



**HAL**  
open science

**La baie au sein d'une vendange asynchrone Un nouveau paradigme vers l'interprétation quantitative de l'alternance typique des sucres et acides en tant qu'osmoticums et substrat respiratoires majeurs lors du développement bimodal du raisin**

Rezk Shahood

► **To cite this version:**

Rezk Shahood. La baie au sein d'une vendange asynchrone Un nouveau paradigme vers l'interprétation quantitative de l'alternance typique des sucres et acides en tant qu'osmoticums et substrat respiratoires majeurs lors du développement bimodal du raisin. Sciences agricoles. Montpellier SupAgro, 2017. Français. NNT : 2017NSAM0025 . tel-04548990

**HAL Id: tel-04548990**

**<https://theses.hal.science/tel-04548990>**

Submitted on 16 Apr 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En [BIDAP – Biologie, Interactions, Diversité Adaptative des Plantes]

École doctorale [GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau]

École doctorale [EDEG – Économie et Gestion]

Portée par l'Université de Montpellier

Unité de recherche [Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales  
(AGAP) – Diversité, Adaptation et Amélioration de la Vigne (DAAV)]

## La baie au sein d'une vendange asynchrone :

Un nouveau paradigme vers l'interprétation quantitative de l'alternance typique des sucres  
et acides en tant qu'osmoticums et substrats respiratoires majeurs lors du développement  
bimodal du raisin.

Présentée par Rezk SHAHOOD

Le 26 Octobre 2017

Sous la direction de Charles Romieu

Devant le jury composé de

M. Christian <b>CHERVIN</b> , Professeur, ENSA Toulouse	[Rapporteur]
M. Éric <b>GOMES</b> , Professeur, Université de Bordeaux	[Rapporteur]
M. Éric <b>DUCHÊNE</b> , Ingénieur de recherche, INRA-Colmar	[Examineur]
M. Philippe <b>LOBIT</b> , Professeur, Universidad Michoacana, Mexico	[Président du jury]
M. Laurent <b>TORREGROSA</b> , Professeur, Montpellier SupAgro	[Examineur]
M. Charles <b>ROMIEU</b> , Chargé de recherches, INRA Montpellier	[Directeur de thèse]



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



## ***Abstract***

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the most important fruit crops in the world, with a majority wine destination in France and Europe. The grape berry is a non-climacteric fruit that necessarily ripens on the vine. It presents a large heterogeneity in size and composition within the population of developing berries. The origin of this heterogeneity is largely unknown; its component related to asynchrony would cause a systematic underestimation of metabolic fluxes in fruit and artifactual correlations between various developmental traits.

Our work aims firstly to revisit the quantitative links between sugar import, growth, malate metabolism and respiration at individual berry scale, and overcome statistical biases on asynchronous population. We have also sought to develop a respiration measurement method on berry still linked to the vine, in order to detect the signature of the activation of the import of photo-assimilate and of malate breakdown on berry respiratory demand, at the onset of ripening. Finally, we have tested the stability of these relationships by studying the impact of the pruning system.

Experiments on single berry development have led to i) determine the asynchrony and the volume as the main causes of berry heterogeneity, ii) measure the real duration of ripening in individual berries within the population. Respiration decreased rapidly with malate concentration during ripening. Malate is the major respiratory substrate at the very beginning of ripening, and then the hexoses contribute mostly to respiration throughout ripening. Contrary to what had been expected, interruption of sugar import slightly increases the respiratory demand of the berry. This demonstrates that the import and vacuolar storage of sugars, as major metabolic fluxes in ripening fruit, is optimized in terms of energy efficiency, which provides arguments about the underlying organization of this pathway at molecular level.

## *Résumé*

La vigne (*Vitis vinifera* L.) est une des cultures fruitières les plus importantes dans le monde, avec une destination vinique majoritaire en France et en Europe. Le raisin est un fruit non climactérique qui mûrit nécessairement sur la vigne. Elle présente une très grande hétérogénéité en taille et en composition au sein de la population. L'origine de cette hétérogénéité est largement inconnue, sa composante en terme d'asynchronie serait à l'origine d'une sous-estimation systématique des flux métaboliques dans le fruit et de corrélations artefactuelles entre différents traits au cours du développement.

Nos travaux visent en premier lieu à revisiter les liens quantitatifs entre import des sucres, croissance, métabolisme du malate et respiration à l'échelle de la baie, en s'affranchissant des biais statistiques sur population asynchrone. Nous nous sommes également attachés à mettre au point une méthode de mesure de respiration sur baie liée à la plante, afin de détecter la signature de l'activation brutale de l'import des photo-assimilats et de la consommation du malate sur la demande respiratoire du fruit, lors de l'initiation du mûrissement. Enfin, nous avons éprouvé la stabilité de ces relations, en étudiant l'impact du système de conduite sur le synchronisme ou le chemin suivi lors de la maturation des baies individuelles.

Les expériences réalisées sur le développement de la baie unique ont conduit à déterminer l'asynchronie et le volume comme causes principales de l'hétérogénéité des baies, et à mesurer la vitesse réelle de développement des baies uniques, au sein de la population. La respiration diminue rapidement avec la concentration en malate pendant la maturation. Le malate est le substrat respiratoire majeur au tout début du mûrissement, puis les hexoses contribuent majoritairement à la respiration tout au long de la maturation. Contrairement à ce qui était attendu, l'interruption de l'import des sucres augmente légèrement la demande respiratoire de la baie. Ceci démontre que l'import et le stockage vacuolaires des sucres, en tant que flux métaboliques majeurs du fruit mûrissant, sont optimisés sur le plan énergétique, ce qui apporte des arguments concernant l'organisation sous-jacente de cette voie sur le plan moléculaire.

## *Remerciements*

Je commencerai en remerciant chaleureusement mon encadrant de thèse Charles Romieu pour sa qualité humaine, son gentillesse, son enthousiasme, sa disponibilité, sa curiosité, sa rigueur scientifique et sa confiance, qui m'a toujours aidé. Il était comme un père qui pousse son fils à aller le plus loin possible. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance et ma gratitude pour ses conseils, ses critiques constructives et son rôle majeur dans la réalisation de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements aux différents membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Un très grand merci à Laurent Torregrosa de m'avoir donné l'accès aux micro-vignes, sans lesquelles les mesures de respiration sur baies attachées auraient été impossibles. Laurent m'a toujours écouté avec bienveillance et aidé à surmonter mes craintes. Je le remercie de m'avoir soutenu et encouragé à poursuivre ma carrière dans la recherche en viticulture.

Je fais également part de ma reconnaissance aux membres de mon comité de thèse qui ont apporté un regard extérieur ainsi que de précieux conseils qui ont permis d'améliorer la qualité de ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur Jean-Pierre Péros et toute son équipe AGAP-DAAV pour m'avoir accueilli et pour tout le temps qu'il a su m'octroyer durant mon séjour à Montpellier.

Je remercie mon pays « Syrie » pour le financement de mes études en France durant les 5 dernières années.

Un très grand merci à Philippe Chatelet pour m'avoir soutenu, encouragé et avoir corrigé mes articles.

Un très grand merci à Marc Farnos, Gilbert Lopez, Valérie Miralles, Angélique Adivèze pour le suivi et la préparation du matériel végétal, l'échantillonnage et l'aide pendant les manips.

Merci à mon prédécesseur Markus Rienth pour nos discussions et échanges scientifiques pendant la première année de ma thèse et lors d'occasions plus ponctuelles.

Merci à tous les doctorants ainsi que les nouveaux arrivants que j'ai côtoyés au cours de mes quatre années de thèse.

Un trop grand merci à ma femme Minas Shahood qui m'a accompagné à Montpellier pendant ma dernière année de thèse et qui était toujours là pour moi si j'avais besoin de

soutien ou de motivation. Merci également à mon fils Hamza de m'avoir permis d'être Papa 5 mois avant la soutenance, à l'issue de 7 mois de grossesse (^\_\_^).

Un grand merci à ma mère, qui même de loin n'a cessé de m'encourager tout au long de ma thèse, à mes frères et sœurs pour leur précieux soutien et tous les fous rires qu'on a partagé (Je mange bien, je bois bien et je dors bien ...etc.). Enfin, une pensée pour mes amis en Syrie et en France, Majd, Manal, Nabil, Nadine, Roba, Samer, Ammar, Hassan, Mai, Batool, Antoine, Catherina qui m'ont encouragé, soutenu et sans lesquels je n'aurais jamais fini ce travail et qui partageront ma vie encore pendant longtemps : je suis et je serai toujours fier de vous avoir à mes côtés.

# Sommaire

Abstract.....	I
Résumé.....	II
Remerciements.....	III
Figures.....	VIII
Tables.....	XI
Figures Supplémentaires .....	XI
Tables suplimentaires.....	XIII
Annexes.....	XIII
Introduction générale .....	1
Chapitre 1. Etude bibliographique .....	4
1. Cycle de développement de la vigne.....	5
2. Cycle de développement de la baie .....	7
2.1. <i>La phase verte</i> .....	7
2.2. <i>Période de latence</i> .....	8
2.3. <i>Phase de la maturation</i> .....	8
3. xylème et phloème .....	10
4. Flux d'eau .....	12
5. Les sucres .....	15
5.1. <i>Accumulation des sucres</i> .....	15
5.2. <i>Transport des sucres</i> .....	16
5.2.1. <i>Les transporteurs membranaires</i> .....	19
5.2.2. <i>Transporteurs de sucres</i> .....	19
5.2.2.1. <i>Transporteurs de disaccharides</i> .....	20
5.2.2.2. <i>Transporteurs de monosaccharides (MST-like) et de polyols</i> .....	24
5.2.2.3. <i>Transporteurs SWEETs</i> .....	26
5.3. <i>Les invertases</i> .....	27
5.4. <i>Les pompes à protons</i> :.....	29
5.5. <i>Métabolisme des Sucres</i> .....	31
6. Acidité et métabolisme du malate .....	35
6.1. <i>Les voies synthétiques du malate</i> .....	36
6.1.1. <i>Glycolyse des sucres</i> .....	36

6.1.2. <i>La photosynthèse</i> .....	37
6.1.3. <i>Cycle des acides tricarboxyliques</i> .....	37
6.1.4. <i>Cycle de glyoxylate</i> .....	37
6.2. <i>Les voies de la dégradation du malate</i> .....	39
6.2.1. <i>Gluconéogenèse</i> .....	39
6.2.2. <i>La respiration</i> .....	39
6.2.3. <i>La fermentation</i> .....	40
Problématiques et objectives de la thèse .....	41
Chapitre 2. How fast does a single <i>Vitis vinifera</i> L. berry ripen: Water, sugar and acids fluxes revisited.....	45
Abstract.....	47
Introduction.....	48
Materials and methods .....	50
<i>Plant material</i> .....	50
<i>Sampling for primary metabolism analyses</i> .....	50
<i>Cluster development monitoring</i> .....	51
<i>Individual berry growth</i> .....	51
<i>Sugar and organic acid content determination</i> .....	51
<i>Firmness and color</i> .....	52
<i>Normalization of berry growth</i> .....	52
Results.....	52
<i>Asynchronous single berry development within bunches at the onset of ripening</i> .....	52
<i>Average berry growth at bunch level</i> .....	54
<i>Evolution of berry growth at fruit level</i> .....	56
<i>Developmental changes in sugar, dicarboxylates and growth in unsynchronized clusters and individual berries</i> .....	57
<i>Asynchrony in softening and berry heterogeneity</i> .....	60
Discussion.....	63
Conclusion.....	72
Références.....	73
Chapitre 3. Respiration and bioenergetics of sugar import and malate breakdown in ripening berries.....	98
Abstract.....	101
Introduction.....	102



Materiel and methods .....	104
<i>Plant material</i> .....	104
<i>Measurement of O2 uptake in detached berry samples</i> .....	104
<i>Measurement of respiration of Individual berries attached to the vine</i> .....	105
<i>Control Samples</i> .....	105
<i>Sugar and organic acids analyses</i> .....	105
Results and discussion.....	106
<i>Sugar import and malate breakdown in synchronized ripening berries</i> .....	106
<i>Effect of temperature and developmental stage on berry respiration</i> .....	108
<i>Activation energy of O<sub>2</sub> reduction decreases during berry ripening</i> .....	111
<i>Energy efficiency of photoassimilate partitioning in developing berries.</i> .....	118
References.....	121
Chapitre 4. Impact de la taille minimal aux flux des Sucres, acides organiques et eau au cours de la maturation des baies de vigne.....	139
Résumé.....	140
Introduction.....	140
Matériels et méthodes.....	142
<i>Matériel végétal</i> .....	142
<i>Sucre et acides organiques</i> .....	143
Résultats et discussion .....	144
Références.....	154
Conclusion générale et les limites .....	158
Perceptives....	175
Références.....	177

