in PS6LC decreased, but after ABA treatment, the flavonoid accumulation increased (Fig 4). Thus, the expression profiles obtained for GST genes were consistent with metabolite content of the berries.

4- Hormone signal transduction

Plant hormones play major roles in regulating berry ripening. Some of them act as promoters and some others as repressors of berry ripening. A review by Fortes et al., (2015) summarized the roles of ABA, ethylene and brassinosteroids to promote the berry ripening, and the inhibitor roles of auxins, cytokinins, gibberellins, jasmonates and polyamines in this process.

At mid-veraison, the expression profiles of genes involved in auxin, ABA, cytokinin, ethylene, brassinosteroid and gibberellin had significant changes in response to LFR treatment. ABA plays a crucial role in controlling several ripening-associated processes in grape berries, and it increases rapidly at ripening initiation (Coombe and Hale, 1973). In our RNA-seq data, *BGL18* gene (Beta-glucosidase 18, *VIT_19s0014g03240*) involved in hydrolysis of abscisic acid glucose ester (ABA-GE), which form free ABA increasing ABA level, was up-regulated in PS6LC berries in response to LFR reduction (Kato-Noguchi and Tanaka, 2008). Two genes encoding type 2C protein phosphatases (*VIT_01s0150g00510* and *VIT_05s0077g01820*), which may have a function as co-receptor for ABA and as a negative regulator of ABA signalling (Scheighofer et al., 2004), were also up-regulated in PS6LC. Moreover, the expression of *Hyd2* (hypodontia 2, *VIT_02s0087g00710*), encoding the ABA 8'-hydroxylase enzyme (Speirs et al., 2013), was lower in PS6LC in comparison to PS12LC and PS12LC+SS treatments. Collectively, the changes of these ABA-associated genes indicated that PS6LC berries tried to accumulate ABA at this stage, which meant the ABA level was less than the need for berry ripening initiation.

At the same time, two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidases (*VIT_00s2086g00010* and *VIT_11s0016g02380*), ethylene biosynthesis enzymes (Barry et al., 2000), were found to have significantly different expression profiles in PS6LC vs PS12LC and in PS6LC vs PS12LC+SS comparisons. Two ethylene-responsive transcription factors were up-regulated in PS6LC vs PS12LC and PS12LC+SS treatments means ethylene signal pathway was positively regulated in response to LFR treatment.

Table 5: Differentially expressed genes at mid-veraison between the different leaf-to-fruit ratio and ABA treatment investigated (Continued from previous page)

| Gene ID | Gene function description | PS6LC vs PS12LC | PS12LC vs PS12LC+SS | PS6LC vs 12LC+SS | PS6LC_ABA vs PS12LC | PS6LC_ABA vs PS6LC | PS6LC_ABA vs PS12LC+SS |
|--|--|--------------------|------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Plant hormone signal transduction | | | | | | | |
| ABA | | | | | | | |
| VIT_10s0003g03750 | 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2 (NCED2) | NS | NS | NS | 1.11 | 1.55 | 1.57 |
| VIT_18s0001g10500 | abscisic acid 8'-hydroxylase 4-like | NS | NS | NS | 1.22 | NS | 1.29 |
| VIT_03s0063g00380 | abscisic acid 8'-hydroxylase 4-like | NS | NS | NS | 1.31 | 1.19 | 1.73 |
| VIT_02s0025g00240 | beta-carotene hydroxylase | NS | NS | NS | 1.56 | 2.15 | 1.16 |
| VIT_01s0011g00760 | beta-glucosidase | NS | NS | NS | NS | 1.65 | 1.09 |
| VIT_19s0014g03240 | beta-glucosidase 18 | 1.07 | NS | 1.88 | NS | -1.15 | NS |
| VIT_02s0087g00710 | hypodontia, autosomal recessive (2)(Hyd2) | -1.21 | NS | -1.15 | 1.56 | 2.78 | 1.62 |
| VIT_16s0050g02680 | probable protein phosphatase 2C | NS | NS | NS | 1.28 | 1.03 | NS |
| VIT_01s0150g00510 | probable protein phosphatase 2C 39-like | 1.03 | NS | 1.41 | NS | -1.09 | NS |
| VIT_05s0077g01820 | probable protein phosphatase 2C 73-like | 1.07 | NS | 1.40 | NS | -1.65 | NS |
| Ethylene | | | | | | | |
| VIT_00s2086g00010 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase 1 | 1.77 | NS | 2.05 | NS | -1.79 | NS |
| VIT_11s0016g02380 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase 3 | -1.80 | NS | -2.33 | NS | 1.41 | NS |
| VIT_14s0006g02290 | ethylene-responsive transcription factor ERF034-like | 1.17 | NS | 1.54 | NS | -1.41 | NS |
| VIT_17s0000g00200 | ethylene-responsive transcription factor ERF114-like | NS | NS | NS | 1.07 | NS | 1.26 |
| VIT_08s0040g03180 | ethylene-responsive transcription factor RAP2-7-like | 1.58 | NS | 1.87 | NS | -1.34 | NS |
| Brassinosteroid | | | | | | | |
| VIT_14s0083g01110 | brassinosteroid-6-oxidase | 1.85 | NS | 2.58 | -1.24 | -3.09 | NS |
| VIT_05s0062g00610 | brassinosteroid-regulated protein BRU1-like | -1.85 | NS | -2.04 | -1.46 | NS | -1.65 |

p value ≤ 0.05 and $|LFC| \geq 1$. NS: not significant

Table 5: Differentially expressed genes at mid-veraison between the different leaf-to-fruit ratio and ABA treatment investigated (Continued from previous stage)

| Gene ID | Gene function description | PS6LC vs PS12LC | PS12LC vs PS12LC+SS | PS6LC vs 12LC+SS | PS6LC_ABA vs PS12LC | PS6LC_ABA vs PS6LC | PS6LC_ABA vs PS12LC+SS |
|---------------------|---|-----------------|---------------------|------------------|---------------------|--------------------|------------------------|
| Auxin | | | | | | | |
| VIT_05s0020g04670 | auxin-responsive protein | NS | NS | NS | NS | -1.34 | -1.45 |
| VIT_06s0004g03130 | auxin response factor 4-like | 1.52 | NS | 2.34 | NS | -2.36 | NS |
| VIT_15s0046g00290 | auxin response factor 18-like | 1.20 | NS | 1.96 | NS | -1.57 | NS |
| VIT_11s0016g03540 | auxin-responsive protein IAA27-like | 1.91 | NS | 2.89 | NS | -2.66 | NS |
| VIT_09s0002g00670 | auxin-responsive protein SAUR71 | 2.09 | 1.20 | 3.30 | NS | -3.06 | NS |
| VIT_04s0023g00580 | auxin-induced protein 15A-like | 1.36 | NS | 1.16 | NS | NS | NS |
| VIT_09s0002g05150 | auxin-induced protein 22A-like | NS | NS | -1.43 | -1.42 | NS | -2.25 |
| VIT_07s0141g00270 | auxin-induced protein 22D-like | 1.36 | NS | 1.35 | NS | -2.34 | NS |
| VIT_14s0030g02310 | auxin-induced protein 22D-like | NS | NS | NS | -1.15 | -1.04 | -1.66 |
| VIT_05s0020g04680 | | | NS | NS | -1.11 | -1.54 | -1.87 |
| VIT_04s0023g00520 | auxin-induced protein 10A5-like | -1.40 | NS | -2.19 | -1.19 | NS | -1.99 |
| VIT_03s0038g01150 | auxin-induced protein 10A5-like | 1.04 | NS | 1.34 | NS | -1.29 | NS |
| VIT_04s0023g00490 | auxin-induced protein X10A-like | -1.30 | NS | -1.47 | -1.02 | NS | -1.19 |
| VIT_03s0038g01110 | auxin-induced protein X15-like | 1.06 | NS | 1.61 | NS | -1.81 | NS |
| VIT_18s0001g03170 | auxin-induced protein 5NG4-like | 1.40 | NS | 1.62 | NS | NS | NS |
| VIT_13s0084g00090 | auxin-induced protein 5NG4-like | 1.17 | NS | 1.95 | NS | -1.55 | NS |
| VIT_04s0044g00310 | auxin-induced protein 5NG4-like | NS | NS | NS | 1.28 | NS | 1.17 |
| VIT_04s0023g02730 | auxin-induced protein 5NG4-like | -1.03 | NS | -1.41 | NS | 1.42 | NS |
| VIT_08s0040g02500 | auxin-induced protein 5NG4-like | -1.03 | NS | -1.06 | NS | 1.17 | NS |
| VIT_14s0066g01640 | auxin-induced protein 5NG4-like | 1.23 | NS | 1.76 | -1.05 | -2.29 | NS |
| VIT_05s0062g01010 | auxin-induced protein PCNT115-like | 1.03 | NS | 1.11 | NS | NS | NS |
| VIT_09s0002g00700 | auxin-repressed 12.5 kDa protein-like | 1.37 | NS | 2.09 | NS | -1.12 | NS |
| VIT_04s0023g01480 | flavin-containing monooxygenase YUCCA6-like | 1.10 | NS | 1.56 | NS | NS | NS |
| Zeatin biosynthesis | | | | | | | |
| VIT_11s0016g02110 | cytokinin dehydrogenase 3-like | -1.10 | NS | -1.10 | NS | NS | NS |
| VIT_13s0158g00320 | cytokinin dehydrogenase 6-like | NS | NS | NS | 1.13 | 1.24 | NS |
| VIT_09s0002g03520 | histidine-containing phosphotransfer protein 4-like | 1.36 | NS | 1.62 | NS | -1.56 | NS |
| VIT_08s0007g08910 | zeatin O-glucosyltransferase-like | 1.34 | 1.01 | 2.35 | NS | -1.88 | NS |
| Gibberellin | | | | | | | |
| VIT_19s0177g00030 | gibberellin 2-beta-dioxygenase 8-like | 1.28 | NS | 1.66 | NS | -1.45 | NS |
| VIT_04s0008g04940 | gibberellin 3-beta-dioxygenase 1-like | 1.20 | NS | 1.82 | NS | -1.03 | NS |
| VIT_03s0063g01290 | gibberellin 20 oxidase 2-like | -2.44 | NS | -3.03 | NS | 2.61 | NS |
| VIT_17s0000g06210 | gibberellin-regulated protein 6-like | NS | NS | NS | -1.09 | NS | -1.25 |

p value ≤ 0.05 and $|LFC| \geq 1$. NS: not significant

Brassinosteroids are a group of steroidal plant hormones. The increase of endogenous brassinosteroids levels was associated with the development of berry (Symons *et al.*, 2006). A brassinosteroids biosynthesis gene encoding a brassinosteroid-6-oxidase (*VIT_14s0083g01110*), which was shown to increase in expression before 8 weeks post flowering and have a low transcript level after this stage (Symons *et al.*, 2006), was up-regulated in PS6L berries. At the same time a brassinosteroid-regulated gene BRU1-like (*VIT_05s0062g00610*) may encode a functional xyloglucan endotransglycosylase involved in cell wall modification (Nunan *et al.*, 2001), was down-regulated in PS6LC berries. This result may influence negatively the content of brassinosteroids, considered as ripening promoting hormones, in PS6LC berries in comparison to PS12LC and PS12LC+SS ones.

As one of inhibitors of berry ripening, auxin levels are relatively high during early stages of berry development, then decline prior to initiation of ripening (Coombe, 1960; Fortes *et al.*, 2015). From our data, we found that the flavin-containing monooxygenase YUCCA6-like gene involved in auxin biosynthesis (*VIT_04s0023g01480*) (Dai *et al.*, 2013), was up-regulated in response to LFR treatment, as well as the most of auxin induced genes (*VIT_06s0004g03130*, *VIT_15s0046g00290*, *VIT_11s0016g03540*, *VIT_09s0002g00670*, *VIT_04s0023g00580*, *VIT_07s0141g00270*, *VIT_03s0038g01150*, *VIT_03s0038g01110*, *VIT_18s0001g03170*, *VIT_13s0084g00090*, *VIT_14s0066g01640*, *VIT_05s0062g01010*). It was proved that pre-veraison auxin treatments can delay grape berry ripening and increases sugar accumulation (Böttcher *et al.*, 2011b). Thus, these auxin-related genes up-regulated in response to a low LFR treatment may aim at retarding the ripening initiation and accumulate more sugar to supply the reduction in carbon sources from leaves.

Cytokinins levels in berry have similar changes than auxin (Zhang *et al.*, 2003), which are high early in berry development but decrease rapidly at around veraison stage. Among the genes related to cytokinins, there were two genes up-regulated and one gene down-regulated in response on LFR treatment. One of the two up-regulated genes encodes a zeatin O-glucosyltransferase-like (*VIT_08s0007g08910*), which is considered to be important in cytokinin transport, storage and protection against cytokinin oxidases (Martin and Mok, 1999), and the other one encodes an histidine-containing phosphotransfer protein 4-like (*VIT_09s0002g03520*), which is a positive regulator of cytokinin signalling (Hutchison *et al.*, 2006). The down-regulated gene encodes a cytokinin dehydrogenase 3-like

(*VIT_11s0016g02110*). Thus, cytokinins were thought to be accumulated in response to a low LFR which was similar to auxin.

Gibberellin 20 oxidases and gibberellin 3-beta-dioxygenases play key roles in gibberellin biosynthesis whereas gibberellin 2-beta-dioxygenase is a pivotal enzyme in gibberellin metabolism (Chai *et al.*, 2014). Based on our data, except the gene encoding gibberellin 20 oxidase 2-like (*VIT_03s0063g01290*), other genes related to gibberellin were up-regulated in PS6LC in comparison to PS12LC and PS12LC+SS treatments. Taking this result into account, the content of gibberellins, considered as negative regulating hormones, may be increased in response to LFR modulation in PS6LC berries in comparison to PS12LC and PS12LC+SS ones.

After ABA treatment, these genes had almost opposite changes, which meant spraying ABA was able to change partly the transcript levels of plant hormones related genes in berry. It was interesting to find that the gene *VIT_10s0003g03750* encoding a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase which is the key enzyme in the ABA biosynthetic pathway was up-regulated after ABA treatment (Zhang *et al.*, 2009). It meant adding exogenous ABA induced the synthesis of endogenous ABA in the berry.

5- Secondary metabolites-related genes

Secondary metabolism including aromatic and volatile compounds, phenylpropanoid, flavonoid and anthocyanin biosynthesis are important determinants of berry quality traits. To analyse the influence of LFR and ABA treatments on berry secondary metabolism, the genes involved in these pathways were identified in comparative transcriptional profiling analysis.

Seven genes probably involved in aromatic and volatile compounds (*VIT_04s0079g00690*, *VIT_16s0039g01410*, *VIT_17s0000g02870*, *VIT_14s0006g02170*, *VIT_08s0007g01040*, *VIT_04s0023g03810*, *VIT_15s0046g03570*) were significantly differentially expressed in response to a low LFR treatment (PS6LC), while 10 genes (*VIT_08s0007g01420*, *VIT_07s0104g01800*, *VIT_04s0079g00690*, *VIT_16s0039g01410*, *VIT_05s0094g01250*, *VIT_08s0007g01040*, *VIT_04s0023g03810*, *VIT_19s0015g02070*, *VIT_15s0046g03570* and *VIT_14s0128g00780*) also probably involved in aromatic and volatile compounds were significantly differentially expressed after ABA treatment (Table 5).

Table 5: Differentially expressed genes at mid-veraison between the different leaf-to-fruit ratio and ABA treatment investigated (Continued from previous stage)

| Gene ID | Gene function description | PS6LC vs PS12LC | PS12LC vs PS12LC+SS | PS6LC vs 12LC+SS | PS6LC_ABA vs PS12LC | PS6LC_ABA vs PS6LC | PS6LC_ABA vs PS12LC+SS |
|---|--|-----------------|---------------------|------------------|---------------------|--------------------|------------------------|
| Biosynthesis of secondary metabolites | | | | | | | |
| Flavonoid biosynthesis | | | | | | | |
| VIT_06s0009g01990 | anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 2-like | 1.15 | NS | 1.27 | NS | -1.44 | NS |
| VIT_04s0023g01240 | anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 5-like | 1.60 | NS | 1.68 | NS | -1.33 | NS |
| VIT_16s0022g01970 | anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 5-like | 1.86 | 1.14 | 3.00 | NS | -2.49 | NS |
| VIT_12s0134g00670 | anthocyanin 5-aromatic acyltransferase-like | 1.15 | NS | 1.05 | NS | NS | NS |
| VIT_05s0136g00260 | chalcone synthase (CHS) | -1.23 | NS | -1.82 | NS | 1.54 | NS |
| VIT_02s0025g01260 | dihydroflavonol-4-reductase-like (DFR) | 1.12 | NS | 1.93 | NS | -1.24 | NS |
| VIT_06s0009g03010 | flavonoid 3',5'-hydroxylase 2 (F3'5'H 2) | NS | NS | -1.47 | NS | 1.13 | NS |
| VIT_06s0009g02970 | flavonoid 3',5'-hydroxylase 2-like | -1.88 | NS | -2.60 | NS | 2.34 | NS |
| VIT_01s0010g03510 | flavonoid 3',5'-methyltransferase | -1.22 | NS | -2.02 | NS | 1.90 | NS |
| VIT_01s0010g03490 | flavonoid 3',5'-methyltransferase | -1.01 | NS | -1.84 | NS | 1.65 | NS |
| VIT_06s0009g02840 | flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H) | NS | -1.16 | -1.47 | NS | 1.16 | NS |
| VIT_13s0106g00550 | flavonol 4'-sulfotransferase-like | 1.70 | 1.21 | 2.91 | NS | -2.17 | NS |
| VIT_11s0037g00440 | hydroxycinnamoyl-Coenzyme A shikimate/quininate hydroxycinnamoyltransferase-like | NS | NS | NS | 1.79 | 2.01 | 1.96 |
| VIT_02s0033g00270 | isoflavone reductase homolog-like | NS | NS | NS | 1.44 | 1.14 | 1.36 |
| VIT_02s0025g04720 | leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) | -1.11 | NS | -1.73 | NS | 1.45 | NS |
| VIT_01s0011g02960 | leucoanthocyanidin reductase 1 | NS | NS | NS | 1.33 | 1.66 | 1.19 |
| VIT_06s0009g02810 | probable flavonoid 3',5'-hydroxylase 2-like | -1.12 | NS | -1.97 | NS | 1.33 | NS |
| VIT_11s0078g00290 | trans-cinnamate 4-monooxygenase-like | NS | NS | NS | 1.46 | 1.54 | 1.29 |
| VIT_16s0039g02230 | UDP glucose:flavonoid 3-o-glucosyltransferase (UFGT) | -1.11 | NS | -1.61 | NS | 1.68 | NS |
| VIT_12s0034g00130 | UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase 6-like | NS | NS | NS | 1.25 | 1.00 | NS |
| Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis | | | | | | | |
| VIT_08s0040g00780 | cytochrome P450 98A2 | NS | NS | NS | 1.54 | 1.27 | 1.72 |
| VIT_16s0100g00780 | Stilbene synthase 5 | NS | NS | NS | 1.27 | 1.44 | 1.24 |
| VIT_16s0100g01120 | stilbene synthase 5-like | NS | NS | NS | 1.09 | 1.47 | NS |
| VIT_16s0100g00840 | stilbene synthase 4-like | NS | NS | NS | 1.33 | 1.57 | 1.17 |
| VIT_16s0100g01020 | stilbene synthase 4-like | NS | NS | NS | 1.09 | 1.17 | NS |
| VIT_16s0100g01010 | stilbene synthase 2-like | NS | NS | NS | 1.34 | 1.78 | 1.19 |
| VIT_16s0100g01200 | stilbene synthase (STS) | NS | NS | NS | 1.00 | 1.15 | NS |
| VIT_16s0100g01030 | stilbene synthase | NS | NS | NS | 1.35 | 1.99 | 1.17 |
| VIT_07s0031g00350 | caffeoyl-CoA O-methyltransferase-like (CCoAOMT) | NS | NS | NS | 1.03 | 1.05 | NS |
| VIT_12s0028g03110 | caffeoyl-CoA O-methyltransferase-like (CCoAOMT) | 1.49 | NS | 1.86 | NS | -1.17 | NS |

p value ≤ 0.05 and $|LFC| \geq 1$. NS: not significant

Table 5: Differentially expressed genes at mid-veraison between the different leaf-to-fruit ratio and ABA treatment investigated (Continued from previous stage)

| Gene ID | Gene function description | PS6LC vs PS12LC | PS12LC vs PS12LC+SS | PS6LC vs 12LC+SS | PS6LC_ABA vs PS12LC | PS6LC_ABA vs PS6LC | PS6LC_ABA vs PS12LC+SS |
|--|--|-----------------|---------------------|------------------|---------------------|--------------------|------------------------|
| Biosynthesis of secondary metabolites | | | | | | | |
| Aromatic and volatile metabolites | | | | | | | |
| VIT_19s0015g02070 | (-)-germacrene D synthase-like | NS | NS | NS | NS | -1.61 | -1.20 |
| VIT_15s0046g03570 | (+)-neomenthol dehydrogenase | 1.07 | NS | 1.48 | NS | -1.12 | NS |
| VIT_08s0007g01040 | aldo-keto reductase family 4 member C9-like | 1.23 | NS | 1.94 | NS | -1.20 | NS |
| VIT_14s0128g00780 | lipoxygenase | NS | NS | NS | NS | 1.01 | 1.08 |
| VIT_05s0094g01250 | NADP-dependent alkenal double bond reductase P2-like(AKR) | NS | NS | NS | -1.0 | -1.11 | -1.59 |
| VIT_14s0006g02170 | probable S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase At5g37990-like | 1.00 | NS | 1.33 | NS | NS | NS |
| VIT_17s0000g02870 | probable S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase At5g38780-like | -1.18 | NS | -1.92 | NS | NS | -1.36 |
| VIT_16s0039g01410 | probable tocopherol O-methyltransferase, chloroplastic-like | 1.10 | NS | 1.39 | NS | -1.59 | NS |
| VIT_04s0023g03810 | salicylate O-methyltransferase-like | 1.00 | NS | 1.54 | NS | -1.06 | NS |
| Phenylpropanoid biosynthesis | | | | | | | |
| VIT_04s0023g02900 | cytochrome P450 84A1-like | NS | NS | NS | 1.64 | 1.54 | 1.90 |
| VIT_11s0052g00650 | peroxidase 16-like | -1.50 | NS | -1.00 | NS | 1.31 | NS |
| VIT_08s0040g02200 | peroxidase 21-like | 1.24 | NS | 1.31 | NS | -1.51 | NS |
| VIT_07s0129g00360 | peroxidase 73-like | NS | NS | NS | 1.19 | NS | 1.05 |
| VIT_08s0040g01710 | phenylalanine ammonia-lyase-like | NS | NS | NS | 1.42 | 1.19 | 1.39 |
| VIT_09s0070g00240 | bifunctional dihydroflavonol 4-reductase/flavanone 4-reductase-like | NS | NS | 1.03 | 1.29 | NS | 1.60 |
| VIT_11s0052g01090 | 4-coumarate--CoA ligase 1-like (4CL) | NS | NS | NS | 1.26 | 1.15 | 1.10 |
| VIT_16s0039g01100 | phenylalanine ammonia-lyase-like | NS | NS | NS | 1.40 | 2.33 | 1.35 |
| VIT_16s0039g01130 | phenylalanine ammonia-lyase-like | NS | NS | NS | 1.22 | 1.44 | NS |
| VIT_00s0615g00010 | probable mannitol dehydrogenase-like | -1.02 | NS | -1.30 | NS | 1.37 | NS |
| VIT_00s0371g00100 | probable mannitol dehydrogenase-like | 1.43 | NS | 2.28 | NS | -1.53 | NS |

p value ≤ 0.05 and $|LFC| \geq 1$. NS: not significant

Among these genes, *VviGST4* (*VIT_04s0079g00690*) which may play a role in the thiol precursors biosynthesis pathway, as reported by Kobayashi *et al.* (2010), was down-regulated in PS6LC in comparison to PS12LC and PS12LC+SS treatments, and two other GST genes (*VIT_08s0007g01420* and *VIT_07s0104g01800*) were up-regulated in response to ABA treatment. This result is in agreement with the must content in Pgsh-3SH and Pgsh3SH-Al which decreased for Pgsh-3SH after LFR treatment and which increased for Pgsh-3SH after ABA treatment (Table 2). One gene encoding a (+)-neomenthol dehydrogenase (*VIT_15s0046g03570*) putatively involved in volatile monoterpene biosynthesis was up-regulated in PS6LC in response to LFR modulation (Agudelo-Romero *et al.*, 2013). However, after ABA treatment, most of genes related to aromatic and volatile metabolites were down-regulated except the gene encoding a lipoxygenase (*VIT_14s0128g00780*). Lipoxygenase is an important oxidative enzyme involved in the formation of C6 volatile compounds, and possibly involved in ABA biosynthesis pathway with violaxanthin as precursor (Costantini *et al.*, 2006). This may be another way to evidence the effect of spraying exogenous ABA to induce ABA biosynthesis in berry.

Five genes involved in phenylpropanoid biosynthesis had significantly changes in their transcript abundances in response to LFR treatment. Half of them were significantly up-regulated and the others were significantly down-regulated in PS6LC in comparison to PS12LC and/or PS12LC+SS treatments.

Flavonoids are important secondary metabolites derived from malonyl-CoA and the aromatic amino acid Phe whose biosynthesis pathway followed the phenylpropanoid biosynthesis one (Verpoorte and Alfermann, 2000). Based on gene set enrichment analysis (GSEA), genes related to flavonoid pathway and to flavone and flavonol biosynthesis were down-regulated in response to a low LFR (PS6LC) (Sup Table 4). Among the genes involved in these two pathways, a gene encoding a chalcone synthase (*VIT_05s0136g00260*) conducting the first step in the flavonoid biosynthetic pathway was down-regulated in PS6LC, as well as the gene coding a leucoanthocyanidin dioxygenase (*VIT_02s0025g04720*) and two *F3'5'H* genes (flavonoid 3',5'-hydroxylase 2-like; *VIT_06s0009g02810* and *VIT_06s0009g02970*,) which deliver flavonoid precursors into the pathway leading to the synthesis of tri-hydroxylated anthoxyanins contributing to red color (Bogs *et al.*, 2006). Moreover, one gene encoding a UDP glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase (*VIT_16s0039g02230*) and two anthocyanin O-

methyltransferase genes (*VIT_01s0010g03510*, and *VIT_01s0010g03490*) which were key genes involved in anthocyanins biosynthesis and accumulation (Huguene *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2001), were down-regulated in PS6LC. This result meant the anthocyanins accumulation in PS12LC and PS12LC+SS berries were more important than in PS6LC ones, as shown Fig 4B. Only one gene, involved in stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis pathway, pathway following the phenylpropanoid biosynthesis, and encoding a probable caffeoyl-CoA O-methyltransferase (*VIT_12s0028g03110*) was up-regulated in response to LFR modulation.

Based on GSEA and RNAseq analysis, DEGs related to phenylalanine metabolism, phenylpropanoid biosynthesis, flavonoid pathway and stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis were almost all significantly up-regulated in response to ABA treatment (Table 5 and Sup Table 3). This result indicated that spraying ABA induced the production of secondary metabolites and especially of anthocyanins as shown Fig 4B.

6- Transcription factors

Twenty-seven transcription factors were differentially expressed in response to LFR and ABA treatments including 7, 3 and 5 genes belonging to the MYB, bHLH and WRKY family respectively (Table 5). As reviewed by Xu *et al.*, (2015) MYB-bHLH-WDR (MBW) protein complexes play a major role in regulating anthocyanin biosynthesis (Xu *et al.*, 2015). Besides, another kind of transcription factor WRKY was also proved as being involved in regulating flavonoid biosynthesis, and was able to bind to MBW protein complexes forming a WMBW transcription complex (Amato *et al.*, 2017; Verweij *et al.*, 2016). Combining with the transcript abundance changes of genes involved in flavonoid biosynthesis, it seems that WMBW protein complexes may also response to LFR treatment at mid-veraison. ATP-binding cassette transporters (ABC transporters) are members of a transport system superfamily, which are involved in vacuolar sequestration of flavonoids and cellular uptake of the plant hormone abscisic acid (Goodman *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2010). We found 7 genes encoding ABC transporter G or C family member protein differentially expressed in response to LFR and ABA treatments which might be involved in the transport of secondary metabolites. One ABC gene (*VIT_09s0002g05590*) was down-regulated in PS6LC berries and up-regulated in PS6LC_ABA ones, which was found as 73% similar at the protein level to AtPDR12/ABCG40 that acted as

an ABA transporter in *Arabidopsis thaliana* (Kang *et al.*, 2010). This was consistent with the transcript abundance changes of genes related to ABA metabolism mentioned above.

Table 5: Differentially expressed genes at mid-veraison between the different leaf-to-fruit ratio and ABA treatment investigated (Continued from previous stage)

| Gene ID | Gene function description | PS6LC vs PS12LC | PS12LC vs PS12LC+SS | PS6LC vs 12LC+SS | PS6LC_ABA vs PS12LC | PS6LC_ABA vs PS6LC | PS6LC_ABA vs PS12LC+SS |
|------------------------------|---|-----------------|---------------------|------------------|---------------------|--------------------|------------------------|
| Transcription factors | | | | | | | |
| VIT_02s0033g00390 | myb-related transcription factor (VvMYBA2) | -1.70 | NS | -2.65 | NS | 2.50 | NS |
| VIT_02s0033g00410 | myb-related transcription factor (VvMYBA1) | -1.31 | NS | -2.01 | NS | 1.91 | NS |
| VIT_14s0006g01280 | R2R3 MYB transcription factor | 1.76 | NS | 2.00 | NS | -1.80 | NS |
| VIT_14s0066g01090 | R2R3 Myb24 transcription factor | -1.03 | NS | -1.71 | NS | NS | -1.48 |
| VIT_05s0077g00500 | R2R3 transcription factor MYB108-like protein 1 | NS | NS | NS | 1.18 | 1.07 | 1.07 |
| VIT_07s0005g01950 | R2R3 transcription factor MYB108-like protein 2 | NS | NS | NS | 1.28 | 1.50 | 1.45 |
| VIT_02s0033g00450 | transcription factor MYB113-like | -1.87 | NS | -2.83 | NS | 2.66 | NS |
| VIT_01s0011g02940 | transcription factor bHLH30-like | 1.03 | NS | 1.28 | NS | NS | NS |
| VIT_13s0067g01350 | transcription factor bHLH51-like | 1.03 | NS | 1.38 | -1.24 | -2.27 | NS |
| VIT_19s0014g04670 | transcription factor bHLH123-like | 1.17 | NS | 1.10 | NS | -1.01 | NS |
| VIT_09s0018g00240 | probable WRKY transcription factor 40-like | NS | NS | NS | 1.03 | 1.29 | 1.03 |
| VIT_08s0007g00570 | probable WRKY transcription factor 49-like | 1.10 | NS | 1.24 | NS | NS | 1.24 |
| VIT_04s0008g01470 | probable WRKY transcription factor 50-like | NS | NS | NS | 1.66 | 1.35 | 1.27 |
| VIT_08s0058g01390 | probable WRKY transcription factor 70-like | 1.14 | NS | 1.03 | 1.58 | NS | 1.47 |
| VIT_13s0067g03140 | probable WRKY transcription factor 70-like | NS | NS | NS | 1.31 | NS | 1.32 |
| VIT_06s0061g00720 | transcription factor fer-like iron deficiency-induced transcription factor-like | -1.44 | NS | -1.68 | NS | NS | -1.03 |
| VIT_14s0068g00330 | transcription factor TCP13-like | 1.14 | NS | 1.31 | NS | -1.33 | NS |
| VIT_17s0000g06020 | transcription factor TCP15-like | 1.05 | NS | 1.94 | NS | -2.01 | NS |
| VIT_07s0031g01320 | transcription factor TGA1-like | 1.18 | NS | 1.60 | NS | -1.18 | NS |
| VIT_09s0002g01400 | transcription factor TT2-like | 1.40 | NS | 1.73 | NS | NS | NS |
| VIT_07s0005g01700 | transcription factor UPBEAT1-like | -1.10 | NS | -1.38 | NS | NS | NS |
| VIT_03s0091g00690 | zinc finger protein ZAT10-like | NS | NS | NS | 1.12 | 1.17 | 1.27 |
| VIT_19s0015g00440 | nuclear transcription factor Y subunit B-3-like | 1.18 | NS | 2.06 | NS | -1.24 | NS |
| VIT_12s0035g00900 | protein TIFY 10A | 1.02 | NS | 1.62 | NS | -1.74 | NS |
| VIT_08s0007g07550 | GATA transcription factor 9-like | 1.02 | NS | 1.43 | NS | -1.34 | NS |
| VIT_04s0008g01290 | putative GATA transcription factor 22-like | NS | 1.11 | 2.10 | NS | -1.60 | NS |
| VIT_11s0016g03940 | heat stress transcription factor C-1-like | 1.62 | NS | 2.25 | NS | -1.57 | NS |
| ABC transporter | | | | | | | |
| VIT_03s0017g01300 | ABC transporter G family member 11-like | 1.13 | NS | 1.82 | NS | -1.81 | NS |
| VIT_02s0087g00840 | ABC transporter G family member 14-like | 1.01 | NS | 1.45 | NS | NS | 1.28 |
| VIT_02s0025g00970 | ABC transporter C family member 10-like | NS | 1.23 | 1.74 | NS | NS | NS |
| VIT_18s0072g01220 | ABC transporter G family member 25-like | NS | NS | NS | 1.07 | 1.76 | 1.14 |
| VIT_08s0032g00790 | ABC transporter G family member 22 | 1.21 | NS | 1.32 | NS | -1.39 | NS |
| VIT_09s0002g05590 | ABC transporter G family member 40-like | -1.01 | NS | -1.35 | NS | 1.20 | NS |
| VIT_07s0031g02550 | ABC transporter G family member 5-like | 1.17 | NS | 1.87 | NS | -1.12 | NS |

p value ≤ 0.05 and $|LFC| \geq 1$. NS: not significant

IV- Conclusions

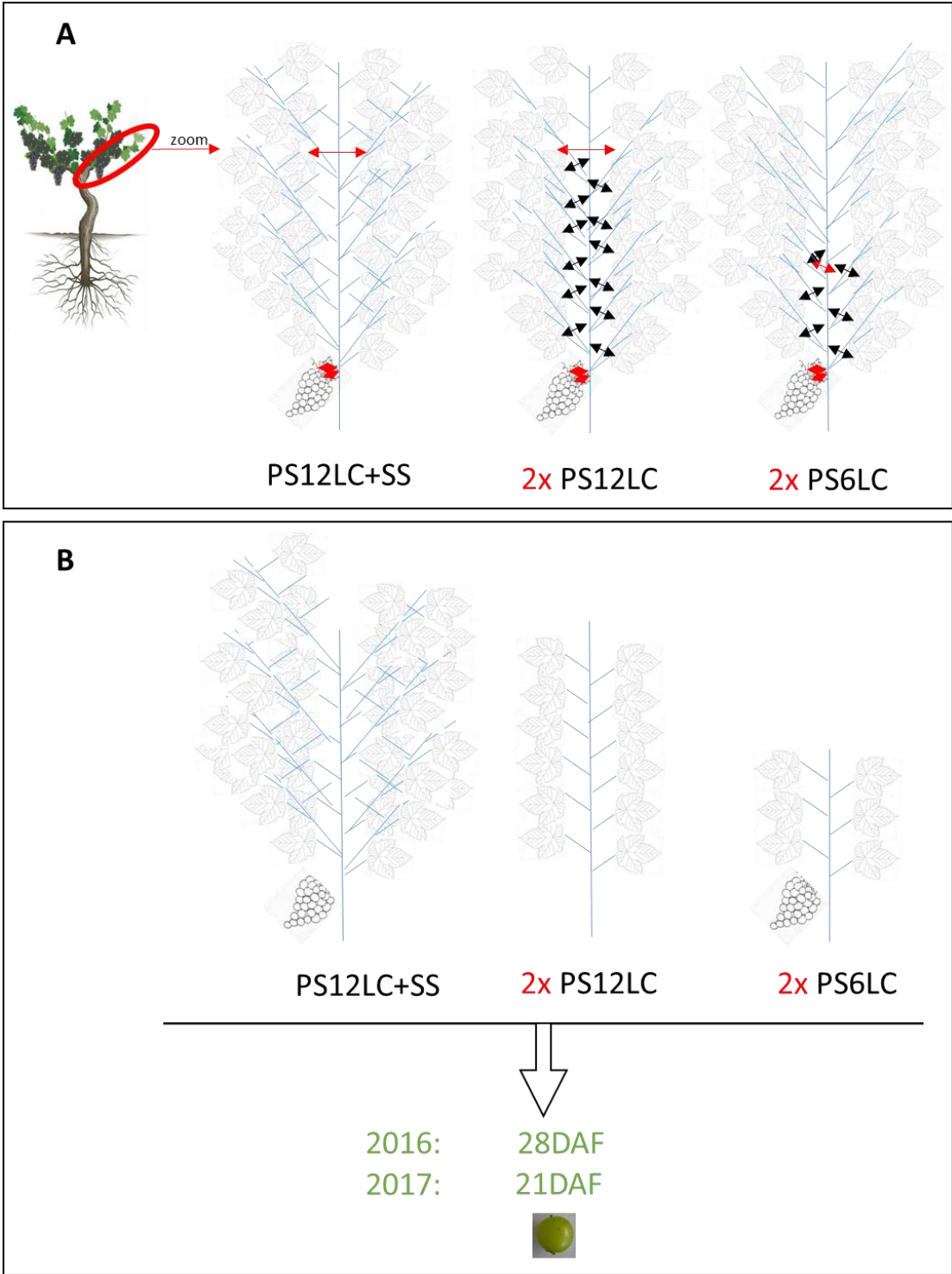
A comparison was made of biochemical and transcriptional responses to LFR modulation coupled or not to spray of ABA in Cabernet-Sauvignon vines grown in vineyard during two consecutive years to evaluate the effects of response to LFR modification and ABA application on berries. In terms of grape composition, reducing LFR induced a significant decrease in sugar content and total anthocyanins and an increase in malic acid content at harvest in response to LFR modulation. Same results were evidenced on musts and wines performed in our study. Lowering LFR did not have an effect on the concentration of the aromatic compounds associated with the vegetal character of the wine, namely MPs and also on precursors of thiols, involved in the fruity character of wines. The positive effect on total anthocyanins content of coupling ABA spraying just before veraison to LFR treatment was evidenced. The sensory analysis performed on microvinifications showed that LFR ratio modulation did not affect significantly the Bordeaux wine typicality but spraying ABA on berries had an impact on wine composition for both vintages by increasing Bordeaux wine olfactory typicality in PS6LC_ABA wines compared to PS6LC ones and made it close to PS12LC control ones.

Global gene expression analysis performed on berries from LFR coupled or not to ABA spraying and untreated control vines allowed genes commonly regulated by selective leaf-stripping combined or not to ABA treatment to be identified. The differential expression of these putative marker genes, mainly related to photosynthesis, carbohydrates metabolism (phosphoribulokinase), hormone signaling and secondary metabolism (*VviLDOX*, *VviUFGT*, *VviFAOMT*, (+)-neomenthol dehydrogenase, AKR (*VIT_08s0007g01040*)) could link the LFR treatment to physiological and metabolic changes found in treated berries, musts and wines obtained. Several other marker genes related to secondary metabolism and more precisely to anthocyanin and flavonoid biosynthesis (UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase 6-like (*VIT_12s0034g00130*)), stilbenes and aroma compounds biosynthesis were influenced in response to ABA treatment.

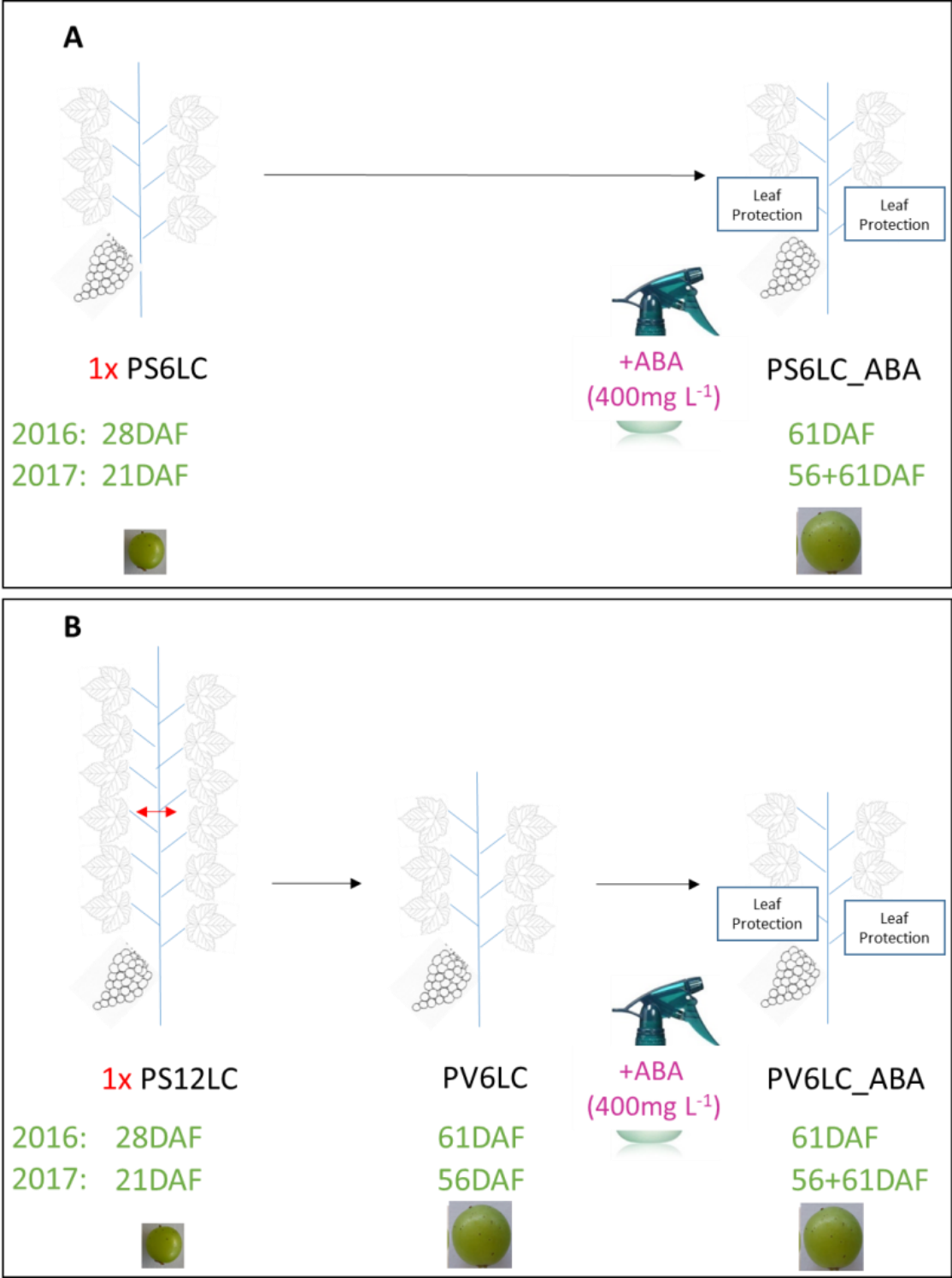
These new insights greatly improve previous knowledge about molecular mechanisms on an important and widely used management technique in viticulture, allowing physiological responses in berry to the selective LFR practice and proved the interest to combine LFR and ABA treatments on berry biochemical composition for optimal wine quality.

V- Supplementary data

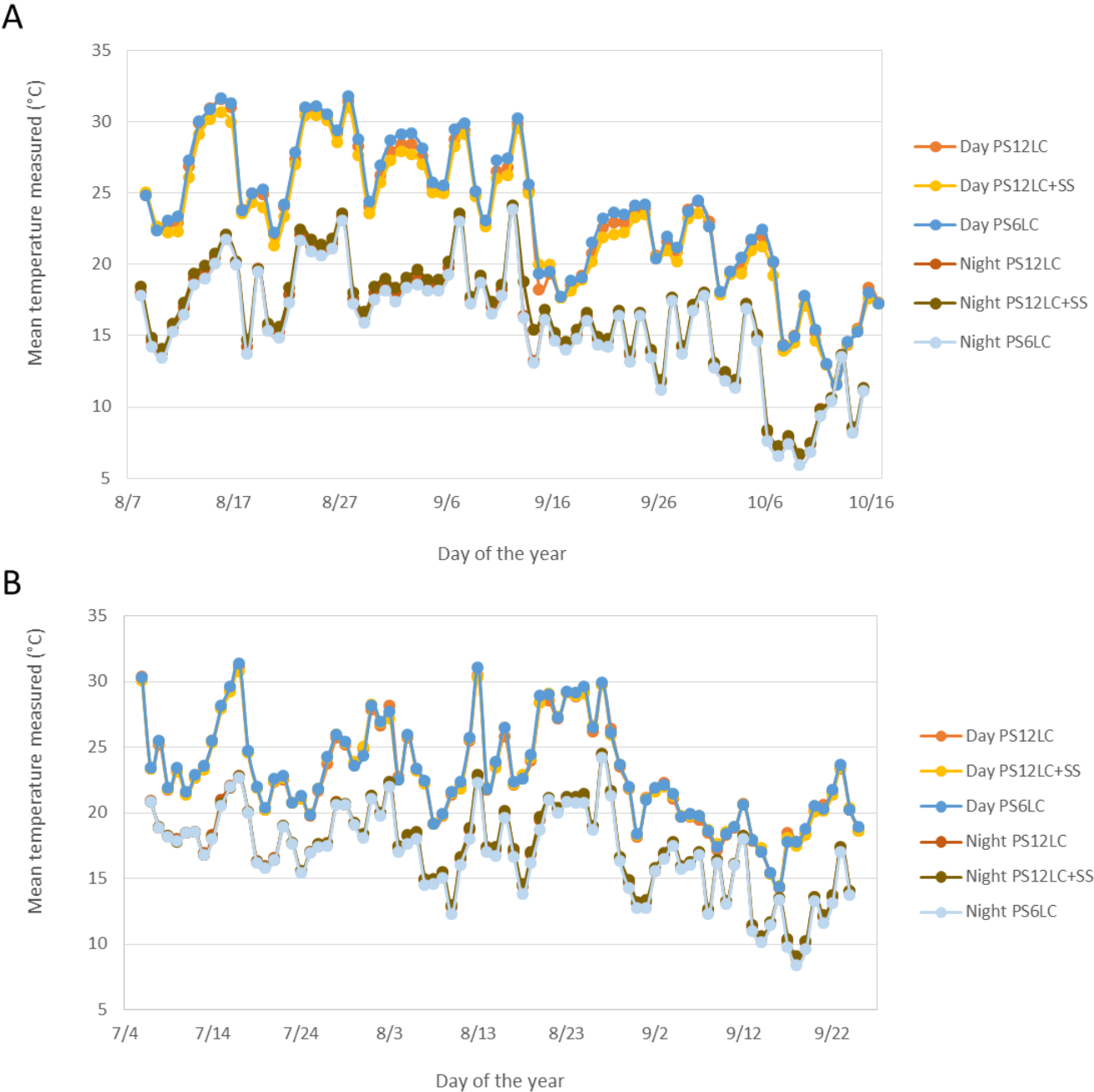
Sup Fig 1. Experimental set up of leaf-to-fruit ratios treatments performed at pea-size stage, before (A) and after the treatments (B). Red arrows represent the heading cut of primary shoot and leaf removal around the bunch. Black arrows represent the secondary shoot removal. DAF, day after flowering.



Sup Fig 2. Experimental set up of leaf-to-fruit ratios coupled with sprayed ABA before veraison, before (A) and after the treatments (B). Red arrow represents the heading cut of primary shoot.
 DAF, day after flowering.



Sup Fig 3. Seasonal trends of bunch temperature in 2016 (A) and 2017 (B) of Cabernet-Sauvignon vines during the growing season.



Sup Table 1. Effect of source-to-sink modulation and ABA treatment on agronomical measurements

| Year | Treatment | Leaf area | $\delta C13$ | Leaf water potential (Mpa) | | | Dualox at 47DAF | | |
|------|-----------|-----------------------|----------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|
| | | | | 28DAF | 75DAF | 122DAF | Chl ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | Flav | NBI |
| 2016 | PS12LC | 1836.65 \pm 16.04 b | -26.21 \pm 0.09 ab | -0.14 \pm 0.01 a | -0.13 \pm 0.02 a | -0.16 \pm 0.01 a | | | |
| | PS12LC+SS | | -26.79 \pm 0.12 b | -0.12 \pm 0.01 a | -0.15 \pm 0.01 a | -0.14 \pm 0.00 a | | | |
| | PS6LC | 1066.7 \pm 4.74 c | -25.74 \pm 0.02 a | -0.09 \pm 0.00 a | -0.17 \pm 0.01 a | -0.09 \pm 0.01 a | | | |
| | PS6LC_ABA | 869.69 \pm 23.18 d | -25.58 \pm 0.02 a | -0.12 \pm 0.00 a | -0.20 \pm 0.04 a | -0.08 \pm 0.00 a | | | |
| | PV6LC_ABA | 954.58 \pm 20.19 cd | -25.87 \pm 0.09 a | -0.16 \pm 0.01 a | -0.12 \pm 0.00 a | -0.11 \pm 0.02 a | | | |
| | | | | 35DAF | 47DAF | 89DAF | | | |
| 2017 | PS12LC | 1329.73 \pm 19.59 b | -26.00 \pm 0.13 a | -0.08 \pm 0.00 a | -0.11 \pm 0.02 a | -0.24 \pm 0.01 a | 34.33 \pm 0.42 a | 2.60 \pm 0.03 a | 13.30 \pm 0.31 a |
| | PS12LC+SS | | -26.38 \pm 0.15 a | -0.06 \pm 0.00 a | -0.08 \pm 0.02 a | -0.23 \pm 0.02 a | 31.95 \pm 0.87 a | 2.62 \pm 0.06 a | 12.53 \pm 0.61 a |
| | PS6LC | 603.81 \pm 32.62 c | -26.03 \pm 0.03 a | -0.11 \pm 0.01 a | -0.14 \pm 0.02 a | -0.27 \pm 0.02 a | 34.92 \pm 0.92 a | 2.72 \pm 0.04 a | 13.16 \pm 0.46 a |
| | PS6LC_ABA | 611.44 \pm 7.70 c | -25.84 \pm 0.07 a | -0.15 \pm 0.00 a | -0.11 \pm 0.00 a | -0.16 \pm 0.00 a | 35.16 \pm 0.23 a | 2.94 \pm 0.03 a | 12.03 \pm 0.03 a |
| | PV6LC_ABA | 575.18 \pm 30.57 c | -26.24 \pm 0.02 a | -0.07 \pm 0.01 a | -0.11 \pm 0.00 a | -0.23 \pm 0.02 a | 32.10 \pm 0.36 a | 2.68 \pm 0.03 a | 12.36 \pm 0.35 a |

All data are presented as mean \pm Standard Error (SE) of three biological replicates.

Different and non-overlapping letters indicate significant differences between treatments (p value < 0.05).

Statistical significance was determined by Anova test results followed by Tukey tests (p value < 0.05).

Chl, surface content in chlorophyll. Flav, epidermal flavonol index. NBI, Nitrogen Balance Index.

Sup Table 2. Effect of source-sink modulation and ABA treatment on free amino acids contents throughout the berry development

| Year | Day after flowering | Treatment | Asp | Glu | Asn | Ser | Gly | Gln | His | Arg | Thr | |
|-----------|---------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------------------|------------------|
| 2016 | 33 | PS12LC | 197.70 ± 9.53 a | 402.02 ± 24.51 a | 44.46 ± 1.34 a | 162.12 ± 4.23 a | 39.71 ± 0.48 a | 660.12 ± 38.53 a | 81.42 ± 1.96 a | 666.71 ± 28.23 a | 157.36 ± 7.27 a | |
| | | PS12LC+SS | 255.30 ± 46.49 a | 542.44 ± 91.87 a | 71.58 ± 13.16 a | 177.36 ± 25.03 a | 33.99 ± 3.96 a | 1376.85 ± 224.82 a | 87.36 ± 7.11 a | 875.49 ± 119.04 a | 176.10 ± 29.27 a | |
| | | PS6LC | 272.14 ± 14.24 a | 570.03 ± 14.72 a | 83.20 ± 11.49 a | 230.40 ± 13.45 a | 66.43 ± 5.66 a | 788.85 ± 103.27 a | 100.18 ± 6.48 a | 972.64 ± 144.54 a | 228.57 ± 27.20 a | |
| | | | PS6LC_ABA | 245.81 ± 4.19 a | 542.46 ± 9.63 a | 99.50 ± 9.52 a | 194.99 ± 4.04 a | 57.22 ± 5.06 a | 886.83 ± 38.31 a | 96.77 ± 2.60 a | 908.43 ± 77.08 a | 186.01 ± 10.17 a |
| | 40 | PS12LC | 126.73 ± 3.10 b | 251.68 ± 3.28 c | 65.05 ± 5.32 b | 88.209 ± 1.75 c | 26.37 ± 0.53 a | 347.80 ± 10.44 b | 91.42 ± 2.67 a | 731.95 ± 33.73 b | 182.26 ± 5.48 b | |
| | | PS12LC+SS | 245.41 ± 3.73 a | 468.49 ± 11.56 ab | 120.3 ± 2.70 a | 145.12 ± 1.46 a | 27.62 ± 2.63 a | 924.69 ± 44.51 a | 123.40 ± 2.02 a | 1474.86 ± 75.75 a | 339.30 ± 13.86 a | |
| | | PS6LC | 203.50 ± 11.37 ab | 399.87 ± 18.04 b | 79.23 ± 1.55 b | 113.23 ± 3.50 b | 38.11 ± 1.65 a | 496.58 ± 12.40 b | 110.83 ± 2.83 a | 1208.47 ± 94.17 ab | 259.80 ± 20.37 ab | |
| | | | PS6LC_ABA | 256.37 ± 19.81 a | 542.54 ± 13.46 a | 152.0 ± 7.59 a | 153.89 ± 1.35 a | 42.16 ± 1.29 a | 935.61 ± 67.85 a | 119.19 ± 8.99 a | 1564.85 ± 84.94 a | 339.59 ± 13.96 a |
| | 61 | PS12LC | 181.38 ± 5.86 a | 209.94 ± 5.05 a | 15.91 ± 1.01 b | 59.216 ± 2.65 a | 33.65 ± 0.59 b | 322.01 ± 2.70 a | 138.13 ± 3.33 a | 683.40 ± 54.32 a | 175.77 ± 10.75 a | |
| | | PS12LC+SS | 201.92 ± 15.11 a | 287.01 ± 17.04 a | 19.84 ± 1.56 b | 87.028 ± 3.405 a | 24.69 ± 2.71 b | 365.87 ± 12.78 a | 144.63 ± 8.66 a | 1019.07 ± 131.01 a | 269.57 ± 17.01 a | |
| | | PS6LC | 241.27 ± 13.85 a | 306.70 ± 18.96 a | 40.14 ± 2.25 a | 63.902 ± 3.81 a | 61.08 ± 3.42 a | 477.82 ± 53.23 a | 164.51 ± 8.38 a | 1198.01 ± 94.99 a | 272.35 ± 19.31 a | |
| | 70 | PS12LC | 212.42 ± 3.86 a | 257.83 ± 2.90 a | 15.67 ± 1.54 b | 112.03 ± 4.70 a | 18.76 ± 0.76 bc | 328.50 ± 11.30 a | 117.85 ± 2.99 b | 488.24 ± 33.45 b | 198.37 ± 10.79 b | |
| | | PS12LC+SS | 265.06 ± 6.61 a | 309.33 ± 4.77 a | 18.05 ± 0.59 ab | 112.23 ± 2.84 a | 13.69 ± 0.47 c | 348.18 ± 14.37 a | 118.32 ± 0.95 ab | 607.49 ± 42.46 ab | 214.97 ± 9.01 ab | |
| | | PS6LC | 192.57 ± 10.33 a | 251.61 ± 14.70 a | 21.22 ± 0.97 ab | 106.40 ± 3.10 a | 35.02 ± 0.58 a | 370.30 ± 21.67 a | 146.88 ± 5.64 ab | 729.92 ± 97.17 ab | 223.98 ± 13.83 ab | |
| | | PS6LC_ABA | 174.33 ± 13.94 a | 223.22 ± 17.55 a | 23.09 ± 1.89 ab | 114.58 ± 8.59 a | 35.14 ± 1.80 a | 407.77 ± 28.08 a | 142.67 ± 2.19 ab | 965.72 ± 30.42 ab | 286.70 ± 16.03 ab | |
| | | PV6LC_ABA | 265.35 ± 15.47 a | 320.58 ± 26.32 a | 33.97 ± 2.87 a | 146.95 ± 13.03 a | 29.33 ± 2.17 ab | 415.35 ± 46.48 a | 155.73 ± 5.05 a | 1045.95 ± 84.37 a | 351.04 ± 23.27 a | |
| | 80 | PS12LC | 204.57 ± 1.39 ab | 227.76 ± 10.27 a | 12.21 ± 0.52 a | 105.77 ± 4.94 a | 16.32 ± 0.62 ab | 173.21 ± 11.67 a | 102.82 ± 4.536 a | 455.34 ± 48.32 a | 207.74 ± 17.11 a | |
| | | PS12LC+SS | 321.84 ± 17.86 a | 407.91 ± 15.99 a | 22.65 ± 1.17 a | 161.37 ± 10.56 a | 20.50 ± 1.57 ab | 339.32 ± 28.71 a | 141.81 ± 7.13 a | 683.10 ± 46.26 a | 295.20 ± 13.24 a | |
| | | PS6LC | 321.67 ± 14.55 a | 416.41 ± 19.58 a | 27.86 ± 2.72 a | 221.52 ± 17.67 a | 33.95 ± 2.66 a | 479.91 ± 69.67 a | 155.51 ± 8.23 a | 1181.41 ± 191.66 a | 441.14 ± 51.13 a | |
| | | PS6LC_ABA | 276.20 ± 25.89 ab | 345.99 ± 43.90 a | 24.56 ± 1.98 a | 197.38 ± 21.34 a | 26.39 ± 2.59 ab | 571.61 ± 85.07 a | 161.85 ± 12.65 a | 1285.20 ± 103.97 a | 459.06 ± 49.22 a | |
| | | PV6LC_ABA | 152.62 ± 5.723 b | 180.62 ± 15.58 a | 15.24 ± 0.79 a | 88.796 ± 2.15 a | 15.61 ± 0.63 b | 165.56 ± 6.15 a | 118.49 ± 4.35 a | 634.61 ± 10.61 a | 224.88 ± 7.93 a | |
| | 90 | PS12LC | 294.14 ± 12.21 a | 381.51 ± 13.65 a | 16.59 ± 1.06 a | 176.99 ± 9.48 a | 39.21 ± 1.69 a | 130.51 ± 9.28 a | 178.66 ± 4.27 a | 629.29 ± 68.20 b | 280.73 ± 24.52 a | |
| | | PS12LC+SS | 307.52 ± 26.13 a | 572.73 ± 22.92 a | 15.03 ± 0.67 a | 195.38 ± 11.41 a | 41.14 ± 2.28 a | 220.50 ± 19.18 a | 189.94 ± 12.59 a | 697.65 ± 102.26 ab | 296.66 ± 26.77 a | |
| | | PS6LC | 367.50 ± 40.25 a | 685.23 ± 146.0 a | 19.35 ± 0.92 a | 224.13 ± 21.61 a | 37.70 ± 3.79 a | 263.19 ± 45.98 a | 217.76 ± 11.20 a | 1301.13 ± 183.44 ab | 508.99 ± 64.24 a | |
| PS6LC_ABA | | 334.93 ± 17.22 a | 527.04 ± 59.78 a | 26.23 ± 1.69 a | 317.15 ± 28.12 a | 50.00 ± 0.35 a | 507.30 ± 91.75 a | 233.65 ± 16.33 a | 2231.70 ± 265.96 ab | 700.54 ± 85.92 a | | |
| | | PV6LC_ABA | 234.14 ± 18.70 a | 339.58 ± 45.99 a | 22.89 ± 2.19 a | 168.19 ± 16.76 a | 34.53 ± 3.08 a | 168.43 ± 24.33 a | 185.44 ± 9.33 a | 790.58 ± 98.07 ab | 327.31 ± 46.70 a | |
| 100 | PS12LC | 184.12 ± 7.41 a | 258.71 ± 6.54 a | 7.427 ± 0.93 a | 136.59 ± 8.70 a | 23.95 ± 1.86 a | 165.28 ± 7.71 a | 169.57 ± 4.26 a | 328.34 ± 42.00 a | 207.27 ± 18.44 a | | |
| | PS12LC+SS | 230.46 ± 2.53 a | 333.35 ± 8.46 a | 9.72 ± 0.95 a | 145.01 ± 3.77 a | 22.72 ± 0.56 a | 192.53 ± 11.40 a | 155.54 ± 2.32 a | 299.71 ± 40.05 a | 188.53 ± 13.19 a | | |
| | PS6LC | 213.84 ± 20.15 a | 322.28 ± 37.93 a | 8.887 ± 0.54 a | 177.35 ± 16.79 a | 23.37 ± 2.04 a | 233.97 ± 28.10 a | 176.46 ± 9.05 a | 669.66 ± 116.41 a | 355.73 ± 48.13 a | | |
| | PS6LC_ABA | 159.09 ± 2.29 a | 210.95 ± 1.18 a | 8.884 ± 0.78 a | 166.76 ± 8.98 a | 28.25 ± 3.12 a | 206.06 ± 8.45 a | 159.79 ± 3.58 a | 779.52 ± 51.52 a | 349.95 ± 19.08 a | | |
| | | PV6LC_ABA | 159.63 ± 23.87 a | 238.82 ± 42.17 a | 15.50 ± 2.45 a | 128.11 ± 17.02 a | 23.87 ± 3.27 a | 180.59 ± 23.18 a | 151.70 ± 9.86 a | 442.65 ± 68.89 a | 228.73 ± 33.12 a | |
| 110 | PS12LC | 223.80 ± 11.80 a | 420.86 ± 17.49 a | 15.67 ± 1.10 a | 276.23 ± 29.83 a | 83.21 ± 13.58 a | 164.95 ± 7.46 a | 155.22 ± 7.46 b | 468.23 ± 53.20 b | 250.00 ± 24.96 a | | |
| | PS12LC+SS | 202.48 ± 4.76 a | 571.94 ± 11.53 a | 13.71 ± 0.59 a | 227.68 ± 11.65 a | 30.56 ± 1.99 a | 200.92 ± 11.27 a | 182.37 ± 7.03 b | 421.90 ± 48.01 b | 241.05 ± 12.86 a | | |
| | PS6LC | 282.35 ± 15.66 a | 565.80 ± 45.16 a | 21.47 ± 1.81 a | 279.31 ± 24.57 a | 40.49 ± 2.21 a | 305.04 ± 33.35 a | 221.05 ± 10.19 ab | 1203.39 ± 169.41 ab | 510.11 ± 58.20 a | | |
| | PS6LC_ABA | 294.25 ± 8.59 a | 606.21 ± 14.14 a | 23.18 ± 2.79 a | 357.49 ± 18.05 a | 50.55 ± 1.46 a | 483.91 ± 46.48 a | 269.90 ± 12.13 ab | 2091.75 ± 202.00 ab | 819.68 ± 70.19 a | | |
| | | PV6LC_ABA | 344.60 ± 48.43 a | 687.62 ± 83.64 a | 28.70 ± 3.87 a | 156.84 ± 36.58 a | 45.85 ± 4.58 a | 358.72 ± 50.93 a | 194.07 ± 3.15 ab | 1195.38 ± 243.42 ab | 537.25 ± 90.84 a | |

All data are presented as mean ± Standard Error (SE) of three biological replicates.
 Different and non-overlapping letters indicate significant differences between treatments (p value < 0.05).
 Statistical significance was determined by Anova test results followed by Tukey tests (p value < 0.05).

Sup Table 2. Effect of source-sink modulation and ABA treatment on free amino acids contents throughout the berry development

| Year | Day after flowering | Treatment | Ala | Gaba | Pro | Tyr | Cys | Val | Ileu | Lys | Leu | Phe |
|-----------|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|
| 2016 | 33 | PS12LC | 149.58 ± 4.92 a | 76.091 ± 3.02 a | 90.52 ± 4.80 a | 11.93 ± 0.21 b | 24.82 ± 0.56 a | 36.64 ± 1.32 a | 7.24 ± 0.22 a | 5.91 ± 0.28 a | 14.65 ± 0.28 a | 19.25 ± 0.66 a |
| | | PS12LC+SS | 223.04 ± 41.10 a | 91.23 ± 16.03 a | 77.153 ± 12.25 a | 19.26 ± 1.15 ab | 26.68 ± 1.24 a | 47.24 ± 8.17 a | 9.40 ± 1.50 a | 6.65 ± 1.30 a | 21.01 ± 3.76 a | 27.87 ± 3.07 a |
| | | PS6LC_ABA | 182.32 ± 4.60 a | 110.53 ± 1.58 a | 103.75 ± 5.17 a | 20.50 ± 0.62 ab | 21.73 ± 2.70 a | 41.10 ± 0.57 a | 8.58 ± 0.14 a | 7.34 ± 0.64 a | 17.35 ± 0.39 a | 34.27 ± 0.84 a |
| | 40 | PS12LC | 129.54 ± 3.01 c | 90.97 ± 6.06 b | 58.36 ± 2.73 c | 29.28 ± 0.32 a | 28.13 ± 0.51 a | 26.21 ± 6.13 b | 18.24 ± 0.27 b | 13.08 ± 0.46 b | 37.94 ± 0.59 a | 22.19 ± 0.66 b |
| | | PS12LC+SS | 236.81 ± 1.90 ab | 154.43 ± 1.08 a | 122.42 ± 2.25 ab | 56.57 ± 3.83 a | 82.68 ± 24.85 a | 68.97 ± 2.08 a | 33.75 ± 1.73 a | 23.87 ± 0.67 a | 60.57 ± 2.51 a | 38.30 ± 0.99 ab |
| | | PS6LC_ABA | 197.44 ± 6.82 b | 124.17 ± 6.08 ab | 94.54 ± 5.70 b | 52.16 ± 4.21 a | 20.94 ± 0.31 a | 64.06 ± 3.35 ab | 35.16 ± 2.31 a | 22.56 ± 1.68 ab | 56.42 ± 3.70 a | 42.74 ± 4.59 ab |
| | 61 | PS12LC | 110.35 ± 5.22 b | 80.96 ± 7.71 a | 62.09 ± 5.07 b | 50.56 ± 1.66 a | 31.56 ± 0.30 a | 25.82 ± 0.24 a | 22.65 ± 0.29 a | 10.77 ± 0.71 a | 63.56 ± 1.59 a | 35.18 ± 1.52 b |
| | | PS12LC+SS | 166.89 ± 3.28 a | 72.42 ± 2.50 a | 175.51 ± 16.59 a | 53.43 ± 4.43 a | 33.00 ± 0.75 a | 33.16 ± 0.78 a | 26.93 ± 2.18 a | 12.94 ± 0.72 a | 76.62 ± 8.03 a | 25.51 ± 0.67 b |
| | | PS6LC_ABA | 122.29 ± 7.49 ab | 71.69 ± 4.29 a | 87.17 ± 8.86 ab | 78.48 ± 7.92 a | 29.78 ± 2.32 a | 39.22 ± 2.92 a | 30.52 ± 2.76 a | 18.35 ± 1.36 a | 76.83 ± 7.03 a | 73.11 ± 6.23 a |
| | 70 | PS12LC | 162.80 ± 9.25 a | 76.73 ± 2.13 a | 277.76 ± 19.13 b | 37.32 ± 2.22 a | 29.40 ± 0.65 a | 38.51 ± 2.98 a | 21.26 ± 1.53 a | 6.14 ± 0.29 b | 42.89 ± 3.13 a | 16.70 ± 1.06 a |
| | | PS12LC+SS | 234.62 ± 10.01 a | 77.41 ± 2.81 a | 780.64 ± 25.43 a | 29.32 ± 0.30 a | 29.20 ± 0.91 a | 42.01 ± 1.74 a | 18.70 ± 0.56 a | 6.91 ± 0.45 ab | 42.59 ± 0.47 a | 14.67 ± 0.64 a |
| | | PS6LC_ABA | 150.19 ± 3.02 a | 64.86 ± 6.69 a | 247.92 ± 14.15 b | 55.19 ± 3.55 a | 35.82 ± 0.65 a | 38.49 ± 1.72 a | 24.59 ± 1.55 a | 9.31 ± 0.93 ab | 52.65 ± 2.37 a | 29.39 ± 2.68 a |
| | | PV6LC_ABA | 178.08 ± 17.87 a | 66.46 ± 6.22 a | 286.34 ± 28.92 b | 60.77 ± 7.13 a | 30.39 ± 1.71 a | 37.54 ± 4.18 a | 25.74 ± 2.59 a | 10.78 ± 0.10 ab | 55.58 ± 4.14 a | 25.73 ± 2.72 a |
| | 80 | PS12LC | 231.13 ± 21.70 a | 55.00 ± 6.14 a | 400.90 ± 51.48 b | 68.42 ± 5.25 a | 28.38 ± 0.47 a | 61.82 ± 6.90 a | 39.79 ± 4.90 a | 14.38 ± 1.42 a | 67.39 ± 7.18 a | 29.66 ± 2.81 a |
| | | PS12LC+SS | 303.61 ± 21.78 a | 61.10 ± 1.61 b | 1008.04 ± 46.27 b | 23.77 ± 2.07 a | 27.26 ± 0.78 a | 57.45 ± 3.93 a | 24.03 ± 2.18 a | 6.81 ± 0.59 a | 41.72 ± 3.59 a | 17.39 ± 1.31 a |
| | | PS6LC_ABA | 472.39 ± 24.59 a | 181.02 ± 10.57 a | 2583.97 ± 95.44 a | 41.82 ± 4.62 a | 27.80 ± 0.39 a | 94.15 ± 7.16 a | 37.03 ± 3.52 a | 8.57 ± 0.81 a | 67.21 ± 4.15 a | 31.60 ± 3.17 a |
| | | PV6LC_ABA | 517.59 ± 54.60 a | 91.26 ± 9.51 ab | 1467.24 ± 227.14 ab | 76.20 ± 6.35 a | 29.74 ± 1.06 a | 117.40 ± 6.89 a | 55.58 ± 3.67 a | 15.68 ± 1.55 a | 84.10 ± 6.90 a | 42.14 ± 2.98 a |
| | 90 | PS12LC | 529.31 ± 59.48 a | 81.65 ± 13.65 b | 1204.38 ± 106.07 b | 57.29 ± 9.93 a | 26.98 ± 0.82 a | 97.72 ± 16.77 a | 42.31 ± 7.87 a | 15.85 ± 1.52 a | 71.87 ± 11.40 a | 32.91 ± 6.04 a |
| | | PS12LC+SS | 274.47 ± 7.11 a | 43.73 ± 5.86 b | 939.11 ± 88.59 b | 18.68 ± 2.38 a | 31.67 ± 1.58 a | 48.18 ± 6.57 a | 20.96 ± 3.66 a | 8.17 ± 0.46 a | 38.86 ± 5.34 a | 16.48 ± 3.31 a |
| | | PS6LC_ABA | 471.10 ± 30.59 a | 105.37 ± 7.23 a | 3855.50 ± 270.76 a | 38.92 ± 3.54 a | 32.24 ± 2.80 a | 110.08 ± 6.01 a | 44.32 ± 2.56 a | 9.56 ± 0.55 a | 71.41 ± 4.08 a | 30.38 ± 1.48 a |
| | | PV6LC_ABA | 474.53 ± 30.02 a | 247.09 ± 7.70 a | 5746.05 ± 61.01 a | 53.61 ± 2.49 a | 44.00 ± 1.75 a | 133.14 ± 6.54 a | 49.22 ± 1.69 a | 12.91 ± 0.74 a | 86.52 ± 3.56 a | 43.05 ± 0.82 a |
| | 100 | PS12LC | 615.90 ± 68.54 a | 152.15 ± 35.11 a | 4022.40 ± 297.49 a | 43.33 ± 4.69 a | 32.52 ± 0.19 a | 131.54 ± 18.51 a | 48.12 ± 5.79 a | 15.99 ± 1.85 a | 75.67 ± 9.79 a | 33.41 ± 4.60 a |
| | | PS12LC+SS | 1023.49 ± 118.18 a | 128.03 ± 21.34 a | 5112.58 ± 220.87 a | 97.20 ± 15.59 a | 45.91 ± 3.28 a | 183.29 ± 25.76 a | 71.17 ± 10.04 a | 24.02 ± 2.37 a | 120.89 ± 14.90 a | 49.82 ± 6.48 a |
| | | PS6LC_ABA | 463.82 ± 53.31 a | 91.23 ± 15.43 a | 3374.25 ± 283.18 a | 34.89 ± 3.93 a | 38.60 ± 0.56 a | 85.44 ± 15.38 a | 28.01 ± 5.82 a | 7.97 ± 2.07 a | 46.67 ± 9.98 a | 20.20 ± 3.90 a |
| PV6LC_ABA | | 278.24 ± 20.73 a | 112.65 ± 7.15 ab | 4500.26 ± 196.85 a | 17.41 ± 2.56 a | 45.83 ± 2.97 a | 75.87 ± 5.03 a | 23.76 ± 2.48 a | 3.54 ± 0.33 a | 50.95 ± 4.56 a | 17.01 ± 1.74 a | |
| 110 | PS12LC | 272.27 ± 7.22 a | 187.68 ± 4.03 a | 6000.26 ± 173.43 a | 18.97 ± 1.15 a | 33.41 ± 5.08 a | 73.29 ± 1.96 a | 21.34 ± 1.32 a | 1.92 ± 0.11 a | 48.66 ± 1.17 a | 19.80 ± 0.70 a | |
| | PS12LC+SS | 337.26 ± 38.77 a | 127.03 ± 11.71 ab | 5547.28 ± 589.16 a | 24.52 ± 0.86 a | 44.97 ± 0.68 a | 114.36 ± 9.20 a | 37.32 ± 1.40 a | 6.06 ± 1.03 a | 72.72 ± 4.76 a | 25.71 ± 1.84 a | |
| | PS6LC_ABA | 403.71 ± 31.07 a | 81.604 ± 1.86 b | 6817.28 ± 271.34 a | 21.46 ± 1.84 a | 40.02 ± 1.71 a | 68.84 ± 3.78 a | 20.15 ± 1.08 a | 6.66 ± 0.84 a | 55.31 ± 2.70 a | 14.45 ± 0.51 a | |
| | PV6LC_ABA | 265.49 ± 35.70 a | 103.14 ± 16.69 ab | 3700.99 ± 388.23 a | 14.47 ± 1.82 a | 44.10 ± 0.29 a | 74.47 ± 11.61 a | 23.44 ± 3.53 a | 5.04 ± 0.98 a | 50.39 ± 6.72 a | 15.02 ± 2.55 a | |
| 110 | PS12LC | 437.66 ± 36.95 a | 169.65 ± 9.83 a | 9338.73 ± 184.83 a | 28.58 ± 4.13 a | 34.93 ± 1.46 a | 134.76 ± 14.79 a | 51.26 ± 7.37 a | 15.20 ± 4.26 a | 87.08 ± 12.58 a | 33.78 ± 4.77 a | |
| | PS12LC+SS | 407.85 ± 8.02 a | 319.84 ± 23.8 a | 10699.71 ± 522.96 a | 40.24 ± 4.75 a | 37.71 ± 0.98 a | 156.64 ± 8.55 a | 58.08 ± 4.33 a | 7.07 ± 0.44 a | 100.21 ± 4.92 a | 42.93 ± 2.84 a | |
| | PS6LC_ABA | 586.59 ± 60.41 a | 223.24 ± 12.01 a | 9996.61 ± 668.55 a | 35.27 ± 2.92 a | 35.16 ± 0.55 a | 207.15 ± 13.03 a | 70.23 ± 2.87 a | 8.64 ± 1.04 a | 127.42 ± 8.42 a | 49.70 ± 2.44 a | |
| | PV6LC_ABA | 857.45 ± 69.14 a | 277.67 ± 11.99 a | 12814.49 ± 632.69 a | 56.58 ± 2.65 a | 36.15 ± 3.06 a | 268.65 ± 17.35 a | 98.44 ± 7.79 a | 18.96 ± 2.20 a | 181.64 ± 13.76 a | 66.88 ± 4.81 a | |
| | | PS6LC_ABA | 800.45 ± 123.75 a | 249.54 ± 21.83 a | 11618.74 ± 1387.34 a | 34.82 ± 4.11 a | 41.54 ± 2.56 a | 214.8 ± 22.76 a | 69.41 ± 6.88 a | 9.87 ± 1.43 a | 127.31 ± 14.19 a | 49.39 ± 6.67 a |

All data are presented as mean ± Standard Error (SE) of three biological replicates.
 Different and non-overlapping letters indicate significant differences between treatments (p value < 0.05).
 Statistical significance was determined by Anova test results followed by Tukey tests (p value < 0.05).

Sup Table 2. Effect of source-sink modulation and ABA treatment on free amino acids contents throughout the berry development

| Year | Day after flowering | Treatment | Asp | Glu | Asn | Ser | Gly | Gln | His | Arg | Thr |
|------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
| 2017 | 22 | PS12LC | 356.87 ± 21.20 a | 524.15 ± 32.51 a | 98.97 ± 13.71 a | 216.94 ± 16.68 a | 57.48 ± 10.5 a | 1212.80 ± 189.00 a | 148.87 ± 4.80 a | 891.645 ± 91.151 a | 260.04 ± 12.97 a |
| | | PS12LC+SS | 314.39 ± 28.89 a | 549.33 ± 54.68 a | 106.4 ± 12.4 a | 189.41 ± 18.96 a | 33.96 ± 2.13 a | 1042.90 ± 89.41 a | 149.25 ± 1.98 a | 817.59 ± 41.48 a | 277.52 ± 12.38 a |
| | | PS6LC | 305.06 ± 9.811 a | 577.48 ± 25.43 a | 110.01 ± 10.08 a | 269.90 ± 9.717 a | 66.73 ± 6.26 a | 1333.75 ± 161.33 a | 137.31 ± 4.20 a | 1989.01 ± 181.24 a | 289.07 ± 9.297 a |
| | | PS6LC_ABA | 273.67 ± 4.158 a | 495.52 ± 11.99 a | 70.47 ± 3.25 a | 185.17 ± 14.99 a | 50.29 ± 7.90 a | 993.40 ± 56.45 a | 139.06 ± 1.95 a | 1478.28 ± 162.08 a | 254.02 ± 5.868 a |
| | 35 | PS12LC | 361.48 ± 15.18 a | 599.00 ± 23.12 a | 154.1 ± 14.85 ab | 211.98 ± 3.21 a | 36.96 ± 2.27 a | 1028.33 ± 47.67 a | 97.645 ± 5.24 a | 2108.13 ± 211.85 a | 530.60 ± 5.825 a |
| | | PS12LC+SS | 397.21 ± 13.74 a | 643.02 ± 2.201 a | 114.5 ± 4.51 b | 226.38 ± 10.78 a | 35.66 ± 4.77 a | 1382.50 ± 39.94 a | 113.25 ± 2.34 a | 2712.16 ± 40.83 a | 593.97 ± 8.752 a |
| | | PS6LC | 349.78 ± 5.095 a | 662.42 ± 14.66 a | 203.79 ± 3.01 a | 227.72 ± 19.68 a | 60.36 ± 10.9 a | 1158.40 ± 5.86 a | 102.09 ± 0.67 a | 2484.95 ± 145.34 a | 606.42 ± 8.028 a |
| | | PS6LC_ABA | 320.72 ± 10.39 a | 574.21 ± 14.78 a | 149.89 ± 8.21 ab | 187.48 ± 5.52 a | 41.27 ± 0.99 a | 984.11 ± 46.81 a | 97.78 ± 1.54 a | 2295.10 ± 164.09 a | 533.08 ± 17.05 a |
| | 55 | PV6LC_ABA | 342.65 ± 27.90 a | 653.34 ± 55.21 a | 136.06 ± 6.83 ab | 231.58 ± 33.18 a | 66.61 ± 19.08 a | 1219.23 ± 110.84 a | 91.54 ± 4.67 a | 2572.07 ± 176.56 a | 500.25 ± 20.93 a |
| | | PS12LC | 310.11 ± 7.493 a | 350.34 ± 4.197 a | 44.69 ± 3.80 a | 77.657 ± 3.63 a | 52.79 ± 2.82 a | 542.54 ± 36.63 a | 185.80 ± 7.34 a | 2570.04 ± 111.00 bc | 451.25 ± 29.07 a |
| | | PS12LC+SS | 309.82 ± 13.18 a | 365.81 ± 28.86 a | 33.71 ± 3.00 a | 123.71 ± 19.66 a | 57.41 ± 12.3 a | 524.91 ± 51.50 a | 181.85 ± 8.12 a | 2632.61 ± 46.03 abc | 458.75 ± 11.76 a |
| | | PS6LC | 334.36 ± 16.41 a | 434.27 ± 11.35 a | 41.46 ± 7.70 a | 102.84 ± 6.81 a | 68.45 ± 2.43 a | 811.80 ± 13.20 a | 178.50 ± 5.36 a | 3559.65 ± 101.00 a | 606.15 ± 2.297 a |
| | 64 | PS6LC_ABA | 283.46 ± 5.347 a | 339.13 ± 12.79 a | 44.15 ± 6.99 a | 104.88 ± 5.63 a | 75.00 ± 7.88 a | 589.37 ± 25.49 a | 158.56 ± 8.02 a | 3242.91 ± 128.12 ab | 519.54 ± 26.73 a |
| | | PV6LC_ABA | 320.32 ± 13.68 a | 379.37 ± 19.32 a | 29.06 ± 0.68 a | 102.54 ± 3.45 a | 65.45 ± 5.03 a | 563.08 ± 53.52 a | 142.05 ± 7.13 a | 2050.21 ± 91.93 c | 413.28 ± 18.59 a |
| | | PS12LC | 347.31 ± 2.136 a | 445.32 ± 8.346 a | 28.12 ± 1.53 a | 117.25 ± 1.64 ab | 20.69 ± 0.18 a | 270.19 ± 5.65 b | 128.22 ± 5.91 a | 1568.44 ± 59.82 c | 279.91 ± 4.652 b |
| | | PS12LC+SS | 360.60 ± 12.64 a | 504.28 ± 12.89 a | 22.05 ± 2.49 a | 162.03 ± 14.37 a | 39.91 ± 9.15 a | 301.01 ± 7.82 ab | 123.47 ± 4.68 a | 1725.08 ± 24.41 bc | 308.91 ± 7.872 b |
| | 76 | PS6LC | 304.41 ± 2.538 a | 406.65 ± 15.10 ab | 49.44 ± 5.47 a | 107.71 ± 6.48 ab | 46.29 ± 6.01 a | 430.73 ± 26.18 ab | 158.02 ± 6.28 a | 2364.37 ± 62.52 ab | 438.21 ± 10.30 ab |
| | | PS6LC_ABA | 383.40 ± 10.61 a | 493.22 ± 8.873 a | 51.03 ± 2.83 a | 179.10 ± 4.63 a | 51.26 ± 8.86 a | 635.48 ± 75.83 a | 157.62 ± 7.05 a | 2583.43 ± 116.00 a | 531.97 ± 39.21 a |
| | | PV6LC_ABA | 477.60 ± 47.04 a | 270.92 ± 25.12 b | 40.97 ± 2.51 a | 86.173 ± 2.53 b | 20.96 ± 0.87 a | 220.11 ± 1.05 b | 109.83 ± 0.32 a | 1380.42 ± 69.92 c | 266.39 ± 10.15 b |
| | | PS12LC | 393.62 ± 12.21 ab | 645.97 ± 10.80 bc | 38.80 ± 2.77 b | 147.31 ± 5.44 c | 2.846 ± 0.94 b | 269.64 ± 6.36 a | 112.45 ± 3.71 a | 1219.94 ± 62.88 b | 346.44 ± 12.44 b |
| | 89 | PS12LC+SS | 318.90 ± 11.39 b | 777.09 ± 11.11 ab | 27.23 ± 0.83 b | 127.76 ± 2.02 c | 4.377 ± 1.32 b | 220.38 ± 6.52 a | 112.50 ± 0.36 a | 1128.54 ± 63.42 b | 310.87 ± 29.98 b |
| | | PS6LC | 481.92 ± 16.41 a | 557.64 ± 13.61 c | 53.38 ± 1.36 ab | 253.87 ± 31.87 bc | 35.82 ± 1.91 a | 676.94 ± 192.05 a | 147.78 ± 24.53 a | 2322.40 ± 298.72 ab | 603.47 ± 143.79 ab |
| | | PS6LC_ABA | 528.77 ± 20.21 a | 864.10 ± 20.78 a | 74.15 ± 2.86 a | 423.02 ± 4.32 a | 18.14 ± 2.06 ab | 1108.66 ± 136.65 a | 166.05 ± 8.87 a | 3105.56 ± 261.97 a | 994.35 ± 45.23 a |
| | | PV6LC_ABA | 435.36 ± 8.725 ab | 775.62 ± 25.42 ab | 48.63 ± 3.35 b | 267.36 ± 14.99 b | 16.82 ± 2.83 ab | 608.56 ± 99.03 a | 140.25 ± 4.80 a | 1678.32 ± 144.84 ab | 604.76 ± 55.60 ab |
| | 102 | PS12LC | 396.53 ± 3.652 ab | 736.02 ± 10.34 b | 33.92 ± 3.43 bc | 294.84 ± 17.89 bc | 49.14 ± 14.2 a | 224.52 ± 11.42 a | 126.85 ± 2.26 bc | 1008.60 ± 94.88 bc | 462.82 ± 41.47 b |
| | | PS12LC+SS | 255.97 ± 17.98 b | 666.85 ± 24.80 b | 18.70 ± 1.17 c | 189.47 ± 3.24 c | 18.90 ± 0.48 a | 233.73 ± 4.89 a | 103.32 ± 7.23 c | 863.01 ± 22.20 c | 378.85 ± 13.33 b |
| | | PS6LC | 547.64 ± 5.079 a | 832.46 ± 6.979 ab | 51.37 ± 2.30 ab | 438.51 ± 25.18 ab | 48.62 ± 7.61 a | 572.61 ± 46.33 a | 188.10 ± 10.9 abc | 2523.40 ± 191.25 abc | 981.50 ± 84.61 ab |
| | | PS6LC_ABA | 519.02 ± 28.04 a | 968.91 ± 34.84 a | 74.52 ± 5.21 a | 571.43 ± 24.06 a | 51.46 ± 3.24 a | 781.85 ± 126.63 a | 215.30 ± 14.3 ab | 3631.80 ± 419.36 ab | 1433.1 ± 118.6 a |
| | 112 | PV6LC_ABA | 497.45 ± 30.89 a | 984.00 ± 26.83 a | 57.68 ± 2.46 ab | 556.44 ± 15.87 a | 46.56 ± 2.63 a | 780.74 ± 117.39 a | 241.10 ± 14.5 a | 3717.19 ± 383.10 a | 1444.9 ± 108.1 a |
| | | PS12LC | 373.42 ± 40.76 a | 630.43 ± 15.39 ab | 23.34 ± 0.65 a | 229.81 ± 13.60 ab | 18.58 ± 3.13 a | 182.16 ± 12.49 a | 99.93 ± 2.55 a | 779.44 ± 88.73 a | 382.88 ± 41.46 a |
| | | PS12LC+SS | 441.44 ± 10.34 a | 274.33 ± 39.41 b | 20.06 ± 1.37 a | 179.45 ± 7.49 b | 17.50 ± 5.10 a | 160.91 ± 2.79 a | 80.42 ± 2.12 a | 589.03 ± 38.29 a | 221.55 ± 3.720 a |
| | | PS6LC | 560.53 ± 22.09 a | 665.15 ± 37.45 a | 24.51 ± 0.93 a | 322.32 ± 15.08 ab | 36.79 ± 4.16 a | 375.25 ± 36.95 a | 164.90 ± 13.6 a | 2367.90 ± 143.74 a | 1075.7 ± 127.2 a |
| | 112 | PS6LC_ABA | 510.05 ± 36.24 a | 657.24 ± 27.17 a | 36.34 ± 2.86 a | 475.12 ± 33.54 a | 35.51 ± 6.05 a | 484.68 ± 73.36 a | 202.56 ± 15.8 a | 3369.78 ± 393.78 a | 1388.1 ± 150.1 a |
| | | PV6LC_ABA | 465.20 ± 32.38 a | 610.12 ± 55.57 ab | 43.96 ± 7.86 a | 473.01 ± 42.70 a | 39.31 ± 5.63 a | 614.72 ± 161.18 a | 185.51 ± 27.4 a | 2954.82 ± 477.84 a | 1239.8 ± 181.9 a |
| | | PS12LC | 246.56 ± 16.13 ab | 584.63 ± 20.39 a | 24.36 ± 2.40 a | 259.86 ± 16.67 b | 29.34 ± 3.49 a | 177.89 ± 11.92 a | 99.34 ± 4.82 a | 722.01 ± 83.13 b | 379.34 ± 29.08 b |
| | | PS12LC+SS | 156.39 ± 16.82 b | 481.94 ± 49.99 a | 25.33 ± 1.49 a | 216.25 ± 11.92 b | 15.63 ± 2.14 a | 171.70 ± 9.22 a | 86.2 ± 2.70 a | 577.07 ± 45.58 b | 236.48 ± 21.80 b |
| 112 | PS6LC | 385.08 ± 21.18 a | 655.75 ± 12.50 a | 35.93 ± 1.08 a | 305.37 ± 7.37 b | 26.85 ± 2.50 a | 312.05 ± 24.20 a | 128.36 ± 6.54 a | 2347.39 ± 229.33 ab | 980.95 ± 102.6 ab | |
| | PS6LC_ABA | 355.54 ± 22.67 ab | 766.20 ± 25.29 a | 36.00 ± 2.36 a | 434.40 ± 13.43 a | 30.83 ± 3.41 a | 330.07 ± 18.68 a | 169.03 ± 14.0 a | 3147.98 ± 291.03 ab | 1304.0 ± 95.08 a | |
| | | PV6LC_ABA | 375.74 ± 32.18 ab | 723.86 ± 31.89 a | 37.07 ± 0.72 a | 338.73 ± 13.53 ab | 28.99 ± 3.84 a | 258.61 ± 29.47 a | 116.16 ± 13.7 a | 1843.90 ± 309.04 ab | 802.68 ± 109.2 ab |