*Figures:*

Figure 1. 1.	Stades phénologiques de la vigne d'après Meier (2001).....	6
Figure 1. 2.	Cycle de développement d'une baie moyenne au cours de temps. ....	9
Figure 1. 3.	Les voies sym-plastique et apo-plastique dans le phloème des plantes.....	11
Figure 1. 4.	Les flux calculé du xylème, du phloème et de la transpiration de l'eau, pour les baies du raisin irriguées.....	14
Figure 1. 5.	Transport du saccharose de la source au puits .....	18
Figure 1. 6.	Transporteurs du sucre et les pompes à protons situés à la membrane plasmique et vacuolaire.....	21
Figure 1. 7.	Arbre phylogénétique des transporteurs de saccharose.....	23
Figure 1. 8.	Arbre phylogénétique présente la distribution des protéines SWEET.....	27
Figure 1. 9.	Changements des contenus et des activités de l'invertase acide pendant le développement du raisin d'après Zhang et al. (2006). ....	28
Figure 1. 10.	Compartimentation des sucres dans une cellule puits de plantes.....	33
Figure 1. 11.	Les voies métaboliques potentielles de la glycolyse du saccharose chez les cellules végétales.....	34
Figure 1. 12.	Les voies métaboliques possibles pour la synthèse et la dégradation du malate dans la cellule du fruit).....	38
Figure 1. 13.	Cinétique de croissance et d'accumulation des sucres de populations de baies de Syrah en cours de maturation. ....	42
Figure 1. 14.	Cinétique de croissance d'une baie unique du cultivar Doradillo d'après Coombe 1984. ....	43
Figure 2. 1.	Berry heterogeneity in a Cabernet Sauvignon cluster harvested at mid-veraison.....	53
Figure 2. 2.	Average Pinot Meunier berry volume differs among clusters. . ....	55
Figure 2. 3.	(a) Normalized volume of 10 individual berries (b) Duration of phase III growth period (ripening) .....	56
Figure 2. 4.	Average fruit weight per cluster (a) or (b) single berry fruit weight of Pinot Meunier.....	58
Figure 2. 5.	Malate breakdown during the sugar accumulation period in Pinot Meunier berries.....	59

---

Figure 2. 6. Malate breakdown during the sugar accumulation period in individual Syrah berries.....	61
Figure 2. 7. Developpment of synchronized berries. Berry weight (A), day after softening (B), malate and sugar accumulation (C) of Syrah as a function of total solutes concentration as proxy for osmotic pressure.....	62
Figure 2. 8. Kinetics of malate breakdown (closed circles), sugar loading (gray squares) and berry growth (open circles) of ripening Syrah berries.....	64
Figure 2. 9. Malate breakdown with respect to sugar accumulation in an imaginary berry (Nberry) that weighs 1 kg at maturity.....	66
Figure 2. 10. Kinetics of sugar accumulation (a, d, g), malate breakdown (b, e, h) and berry growth (c, f, i) during ripening of individual berries.....	68
Figure 3. 1. Berry development as a function of days after softening. Each sample corresponds to average berries sorted by density.....	107
Figure 3. 2. Impact of temperature on respiratory metabolism as a function of sugar accumulation.....	109
Figure 3. 3. Impact of temperature on respiration of homogenous berries samples during development.....	112
Figure 3. 4. Respiratory flux of single berries at 25°C (A) Malate (closed circles) and sugar (open circles) (B) O <sub>2</sub> uptake of attached berries (open circles) and detached/attached berry O <sub>2</sub> uptake ratio (closed circles).....	115
Figure 3. 5. (A) Normalized O <sub>2</sub> uptake at 25°C and (B) normalized growth of attached ML1 microvine berry.....	117
Figure 3. 6. Respiratory flux and change in respiratory substrate in the developping berry as a function of days after softening.....	119
Figure 4. 1. Cinétiques des flux de la baie du Syrah de deux tailles différentes (normale (ouverte), minimale (fermé)) pendant la maturation.....	146
Figure 4. 2. Poids des baies du Syrah à l'échelle de la baie individuelle de deux modes de conduite.....	150
Figure 4. 3. Développement des baies du Syrah de deux mode différents (normale : cercles, minimale : triangles) en fonction des solutés totale.....	151
Figure 4. 4. Dégradation du malate en fonction de l'accumulation du sucre d'une baie pesant 1 kg à la maturité.....	152

---

Figure 4. 5.	Le rapporte du fructose/ glucose.....	150
Figure 4. 6.	Cinétique du tartrate du Syrah à l'échelle de la baie individuelle de deux modes de conduite.....	148
Figure 5. 1.	Le déroulement de la thèse vers la baie modèle.....	158
Figure 5. 2.	Durée de la floraison des grappes de trois cultivars.....	162
Figure 5. 3.	Modèle de la maturation d'une baie individuelle.....	165
Figure 5. 4.	Relation entre l'hétérogénéité en malate/tartrate (A) et l'hétérogénéité en poids (B) des baies du cultivar de Syrah en fonction des solutés majeurs. ....	168
Figure 5. 5.	Les voies possibles de transport des sucres.....	174

## ***Tables***

Table 3. 1. Change in 25 °C activation energy of O <sub>2</sub> reduction (E <sub>a</sub> ) and in dynamic response of E <sub>a</sub> to temperature (δ) during berry development.....	113
Table 4. 1. Variables données obtenues des vignes avec la taille minimale et normale pendant la saison 2015.....	145
Table 5. 1. Phase de la maturation à l'échelle d'une baie individuelle et d'une baie moyenne.....	167

## ***Figures supplémentaires***

Figure 2. 11. Model of individual berry ripening.....	71
Figure. 2. S1. (a) Mean temperature variations.....	81
Figure. 2. S2. Normalized average berry volume of <i>V. vinifera</i> clusters flowering at different dates.....	82
Figure. 2. S3. Normalized Average Pinot Meunier berry volume in one cluster, plotted as a function of days after flowering.....	83
Figure. 2. S4. Development of 20 Pinot Meunier clusters.....	84
Figure. 2. S5. Development of Cabernet Sauvignon (a) and Pinot Noir (b) individual berries.....	85
Figure. 2. S6. Relation between maximum and veraison berry volumes.....	86
Figure. 2. S7. Malate concentration (black circles) and berry weight (gray circles) of Pinot Meunier cultivar.....	87
Figure. 2. S8. Berry weight (gray circles) and malate breakdown (closed circles) in Pinot Meunier berries with respect to total solute concentration.....	88
Figure. 2. S9. (a) Development pattern (closed circles) and normalized sugar accumulation (gray circles) in an imaginary Pinot Meunier berry, and (b) Glu/Fru ratio, with respect to total solute concentration.....	89
Figure. 2. S10. Development and Malate breakdown of Syrah berries with (a) individually determined DAS and (b) undefined individual DAV.....	90
Figure. 2. S11. Relationship between DAS and total solutes concentration (Malate + Tartrate + Sugars) in Syrah berries.....	91

---

Figure. 2. S12. Sugar accumulation in various cultivars, obtained by recalculating the evolution of sugars per berry.....	92
Figure. 2. S13. Malic acid breakdown in various cultivars, obtained by recalculating the evolution of malate per berry.....	93
Figure. 2. S14. Accumulation of sugars at constant volume at the end of ripening: a possible artifact in non-synchronized berries.....	94
Figure S3. 1. (A): Respiration chamber used for attached single berry. (B): O <sub>2</sub> uptake trace obtained with the OXY- mini.....	127
Figure S3. 2. Attached berry of “ML1 microvines” used for periodic respiration measurement shows usual development pattern .....	128
Figure S3. 3. Distribution of Pinot berries in different density classes .....	129
Figure S3. 4. Malate and sugar respiration in different stages as a function of the temperature.....	130
Figure S3. 5. Impact of temperature on the duration of malate breakdown before reaching a minimal 50 mEq threshold, calculated from O <sub>2</sub> consumed and CO <sub>2</sub> emitted.....	131
Figure S3. 6. Respiratory flux in different stages.....	132
Figure S3. 7. Correlation between the overall activation energy for oxygen reduction (E <sub>0</sub> ) and the parameter $\delta$ , which describes the dynamic adjustment of E <sub>0</sub> to temperature, starting from the reference temperature 288 K (15°C). .....	133
Figure S3. 8. Energy requirement for sugar loading in ripening berries depends on the precise site of sugar inversion in the apoplasmic pathway and the relative fluxes between SWEETs and energized transporters.....	134
Figure S3. 9. Variations in $\Delta G_{ATP}$ during Pinot Meunier berry development.....	135
Figure S3. 10. Correlation between respiration and malic acid in single ML1 microvine berries.....	136
Figure S3. 11. Cycle of photos taken for one berry of “ML1 microvines” during respiration measurement in 2015. ....	137

## *Tables supplémentaires*

Table.2. S1. Berry development in Zinfandel and Pinot Meunier clusters flowering at different dates.	95
Table.2. S2. Rate of sugar accumulation in different cultivars recalculated from literature data.....	96
Table.2. S3. Rate of malate breakdown of different cultivars recalculated from literature data.....	97

## *Annexes*

<i>Annex S3. 1. V-ATPase sur le tonoplaste. Les pompes utilisent l'énergie pour le transfert de chaque H<sup>+</sup> du cytoplasme vers la vacuole. ....</i>	<i>100</i>
<i>Annex S3. 2. Modèle énergétique de contrôle du pH par l'entrée des sucres. ....</i>	<i>100</i>
<i>Annex S3. 3. Calculation of substrate flux in berries depending on the known parameters: Consumed malic acid, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>.....</i>	<i>138</i>

## ***Introduction générale :***

Le raisin est un fruit charnu non climactérique qui mûrit nécessairement sur la vigne, à la faveur d'une accélération du déchargement phloémien par la voie apoplasmique (Keller et al. 2014 ; Zhang et al. 2006). L'accumulation des hexoses correspond à la seconde phase de croissance, qui représente approximativement la moitié du cycle de développement du fruit, tant en durée qu'en volume. Différents processus physiologiques contrôlent le bilan hydrique, la croissance du fruit, son bilan carboné, et l'inter-conversion des différents solutés et polymères majeurs, dont le fruit, en tant qu'organe puits, effectue la synthèse à partir des photoassimilats importés. La régulation des voies d'import, du métabolisme, et du stockage de l'eau et des solutés, de la turgescence cellulaire et de la croissance, constituerait donc le site de régulation privilégié de la qualité des vendanges, sous contrôle développemental et environnemental. L'importance économique de la viticulture explique ainsi l'attention considérable donnée à la physiologie et à la génomique fonctionnelle du fruit. Depuis le séquençage du génome de la vigne (Jaillon et al. 2007), d'intenses travaux de transcriptomique ont permis d'identifier les gènes impliqués dans le développement du raisin, de façon exhaustive. Des tentatives de modélisation se développent sur bases mécanistiques très simplifiées, par rapport à la grande diversité des gènes exprimés et aux fonctions redondantes qu'ils encodent dans différentes assises tissulaires et compartiments intracellulaire en interaction, et dont la modulation développementale est dorénavant bien établie.

L'intensité des flux, leurs variations et relations temporelles, méritent une attention particulière, car se situant à l'interface entre modélisation et criblage moléculaire. Un stade physiologique peut être appréhendé en tant qu'unité homogène de flux, bornée dans le temps par des transitions brutales. Notre corpus de connaissances sur la physiologie du fruit, en termes de cinétique d'accumulation des solutés majeurs et de métabolisme ne permet pas d'atteindre cet objectif. Deux niveaux d'approche sont assimilés de façon abusive :

- celui de la population de baies, largement documenté de façon empirique, et sur laquelle sont définis des « stades phénologiques » qui n'ont qu'un sens statistique



- celui du fruit individuel, paradoxalement très mal documenté, mais le seul sur lequel l'on soit réellement en droit d'envisager une succession de stades « physiologiques ». C'est en tout cas ce que démontrent sans ambiguïté les rares analyses transcriptomiques réalisées sur des baies individuelles (Lund et al. 2008, Rienth et al. 2016).

Cette thèse a donc pour objectif principal de réexaminer, sur le plan strictement quantitatif, le métabolisme sucre/acides organiques, la croissance et la respiration à l'échelle de la baie unique, afin de bien établir comment évoluent leurs flux respectifs dans une seule baie au cours du temps. Il s'agit de définir des stades physiologiques réels du fruit, en s'affranchissant du paradoxe que ceux-ci n'ont aucun sens, sur un mélange de baies asynchrones. Un premier modèle de l'énergétique du transport des sucres, en liaison avec l'acidité, est également proposé.

Pour atteindre cet objectif, le travail est divisé en 4 étapes :

La première étape consiste à étudier l'hétérogénéité des baies individuelles à l'échelle de la parcelle et de la grappe, dans divers cépages de *Vitis vinifera* L., en suivant la croissance des organes dans le temps, et en dosant les concentrations en osmoticums majeurs dans un grand nombre de fruits.

La seconde étape consiste à établir le modèle de développement le plus simple possible, en terme d'activation des différents flux, susceptible de rassembler l'ensemble des données cinétiques non destructives obtenues sur grappes ou baies uniques, principalement sur la croissance, avec la masse des analyses individuelles destructives plus ou moins précisément référencées dans le temps.

La troisième étape consiste à étudier la stabilité de ce modèle, dans des conditions de taille minimale connues pour affecter sensiblement le volume des baies.

La dernière étape a été orientée vers la recherche et l'analyse d'une signature éventuelle de l'activation brutale de l'import des photo-assimilats et de la consommation du malate sur la demande respiratoire du fruit, lors de l'initiation du mûrissement.

L'ensemble de ces travaux permet de mieux présenter le développement de la baie unique au sein de la population du raisin.

Le mémoire est structuré en 5 chapitres. Le premier chapitre présente une étude bibliographique sur le développement du raisin, notamment la croissance, le sucre et les acides organiques, ainsi que la problématique et les objectifs de ce travail. Il est suivi de trois chapitres de résultats sous forme d'articles. Le dernier chapitre consiste en une discussion générale, comprenant, en particulier, les limites de notre approche et les perspectives qui en découlent.