All data are presented as mean ± Standard Error (SE) of three biological replicates.

Different and non-overlapping letters indicate significant differences between treatments (p value < 0.05).

Statistical significance was determined by Anova test results followed by Tukey tests (p value < 0.05).

Sup Table 2. Effect of source-sink modulation and ABA treatment on free amino acids contents throughout the berry development

| Year | Day after flowering | Treatment | Ala | Gaba | Pro | Tyr | Cys | Val | Ileu | Lys | Leu | Phe | |
|------|---------------------|-----------|-------------------|------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|
| 2017 | 22 | PS12LC | 128.52 ± 7.32 a | 80.55 ± 6.04 a | 96.70 ± 7.18 a | 23.47 ± 3.26 a | 15.78 ± 1.52 a | 42.72 ± 4.42 a | 9.29 ± 0.97 a | 9.073 ± 0.93 a | 24.34 ± 2.13 a | 34.63 ± 3.18 a | |
| | | PS12LC+SS | 131.00 ± 9.86 a | 70.86 ± 3.57 a | 108.09 ± 15.01 a | 30.78 ± 9.47 a | 14.85 ± 1.14 a | 47.19 ± 7.85 a | 10.00 ± 2.17 a | 10.84 ± 1.33 a | 24.16 ± 6.43 a | 37.82 ± 7.27 a | |
| | | PS6LC | 152.23 ± 2.80 a | 84.54 ± 8.35 a | 100.46 ± 6.38 a | 17.30 ± 1.70 a | 13.49 ± 2.37 a | 47.03 ± 1.15 a | 8.973 ± 0.47 a | 17.12 ± 2.20 a | 20.14 ± 0.24 a | 31.10 ± 1.00 a | |
| | | PS6LC_ABA | 124.58 ± 5.93 a | 72.87 ± 4.20 a | 95.73 ± 9.90 a | 17.17 ± 1.74 a | 14.58 ± 0.54 a | 41.09 ± 2.10 a | 8.65 ± 0.65 a | 7.997 ± 0.77 a | 18.93 ± 1.64 a | 25.94 ± 1.57 a | |
| | 35 | PS12LC | 260.90 ± 4.19 a | 97.12 ± 2.28 a | 174.76 ± 5.67 a | 73.16 ± 0.64 a | 20.18 ± 0.90 ab | 95.72 ± 2.89 a | 45.15 ± 1.52 a | 23.65 ± 0.03 a | 80.25 ± 3.48 a | 90.05 ± 2.85 a | |
| | | PS12LC+SS | 264.70 ± 2.98 a | 108.41 ± 4.01 a | 168.14 ± 6.69 a | 75.51 ± 4.59 a | 24.45 ± 1.47 a | 99.15 ± 4.10 a | 46.32 ± 1.79 a | 28.08 ± 1.70 a | 93.68 ± 4.03 a | 69.63 ± 2.56 a | |
| | | PS6LC | 265.07 ± 9.98 a | 120.77 ± 3.10 a | 197.70 ± 5.78 a | 80.13 ± 1.30 a | 16.99 ± 0.33 ab | 103.43 ± 2.90 a | 53.92 ± 0.45 a | 38.76 ± 3.98 a | 84.20 ± 0.84 a | 112.8 ± 2.77 a | |
| | | PS6LC_ABA | 236.42 ± 4.09 a | 102.43 ± 3.86 a | 158.27 ± 5.99 a | 76.06 ± 2.26 a | 18.80 ± 0.83 ab | 94.65 ± 1.71 a | 46.15 ± 1.78 a | 27.09 ± 1.44 a | 79.98 ± 3.10 a | 92.58 ± 7.93 a | |
| | 55 | PV6LC_ABA | 267.92 ± 30.35 a | 106.79 ± 7.34 a | 164.47 ± 15.95 a | 70.11 ± 7.23 a | 14.18 ± 0.39 b | 95.46 ± 9.00 a | 43.17 ± 4.95 a | 22.42 ± 3.30 a | 78.08 ± 5.93 a | 78.85 ± 3.55 a | |
| | | PS12LC | 127.63 ± 3.49 a | 43.41 ± 2.36 a | 143.48 ± 5.06 a | 71.51 ± 3.05 b | 25.48 ± 0.19 a | 45.19 ± 2.81 a | 39.73 ± 2.75 a | 21.82 ± 0.88 a | 101.80 ± 5.09 a | 56.50 ± 2.88 b | |
| | | PS12LC+SS | 142.49 ± 5.61 a | 49.7 ± 2.71 a | 139.45 ± 0.73 a | 74.22 ± 6.38 ab | 16.97 ± 0.96 a | 41.50 ± 3.49 a | 38.12 ± 3.52 a | 20.52 ± 1.57 a | 103.67 ± 8.82 a | 47.93 ± 1.74 b | |
| | | PS6LC | 161.03 ± 4.01 a | 68.04 ± 7.85 a | 194.25 ± 13.61 a | 117.9 ± 3.48 a | 22.80 ± 0.59 a | 65.25 ± 0.76 a | 56.64 ± 1.62 a | 25.51 ± 0.86 a | 143.07 ± 5.11 a | 103.0 ± 5.36 a | |
| | 64 | PS6LC_ABA | 143.03 ± 4.42 a | 82.93 ± 18.66 a | 156.26 ± 13.84 a | 86.09 ± 3.78 ab | 21.23 ± 0.95 a | 54.15 ± 1.63 a | 46.54 ± 2.90 a | 27.76 ± 2.11 a | 109.88 ± 6.24 a | 88.74 ± 6.66 ab | |
| | | PV6LC_ABA | 146.13 ± 4.22 a | 56.46 ± 3.34 a | 153.05 ± 9.54 a | 90.83 ± 4.81 ab | 24.51 ± 1.51 a | 53.35 ± 3.00 a | 48.86 ± 3.91 a | 20.74 ± 0.86 a | 122.23 ± 9.23 a | 74.56 ± 3.10 ab | |
| | | PS12LC | 188.99 ± 5.34 a | 50.3 ± 4.65 a | 171.35 ± 13.52 b | 38.10 ± 1.50 b | 18.18 ± 1.66 a | 36.62 ± 0.92 ab | 25.66 ± 0.37 ab | 11.27 ± 0.78 ab | 48.24 ± 0.48 bc | 22.69 ± 0.33 b | |
| | | PS12LC+SS | 282.24 ± 11.18 a | 85.53 ± 12.62 a | 361.19 ± 22.46 a | 38.12 ± 1.01 b | 16.41 ± 1.07 a | 46.48 ± 0.21 ab | 27.79 ± 0.65 ab | 9.39 ± 0.79 b | 50.94 ± 2.28 abc | 23.34 ± 0.58 b | |
| | 76 | PS6LC | 188.41 ± 17.65 a | 80.27 ± 4.39 a | 176.53 ± 11.29 b | 79.72 ± 5.04 a | 22.40 ± 0.44 a | 45.77 ± 3.37 ab | 40.50 ± 2.61 ab | 18.01 ± 0.56 ab | 81.75 ± 2.46 ab | 64.84 ± 0.85 a | |
| | | PS6LC_ABA | 302.50 ± 22.65 a | 93.66 ± 14.59 a | 294.55 ± 20.70 ab | 77.10 ± 5.77 a | 23.33 ± 0.36 a | 58.91 ± 4.68 a | 47.57 ± 3.74 a | 22.21 ± 1.25 a | 82.81 ± 6.31 a | 47.42 ± 3.96 a | |
| | | PV6LC_ABA | 162.18 ± 5.71 a | 101.79 ± 28.87 a | 173.85 ± 9.47 b | 29.49 ± 2.97 b | 14.90 ± 0.63 a | 23.52 ± 2.02 b | 18.83 ± 1.83 b | 16.18 ± 2.28 ab | 33.04 ± 2.62 c | 17.24 ± 1.71 b | |
| | | PS12LC | 316.99 ± 4.37 b | 76.38 ± 3.34 a | 1489.69 ± 36.22 b | 23.87 ± 2.31 b | 12.32 ± 0.70 a | 67.416 ± 2.66 b | 33.76 ± 1.48 b | 9.854 ± 0.21 a | 48.03 ± 2.36 b | 31.80 ± 1.73 b | |
| | 89 | PS12LC+SS | 295.85 ± 13.87 b | 100.64 ± 3.32 a | 2521.03 ± 51.49 a | 29.29 ± 1.28 b | 14.45 ± 0.90 a | 72.72 ± 2.81 b | 36.13 ± 0.87 ab | 11.45 ± 1.74 a | 57.99 ± 2.62 ab | 40.76 ± 0.85 ab | |
| | | PS6LC | 469.81 ± 105.93 b | 88.08 ± 21.4 a | 1242.98 ± 282.57 b | 60.30 ± 18.41 ab | 12.07 ± 0.58 a | 95.22 ± 17.68 ab | 49.76 ± 9.75 ab | 14.86 ± 2.72 a | 74.50 ± 16.54 ab | 47.41 ± 9.07 ab | |
| | | PS6LC_ABA | 871.73 ± 27.76 a | 121.66 ± 2.91 a | 2416.32 ± 49.27 a | 83.98 ± 2.89 a | 12.68 ± 0.49 a | 149.95 ± 3.58 a | 65.04 ± 2.04 a | 20.91 ± 1.30 a | 106.41 ± 3.13 a | 64.84 ± 1.40 a | |
| | | PV6LC_ABA | 534.01 ± 36.42 ab | 90.89 ± 2.77 a | 2104.47 ± 67.73 ab | 49.68 ± 2.77 ab | 12.70 ± 1.29 a | 108.31 ± 3.48 ab | 46.90 ± 1.39 ab | 13.95 ± 1.12 a | 71.10 ± 2.16 ab | 47.01 ± 1.40 ab | |
| | 102 | PS12LC | 631.79 ± 24.77 ab | 183.05 ± 6.51 ab | 3976.22 ± 794.04 b | 59.88 ± 3.77 b | 14.31 ± 0.56 a | 183.95 ± 6.97 b | 79.79 ± 3.08 ab | 16.39 ± 0.74 bc | 109.13 ± 4.14 b | 61.51 ± 2.39 b | |
| | | PS12LC+SS | 453.70 ± 10.84 b | 282.44 ± 20.57 a | 7169.11 ± 128.04 ab | 60.36 ± 5.83 b | 18.79 ± 0.70 a | 146.82 ± 11.2 b | 65.25 ± 4.86 b | 9.78 ± 0.23 c | 96.62 ± 6.23 b | 59.65 ± 3.54 b | |
| | | PS6LC | 1116.1 ± 89.59 ab | 153.31 ± 10.23 b | 5145.84 ± 346.90 ab | 85.37 ± 8.32 ab | 18.06 ± 0.68 a | 233.95 ± 14.9 ab | 92.60 ± 5.15 ab | 26.74 ± 1.70 ab | 128.93 ± 10.5 ab | 75.53 ± 4.09 ab | |
| | | PS6LC_ABA | 1550.9 ± 141.83 a | 270.56 ± 2.49 a | 9039.81 ± 417.46 a | 120.8 ± 3.56 a | 13.42 ± 1.19 a | 293.98 ± 7.97 a | 108.62 ± 2.94 a | 32.83 ± 1.06 a | 174.66 ± 5.54 a | 99.12 ± 3.13 a | |
| | 112 | PV6LC_ABA | 1554.2 ± 140.69 a | 285.54 ± 5.03 a | 8849.42 ± 255.56 a | 123.1 ± 3.16 a | 16.54 ± 0.60 a | 305.54 ± 6.94 a | 113.61 ± 2.61 a | 35.37 ± 1.77 a | 183.34 ± 4.15 a | 99.08 ± 2.05 a | |
| | | PS12LC | 303.47 ± 17.61 a | 226.38 ± 3.37 ab | 9346.69 ± 654.17 ab | 26.89 ± 2.74 a | 18.41 ± 1.26 a | 147.00 ± 5.50 ab | 60.63 ± 1.75 ab | 10.88 ± 0.10 a | 90.22 ± 4.58 ab | 46.41 ± 2.02 ab | |
| | | PS12LC+SS | 211.62 ± 1.56 a | 231.25 ± 26.31 a | 7915.07 ± 156.92 b | 18.64 ± 1.88 a | 15.94 ± 0.68 a | 88.20 ± 3.59 b | 41.22 ± 3.15 b | 6.4 ± 0.47 a | 56.20 ± 2.92 b | 31.17 ± 1.60 b | |
| | | PS6LC | 577.02 ± 60.34 a | 171.56 ± 7.05 b | 10001.95 ± 635.12 ab | 42.25 ± 5.13 a | 14.34 ± 0.41 a | 195.97 ± 19.8 ab | 71.81 ± 6.58 ab | 17.66 ± 1.96 a | 132.38 ± 14.0 ab | 63.83 ± 4.39 ab | |
| | 112 | PS6LC_ABA | 790.00 ± 120.78 a | 344.51 ± 14.94 a | 14659.51 ± 369.88 a | 72.51 ± 3.88 a | 15.41 ± 0.96 a | 271.430 ± 16.3 a | 96.74 ± 4.27 a | 24.13 ± 3.12 a | 183.57 ± 9.73 a | 86.13 ± 4.10 a | |
| | | PV6LC_ABA | 915.48 ± 203.02 a | 265.48 ± 23.18 a | 12022.77 ± 1155.57 ab | 84.93 ± 13.6 a | 13.90 ± 2.37 a | 251.91 ± 23.0 a | 97.99 ± 6.59 a | 26.63 ± 3.60 a | 163.67 ± 12.8 a | 86.54 ± 9.81 a | |
| | | PS12LC | 298.48 ± 6.10 a | 280.03 ± 10.21 b | 11578.06 ± 973.90 ab | 25.81 ± 1.75 b | 14.44 ± 0.36 a | 190.12 ± 8.98 ab | 94.65 ± 4.34 a | 8.75 ± 0.10 a | 136.02 ± 7.82 bc | 63.21 ± 3.34 c | |
| | | PS12LC+SS | 245.52 ± 8.74 a | 331.45 ± 7.72 ab | 10431.60 ± 185.24 b | 17.95 ± 0.96 b | 15.75 ± 0.29 a | 134.77 ± 8.42 b | 71.55 ± 4.33 a | 8.2 ± 0.14 a | 89.45 ± 5.97 c | 45.38 ± 2.74 c | |
| | 112 | PS6LC | 499.54 ± 38.81 a | 233.19 ± 11.31 c | 13615.01 ± 804.64 ab | 37.40 ± 2.29 ab | 13.20 ± 0.89 a | 212.20 ± 14.5 ab | 92.09 ± 5.37 a | 19.60 ± 2.51 a | 169.13 ± 11.4 ab | 91.11 ± 2.48 ab | |
| | | PS6LC_ABA | 681.56 ± 68.59 a | 404.30 ± 5.25 a | 17099.89 ± 318.16 a | 59.55 ± 4.48 a | 13.41 ± 0.73 a | 268.21 ± 13.4 a | 111.15 ± 3.54 a | 18.17 ± 1.54 a | 214.09 ± 7.49 a | 97.29 ± 2.57 a | |
| | | | PV6LC_ABA | 565.79 ± 74.29 a | 387.27 ± 10.05 a | 13132.76 ± 107.91 ab | 31.98 ± 3.06 b | 15.36 ± 0.41 a | 206.89 ± 4.03 ab | 95.17 ± 3.89 a | 14.02 ± 1.19 a | 158.31 ± 0.90 abc | 68.98 ± 0.57 bc |

All data are presented as mean ± Standard Error (SE) of three biological replicates.

Different and non-overlapping letters indicate significant differences between treatments (p value < 0.05).

Statistical significance was determined by Anova test results followed by Tukey tests (p value < 0.05).

Sup table 3. Primers used for fluidigm real-time PCR analysis and related gene descriptions

| Gene ID | Gene Potential Function | Pathway Description | Forward primer 5'-3' | Reverse primer 5'-3' | References related |
|--|--|--|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Primary metabolites | | | | | |
| VIT_00s0304g00080 | trehalose-phosphate phosphatase-like (TPP) | Starch and sucrose metabolism | CCCAAGGATACCTCTGCATCT | ATTCTTCTGCTCTTACACCCTG | |
| VIT_00s2527g00010 | acid beta-fructofuranosidase-like | Starch and sucrose metabolism | ACTCCTTGTGGACTGGGTCA | AGGCTGTTGATGGGTACAG | |
| VIT_01s0146g00260 | bidirectional sugar transporter (SWEET 15) | Starch and sucrose metabolism | TCGAACCAAGAGCGTCGAAT | ACACTTCAACAGACAGCAGAGA | |
| VIT_02s0025g02080 | bidirectional sugar transporter (SWEET4-like) | Starch and sucrose metabolism | AGCTTAAACAATTAACGGCTATGAC | TTTAAGGAAGAGAGATGATGCGTG | |
| VIT_03s0038g04570 | glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1-like | Starch and sucrose metabolism | AAGCAAGCAGAGGTGGACTC | GCCAACTGACTAACCACCAAC | |
| VIT_04s0044g00710 | UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase-like (UGPase) | Starch and sucrose metabolism | TTGAAGCTAAGCGTGGGGTG | AGGAACCGTTACAGTGGTTT | |
| VIT_14s0060g01910 | bidirectional sugar transporter (SWEET16-like) | Starch and sucrose metabolism | CTGGGGCGCTTACTTGTCTCT | AAAGCCCAACATCCAAACCGG | Chong <i>et al.</i> , 2014 |
| VIT_14s0066g01420 | bidirectional sugar transporter (SWEET6b-like) | Starch and sucrose metabolism | GTCTCGGACTGTGATTGGTA | ACATGCACTTCATCACTGTGG | Chong <i>et al.</i> , 2014 |
| VIT_18s0001g08210 | sucrose transporter-like (SUC11) | Starch and sucrose metabolism | ATCTTGGCTATTCTCTGACTCA | TAACATTTAAACCACCATATTGA | |
| VIT_18s0076g00250 | sucrose transporter-like (SUC27) | Starch and sucrose metabolism | GGAGTTAGCCAAAGCCTTCTTCAG | GC AACGCCATCCGAACTG | |
| VIT_08s0007g01570 | fructose-1,6-bisphosphatase | Pentose phosphate pathway | CGGAAGCAGAGACCAAGAAG | ATCAATAACACCCGCTTGTCT | |
| VIT_10s0007g01060 | pyruvate kinase (PK) | Pentose phosphate pathway | GCCTGTGGACTTGAAGCCCTGGAA | CAGTGTCTCTGC AACGGCATCTT | |
| VIT_12s0057g00940 | glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PDH) | Pentose phosphate pathway | ATCCTCTGACCGAAGTCAACATTGC | CGCCGCAACTGTTATGCTGAGA | |
| VIT_12s0057g01030 | glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PDH) | Pentose phosphate pathway | GTTCTGCTTGGCTGACTGAGATTGG | TCTACAGCGTCTAATAGCAGCCTCT | |
| VIT_16s0100g00290 | L-iditol 2-dehydrogenase | Pentose and glucuronate interconversions | ATCTATTGTTTGTGGAGCCGATA | TGAGGATGATTGTTGTTTATTACC | |
| VIT_04s0008g00520 | 6-phosphofructokinase 3-like | Fructose and mannose metabolism | CAGGTTACACTGGCTTACAGATTGG | GTCCCGACTCTCATTGATCGGATGG | |
| VIT_04s0023g03170 | GDP-mannose 4,6 dehydratase 2-like | Fructose and mannose metabolism | GGCAGGATGGGTCGATCTA | ATTGAGGCGTTGGGATTGA | |
| VIT_11s0016g03070 | hexokinase-1-like (HXK1) | Fructose and mannose metabolism | GGCCCATGTATTTTGGTCT | CCAACCCGATATCTGATCC | |
| VIT_11s0037g00930 | putative GDP-L-fucose synthase 2-like | Fructose and mannose metabolism | TCGTTCTCACTCCGTTCTCTC | CCTTAGCGGATTGGTTGGAAA | |
| VIT_19s0085g00370 | phosphoglycerate kinase | Glycolysis glycolysis | CCAACCTATCCCTGCCCTCT | ATCCGCCCTCTCAGATCAC | |
| VIT_01s0011g05370 | phosphoglucomutase (PGM) | Sucrose biosynthesis | GGTGCCGCTTCTGATGGTGTAG | TGGGCATCTCTGGCACTCC | |
| VIT_04s0044g01490 | 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase | Propanoate metabolism | TGTGTTGTGGGCTTGGAAA | GCATCTGGTCTTCTGCAAGT | |
| VIT_02s0109g00080 | phosphoribulokinase | Carbon fixation in photosynthetic organisms | AGCATCAGCCCAACATCA | GGAAACCAGAGGAACACACTAAA | |
| VIT_01s0011g00690 | UDP-glucose 6-dehydrogenase | Amino sugar and nucleotide sugar metabolism | TGCCGATGTATCCAACTCTG | CCTTGCTGTTGTGGTGCAGAA | |
| VIT_05s0020g04510 | GDP-mannose 3,5-epimerase 1-like | Amino sugar and nucleotide sugar metabolism | CGTGCTGCTGATGGTAAAGA | TCCATACCCAGGTGATCCAT | |
| VIT_01s0011g02740 | phosphoenolpyruvate carboxylase 4-like | Pyruvate metabolism | ATGACGGACACCACAGATGA | CTGCAACACCTCTGTGAGAA | |
| VIT_01s0244g00140 | aspartokinase 1 | Lysine biosynthesis | GTCGCCCATTTCTTCTCTG | CGTCTCACTCGCTTCTCT | |
| VIT_10s0116g01540 | aminomethyltransferase | Glycine, serine and threonine metabolism | GGCCATAGGGAAGAGAAGA | GAGAGAAAGAGCCGACACG | |
| VIT_11s0016g02830 | gamma-GDP-amylintrapeptidase 1-like (GGT) | Taurine and hypotaurine metabolism | TGGCAACAGCTTAGAGGCAGTA | CCCACCTGCCTTCTCACAT | Kobayashi <i>et al.</i> , 2011 |
| VIT_19s0014g01800 | homogentisate 1,2-dioxygenase-like | Tyrosine metabolism | AACTACGGTGAAGCCTGTG | CATATCCATGCCGAAGGAAT | |
| Biosynthesis of secondary metabolites | | | | | |
| VIT_04s0044g01740 | hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) | Terpenoid backbone biosynthesis | TGCCACTGCCTCTACCTT | TACGGATCTTCTCCCTCAA | |
| VIT_01s0011g05380 | pectinesterase | Terpenoid backbone biosynthesis | TTGGGCTGATTGTTGGAG | TGACCGCTGGACTGATAGAG | |
| VIT_15s0046g03600 | (+)-neomenthol dehydrogenase | Monoterpenoid biosynthesis | AAGCCCTGTGAGATTGGCT | CCGAGATTCATGCAAGCCAT | |
| VIT_18s0001g04780 | Gewürztraminin (E)- α -Bergamotene Syn (GwaBer) | Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis | CCTAGCATTTGGGGCAATAC | CCGTTGAACTGCATCGATAA | |
| VIT_18s0001g04280 | Gewürztraminin Germacrene D Syn (GwGerD) | Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis | ACTCCGAGGACGAGGTAAAC | ACGTTGCACAGATCGATAA | |
| VIT_18s0001g04080 | Gewürztraminin (E)- β -Caryophyllene Syn (GwECar3) | Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis | AAATCGTGTCAAAGGAGGCCCT | CTGATGCTACATGCCCTCTCT | |
| VIT_19s0014g04930 | (-)-germacrene D synthase (GerD) | Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis | TGCCCTGTGGCGTTAGTTACC | AGCATCTCCATCCAAACAA | |
| VIT_12s0059g01790 | O-methyltransferase (OMT1) | Methoxypyrazines biosynthesis | GAGAAGCAGGTTGGAAATG | TGAGATGATTACTCTGGATATGC | Guillaumie <i>et al.</i> , 2013 |
| VIT_12s0059g01750 | O-methyltransferase (OMT2) | Methoxypyrazines biosynthesis | CCGAGGTTGAATGGAAGAA | AATGACAACACAGATGTAGATTAC | Guillaumie <i>et al.</i> , 2013 |
| VIT_03s0038g03090 | O-methyltransferase (OMT3) | Methoxypyrazines biosynthesis | ATGATGGCTACTACTACTAC | CCTAATTTCTGCTCTTAATG | Vallarino <i>et al.</i> , 2014 |
| VIT_03s0038g03080 | O-methyltransferase (OMT4) | Methoxypyrazines biosynthesis | GATGGCACACTACTACTACA | GGGATTTACCTTGCAGATA | Vallarino <i>et al.</i> , 2014 |
| VIT_15s0048g02480 | caffeic acid 3-O-methyltransferase | Phenylpropanoid biosynthesis | CTGGGAACCACCCTTAGCAT | CAGGAACGCCACAGCAT | |
| VIT_07s0005g04880 | glutathione transferase (GST 23-like) | Glutathione metabolism | TTGGATTGGCAGACATAGCC | CGGAGGAAACCTATCATCTCT | |
| VIT_01s0026g01340 | glutathione S-transferase U17-like | Glutathione metabolism | TTAAGTGGAGTGTGGATTGG | TGTTGACAGGAGGAATAGC | |
| VIT_04s0079g00690 | glutathione S-transferase (GST4) | Glutathione metabolism | AGTCATCTCCGGCCATCAG | CTCCACCATGCATCACACT | Kobayashi <i>et al.</i> , 2010 |
| VIT_12s0028g00920 | glutathione S-transferase 3 (GST3) | Glutathione metabolism | TGCAAAGTGTGGACATCTATG | TGTGAATGGAAGTGGCTAAGA | Kobayashi <i>et al.</i> , 2010 |
| VIT_04s0023g02200 | benzoate carboxyl methyltransferase-like | Volatile ester biosynthesis | AAGGAGGAGGACGACACACT | ACAGCCAGTGAACGCTACAA | |
| VIT_02s0087g00930 | probable carotenoid cleavage dioxygenase 4 (CCD4b) | Carotenoid biosynthesis | GTGAAGCTGGACGATACACGA | CTCCTCTGCCTCTGGATTGTC | |
| VIT_03s0063g00050 | abscisate beta-glucosyltransferase-like | Carotenoid biosynthesis | CGCCATCGGAGGATTCGTGACT | CCTCTCATCTCCACCCTCTCTCT | |
| VIT_07s0031g00620 | zeaxanthin epoxidase (ZEP/ZEP1) | Carotenoid biosynthesis | TACCGGGTATTTTTGGGACA | CTTCTTATCCGTTGGCAAGT | Wheeler <i>et al.</i> , 2009 |
| VIT_14s0006g01460 | benzyl alcohol O-benzoyltransferase | Volatile benzenoid and benzoic acid biosynthesis | AGGGTGTGGAGGAGTGTG | TGAGCGAGGTAGCAGAGT | |
| VIT_06s0004g01510 | lipoygenase (LOXA) | Jasmonic acid biosynthesis | GC AAATCAAAGGGACAACGCTGATGG | TGCTTCCACTCGGGCTTCC | Podolyan <i>et al.</i> , 2010 |
| VIT_14s0128g00780 | lipoygenase (LOXC) | Lipoic acid metabolism | TGGTGAAGGAAGTCAGGAAGAG | TGGCGGGTTTGGGAGGTAGC | Podolyan <i>et al.</i> , 2010 |
| VIT_00s0361g00040 | anthocyanidin reductase (ANR) | Anthocyanin biosynthesis | ACAGGTTGGCAGTTTGTCTTCC | CACTACTCTTGAATTTGCTGGCTTG | |
| VIT_01s0010g03510 | anthocyanin O-methyltransferase (FAOMT) | Anthocyanin biosynthesis | CTCTGCAGGCGCCTCTATTA | CCCAAAAACAGAGTCTGGACA | Xie <i>et al.</i> , 2015 |
| VIT_02s0025g04720 | leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) | Anthocyanin biosynthesis | AGGGAAGGGAACAAAGTAG | ACTCTTTGGGATTGACTGG | Jeong <i>et al.</i> , 2004 |
| VIT_02s0033g00410 | MYBA1 | Anthocyanin biosynthesis | TAGTACCACCTTCAAAAAGG | GATGTGTTTGGGGTTTATC | Jeong <i>et al.</i> , 2004 |
| VIT_06s0009g03010 | flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) | Anthocyanin biosynthesis | GCCTAGCTACTATATGGCATGGAT | ATGGTGGTAGAATGAACTCCCAAT | |
| VIT_14s0060g01280 | H ⁺ -pyrophosphatase (VHP1;1) | Anthocyanin biosynthesis | ACCTGAGCCGTTCTGTGG | CGTAGTAAAATCGCGATCATC | Sun, Tianyu, <i>et al.</i> 2017 |
| VIT_16s0039g02230 | UDP-glucose:flavonoid 3-o-glucosyltransferase (UGFT) | Anthocyanin biosynthesis | CCCTCCTTGCCTGTGTGG | GTTGGATTGGCTGGTGTGAGG | |
| VIT_16s0098g00870 | WD-repeat 1 (WDR1) | Anthocyanin biosynthesis | CCAATCTGAGGGAGATGGTC | TCCGAATCAAGAACCAAAGC | Xie <i>et al.</i> , 2015 |
| VIT_16s0039g01100 | phenylalanine ammonia-lyase (PAL 1) | Phenylpropanoid biosynthesis | GCAGTGAGTGGGTGATGGAGAG | CCAGCATTCAAGACCTGATGAGC | |
| VIT_19s0014g02370 | 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase-like | Phenylalanine metabolism | TTACACAGGCCACC AAATCC | GTAGAGTTGCAGAGCCACA | |
| VIT_17s0000g07200 | flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H) | Leucopelargonidin and leucocyanidin biosynthesis | GCCTCCGTTGCTGCTCAGTT | GAGAAGAGGTGGACGGGCAAAATC | Jeong <i>et al.</i> , 2006 |

Sup table 3. Primers used for fluidigm real-time PCR analysis and related gene descriptions

| Abscisic acid related | | | | | |
|------------------------------|--|--|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| VIT_01s0011g00760 | beta-glucosidase (BG1) | Coumarin biosynthesis | TGAACCTTACATAGTTGCCACCAT | AATCCCCATACATCAGAGGGTCAAT | Zhang <i>et al.</i> , 2013 |
| VIT_14s0006g01790 | beta-glucosidase 44-like | Coumarin biosynthesis | GCCGCAGAATAGTAGAAGACTTTGC | GCAATATAAGGCTCGGTTGATGAGT | Zhang <i>et al.</i> , 2013 |
| VIT_07s0129g00660 | probable indole-3-acetic acid-amido synthetase (GH3.2) | Auxin signaling pathway | CTGGAGATAAGGGTGGTGAAA | CTGGGCTGAAGTAGGTGGAG | |
| VIT_04s0008g03950 | rd22-c protein | ABA signaling pathway | TTTCACCTCCTACCCATCCT | CAACATTTACACCACCCCTTCC | |
| VIT_07s0005g00390 | beta-glucosidase 11-like | ABA signaling pathway | GGGAACCTCCTAACAGAGGC | TGGACCAAGAGTCCATAGCCA | |
| VIT_07s0197g00080 | serine/threonine-protein kinase (SnRK2.5) | ABA signaling pathway | GGCAAGAATACGATGGCAAG | GGAAGTCCTTGGGTTTCATCA | |
| VIT_09s0002g05590 | ABC transporter G family-like | ABA signaling pathway | AGGGTTCCTCGTTTCGTGTT | TCCTCACCAGAGTTCCTCCAT | |
| VIT_10s0003g03750 | 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2 (NCED2) | ABA signaling pathway | AGTTCATACGGGTTTCATGGG | CCATTTTCCAATCCAGGGTGT | Wheeler <i>et al.</i> , 2009 |
| VIT_10s0003g04390 | ABC transporter C family-like | ABA signaling pathway | TGTCGGCGGTTACTGGAGAAGGA | ATCACCACCAGGCAGTAAGTCAAGG | |
| VIT_14s0128g00890 | sucrose nonfermenting 4-like | ABA signaling pathway | CTGGCGGATCTAACATGGAT | ATACACGATGGCGAGAGACC | |
| VIT_16s0022g02210 | probable protein phosphatase 2C 75-like | ABA signaling pathway | AAAGAGAGGCAGGAGATGAGTGT | AAAGCAAGGCGGGTGAGA | |
| VIT_18s0001g10500 | abscisic acid 8'-hydroxylase 4-like (Hyd4) | ABA signaling pathway | ATGGACTTCCAGCCAGATTG | GGACATCTCTCCAACCCAGA | Speirs <i>et al.</i> , 2013 |
| VIT_19s0093g00550 | 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED1/NCED3) | ABA signaling pathway | GAGACCCCAACTCTGGCAGG | AAGGTGCCGTGGAATCCATAG | Wheeler <i>et al.</i> , 2009 |
| Miscellaneous | | | | | |
| VIT_05s0049g01130 | aldo-keto reductase | Metabolic processes and stress defense | TACGCGTTTGAGCATGGGAT | ATTTACGCCAACTGGCGATG | |
| VIT_05s0077g01300 | aldo-keto reductase | Metabolic processes and stress defense | TGTGCGAGGTGTTTGAGGTT | TGCTCTCGTACAGTCCATGTT | |
| VIT_08s0007g01040 | aldo-keto reductase family 4 member C9-like | Metabolic processes and stress defense | CTTGAGCCCTACAAGACTGTT | GACAATTTGGGCCGACAGATTC | |
| VIT_05s0094g01250 | 2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent) | Metabolic processes and stress defense | CTACTGCCTTACATCAGAGA | TGCTTGACATTCCATTC | |
| VIT_05s0062g00980 | probable aldo-keto reductase 2 | Metabolic processes and stress defense | CTCCCAAGCCAGAACAAAGAC | CCGTAGATGTCGGAGGTGTC | |
| VIT_02s0154g00260 | nitrate transporter 1.1-like | Nitrogen metabolism | CAGTTCCTATTGGTGGGTGC | CCCTAATGAAAGTGTGCTCAAA | Cochetel <i>et al.</i> , 2017 |
| VIT_01s0026g01570 | nitrate transporter 1.2-like | Nitrogen metabolism | GGTCTAGTCTTCTCCATTATAGCC | TGTTCACTGGAGTCCGATTAGC | |
| VIT_14s0066g00850 | high affinity nitrate transporter 2.5-like | Nitrogen metabolism | CCACCTTCGCCATTCTCCTCTT | ACACGCCGTACCCATCGCTAAA | |
| VIT_00s0203g00070 | MYB 102-like | Transcription factor | TGGCTATGAAACTGGAGGACACTT | CAGCAATGGCAGACCATTGTTACC | |
| VIT_15s0046g00170 | MYBPA1 protein | Transcription factor | ATCGCAGGTAGGCTTCCAGGTC | CCTCCGCCATTGTTGGTCTTGT | |
| VIT_08s0007g08920 | cis-zeatin O-glucosyltransferase | Zeatin biosynthesis | TGTGGCTGTGGTGTGATGGT | CTTGCTTGGTTGATGTGG | |
| Reference genes | | | | | |
| VIT_17s0000g10430 | GAPDH | | CCACAGACTTCATCGGTGACA | TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA | Reid <i>et al.</i> , 2006 |
| VIT_04s0044g00580 | Actin | | CTTGATCCCTCAGCACCTT | TCCTGTGGACAATGGATGGA | Reid <i>et al.</i> , 2006 |
| VIT_12s0035g01130 | EF1γ | | CAAGAGAAACAATCCCTAGCTG | TCAATCTGTCTAGGAAAGGAAG | Reid <i>et al.</i> , 2006 |
| VIT_16s0098g01190 | Ubiquitin | | AACCTCAATCCAGTCATCTAC | GTGGTATTATTGAGCCATCCTT | Reid <i>et al.</i> , 2006 |

Sup Table 4. Gene set enrichment analysis (GSEA) of genes associated with

Vitis vinifera metabolism pathways

| KEGG ID | Pathway description | P_value | FDR q_value | FWER p-value | ES | NES |
|----------------------------|---|---------|-------------|--------------|-------|-------|
| PS6LC vs PS12LC | | | | | | |
| VVI00195 | Photosynthesis | 0 | 0 | 0 | 0.72 | 2.44 |
| VVI00196 | Photosynthesis antenna proteins | 0 | 0 | 0 | 0.81 | 2.31 |
| VVI00910 | Nitrogen metabolism | 0 | 0.016 | 0.066 | 0.60 | 1.78 |
| VVI00860 | Porphyrin and chlorophyll metabolism | 0.007 | 0.0646 | 0.297 | 0.51 | 1.67 |
| VVI00010 | Glycolysis / Gluconeogenesis | 0 | 0.0837 | 0.329 | -0.36 | -1.66 |
| VVI04145 | Phagosome | 0 | 0.0533 | 0.193 | -0.41 | -1.74 |
| VVI00966 | Glucosinolate biosynthesis | 0.005 | 0.0432 | 0.137 | -0.81 | -1.80 |
| VVI00941 | Flavonoid biosynthesis | 0 | 0.0148 | 0.041 | -0.47 | -1.91 |
| VVI00520 | Amino sugar and nucleotide sugar metabolism | 0 | 0.0095 | 0.022 | -0.43 | -1.95 |
| VVI00020 | Citrate cycle (TCA cycle) | 0 | 0 | 0 | -0.54 | -2.14 |
| VVI00944 | Flavone and flavonol biosynthesis | 0 | 0 | 0 | -0.85 | -2.16 |
| VVI03050 | Proteasome | 0 | 0 | 0 | -0.57 | -2.21 |
| PS12LC vs PS12LC+SS | | | | | | |
| VVI00196 | Photosynthesis antenna proteins | 0 | 0 | 0 | 0.89 | 2.58 |
| VVI00195 | Photosynthesis | 0 | 0,0005 | 0.001 | 0.55 | 2.06 |
| VVI00908 | Zeatin biosynthesis | 0.0018 | 0.0085 | 0.024 | 0.72 | 1.92 |
| VVI00906 | Carotenoid biosynthesis | 0.0035 | 0.0272 | 0.102 | 0.55 | 1.80 |
| VVI00710 | Carbon fixation in photosynthetic organisms | 0.0018 | 0.0308 | 0.136 | 0.47 | 1.78 |
| VVI03022 | Basal transcription factors | 0.0074 | 0.0799 | 0.541 | -0.44 | -1.60 |
| VVI03050 | Proteasome | 0.0099 | 0.0575 | 0.399 | -0.44 | -1.66 |
| VVI00941 | Flavonoid biosynthesis | 0.0052 | 0.0463 | 0.304 | -0.43 | -1.69 |
| VVI03010 | Ribosome | 0 | 0.051 | 0.287 | -0.34 | -1.70 |
| VVI00944 | Flavone and flavonol biosynthesis | 0 | 0.0061 | 0.027 | -0.76 | -1.95 |
| VVI04141 | Protein processing in endoplasmic reticulum | 0 | 0.0069 | 0.023 | -0.41 | -1.97 |
| VVI04130 | SNARE interactions in vesicular transport | 0 | 0 | 0 | -0.66 | -2.31 |
| VVI00190 | Oxidative phosphorylation | 0 | 0 | 0 | -0.53 | -2.43 |
| PS6LC vs PS12LC+SS | | | | | | |
| VVI00195 | Photosynthesis | 0 | 0 | 0 | 0.74 | 2.53 |
| VVI00196 | Photosynthesis antenna proteins | 0 | 0 | 0 | 0.82 | 2.28 |
| VVI00860 | Porphyrin and chlorophyll metabolism | 0.0041 | 0.043 | 0.135 | 0.54 | 1.74 |
| VVI00330 | Arginine and proline metabolism | 0 | 0.0523 | 0.283 | -0.41 | -1.65 |
| VVI04145 | Phagosome | 0 | 0.029 | 0.146 | -0.40 | -1.74 |
| VVI00520 | Amino sugar and nucleotide sugar metabolism | 0 | 0.0054 | 0.025 | -0.41 | -1.90 |
| VVI00020 | Citrate cycle (TCA cycle) | 0 | 0.0035 | 0.014 | -0.50 | -1.94 |
| VVI00941 | Flavonoid biosynthesis | 0 | 0.001 | 0.003 | -0.50 | -2.05 |
| VVI04130 | SNARE interactions in vesicular transport | 0 | 0 | 0 | -0.61 | -2.20 |
| VVI00944 | Flavone and flavonol biosynthesis | 0 | 0 | 0 | -0.88 | -2.31 |
| VVI03050 | Proteasome | 0 | 0 | 0 | -0.60 | -2.31 |
| VVI00190 | Oxidative phosphorylation | 0 | 0 | 0 | -0.50 | -2.32 |

ES, enrichment score. NES, Normalized enrichment score. FDR, False Discovery Rate. FWER p-value, Familywise-error rate.

Sup Table 4. Gene set enrichment analysis (GSEA) of genes associated with Vitis vinifera metabolism pathways

| KEGG ID | Pathway description | P_value | FDR q_value | FWER p-value | ES | NES |
|-------------------------------|--|---------|-------------|--------------|-------|-------|
| PS6LC_ABA vs PS12LC+SS | | | | | | |
| VI00945 | Stilbenoid diarylheptanoid and gingerol biosynthesis | 0 | 0 | 0 | 0.79 | 3.46 |
| VI00941 | Flavonoid biosynthesis | 0 | 0 | 0 | 0.63 | 3.19 |
| VI00196 | Photosynthesis antenna proteins | 0 | 0 | 0 | 0.76 | 3.09 |
| VI00906 | Carotenoid biosynthesis | 0 | 0 | 0 | 0.61 | 2.74 |
| VI00940 | Phenylpropanoid biosynthesis | 0 | 0 | 0 | 0.43 | 2.73 |
| VI00073 | Cutin. suberine and wax biosynthesis | 0 | 0 | 0 | 0.71 | 2.69 |
| VI00360 | Phenylalanine metabolism | 0 | 0 | 0 | 0.49 | 2.51 |
| VI04712 | Circadian rhythm-plant | 0 | 0.001 | 0.003 | 0.42 | 2.16 |
| VI00950 | Isoquinoline alkaloid biosynthesis | 0 | 0.0009 | 0.003 | 0.54 | 2.15 |
| VI00591 | Linoleic acid metabolism | 0 | 0.0142 | 0.062 | 0.52 | 1.83 |
| VI00195 | Photosynthesis | 0 | 0.0176 | 0.083 | 0.33 | 1.78 |
| VI00052 | Galactose metabolism | 0 | 0.0393 | 0.193 | 0.31 | 1.62 |
| VI04016 | MAPK signaling pathway-plant | 0 | 0.0454 | 0.237 | 0.27 | 1.59 |
| VI04144 | Endocytosis | 0 | 0.0803 | 0.604 | -0.41 | -1.57 |
| VI03060 | Protein export | 0.0032 | 0.0553 | 0.434 | -0.47 | -1.61 |
| VI03030 | DNA replication | 0.001 | 0.0454 | 0.344 | -0.49 | -1.64 |
| VI03050 | Proteasome | 0.0021 | 0.0201 | 0.152 | -0.50 | -1.71 |
| VI03010 | Ribosome | 0 | 0.0152 | 0.1 | -0.44 | -1.74 |
| VI00902 | Monoterpenoid biosynthesis | 0.005 | 0.0172 | 0.095 | -0.71 | -1.75 |
| VI00190 | Oxidative phosphorylation | 0 | 0.0185 | 0.083 | -0.47 | -1.76 |
| VI04145 | Phagosome | 0 | 0.0006 | 0.002 | -0.53 | -1.93 |
| VI04130 | SNARE interactions in vesicular transport | 0 | 0 | 0 | -0.65 | -2.12 |
| PS6LC_ABA vs PS6LC | | | | | | |
| VI00941 | Flavonoid biosynthesis | 0 | 0 | 0 | 0.76 | 4.22 |
| VI00945 | Stilbenoid diarylheptanoid and gingerol biosynthesis | 0 | 0 | 0 | 0.70 | 3.09 |
| VI00944 | Flavone and flavonol biosynthesis | 0 | 0 | 0 | 0.89 | 2.95 |
| VI00360 | Phenylalanine metabolism | 0 | 0 | 0 | 0.49 | 2.65 |
| VI00950 | Isoquinoline alkaloid biosynthesis | 0 | 0.0025 | 0.004 | 0.49 | 2.14 |
| VI04712 | Circadian rhythm-plant | 0 | 0.0048 | 0.01 | 0.41 | 2.02 |
| VI00940 | Phenylpropanoid biosynthesis | 0 | 0.007 | 0.019 | 0.37 | 1.94 |
| VI00350 | Tyrosine metabolism | 0 | 0.0081 | 0.029 | 0.38 | 1.90 |
| VI03050 | Proteasome | 0 | 0.0239 | 0.1 | 0.31 | 1.72 |
| VI00906 | Carotenoid biosynthesis | 0 | 0.0419 | 0.184 | 0.33 | 1.59 |
| VI00071 | Fatty acid degradation | 0 | 0.0534 | 0.24 | 0.31 | 1.55 |
| VI00040 | Pentose and glucuronate interconversions | 0 | 0.0603 | 0.285 | 0.27 | 1.53 |
| VI00905 | Brassinosteroid biosynthesis | 0.0093 | 0.0797 | 0.481 | -0.61 | -1.60 |
| VI00710 | Carbon fixation in photosynthetic organisms | 0.002 | 0.071 | 0.392 | -0.48 | -1.63 |
| VI00910 | Nitrogen metabolism | 0.0076 | 0.0463 | 0.23 | -0.55 | -1.68 |
| VI00750 | Vitamin B6 metabolism | 0.0034 | 0.0561 | 0.223 | -0.63 | -1.68 |
| VI00860 | Porphyrin and chlorophyll metabolism | 0.001 | 0.0558 | 0.169 | -0.52 | -1.71 |
| VI00196 | Photosynthesis antenna proteins | 0.0022 | 0.0413 | 0.088 | -0.60 | -1.77 |
| VI00195 | Photosynthesis | 0 | 0 | 0 | -0.69 | -2.34 |
| PS6LC_ABA vs PS12LC | | | | | | |
| VI00941 | Flavonoid biosynthesis | 0 | 0 | 0 | 0.75 | 4.74 |
| VI00945 | Stilbenoid diarylheptanoid and gingerol biosynthesis | 0 | 0 | 0 | 0.75 | 3.57 |
| VI04712 | Circadian rhythm-plant | 0 | 0.0007 | 0.001 | 0.39 | 2.45 |
| VI00073 | Cutin. suberine and wax biosynthesis | 0 | 0.0005 | 0.001 | 0.60 | 2.43 |
| VI00360 | Phenylalanine metabolism | 0 | 0.0004 | 0.001 | 0.41 | 2.43 |
| VI00906 | Carotenoid biosynthesis | 0 | 0.0004 | 0.001 | 0.45 | 2.39 |
| VI00940 | Phenylpropanoid biosynthesis | 0 | 0.0003 | 0.001 | 0.37 | 2.32 |
| VI00591 | Linoleic acid metabolism | 0 | 0.0124 | 0.041 | 0.47 | 1.83 |
| VI00944 | Flavone and flavonol biosynthesis | 0 | 0.0114 | 0.043 | 0.52 | 1.82 |
| VI00052 | Galactose metabolism | 0 | 0.0207 | 0.083 | 0.30 | 1.74 |
| VI00592 | alpha Linolenic acid metabolism | 0 | 0.0800 | 0.327 | 0.26 | 1.51 |
| VI00480 | Glutathione metabolism | 0 | 0.0951 | 0.403 | 0.21 | 1.47 |

ES, enrichment score. NES, Normalized enrichment score. FDR, False Discovery Rate. FWER p-value, Familywise-error rate.

VI- References

- Acevedo De la Cruz A, Hilbert G, Rivière C, Mengin V, Ollat N, Bordenave L, Decroocq S, Delaunay J-C, Delrot S, Mérillon J-M, Agudelo-Romero P, Ali K, Choi YH, Sousa L, Verpoorte R, Tiburcio AF, Fortes AM. 2014. Perturbation of polyamine catabolism affects grape ripening of *Vitis vinifera* cv. Trincadeira. *Plant Physiology and Biochemistry* **74**, 141-155.
- Agudelo-Romero P, Erban A, Sousa L, Pais MS, Kopka J, Fortes AM. 2013. Search for transcriptional and metabolic markers of grape pre-ripening and ripening and insights into specific aroma development in three Portuguese cultivars. *PLoS one* **8**, e60422.
- Allamy L. 2015. Recherches sur les marqueurs moléculaires de l'arôme de « fruits cuits » des raisins et des vins rouges issus des cépages Merlot et Cabernet-Sauvignon. *Manuscrit de thèse Université de Bordeaux*, 1-342.
- Amato A, Cavallini E, Zenoni S, Finezzo L, Begheldo M, Ruperti B, Tornielli GB. 2017. A Grapevine TTG2-Like WRKY Transcription Factor Is Involved in Regulating Vacuolar Transport and Flavonoid Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1979-1979.
- Anders S, Pyl PT, Huber W. 2014. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166-169.
- Anesi A, Stocchero M, Dal Santo S, Commisso M, Zenoni S, Ceoldo S, Tornielli G, Siebert T, Herderich M, Pezzotti M, Guzzo F. 2015. Towards a scientific interpretation of the terroir concept: plasticity of the grape berry metabolome. *BMC Plant Biology* **15**, 191.
- Balic I, Vizoso P, Nilo-Poyanco R, Sanhueza D, Olmedo P, Sepúlveda P, Arriagada C, Defilippi BG, Meneses C, Campos-Vargas R. 2018. Transcriptome analysis during ripening of table grape berry cv. Thompson Seedless. *PLoS one* **13**, e0190087-e0190087.
- Barry C, LlopTous M, Grierson D. 2000. The regulation of 1aminocyclopropane1carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system1 to system2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiology* **123**, 979 - 986.
- Bennett JS, Gregan SM, Jordan B. 2013. The influence of vineyard and fruit exposure on the accumulation of methoxypyrazines in Marlborough Sauvignon blanc grapes. In *15th Australian wine industry technical conference, Sydney, new south wales 13-18 july 2013*.
- Blanke MM, Lenz F. 1989. Fruit photosynthesis. *Plant, Cell & Environment* **12 (1)**, 31-46.
- Bogs J, Downey MO, Harvey JS, Ashton AR, Tanner GJ, Robinson SP. 2005. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology* **139**, 652-663.
- Bogs J, Ebadi A, McDavid D, Robinson S. 2006. Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiology* **140**, 279 - 291.
- Böttcher C, Boss PK, Davies C. 2011a. Acyl substrate preferences of an IAA-amido synthetase account for variations in grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening caused by different auxinic compounds indicating the importance of auxin conjugation in plant development. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4267-4280.
- Böttcher C, Harvey K, Forde CG, Boss PK, Davies C. 2011b. Auxin treatment of pre-veraison grape (*Vitis vinifera* L.) berries both delays ripening and increases the synchronicity of sugar accumulation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **17**, 1-8.
- Castellarin S, Di Gaspero G. 2007. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biology* **7**, 1-10.
- Cerovic ZG, Ghazlen NB, Milhade C, Obert M, Debusson S, Moigne ML. 2015. Nondestructive Diagnostic Test for Nitrogen Nutrition of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Based on Dualex Leaf-Clip Measurements in the Field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 3669-3680.
- Chai L, Li Y, Chen S, Perl A, Zhao F, Ma H. 2014. RNA sequencing reveals high resolution expression change of major plant hormone pathway genes after young seedless grape berries treated with gibberellin. *Plant Science* **229**, 215-224.
- Chong J, Piron M-C, Meyer S, Merdinoglu D, Bertsch C, Mestre P. 2014. The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany* **65**, 6589-6601.
- Coombe B, Hale C. 1973. The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiology* **51**, 629 - 634.
- Coombe BG. 1960. Relationship of growth and development to changes in sugars, auxins, and gibberellins in fruit of seeded and seedless varieties of *Vitis vinifera*. . *Plant Physiology* **35(2)**, 241.
- Costantini V, Bellincontro A, De Santis D, Botondi R, Mencarelli F. 2006. Metabolic changes of Malvasia grapes for wine production during postharvest drying. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54(9)**, 3334-3340.
- Dai X, Mashiguchi K, Chen Q, Kasahara H, Kamiya Y, Ojha S, DuBois J, Ballou D, Zhao Y. 2013. The biochemical mechanism of auxin biosynthesis by an arabidopsis YUCCA flavin-containing monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **288(3)**, 1448-1457.
- Dai ZW, Ollat N, Gomès E, Decroocq S, Tandonnet J-P, Bordenave L, Pieri P, Hilbert G, Kappel C, van Leeuwen C, Vivin P, Delrot S. 2011. Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* **62**, 413-425.
- Dal Santo S, Fasoli M, Negri S, D'Inca E, Vicenzi N, Guzzo F, Tornielli GB, Pezzotti M, Zenoni S. 2016. Plasticity of the Berry Ripening Program in a White Grape Variety. *Frontiers in Plant Science* **7**, 970-970.
- Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, Tillett RL, Quilici DR, Osborne C, Schooley DA, Schlauch KA, Cushman JC, Cramer GR. 2007. Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* **8**, 429.
- Desprez T, Juraniec M, Crowell EF, Jouy H, Pochylova Z, Parcy F, Höfte H, Gonneau M, Vernhettes S. 2007. Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15572-15577.

- Deytieux-Belleau C, Gagne S, L'Hyvernay A, Doneche B, Geny L.** 2007. Possible roles of both abscisic acid and Indol-acetic acid in controlling grape berry ripening process. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin* **41**, 141 - 148.
- du Plessis K, Young PR, Eyéghé-Bickong HA, Vivier MA.** 2017. The Transcriptional Responses and Metabolic Consequences of Acclimation to Elevated Light Exposure in Grapevine Berries. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Dunlevy J, Soole K, Perkins M, Dennins E, Keyzers R, Kalua C, Boss P.** 2010. Two O-methyltransferases involved in the biosynthesis of methoxypyrazines: grape-derived aroma compounds important to wine flavour. *Plant Mol Biol* **74**, 77-89.
- Dunlevy JD, Dennis EG, Soole KL, Perkins MV, Davies C, Boss PK.** 2013a. A methyltransferase essential for the methoxypyrazine-derived flavour of wine. *The Plant Journal* **75**, 606-617.
- Dunlevy JD, Soole KL, Perkins MV, Nicholson EL, Maffei SM, Boss PK.** 2013b. Determining the methoxypyrazine biosynthesis variables affected by light exposure and crop level in Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* **64**, 450-458.
- Effmert U, Saschenbrecker S, Ross J, Negre F, Fraser CM, Noel JP, Dudareva N, Piechulla B.** 2005. Floral benzenoid carboxyl methyltransferases: From in vitro to in planta function. *Phytochemistry* **66**, 1211-1230.
- Ferrara G, Mazzeo A, Matarrese AMS, Pacucci C, Punzi R, Faccia M, Trani A, Gambacorta G.** 2015. Application of abscisic acid (S-ABA) and sucrose to improve colour, anthocyanin content and antioxidant activity of cv. Crimson Seedless grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **21**, 18-29.
- Fortes AM, Teixeira RT, Agudelo-Romero P.** 2015. Complex interplay of hormonal signals during grape berry ripening. *Molecules* **20(5)**, 9326-9343.
- Fujita A, Soma N, Goto-Yamamoto N, Shindo H, Kakuta T, Koizumi T, Hashizume K.** 2005. Anthocyanidin Reductase Gene Expression and Accumulation of Flavan-3-ols in Grape Berry. *American Journal of Enology and Viticulture* **56**, 336-342.
- Gambetta GA, Matthews MA, Shaghasi TH, McElrone AJ, Castellarin SD.** 2010. Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape *Planta* **232**, 219-234.
- GIEC.** 2018. Global warming of 1.5°C an IPCC special report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Incheon, Republic of Korea*.
- Goodman CD, Casati P, Walbot V.** 2004. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *The Plant Cell* **16**, 1812-1826.
- Goulas Y, Zoran GC, Aurélie C, Ismaël M.** 2004. Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *APPLIED OPTICS* **43(23)**, 4488-4496.
- Guillaumie S, Ilg A, Réty S, Brette M, Trossat-Magnin C, Decroocq S, Léon C, Keime C, Ye T, Baltenweck-Guyot R, Claudel P, Bordenave L, Vanbrabant S, Duchêne E, Delrot S, Darriet P, Hugueney P, Gomès E.** 2013. Genetic analysis of the biosynthesis of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, a major grape-derived aroma compound impacting wine quality. *Plant Physiology* **162**, 604-615.
- Hein K, Ebeler SE, Heymann H.** 2009. Perception of fruity and vegetative aromas in red wine. *Journal of Sensory Studies* **24**, 441-455.
- Hugueney P, Provenzano S, Verriès C, Ferrandino A, Meudec E, Batelli G, Merdinoglu D, Cheynier V, Schubert A, Ageorges A.** 2009. A novel cation-dependent O-methyltransferase involved in anthocyanin methylation in grapevine. *Plant Physiology* **150**, 2057-2070.
- Hutchison CE, Li J, Argueso C, Gonzalez M, Lee E, Lewis MW, Maxwell BB, Perdue TD, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ.** 2006. The Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell* **18(11)**, 3073-3087.
- Jeong S, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M.** 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* **167**, 247 - 252.
- Kanayama Y, Mizutani R, Yaguchi S, Hojo A, Ikeda H, Nishiyama M, Kanahama K.** 2014. Characterization of an uncharacterized aldo-keto reductase gene from peach and its role in abiotic stress tolerance. *Phytochemistry* **104**, 30-36.
- Kang J, Hwang J-U, Lee M, Kim Y-Y, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y.** 2010. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 2355-2360.
- Katayama-Ikegami A, Sakamoto T, Shibuya K, Katayama T, Gao-Takai M.** 2016. Effects of Abscisic Acid Treatment on Berry Coloration and Expression of Flavonoid Biosynthesis Genes in Grape. *American Journal of Plant Sciences* **07**, 1325-1336.
- Kato-Noguchi H, Tanaka Y.** 2008. Effect of ABA- β -d-glucopyranosyl ester and activity of ABA- β -d-glucosidase in Arabidopsis thaliana. *Journal of plant physiology*, **165(7)**, 788-790.
- Kikuchi G.** 1973. The glycine cleavage system: Composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1**, 169-187.
- Kim D, Perteza G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL.** 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* **14**, R36.
- Kirch H-H, Bartels D, Wei Y, Schnable PS, Wood AJ.** 2004. The ALDH gene superfamily of Arabidopsis. *Trends in plant science* **9**, 371-377.
- Kobayashi S, Ishimaru M, Ding CK, Yakushiji H, Goto N.** 2001. Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Science* **160**, 543-550.
- Kotseridis Y.** 1999. Etude de l'arôme des vins de Merlot et Cabernet Sauvignon de la région bordelaise. *Université Victor Segalen Bordeaux II.*, 268.
- Kotseridis Y, Razungles A, Bertrand A, Baumes R.** 2000. Differentiation of the aromas of merlot and Cabernet-Sauvignon wines using sensory and instrumental analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 5383-5388.

Koyama R, Marinho de Assis A, Yamamoto L, Borges W, Sa Borge R, Prudencio S, Roberto S. 2014. Exogenous abscisic acid increases the anthocyanin concentration of berry and juice from "Isabel" grapes (*Vitis labrusca* L.). *HortScience* **49**, 460-464.

Koyama R, Roberto SR, de Souza RT, Borges WFS, Anderson M, Waterhouse AL, Cantu D, Fidelibus MW, Blanco-Ulate B. 2018. Exogenous Abscisic Acid Promotes Anthocyanin Biosynthesis and Increased Expression of Flavonoid Synthesis Genes in *Vitis vinifera* × *Vitis labrusca* Table Grapes in a Subtropical Region. *Frontiers in Plant Science* **9**, 323-323.

Lecourieux F, Lecourieux D, Vignault C, Delrot S. 2010. A sugar-inducible protein kinase, VvSK1, regulates hexose transport and sugar accumulation in grapevine cells. *Plant Physiology* **152**, 1096-1106.

Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**.

Lücker J, Bowen P, Bohlmann J. 2004. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochemistry* **65**, 2649-2659.

Lumba S, Toh S, Handfield L-F, Swan M, Liu R, Youn J-Y, Cutler Sean R, Subramaniam R, Provart N, Moses A, Desveaux D, McCourt P. 2014. A Mesoscale Abscisic Acid Hormone Interactome Reveals a Dynamic Signaling Landscape in Arabidopsis. *Developmental Cell* **29**, 360-372.

Martin D, Grose C, Fedrizzi B, Stuart L, Albright A, McLachlan A. 2016. Grape cluster microclimate influences the aroma composition of Sauvignon blanc wine. *Food chemistry* **210**, 640-647.

Martin RC, Mok MC. 1999. Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, pp. 284-289.

Maugé C, Granier T, d'Estaintot BL, Gargouri M, Manigand C, Schmitter J-M, Chaudière J, Gallois B. 2010. Crystal Structure and Catalytic Mechanism of Leucoanthocyanidin Reductase from *Vitis vinifera*. *Journal of molecular biology* **397**, 1079-1091.

Montero F, de Juan J, Cuesta A, Brasa A. 2000. Nondestructive methods to estimate leaf area in *Vitis vinifera* L. *HortScience* **35**, 696-698.

Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramaniam A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC. 2003. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics* **34**, 267.

Mudalkar S, Sreeharsha RV, Reddy AR. 2016. A novel aldo-keto reductase from *Jatropha curcas* L. (JcAKR) plays a crucial role in the detoxification of methylglyoxal, a potent electrophile. *Journal of Plant Physiology* **195**, 39-49.

Neto F, Tecchio M, Junior A, Vedoato B, Lima G, Roberto S. 2017. Effect of ABA on colour of berries, anthocyanin accumulation and total phenolic compounds of 'Rubi' table grape (*Vitis vinifera*). *Australian Journal of Crop Science* **11**, 199-205.

Nunan K, Davies C, Robinson S, Fincher G. 2001. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta* **214**, 257 - 264.

Palliotti A, Tombesi S, Silvestroni O, Lanari V, Gatti M, Poni S. 2014. Changes in vineyard establishment and canopy management urged by earlier climate-related grape ripening: a review. *Scientia Horticulturae*. **178**, 43-54.

Parker AK, Raw V, Martin D, Haycock S, Sherman E, Trought MCT. 2016. Reduced grapevine canopy size post-flowering via mechanical trimming alters ripening and yield of 'pinot noir'. *VITIS - Journal of Grapevine Research* **55**, 1-9.

Peppi M, Fidelibus M, Dokoozlian N. 2006. Abscisic Acid Application Timing and Concentration Affect Firmness, Pigmentation, and Color of 'Flame Seedless' Grapes. *Horticultural Science* **41**, 1440-1445.

Pérez-Díaz R, Madrid-Espinoza J, Salinas-Cornejo J, et al. 2016. Differential roles for VvGST1, VvGST3, and VvGST4 in proanthocyanidin and anthocyanin transport in *Vitis vinifera*. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1166.

Pilati S, Bagagli G, Sonogo P, Moretto M, Brazzale D, Castorina G, Simoni L, Tonelli C, Guella G, Engelen K, Galbiati M, Moser C. 2017. Abscisic Acid Is a Major Regulator of Grape Berry Ripening Onset: New Insights into ABA Signaling Network. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1093-1093.

Pons A, Allamy L, Lavigne V, Dubourdieu D, Darriet P. 2017. Study of the contribution of massoia lactone to the aroma of Merlot and Cabernet Sauvignon musts and wines. *Food chemistry* **232**, 229-236.

R Development Core Team. 2010. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Rapp A, Knipser W, Engel L, Ullemeyer H, Heimann W. 1980. Off-flavor compounds in the berry and wine aroma of grapevine hybrids. 1. The strawberry-like flavour. *Vitis* **19** (1), 13-23.

Rattanakon S, Ghan R, Gambetta GA, Deluc LG, Schlauch KA, Cramer GR. 2016. Abscisic acid transcriptomic signaling varies with grapevine organ. *BMC Plant Biology* **16**, 72.

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**.

Robinson AL, Adams DO, Boss PK, Heymann H, Solomon PS, Trengove RD. 2011. The relationship between sensory attributes and wine composition for Australian Cabernet Sauvignon wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **17**, 327-340.

Roland A, Schneider R, Razungles A, Cavelier F. 2011. Varietal thiols in wine: discovery, analysis and applications. *Chemical Reviews* **111**, 7355-7376.

Scheighofer A, Hirt H, Meskiene I. 2004. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in plant science* **9**(5), 236-243.

Speirs J, Binney A, Collins M, Edwards E, Loveys B. 2013. Expression of ABA synthesis and metabolism genes under different irrigation strategies and atmospheric VPDs is associated with stomatal conductance in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon). *Journal of Experimental Botany* **64**, 1907-1916.

- Subramanian A.** 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15545-15550.
- Sun R, He F, Lan Y, Xing R, Liu R, Pan Q, Wang J, Duan C.** 2015. Transcriptome comparison of Cabernet Sauvignon grape berries from two regions with distinct climate. *Journal of Plant Physiology* **178**, 43-54.
- Sweetman C, Wong D, Ford C, Drew D.** 2012. Transcriptome analysis at four developmental stages of grape berry (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) provides insights into regulated and coordinated gene expression. *BMC Genomics* **13**, 691.
- Symons G, Davies C, Shavrukov Y, Dry I, Reid J, Thomas M.** 2006. Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology* **140**, 150 - 158.
- Torres N, Hilbert G, Goicoechea N, Antolin C.** 2017. Berry metabolite profiling on *Vitis vinifera* L. cv Tempranillo subjected to deficit irrigation under elevated temperatures. *Reviewed by Journal of Food Composition and Analysis*, 51-62.
- Turner NC.** 1988. Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Science* **9**, 289-308.
- Van Leeuwen C, Darriet P.** 2016. The Impact of climate change on viticulture and wine Quality. . *Journal of Wine Economics*. **11**, 150-167.
- Van Leeuwen C, Trégoat O, Choné X, Bois B, Pernet D, Gaudillere JP.** 2009. Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin* **43**, 121-134.
- Verpoorte R, Alfermann AW.** 2000. *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. : Springer Netherlands.
- Verweij W, Spelt CE, Bliet M, de Vries M, Wit N, Faraco M, Koes R, Quattrocchio FM.** 2016. Functionally Similar WRKY Proteins Regulate Vacuolar Acidification in *Petunia* and Hair Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **28**, 786-803.
- Webb L, Watterson I, Bhend J, Whetton P, Barlow E.** 2013. Global climate analogues for winegrowing regions in future periods: projections of temperature and precipitation. . *Australian Journal of Grape and Wine Research*. **19**, 331-341.
- Xu W, Dubos C, Lepiniec L.** 2015. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB–bHLH–WDR complexes. . *Trends in plant science* **20(3)**, 176-185.
- Zenoni S, Dal Santo S, Tornielli GB, D'Inca E, Filippetti I, Pastore C, Allegro G, Silvestroni O, Lanari V, Pisciotta A, Di Lorenzo R, Palliotti A, Tombesi S, Gatti M, Poni S.** 2017. Transcriptional Responses to Pre-flowering Leaf Defoliation in Grapevine Berry from Different Growing Sites, Years, and Genotypes. *Frontiers in Plant Science* **8**, 630-630.
- Zenoni S, Ferrarini A, Giacomelli E, Xumerle L, Fasoli M, Malerba G, Bellin D, Pezzotti M, Delledonne M.** 2010. Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-seq. *Plant Physiology* **152**, 1787 - 1795.
- Zhang M, Leng P, Zhang G, Li X.** 2009. Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. . *Journal of Plant Physiology* **166(12)**, 1241-1252.
- Zhang XR, Luo GG, Wang RH, Wang J, Hilmerick DG.** 2003. Growth and developmental responses of seeded and seedless grape berries to shoot girdling. *J Am Soc Hort Sci* **128**.

Chapitre IV : Caractérisation fonctionnelle de *VviAKR*, enzyme potentiellement impliquée dans la voie de biosynthèse des méthoxypyrazines.

L'objectif du travail décrit dans ce chapitre est la caractérisation fonctionnelle de *VviAKR* (VIT_05s0094g01250) potentiellement impliqué dans la voie de biosynthèse des méthoxypyrazines (MPs).

Afin d'étudier les bases génétiques de la biosynthèse de méthoxypyrazines dans les baies de raisin, le clonage des séquences alléliques de *VviAKR*, la production et la purification de protéines recombinantes ainsi que des dosages enzymatiques pour déterminer le substrat préférentiel de cette enzyme ont été réalisés.

Les allèles de *VviAKR* au sein des cépages Carmènère (CA)/Cabernet-Sauvignon (CS)/Sauvignon blanc (SB), Petit Verdot (PV) et Pinot noir (PN) ont montré une différence drastique de séquences entre les cépages forts (CA, CS, SB) et faibles producteurs (PV, PN) d'IBMP. Les protéines obtenues diffèrent par leurs poids moléculaires : 100 acides aminés pour CA/CS/SB au lieu de 266 pour PV et 344 pour PN. Suite à la présence de l'insertion d'un nucléotide dans l'exon 1 induisant un décalage du cadre de lecture et d'un codon stop précoce chez CA, CS, SB, l'AKR de CA/CS/SB serait ainsi non fonctionnelle contrairement à celles présentes au sein des cépages PV ou PN qui seraient actives.

Sur la base du fait que des molécules précurseurs de MPs non méthylées et non volatiles sont présentes dans *E. coli* (Guillaumie et al. 2013), une expression de *VviAKR* ainsi qu'une co-expression de *VviOMT3* et *VviAKR* en système hétérologue a été réalisée afin de fournir des informations sur l'implication ou non de cette AKR dans la voie de biosynthèses des MPs. Cependant la production des protéines AKR, AKR-NusA, et AKR-MBP sous leurs formes solubles par *E coli* s'est avérée très difficile.

En parallèle des deux précédentes approches, nous avons utilisé le système hairy roots (HR) afin de transformer des racines de cépages naturellement plus ou moins fort producteurs de MPs tels que RGM, CS, PN et PV en surexprimant sous promoteur 35S le gène *VviAKR* afin de voir l'impact de la présence ou non de cette protéine en système homologue sur la concentration en MPs. Cependant aucune différence significative n'a pu être observée lors de l'analyse des résultats de concentration en IBMP entre les constructions surexprimant un allèle donné de *VviAKR* et leur contrôle respectif ne l'exprimant pas. Ceci pourrait être expliqué par la différence d'expression de *VviAKR* au sein de chaque transformant HR. En

effet, la variabilité d'expression de *VviAKR* au sein d'une même construction reste importante.

Le rôle de *VviAKR* n'a donc pas encore été clairement établi à ce jour et reste donc toujours à démontrer.

I. Introduction

L'arôme d'un vin est le résultat d'un mélange complexe de composés volatils dans l'espace de tête d'un verre de vin qui induit une sensation de plaisir au niveau du cerveau (Shepherd 2006). Les arômes sont divisés en trois catégories principales: les arômes primaires, provenant de la baie de raisin et jouant un rôle crucial dans la typicité du vin; arômes secondaires, produits par les levures et les bactéries au cours des fermentations alcooliques et malolactiques; arômes tertiaires issus du vieillissement du vin et de son évolution en bouteille.

Parmi les arômes primaires ou variétaux, la famille des arômes herbacés ou végétaux est importante à considérer en raison de son antagonisme perceptif avec les nuances fruitées des vins rouges (Hein et al. 2009; Robinson et al. 2011). Au sein de cette famille, plusieurs composés volatils contribuent aux nuances végétales (Mozzon et al. 2016), comme les alcools à 6 atomes de carbone (C6) pour les nuances herbacées (Escudero et al. 2007), la 4MSP pour les arômes de buis (Darriet et al. 1995), le 1,8-cinéole pour les arômes d'eucalyptus (Herve et al. 2003) ou les méthoxy-pyrazines (MPs).

Les MPs sont présents à l'état volatil libre dans les baies et s'accumulent pendant la phase de croissance herbacée du fruit (Dunlevy et al. 2010 ; Guillaumie et al. 2013 ; Dunlevy et al. 2013). Les pyrazines (1,4-diazines) sont des composés hétérocycliques contenant de l'azote qui sont assez largement répandus dans la nature, tant dans le règne animal que végétal (Roujou de Boubée et al. 2000). Les seules pyrazines présentes naturellement dans les plantes sont les MPs, associées à des arômes de type végétal. Les MPs les plus abondantes sont l'IPMP, la SBMP et l'IBMP (Figure 1), cette dernière étant considérée comme celle ayant le plus d'impact pour l'arôme du vin.

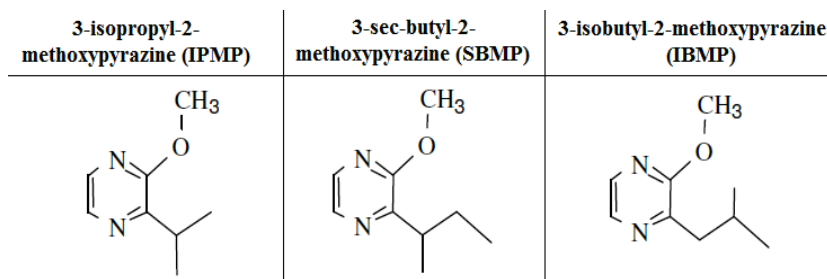


Figure 1: Principales méthoxy-pyrazines présentes au sein de la baie de raisin, du moût et du vin (Sala et al. 2004).

L'IBMP confère des arômes de poivron vert, l'IPMP est associé à des arômes d'asperge et de haricot vert et la SBMP à des arômes de pois et de poivron. L'IBMP n'a été identifié qu'au sein de quelques cultivars tels que CS, SB, Cabernet Franc, Merlot et Carménère (CA) (Sala et al. 2004), considérés comme des cépages produisant beaucoup de MPs. En revanche, l'IBMP l'a rarement été dans les cépages Pinot Noir (PN), Chardonnay et Petit Verdot (PV), qui sont considérés comme des cépages produisant peu de MPs.

Compte tenu de l'importance des MPs en tant qu'arômes variétaux typiques, l'étude du déterminisme génétique et moléculaire de leur accumulation présente un grand intérêt pour la viticulture. La voie de biosynthèse, encore largement hypothétique, des MPs commencerait par l'ajout d'un α -dicarbonyle (sous forme de glyoxal) à un acide aminé ramifié (leucine pour l'IBMP, valine pour l'IPMP et isoleucine pour le SBMP) pour former une 2-hydroxy-3-alkylpyrazine (Figure 2). Ce dernier est ensuite transformé en MP par le biais d'une O-méthylation. Cette réaction implique le transfert du groupe méthyle de la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) au groupe hydroxyle du noyau pyrazine (Hashizume et al. 2001a). La dernière étape de la voie de biosynthèse est maintenant bien connue et l'enzyme O-méthyltransférase (OMT), codée par le gène *VviOMT3*, a été caractérisée chez la vigne (Dunlevy et al. 2013a; Guillaumie et al. 2013). La régulation de cette voie de biosynthèse reste à explorer et sa résolution contribuerait fortement à une meilleure compréhension de la synthèse de l'IBMP.

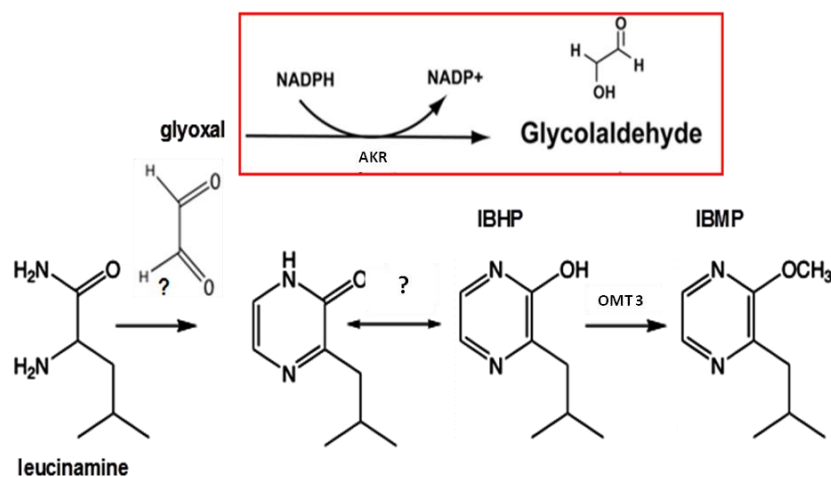


Figure 2 : Voie de biosynthèse potentielle de l'IBMP adaptée de Guillaumie et al. (2013) comprenant l'alkénal 2-réductase. IBHP, 2-hydroxy-3-isobutylpyrazine; IBMP, 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine; AKR, alkénal 2-réductase; OMT, O-méthyltransférase.

En 2013, Guillaumie et al. ont analysé par une approche de génétique quantitative une descendance F1 issue du croisement entre *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon (CS) et *Vitis riparia* cv. Gloire de Montpellier (RGM) (Guillaumie et al. 2013). CS est considéré comme un cépage fort producteur de MP alors que RGM n'en accumule pas de manière significative. L'IBMP a été quantifié dans les feuilles basales de cette population génétique en ségrégation par GC-MS. Une détection de loci à effets quantitatifs (QTL) a été réalisée à l'aide de la carte génétique F1 CS x RGM composée de 206 marqueurs génétiques ordonnés en 19 groupes de liaison (GL).

Cinq QTL ont été identifiés, expliquant 41% de la variabilité totale pour le contenu en IBMP des feuilles de la population F1 CS x RGM. Parmi ces QTLs, trois d'entre eux à savoir les QTLIBMP12, QTLIBMP3 et QTLIBMP5 respectivement associés aux GL12, GL3 et GL5 expliquent individuellement plus de 10% de la variabilité pour ce caractère considéré et sont significatifs non seulement au niveau de leur groupe de liaison respectif mais aussi au niveau du génome complet. Les QTLIBMP12 et QTLIBMP3 ont déjà pu être associés à des gènes candidats impliqués dans la voie de biosynthèse des méthoxypyrazines (Dunlevy et al. 2010; Dunlevy et al. 2013a; Guillaumie et al. 2013).