Les travaux de cette thèse font l'objet de différentes présentations et publications :

**Présentations de poster :**

- 19th international meeting GIESCO, 2015, Montpellier (France). *Evolution of grapevine (Vitis vinifera L.) berry heterogeneity during ripening*. R. Shahood, M. Rienth, L. Torregrosa, C. Romieu

**Proceedings paper**

Shahood, R., Rienth, M., Torregrosa, L., Romieu, C (2015). Evolution of grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry heterogeneity during ripening. In : Comptes-rendus GiESCO, Vol :2 (p. 564-568). Presented at 19. *Journées Internationales de Viticulture GiESCO*, Gruissan, FRA.

**Publication soumise :**

How fast does a single *Vitis vinifera* L. berry ripen? Water, sugar and acid fluxes revisited. R. Shahood, L. Torregrosa, C. Romieu. *Australian Journal of Grape and Wine Research* (2017)

**Publications en cours de rédaction :**

- Respiration and bioenergetics of sugar import and malate breakdown in ripening berries. R. Shahood, L. Torregrosa, C. Romieu. *Journal of experimental botany* (2017)

- Impact de la taille minimale sur les flux des Sucres, acides organiques et eau au cours de la maturation des baies de vigne. R. Shahood, L. Torregrosa, C. Romieu. *Journal international des sciences de la vigne et du vin* (2017)

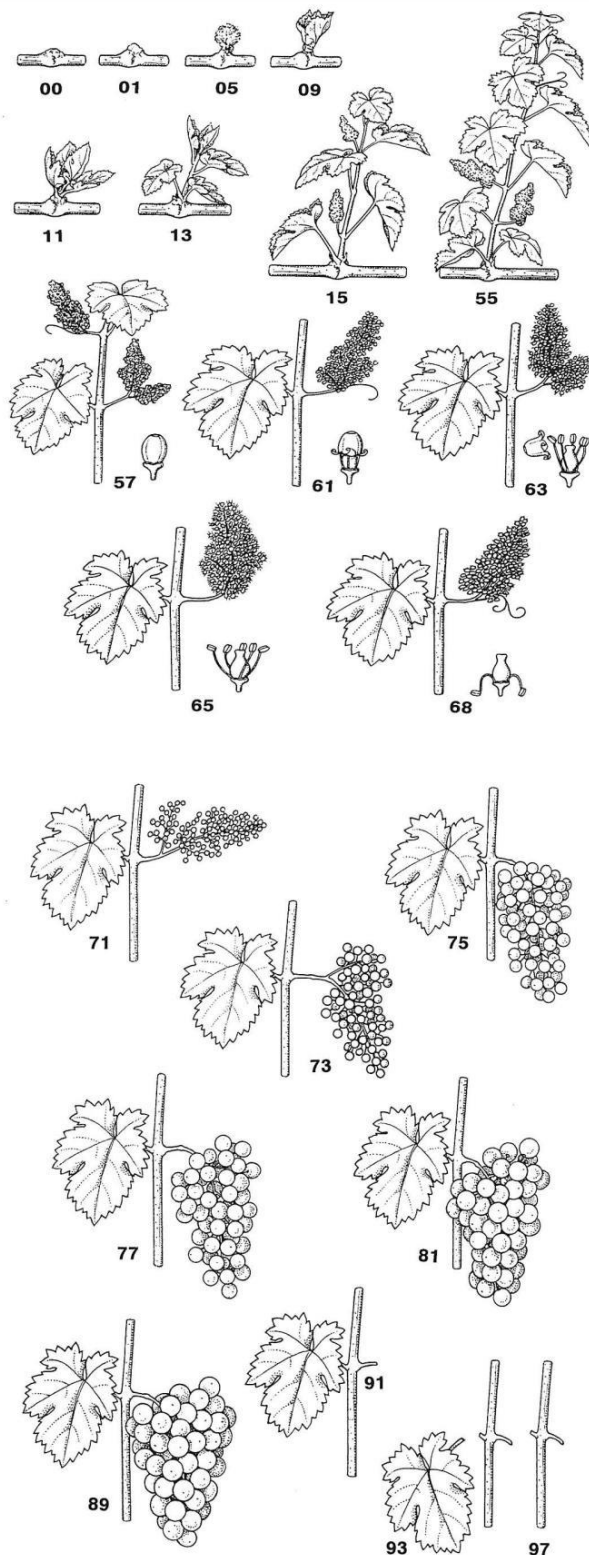
# ***Chapitre 1. Etude bibliographique***

## ***1. Cycle de développement de la vigne***

Suite au repos hivernal, le développement de la vigne va impliquer la superposition du cycle végétatif et du cycle reproducteur. Baggiolini (1952) a décomposé le cycle annuel de développement de la vigne en « stades phénologiques ». Eichhorn et Lorenz (1977) et Meier (2001) ont affiné cette description en subdivisant les stades existants (échelle BBCH : Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry, Fig. 1. 1).

Le cycle végétatif débute lorsque la température du sol s'élève à la fin de l'hiver. La mobilisation des réserves permet alors l'alimentation énergétique des transports ioniques à l'origine de l'absorption racinaire des minéraux et de l'eau du sol, et à l'établissement, dans les vaisseaux du xylème, d'une poussée racinaire qui se matérialise par un écoulement de sève (pleurs) au niveau des plaies de taille. Dans le sud de France, le débourrement (stade 01-BBCH) a lieu fin mars - début avril et se poursuit par le développement des feuilles (stades 11 à 19-BBCH). Les inflorescences vont apparaître (stade 53-BBCH) et l'évolution de l'appareil reproducteur va se poursuivre jusqu'au stade 89-BBCH. L'aoûtement (stade 91-BBCH) des rameaux se termine et les feuilles deviennent sénescents puis tombent (stade 92 à 97-BBCH).

La floraison (stade 60 à 69-BBCH) débute au mois de mai jusqu'à la chute des capuchons floraux. L'ovaire est ensuite fécondé pour devenir un fruit (stade 71-BBCH). Les raisins grossissent (petits pois, stade 75-BBCH) jusqu'à la fermeture de la grappe (stade 77 à 79-BBCH). Le changement de couleur correspond à la véraison (stade 81-BBCH) qui marque le début de la maturation. La vendange (stade 89-BBCH) est effectuée lorsque les raisins ont atteint des caractéristiques physico-chimiques optimales.



**Stade principal 0 : bourgeonnement ou débournement**

00 Dormance : les bourgeons d'hiver sont pointus à arrondis, suivant la variété ils sont brun clair à foncé et les écailles sont plus ou moins appliquées aux bourgeons

01 Début du gonflement des bourgeons : les bourgeons s'allongent à l'intérieur des écailles

03 Fin du gonflement des bourgeons, les bourgeons ne sont pas encore verts

05 « Stade de la bourre » : une protection cotonneuse est nettement visible

07 Début de l'éclatement des bourgeons (débournement) : l'extrémité verte de la jeune pousse est juste visible

09 Débournement : l'extrémité verte de la jeune pousse est nettement visible

**Stade principal 1 : développement des feuilles**

11 Première feuille étalée et écartée de la pousse

12 2 feuilles étalées

13 3 feuilles étalées

1. Et ainsi de suite...

19 9 ou davantage de feuilles sont étalées

**Stade principal 5 : apparition des inflorescences**

53 Les grappes (inflorescences) sont nettement visibles

55 Les grappes augmentent de taille, les boutons floraux sont agglomérés

57 Les grappes sont bien développées, les fleurs se séparent

**Stade principal 6 : la floraison**

60 Les premiers capuchons floraux se séparent du réceptacle

61 Début de la floraison : 10% des capuchons floraux sont tombés

62 20% des capuchons floraux sont tombés

63 Floraison partielle : 30% des capuchons floraux sont tombés

64 40% des capuchons floraux sont tombés

65 Mi- floraison : 50% des capuchons floraux sont tombés

66 60% des capuchons floraux sont tombés

67 70% des capuchons floraux sont tombés

68 La floraison s'achève : 80% des capuchons floraux sont tombés

69 Fin de la floraison

**Stade principal 7 : développement des fruits**

71 Nouaison : début du développement des fruits, toutes les pièces florales sont tombées

73 Les fruits (baies) ont la grosseur de plombs de chasse, les grappes commencent à s'incliner vers le bas

75 Les baies ont la grosseur de petits pois, les grappes sont en position verticale

77 Début de la fermeture de la grappe (les baies commencent à se toucher)

79 La fermeture de la grappe est complète, les fruits ont fini de grossir

**Stade principal 8 : maturation des baies**

81 Début de la maturation : les baies commencent à s'éclaircir et/ou à changer de couleur

83 Eclaircissement et/ou changement de couleur en cours

85 Les baies deviennent molles au toucher

89 Les baies sont mûres pour la vendange

**Stade principal 9 : sénescence ou début du repos végétatif**

91 Après la vendange : l'aouïement du bois est terminé

92 Début de la coloration des feuilles

93 Début de la chute des feuilles

95 50% des feuilles sont tombées

97 Fin de la chute des feuilles

99 Baies mûres en phase de conservation

Figure 1.1. Stades phénologiques de la vigne d'après Meier (2001).

## ***2. Cycle de développement de la baie :***

De manière générale, la croissance des fruits peut suivre une courbe sigmoïde simple, comme chez la pomme, la date, l'avocat, l'orange...etc, ou bien une double sigmoïde comme chez les fruits à noyau, la figue, la framboise, l'olive et le raisin (Coombe 1976).

Chez le raisin, le développement de la baie se décompose en deux phases principales (Fig. 1. 2), la phase verte (ou herbacée), suivie de la phase de maturation. Les deux phases de croissance sont séparées par une période de ralentissement de croissance (période de latence, plateau herbacé). La maturation s'achève par une phase de flétrissement, pendant laquelle l'évaporation provoque une contraction du fruit (Coombe 1992 ; Coombe 1960 ; Famiani et al. 2014 ; Famiani et al. 2000 ; Harris et al. 1971 ; Ojeda et al. 1999 ; Ollat et al. 2002 ; Palliotti and Cartechini 2001). Tous ces stades ont été définis sur des échantillons représentatifs de l'évolution de la population de baies au vignoble, dont la moyenne est supposée représenter une baie « idéale ».

### **2.1. La phase verte :**

La phase verte (herbacée) débute à la floraison et peut durer jusqu'à 60 j suivant les cultivars (Huglin and Schneider 1998 ; Conde et al. 2007). Pendant cette phase, la croissance de la baie repose simultanément sur la division et l'expansion cellulaire, les divisions cellulaires se produisent pendant les premières semaines de la formation de la baie et des pépins et le nombre final des assises cellulaires constitutives de la baie est atteint avant l'induction du mûrissement (Harris et al. 1968 ; Coombe 1960 ; Ojeda et al. 1999 ; Coombe et McCarthy 2000 ; Jona et Botta 1988 ; Cadot et al. 2006). Les pépins atteignent presque leur taille finale. La croissance est déterminée par le nombre de pépins, certaines phytohormones, les relations source-puits et les conditions climatiques (Ollat et al. 2002). Les baies, pendant cette phase, sont fermes, vertes, acides et astringentes, et présentent une certaine activité photosynthétique.

La baie couvre cependant l'essentiel de ses besoins métaboliques et énergétiques en important du saccharose véhiculé par le phloème, suivant la voie de déchargement symplasmique (Zhang et al. 2006 ; Reynier 2007). L'essentiel de l'eau évaporée par la baie et nécessaire à la croissance du fruit arrive alors par le xylème (Ollat et al. 2002).

La croissance cellulaire est associée à l'accumulation des solutés au cours de cette phase. Plus de 20 acides organiques sont accumulés dans la baie (Kliewer 1966). Le malate et le tartrate représentent jusqu'à 92% des acides organiques totaux (Possner and Kliewer 1985) qui s'accumulent dans le mésocarpe. On rencontre également de faibles quantités d'acides citrique, succinique, fumarique, gallique et shikimique (Kliewer 1966 ; Conde et al. 2007 ; Silva et al. 2016).

Le tartrate s'accumule plus rapidement au début de la phase verte, rapidement suivi par le malate (Terrier and Romieu 2001). La quantité totale de ces acides organiques, le rapport Mal/Tar ainsi que la quantité de potassium conditionnent le pH de la vacuole cellulaire et aboutissent à un pH ~ 2.5-2.7 (Terrier and Romieu 2001) dans la pulpe de tous les cultivars connus, excepté le mutant « acidless » Gora-chirine (Diakou et al. 2000). Le contenu en potassium est sensiblement plus élevé dans la pellicule (Possner and Kliewer 1985).

Les sucres s'accumulent à vitesse faible pendant cette phase, où la plupart des sucres chargés sont métabolisés et leur concentration ne dépasse pas 150 mM, principalement sous forme de glucose (Fillion et al. 1999 ; Houel et al. 2015).

D'autres composés déterminants pour la qualité œnologique de la future vendange sont également accumulés à ce stade, tels que les tanins et l'acide hydroxy-cinamique (Possner and Kliewer 1985 ; Kennedy et al. 2006 ; Romeyer et al. 1983), des micro et macroéléments minéraux (Bertoldi et al. 2011 ; Rogiers et al. 2006), des acides aminés (Le Guan et al. 2017 ; Pereira et al. 2006 ; Hilbert et al. 2005 ; Stines et al. 2000), et des composés aromatiques tels que les méthoxypyrazines (Allen and Lacey 1998).

## **2.2. Période de latence :**

Elle débute par un ralentissement de croissance à la fin de la phase verte (Coombe 1992 ; Coombe and McCarthy 2000), pendant les 10 à 20 derniers jours selon les variétés. L'embryon dans les pépins est alors mature et leur tégument se lignifie.