Concernant le QTLIBMP5, expliquant 10,8% de la variabilité totale et situé sur GL5, 383 gènes ont pu être identifiés dans l'intervalle de ce QTL (Guillaumie et al. 2013). Parmi ces gènes, le gène *VviAKR*, codant potentiellement pour une alkénal 2-réductase (AKR), co-localise avec l'aplomb de ce QTL. En parallèle, une analyse globale du transcriptome de type RNAseq des baies des cépages Carménère et Petit Verdot, cépages les plus contrastés par

rapport au contenu en IBMP, a été effectuée au cours du développement et de la maturation des baies. Cette analyse a permis de distinguer quels gènes sont à la fois i) différentiellement exprimés entre les deux cépages étudiés et entre les stades de prélèvement des baies de raisin et ii) s'ils co-localisent avec l'intervalle de confiance des QTL de teneur en IBMP identifiés. Cette analyse globale du transcriptome suggère que le gène *VviAKR* pourrait être impliqué dans la voie de biosynthèse de l'IBMP. Ce gène présente un profil d'expression opposé à celui de *VviOMT3* au sein de 5 cépages contrastés vis-à-vis de la production d'IBMP au sein de leurs baies. En effet, chez les cépages fort producteurs d'IBMP CA, CS, SB, *VviOMT3* est fortement exprimé au stade "fermeture de grappe" contrairement aux cépages faibles producteurs d'IBMP PN et PV qui ne l'exprime pas. Ce profil d'expression est totalement inversé pour le gène *VviAKR*. Ainsi, *VviAKR* pourrait intervenir dans la régulation d'une étape précoce de la voie de biosynthèse de MP qui modulerait la production de l'IBMP (Figure 2).

Les AKR sont des NAD(P)(H) oxydoréductases solubles dont le but principal est de réduire les aldéhydes et les cétones en alcools primaires et secondaires, respectivement (Jin and Penning 2007). Plus de 150 enzymes divisées en 15 familles différentes appartenant à tous les règnes vivants ont été identifiées (Mindnich et Penning 2009). Les AKR humaines jouent de nombreux rôles dans le métabolisme des stéroïdes, des sucres et d'autres carbonyles, mais de nombreux membres de la superfamille des AKR restent non caractérisés (Kanayama et al. 2014). Les AKR sont, pour la plupart, cytosoliques, actives en tant que monomères et ont une large gamme de substrats. Dans les plantes, les AKR font partie d'une famille appelée AKR4. Plusieurs enzymes ont été identifiées et caractérisées, telles que AKR4C8, AKR4C9, AKR4C10 et AKR4C11 chez *Arabidopsis thaliana* (Simpson et al. 2009), Dbr1 chez *Artemisia annua* (Zhang et al 2009), AKR4C14 chez *Oryza sativa* (Narawongsanont et al. 2012) et PpAKR1 chez *Prunus persica* (Kanayama et al. 2014). Les AKR de plantes sont supposées être impliquées dans diverses réactions métaboliques des plantes, notamment la détoxification réactive des aldéhydes, la biosynthèse des osmolytes, le métabolisme secondaire, le transport membranaire, les réponses de défense vis-à-vis des stress biotiques et abiotiques (Sengupta et al. 2015). Les AKR de plantes réduisent les substrats allant des sucres simples aux aldéhydes potentiellement toxiques. Les AKR de *Medicago sativa* et *Arabidopsis thaliana* utilisent des substrats comprenant des stéroïdes, des sucres, des

cétones et des aldéhydes aliphatiques / aromatiques (Sengupta et al. 2015). *VviAKR* pourrait ainsi utiliser le glyoxal ou un alkénal dérivé de la peroxydation lipidique comme substrat, réduisant ainsi l'accumulation de l'IBMP (Figure 2).

L'objectif du travail décrit dans ce chapitre est la caractérisation fonctionnelle de *VviAKR* (VIT_05s0094g01250). Afin d'étudier les bases génétiques de la biosynthèse de MP dans les baies de raisin, le clonage des séquences alléliques de *VviAKR*, la production et la purification de protéines recombinantes et des dosages enzymatiques pour déterminer le substrat préférentiel de cette enzyme ont été réalisés selon la démarche expérimentale proposée Figure 3.

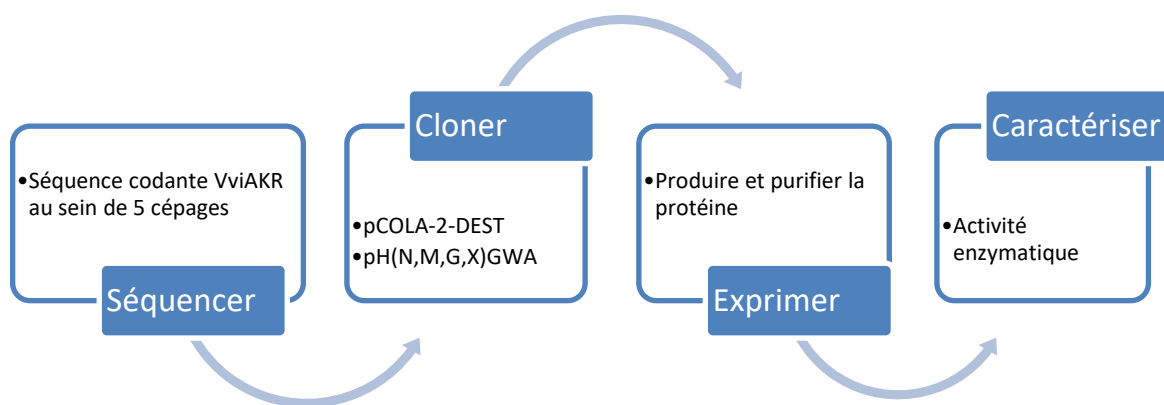


Figure 3 : Démarche expérimentale de la caractérisation enzymatique de *VviAKR*.

De gauche à droite : obtention des séquences des différents isoformes de *VviAKR* à partir de 5 cépages (CA, CS, SB, PN, PV) ; clonage dans un vecteur d'expression bactérien ; production des protéines dans les bactéries *E. coli* et purification à partir des lysats bactériens ; test des activités enzymatiques.

Sur la base du fait que des molécules précurseurs de MP non méthylées et non volatiles sont présentes dans *E. coli* (Guillaumie et al. 2013), une expression de *VviAKR* ainsi qu'une co-expression de *VviOMT3* et *VviAKR* en système hétérologue a été réalisée afin de fournir des informations sur l'implication ou non de AKR dans la voie de biosynthèses des MPs.

En parallèle des deux précédentes approches, nous avons utilisé le système hairy roots (HR) afin de transformer des racines de cépages naturellement plus ou moins fort producteurs de MPs tels que RGM, CS, PN et PV en surexprimant sous promoteur 35S le gène *VviAKR* afin de voir l'impact de la présence ou non de cette protéine en système homologue sur la concentration en MPs.

II. Matériels et méthodes

A) Clonage de l'ADNc pleine longueur de *VviAKR*

La séquence codante pleine longueur de *VviAKR* (VIT_05s0094g01250) a été identifiée à partir de la séquence 8X du génome de la vigne PN40024 (Jaillon 2007). Elle a été amplifiée à partir des ADNc de baies de cinq cépages présentant un contenu en IBMP contrasté, à savoir trois cépages forts producteurs d'IBMP i.e. Carménère (CA), Cabernet sauvignon (CS), Sauvignon blanc (SB) et deux cépages faibles producteurs ou non producteurs d'IBMP i.e Pinot noir (PN) et Petit Verdot (PV).

Les réactions PCR ont été effectuées selon les conditions suivantes : 2µL d'ADNc de baies, 10µL de 5X Phusion® HF buffer, 1µL dNTP (10mM), 2.5µL d'oligonucléotide sens (10µM) (*VviAlkS*, ATGGCCAAGTTAGAAGTGAGCA), 2.5µL d'oligonucléotide antisens (10µM) (*VviAlkAS*, TTATTCATGAGCAACTGCAGCTACT) et 1U de Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) pour un volume final de 50µL. Les ADNc utilisés correspondent au stade phénologique de la baie où le gène *VviAKR* est le plus exprimé selon le cépage considéré. Ainsi, ce stade correspond à la fermeture de grappe pour PN et PV et au stade de la maturité de la baie pour CA, CS et SB. L'amplification PCR a été réalisée selon les recommandations du fournisseur dénaturation initiale 98°C 30s, suivie de 35 cycles de 10 s à 98°C, 30 s à 58°C et 72°C pendant 1min, enfin 3 min d'extension finale à 72°C.

Les fragments amplifiés obtenus ont été purifiés à l'aide du kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up system de Promega en suivant les recommandations du fournisseur. 150 ng d'amplicons purifiés ont ensuite subi une étape de A-tailing (dénaturation initiale 95°C 2min, suivi de 25 min à 70°C en présence de dATP 0,2 mM, de MgCl₂ 2mM, de 0.625 U de Jump Start DNA Polymerase (Sigma) et de son tampon 1X dans 10 µL de volume réactionnel).

Enfin, l'ADNc amplifié pour chaque cépage a été cloné en vecteur pGEM-T Easy (Promega) amplicilline résistant (*amp^R*) (100µg/mL), en utilisant 20ng d'insert pour un ratio de 1 :1 selon les recommandations du fournisseur.

Des bactéries *E. coli* One Shot® TOP10 Electrocomp™ (Invitrogen) ont été utilisées pour les transformations bactériennes effectuées. Pour 45µL de bactéries TOP 10 électrocompétentes, 5 µL de la ligation ou 2 µL de plasmide sont utilisés par transformation dans une cuve à électroporation. Une tension de 1800 volts est appliquée par l'Electroporator 2510 (Eppendorf) pendant environ 3 s, puis les bactéries sont remises en

culture avec 900µL de milieu LB liquide sans antibiotique pendant 1h à 37°C sous agitation. Les bactéries sont étalées sur milieu LB solide avec marqueur de sélection et cultivées à 37°C toute la nuit.

Une vérification de l'intégration de la séquence codante de *VviAKR* par PCR couplée à une électrophorèse est alors réalisée sur les colonies ayant poussé. Afin de procéder au séquençage de *VviAKR*, une minipréparation d'ADN plasmidique a été effectuée à l'aide du kit Miniprep QiAprep Spin (Qiagen). La concentration des plasmides obtenus a été déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop 2000c (Labtech France). La pureté des échantillons est évaluée avec les rapports d'absorbance, A260/A280 et A260/A230. Le séquençage de 5 à 10 clones par cépage a été effectué par la société GATC Biotech. Les séquences nucléiques et protéiques obtenues de *VviAKR* ont été alignées en utilisant ClustalW (Thompson et al. 1984).

Le couple d'oligonucléotides Alkp129A_S_sec (5'-gttcacaaggatccaatgca-3') et Alkp231C_AS_sec (5'-atataatactcgagaggataactg) a été défini pour identifier spécifiquement la présence au sein du génome de la vigne de certains allèles de *VviAKR*. Les réactions PCR associées sont effectuées selon les conditions suivantes : 1µL d'ADNg dilué à 50 ng/µL, 1.5 µL 10X Buffer, 1.2 µL MgCL2 25mM, 0.3µL dNTP 10mM, Mastermix 2x (Promega), 0.3 µL d'oligonucléotide sens (10µM), 0.3 µL d'oligonucléotide antisens (10µM), 0.1 µL Jumpstart™ Taq DNA polymerase pour un volume final de 15µL. L'amplification PCR a été réalisée selon le protocole suivant : dénaturation initiale 95°C 5 min, suivie de 35 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à 62°C et 72°C pendant 30 s, enfin 3 min d'extension finale à 72°C. Un amplicon de 148 pb est attendu.

B) Clonage en système Gateway® (Invitrogen)

La technologie Gateway® (Invitrogen) permet le clonage rapide d'un fragment d'ADN dans un premier vecteur, dit d'entrée (pDONR) qui permettra par la suite le clonage de ce même fragment dans une multitude de vecteurs de destination, ceci par un système de recombinaison au niveau de séquences spécifiques de type att (site specific attachment) (Annexe 2).

1. *VviAKR*

Les allèles de *VviAKR* identifiés lors du séquençage ont été clonés en système Gateway. Une amplification PCR de chaque allèle a été réalisée sur les inserts clonés en vecteur pGEM-T Easy afin d'intégrer les sites att et ceci grâce aux oligonucléotides suivants : attB1VviAlkS2, GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTTCCGCGTGGATCCATGGCCAAGTTAGAAGTGAG et attB2VviAlkAS, GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTATTATTCATGAGCAACTGCAGCTACT. Les amplicons obtenus ont été purifiés à l'aide du kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up system (Promega).

Le clonage en système Gateway® s'est effectué selon les recommandations du manuel technique du fournisseur (Gateway® Technology, 2010). L'étape initiale consiste à amplifier la séquence codante pleine longueur de *VviAKR* tout en lui rajoutant à ses deux extrémités les séquences attB1 et attB2. Ce fragment a ensuite été introduit dans deux vecteurs d'entrée pDONR™207 et pDONR™201 (Invitrogen) présentant une résistance antibiotique différente (gentamicine (gent^R) et kanamycine (kan^R) respectivement). Cela s'effectue par simple recombinaison des séquences attB1 avec attP1 et attB2 avec attP2 respectivement sous l'action d'une BP clonase (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. La recombinaison crée de nouveaux sites d'attachement, attL1 et attL2. Les clones d'entrées obtenus ont été séquencés pour vérifier l'absence de mutations au sein de leurs séquences. La deuxième étape du clonage consiste à transférer le gène *VviAKR* dans le vecteur pCOLA-2-DEST (kan^R, Annexe 3) (Millipore) permettant la production d'une protéine étiquetée avec 6 Histidine et au sein des vecteurs pHGGWA, pHMGWA, pHNGWA et pHXGWA (amp^R) permettant la production d'une protéine de fusion (GST: glutathione S-transferase, MBP: Maltose binding protein, NusA: N-utilizing substance A, TRX: thioredoxin) étiquetée également avec 6 Histidine (Figure 4) (Busso et al. 2005).

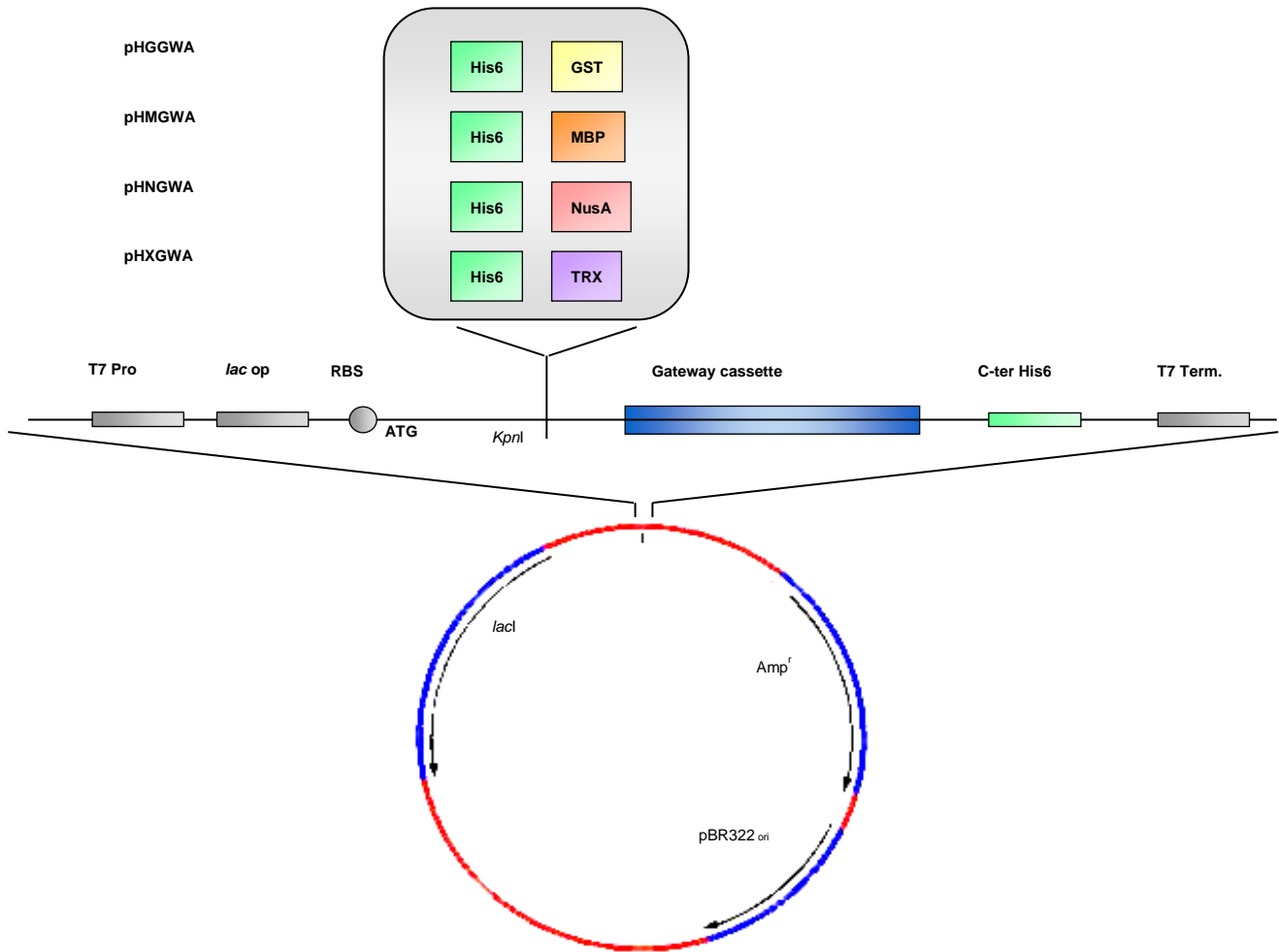


Figure 4: Vecteurs d'expression de type GatewayTM développés par Busso et al. (2005)

Cette étape s'effectue en présence de la LR clonase (Invitrogen) qui permettra la recombinaison entre les sites attL1 et attL2 du pDONR contenant l'insert et les sites attR1 et attR2 du vecteur de destination respectivement. Les sites attB1 et attB2 seront reconstitués dans le vecteur de destination recombiné.

Les plasmides obtenus sont introduit dans les bactéries *E. coli* Artic Express (DE3) (Agilent technology) qui sont adaptées à la production de protéines recombinantes à basse température grâce à la présence d'un plasmide codant pour deux protéines chaperonnes. Pour la transformation par choc thermique d'*E. coli* Arctic Express (DE3), 0.5µL de β-mercaptoéthanol dilué au 1/10 doit être ajouté dans 25µL de bactéries conservées 10min dans la glace. 12ng de plasmide sont mis en présence de 25µL de bactéries thermocompétentes pendant 30min dans de la glace, puis les bactéries sont incubées à 42°C pendant 20s et remise 2min dans la glace. Après ajout de 450µL de milieu SOC liquide sans

antibiotique, les bactéries sont incubées 1h à 37°C sous agitation puis étalées sur milieu solide avec le marqueur de sélection associé. Les bactéries compétentes ainsi obtenues sont conservées à -80°C par la réalisation de stocks glycérolés.

2. Doubles transformants : *VviAKR* et *VviOMT3*

Les bactéries Artic Express (DE3) ont été aussi utilisées afin d'obtenir des doubles transformants *VviAKR* et *VviOMT3* selon le protocole de transformation présenter précédemment. Les vecteurs d'expression utilisés sont pHMGWA pour les allèles de *VviAKR* et pCOLA-2-DEST pour *VviOMT3*. Le gène de l'anthocyanidine synthétase (*VviANS*) a aussi été cloné au sein du vecteur pHMGWA et double transformé avec le gène *VviOMT3*. Il est utilisé comme contrôle négatif.

3. Hairy roots (HR)

La stratégie choisie a consisté à développer des HR de quatre génotypes (RGM, CS, PN et PV) transformées pour surexprimer sous promoteur 35S les allèles du gène *VviAKR* identifiés afin de comparer les quantités de méthoxypyrazines produites en fonction de chaque allèle dans quatre fonds génétiques différents contrastés vis-à-vis de la synthèse de méthoxypyrazines. Pour assurer la surexpression, les allèles de *VviAKR* ont été placés sous le contrôle du promoteur 35S au sein du plasmide pH7WG2D.1 (Figure 5) grâce à la technologie Gateway à partir des vecteurs pDONR 201/*VviAKR* précédemment obtenus et selon le protocole précédemment défini. Le vecteur pH7WG2D.1 présente le second avantage de disposer au sein de sa séquence du gène codant la protéine fluorescente verte (GFP) permettant la visualisation de la transformation effectuée grâce à l'utilisation d'un microscope à fluorescence.

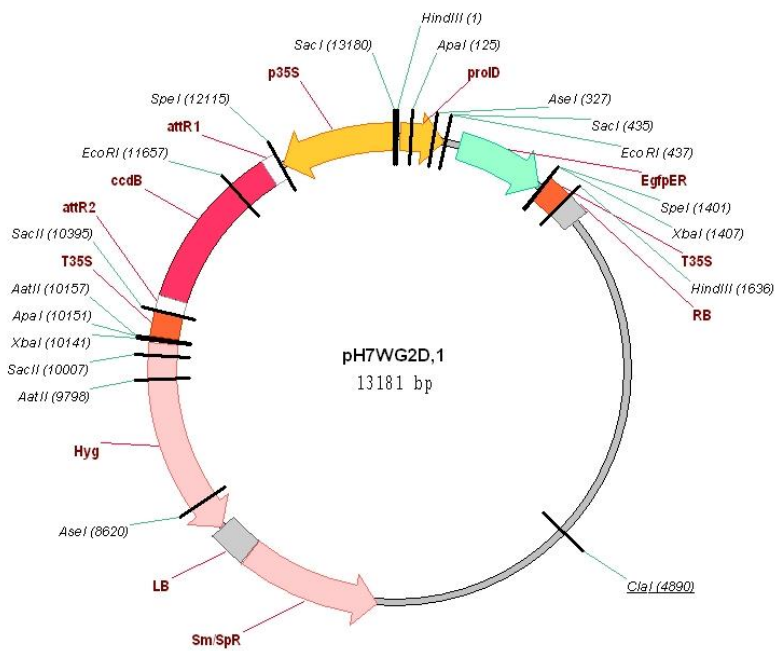


Figure 5 : Carte du plasmide pH7WG2D.1

Par ailleurs, le vecteur Goldenbraïd de destination pDGB3 alpha1, présentant un promoteur de type 35S, a été utilisé sous sa forme vide comme contrôle négatif.

C) Induction de l'Expression des Protéines Recombinantes

1. VviAKR

La culture des bactéries *E.coli* Artic Express (DE3) recombinantes pour chaque plasmide d'expression (pHGGWA, pHMGWA, pHNGWA, pHXGWA ou pCOLA-2-DEST) est réalisée à 37°C au sein du milieu de culture 2x YT (Annexe 4) enrichi avec 1% (v/v) de glycérol et contenant l'antibiotique nécessaire à la sélection selon le protocole défini par (Guillaumie et al. 2013).

Lorsque la culture atteint une densité optique à 600 nm comprise entre 0,6 et 0,7 les bactéries sont placées à 12°C pendant 15 min. L'induction est ensuite réalisée par l'ajout d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) aux concentrations finales de 0,2 ; 0,3 ou 1 mM selon les expériences effectuées. Avant chaque induction, 2 mL de culture sont prélevés et serviront de contrôle de culture *E. coli* non induite. La culture *E. coli* induite est poursuivie sous agitation à 12°C, température optimale de production des protéines recombinantes

solubles. La durée de l'induction varie de 1h à 24h selon les expériences réalisées. Les bactéries sont ensuite centrifugées et les culots conservés à -20°C.

2. Doubles transformant VviAKR et VviOMT3

Les inductions ont été effectuées à faible concentration d'IPTG (0.3mM) à 14°C pendant 24h afin d'éviter la formation de corps d'inclusions. Différents points de prélèvement ont été réalisés à 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h en plus du point de récolte à 24h.

D) Electrophorèse Monodimensionnelle en Condition Dénaturante (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide (ou PAGE) en présence de sodium dodécylsulfate (SDS).

Le gel de séparation contient 10% d'acrylamide/bisacrylamide (excepté pour l'AKR des cépages CA/CS/SB où il en contient 15%), du tampon Tris/HCl à 2,66 M (pH 8,8) et 10% de SDS (v/v). La polymérisation du gel est déclenchée par l'ajout de persulfate d'ammonium (PA) 10% (v/v) et de N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine 4% (v/v) (TEMED). La surface du gel est stabilisée par l'ajout d'éthanol 70%. Lorsque le gel de séparation est polymérisé, le gel de concentration est alors coulé sur celui de séparation. Il est constitué de 4% d'acrylamide/bisacrylamide, de Tris/HCl 8M (pH 6,8) et de SDS à 6.6% (v/v). La polymérisation du gel est également déclenchée par l'ajout de PA 10% et de 12% (v/v) TEMED.

Les protéines (environ 30 µg) sont solubilisées dans le tampon de charge ou tampon Laemmli 4x contenant du Tris/HCl 4M (pH=6,8), 40% de glycérol, 8% de SDS, 2,5% de β-Mercaptoéthanol et 0,1% de bleu de bromophénol. Les échantillons de protéines sont chauffés à 95°C pendant 5 min puis centrifugés (10 min à 13 000g). La séparation des protéines est réalisée dans le tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 14 mM et de SDS 0,1%) sous une tension de 200 volts appliquée pendant 1h.

A la fin de l'électrophorèse, les gels sont colorés au bleu de Coomassie (solution contenant 2,3% d'éthanol, 10% d'acide acétique et 0,5% (p/v) de bleu de Coomassie). La coloration dure 1 h minimum et est réalisée sous agitation. Les gels sont ensuite décolorés par des bains successifs dans une solution contenant 3,4% d'éthanol et 20% d'acide acétique.

E) Immunodétection de l'AKR par Western Blot

Le transfert des protéines du gel SDS-PAGE sur membrane de nitrocellulose (NC) est réalisé en milieu liquide (tampon contenant $3,03\text{g L}^{-1}$ de Tris-base; $14,4\text{g L}^{-1}$ de Glycine) sous une tension de 60 V pendant 20 min. La membrane de NC est saturée pendant 1h dans une solution de PBS/NaCl 0,15 M contenant 3% (p/v) de poudre de lait écrémé. La membrane est ensuite placée en présence d'un anticorps de souris (Eurogentec) dirigé contre l'étiquette de polyhistidine 6(His) des protéines *VviAKR* recombinantes, il est dilué au 1500 fois dans du PBS/NaCl 0,15 M. La membrane est ensuite lavée trois fois dans le tampon PBS contenant 0,5 M de NaCl. L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps de lapin anti-IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline (Abcam). Il est utilisé dilué 10 000 fois dans du TBS 0,15 M NaCl. La membrane est incubée avec l'anticorps secondaire pendant 30 min puis elle est lavée trois fois comme décrit précédemment. La révélation finale est obtenue par incubation de la membrane dans le tampon phosphatase alcaline à pH 9,5 (Tris 100 mM, NaCl 100 mM et MgCl_2 5 mM) en présence des substrats de la phosphatase alcaline, le « nitrobleu tetrazoliumchloride » (NBT) à $18,75\text{ mg mL}^{-1}$ et le « bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate » (BCIP) à $9,4\text{ mg mL}^{-1}$ (ROCHE). La réaction réalisée par la phosphatase alcaline fait apparaître des bandes colorées en rose-violet à l'endroit des protéines d'intérêt. La réaction est alors stoppée par élimination de la solution de révélation remplacée par des bains successifs d'eau. La membrane est ensuite séchée entre deux papiers absorbants et conservée à l'abri de la lumière.

F) Purification des protéines Recombinantes

Les alkénal-2-réductases recombinantes possèdent une étiquette polyhistidine 6(His) qui permet de les purifier par chromatographie d'affinité de type IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography). La purification est réalisée par gravité à l'aide d'une résine Protino® Ni-TED (Macherey-Nagel). C'est une résine de silice préchargée avec des ions nickel Ni^{2+} . Les billes de silice possèdent des chélateurs pentadentate TED (tris-carboxyméthyl ethylene diamine) qui chélatent les ions Ni^{2+} (Figure 6). Le site de coordination restant libre du Ni^{2+} est disponible pour la liaison avec la protéine recombinante via le résidu His de l'étiquette.

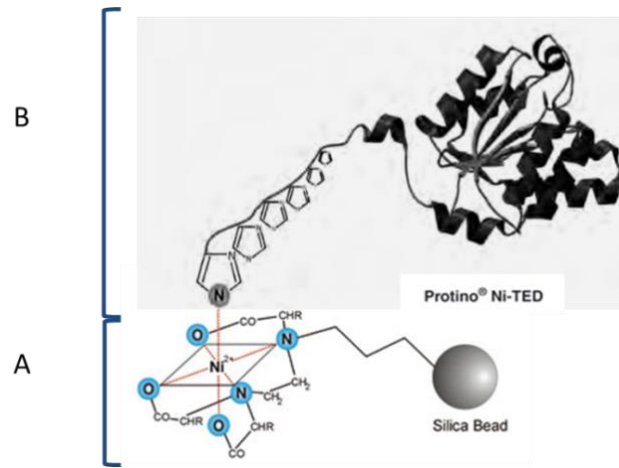


Figure 6 : Liaison de la protéine recombinante étiquetée polyhistidine à la résine Protino® Ni-TED

A : Bille de silice porteuse de TED, chélateur d'ions Ni²⁺. B : Un résidu His de l'étiquette polyhistidine de la protéine recombinante se lie au Ni²⁺. D'après le site <http://www.mnnet.com>.

1. Préparation des extraits de protéines totales de bactéries

La purification des protéines recombinantes AKR est réalisée à l'aide du kit Protino® Ni-TED (Macherey-Nagel) selon les recommandations commerciales (site <http://www.mnnet.com>). Les culots de bactéries, issues de l'induction à l'IPTG de 50 mL de cultures recombinantes ou non, sont resuspendus chacun dans 10 mL de tampon d'extraction dénaturant ou non composition décrite paragraphe III-B-1) suivant. La lyse des parois bactériennes est déclenchée par addition de lysozyme à raison de 1 mg mL⁻¹. L'ensemble est placé à 30°C et agité pendant 30 min. Une étape de lyse cellulaire est alors effectuée en utilisant un appareil de Fast Prep 24 (MP Biochemicals) (6 cycles de 15sec de broyage avec 5 min de pause dans la glace entre chaque cycle afin d'éviter la dénaturation thermique des protéines, à 6.5M/s) permet de poursuivre la lyse des bactéries. Le lysat cellulaire obtenu est ensuite centrifugé pour éliminer les débris et bactéries non lysées (6000g, 15 min, 4°C). A l'issue de la centrifugation, le surnageant placé dans la glace, est filtré sur filtre de 0,45 µm (Merck Millipore). 100µL d'extrait brut filtrés sont alors prélevés avant purification afin de connaître l'efficacité de purification suivante par électrophorèse SDS-PAGE.

2. Etapes de purification par chromatographie d'affinité sur résine Protino® Ni-TED

Le filtrat obtenu (environ 4 mL) correspond à l'extrait de protéines totales. Celui-ci est chargé sur la résine d'affinité Protino® Ni-TED équilibrée au préalable selon le tampon

d'extraction utilisé décrit paragraphe III-B-1). La résine est ensuite lavée avec 6mL de ce même tampon. Les protéines recombinantes sont éluées par 4 mL de tampon phosphate (50mM) – NaCl (300mM) (pH 8) contenant 250 mM d'imidazole. Les éluats sont visualisés en SDS-PAGE pour vérifier la présence des protéines d'intérêt et la qualité de la purification.

G) Dosage des protéines par la méthode de Bradford.

La quantification des protéines extraites des bactéries est déterminée par mesure spectrophotométrique selon la méthode Bradford (Bradford 1976). Une courbe étalon est établie avec l'albumine de sérum de bovin (BSA) pour des concentrations comprises entre 0 et 20 µg/µL. La gamme étalon et les échantillons de protéines sont préparés dans un volume final de 10 µL auxquels est ajouté 90 µL de réactif de Bradford (Sigma). La lecture de l'absorbance est réalisée à 595 nm entre 5 min et 1h après l'addition du réactif.

H) Mesure de l'activité alkénal réductase

L'activité alkénal 2-réductase est mesurée selon la méthode adaptée de Narawongsanont *et al.* (2012) pour les constructions effectuées à l'aide des vecteurs pHNGWA et pHMGWA pour les différentes AKR identifiées. Le méthylglyoxal est testé comme substrat et l'oxydation du co-facteur NADPH₂ est suivi par mesure de son absorbance à 340 nm. Les réactions enzymatiques sont effectuées en microplaque de 96 puits. Trois répétitions techniques sont réalisées par essai. Le milieu réactionnel, de volume final 200 µL, est composé de tampon phosphate (NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7), de méthyl glyoxal à 2 mM, d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) 2 mM, dithiothréitol (DTT) 2 mM et de 50 µg de protéines totales extraites de bactéries recombinantes induites ou non à l'IPTG (Matériel et Méthodes « F »). La réaction enzymatique est déclenchée par l'addition de NADPH₂ à la concentration finale de 0,1 mM. Des contrôles sont réalisés pour vérifier si le NADPH₂ est capable de s'hydrolyser spontanément au cours de la réaction. Les activités AKR sont conduites à 25°C et les mesures d'absorbance à 340 nm sont réalisées toutes les min pendant une période de 30 min à 1h (lecteur de microplaques multimode Synergy HT, Biotek).

Les vitesses initiales de l'AKR sont déterminées sur des temps courts (de 5 à 7 min) et, elles sont exprimées en µM de NADPH₂ oxydés par min. La différence entre les vitesses initiales des protéines induites et des protéines non induites correspond à l'activité de l'AKR exprimée par les bactéries.

I) Hairy roots : Agro-infiltration et repiquage des cals

Le protocole utilisé est celui défini par Torregrosa et al. 2015. Les différents plasmides ont été introduits dans *Agrobacterium rhizogenes* A4 par électroporation. Deux jours avant l'expérimentation, les bactéries sont étalées sur une boîte de MG/L (Garfinkel and Nester 1980) additionné de rifampicine ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) et de Spectinomycine ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Les bactéries sont remises en suspension dans 10mL de milieu MS/2 additionné de 25 μL d'acétosyringone 100mM, jusqu'à obtention d'une DO_{550} de 0.3 ($\approx 10^6 \text{ cfu mL}^{-1}$). L'inoculation des plantes est réalisée sur des plantes *in vitro* âgées de plus de 3 mois. L'apex et les deux premières feuilles sont retirés. Les bactéries sont mises au contact de la plante en écrasant légèrement les parties blessées avec des pinces trempées dans la solution bactérienne. Les plantes alors sont placées en chambre de culture à une température de 22°C sous 16h de jour et 8h de nuit. Au bout de 3 semaines, l'apparition de cals est visible (Figure 7a).

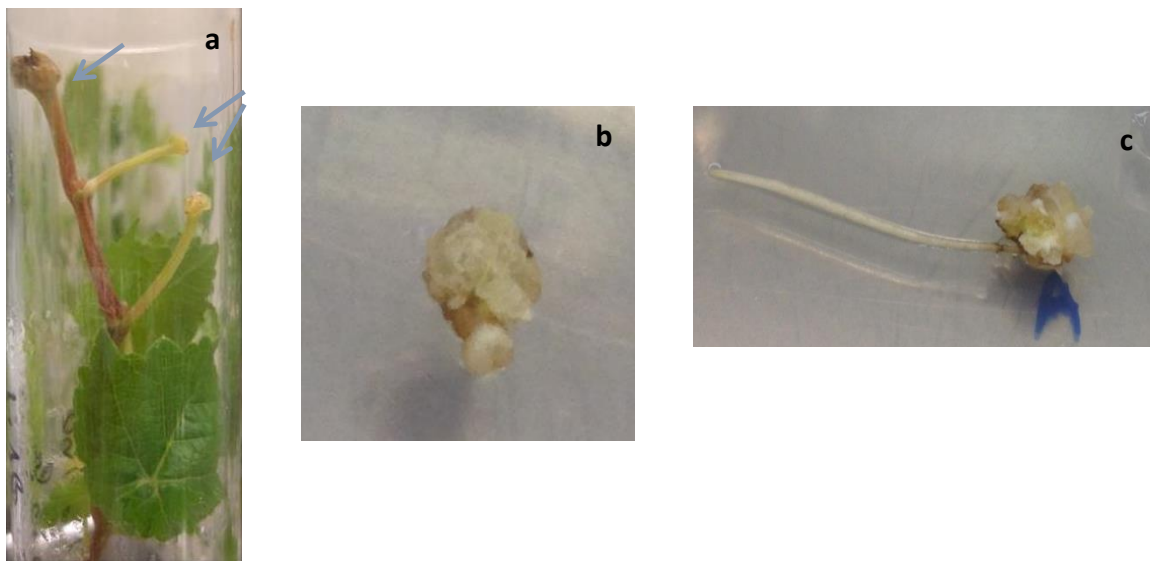
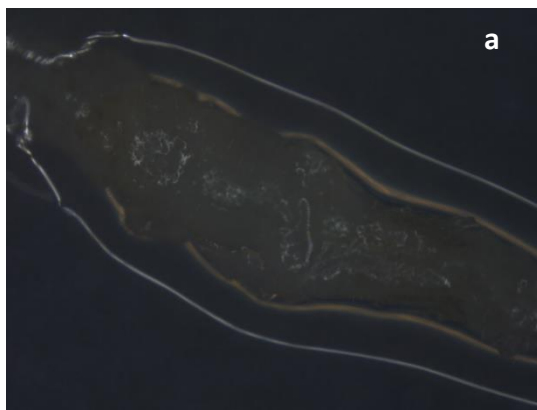


Figure 7 : Développement des cals et hairy roots, (a) cals obtenus 2 semaines après agro-infiltration, (b) cal repiqué sur milieu, (c) hairy root émergent du cal.

Lorsque la taille des cals dépasse 5mm, ils sont repiqués sur le milieu LG0 (Annexe 5) additionné de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de timentin et $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de céfotaxime pour poursuivre leur développement (Figure 7b). Environ 2 semaines après repiquage, les premières racines émergent des cals (Figure 7c). Lorsqu'elles atteignent 1cm, elles peuvent être séparées du cal et repiquées sur milieu LG0.

J) Hairy roots : Vérification de l'intégration du plasmide et du transgène

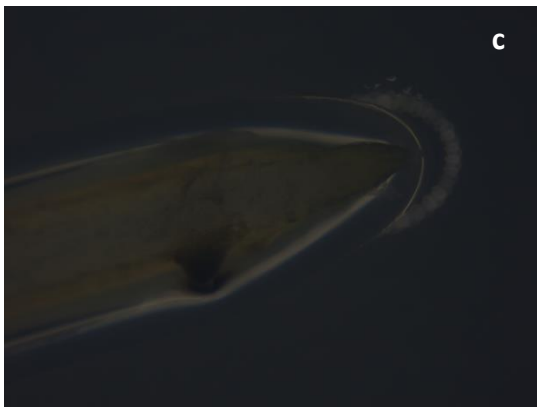
Afin de s'assurer de la transformation des racines par le plasmide pH7WG2D.1, celles-ci ont été observées au microscope Zeiss Axiozoom (x19.5) avec le filtre GFP afin de s'assurer de la transformation des racines par ce vecteur ($\lambda_{\text{GFP}} \text{ excitation } 460-488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{GFP}} \text{ émission } 496\text{nm}$). De la même manière, l'observation microscopique des racines témoins provenant de la transformation avec le vecteur vide pDGB3 alpha 1 a été réalisée dans les mêmes conditions afin de vérifier l'absence de signal de fluorescence.



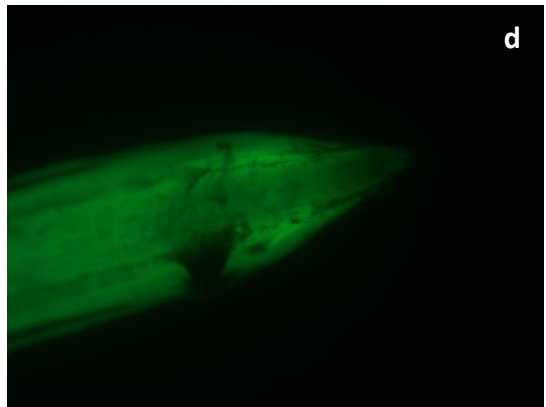
Hairy root RGM x Plasmide vide



Hairy root RGM x Plasmide vide, filtre GFP



Hairy root RGM x allèle de VviAK



Hairy root RGM x allèle de VviAKR, filtre GFP

Figure 8 : Observation d'hairy root au microscope Zeiss Axiozoom (x19.5).

(a) hairy root RGM transformée avec le vecteur vide pDGB3 alpha 1, (b) hairy root RGM transformée avec le vecteur vide pDGB3 alpha 1 observée avec le filtre GFP. (c) hairy root RGM transformée avec le vecteur pH7WG2D.1 contenant un allèle de VviAKR, (d) hairy root RGM transformée le vecteur pH7WG2D.1 contenant un allèle de VviAKR visualisée avec le filtre GF.

Les HR dont la transformation génétique a été validée par le vecteur pH7WG2D.1 sont ensuite multipliées sur milieu LG0 (Figure 27).



Figure 9 : Hairy root en cours de multiplication

Une validation de la présence du transgène d'intérêt *VviAKR* sur l'ensemble des transformées a été réalisée. Environ 80 mg de matière fraîche de la racine est prélevée pour en extraire l'ADN génomique selon le protocole d'extraction au CTAB adapté de (Lodhi et al. 1994) en utilisant du PVPP au lieu du PVP lors de la préparation du tampon d'extraction.