## **2.3. Phase de la maturation :**

La phase de maturation débute avec l'accélération brutale du chargement en sucres et dure près de 60 jours (Conde et al. 2007 ; Kennedy 2002). La fermeté des baies diminue en un à trois jours à l'échelle de la baie (Coombe 1984) mais le phénomène peut prendre plusieurs semaines à l'échelle du vignoble, suivant les parcelles et les millésimes (Robin et al. 1996). Les baies tendent à devenir translucides pour les cépages blancs ou à se pigmenter pour les

cépages rouges. La teneur des baies en chlorophylle et l'activité photosynthétique diminuent (Koch and Alleweldt 1978) amplifiant le statut d'organe puits (Ollat et al. 2002).

La croissance reprend du fait de la ré-expansion cellulaire, se traduisant par un doublement approximatif du volume de la baie entre le début et la fin de cette phase (Coombe 1992 ; Kennedy 2002; Harris et al. 1968 ; Houel et al. 2013).

La pulpe accumule de grandes quantités d'eau et de sucres. Le tartrate reste dorénavant constant en quantité par baie mais sa concentration diminue par dilution (Terrier et Romieu 2001 ; Duchêne et al. 2014) ; le malate diminue en quantité par fruit comme en concentration, car sa respiration et la gluconéogenèse se surimposent à sa dilution (Reynier 2007 ; Conde et al. 2007 ; Famiani et al. 2014 ; Famiani et al. 2016 ; Ruffner 1975). La baie est également susceptible d'alimenter des cycles futiles de formation d'éthanol par fermentation aérobie lorsqu'elle est attachée à la plante (Terrier et al. 2005), voire d'accumuler des quantités significatives d'éthanol en stade mûr après récolte, suivant la température (Tesnière et al. 2009 ; Romieu et al. 1992 ; Terrier et al. 1996).

Les acides aminés s'accumulent également en quantités importantes (Kennedy 2002). Les arômes s'accumulent uniquement durant la fin de cette phase de maturation (Gholami et al. 1995 ; Coombe et McCarthy 1999). Les flavonoïdes s'accumulent dans la pellicule. Les méthoxypyrazines sont dégradées par la lumière (Kennedy 2002).

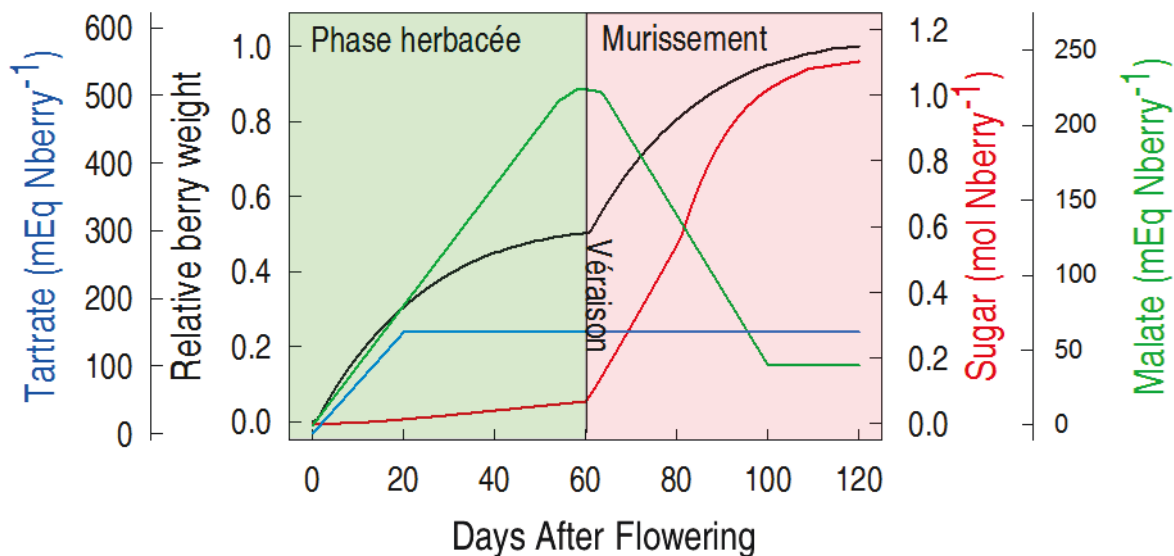


Figure 1. 2. Cycle de développement d'une baie théorique de 1 Kg au cours de temps.



### **3. xylème et phloème :**

Le développement des baies du raisin implique des flux nets d'eau et de solutés de la plante vers le fruit, suivant deux tissus vasculaires principaux, le xylème et le phloème qui sont juxtaposés dans tout le corps de la plante. Le **xylème** assure l'essentiel de la conduction d'eau pendant le stade vert (Greenspan et al. 1994). Il comprend des éléments trachéides (vaisseaux et trachéides), des cellules du parenchyme et des cellules du support. Le **phloème** assure le transport des photoassimilats, principalement sous forme de saccharose chez la vigne. Il comprend les cellules conductrices, sous forme de tubes criblés et de cellules compagnes (Van Bel 2003). Les tubes criblés sont formés de cellules allongées communiquant par des plasmodesmes qui facilitent le passage de la sève élaborée, suivant un continuum cytoplasmique. Chaque tube criblé est associé à une cellule compagne, ainsi que d'autres cellules parenchymateuses et des cellules du support (Evert 2006). Des plasmodesmes branchus assurent la connexion entre cellule criblée et compagne. Le xylème et le phloème sont physiquement reliés par des cellules des rayons (Van Bel 1990), et sont fonctionnellement couplés, en raison de leurs échanges d'eau, de minéraux, de sucres et d'hormones (Metzner et al. 2010). Les baies individuelles sont reliées au reste de la vigne par 5-6 faisceaux vasculaires périphériques et centraux.

Les échanges entre tube criblés et organes sources ou organes puits peuvent s'effectuer suivant deux voies (Fig. 1. 3) :

**Apoplastique** : C'est la voie dominante, tout du moins après véraison (Afoufa-Bastien et al 2010 ; Lalonde et al. 2003). Les assimilats passent d'une cellule à l'autre de manière indirecte, en traversant les membranes plasmiques et en circulant dans l'apoplasme. Plusieurs types de transporteurs permettent alors le passage des sucres à travers les membranes plasmiques, suivant leur gradient de concentration, où à l'encontre de ce même gradient, au prix d'un coût énergétique du transport.

**Symplastique** : les plasmodesmes, qui autorisent la continuité cytoplasmique entre les faisceaux conducteurs du phloème et les cellules puits, permettent le transfert de la solution phloémienne suivant un flux de masse (Lalonde et al. 2003).

**Symplastique** à travers un mécanisme de **piégeage moléculaire** : chez les plantes qui transportent des oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs) (ex : Cucurbitacées) (Dinant and Lemoine 2010).

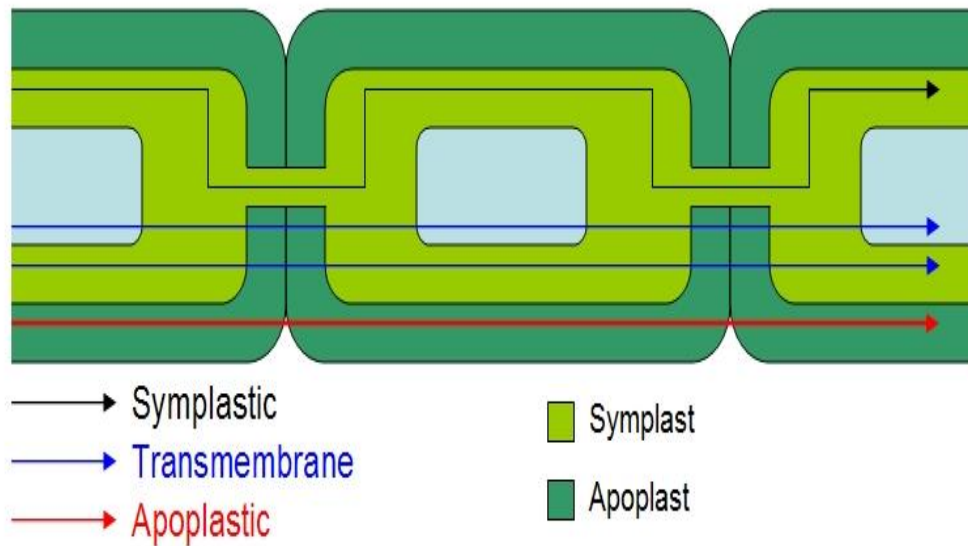


Figure 1. 3. Les voies symplastique et apoplastique dans le phloème des plantes

#### 4. Flux d'eau :

Le teneur en eau détermine la concentration des solutés (sucres, acides organiques, composés phénoliques...etc.) et influence grandement la qualité des fruits (Keller et al. 2015). Les transports d'eau s'effectuent à la fois via le xylème et le phloème chez les plantes (Greenspan et al. 1994 ; 1996 ; Ollat et al. 2002 ; Matthews and Shackel 2005). Leur contribution respective dépend du stade de développement du fruit ainsi que de l'espèce considérée (Keller et al. 2006 ; Keller et al. 2017). L'eau nécessaire à l'expansion cellulaire, arrive principalement via le xylème pendant le stade vert du raisin (Fig. 1. 4 ; Greenspan et al. 1996 ; Choat et al. 2009), le phloème ne contribuant qu'à environ 12% de l'influx total (Greenspan et al. 1994). A la véraison, la baie ramollit et les sucres commencent à s'accumuler. Une transition importante est observée, où le flux xylémien diminue en dépit des augmentations transitoires de la croissance des baies et de la transpiration (Cuéllar et al. 2013 ; Keller et al. 2015 ; Keller et al. 2017) pour devenir majoritairement phloémien (Fig. 1. 4 ; Chatelet et al. 2008 a, b ; Choat et al. 2009 ; Dai et al. 2010 ; Keller et al. 2014). Cependant, le xylème de la baie reste physiquement intact et sans occlusion pendant la maturation (Rogiers et al. 2006 ; Keller et al. 2006 ; Chatelet et al. 2008 a ; 2008 b ; Choat et al. 2009 ; Tilbrook and Tyerman 2009 ; Clearwater et al. 2012 ; Keller et al. 2014). La diminution du flux xylémien a été longtemps attribuée à l'isolation hydraulique des baies de la plante mère, suite à l'étirement et à la rupture des vaisseaux périphériques du xylème du fait de la croissance (Dražeta et al. 2004). Keller et al. (2015) ont suggéré que cette diminution serait plutôt due à l'augmentation de l'influx phloémien liée à une augmentation rapide de turgescence. La fermeté de l'exocarpe diminue au début de la maturation, entraînant un changement dans la direction prédominante du gradient de pression hydrostatique entre les extrémités du xylème ( $\Delta P_x$ ).

La conductivité hydraulique et le gradient de pression hydrostatique du xylème ( $\Delta P_x$ ) entre la baie et la plante peuvent entraîner la circulation de l'eau dans les deux directions (Keller et al. 2006 ; Tilbrook and tyerman 2008 ; 2009), suivant les conditions climatiques et le statut hydrique de la plante.  $\Delta P_x$  peut être modifié par trois paramètres, i) l'augmentation de la pression osmotique dans la vacuole ( $J_{I_v}$ ) de la baie (dépend de la concentration du sucre dans le phloème et dans la baie), ii) des changements de transpiration des baies au cours de la maturation, et iii) la capacité de recycler l'eau phloémienne via le

xylème (Becker et Knoche 2011 ; Zhang et Keller 2015 ; 2017).  $\Delta P_x$  affecte la croissance des baies au cours du cycle nyctéméral, avec une contraction le jour du fait du retour de l'eau vers la plante mère et de la transpiration par la surface du fruit. Cette contraction est d'autant plus élevée que le potentiel hydrique des feuilles est inférieur à - 0.8 MPa (Greenspan et al. 1996), ce qui correspond à la pression osmotique du fruit vert. L'accumulation des sucres dans le fruit murissant est responsable d'une pression osmotique considérable (Greenspan et al. 1994) qui devrait, si la croissance l'autorise, faire du fruit le puits le plus fort de la plante pour l'eau. Lors d'un stress hydrique important, les baies vertes flétrissent, mais celles qui commencent à vériter reprennent leur croissance, même avant irrigation (Keller et al. 2014).

Une fois que le flux xylémien diminue et que le flux devient majoritairement phloémien à la véraison, le déchargement du phloème dans les cellules du péricarpe passe de la voie symplastique à la voie apoplastique (Ruan and Patrick 1995 ; Zhang et al. 2006). Ce changement augmenterait la concentration en solutés et la pression osmotique de l'apoplasme ( $J_{I_a}$ ) (Keller et al. 2015 ; Wada et al. 2008 ; Keller et Sherstha 2014), facilitant l'efflux d'eau du phloème, et donc le flux de masse (Patrick 1997). Si l'accumulation des sucres dans le péricarpe se poursuit alors que sa croissance cesse en fin de maturation, ce que suggèrent les mesures de croissance et de concentration en sucre, l'excès d'eau ne peut être éliminé que par un reflux du xylème, de la baie vers la plante (Keller et al. 2015). La modélisation des flux vasculaires des baies à partir des mesures de la concentration en sucre de la sève du pédicelle, de la croissance des baies, de l'accumulation de soluté et de la transpiration, suggère que seulement 20 % de l'eau dérivée du phloème serait utilisée pour répondre à la demande de croissance et à la transpiration des baies, tandis que le reste serait recyclé au travers du xylème (Keller et al. 2015). Ce reflux xylémien serait donc nécessaire pour autoriser le flux de masse et le transport des sucres vers le fruit pendant la maturation normale du raisin (Keller et al. 2017). La recirculation du xylème varie en fonction de la demande de soluté de fruit, de la photosynthèse foliaire, du statut hydrique de la plante et du déficit de pression de vapeur de l'atmosphère (VPD : Vapour Pressure Deficit) (Keller et al. 2015). Cependant, le calcul repose sur des mesures extrêmement délicates de concentration du saccharose dans le phloème, et sur l'évaluation de la croissance et des concentrations en hexoses dans des lots de baies supposées synchrones, notions sur lesquelles nous reviendrons en détail dans nos propres travaux.

A la fin du mûrissement, la baie flétrit car sa transpiration et/ou le reflux xylémien dépasse le flux phloémien (Greer and Rogiers 2009). La transpiration dépend du stade et des

conditions climatiques et peut effectivement jouer un rôle important pour la force motrice essentielle à l'accumulation des sucres (Dreier et al. 2000).

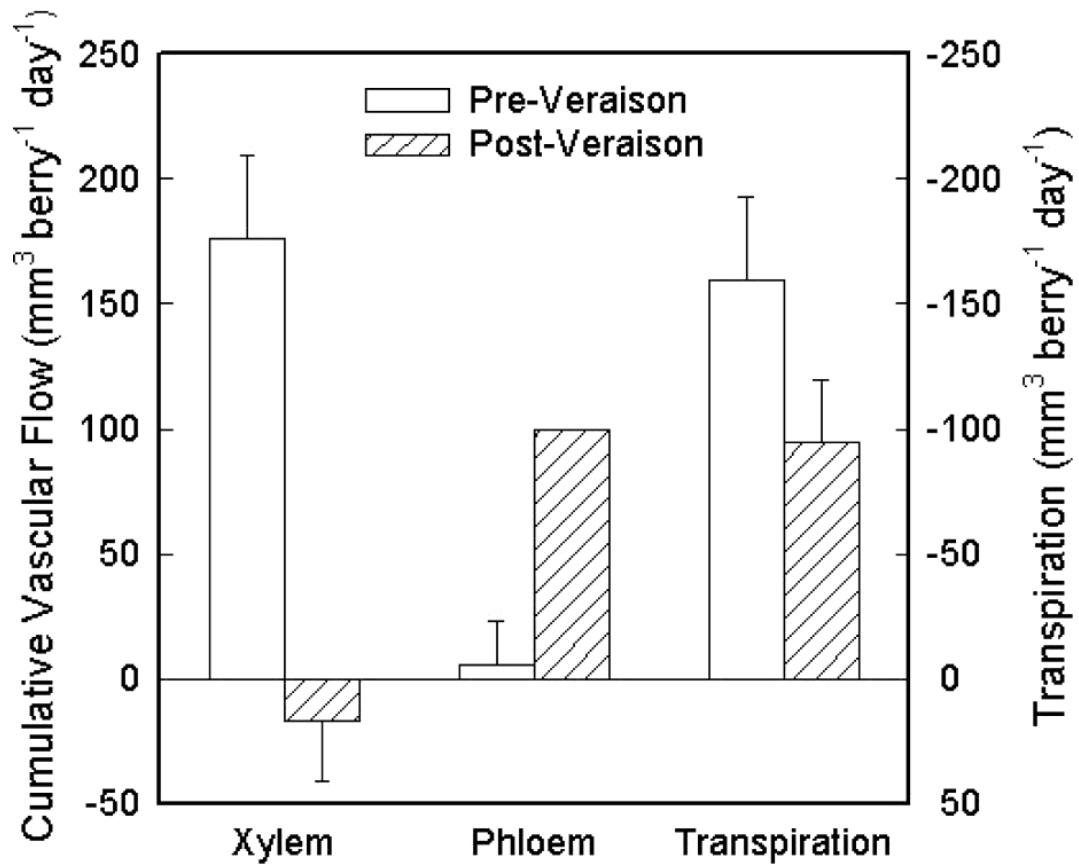


Figure 1. 4. Les flux calculé du xylème, du phloème et de la transpiration de l'eau, pour les baies du raisin irriguées avant et après la véraison d'après Greenspan et al. (1996).

## 5. Les sucres

Le glucose et le fructose sont les sucres majeurs accumulés par le raisin. Leurs teneurs vont fortement augmenter pour atteindre 1 M dans les baies mûres avec un ratio glucose/fructose proche de 1. La teneur en sucres est un des indicateurs majeurs pour déterminer le niveau de maturité des raisins et fixer la date de vendange. La concentration des moûts en sucre permet d'estimer la teneur d'alcool finale dans les vins, après la fermentation alcoolique levurienne. Environ 10% des sucres peut également être transformée en alcool par le fruit lui-même (fermentation propre) lors des vinifications en baies entières (macération carbonique, vinification beaujolaise).

### 5.1. Accumulation des sucres :

Le saccharose, produit par la photosynthèse au niveau des feuilles, est la forme majeure de sucre transportée via le phloème chez la vigne (Swanson and Shishiny 1958), alors que les principaux sucres accumulés dans les vacuoles du raisin sont, tout du moins chez *V. vinifera*, le glucose et le fructose (hexoses) (Amerine and Root 1960). Leur teneur totale dans la baie va fortement augmenter dès la véraison pour atteindre à peu près 1M d'hexoses à la maturité physiologique, avec un ratio glucose/fructose proche de 1. Pendant le stade vert, la plupart du saccharose importé dans les baies est métabolisée, et les sucres stockés dans les vacuoles ne dépassent pas 150 mM (Findlay et al. 1987 ; Houel et al. 2015)), essentiellement sous forme de glucose. A la véraison, le saccharose est transporté en quantité massive et se décharge dans les baies. Différentes isoformes d'invertases localisées dans les parois, le cytoplasme et la vacuole catalysent l'hydrolyse du saccharose en hexoses, d'où un gradient de saccharose globalement favorable à son transport dans les vacuoles des cellules (Fillion et al. 1999). Cette accumulation est directement liée à l'intensité lumineuse, au statut hydrique et ionique, à l'équilibre hormonal et aux stress biotiques (Octave et al. 2006 a, b). Le passage du déchargement phloémien de la voie symplastique à la voie apoplastique conduirait à cette modification drastique de la vitesse d'importation des sucres à la véraison (Zhang et al. 2006). Des transporteurs spécifiques, localisés dans la membrane plasmique et dans la membrane vacuolaire (Hedrich et al. 2015), facilitent l'absorption des sucres dans les cellules végétales.

## **5.2. Transport des sucres :**

Le transport du sucre joue un rôle très important dans la régulation du développement des plantes et leurs réponses aux facteurs biotiques et abiotiques (Lemoine et al. 2013). Les sucres sont synthétisés dans le cytoplasme des feuilles (source) à partir des trioses-phosphate issus du cycle de Calvin dans les chloroplastes des cellules photosynthétiques. Une partie est directement utilisée pour répondre à la demande de la cellule elle-même, le reste est transféré vers les puits (fleurs, baies, racines) après stockage transitoire sous forme d'amidon. Les sucres transportés par le phloème assurent un approvisionnement adéquat pour le développement des organes puits (Williams et al. 2000). Chez le raisin, le saccharose est la forme principale transportée par la sève phloémienne.

**Translocation des sucres dans la plante (Fig. 1. 5) :** L'ensemble des assimilats (surtout le saccharose) transite par les voies apoplastique et symplastique, impliquant dans le premier cas des transporteurs spécialisés dans les transports de l'eau et des assimilats (Canaux, transporteurs, facilitateurs, etc.) de part et d'autre des différentes membranes plasmiques. Dans un premier temps, le saccharose est chargé dans des cellules du parenchyme phloémien vers le complexe « cellules compagnes–tubes criblés » des organes sources. Il est ensuite véhiculé vers les puits (Turgeon et Wolf 2009), via le flux de masse qui transite par les plasmodesmes entre tubes criblés successifs. Le déchargement phloémien passe par la voie symplastique ou par la voie apoplastique, selon l'espèce, l'organe et le stade de développement. Selon les résultats des études de microscopie électronique, l'existence de plasmodesmes, entre les tubes criblés et les cellules parenchymateuses des baies, peut autoriser la connexion symplastique (Zhang et al. 2006). L'augmentation de l'activité de l'invertase pariétale après véraison, et l'utilisation de traceurs phloémiens suggèrent que le déchargement des sucres passe de la voie symplastique à la voie apoplastique à la véraison, ce qui peut augmenter la capacité d'accumulation des sucres dans les baies (Patrick 1997 ; Zhang et al. 2006). Cependant, le xylème de la baie reste physiquement intact et sans occlusion pendant la maturation (Chatelet et al. 2008a, 2008b ; Choat et al. 2009). Le saccharose, comme les hexoses, sont imperméants dans la bicouche phospholipidique et nécessitent donc des transporteurs membranaires afin de traverser la membrane plasmique et le tonoplaste des baies dans lesquels ils s'accumulent, que ce transport s'effectue par simple diffusion, ou bien qu'il soit énergisé. Fontes et al. (2011) ont montré que le déchargement apoplastique du sucre dans le cytosol pourrait également s'effectuer par endocytose.

**Déchargement dans les cellules-puits :** Le saccharose peut être directement transporté vers le cytosol par les transporteurs de saccharose (SUTs ou SUCs) (Lemoine, 2000), ou bien hydrolysé en hexoses par l'activité des invertases pariétales (CW-INV), avant son transport dans le cytosol par des transporteurs de monosaccharides (hexoses) (HTs) situés au niveau de la membrane plasmique et énergisés par la force proton motrice (Sarry et al. 2004). Le saccharose cytoplasmique peut ensuite être transporté dans la vacuole avant d'être inverti par une très forte activité vacuolaire (Lalonde et al. 2003 ; Zhang et al. 2013). Le saccharose peut être encore clivé en hexoses dans le cytosol par l'activité d'invertases cytoplasmique ou la saccharose synthase (Lytovchenko et al. 2007).



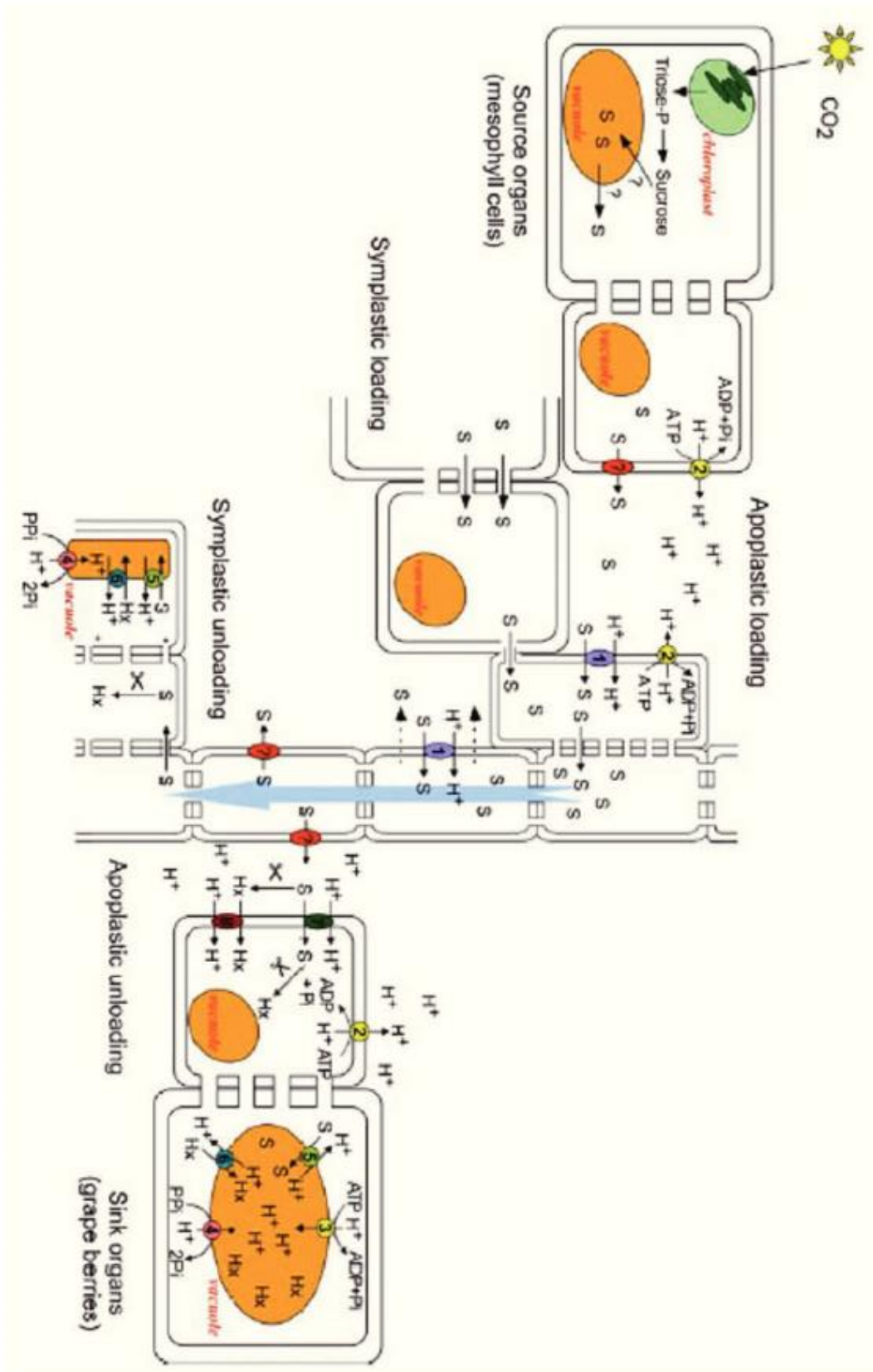


Figure 1. 5. Transport du saccharose des sources aux puits d'après Conde et al. (2007a).