Une validation de la présence du transgène *VviAKR* a été réalisée en utilisant les oligonucléotides p35S (TCGGATTCCATTGCCAGCTAT) et *VviAlk* (GGTTCCTGGCTCAACTCTAGG) afin de mettre en évidence la présence conjointe du transgène et du vecteur pH7WG2D.1. Les réactions PCR ont été effectuées selon les conditions suivantes : 1µL d'ADNg dilué à 50 ng/µL, 5 µL Mastermix 2x (Promega), 0.25 µL d'oligonucléotide sens (10µM), 0.25 µL d'oligonucléotide antisens (10µM) pour un volume final de 10µL. L'amplification PCR a été réalisée selon le protocole suivant : dénaturation initiale 95°C 3 min, suivie de 30 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à 60°C et 72°C pendant 30 s, enfin 5 min d'extension finale à 72°C. Un amplicon de 544 pb est obtenu en cas de présence du transgène.

K) Extraction d'ARN totaux et analyse de l'expression du transgène *VviAKR*

Les ARN totaux des racines transformées ont été isolés selon le protocole défini par (Reid et al. 2006) à partir de 70 mg de racines broyées. Les traces d'ADNg ont été éliminées par un traitement à la DNase I en utilisant le kit Ambion TURBO DNA-free DNase (Life Technologies) selon le protocole du fournisseur. Les ARN totaux ont été quantifiés à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) et l'intégrité des ARN totaux a été

vérifiée sur gel d'agarose 1.8%. La synthèse de ADNc a été réalisée à partir de 0.5 µg d'ARN totaux qui ont été reverse transcrits à l'aide d'amorces oligodT dans un volume de réactionnel de 20 µL en présence de la transcriptase inverse SuperScript III (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur.

Une quantification relative des transcrits des gènes *VviAKR* et *VviOMT3* a été réalisée par PCR quantitative en temps réel à l'aide du thermocycler CFX96 Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad). Les réactions PCR ont été effectuées selon les conditions suivantes : 5 µL de 10 µL de iQSYBRGreen Supermix (Applied Biosystems), 0.2µM de chaque amorce, et 2 µL d'ADNc dilué dans un volume réactionnel de 10µL. Des contrôles négatifs sont inclus dans chaque expérimentation. L'amplification PCR a été réalisée selon le protocole suivant : dénaturation initiale 95°C 3 min, suivie de 40 cycles de 10 s à 95°C, et de 15 s à 60°C. L'amplification PCR est suivie par une analyse de courbe de fusion pour vérifier la spécificité des amorces au sein de chaque réaction. Les efficacités d'amplication ont été définies à l'aide de dilutions en série d'ADNc et l'expression normalisée de chaque gène a été calculée en utilisant le logiciel Bio-Rad CFX Manager software. Les gènes *VviGAPDH* et *VviActin* ont été utilisés pour la normalization des données d'expression en comparant le seuil du cycle du gène candidat à celui des gènes standard. L'ensemble des expérimentations ont été effectuées avec deux réplicats techniques. Les amorces utilisées sont les suivantes : *VviAKR* (S 5'-CTACTGCCTTACATCAGAGA-3' et AS 5'-TGCTTGACATTCTTCATTC-3'), *VviOMT3* (*VIT_03s0038g03090*; S 5'-ATGATGGCTCATACTACTAC-3' et AS 5'-CCTAATTCGTGTCCTAATG-3'), *VviGAPDH* (*VIT_17s0000g10430*; S 5'-TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA-3' et AS 5'-CCACAGACTTCATCGGTGACA3') et *VviActin* (*VIT_04s0044g00580*; S 5'-CTTGCATCCCTCAGCACCTT-3' et AS 5'-TCCTGTGGACAATGGATGGA-3').

L) Dosage des méthoxyypyrazines par GC-MS

MPs ont été quantifiés sur les HR par un dosage de dilution d'isotopes stables utilisant une microextraction en phase solide dans l'espace de tête couplée à un chromatographe en phase gazeuse et à un spectromètre de masse (SIDA-SPME-GC-MS) selon Helwi et al. (2015). Un aliquot de 200 mg de HR ont été dissous dans 6 ml d'eau déionisée dans des flacons marrons de 20 ml dédiés à la SPME avec 4 g de NaCl.

Un étalon interne, $^2\text{H}_3\text{-IBMP}$, a également été ajouté pour atteindre une concentration finale de 100 ng L⁻¹. Les échantillons ont été soumis à une agitation (500 tr / min pendant 5 s, arrêt pendant 2 s), suivie de 5 min à 50°C, puis de l'extraction avec la fibre de SPME pendant 40 min à 50 °C. Une fibre divinylbenzène / carboxène / polydiméthylsiloxane (DVB / CAR / PDMS d'épaisseur 50/30 µm, calibre 24, Supelco Bellefonte, PA, USA) a été insérée et le flacon est agité à 500 tr min⁻¹ pendant 40 min à 50°C. L'injection SPME a ensuite été réalisée en mode "splitless" pendant 10 minutes avec une température de désorption de 240°C.

Comme décrit par Helwi et al. (2015), une analyse GC-MS automatisée a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse 6890 N (Agilent Technologies) équipé d'un échantillonneur automatique Combi PAL (CTC Analytics). La GC a été couplé à un détecteur sélectif de masse HP 5973N (Agilent Technologies) fonctionnant en mode impact électronique à 70 eV. Les analyses ont été effectuées sur une colonne capillaire Carbowax 20 M (BP20, 50 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 µm, Scientific Glass Engineering).

L'hélium 6.0 (LINDE) a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 0,9 mL min⁻¹. Le programme de température était le suivant: maintien initial pendant 5 min à 45°C, suivi d'une augmentation de 3°C min⁻¹ à 140°C, puis d'une rampe de 30°C min⁻¹ à 240°C et enfin maintien durant 10 min. Le port d'injection était à 240°C.

Au cours de l'élution des MPs, la GC-MS a été commutée en mode "single-ion monitoring" et réglée pour mesurer les valeurs m/z des ions 95, 127 et 154 pour l' $^2\text{H}_3\text{-IBMP}$, des ions 94, 124 et 151 pour l'IBMP, des ions 124, 137, 152 pour l'IPMP et des ions 124, 138, 151 pour la SBMP (les ions de quantification sont soulignés). Le traitement des données a été effectué à l'aide du logiciel MSD Chemstation (5973n Data Analysis, Agilent Technologies). Les résultats ont été rapportés par poids de ng par kg de poids frais.

La même analyse a été réalisée sur baies entières des 30 cépages récoltés au stade fermeture de la grappe au cours de l'année de croissance 2015 sur le dispositif VITADAPT (INRA Villenave d'Ornon). Un aliquot de 1g en poids frais de poudre de baies congelées a été utilisé pour ces analyses.

III. Résultats

A) Identification des variants alléliques de *VviAKR*

Le gène *VviAKR* (VIT_05s0094g01250) a été identifié à partir du génome PN40024 8X de la vigne. Ce gène est positionné sur le chromosome 5 et est constitué de 4 introns et de 5 exons dont le plus long est de 376pb. La séquence codante de ce gène a une longueur de 1035pb et code pour une protéine potentielle de 344 aa.

Nous avons choisi de cloner les différents allèles de ce gène au sein de 5 cépages contrastés vis-à-vis de la présence d'IBMP dans leurs baies de raisin à savoir CA, CS, SB, PN et PV.

Les résultats de la PCR haute-fidélité effectuée sont présentés Figure 10. Nous observons un profil d'amplification se situant entre 800 et 1500pb, selon les cépages étudiés, qui diffère du profil attendu de 1035pb prédit à partir du génome de référence. Une différence entre les cépages forts et faibles producteurs d'IBMP est visible lors de la migration électrophorétique. En effet, la présence d'une seule bande d'amplicons d'environ 1500pb pour les cépages forts producteurs d'IBMP (CA, CS et SB) a pu être notée contrairement aux cépages faibles producteurs d'IBMP (PN et PV) où plusieurs bandes d'amplicons sont visibles (Figure 10). Cela indique la présence potentielle de plusieurs formes alléliques du gène *VviAKR* chez les cépages PN et PV.

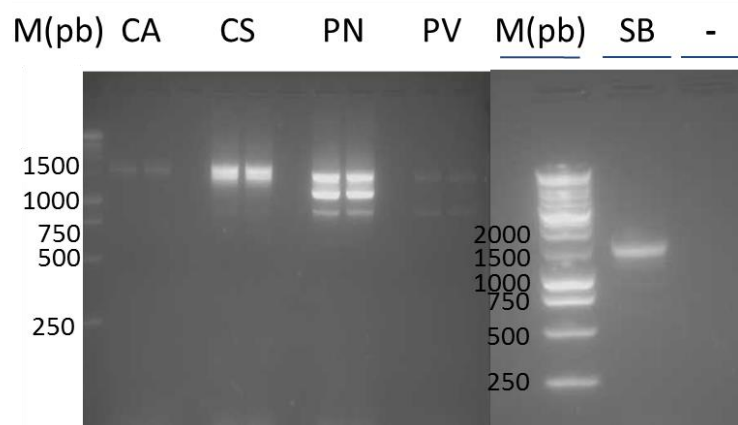


Figure 10: Migration électrophorétique après amplification PCR d'ADNc pleine longueur de *VviAKR*. Carménère (CA); Cabernet Sauvignon (CS); Pinot Noir (PN); Petit Verdot (PV); Sauvignon Blanc (SB); Marqueur (M) 1kb DNA ladder (Promega); témoin négatif (-). Dépôt de 5µL d'échantillon et 2µL de marqueur; gel 1.8% d'agarose

Plusieurs clones ont été séquencés (entre 5 et 10) pour chaque cépage afin d'identifier les variants alléliques et définir si ce gène est à l'état homozygote ou hétérozygote.

Les résultats du séquençage ont montré que les cépages forts producteurs d'IBMP c'est-à-dire CA, CS et SB sont hétérozygotes pour ce gène. L'ensemble des allèles identifiés pour ces trois cépages présente une insertion d'un nucléotide (Thymine en position 129) dans l'exon 1 conduisant à un décalage du cadre de lecture (Figure 11). De plus, une mutation (Thymine au lieu d'une Cytosine en position 231) dans le site d'épissage 5' de l'intron 1 induit la présence de cet intron au sein de la séquence codante de *VviAKR* ce qui implique l'existence d'un codon stop précoce au sein de la séquence protéique putative *VviAKR* (Figure 11).

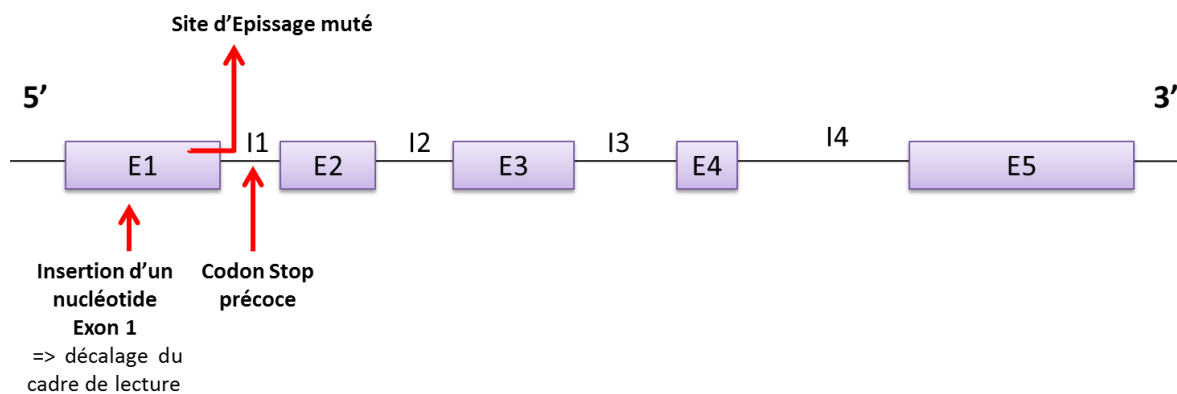


Figure 11 : Structure des allèles du gène *VviAKR* présents chez CA, CS, SB. Exon (E); Intron (----)

L'isoforme protéique ainsi obtenue dispose de seulement 100 acides aminés au lieu des 344 prédits pour la séquence de référence. Compte tenu du décalage du cadre de lecture au sein de l'exon 1, seuls 43 acides aminés sont identiques aux 344 acides aminés de la séquence du génome PN40024. Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse que cette protéine potentielle présente une fonction drastiquement différente de celle prédite suite à l'annotation du génome de référence de la vigne PN40024 8X. Cette protéine ne serait plus fonctionnelle due à l'absence du site actif de l'enzyme.

Les deux cépages faibles producteurs d'IBMP à savoir PN et PV sont quant à eux homozygotes pour *VviAKR*. Concernant PN, la séquence codante obtenue à l'issue du séquençage est de 1035pb. Elle est identique à la séquence du génome de référence de la vigne PN40024 8X et code pour une protéine en $(\alpha, \beta)^8$ de 344 acides aminés. Le génotype PN40024 ayant été utilisé pour le séquençage du génome de la vigne est homozygote à 93%. Il est issu d'une série d'autofécondations successives réalisées à partir d'un clone de Pinot noir (PN).

Concernant PV, 6 acides nucléiques associés aux exons 4 et 5 sont différents de la séquence PN de référence induisant 5 mutations ponctuelles de la séquence protéique. De plus, la séquence codante obtenue est plus courte car l'exon 2 est absent ce qui pourrait entraîner une modification fonctionnelle de la protéine la rendant peut-être plus active. En effet, sur les 5 cépages étudiés, PV est le cépage accumulant le moins voire pas du tout de MPs.

Les différents allèles du gène *VviAKR* identifiés lors du séquençage montrent non seulement des mutations ponctuelles en comparaison avec la séquence de référence PN40024 mais aussi de l'épissage alternatif pouvant déjà être suspecté lors de l'amplification PCR présentée Figure 11. Plusieurs membres de la famille des AKR ont aussi montré lors de leurs caractérisations fonctionnelles de l'épissage alternatif (Barski et al. 2013; Mindnich et Penning 2009). L'épissage alternatif induit toujours une forme ARNm majoritairement exprimée pour un génotype donné, pour un organe donné ou pour un stade de développement donné (Reddy et al. 2013).

Le gène *VviAKR* présente de l'épissage alternatif non seulement au niveau de l'intron 1 mais aussi au niveau de l'intron 2 ce qui implique pour le cépage PV une forme allélique majoritaire de 801pb ne possédant pas l'exon 2 (Annexe 6). Cette forme allélique est à l'origine d'une protéine de seulement 266 acides aminés (Figure 12). Concernant CA/CS/SB, à l'inverse de PV et de la forme allélique majoritaire de PN, les introns 1 et 2 se retrouvent partiellement présents au sein de la séquence codante ARNm de 1446pb.

Pour l'ensemble de nos cépages nous avons donc sélectionné la forme majoritaire pour le clonage en système Gateway. Trois séquences ont ainsi été sélectionnées et induisent la production d'une protéine de 100, 344, et 266 acides aminés associées respectivement aux cépages CA/CS/SB, PN, et PV.

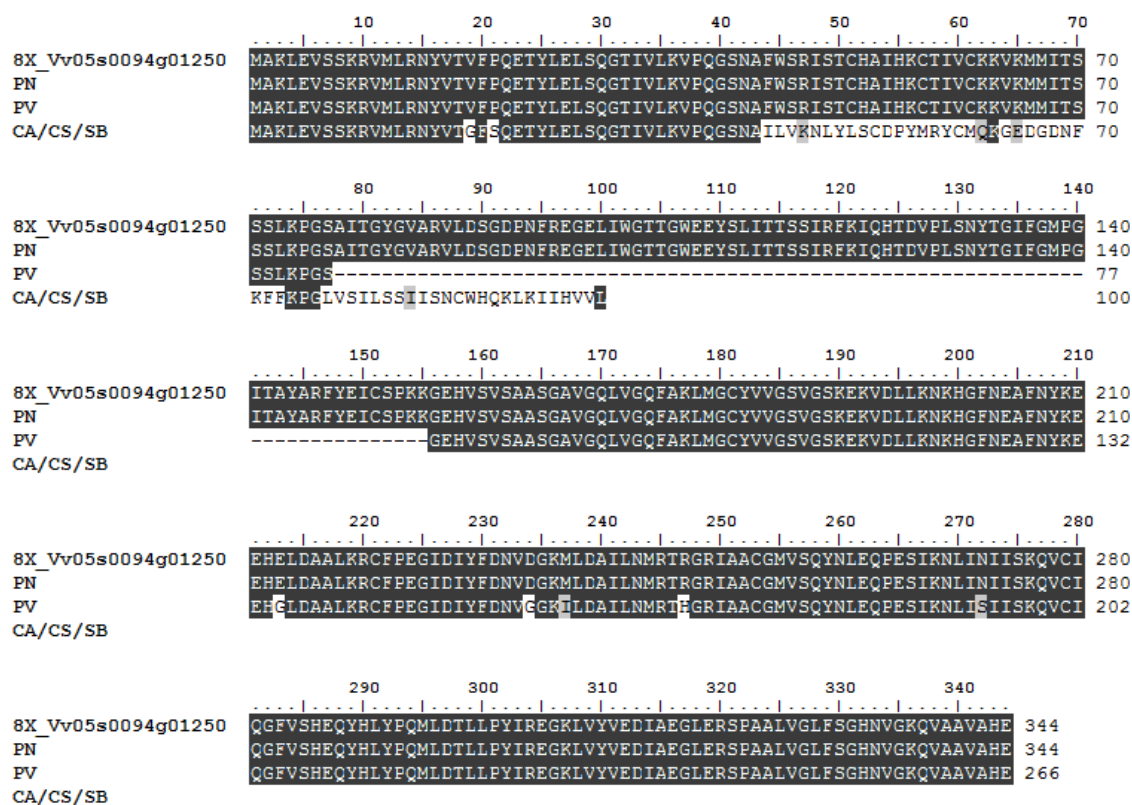


Figure 12 : Alignement multiple des protéines VviAKR prédites de CA/CS/SB, PN et PV. La fonction ClustalW du logiciel BioEdit a été utilisée.

Comme décrit précédemment, une grande différence de séquence du gène *VviAKR* a pu être observée entre les cépages forts (CA, CS, SB) et faibles producteurs (PN, PV) d'IBMP (Annexe 6). Ces modifications codent pour des protéines de fonctions biologiques potentiellement différentes ce qui pourrait être un facteur expliquant la différence de contenu en IBMP au sein de ces cépages.

La présence des allèles fonctionnels PN et PV au sein du génome d'autres cépages a été confirmé par l'utilisation du couple d'amorces Alkp129A_S_sec et Alkp231C_AS_sec, amorces permettant de mettre en évidence l'absence d'insertion d'un nucléotide en position 129 et l'absence de mutation dans le site d'épissage 5' de l'intron 1 en position 231 rencontrées pour l'allèle CA/CS/SB de *VviAKR*. Ce marqueur PCR a été utilisé pour identifier la présence des allèles PN ou PV au sein du génome de 30 cépages. Les résultats montrent que ces deux allèles ne sont pas présents au sein des génomes des cépages CA, Cabernet franc, CS, Colombard, Marselan, Merlot, Rkatsiteli, Sangiovese, Saperavi, SB et Sémillon. Un dosage de MPs des mêmes 30 cépages a été effectué sur des baies entières prélevées au stade fermeture de la grappe ainsi qu'un suivi d'expression des gènes *VviAKR* et *VviOMT3*.

Les résultats montrent que beaucoup de MPs et plus particulièrement d'IBMP (Figure 13) s'accumulent au sein des baies des cépages CA, Cabernet franc, CS, Marselan, Merlot, SB et Sémillon qui ne présentent pas l'allèle PN ou PV de *VviAKR* au sein de leur génome. Seul le cépage Castets présente à la fois une accumulation importante d'IBMP au sein de ses baies et l'allèle PN ou PV de *VviAKR* au sein de son génome.

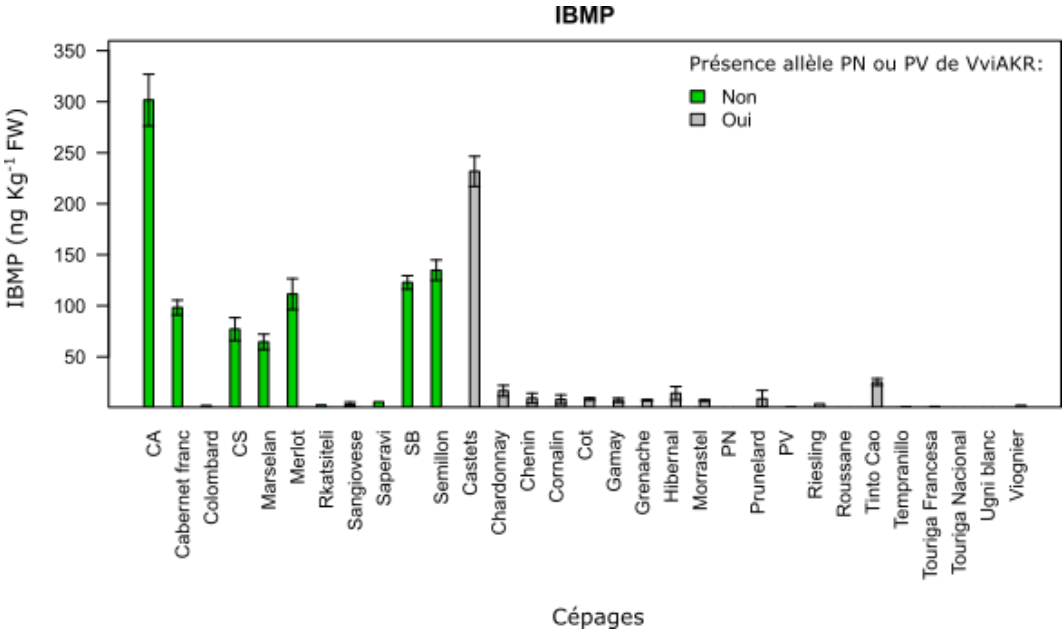


Figure 13 : Profils d'accumulation de l'IBMP au sein de baies récoltées au stade fermeture de la grappe de différents cépages possédant ou non l'allèle AKR de PN et PV.

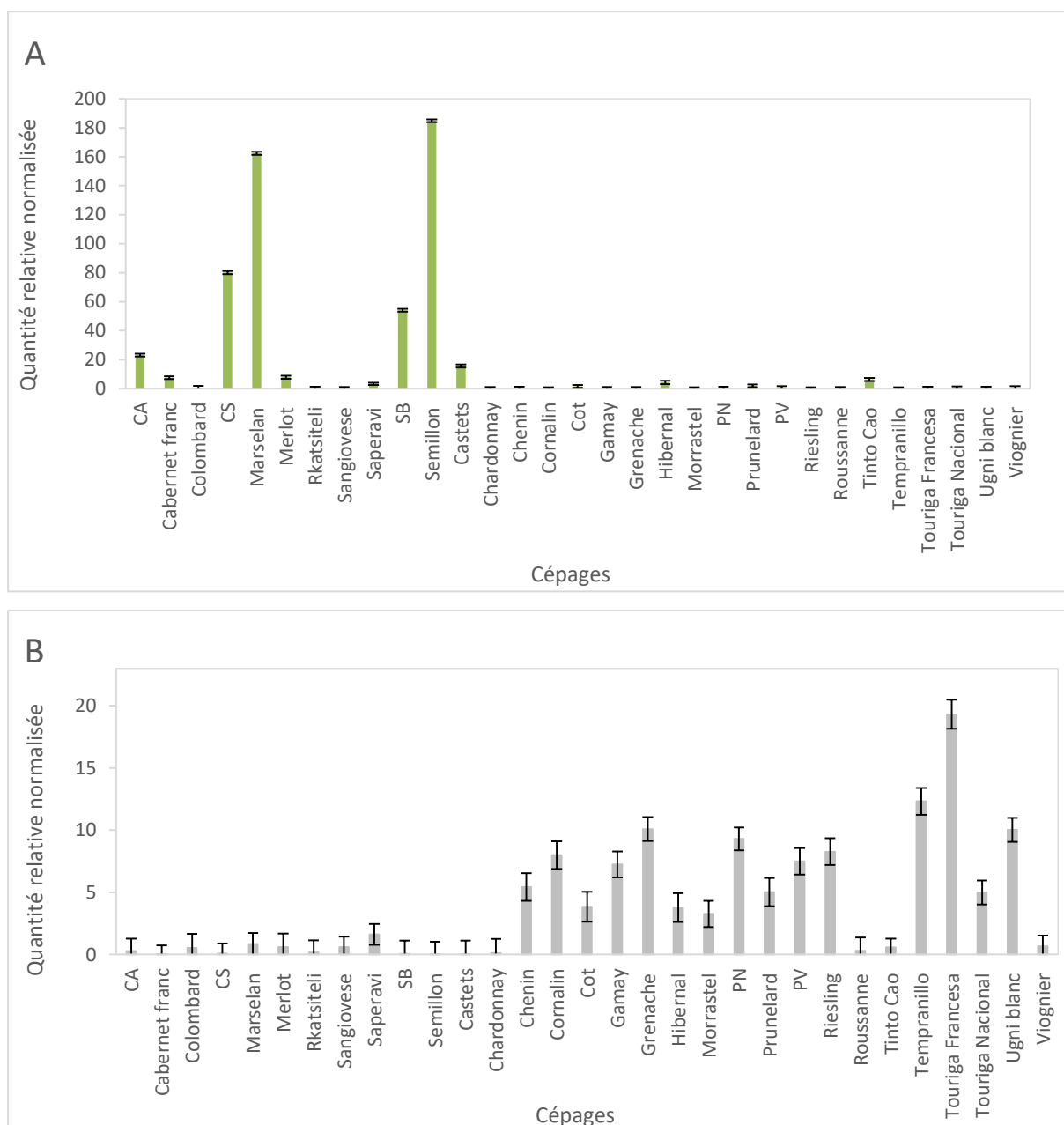


Figure 14 : Profils d'expression en quantité normalisée des gènes (A) *VviOMT3* et (B) *VviAKR* au sein de baies de plusieurs cépages récoltées au stade fermeture de la grappe.

Les données d'expression montrent qu'au même stade le gène *VviOMT3* est fortement exprimé au sein des 8 cépages forts producteurs de MPs à savoir CA, Cabernet franc, CS, Marselan, Merlot, SB, Sémillon et Castets (Figure 14A) et que le gène *VviAKR* ne montre qu'une faible expression en comparaison des autres cépages faibles producteurs de MPs (Figure 14B). Concernant les cépages Cabernet franc, Sémillon et Castets une absence totale d'expression de *VviAKR* a pu être notée.

Une analyse phylogénétique entre les différents allèles de *VviAKR* et les autres AKR de plantes publiées a été réalisée (Figure 33) et montre bien la spécificité de séquence de *VviAKR* par rapport aux autres AKR déjà identifiés. L'AKR la plus proche est *VrALR* qui peut être considérée comme un sous-groupe des AKR de vigne identifiées dans notre étude.

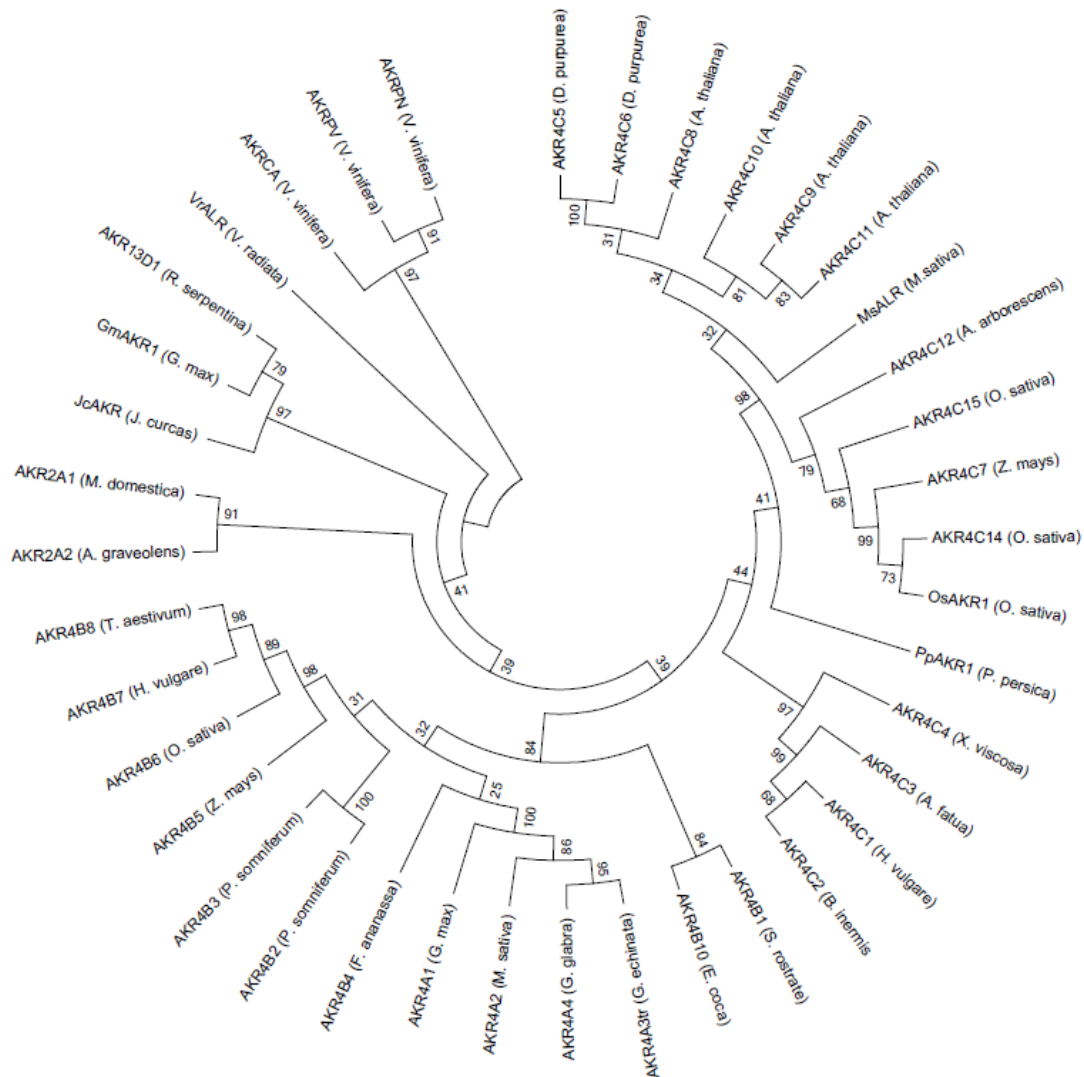


Figure 15 : Analyse phylogénétique : *VviAKRCA*, *VviAKRPN*, *VviAKRPV* et leurs relations avec les autres AKRs de plantes publiées.

Le logiciel MEGA6 a été utilisé pour la construction de l'arbre en utilisant la méthode « maximum likelihood » et le programme MUSCLE comme recommandé par Hall 2013. Le modèle LG+G utilisé a été déterminé par MEGA6 comme étant le plus pertinent. Puis le pourcentage de confiance a été calculé avec la méthode boot strap effectuant 500 réplicats, les résultats de ces calculs sont représentés sur les branches de l'arbre en pourcentage. Les numéros d'accèsion de *JcAKR*, *PpAKR1* et *VrALR* sont KU513391, AB183148 et AAD53967.1 respectivement, alors que les numéros d'accèsions des autres AKRs de plantes utilisés dans la construction de l'arbre phylogénétique proviennent du site www.med.upenn.edu/akr.

B) Production des Protéines Recombinantes par *E. coli* et optimisation

Les allèles CA/CS/SB, PN et PV obtenus pour *VviAKR* ont été introduit dans les bactéries *E. coli* Artic Express (DE3) (Agilent) qui sont adaptées à la production de protéines recombinantes à basse température grâce à la présence d'un plasmide codant pour deux protéines chaperonnes réduisant ainsi la présence de corps d'inclusions.

L'étape d'expression de la protéine est une étape complexe qui a nécessité plusieurs mises au point concernant le choix des bactéries d'expression *E. Coli* ArcticExpress (DE3) permettant de réduire la production de corps d'inclusion qui en trop forte quantité empêchent l'extraction des protéines AKR. Le vecteur d'expression à utiliser (pCOLA-2-DEST, pHMGWA, pHNGWA, pHGGWA ou pHXGWA), le pHMGWA (permettant l'expression de *VviAKR* en fusion avec la *Maltose Binding Protein* ou *MBP*) s'est révélé le plus adéquat. Ainsi que la concentration optimale d'IPTG (molécule permettant d'induire la production de la protéine par la bactérie) à utiliser, fixée à 1 mM.

L'identité de MBP-AKR purifié provenant des trois cultivars a été vérifiée par Western Blot en utilisant des anticorps spécifiques produits contre le marqueur 6-His (Figure 16). Le Western blot a révélé des protéines avec les mêmes poids moléculaires que ceux précédemment observés en SDS-PAGE. De plus, ces protéines n'ont pas été détectées dans les extraits cellulaires non induits (Ni). L'identité de MBP-AKR a été confirmée pour les trois cultivars dans les échantillons induits et dans les premiers éluats de purification.

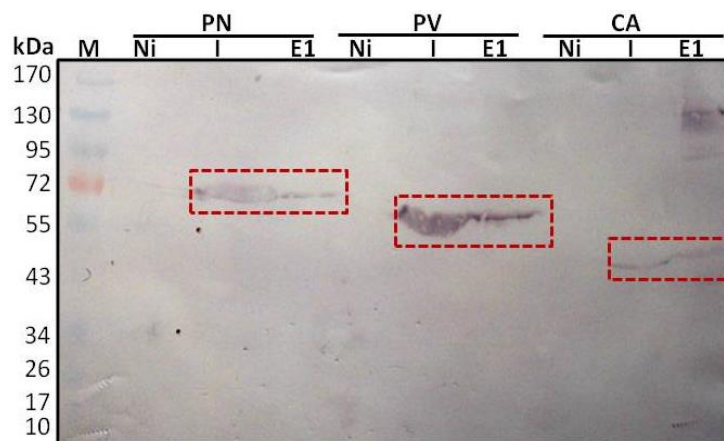


Figure 16 : Immunodétection par Western blot des différentes AKRs dans les extraits protéiques d'*E. coli* recombinantes pour AKR-MBP.

Les protéines totales sont extraites à partir des cultures *E. coli* recombinantes pour AKR-MBP (pHMGWA), induites (I) ou non à l'IPTG (Ni). Elles sont ensuite séparées par SDS-PAGE puis transférées sur membrane de nitrocellulose. L'immunodétection de l'AKR-MBP est réalisée avec l'anticorps primaire dilué au 1500^{ème} et dirigé contre l'étiquette polyhistidine. L'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline est utilisé au 1/10000^{ème}. La révélation est réalisée avec les substrats, nitroblue tetrazoliumchloride et bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate. Les AKR-MBP des différents cépages testés sont celles de Pinot noir (PN), Petit verdot (PV) et Carménère (CA).

Une optimisation de l'induction de la production des différentes protéines *VviAKR* a été réalisée, notamment en optimisant le milieu de culture des bactéries. En effet, le milieu de culture En Presso[®] de Sigma Aldrich plus riche et au pH plus finement contrôlé permet la production de protéines de fusion en quantité suffisante pour effectuer une purification. Malheureusement ce produit n'est plus commercialisé depuis Février 2017. Une nouvelle adaptation du protocole de production des protéines recombinantes a donc été effectué grâce à l'utilisation du kit « Media Optimization Kit » de AthenaES[®].

En effet le milieu « Hyper » s'est montré le plus efficace dans l'induction des protéines AKR à 12°C pendant 24h (données non montrées).

Enfin, concernant la caractérisation fonctionnelle de *VviAKR*, l'optimisation du protocole de purification de l'enzyme recombinante n'a pas permis d'obtenir une quantité de protéine suffisante pour effectuer des tests enzymatiques.

1. Tampon d'extraction

Quatre différents tampons d'extraction ont été testés afin d'optimiser l'extractibilité de la protéine : tampon Hépès, tampon Lew (50mM NaH₂PO₄ + 300mM NaCl à pH=8), tampon 3 constitué de 50mM NaH₂PO₄ + 300mM NaCl + CHAPS 2% + 5mM DTT + EDTA 3mM à pH=8, tampon 4 constitué de Tris pH=8 50mM + Igepal 1% + SDS 0.1% + Sodium deoxycholate 0.5% + NaCl 150mM. L'optimum identifié est le tampon Lew et a été conservé pour la suite de l'analyse.

2. Tampon de lavage

Des tests de tampons de lavage ont aussi été effectués afin d'obtenir des éluats les plus purs possible.

En condition native, différents tampons de lavage ont été testé :

- 50mM NaH₂PO₄ + 300mM NaCl à pH=8
- 50mM KH₂PO₄ + 300mM NaCl à pH=8
- 50mM KH₂PO₄ + 500mM NaCl à pH=8 couplé à 20mM Hépès pH=7 + 10mM MgCl₂ + 5mM ATP + 500mM KCl

L'optimum obtenu étant le dernier tampon testé, cependant la protéine chaperonne est toujours retrouvée dans les éluats aux alentours de 55kDa en quantité plus importante que la protéine d'intérêt.

Afin d'éliminer cette protéine chaperonne, des tests en condition dénaturante ont été effectués. L'optimum obtenu est un tampon phosphate 50mM NaH₂PO₄ + 300mM NaCl à pH=8 + urée [2.5M].

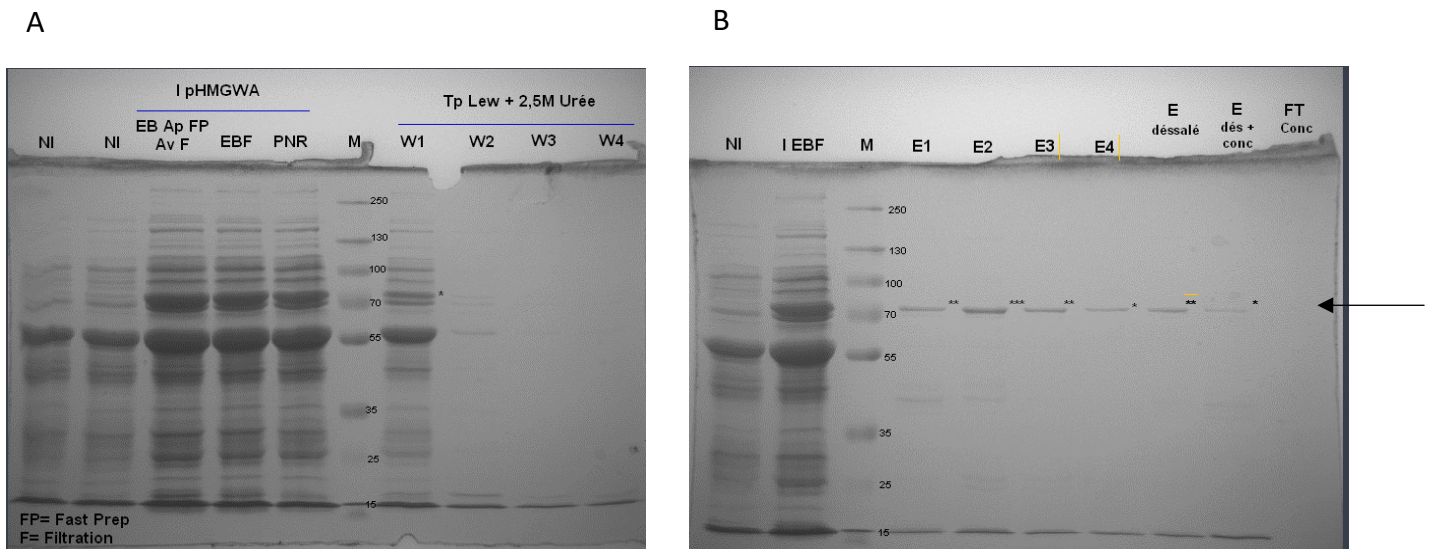


Figure 17 : SDS-PAGE des différentes fractions protéiques obtenues lors de la purification sur colonne IMAC de AKR-MBP de Pinot noir.

(* peu d'AKR-MBP ; ** présence significative d'AKR-MBP ; *** présence très significative d'AKR-MBP, ← montre la présence de la protéine). Les bactéries *E. coli* recombinantes pour AKR-MBP sont non induites (NI) ou induites (I) par l'IPTG 1mM pendant 24h à 14°C. Les protéines totales sont extraites des bactéries induites et la protéine AKR-MBP est purifiée sur résine Protino Ni-TED. Les fractions protéiques, extrait brut avant Fast prep et avant filtration (EB AP FP Av F), chargées sur la résine (EBF), protéines non retenues (PNR), lavages 1 à 4 (W1 à W4), gradient renaturant (W5 à W10 non montrés), les éluats 1 à 4 (E1 à E4), les éluats dessalés (E1+E2), puis concentrés (E dés+ conc) sont séparés par SDS-PAGE et le gel est coloré au bleu de Coomassie.

Cependant et afin d'effectuer une mesure d'activité de la protéine recombinante, il est ensuite nécessaire de mettre en place une étape de renaturation de l'AKR-MBP en éliminant l'urée par passage de tampon contenant de moins en moins d'urée sur colonne de purification. Ceci permet d'obtenir une protéine de fusion AKR-MBP présentant un meilleur degré de pureté (Figure 17B, exemple de l'isoforme du PN). A notre connaissance, il s'agit là de la première purification d'une AKR de vigne qui sera ensuite utilisée pour les tests d'activité enzymatique. Cependant il n'existe aucun moyen simple de vérifier si la conformation 3D de la protéine après renaturation est la même que la conformation native, ce qui peut poser problème pour les tests d'activités enzymatiques.

De plus la quantité de protéines purifiées étant faible (environ 100µg de protéines totales obtenu dans les éluats après purification pour 50 mL de culture bactériennes), d'autres tampons non dénaturants doivent être trouvés et testés.

Une fois avoir mis au point le protocole de purification sur la protéine AKR provenant du cépage PN, le même protocole sera par la suite appliqué pour la purification des protéines AKR provenant de PV et de CA/CS/SB, afin de valider ou non le rôle de cette enzyme dans la biosynthèse des méthoxypyrazines.