### 5.2.1. *Les transporteurs membranaires*

Les membranes cellulaires jouent un rôle essentiel dans tous les mécanismes d'absorption ou d'excrétion des métabolites. Le caractère hydrophobe de la double couche lipidique permet à la cellule de maintenir les gradients de concentrations entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire. Les compartiments de la cellule se séparent par des membranes par lesquels des échanges moléculaires nécessaires à la vie cellulaire se produisent. Pour assurer l'approvisionnement en métabolites, l'élimination des déchets métaboliques et le maintien de concentrations ioniques bien définies, les cellules ont développé des systèmes de transport d'ions et de macromolécules faisant intervenir des protéines membranaires (Whiteman et al. 2008 ; Schulze et al. 2012) :

- a. Les canaux, pores qui permettent le mouvement passif d'ions ou de molécules de petite taille avec une capacité de transport d'environ  $10^8$  molécules/sec.
- b. Les transporteurs assurant un transport passif uniport ou actif « symport et antiport » avec une capacité de transport  $10^4$  molécules/sec. Ce transport actif nécessite la constitution préalable d'un gradient ionique et est aussi dénommé « transport actif secondaire ».
- c. Les pompes, dénommées « transport actif primaire », sont fréquemment des protéines qui hydrolysent l'ATP (ATPases). Avec une capacité de transport actif d'environ  $10^3$  ions/sec. Chez les plantes, l'énergie utilisée pour les transports membranaire existe essentiellement sous forme d'un gradient électrochimique de protons.

### 5.2.2. *Transporteurs de sucres*

Ces transporteurs appartiennent à trois familles distinctes (Fig. 1. 6) :

- Les transporteurs de disaccharides (DST), responsables principalement du transport du saccharose, également nommés transporteurs de saccharose (SUC : Sucrose Carrier, SUT : Sucrose transporter et SUF : Sucrose Facilitator).
- Les transporteurs de monosaccharides et de polyols (MST-Like), responsables du transport d'une large gamme de monosaccharides (Williams et al. 2000).

Ces deux familles appartiennent à la superfamille des facilitateurs majeurs (MFS) qui comprennent la majorité des transporteurs des sucres chez les végétaux (Buttner 2007). Elle

regroupe selon Saier (2000b) des facilitateurs (uniporteurs) qui permettent la diffusion passive des sucres selon leur gradient de concentration, des antiporteurs et des symporteurs catalysant le transport actif secondaire (énergisé) des sucres. Le transport actif des sucres dépend du gradient électrochimique de  $H^+$  chez les plantes, qui est généré par l'activité de pompes à protons (ATPases) (Delrot et al. 2001).

- Les SWEETs, caractérisés par Chen et al. (2010). Ce sont de petites protéines constituées de 7 domaines transmembranaires, plus récemment identifiées chez les végétaux (riz, *Arabidopsis*, vigne) et les métazoaires, qui permettent la diffusion passive des sucres.

#### ***5.2.2.1. Transporteurs de disaccharides***

**Chez les végétaux en général :** La plupart des transporteurs de saccharose (SUT) identifiés sont des symporteurs saccharose/ $H^+$  (Kuhn et Grof 2010), excepté les facilitateurs (SUF) caractérisés chez des légumineuses (Zhou et al. 2007). Ces transporteurs sont codés par une famille multigénique dont on connaît 9 isoformes chez l'arabette (Sauer et al. 2004) et 4 chez la vigne (Davies et al. 1999 ; Ageorges et al. 2000). A partir des analyses phylogéniques, les transporteurs de saccharose identifiés chez différentes espèces se répartissent en 3 à 5 groupes (Fig.1. 7 ; Kuhn et Grof 2010).

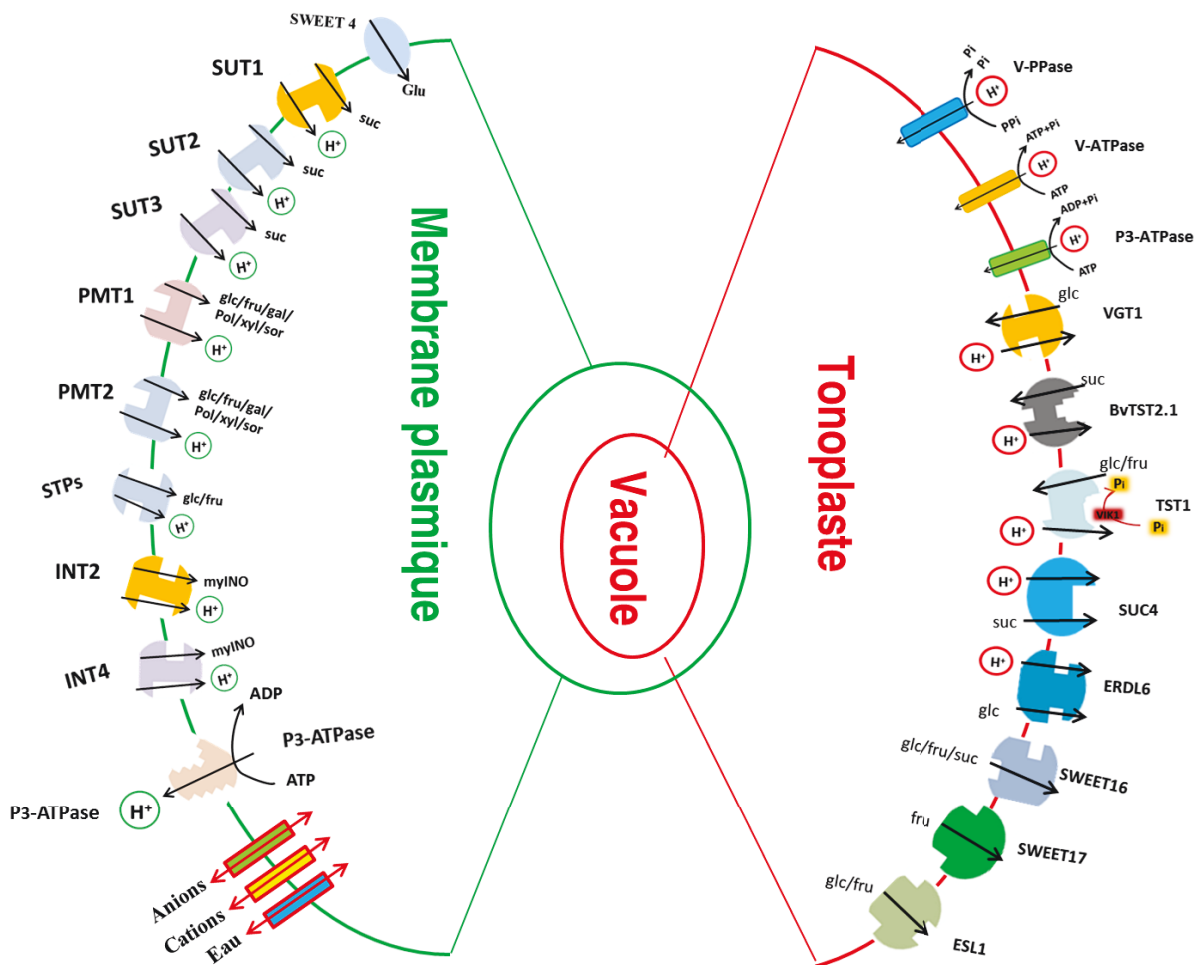


Figure 1.6. Transporteurs de sucres et pompes à protons situés sur les membranes plasmique et vacuolaire (Hayes et al. 2007 ; Schulz et al. 2011 ; Davies et al. 2012 ; Chong et al. 2014 ; Hedrich et al. 2015).

I. Groupe 1 : divisé en 2 clades (SUT3 et SUT5), il comprend des transporteurs de saccharose à forte affinité qui catalysent principalement le chargement du phloème et des cellules puits et qui se localisent au niveau de la membrane plasmique de Monocotylédones.

II. Groupe 2 : correspond au clade de SUT1, et comprend des transporteurs de saccharose à forte affinité localisés dans la membrane plasmique de Dicotylédones, et dont le rôle principal est, comme le groupe 1, le chargement du phloème et l'import du saccharose dans différents tissus puits.

III. Groupe 3 : correspond au clade de SUT2, qui inclut des transporteurs de saccharose à faible affinité, et proposés comme responsables de l'import de saccharose. Ils ont été localisés dans les membranes plasmiques des complexes cellules compagnes-tubes criblés chez la tomate (Barker et al. 2000), le plantain (Barth et al. 2003) et l'arabette (Meyer et al. 2004).

IV. Groupe 4 : clade de SUT4, comprend des transporteurs de saccharose à faible affinité. Identifiés comme symporteurs saccharose/H<sup>+</sup> (Schneider et al. 2012 ; Hedrich et al. 2015). Selon leur expression hétérologue dans la levure, (AtSUT4, StSUT4 et HvSUT2) ou bien l'immuno-localisation (St- SUT4 et LeSUT4), ils ont été proposés comme localisés dans la membrane plasmique (Weise et al. 2000 ; Weschke et al. 2000). Cependant des travaux plus récents montrent une localisation dans le tonoplaste, comme AtSUT4, HvSUT2 et LjSUT4 (Endler et al. 2006 ; Reinders et al. 2008 ; 2012). Leur localisation indique donc qu'ils pourraient participer au compartimentage cellulaire du saccharose et par conséquent à la régulation de la pression osmotique.

**Chez la vigne :** Dans les baies du raisin, trois transporteurs de saccharose (SUTs ou SUCs), ont été clonés, VvSUC11, 12, 27 (Davies et al. 1999), et ont été confirmés comme symporteurs saccharose/H<sup>+</sup> par des analyses fonctionnelles après expression dans la levure (Manning et al. 2001). Un quatrième VvSUT2 a été identifié avec une expression faible dans la plupart des tissus (Afoufa-Bastien et al. 2010). VvSUC27 est un transporteur de saccharose du plasmalemma à basse affinité et haute capacité, avec une expression forte juste pendant le stade vert, alors que le 11 et 12 sont à haute affinité avec une expression majeure après la véraison (Manning et al. 2001).

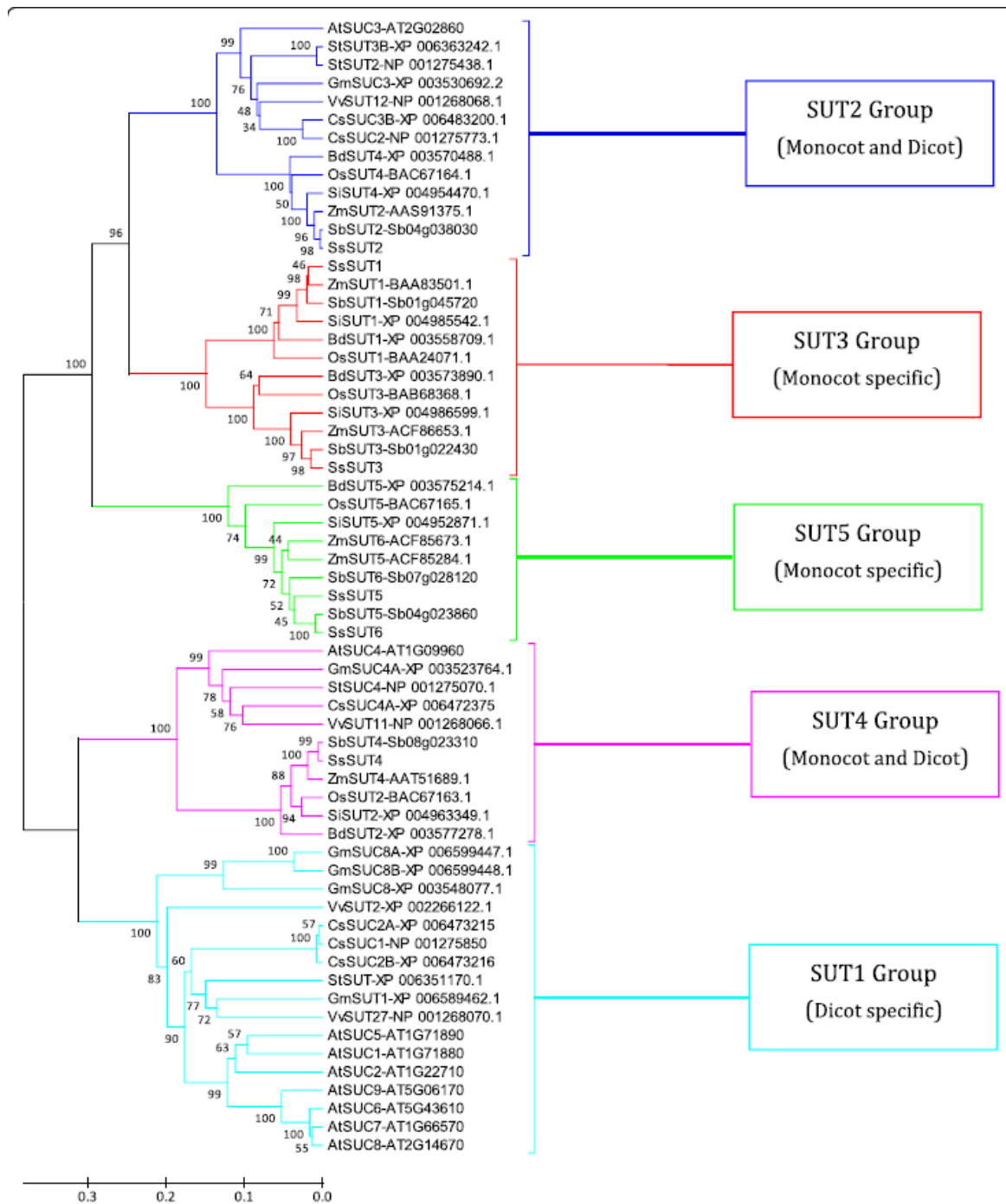


Figure 1.7. Arbre phylogénétique des transporteurs de saccharose d'après Zhang et al. (2016)

### 5.2.2.2. *Transporteurs de monosaccharides (MST-like) et de polyols*

Chez les plantes en général, les observations suggèrent qu'ils sont des symporteurs monosaccharide/H<sup>+</sup> qui assurent le transport actif d'hexoses, polyols, pentoses et de tetroses au travers des membranes (Buttner, 2007). L'analyse des génomes complètement séquencés indique qu'ils sont codés par une grande famille multigénique. Une analyse des banques ESTs a notamment permis d'identifier 8 MSTs chez la vigne (Conde et al. 2006), le riz (Cho et al. 2010) et le ricin (Weig et al. 1994). Buttner (2007) a divisé cette famille en 7 sous-familles distinctes, à partir de l'analyse phylogénétique chez l'arabette : les STP, VGT, TMT, pGlcT/SGB1, PMT (PLT), INT et ERD6-like.