C) Dosage MPS

1. Doubles transformant : *VviAKR* et *VviOMT3*

Les combinaisons des différentes constructions testées en double transformation sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Combinaisons des différentes constructions testées. (*OMT3.2* : contrôle positif, *OMT+ANS* : contrôle négatif)

| OMT3.2 | ANS | PN AKR | PV AKR | CA AKR |
|--------|-----|--------|--------|--------|
| X | | | | |
| X | X | | | |
| X | | X | | |
| X | | | X | |
| X | | | | X |
| | | X | | |
| | | | X | |
| | | | | x |

Le dosage des MP sur le milieu de cultures des doubles transformant a été effectué et c'est avéré non significativement différents entre les différentes constructions induites ou non. Le contrôle positif d'induction (simple transformant *OMT3.2*) induit à quant à lui une concentration en IBMP de 1,7 à 1,1 fois supérieure obtenue après 30min et après 4h d'induction respectivement comparée au non induit. Le contrôle négatif, à savoir

OMT3.2+ANS induit ne présente pas de différence d'accumulation significative de MPs au sein du surnageant de la culture bactérienne comparé au contrôle positif induit.

Des dosages d'IBHP par LC-MS seront effectués dans les prochaines semaines sur les surnageants de cultures bactériennes obtenus afin de valider ou non l'hypothèse formulée quant à la fonction de *VviAKR*.

2. Hairy roots

Les combinaisons des différentes transformations réalisées sont présentées Tableau 2.

Tableau 2 : Combinaisons des différentes transformations réalisées

| Génotypes utilisés | RGM | | | | CS | | | | PN | | | | PV | | | |
|--------------------|-----|----|----|--------------------------------|----|----|----|--------------------------------|----|----|----|--------------------------------|----|----|----|--------------------------------|
| Allèles | CA | PV | PN | Plasmide vide pDGB3 α 1 | CA | PV | PN | Plasmide vide pDGB3 α 1 | CA | PV | PN | Plasmide vide pDGB3 α 1 | CA | PV | PN | Plasmide vide pDGB3 α 1 |

La surexpression de *VviAKR* a été vérifiée et validée pour l'ensemble des constructions réalisées par analyse qPCR. Les hairy roots obtenues en triplicats pour chaque combinaison (si présence d'assez d'individu), ont été prélevées pour doser les MPs (Figure 36). Seules les hairy root de fond génétique RGM se sont assez développées et ont permis d'obtenir assez de réplicats biologiques pour être dosées en GC-MS vis-à-vis de leur contenu en MPs.

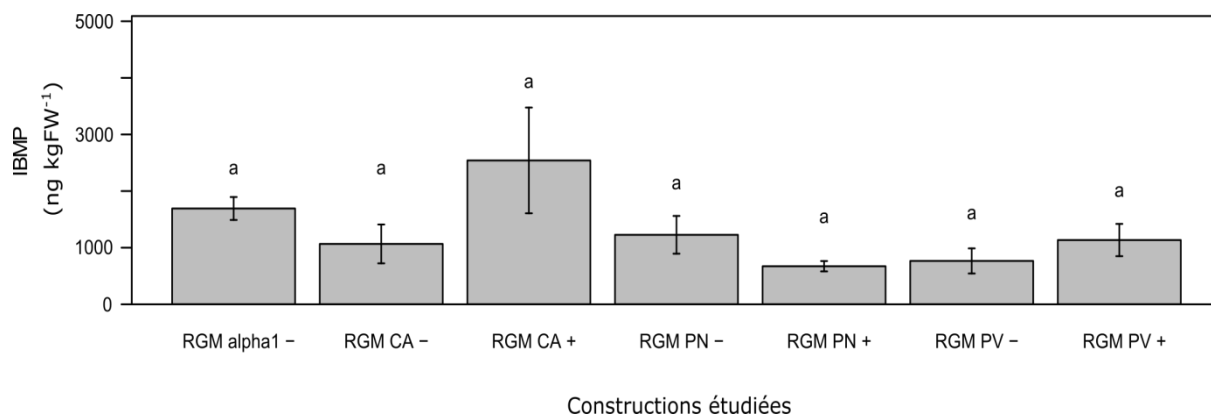


Figure 18: Contenu en IBMP au sein des différentes constructions de Hairy roots étudiées dans le cadre du fond génétique de RGM. Toutes les données sont présentées comme la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres verticales indiquent l'erreur standard (SE), les différentes lettres indiquent les différences significatives obtenues suite au résultat d'Anova suivi par un test de Tukey (p value < 0.05), N=3 réplicats biologiques, CA=Carménère, PN=Pinot noir, PV=Petit Verdot, (-) =contrôle.

Les résultats des dosages de MPs réalisés montrent une quantité 10 fois supérieure de MPs (IBMP, sBMP et IPMP) au sein des hairy roots comparée à celle obtenue à fermeture de la grappe pour les cépages forts producteurs de MPs contenue dans les baies. De plus, les résultats de concentration en IBMP ne montrent aucune différence significative entre les constructions surexprimant un allèle donné de *VviAKR* et leur contrôle respectif ne l'exprimant pas (par exemple RGM CA + vs RGM CA -) (Figure 36). De même, aucune différence significative n'est observée entre les différentes constructions surexprimant les allèles CA, PN et PV de *VviAKR*. Des résultats similaires sont obtenus pour la concentration en sBMP et en IPMP au sein des Hairy roots (données non montrées).

IV. Conclusion et perspectives

Les allèles de *VviAKR* chez CA/CS/SB, PV et PN ont montré une différence drastique de séquences entre les cépages forts et faibles producteurs d'IBMP (insertion d'un nucléotide dans l'exon 1 induisant un décalage du cadre de lecture, mutation dans le site d'épissage 5' de l'intron 1 impliquant la présence de l'intron 1 et d'un codon stop précoce chez CA, CS, SB). Les protéines obtenues diffèrent par leurs poids moléculaires : 100 acides aminés pour CA/CS/SB au lieu de 266 pour PV et 344 pour PN. De plus, seulement 43 acides aminés de l'AKR de CA/CS/SB sont identiques aux 344 acides aminés de l'AKR de PN et aux 266 acides aminés de l'AKR de PV impliquant potentiellement une différence de fonction. L'AKR de CA/CS/SB serait ainsi non fonctionnelle contrairement à celles de PV ou PN qui seraient actives.

Ces modifications de séquences entre les cépages forts et faibles producteurs d'IBMP s'associent aux différences d'expression de *VviAKR* précédemment identifiées au sein de l'UMR 1287. Elles viendraient renforcer l'hypothèse selon laquelle l'AKR pourrait intervenir de manière précoce dans la voie de biosynthèse de l'IBMP en transformant le glyoxal en glycolaldéhyde, empêchant ainsi la synthèse d'IBMP au sein des cépages faibles producteurs de MP.

Après avoir identifié la séquence codante du gène *VviAKR* au sein de CA, CS, SB, PN et PV, celle-ci a été clonée grâce au système Gateway® et exprimée au sein des bactéries *E. coli* Arctic Express (DE3). La production des protéines AKR, AKR-NusA, et AKR-MBP sous leurs formes solubles par *E. coli* s'est avérée très difficile. Les multiples essais réalisés en modifiant les paramètres de concentration en IPTG, de température, de durée d'induction et de tampon d'extraction des protéines, n'ont pas permis d'obtenir des taux élevés de protéines recombinantes solubles disponibles pour leurs purifications. La solubilisation à l'urée des culots bactériens montre qu'une grande proportion des protéines AKR ou AKR-MBP se retrouve sous la forme insoluble dans les corps d'inclusion fabriqués par *E. coli*.

Dans la perspective de tenter d'augmenter la production de protéines recombinantes solubles, d'autres paramètres peuvent s'associer à ceux de la température et de la durée d'induction. Sivashanmugam et al. 2009 proposent de commencer l'induction lorsque que

les bactéries sont très denses (D.O.₆₀₀ entre 5 et 7) et de changer le milieu de culture par un milieu minimum. D'après San-Miguel et al. 2013, l'addition d'IPTG en début de phase exponentielle de croissance des bactéries *E. coli* (D.O.₆₀₀ de 0,1) avec une induction réalisée à 4°C pendant 48 h à 72 h augmentent de façon très significative la proportion de protéines recombinantes solubles. Par ailleurs, un autre tampon d'extraction pourrait encore être testé en ajoutant du n-octyl glucoside connu pour solubiliser les protéines membranaires (Saito and Tsuchiya 1984).

La perspective de solubiliser les corps d'inclusion à l'urée pour libérer les protéines recombinantes demande de prévoir une renaturation des protéines d'intérêt après leurs purifications. L'étape de renaturation est aléatoire car il est difficile de savoir avec certitude si l'enzyme renaturée est à nouveau dans sa conformation native fonctionnelle (Betton et Chaffotte 2005). De plus, l'étape de renaturation est souvent longue et demande de tester plusieurs protocoles (Kohyama et al. 2010).

Les tests d'activité de l'AKR sur protéines totales extraites de bactéries *E. coli* a fonctionné. La vitesse initiale (Vi) obtenue pour l'une ou l'autre des AKR (4,178 µM/min et 4,35 µM/min) donne une valeur approximative de l'activité de l'enzyme de PN pour le substrat méthylglyoxal. Même si les activités ont été réalisées sur extraits de protéines totales de bactéries *E. coli*, la Vi déterminée est indicatrice de la présence de protéines AKR ou AKR-Nus fonctionnelles appartenant à la Vigne. Si nous parvenons à mettre au point un protocole d'obtention de protéines recombinantes AKR solubles, il sera possible de déterminer les paramètres cinétiques des AKR purifiées, K_M et V_{max} pour le méthylglyoxal. D'autres substrats potentiels des AKR, les aldéhydes (trans-2-hexenal, et glycéraldéhyde) et les sucres (xylose) pourront être testés. Il sera ainsi possible de connaître quel substrat a le plus d'affinité pour l'enzyme et de déterminer entre PN ou PV, quelle AKR est la plus efficace.

Un test sur un plus grand nombre de cépages contrastés vis-à-vis de leurs contenus en IBMP pourrait également avoir lieu afin de confirmer la présence des variants alléliques identifiés au cours de ma thèse chez les cépages forts et les faibles producteurs de MP.

CHAPITRE V : Conclusion Générale & Perspectives

L'un des objectifs de ce travail consistait à déterminer l'effet de la modification du ratio Fe/Fr sur la composition de la baie de raisin dans le but d'une adaptation possible aux changements climatiques en cours. En effet, la plupart des études effectuées se concentrent sur l'effet de l'effeuillage à un temps donné dans la saison (Pastore *et al.*, 2013 ; Pastore *et al.*, 2017; Risco *et al.*, 2013, Tardaguila *et al.*, 2008) et non réellement sur le ratio Fe/Fr conservé au cours de la saison. Quelques travaux de l'impact de la modulation du ratio Fe/Fr ont tout de même déjà été effectués, notamment l'étude réalisée par Bobeica *et al.*, (2015). Au cours de ce travail, une étude biochimique de la composition de la baie en réponse à la modulation du ratio Fe/Fr a été effectuée (sucres, acides organiques, anthocyanes) sur boutures fructifères et au vignoble mettant en jeu un nombre limité de ratio Fe/Fr testé (3F et 12F restantes par grappe) et de métabolites analysés.

Une des originalités de mon travail de thèse résidait dans le fait de coupler des approches agronomiques, biochimiques et transcriptomiques à la fois en serre et au vignoble mais aussi des analyses sensorielles des vins issus de l'expérimentation au vignoble et ainsi de compléter les études précédemment effectuées sur la modulation du ratio Fe/Fr.

A ce jour, aucun travail publié ne prend en compte autant d'éléments sur l'étude des conséquences de la modification du ratio Fe/Fr sur la composition des baies de raisin afin de répondre à l'enjeu de l'adaptation au changement climatique.

Pour répondre à cet objectif, nous avons donc effectué un premier plan d'expérience en serre en conditions semi-contrôlées sur boutures fructifères de Cabernet-Sauvignon constitué de plusieurs ratios Fe/Fr allant de 2F à 12F par grappe. Cette expérience possédant un large panel de ratio Fe/Fr, cela nous a permis d'effectuer une sélection des différents ratio à conserver pour définir le plan d'expérience utilisé au vignoble, celui-ci étant réduit.

Pour rappel, une analyse fine de la composition biochimique des baies en métabolites primaires (sucres, acides organiques, acides aminés) et en métabolites secondaires (anthocyanes, arômes et précurseurs d'arômes) couplée ou non à l'ajout d'ABA a été effectuée afin de déterminer l'impact de la modification du ratio Fe/Fr en serre et au vignoble. A noter qu'au niveau du plan expérimental réalisé au vignoble, deux stades d'application de la modulation du ratio Fe/Fr i.e. petit pois et pré-véraison ont été comparés. Les résultats obtenus ont globalement indiqué que les teneurs des baies en acides aminés,

en acides organiques et en anthocyanes, sont bien plus affectées par la réduction du rapport Fe/Fr que celles des sucres. Ces résultats corroborent les résultats préliminaires obtenus par Bobeica *et al.*, (2015). En effet lors d'une réduction du ratio Fe/Fr la concentration totale en sucres, en acides aminés et en anthocyanes diminue alors que la concentration en acides organiques augmente. Par ailleurs, dans notre étude la réduction du rapport Fe/Fr n'a pas eu d'impact sur les composés aromatiques dosés sur baies responsables du caractère végétal des vins, à savoir les MPs, au sein des deux plans d'expériences ce qui valide définitivement ce point. La diminution du ratio Fe/Fr n'a également pas impacté les précurseurs de thiols dosés sur les baies et le moût et impliqués dans le caractère fruité des vins.

Dans le but d'essayer de compenser les effets négatifs de la diminution du ratio Fe/Fr sur la teneur en anthocyanes, composés indispensables à la typicité des vins de Bordeaux. La pulvérisation d'ABA, connue pour étant impliquée dans la voie métabolique des sucres et des anthocyanes, couplée à la modulation du ratio Fe/Fr a également été testée au vignoble. En effet, la pulvérisation d'ABA a déjà prouvé son efficacité lors d'une pulvérisation autour de la véraison sur l'augmentation de la teneur en anthocyanes de cépages de table à savoir le Crimson seedless, le Rubi ou le Flame seedless (Ferrara *et al.* 2015; Koyama *et al.* 2014; Neto *et al.* 2017; Peppi *et al.* 2006). Wheeler *et al.*, (2009) ainsi que Pilati *et al.*, (2017) ont également identifié le même effet de l'ABA sur cépages de cuve à savoir Cabernet-Sauvignon et Pinot Noir respectivement. Ces études n'ont cependant jamais regardé l'impact de la modulation du ratio Fe/Fr couplée à la pulvérisation d'ABA. Le travail effectué au cours de ma thèse a permis de conclure sur l'effet positif de l'ajout d'ABA couplé à une modulation du ratio Fe/Fr. En effet, pour le traitement présentant 6 feuilles restantes par grappe associé à la pulvérisation d'ABA (PS6LC_ABA), la concentration en anthocyanes totales des baies est comparable à celle du contrôle présentant 12 feuilles restantes par grappe (PS12LC), sans pour autant perdre l'avantage de la modulation du ratio Fe/Fr qui est de diminuer la quantité de sucres des baies en comparaison du traitement contrôle (PS12LC), et par conséquent l'alcool des vins, dont l'augmentation se révèle être une des conséquences liée au changement climatique.

Ce travail a été complété par l'étude des mécanismes physiologiques et moléculaires sous-tendant la sensibilité de la composition de la baie de raisin (sucres, acides organiques, acides

aminés, polyphénols, composés aromatiques) aux modifications du ratio Fe/Fr couplées ou non à l'utilisation d'ABA. Ainsi, une étude ciblée au cours du développement et de la maturation de la baie de gènes clefs intervenant dans les principales voies métaboliques précédemment caractérisées d'un point de vue biochimique (métabolismes du carbone, des anthocyanes, de l'ABA, des arômes..) a été réalisée par le biais d'une approche de qPCR en temps réel de type Fluidigm ainsi que par l'étude du transcriptome global de la baie à la mi-véraison en utilisant une approche de type RNAseq.

D'un point de vue transcriptomique, la réduction du ratio Fe/Fr induit une expression différentielle de nombreux gènes en serre liés au métabolisme du carbone et énergétique (fructose 1,6-bisphosphatase, phosphoribulokinase, gènes de la famille SWEET, gènes associés à la perte de rigidification de la paroi cellulaire), de la voie de biosynthèse des anthocyanes (*VviF3'H*, *VviUGT*) ou impliqués dans la transduction du signal hormonal. Les mêmes voies de biosynthèse se retrouvent impactées par la modulation du ratio Fe/Fr au vignoble. En effet, on retrouve un impact sur l'expression des gènes du métabolisme du carbone (phosphoribulokinase), de la transduction du signal hormonal ainsi que du métabolisme secondaire (*VviLDOX*, *VviUGT*, *VviFAOMT*, (+)-neomenthol dehydrogenase, AKR (*VIT_08s0007g01040*). Cependant, les gènes marqueurs (flavonol synthase, jasmonate méthyltransférase, récepteur de l'ABA PYL4) identifiés par Zenoni *et al.*, (2017), lors d'une analyse globale du transcriptome de la baie de type RNAseq, comme étant affectés dans leur expression au cours du développement de la baie en réponse à une défoliation précoce effectuée avant la floraison n'ont pas été retrouvés comme étant différentiellement exprimés dans le cadre de notre étude lors de l'analyse des données de RNAseq effectuées au stade mi-véraison. Une des explications avancées vient du fait que les traitements de modulation de la canopée ont été réalisés dans notre étude après la floraison.

Les données obtenues suite à l'analyse ciblée par qPCR en temps réel de type Fluidigm concernant l'effet de l'utilisation d'ABA exogène avant la véraison sur le transcriptome de la baie sont toujours en cours de traitement. Cependant les résultats obtenus suite à l'analyse des données de transcriptomique à haut débit de type RNAseq ont permis de constater une modification d'expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes et des anthocyanes (UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase 6-like

(*VIT_12s0034g00130*) ou encore dans la voie de biosynthèse des composés aromatiques et des stilbènes. Concernant l'impact de l'ajout d'ABA sur l'expression des gènes au sein de la baie, d'autres précédent travaux, tel que Wheeler *et al.*, (2009), se sont concentrés sur l'effet de l'ajout d'ABA exogène sur certains gènes cibles de Cabernet-Sauvignon tels que *VviNCED* ou encore *VviZEP* rendant l'étude effectuée au cours de ma thèse plus complète. Pilati *et al.*, (2017) ont quant à eux effectué une analyse à large spectre de type RNAseq au moment de l'initiation de la maturation des baies de Pinot Noir et ont identifié *VviLOXA* et *VviNCED* comme marqueur potentiel de cette initiation.

Ce travail nous a permis de mettre en exergue quels gènes sont conjointement différenciellement exprimés suite aux modifications du ratio Fe/Fr au cours des deux plans d'expériences effectués en serre et au vignoble. On retrouve en particulier certains gènes du métabolisme carboné tels que la phosphoribulokinase ainsi que la fructose bisphosphatase. Mais également certains gènes impliqués dans le métabolisme secondaire et plus particulièrement dans la synthèse des arômes tel que le gène codant une AKR (*VIT_08s0007g01040*), *VviGerD* ainsi que le gène codant potentiellement une benzoate carboxyl methyltransferase (*VIT_04s0023g02280*). L'impact de l'ABA sur l'expression de certains gènes cibles est quant à lui toujours en cours d'analyse. Ainsi, ces gènes différenciellement exprimés pourraient être utilisés directement ou indirectement comme indicateurs potentiels de la modulation du ratio Fe/Fr sur la composition biochimique des baies en relation avec l'obtention d'une qualité et typicité optimales du vin.

Enfin, des analyses biochimiques et sensorielles des microvinifications obtenues pour le plan d'expérience au vignoble permettant de regarder l'impact de la modification du ratio Fe/Fr couplée ou non à l'ajout d'ABA sur la typicité bordelaise des vins obtenus ont été réalisées. Les analyses biochimiques (sucres, anthocyanes, acidité) et aromatiques (MPs, thiols) des vins ont montré des résultats en cohérence avec les analyses faites sur baies. Concernant l'étude de la modulation du ratio Fe/Fr sur la typicité des vins de Bordeaux, aucune différence significative n'a été notée par notre panel d'un point de vue olfactif et gustatif en comparaison de la modalité contrôle (PS12LC). Cependant un effet sur l'intensité colorante des vins corrélé positivement au ratio Fe/Fr a été observé ce qui est en accord avec les

résultats des analyses biochimiques effectuées sur baies et sur vin.

L'effet de l'ajout d'ABA couplé à la modulation du ratio Fe/Fr n'a quant à lui révélé aucun effet significativement négatif sur la perception de la typicité olfactive et gustative par notre jury. De plus, il semblerait que l'utilisation d'ABA avant véraison améliorerait la perception de typicité olfactive des jurés si l'on compare des vins de ratio Fe/Fr équivalent (PS6LC vs PS6LC_ABA).

Ainsi, nous démontrons dans ce travail l'impact des traitements de manipulation de la canopée et plus particulièrement de modification du rapport source-puits couplés ou non à l'utilisation d'ABA sur la physiologie des plantes d'une part, mais également sur l'accumulation des différents métabolites primaires et secondaires dans les baies contribuant à la typicité et aux qualités organoleptiques des vins. Mais aussi le non impact du ratio carboné sur la concentration en MPs.

Mes travaux de thèse seront une aide afin de proposer une voie d'adaptation à court terme au changement climatique afin de lutter contre la hausse du taux de sucres des baies via l'utilisation couplée de la modulation du ratio Fe/Fr à la pulvérisation d'ABA sur les baies et ceci tout en préservant une perception de typicité des vins de Bordeaux proche de l'actuelle par le consommateur. Par ailleurs, les gènes identifiés comme différenciellement exprimés au sein des deux plans d'expérience pourraient être utilisés directement ou indirectement comme indicateurs potentiels de la modulation du ratio Fe/Fr sur la composition biochimique des baies pour une qualité de vin optimale.

Ces travaux méritent cependant d'être approfondis, en effet, différentes concentrations d'ABA pulvérisées au niveau des baies couplées à la modulation du ratio Fe/Fr pourraient ainsi être testées afin de définir la concentration optimale d'ABA à partir de laquelle un effet significatif peut être noté sur la concentration en anthocyanes dans les baies et au sein du vin produit et ceci afin de contrecarrer l'effet délétère de la diminution du ratio source-puits sur l'accumulation de ces métabolites secondaires prépondérantes pour la qualité et la typicité du vin de Bordeaux.

Par ailleurs, une stimulation de la production endogène d'acide abscissique peut aussi être une piste à envisager afin d'éviter le refus des différentes appellations d'origine contrôlée. En effectuant un stress hydrique à la plante par exemple.

Le dernier objectif de ma thèse a été d'effectuer la caractérisation du gène *VviAKR* potentiellement impliqué dans la voie de biosynthèse des MPs qui sont en partie responsables de l'arôme végétal des vins.

Ce travail a permis l'identification de trois allèles de *VviAKR* associés aux cépages plus ou moins forts producteurs de MPs tels que les allèles *VviAKR-PN* et *VviAKR-PV* associés aux cépages faibles producteurs Pinot Noir et Petit Verdot ainsi que l'allèle *VviAKR-CA/CS/SB* associé aux cépages forts producteurs de MPs comme Carménère, Cabernet-Sauvignon et Sauvignon blanc. Le séquençage de ces allèles nous a ainsi amené à penser que les allèles *VviAKR-PN* et *VviAKR-PV* seraient fonctionnels alors que *VviAKR-CA/CS/SB* possédant un codon stop précoce suite à un décalage du cadre de lecture serait non fonctionnel. L'essai de purification en condition native de l'ensemble de ces protéines c'est cependant relevé impossible de par le manque de solubilité de ces protéines au sein des bactéries transformées. En effet, ces protéines se retrouvent retenues dans les corps d'inclusion des bactéries transformées, révélant une purification protéique en condition native complexe. Ce problème de solubilité a déjà été observé au sein de la famille des AKR de végétaux par Narawongsanont *et al.*, (2012). Leur solution avait été d'utiliser des protéines de fusion facilitant la solubilité des protéines. Au cours de notre étude, l'utilisation de protéines de fusion n'a cependant pas permis de solubiliser *VviAKR*.

Pour tout de même essayer de caractériser ces allèles, un essai de double transformation des différents allèles de *VviAKR* avec le gène *VviOMT3*, impliqué dans la dernière étape de la voie de biosynthèse des MPs, a été effectué en conditions hétérologue chez *E. coli*. Le même problème de présence de corps d'inclusions évoqué plus haut a été noté. En effet, même à faible concentration d'induction à l'IPTG, les différents allèles de *VviAKR* ne semblent pas avoir été suffisamment présents en milieu cytosolique pour conclure quant à leurs fonctions potentielles.

Une troisième approche a alors été testée à savoir la transformation racinaire *in vitro* de type Hairy roots en système homologue. Après avoir transformé les racines afin qu'elles surexpriment les différents allèles de *VviAKR* dans différents fonds génétiques, un dosage des MPs a été effectué. Cependant, n'ayant pas assez de racines viables pour l'ensemble des fonds génétiques testés, seul l'un d'entre eux correspondant à *Vitis riparia* cv. Riparia Gloire de Montpellier (RGM) a réellement pu être exploité. Malheureusement aucune conclusion n'a réellement pu être tirée de ce dosage du fait de la variation assez importante au sein même des triplicats biologiques.

La fonction potentielle de *VviAKR* comme étant ou non impliqué dans la voie de biosynthèses des MPs reste donc encore à être élucidée.

Afin d'essayer de caractériser *VviAKR*, des analyses de type RNAseq pourraient être envisagées sur les hairy roots transformées obtenues afin de voir l'impact ou non des différents allèles de cette enzyme sur le transcriptome associé à la synthèse des arômes végétaux.

Une purification en méthode dénaturante, suivie d'une étape de renaturation pourrait aussi être envisagée.

Bibliographie : Chapitres I, IV et V

- Afoufa-Bastien D, Medici A, Jeauffre J, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Atanassova R, Laloi M (2010) The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and microarray expression profiling. *BMC Plant Biology* 10 : 245
- Agasse A, Vignault C, Kappel C, Conde C, Gerós H, Delrot S (2009) Sugar transport and sugar sensing in grape. In: Roubelakis- Angelakis KA, ed. *Grapevine molecular physiology and biotechnology*, 2nd edn. Berlin: Springer 105–140.
- Agius F, Gonzalez-Lamothe R, Caballero J, Munoz-Blanco J, Botella M, Valpuesta V (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* 21: 177 - 181
- Alem H, Rigou P, Schneider R, Ojeda H, Torregrosa L (2018) Impact of agronomic practices on grape aroma composition: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*
- Allamy L (2015) Recherches sur les marqueurs moléculaires de l'arôme de « fruits cuits » des raisins et des vins rouges issus des cépages Merlot et Cabernet-Sauvignon. Manuscrit de thèse Université de Bordeaux 1-342
- Allen M, Lacey M, Harris R, Brown W (1991) Contribution of methoxypyrazines to Sauvignon Blanc wine aroma. *Am J Enol Vitic* 42: 109-112
- Ananga A, Georgiev V, Ochieng J, Phills B, Tsoleva V (2013) Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. In: Poljuha D, Sladonja B (eds) *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*. InTech
- Andersen OE, Markham KE, Brown J, Kyle J, Veitch N, Schwinn K, Marston A, Jay M, Fossen T, Davies K, Cheynier V, Clifford M, Gould K, Dangles O, Ferreira D, Valant-Vetschera K, Williams C, Wiseman H, Hostettmann K, Duthie G, Lister C, Wollenweber E, Slade D, Marais J, Dufour C, Jordheim M, Grayer R (2005) *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton: CRC Press. Chapter 10 : The anthocyanins.: 468-549
- Arnold RA, Noble AC (1978) Bitterness and Astringency of Grape Seed Phenolics in a Model Wine Solution. *American Journal of Enology and Viticulture* 29: 150-152
- Ayabe S., Udagawa A., T. F (1988) NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase activity in *Glycyrrhiza echinata* cells induced by yeast extract. . *Archives of biochemistry and biophysics* 261: 458-462
- Balint G, Reynolds AG (2012) Impact of exogenous abscisic acid on vine physiology and grape composition of cabernet sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* 64: 74-87
- Barski O, Mindnich R, Penning T (2013) Alternative splicing in the aldo–keto reductase superfamily: Implications for protein nomenclature. . *Chemico-Biological Interactions* 202: 153-158
- Barski OA, Tipparaju SM, Bhatnagar A (2008) The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metabolism Reviews* 40: 553-624
- Baumes RL, Wirth J, Bureau S, Gunata YZ, Razungles AJ (2002) Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds experiments supportives for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Analytica Chimica Acta* 458: 3-14
- Baydar NG, Harmankaya N (2005) Changes in endogenous hormone levels during the ripening of grape cultivars having different berry set mechanisms
- Belancic A, Agosin E (2007) Methoxypyrazines in grapes and wines of *Vitis vinifera* cv. Carmenere. *Am J Enol Vitic* 58: 462-469
- Belda I, Ruiz J, Navascués E, Marquina D, Santos A (2016) Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased β -lyase activity. *International Journal of Food Microbiology* 225: 1-8
- Bell S-J, Henschke PA (2005) Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*: 242-295

- Berli FJ, Moreno D, Piccoli P, Hespanhol-Viana L, Silva MF, Bressan-Smith R, Cavagnaro JB, Bottini R (2010) Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant, Cell & Environment* 33: 1-10
- Betton J-M, Chaffotte A (2005) Repliement et production de protéines recombinantes. *médecine/sciences* 21: 613-617
- Bindon KA, Dry PR, Loveys BR (2007) Influence of plant water status on the production of C13-norisoprenoid precursors in *Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Sauvignon grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4493-4500
- Blaise A (1998) Altérations organoleptiques des vins. . In *Oenologie, Fondements Scientifique et Technologiques*, Flanzy, C., Ed. Tec & Doc Lavoisier: Paris: 1182-1216
- Blanchard L, Bouchilloux P, Darriet P, Tominaga T, Dubourdiou D (1999) Caractérisation de la fraction volatile de nature soufrée dans les vins de Cabernet et Merlot. Étude de son évolution au cours de l'élevage en barriques. . 6e Symp. Int. oenol. Tec et Doc, : 501-505
- Blanchard L, Darriet P, Dubourdiou D (2004) Reactivity of 3-Mercaptohexanol in Red Wine: Impact of Oxygen, Phenolic Fractions, and Sulfur Dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture* 55: 115-120
- Blank I, Fay LB, Lakner FJ, Schlosser M (1997) Détermination of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 2(or 5)-ethyl-4-hydroxy-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone in pentose sugar-based maillard model systems by isotope dilution assays. *Journal of agricultural and food chemistry* 45: 2642-2646
- Bobeica N, Poni S, Hilbert G, Renaud C, Gomès E, Delrot S, Dai Z (2015) Differential responses of sugar, organic acids and anthocyanins to source-sink modulation in Cabernet Sauvignon and Sangiovese grapevines. *Frontiers in Plant Science* 6: 382
- Bogart K, Bisson L (2006) Persistence of vegetal characters in wine grapes and wine. *Practical winery and vineyard magazine* March/April
- Bomati EK, Austin MB, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP (2005) Structural Elucidation of Chalcone Reductase and Implications for Deoxychalcone Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 280: 30496-30503
- Bonnefoy C, Quenol H, Bonnardot V, Barbeau G, Madelin M, Planchon O, Neethling E (2012) Temporal and spatial analyses of temperature in a French wine-producing area: the Loire Valley. *International Journal of Climatology* 33: 1849-1862
- Bouchilloux P, Darriet P, Henry R, Lavigne-Cruège V, Dubourdiou D (1998) Identification of volatile and powerful odorous thiols in bordeaux red wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3095-3099
- Bowers JE, Meredith CP (1997) The parentage of a classic wine grape Cabernet Sauvignon. *Nature genetics* 16: 84-87
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248 - 254
- Busso D, Delagoutte-Busso B, Moras D (2005) Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry* 343: 313-321
- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 2165-2180
- Callejón RM, Troncoso AM, Morales ML (2010) Determination of amino acids in grape-derived products: A review. *Talanta* 81: 1143-1152
- Cantín CM, Fidelibus MW, Crisosto CH (2007) Application of abscisic acid (ABA) at veraison advanced red color development and maintained postharvest quality of 'Crimson Seedless' grapes. *Postharvest Biology and Technology* 46: 237-241
- Capone DL, Pardon KH, Cordente AG, Jeffery DW (2011) Identification and quantitation of 3-S-cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc grape juice by HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 59

- Castellarin S, Matthews M, Gaspero G, Gambetta G (2007) Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta* 227: 101-112
- Cheng T-B, Reineccius GA, A BJ, Edwards L (1991) Biosynthesis of 2-Methoxy-3-isopropylpyrazine in *Pseudomonas perolens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 1009-1012
- Cholet C, Claverol S, Claisse O, Rabot A, Osowsky A, Dumot V, Ferrari G, GénY L (2016) Tartaric acid pathways in *Vitis vinifera* L. (cv. Ugni blanc): a comparative study of two vintages with contrasted climatic conditions. *BMC Plant Biology* 16
- Coelho E, Rocha, S. M., Delgadillo, I., et Coimbra, M. A. (2006) Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *vitis vinifera* L. cv. 'baga' ripening. *Analytica Chimica Acta* 563 (1-2 SPEC. ISS.): 204-214
- Conde BC, Silva P, Fontes N, Dias ACP, Tavares RM, Sousa MJ, Agasse A, Delrot S, Geros H (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1: 1-22
- Coombe B (1987) Influence of temperature on composition and quality of grapes. *Acta Hort* 206: 23 - 35
- Coombe B, Hale C (1973) The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiology* 51: 629 - 634
- Coombe BG, McCarthy MG (2000) Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 131-135
- Crupi P, Coletta A, Antonacci D (2010) Analysis of Carotenoids in Grapes To Predict Norisoprenoid Varietal Aroma of Wines from Apulia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 9647-9656
- Dai Z, Plessis A, Vincent J, Duchateau N, Besson A, Dardevet M, Prodhomme D, Gibon Y, Hilbert G, Pailloux M, Ravel C, Martre P (2015) Transcriptional and metabolic alternations rebalance wheat grain storage protein accumulation under variable nitrogen and sulfur supply. *The Plant Journal* 83: 326-343
- Dai ZW, Léon C, Feil R, Lunn JE, Delrot S, Gomès E (2013) Metabolic profiling reveals coordinated switches in primary carbohydrate metabolism in grape berry (*Vitis vinifera* L.), a non-climacteric fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany* 64: 1345-1355
- Dai ZW, Meddar M, Renaud C, Merlin I, Hilbert G, Delrot S, Gomès E (2014) Long-term *in vitro* culture of grape berries and its application to assess the effects of sugar supply on anthocyanin accumulation. *Journal of Experimental Botany* 65: 4665-4677
- Dai ZW, Ollat N, Gomès E, Decroocq S, Tandonnet J-P, Bordenave L, Pieri P, Hilbert G, Kappel C, van Leeuwen C, Vivin P, Delrot S (2011) Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 62: 413-425
- Darriet P, Tominaga T, Lavigne V, Boidron J-N, Dubourdieu D (1995) Identification of a Powerful Aromatic Component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon Wines : 4-Mercapto-4-methylpentan-2-One. *Flavour and fragrance journal* 10: 385-392
- Davies C, Boss P, Robinson S (1997) Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiology* 115: 1155 - 1161
- Davies C, Robinson SP (1996) Sugar accumulation in grape berries (cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues). *Plant Physiology* 111: 275-283
- Delgado-Vargas F, Jiménez aR, Paredes-López O (2000) Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. . *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40: 172-289
- Desportes C, Charpentier M, Duteurtre B, Maujean A, Duchiron F (2001) Isolation, Identification, and Organoleptic Characterization of Low-Molecular-Weight Peptides from White Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 376-380

- Deytieux-Belleau C, Gagne S, L'Hyvernay A, Doneche B, Geny L (2007) Possible roles of both abscisic acid and Indol-acetic acid in controlling grape berry ripening process. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 41: 141 - 148
- Diago M, Martinez De Toda F, Poni S, Tardaguila J (2009) Early leaf removal for optimizing yield components, grape and wine composition in Tempradillo (*Vitis vinifera* L) Sixteenth symposium of the group of international experts of vitivinicultural systems for cooperation University of California, Davis: 1113-1118
- Dominguez PG, Frankel N, Mazuch J, Balbo I, Iusem N, Fernie AR, Carrari F (2013) ASR1 mediates glucose-hormone cross talk by affecting sugar trafficking in tobacco plants. *Plant Physiology* 161 : 1486-1500
- Drawert F (1974) The chemistry of winemaking as a biological-technological sequence. . Chemistry of winemaking, In Society, A. C., Ed. Webb, A.D.: Washington: 1-10.
- Duchêne E, Haurd F, Dumas V, Schneider C, Merdinoglu D (2010) The challenge of adapting grapevine varieties to climate change. *Climate Research* 41: 193-204
- Duncan RA, Stapleton JJ, Leavitt GM (1995) Population dynamics of epiphytic mycoflora and occurrence of bunch rots of wine grapes as influenced by leaf removal. *Plant Pathology* 44: 956-965
- Dunlevy J, Soole K, Perkins M, Dennins E, Keyzers R, Kalua C, Boss P (2010) Two O-methyltransferases involved in the biosynthesis of methoxy-pyrazines: grape-derived aroma compounds important to wine flavour. *Plant Mol Biol* 74: 77-89
- Dunlevy JD, Dennis EG, Soole KL, Perkins MV, Davies C, Boss PK (2013a) A methyltransferase essential for the methoxy-pyrazine-derived flavour of wine. *The Plant Journal* 75: 606-617
- Dunlevy JD, Soole KL, Perkins MV, Nicholson EL, Maffei SM, Boss PK (2013b) Determining the methoxy-pyrazine biosynthesis variables affected by light exposure and crop level in Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* 64: 450-458
- Düring H, Alleweldt G (1980) Effects of Plant Hormones on Phloem Transport in Grapevines. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 93: 339-347
- Edwards EJ, Smith J, Walker A, Barril C, Boettcher A, Foster D (2017) Targeted manipulation of vine balance : does vine balance directly affect fruit composition ? *Proceedings - Sixteenth Australian Wine Industry Technical Conference*: 96-100
- El-Kereamy A, Chervin C, Roustan J-p, Cheynier V, Souquet JM, Moutounet M, Raynal J, Ford A, Pech JC, Bouzayen M (2003) Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiologia plantarum*: 175-182
- Endo A, Okamoto M, Koshiba T (2014) ABA Biosynthetic and Catabolic Pathways. 21-45
- Escudero A, Campo E, Farina L, Cacho J, Ferreira V (2007) Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4501-4510
- Falcetti M, Lacono F, Scienza A, Pinzauti S (1990) Un exemple de zonage en Italie du Nord : influence sur les vins. . *Le bulletin de l'OIV* 63: 741-759
- Fang Y, Qian MC (2006) Quantification of selected aroma-active compounds in Pinot Noir wines from different grape maturities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8567-8573
- Farina L, Boido E, Carrau F, Versini G, Dellacassa E (2005) Terpene compounds as possible precursors of 1,8 -cineol in red grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1633-1636
- Farmer EE, Ryan CA (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4: 129-134
- Fedrizzi B, Pardon KH, Sefton MA, Eelsey GM, Jeffery DW (2009) First identification of 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon blanc juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 991-995

- Ferrara G, Mazzeo A, Matarrese AMS, Pacucci C, Punzi R, Faccia M, Trani A, Gambacorta G (2015) Application of abscisic acid (S-ABA) and sucrose to improve colour, anthocyanin content and antioxidant activity of cv. Crimson Seedless grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 21: 18-29
- Ferreira R, A Piçarra-Pereira M, Monteiro S, B Loureiro VI, R Teixeira A (2001) The wine proteins
- Ferreira V, López R, Cacho JF (2000) Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1659
- Ferreira V, Ortin N, Escudero A, Lopez R, Cacho J (2002) Chemical characterization of the aroma of Grenache rose wines: aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies. *Journal agricultural and food chemistry* 50 (14): 4048-4054
- Ferri M, Righetti L, Tassoni A (2011). Increasing sucrose concentrations promote phenylpropanoid biosynthesis in grapevine cell cultures. *Journal of Plant Physiology* 168 : 189–195.
- Ferrise R, Trombi G, Moriondo M, Bindi M (2014) Climate Change and Grapevines: A Simulation Study for the Mediterranean Basin. *Journal of Wine Economics* 11: 88-104
- Finkelstein RR, Gibson SI (2002) ABA and sugar interactions regulating development Cross-talk or voices in a crowd. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 26-32
- Flynn G (1982) Aldehyde reductases : monomeric NADPH-dependent oxidoreductases with multifunctional potential. *Biochemical Pharmacology* 31: 2705-2712
- Fraga H, Malheiro AC, Moutinho-Pereira J, Santos JA (2012) An overview of climate change impacts on European viticulture. *Food and Energy Security* 1: 94-110
- Gallois A, Kergomard A, Adda J (1988) Study of the biosynthesis of 3-isopropyl-2-methoxypyrazine produced by *Pseudomonas taetrolens*. *Food Chem* 28: 299-309
- Garcia de Cortazar Atauri I (2006) Adaptation du modèle STICS à la vigne (*Vitis vinifera* L.). Utilisation dans le cadre d'une étude d'impact du changement climatique à l'échelle de la France. PhD Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Montpellier: 1-291
- Garcia De Cortazar Atauri I, Duchêne E, Destrac A, Barbeau G, De Resseguier L, Lacombe T, Parker AK, Saurin N, Van Leeuwen C (2017) Grapevine phenology in France : from past observations to future evolutions in the context of climate change. *OENO One* 51: 115 - 126
- Garfinkel DJ, Nester EW (1980) *Agrobacterium tumefaciens* Mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *Journal of bacteriology* 144: 732-743
- Gawel R (1998) Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 74–98.
- Gazzarrini S, McCourt P (2001) Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 387-391
- Genovese A, Piombino P, Lisanti MT, Moio L (2005) Determination of furaneol (4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone) in some wines from Italian native grapes by gas-chromatography-SIM/MASS spectrometry. *Annali Di Chimica* 95 (6): 415-419
- GIEC (2013) IPCC : Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: 1535
- GIEC (2014) Climate Change 2014: Synthesis Report. . Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. GIEC, Genève, Suisse. : 151
- GIEC (2018) Global warming of 1.5°C an IPCC special report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Incheon, Republic of Korea.
- Gigot C, Ongena M, Fauconnier M-L, Whathelet J-P, Du Jardin P, Thonart P (2010) The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. *Biotechnology, Agronomie, Société et Environnement* 14: 451-460