- Sugar Transport Protein (STP) : comprend de 14 membres avec une forte affinité qui sont tous des symporteurs d'hexose/H<sup>+</sup> du plasmalemme, catalysant l'influx d'hexoses de l'apoplasme vers la cellule. La majorité d'entre eux sont exprimés dans divers tissus puits.

- Vacuolar Glucose Transporter-like (VGT-like) : représente des antiporteurs proton/substrats (Schulz et al. 2011 ; Hedrich et al. 2015) et constitué de 3 membres, deux d'entre eux (VGT1&VGT2) sont situés dans le tonoplaste alors que le 3<sup>ème</sup> (5g59250) est localisé dans la membrane chloroplastique (Buttner 2007). Parmi les trois VGTs, juste l'expression de VGT1 et sa localisation dans le tonoplaste a été étudiée dans l'Arabidopsis (Aluri and Buttner 2007).

- Tonoplast Sugar Transporter (TST) : appelé précédemment Tonoplast Monosaccharide Transporter et renommé maintenant Tonoplast Sugar Transporter (Jung et al. 2015). Constituée de 3 membres (TST1, 2, 3). Cette famille comprend des antiporteurs proton/substrats (Schulz et al. 2011 ; Hedrich et al. 2015). TST1 & TST2 sont localisés dans le tonoplaste (Wormit et al. 2006). L'utilisation de mutants démontre que la moitié de l'influx du glucose vacuolaire est importé activement par le TST1 dans les cellules du mésophylle exposées au froid. Toutes les protéines TST présentent une boucle centrale d'environ 320 acides aminés qui relie des domaines transmembranaires putatifs, et qui est absente de tous les autres transporteurs de sucres procaryotes et eucaryotes (Jung et al. 2015). Le couplage de l'import de sucre au gradient de H<sup>+</sup> dirigé vers le cytosol permet le transport de sucres contre un gradient de concentration. Des études d'absorption directe sur des vacuoles isolées ont montré que des transporteurs TST catalysaient un échange électrogène sucre/ proton (Cho et al. 2010 ; Schulz et al. 2011). La capacité de la plante à accumuler du glucose et du fructose à des températures froides est affectée par l'inhibition des TSTs (Wormit et al. 2006). Cela permet de spéculer que l'augmentation de la densité et l'activité des transporteurs de sucre

dans l'Arabidopsis constituerait une réponse au froid (Hedrich et al. 2015). L'activité de TST est régulée par la protéine kinase VIK1 (Wingenter et al. 2011 ; Hedrich et al. 2015), qui stimule l'activité de transporteurs lors de la phosphorylation et donc l'absorption de glucose dans les vacuoles.

- Plastidic Glucose Transporter/Suppressor of G protein Beta1 (pGlcT/SGB1) : elle comprend 4 membres. SopGlcT, l'homologue du transporteur de glucose potentiel pGlcT, identifié sur la membrane interne des chloroplastes d'Epinard (Weber et al. 2000).

- Early-Responsive to Dehydration-like (ERD6-like) : Bien qu'elle regroupe 19 transporteurs potentiels de monosaccharides, seulement trois d'entre eux ont été étudiés, AtERD6, AtSFP1 (Sugar-Porter Family Protein), et AtSFP2 (Buttner 2007). AtERD6 est un symporteur localisé dans le tonoplaste et il ne présente aucune activité de transport lorsqu'il est exprimé chez la levure (Chiou et Bush 1996). Yamada et al. (2010) ont découvert que l'expression de l'ESL1 (ERD6-like 1) est semblable à celle de l'invertase vacuolaire et que l'activité de l'invertase vacuolaire était augmentée dans des conditions de stress abiotique.

- Polyol Transporter (PLT) : constitué de 6 membres qui sont des co-transporteurs de polyols/monosaccharides/H<sup>+</sup> capables de transporter divers substrats dont le sorbitol, xylitol, glucose, fructose et galactose. C'est pourquoi, les renomment PMT (Polyol/monosaccharide transporter). Le 1 & 2 & 5 sont localisé dans la membrane plasmique (Klepek et al. 2010).

- Inositol Transporter (INT) : comprend 4 membres. Le 2 & 4 sont des co-transporteurs de myo-inositol/H<sup>+</sup> localisés dans la membrane plasmique. Le 2 est localisé dans le tonoplaste (Schneider et al. 2007).

**Chez la vigne** : Plusieurs transporteurs d'hexoses (HTs) (VvHT1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7) et VvGLT ont été identifié (Fillion et al. 1999 ; Vignault et al. 2005 ; Conde et al. 2006 ; Hayes et al. 2007 ; Lecourieux et al. 2014). VvHT1 & 2 sont les premiers transporteurs de monosaccharides isolés des baies de raisin à la véraison (Fillion et al. 1999). La diminution de l'expression de VvHT1 au début de la véraison semble l'exclure comme moteur de l'accumulation des sucres pendant le mûrissement (Hayes et al. 2007 ; Conde et al. 2011), contrairement à VvHT2, dont l'expression coïncide avec l'accumulation des hexoses (Fillion et al. 1999). Vignault et al. (2005) montrent que VvHT1 est un transporteur de glucose à haute affinité avec une activité maximale à pH 4.5 et un Km de 70 µM, et montrent de plus par hybridation *in situ* que VvHT1 serait situé sur la membrane plasmique des cellules du mésocarpe et plus précisément des tubes criblés (TC) et des cellules compagnes (CC). La concentration du glucose et les sucres contenant du glucosyle contrôle l'expression de VvHT1



tant positivement que négativement (Atanassova et al. 2003). VvHT1, 2, 3, 4 et 5 appartiennent à la sous famille « Sugar Transport Protein » de la famille des transporteurs mono-saccharidique (Davies et al. 2012), qui sont situés dans la membrane plasmique et stimulent l'absorption des hexoses de l'apoplasme (Buttner 2007). Tandis que VvHT6 a été proposé d'être un transporteur monosaccharide du tonoplaste d'après sa séquence et structure de protéine (Davies et al. 2012). VvHT4 & 5 ont été identifiés dans la levure en tant que symporteurs glucose/H<sup>+</sup> à haute affinité (Hayes et al. 2007). Hayes et al. (2010) ont montré que l'expression de VvHT5 serait régulée en réponse aux attaques fongiques et à l'ABA.

### 5.2.2.3. Transporteurs SWEETs :

Les SWEETs (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) sont des uniporteurs qui facilitent la diffusion des sucres à travers les membranes cellulaires (Chen et al. 2014). Ce sont des facilitateurs à faible affinité. Le premier a été isolé chez *Arabidopsis thaliana* (AtSWEET1) et a été caractérisé par criblage de protéines membranaires (Chen et al. 2010). Il y a 17 SWEETs chez *A. thaliana*, 21 chez le riz (*Oryza sativa*) et 17 chez la vigne (*V. vinifera* PN 40024) qui peuvent se regrouper en 4 clades (Fig. 1. 8) d'après les analyses phylogéniques (Chen et al. 2014 ; Chong et al. 2014). Les membres du clade 1 catalysent l'influx et l'efflux de glucose (Chen et al. 2010). Des membres du clade 3 stimulent le transport du saccharose au travers de la membrane plasmique (Chen et al. 2014). Le facilitateur SWEET 16 stimule le transport du glucose, du fructose et du sucrose au travers du tonoplaste (Hedrich et al. 2015). Le SWEET17 exporte le fructose de la vacuole et serait le facteur majeur du contrôle de la teneur du fructose dans les feuilles et les racines d'*Arabidopsis thaliana* (Chardon et al. 2013 ; Guo et al. 2014). Lin et al. (2014) ont démontré que le SWEET9 est un transporteur d'efflux essentiel à la production de nectar. Les SWEETs ont été proposés comme localisés dans le plasmalemma (Chen et al. 2010), mais les travaux récents montrent qu'il en y a dans le tonoplaste, comme SWEET 16 (Klemens et al. 2013) et SWEET17 (Chardon et al. 2013 ; Hedrich et al. 2015). Chen et al. (2010) ont avancé leur rôle important dans l'approvisionnement en sucres des structures puits.

**Chez la vigne :** 17 gènes SWEET ont été identifiés, en alignant les 17 protéines de SWEET d'*Arabidopsis* contre le protéome prédit à partir de la séquence du génome de la vigne, et sont exprimés de façon différentielle dans les organes végétatifs et reproducteurs (Chong et al. 2014). Ces auteurs montrent l'expression d'un grand nombre de VvSWEETs

dans les baies mûres (VvSWEET4, 7, 10, 11, 15 et 17d) et dans les fleurs (VvSWEET3, 4, 5a, 5b, 7, 10 et 11). D'après ces auteurs, VvSWEET4 serait un transporteur de glucose localisé dans la membrane plasmique.

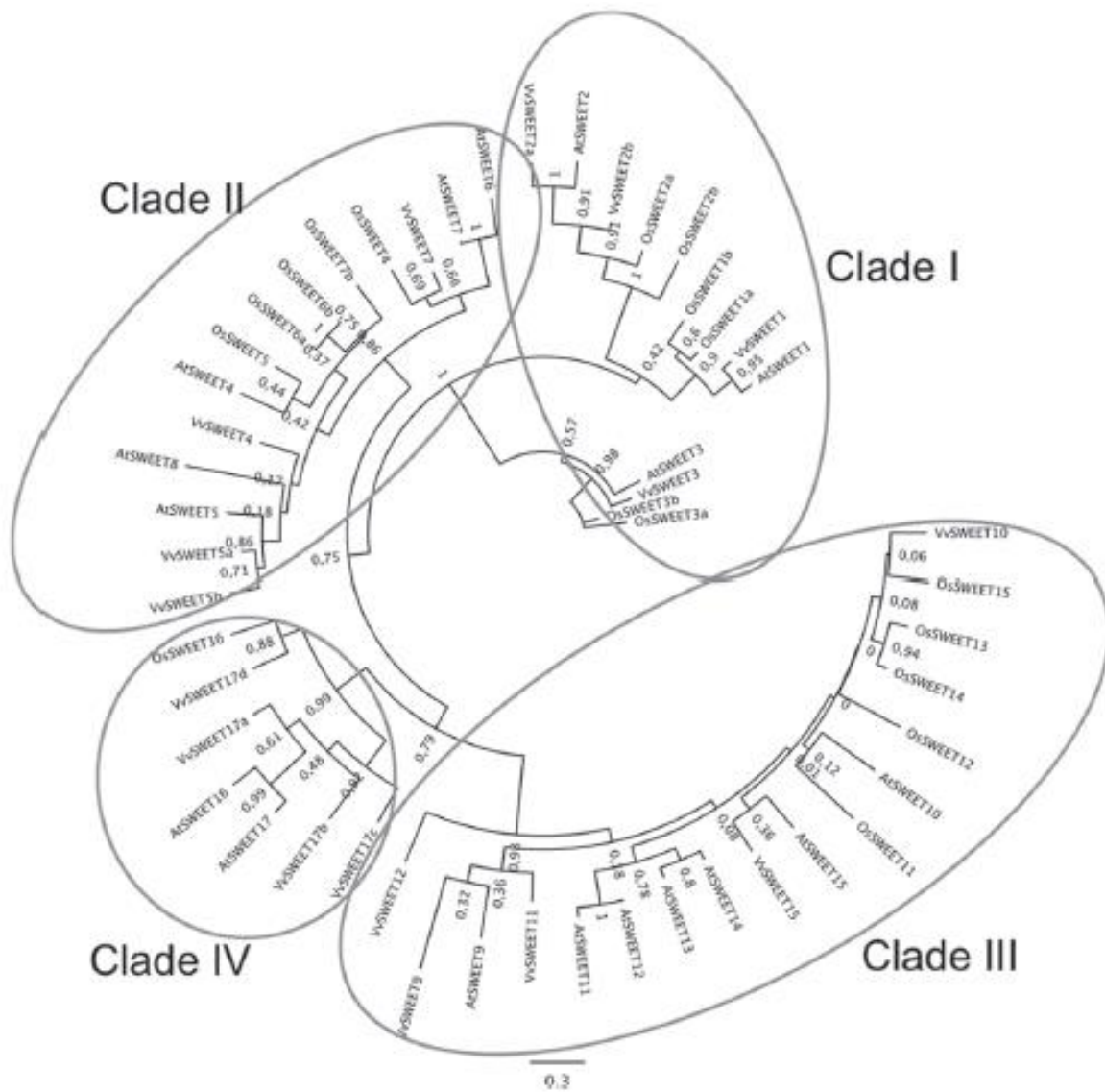


Figure 1.8. Arbre phylogénétique présente la distribution des protéines SWEET d'Arabidopsis (AtSWEET), de Riz (OsSWEET) et de vigne (VvSWEET), en 4 clades, d'après Chong et al. (2014).