- Girard B, Fukumoto L, Mazza G, Delaquis P, Ewert B (2002) Volatile Terpene Constituents in Maturing Gewürztraminer Grapes from British Columbia. *American Journal of Enology and Viticulture* 53: 99-109
- Giribaldi M, Geny L, Delrot S, Schubert A (2010) Proteomic analysis of the effects of ABA treatments on ripening *Vitis vinifera* berries. *Journal of Experimental Botany* 61: 2447-2458
- Guan L, Dai Z, Wu B-H, Wu J, Merlin I, Hilbert G, Renaud C, Gomès E, Edwards E, Li S-H, Delrot S (2015) Anthocyanin biosynthesis is differentially regulated by light in the skin and flesh of white-fleshed and teinturier grape berries. *Planta* 243: 23-41
- Guedes de Pinho P, Bertrand A (1995) Analytical determination of furaneol (2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone). Application to differentiation of white wines from hybrid and various *Vitis vinifera* cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture* 46 (2): 181-186
- Guillaumie S, Ilg A, Réty S, Brette M, Trossat-Magnin C, Decroocq S, Léon C, Keime C, Ye T, Baltenweck-Guyot R, Claudel P, Bordenave L, Vanbrabant S, Duchêne E, Delrot S, Darriet P, Huguenev P, Gomès E (2013) Genetic analysis of the biosynthesis of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, a major grape-derived aroma compound impacting wine quality. *Plant Physiology* 162: 604-615
- Gump BH, Zoeklein BW, Fugelsang KC, Whiton RS (2002) Comparison of Analytical Methods for Prediction of Prefermentation Nutritional Status of Grape Juice. *American Journal of Enology and Viticulture* 53: 325-329
- Guth H (1997) Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3027-3032
- Hall BG (2013) Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution* 30: 1229-1235
- Hannah L, Roehrdanz PR, Ikegami M, Shepard AV, Shaw MR, Tabor G, Zhi L, Marquet PA, Hijmans RJ (2013) Climate change, wine, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 6907-6912
- Hardie WJ, O'Brien TP, Jaudzems VG (1996) Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape, *Vitis Vinifera* L. *Australian Journal of Grape and Wine Research*: 97-142
- Harsch MJ, Benkwitz F, Frost A, Colonna-Ceccaldi B, Gardner RC, Salmon J-M (2013) New Precursor of 3-Mercaptohexan-1-ol in Grape Juice: Thiol-Forming Potential and Kinetics during Early Stages of Must Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 3703-3713
- Hashizume K, Tozawa K, Endo M, Aramaki I (2001a) S-Adenosyl-L-methionine-dependent O-methylation of 2-hydroxy-3-alkylpyrazine in wine grapes: A putative final step of methoxy-pyrazine biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65: 795-801
- Hashizume K, Tozawa K, Hiraga Y, Aramaki I (2001b) Purification and characterization of a O-methyltransferase capable of methylating 2-hydroxy-3-alkylpyrazine from *Vitis vinifera* L. (cv. Cabernet Sauvignon). *Biosci Biotech Biochem* 65: 2213-2219
- Hawker JS (1969) Changes in the activities of malic enzyme, malate dehydrogenase, phosphopyruvate carboxylase and pyruvate decarboxylase during the development of a non-climacteric fruit (the grape). *Phytochemistry* 8: 19-23
- He J-J, Liu Y-X, Pan Q-H, Cui X-Y, Duan C-Q (2010) Different anthocyanin profiles of the skin and the pulp of Yan73 (Muscat Hamburg × Alicante Bouschet) grape berries. *Molecules* 15: 1141-1153
- Hein K, Ebeler SE, Heymann H (2009) Perception of fruity and vegetative aromas in red wine. *Journal of Sensory Studies* 24: 441-455
- Helwi P (2015) Effet du statut azoté de la vigne sur le potentiel aromatique de la baie de raisin et l'arôme du vin approches agronomique, analytique et transcriptomique. Thèse de l'école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, Spécialité Oenologie
- Herve E, Price S, Burns G (2003) Eucalyptol in wines showing "eucalyptus" 388 aroma. In Proceedings of the VII^eeme symposium international 389 d'Oenologie. Bordeaux, France: Actualites Oenologiques Poster presentation
- Hewitt EJ, Mackay DAM, Konigsbacher K, Hasselstrom T (1956) The roles of enzymes in food flavors. *Food technology* 10: 487-489

- Hilbert G, Soyer JP, Molot C, Giraudon J, Milin S, Gaudillere JP (2003) Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot. *Vitis* 42: 69-76
- Holland T, Smit B (2010) Climate Change and the Wine Industry: Current Research Themes and New Directions. *Journal of Wine Research* 21: 125-136
- Huang Z, Ough CS (1989) Effect of Vineyard Locations, Varieties, and Rootstocks on the Juice Amino Acid Composition of Several Cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture* 40: 135-139
- Hyndman D, Bauman DR, Heredia VV, Penning TM (2003) The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-Biological Interactions* 143-144: 621-631
- Jaakola L (2002) Expression of Genes Involved in Anthocyanin Biosynthesis in Relation to Anthocyanin, Proanthocyanidin, and Flavonol Levels during Bilberry Fruit Development. *Plant Physiology* 130: 729-739
- Jackson DI, Lombard PB (1993) Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality - a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 44: 409-430
- Jackson RS (2008) *Wine Science principles and applications*. Academic press
- Jaillon (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463 - 467
- Jeong S, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M (2004) Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* 167: 247 - 252
- Jez JM, Flynn G, Pennings TM (1997) A new nomenclature for the Aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical Pharmacology* 54: 639-647
- Jin Y, Penning TM (2007) Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. . *Annual review of pharmacology and toxicology* 47: 263-292
- Jones GV, Alves F (2012) Impact of climate change on wine production: a global overview and regional assessment in the Douro Valley of Portugal. *International journal of Global Warming* 4: 383-406
- 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, Webb LB (2010) Climate Change, Viticulture, and Wine: Challenges and Opportunities. *Journal of Wine Research* 21: 103-106
- Ju Y-L, Liu M, Zhao H, Meng J-F, Fang Y-L (2016) Effect of Exogenous Abscisic Acid and Methyl Jasmonate on Anthocyanin Composition, Fatty Acids, and Volatile Compounds of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) Grape Berries. *Molecules* 21: 1354
- Kanasawud P, Crouzet JC (1990) Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1. β -Carotene degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 237-243
- Kanayama Y, Mizutani R, Yaguchi S, Hojo A, Ikeda H, Nishiyama M, Kanahama K (2014) Characterization of an uncharacterized aldo-keto reductase gene from peach and its role in abiotic stress tolerance. *Phytochemistry* 104: 30-36
- Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes *Nucleic acids research* 28: 27-30
- Kavanagh KL, Klimacek M, Nidetzky B, Wilson DK (2002) The structure of apo and holo forms of xylose reductase, a dimeric aldo-keto reductase from *Candida tenuis*. . *Biochemistry* 41: 8785-8795
- Keller M (2010a) 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 (2010b) *The Science of Grapevines- Anatomy and Physiology*. Elsevier: Academic Press, Burlington, MA

- Kennedy (2002) Understanding grape berry development. Practical Winery & Vineyard. Practical winery and vineyard journal
- Kenny GJ, Harrison PA (1992) The effects of climate variability and change on grape suitability in Europe. *Journal of Wine Research* 3: 163-183
- Kingston-Smith A (2001) Resource allocation. *Trends in plant science* 6: 48-49
- Kliewer WM (1967) Concentration of tartrates, malates, glucose and fructose in the fruits of the genus *Vitis*. *American Journal of Enology and Viticulture* 18: 87-96
- Kliewer WM (1970) Free amino acids and other nitrogen fractions in wine grapes. *Journal of Food Science* 35: 17-21
- Kliewer WM (1971) Effect of day temperature and light intensity on concentration of malic and tartaric acids in *Vitis vinifera* L. grapes. *Amer Soc Hort Sci J*
- Kliewer WM, Torres RE (1972) Effect of controlled day and night temperatures on grape coloration. *American Journal of Enology and Viticulture* 23: 71-77
- Kobayashi H, Takase H, Kaneko K, Tanzawa F, Takata R, Suzuki S, Konno T (2010) Analysis of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-l-cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 61: 176-185
- Kobayashi H, Takase H, Suzuki Y, Tanzawa F, Takata R, Fujita K, Kohno M, Mochizuki M, Suzuki S, Konno T (2011) Environmental stress enhances biosynthesis of flavor precursors, S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine, in grapevine through glutathione S-transferase activation. *Journal of Experimental Botany* 62: 1325-1336
- Kohno M, Takato H, Horiuchi H, Fujita K, Suzuki S (2012) Auxin non responsive grape Aux/IAA19 is a positive regulator of plant growth. *Molecular Biology* 39 : 911–917
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H (2004) Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* 304: 982
- Koch A, Doyle C, Matthews M, Williams L, Ebeler S (2010) 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and its dependence on genotype. *Phytochemistry* 71: 2190-2198
- Kohyama K, Matsumoto T, Imoto T (2010) Refolding of an unstable lysozyme by gradient removal of a solubilizer and gradient addition of a stabilizer. *The Journal of Biochemistry* 147: 427-431
- Kontoudakis N, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, De Freitas V, Zamora F (2011) Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chemistry* 124: 767-774
- Kotseridis Y (1999) Etude de l'arôme des vins de Merlot et Cabernet Sauvignon de la région bordelaise. . Université Victor Segalen Bordeaux II.: 268
- Kotseridis Y, Razungles A, Bertrand A, Baumes R (2000) Differentiation of the aromas of merlot and Cabernet-Sauvignon wines using sensory and instrumental analysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 48: 5383-5388
- Koyama R, Marinho de Assis A, Yamamoto LY, Borges WF, Sa Borge R, Prudencio SH, Roberto SR (2014) Exogenous abscisic acid increases the anthocyanin concentration of berry and juice from "Isabel" grapes (*Vitis labrusca* L.). *HortScience* 49: 460-464
- Kozma E, Brown E, Ellis EM, Laphorn AJ (2002) The Crystal Structure of Rat Liver AKR7A1. *Journal of Biological Chemistry* 277: 16285-16293
- Kuhn N, Guan L, Dai ZW, Wu B-H, Lauvergeat V, Gomès E, Li S-H, Godoy F, Arce-Johnson P, Delrot S (2014) Berry ripening: recently heard through the grapevine. *Journal of Experimental Botany* 65: 4543-4559
- Lacampagne S, Gagné S, Gény L (2009) 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
- 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

- Laville P (1993) Unités de terroir naturel et terroir. Une distinction nécessaire pour redonner plus de cohérence au système d'appellation d'origine. Thèse du Département Cartes et Synthèses Géologiques
- Le A, S T, Je O, Kk T (2011) Stomatal Responses to Drought Stress and Air Humidity.
- Lebon E (1993) De l'influence des facteurs pédo et mésoclimatiques sur le comportement de la vigne et les caractéristiques du raisin. Application à l'établissement de critères de zonage des potentialités qualitatives en vignoble septentrional (Alsace). . Thèse, Université de Bourgogne.
- Lecourieux F, Lecourieux D, Vignault C, Delrot S (2010) A sugar inducible protein kinase, VvSK1, regulates sugar transport and accumulation in grapevine cells. *Plant Physiology* 152 : 1096–1106
- Lecourieux F, Kappel C, Lecourieux D, Serrano A, Torres E, Arce-Johnson P, Delrot S (2014) An update on sugar transport and signalling in grapevine. *Journal of Experimental Botany* 65: 821-832
- Lecourieux F, Kappel C, Pieri P, Charon J, Pillet J, Hilbert G, Renaud C, Gomès E, Delrot S, Lecourieux D (2017) Dissecting the Biochemical and Transcriptomic Effects of a Locally Applied Heat Treatment on Developing Cabernet Sauvignon Grape Berries. *Frontiers in Plant Science* 8
- Lecourieux F, Lecourieux D, Vignault C, Delrot S (2010) A sugar-inducible protein kinase, VvSK1, regulates hexose transport and sugar accumulation in grapevine cells. *Plant Physiology* 152: 1096-1106
- Levine LH, Richards JT, Wheeler RM (2009) Super-elevated CO₂ interferes with stomatal response to ABA and night closure in soybean (*Glycine max*). *Journal of Plant Physiology* 166: 903-913
- Liang Z, Wu B, Fan P, Yang C, Duan W, Zheng X, Liu C, Li S (2008) Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. *Food Chemistry* 111: 837-844
- Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF, Reisch BI (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. . *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1): 6-13
- Loewus F, Stafford H (1958) Observations on the incorporation of C¹⁴ into tartaric acid and the labeling pattern of D-glucose from an excised grape leaf administered L-ascorbic acid-6-C¹⁴. . *Plant Physiology* 33: 155-156
- Loscos N, Hernandez-Orte P, Cacho J, Ferreira V (2007) Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from nonfloral grape odorless flavor precursors fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6674-6684
- Malheiro AC, Santos JA, Fraga H, Pinto JG (2010) Climate change scenarios applied to viticultural zoning in Europe. *Climate Research* 43
- Marais J (2017) Terpenes in the aroma of grapes and wines : a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 4: 49-58
- Marais J, Hunter JJ, Haasbroek PD, Augustyn OPH (1995) Effect of canopy microclimate on the composition of Sauvignon Blanc grapes. *Proceedings - ninth australian wine industry technical conference*: 72-77
- Marcy JE, Carroll DE, Young CT (1981) Changes in free amino acid and total nitrogen concentrations during maturation of muscadine grapes (*V. rotundifolia*). *Journal of Food Science* 46: 543-547
- Marguerit E, Brendel O, Lebon E, Van Leeuwen C, Ollat N (2012) Rootstock control of scion transpiration and its acclimation to water deficit are controlled by different genes. *New Phytologist* 194: 416-429
- Martin D, Grose C, Fedrizzi B, Stuart L, Albright A, McLachlan A (2016) Grape cluster microclimate influences the aroma composition of Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry* 210: 640-647
- Mateo JJ, Jiménez M (2000) Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A* 881: 557-567
- Mathieu S, Terrier N, Procureur J, Bigey F, Gunata Z (2005) A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C¹³-norisoprenoid accumulation. *Journal of Experimental Botany* 56: 2721 - 2731
- Mazza G (1995) Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35: 341-371

- Mazza G, Fukumoto L, Delaquis P, Girard B, Ewert B (1999) Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet franc, Merlot, and Pinot noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4009-4017
- Meggio F, Prinsi B, Negri AS, Simone Di Lorenzo G, Lucchini G, Pitacco A, Failla O, Scienza A, Cocucci M, Espen L (2014) Biochemical and physiological responses of two grapevine rootstock genotypes to drought and salt treatments. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20: 310-323
- Meynhardt (1965) Biosynthesis of dicarboxylic acids through carbon dioxide fixation by an enzyme extract of Barlinka grape berries..pdf>. *South African Journal of Science* 8: 381-392
- Mindnich RD, Penning TM (2009) Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Human genomics* 3: 362-370
- Mira de Orduña R (2010) Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International* 43: 1844-1855
- Moreno J, Peinado R (2012) *Enological chemistry*. First ed. Academic Press, USA.
- Mori K, Goto-Yamamoto N, Kitayama M, Hashizume K (2007) Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany* 58: 1935 - 1945
- Mori K, Saito H, Goto-yamamoto N, Kitayama M, Kobayashi S, Sugaya S, Gemma H, Hashizume K (2005) Effects of abscisic acid treatment and night temperatures on anthocyanin composition in Pinot noir grapes. *Vitis* 44: 161-165
- Morlat R (1989) *Le terroir viticole, contribution à l'étude de sa caractérisation et de son influence sur les vins. Application aux vignobles rouges de la moyenne vallée de la Loire. Mémoire de thèse Université de Bordeaux 2. INRA éd.: 289*
- Mozzon M, Savini S, Boselli E, Thorngate JH (2016) The herbaceous character of wines. *Italian Journal of Food Science* 28: 190-207
- Murat M-L, Tominaga T, Dubourdieu D (2001) Mise en évidence de composés clefs dans l'arôme des vins rosés et clarets de bordeaux. *Journal international des sciences de la vigne et du vin* 36: 99-105
- Murcia G, Fontana A, Pontin M, Baraldi R, Bertazza G, Piccoli PN (2017) ABA and GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine. *Phytochemistry* 135: 34-52
- Murray K, Whitfield F (1975) Occurrence of 3-Alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables. *J Sci Food Agric* 26: 973-986
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual review of plant biology* 56: 165-185
- Narawongsanont R, Kabinpong S, Auiyawong B, Tantitadapitak C (2012) Cloning and characterization of AKR4C14, a rice aldo-keto reductase, from Thai Jasmine rice. . *The protein journal*. 31: 35-42
- Neto FJD, Tecchio MA, Junior AP, Vedoato BT, Lima GPP, Roberto SR (2017) Effect of ABA on colour of berries, anthocyanin accumulation and total phenolic compounds of 'Rubi' table grape (*Vitis vinifera*). *Australian Journal of Crop Science* 11: 199-205
- Núñez V, Monagas M, Gomez-Cordovés MC, Bartolomé B (2004) *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biology and Technology* 31: 69-79
- Okamoto G, Kuwamura T, Hirano K (2004) Effects of water deficit stress on leaf and berry ABA and berry ripening in Chardonnay grapevines (*Vitis vinifera*). *Vitis* 43: 15-17
- Ollat N, Brisson N, Denoyes B, Garcia de Cortazar-Atauri I, Goutouly J-P, Kleinhentz M, Launay M, Michalet R, Pieri P, Van Leeuwen C (2013) Les activités agricoles. . In : Le Treut H. (Ed.) *Prévoir pour agir, la région Aquitaine anticipe le changement climatique*. Presses Universitaires de Bordeaux.: 108-125
- Ollat N, Touzard J (2014) Stress hydrique et adaptation au changement climatique pour la viticulture et l'oenologie : le projet LACCAVE. *Innovations Agronomiques* 38: 131-141
- Owen SJ, Lafond MD, Bowen P, Bogdanoff C, Usher K, Abrams SR (2009) Profiles of abscisic acid and its catabolites in developing Merlot grape (*Vitis vinifera*) berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 60: 277-284

- Pakdel H, Sarron S, Roy C (2001) α -Terpineol from Hydration of Crude Sulfate Turpentine Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4337
- Palliotti A, Tombesi S, Silvestroni O, Lanari V, Gatti M, Poni S (2014) Changes in vineyard establishment and canopy management urged by earlier climate-related grape ripening: A review. *Scientia Horticulturae* 178: 43-54
- Pan QH, Li MJ, Peng CC, Zhang N, Zou X, Zou KQ, Wang XL, Yu XC, Wang XF, Zhang DP (2005) Abscisic acid activates acid invertases in developing grape berry. *Physiologia Plantarum* 125: 157-170
- Parker AK, Hofmann RW, van Leeuwen C, McLachlan ARG, Trought MCT (2015) Manipulating the leaf area to fruit mass ratio alters the synchrony of total soluble solids accumulation and titratable acidity of grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 21: 266-276
- Parker M, Pollnitz A, Cozzolino D, Francis I, Herderich M (2007) Identification and quantification of a marker compound for 'pepper' aroma and flavor in shiraz grape berries by combination of chemometrics and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5948 - 5955
- Pastore C, Allegro G, Valentini G, Muzzi E, Filippetti I (2017) Anthocyanin and flavonol composition response to veraison leaf removal on Cabernet Sauvignon, Nero d'Avola, Raboso Piave and Sangiovese *Vitis vinifera* L. cultivars. *Scientia Horticulturae* 218: 147-155
- Pastore C, Zenoni S, Fasoli M, Pezzotti M, Tornielli G, Filippetti I (2013) Selective defoliation affects plant growth, fruit transcriptional ripening program and flavonoid metabolism in grapevine. *BMC Plant Biology* 13: 30
- Pavlousek P (2011) Evaluation of drought tolerance of new grapevine rootstock hybrids. *Journal of Environmental Biology* 32: 543-549
- Peña-Gallego A, Hernández-Orte P, Cacho J, Ferreira V (2012) S-Cysteinylation and S-glutathionylation thiol precursors in grapes. A review. *Food Chem* 131: 1-13
- Penning TM (2004) Introduction and overview of aldo-keto reductase superfamily. *American Chemical Society Chapitre 1: 3-20*
- Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania. Aldo-Keto Reductase (AKR) Superfamily. https://www.med.upenn.edu/akr/akr_graphic.html
- Peppi MC, Fidelibus MW, Dokoozlian N (2006) Abscisic Acid Application Timing and Concentration Affect Firmness, Pigmentation, and Color of 'Flame Seedless' Grapes. *Horticultural Science* 41: 1440-1445
- Peyrot des Gachons C, Tominaga T, Dubourdieu D (2002) Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form : identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4076-4079
- Pieri P (2010a) Changement climatique et culture de la vigne: l'essentiel des impacts. In : Ademe (Ed) Changement climatique, agriculture et forêt en France: simulations d'impacts sur les principales espèces. *Le Livre Vert du projet CLIMATOR (2007-2010): 213-223*
- Pieri P (2010b) Modelling radiative balance in a row-crop canopy: Row-soil surface net radiation partition. *Ecological Modelling* 221: 791-801
- Pilati S, Bagagli G, Sonogo P, Moretto M, Brazzale D, Castorina G, Simoni L, Tonelli C, Guella G, Engelen K, Galbiati M, Moser C (2017) Abscisic Acid Is a Major Regulator of Grape Berry Ripening Onset: New Insights into ABA Signaling Network. *Frontiers in Plant Science* 8: 1093-1093
- Pineau B, Barbe J-C, Van Leeuwen C, Dubourdieu D (2007) Which impact for β -damascenone on red wines aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4103-4108
- Pomar F, Novo M, Masa A (2005) Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1094: 34 - 41
- Poni S, Bernizzoni F, Civardi S (2008) The effect of early leaf removal on whole-canopy gas exchange and vine performance of *Vitis vinifera* L. Sangiovese. *Vitis* 47: 1 - 6

- 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
- Poni S, Gatti M, Bernizzoni F, Civardi S, Bobeica N, Magnanini E, Palliotti A (2013) Late leaf removal aimed at delaying ripening in cv. Sangiovese: physiological assessment and vine performance. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19: 378-387
- Possner DRE, Kliewer WM (1985) The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* 24: 220-240
- Rapp A, Knipser W, Engel L, Ullemeyer H, Heimann W (1980) Off-flavor compounds in the berry and wine aroma of grapevine hybrids. 1. The strawberry-like flavour. *Vitis* 19 (1): 13-23
- Reddy ASN, Marquez Y, Kalyna M, Barta A (2013) Complexity of the Alternative Splicing Landscape in Plants. *The Plant Cell* 25: 3657-3683
- Reid K, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund S (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
- Reynier A (2007) *Manuel de viticulture*. Lavoisier Tec & Doc, 10e edition. ISBN 978-2743009755. 21, 23
- Ribereau-Gayon G (1968) Etude des mécanismes de synthèse et de transformation de l'acide malique, de l'acide tartrique et de l'acide citrique chez *Vitis Vinifera* L. *Phytochemistry* 7: 1471-1482
- Ribéreau-Gayon P (1959) *Recherches sur les anthocyanes des végétaux: Application au genre Vitis*. Librairie générale de l'enseignement.
- Ribereau-Gayon P, BDAL, Dubourdieu D (2000). New York: John Wiley&Sons
- Risco D, Pérez D, Yeves A, Castel JR, Intrigliolo DS (2013) Early defoliation in a temperate warm and semi-arid Tempranillo vineyard: vine performance and grape composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20: 111-122
- Robinson AL, Adams DO, Boss PK, Heymann H, Solomon PS, Trengove RD (2011) The relationship between sensory attributes and wine composition for Australian Cabernet Sauvignon wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17: 327-340
- Roehrdanz PR, Hannah L (2014) Climate Change, California Wine, and Wildlife Habitat. *Journal of Wine Economics* 11: 69-87
- Roland A (2010) Influence des phénomènes d'oxydation lors de l'élaboration des moûts sur la qualité aromatique des vins de Melon B. et de Sauvignon Blanc en Val de Loire. Doctoral dissertation, Montpellier, SupAgro: 1-219
- Rook F, Hadingham SA, Li Y, Bevan MW (2006) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, Cell and Environment* 29: 426-434
- Roujou de Boubée D, Van Leeuwen C, Dubourdieu D (2000) Organoleptic impact of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine on red Bordeaux and Loire wines. Effect of environmental conditions on concentrations in grapes during ripening. *J Agric Food Chem* 48: 4830-4834
- Ruffner HP (1982) Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: A review- Part B. *Vitis* 21: 346-358
- Ryona I, Leclerc S, Sacks GL (2010) Correlation of 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine to 3-Isobutyl-2-hydroxypyrazine during Maturation of Bell Pepper (*Capsicum annum*) and Wine Grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 9723-9730
- Ryona I, Pan BS, Intrigliolo DS, Lakso AN, Sacks GL (2008) Effects of Cluster Light Exposure on 3-Isobutyl-2-methoxypyrazine Accumulation and Degradation Patterns in Red Wine Grapes (*Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Franc). *Journal of agricultural and food chemistry* 56: 10838-10846
- Sadras VO, Moran MA, Bonada M (2013) Effects of elevated temperature in grapevine. I Berry sensory traits. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19: 95-106
- Saito S, Tsuchiya T (1984) Characteristics of n-octyl β -D-thioglucopyranoside, a new non-ionic detergent useful for membrane biochemistry. *Biochemical Journal* 222: 829-832

- Sala C, Busto O, Guasch J, Zamora F (2004) Influence of Vine Training and Sunlight Exposure on the 3-Alkyl-2-methoxypyrazines Content in Musts and Wines from the *Vitis vinifera* Variety Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3492-3497
- Saliba AJ, Bullock J, Hardie WJ (2009) Consumer rejection threshold for 1,8-cineole (eucalyptol) in Australian red wine. *Food Quality and Preference* 20: 500-504
- Samson F, Brunaud V, Duchêne S, De Oliveira Y, Caboche M, Lecharny A, Aubourg S (2004) FLAGdb++: a database for the functional analysis of the Arabidopsis genome. *Nucleic Acids Research* 32 : D347–D350
- San-Miguel T, Pérez-Bermúdez P, Gavidia I (2013) Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *SpringerPlus* 2: 89
- Schreier P, Drawert F, Junker A (1976) Identification of volatile constituents from grapes. . *Journal of agricultural and food chemistry*. 24: 331-355.
- Schultz H, Stoll M (2010) Some critical issues in environmental physiology of grapevines: future challenges and current limitations. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16: 4-24
- Schultz HR, Jones G (2010) Climate induced historic and future changes in viticulture. *Journal of Wine Research* 21: 137-145
- Ségurel M (2005) Contribution des précurseurs glycosidiques et du sulfure de diméthyle des baies de *Vitis vinifera* L. cv Grenache noir et Syrah à l'arômes des vins de la vallée du Rhône. *Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, Montpellier*: 248
- Sengupta D, Naika D, Reddy AR (2015) Plant aldo-keto reductases (AKRs) as multi-tasking soldiers involved in diverse plant metabolic processes and stress defense: A structure-function update. *Journal of Plant Physiology* 179: 40-55
- Serra I, Strever A, Myburgh PA, Deloire A (2014) Review: the interaction between rootstocks and cultivars (*Vitis vinifera* L.) to enhance drought tolerance in grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20: 1-14
- Shepherd G (2006) Smell images and the flavor system in the human brain: review. *Nature* 444: 316-321
- Simpson PJ, Tantitadapitak C, Reed AM, Mather OC, Bunce CM, White S, Ride JP (2009) Characterization of two novel aldo-keto reductases from Arabidopsis: expression patterns, broad substrate specificity, and an open active-site structure suggest a role in toxicant metabolism following stress. . *Journal of molecular biology* 392: 465-480
- Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q (2009) Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Science* 18: 936-948
- Soubeyrand E, Basteau C, Hilbert G, van Leeuwen C, Delrot S, Gomès E (2014) Nitrogen supply affects anthocyanin biosynthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet-Sauvignon berries. *Phytochemistry* 103: 38-49
- Soyer Y, Koca N, Karadeniz F (2003) Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis* 16: 629-636
- Šuklje K, Lisjak K, Baša Česnik H, Janeš L, Du Toit W, Coetzee Z, Vanzo A, Deloire A (2012) Classification of Grape Berries According to Diameter and Total Soluble Solids To Study the Effect of Light and Temperature on Methoxypyrazine, Glutathione, and Hydroxycinnamate Evolution during Ripening of Sauvignon blanc (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 9454-9461
- Swanson CA, El-Shishiny EDH (1958) Translocation of sugars in the Concord grape. *Plant Physiology* 33: 33-37
- Sweetman C, Sadras VO, Hancock RD, Soole KL, Ford CM (2014) Metabolic effects of elevated temperature on organic acid degradation in ripening *Vitis vinifera* fruit. *Journal of Experimental Botany* 65: 5975-5988
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 54: 733-749

- Tarara JM, Lee J, Spayd SE, Scagel CF (2008) Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 59: 235-247
- Tardaguila J, Diago MP, De Martinez Toda F, Poni S, Vilanova M (2008) Effects of timing of leaf removal on yield, berry maturity, wine composition and sensory properties of CV. grenache grown under non irrigated conditions. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin* 42: 221-229
- Tatem AJ (2005) Global climate matching: Satellite imagery as a tool for mapping vineyard suitability. *Journal of Wine Research* 16: 19-32
- Taureilles-Saurel C, Romieu C, Robin J, Flanzky C (1995) Grape (*Vitis vinifera* L.) malate dehydrogenase: II: Characterization of the major mitochondrial and cytosolic isoforms and their role in ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* 46: 29 - 36
- Thibon C, Böcker C, Shinkaruk S, Moine V, Darriet P, Dubourdieu D (2016) Identification of S-3-(hexanal)-glutathione and its bisulfite adduct in grape juice from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc as new potential precursors of 3SH. *Food Chem* 199
- Thibon C, Cluzet S, Mérillon JM, Darriet P, Dubourdieu D (2011) 3-Sulfanylhexanol precursor biogenesis in grapevine cells: the stimulating effect of *Botrytis cinerea*. *J Agric Food Chem* 59
- Thibon C, Marullo P, Claisse O, Cullin C, Dubourdieu D, Tominaga T (2008) Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation *FEMS Yeast Research* 8: 1076-1086
- Thompson JD, Higgins DG, Gibso TJ (1984) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680
- Tominaga T, Darriet P, Dubourdieu D (1996) Identification de l'acétate de 3-mercaptohexanol, composé à forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon. *Vitis* 35: 207-210
- Tominaga T, Dubourdieu D (1997) Identification of 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one from the Box Tree (*Buxus sempervirens* L.) and Broom (*Sarothamnus scoparius* (L.) Koch.). *Flavour and fragrance journal* 12: 373-376
- Tominaga T, Furrer A, Henry R, Dubourdieu D (1998a) Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and fragrance journal* 13: 159-162
- Tominaga T, Murat M-L, Dubourdieu D (1998b) Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. CV. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1044-1048
- Torregrosa L, Violet S, Adivèze A, Iocco-Corena P, Thomas MR (2015) Grapevine (*Vitis vinifera* L.). In: Wang K. (eds) *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology*. Springer, New York, NY 1224
- Tsegay D, Amsalem D, Almeida M, Crandles M (2014) Responses of grapevine rootstocks to drought stress. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 6: 1-6
- Unterlinner B, Lenz R, Kutchan TM (1999) Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. *The Plant Journal* 18: 465-475
- Van Leeuwen C, Darriet P (2016) The Impact of Climate Change on Viticulture and Wine Quality. *Journal of Wine Economics* 11: 150-167
- van Leeuwen C, Roby J-P, Alonso-Villaverde V, Gindro K (2012) Impact of clonal variability in *Vitis vinifera* Cabernet franc on grape composition, wine quality, leaf blade stilbene content, and downy mildew resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 19-24
- van Leeuwen C, Schultz HR, Garcia de Cortazar-Atauri I, Duchêne E, Ollat N, Pieri P, Bois B, Goutouly J-P, Quénot H, Touzard J-M, Malheiro AC, Bavaresco L, Delrot S (2013) Why climate change will not dramatically decrease viticultural suitability in main wine-producing areas by 2050. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: E3051-E3052

- Vidal Sp, Francis L, Guyot S, Marnet N, Kwiatkowski M, Gawel R, Cheynier Vr, Waters EJ (2003) The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 564-573
- Vitrac X, Larronde F, Krisa S, Decendit A, Deffieux G, Mérillon JM (2000) Sugar sensing and Ca²⁺-calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry* 53: 659-665
- Walker A, Lee E, Bogs J, McDavid D, Thomas M, Robinson S (2007) White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant Journal* 49: 772 - 785
- Walter MH, Strack D (2011) Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. *Natural Product Reports* 28: 663
- Wang Y, Ho C (2008) Formation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone through methylglyoxal: A maillard reaction intermediate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (16): 7405-7409
- Webb LB, Watterson I, Bhend J, Whetton PH, Barlow EWR (2013) Global climate analogues for winegrowing regions in future periods: projections of temperature and precipitation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19: 331-341
- Webb LB, Whetton PH, Barlow EWR (2007) Modelled impact of future climate change on the phenology of winegrapes in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 13: 165-175
- Weurman C (1961) Gas-Liquid Chromatographic studies on enzymatic formation of volatile compounds in raspberries. *Food technology* 15: 531
- Wheeler S, Loveys B, Ford C, Davies C (2009) The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15: 195-204
- Whitehead IM, Muller BL, Dean C (1995) Industrial use of soybean lipoxygenase for the production of natural green note flavor compounds. *Cereal Foods World* 40: 193-197
- Wolkovich EM, García de Cortázar-Atauri I, Morales-Castilla I, Nicholas KA, Lacombe T (2018) From Pinot to Xinomavro in the world's future wine-growing regions. *Nature Climate Change* 8: 29-37
- Wood C, Siebert T, Parker M, Capone D, Elsey G, Pollnitz A, Eggers M, Meier M, Vossing T, Widder S (2008) From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3738 - 3744
- Wu B-H, Niu N, Li J-H, Li S-H (2013) Leaf:fruit ratio affects the proteomic profile of grape berry skins. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 138: 416-427
- Xie S, Song C, Wang X, Liu M, Zhang Z, Xi Z (2015) Tissue- Specific Expression Analysis of Anthocyanin Biosynthetic Genes in White- and Red-Fleshed Grape Cultivars. *Molecules* 20: 22767-22780
- Yonekura-Sakakibara K, Nakayama T, Yamazaki M, Saito K (2008) Modification and Stabilization of Anthocyanins. In: Winefield C., Davies K., Gould K. (eds) *Anthocyanins*. Springer, New York, NY
- Young P, Eyeghe-Bickong H, Kari du Plessis E, Dan A (2010) Grapevine plasticity in response to an altered microclimate: Sauvignon blanc modulates specific metabolites in response to increased berry exposure. *Plant Physiology* 170: 1235-1254
- Young PR, Lashbrooke JG, Alexandersson E, Jacobson D, Moser C, Velasco R, Vivier MA (2012) The genes and enzymes of the carotenoid metabolic pathway in *Vitis vinifera* L. *BMC Genomics* 13

Annexes

Annexe 1: Descriptions olfactives et seuil de perception gustative dans l'eau des principaux MPs selon Sala et al. (2004).

| Alkylmethoxyypyrazine | Description olfactive | Seuil de perception dans l'eau (ng L ⁻¹) |
|-----------------------|---|--|
| ETMP | Pomme de terre crue, terreux, vert, poivron | 400 – 425 |
| SBMP | Vert, feuille de lierre, poivron | 1 – 2 |
| IPMP | Terreux, asperge cuite, poivron vert | 2 |
| IBMP | Terreux, vert, poivron, moisi | 0,5 – 2 |

Annexe 2: Système Gateway®

Gateway® Recombination Reactions

The Gateway® Technology uses the lambda recombination system to facilitate transfer of heterologous DNA sequences (flanked by modified *att* sites) between vectors (Hartley *et al.*, 2000). Two recombination reactions constitute the basis of the Gateway® Technology:

- **BP Reaction:** Facilitates recombination of an *attB* substrate (*attB*-PCR product or a linearized *attB* expression clone) with an *attP* substrate (donor vector) to create an *attL*-containing entry clone (see diagram below). This reaction is catalyzed by BP Clonase™ enzyme mix.



- **LR Reaction:** Facilitates recombination of an *attL* substrate (entry clone) with an *attR* substrate (destination vector) to create an *attB*-containing expression clone (see diagram below). This reaction is catalyzed by LR Clonase™ enzyme mix.



Novagen®

Gateway® Nova pCOLA-2-DEST™ Vector

TB491 0208

The Gateway® Nova pCOLA-2-DEST™ vector carries the COLA replicon from ColA and the kanamycin resistance gene. This DEST vector is NOT compatible with pENTR vectors derived from pDONR221 or other pENTR vectors carrying Kan^R on their backbone. It is compatible with pENTR vectors created using pDONR vectors that do not carry Kan^R on their backbone, such as pDONR223, the pDONR vector used in the human ORFeome project (Rual 2004). pEXPR recombinants created using Gateway Nova pCOLA-2-DEST can be used for coexpression with Gateway Nova pET-DEST vectors carrying the ColE1 replicon and Amp^R gene.

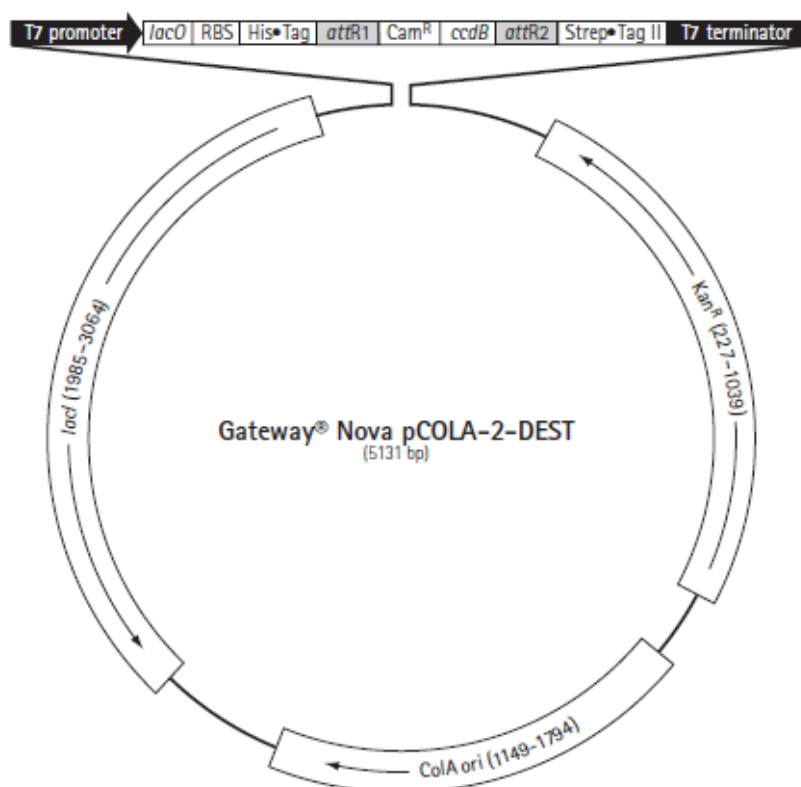
The Gateway Nova pCOLA-2-DEST is designed to create expression clones (pEXPR) that are fused to an N-terminal His•Tag® coding sequence. If the pENTR clone lacks a stop codon and is appropriately designed for a C-terminal fusion, the target gene in the resulting pEXPR clone will also be fused to a C-terminal Strep•Tag® II coding sequence (Skerra 2000). The presence of "gentle elution" tags at both the N- and C-termini is ideal for dual purification strategies designed to isolate full-length fusion proteins (Fiedler 2002).

Fiedler, M. et al. 2002. *Protein Eng.* 15, 931.

Rual, J. F. et. al. 2004. *Genome Res.* 14, 2128.

Skerra, A. and Schmidt, T.G.M. 2000. *Meth. Enzymol.* 326, 271.

| Feature | Location | Cat No. |
|---------------------------------|-----------|---------|
| Gateway® Nova pCOLA-2-DEST™ DNA | | 71855-3 |
| Kan ^R | 227-1039 | |
| ColA ori | 1149-1794 | |
| <i>lacI</i> coding sequence | 1985-3064 | |
| T7 promoter | 3188-3204 | |
| T7 transcription start | 3205 | |
| His•Tag® coding sequence | 3281-3298 | |
| <i>attR1</i> | 3302-3426 | |
| Cam ^R | 3535-4191 | |
| <i>ccdB</i> | 4536-4838 | |
| <i>attR2</i> | 4882-5006 | |
| Strep•Tag® II coding sequence | 5014-5037 | |
| T7 terminator | 5078-5125 | |



USA and Canada

Tel (800) 526-7319
novatech@novagen.com

France
Freephone
0800 126 461

Germany
Freecall
0800 100 3496

Europe

Ireland
Toll Free
1800 409 445

United Kingdom
Freephone
0800 622 935

All other
European Countries
+44 115 943 0840

All Other Countries

Contact Your Local Distributor
www.novagen.com
novatech@novagen.com

techservice@merckbio.eu

www.novagen.com

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR HUMAN OR DIAGNOSTIC USE.

Annexe 4 : composition du Milieu 2x YT

Pour 1L de milieu de culture liquide :

- 16g de Bacto-tryptone
- 10g d'extrait de levure
- 5g de NaCl

Puis mesurer et ajuster le pH à 7.

- Autoclaver pendant **20min**

Ajouter les antibiotiques si nécessaire une fois que la bouteille est refroidie sous hotte aspirante.

Annexe 5 : Composition milieu LGO

Pour 1L de milieu de culture :

- 100mL LGO Macroéléments (10X)
- 10mL MS Microéléments (100X)
- 1mL Vitamines renforcées (1000X)
- 5mL Fe-EDTA (200X)
- 25g Sucrose
- 0.25g Caséine

Puis mesurer et ajuster le pH à 6.

- 10g Agar
- Autoclaver pendant 20min