### 5.3. Les invertases

Les invertases jouent également un rôle très important dans l'accumulation des sucres dans les baies. Elles catalysent l'hydrolyse du saccharose en fructose et en glucose utilisables comme sources de carbone et d'énergie. Elles se classent en trois catégories sur la base de leur solubilité, localisation, pH et point isoélectrique : les invertases vacuolaires (Inv-V), pariétales ou apoplastiques (Inv-CW) et neutres ou cytoplasmiques (Inv-N).

L'invertase pariétale (Vvcw INV) produit les hexoses qui seront transportés par les transporteurs d'hexoses de la membrane plasmique (HTs), contribuant ainsi à la création d'un gradient de saccharose favorable à sa sortie du phloème. Chez la vigne, l'induction de l'invertase pariétale et la chute relative de l'invertase vacuolaire sont des arguments en faveur du passage de la voie symplasmique à la voie apoplastique lors de l'activation du déchargement du phloème dans la baie à la véraison (Fig. 1. 9 ; Zhang et al. 2006).

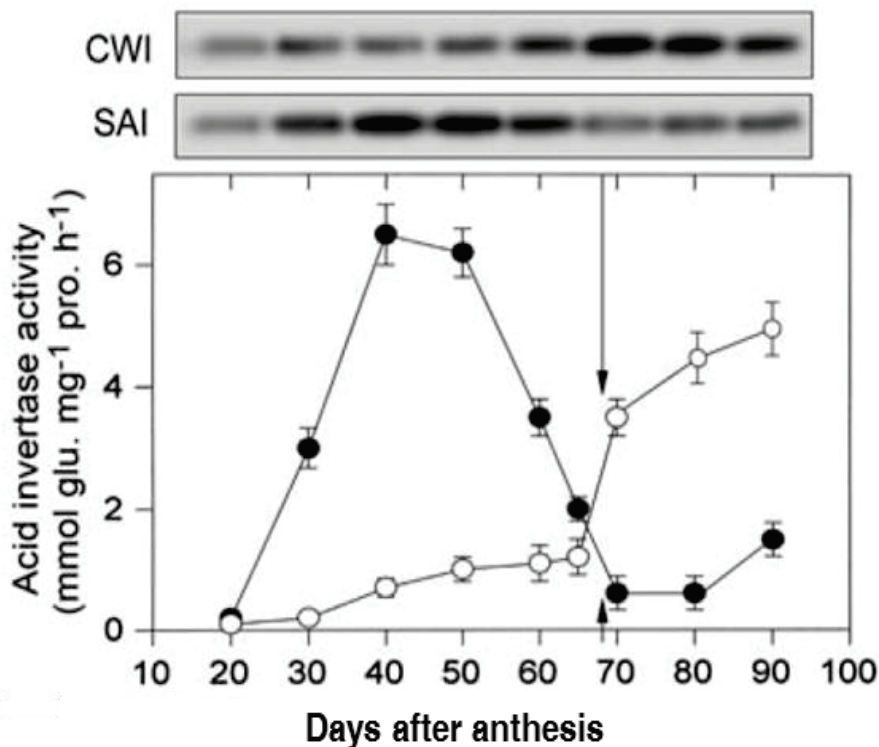


Figure 1.9. Changements des contenus et des activités de l'invertase acide pendant le développement du raisin d'après Zhang et al. (2006). L'intensité des bandes correspond aux quantités d'invertase vacuolaire (SAI) et pariétales (CWI) et le graphique indique les activités invertase vacuolaire (cercles noirs) et invertase pariétale (cercles ouverts). Les flèches correspondent au début du mûrissement.

La quantité relative d'hexoses et de saccharose accumulés dans la vacuole du raisin serait corrélée avec l'activité de l'invertase vacuolaire dans le cépage considéré, mais le fait que le saccharose soit inverti ou non ne semble pas affecter sensiblement la quantité totale de sucres accumulés (Takayanagi et Yokotsuka 1997 ; Davies et Robinson 1996).

L'invertase cytosolique interviendrait plus particulièrement lorsque le saccharose serait importé directement de l'apoplasme. Très peu d'information est disponible sur son expression ou son activité (Davies et al. 2012).

L'invertase est une des protéines les plus abondantes du vin (9-14% de la teneur totale en protéines dans le vin de Chardonnay) (Cilindre et al. 2008). 9 invertases neutres VvNIs, 2 vacuolaires GIN1 & GIN2 et une pariétale VvcwINV ont été caractérisées chez la vigne. GIN1 & GIN2 ont été identifiées dans les baies du cultivar Sultanine à partir de son ADNc et leur expression a été analysée dans différents tissus du cv. Shiraz (Dreier et al. 1998). Le profil de ces deux invertases n'est pas le même et leur expression vacuolaire est forte jusqu'à 10 semaines après la floraison, puis elle diminue drastiquement après la véraison (Davies and Robinson 1996). D'autre part, VvcwINV a été cloné dans des tissus de Cabernet Sauvignon et son expression a été analysée dans les feuilles et les baies au cours du développement. Elle augmente faiblement pendant le stade vert et diminue pendant la maturation (Hayes et al. 2007). L'expression de VvcwINV est induite parallèlement à celle du transporteur d'hexoses VvHT5 en réponse à l'infection par l'oïdium et le mildiou et par l'ABA dans les feuilles de Vigne (Hayes et al. 2010 ; Lecourieux et al. 2014). Les 9 invertases neutres ont été caractérisées dans les différents organes du Pinot Noir et du Merlot (Nonis et al. 2008). Les mêmes auteurs ont montré que l'expression des invertases neutres VvNI 1-5 est faible lors de la maturation.

#### **5.4. Les pompes à protons :**

Les ATPases forment une grande famille de protéines membranaires couplant l'hydrolyse de l'ATP au transport actif de divers ions et métabolites à travers les membranes cellulaires (Möller et al. 1996). Les pompes à protons occupent une place déterminante chez les végétaux.

*Pompes vacuolaires* : L'accumulation du saccharose et des acides organiques dans la vacuole peut s'effectuer contre un gradient de concentration et nécessite alors une source d'énergie constamment renouvelée. Différentes pompes à proton créent une force protomotrice qui se décompose en une DDP transmembranaire de l'ordre de 40 mV, positive vers l'intérieur, ainsi qu'un gradient de pH d'au moins 1 à 2 unités (Hedrich et al. 2012 ; Hedrich et al. 2015), pour excéder 5 unités chez les fruits acides (Schmidt and Briskin 1992 ; Muller et al. 1999 ; Brune et al. 2002 ; Rienmuller et al. 2012). Trois types de pompes vacuolaires très différentes sur les plans structurels et fonctionnels autorisent cette énergisation : la V-pyrophosphatase (V-PPase), la V-ATPase, et une ATPase de type P3<sub>A/B</sub> récemment identifiée sur le tonoplaste, alors que l'on pensait que ce type de structure était spécifique de la membrane plasmique (Faraco et al. 2014). Ces trois pompes sont des transducteurs énergétiques qui convertissent l'énergie chimique de l'hydrolyse du PPi ou l'ATP en un gradient de proton croissant, vers l'intérieur de la vacuole. Les pompes les plus « primitives » (V-PPiase et P3<sub>A/B</sub> ATPase) utilisent l'énergie d'une liaison P~P de leurs substrats respectifs pour le transfert de chaque H<sup>+</sup> du cytoplasme vers la vacuole (Johannes and Felle 1990 ; Palmgren and Nissen 2011 ; Bublitz et al. 2011). Des transitions conformationnelles empêcheraient le reflux des protons du lumen vers le cytosol (Lin et al. 2012 ; Palmgren and Nissen 2011). En revanche, la structure de la V-ATPase est extrêmement complexe, et s'apparente à celle d'un groupe électrogène convertissant l'énergie chimique en un mouvement de rotation, lequel est transmis par un arbre à une pompe à proton. Le rapport de couplage H<sup>+</sup>/ATP varie selon le gradient de protons qui doit être franchi, de façon analogue au changement de vitesse lors du franchissement d'une côte, à bicyclette ou en automobile (Rienmuller et al. 2012). Lobit et al. 2006 ont proposé une équation robuste, car valable aussi bien sur la V-ATPase de levure que celle de la betterave, qui permet de calculer cette stœchiométrie suivant les pH vacuolaire et cytoplasmique, et qu'ils ont utilisé pour modéliser l'évolution du contenu en acides de différents fruits (Lobit et al. 2006 ; Etienne et al. 2013). Il semble toutefois que l'on perde la trace de cette stœchiométrie variable difficilement explicable sur la base des modèles structuraux d'ATPase, la stœchiométrie étant fixée par les rapports entre sous unités de la pompe. Le fonctionnement de la pompe est réversible, c'est-à-dire qu'elle synthétise de l'ATP, lorsque l'énergie du gradient de protons (pondérée par le nombre de protons transportés) dépasse celle de l'ATP (Gambale et al. 1994 ; Hedrich et al. 2015). Quoiqu'il en soit, la V-ATPase transporte toujours plus de protons par ATP consommé que la P3<sub>A/B</sub> ATPase (entre 2 et 4, Kettner et al. 2003), ce qui signifie que la P3<sub>A/B</sub> ATPase devrait toujours forcer la V-ATPase (et la PPiase) à fonctionner

en mode reverse, d'où une hydrolyse futile de l'ATP. Une relation négative, entre l'activité de la pompe V-ATPase et  $P_{3A/B}$ -ATPase, permettrait d'éviter de telles interférences énergivores (Faraco et al. 2014).

*ATPase plasmique (PM  $H^+$ ATPase)* : L'extrusion d'un proton par l' $H^+$ ATPase plasmique mène à un gradient de pH de 1.5 à 2 ordre du grandeur (à l'extérieur de la cellule) et à un potentiel de repos de la membrane d'environ -120 à -160 mV (à l'intérieur de la cellule) (Sze et al. 1999 ; Lalonde et al. 1999). Cette force protomotrice détermine la direction passive du flux ioniques à travers des canaux spécifiques (Sze et al. 1999). La pompe plasmique peut également participer à d'autres fonctions essentielles à la croissance normale des plantes telles que la tolérance au sel, la régulation intracellulaire du pH et l'expansion cellulaire (Sussman 1994).

## 5.5. Métabolisme des Sucres

Le saccharose, déchargé par le phloème, a plusieurs voies métaboliques localisées dans différents compartiments subcellulaires (Fig. 1. 10). La réaction globale de la glycolyse est :  $\text{Hexose} + 2 \text{ADP} + 2 \text{Pi} + 2 \text{NAD}^+ \rightarrow 2 \text{pyruvate} + 2 \text{ATP} + 2 \text{NADH}, \text{H}^+$ . En absence d'oxygène, le NADH doit être recyclé, ce qui est essentiellement permis par la formation de lactate ou d'éthanol à partir du pyruvate chez les plantes (cycle anaérobie Fig. 1. 11). Le saccharose peut en outre servir de source carbonée pour la biosynthèse de métabolites primaires ou de polymères (composés pariétaux) nécessaires au développement de l'organe. Il est également stocké sous forme d'amidon, ou bien utilisé pour la synthèse de composés secondaires (phénoliques, flavonoïdes...). Le saccharose synthase (SuSy) peut cliver le saccharose en UDP-Glucose et fructose. Finalement, les sucres peuvent être transportés dans la vacuole pour y être stockés ou hydrolysés (saccharose).

Le saccharose peut être clivé à la fois par l'invertase (Inv) et la saccharose synthase (SuSy), et re-synthétisé par la saccharose phosphate synthase (SPS). Cette coexistence d'activités antagonistes permet de définir 4 cycles de substrats (nommés autrefois cycles futiles car leur bilan énergétique consomme de l'ATP) d'après Nguyen-Quoc et Foyer (2001) :

✓ Dégradation/synthèse du saccharose cytosolique : N-INV & SuSy clivent le saccharose cytosolique et la SPS le resynthétise. Il est probable que ce cycle participe à la force de puits pour le saccharose.

✓ Dégradation vacuolaire/synthèse cytosolique : V-INV clive le saccharose vacuolaire. Les hexoses sont transportés dans le cytosol, pour régénérer le saccharose, sous l'action de SPS & SuSy. Ce cycle permet l'augmentation du stockage des sucres sous forme d'hexoses dans la vacuole.

✓ Dégradation dans l'apoplasme/synthèse cytosolique : Le saccharose est exporté en dehors de la cellule où il est clivé par les invertases pariétales. Les hexoses sont ensuite remobilisés dans la cellule par des transporteurs.

✓ Synthèse/ hydrolyse de l'amidon dans l'amyloplaste : L'intensité de ce cycle est minimale *in vivo* car un des points de contrôle de ce cycle futile se situerait au niveau de l'inter-conversion G6P – G1P par l'UGPase (Tiessen et al. 2002) et l'autre, au niveau de l'échange des hexoses phosphates entre le plaste et le cytosol (Kunz et al. 2010).

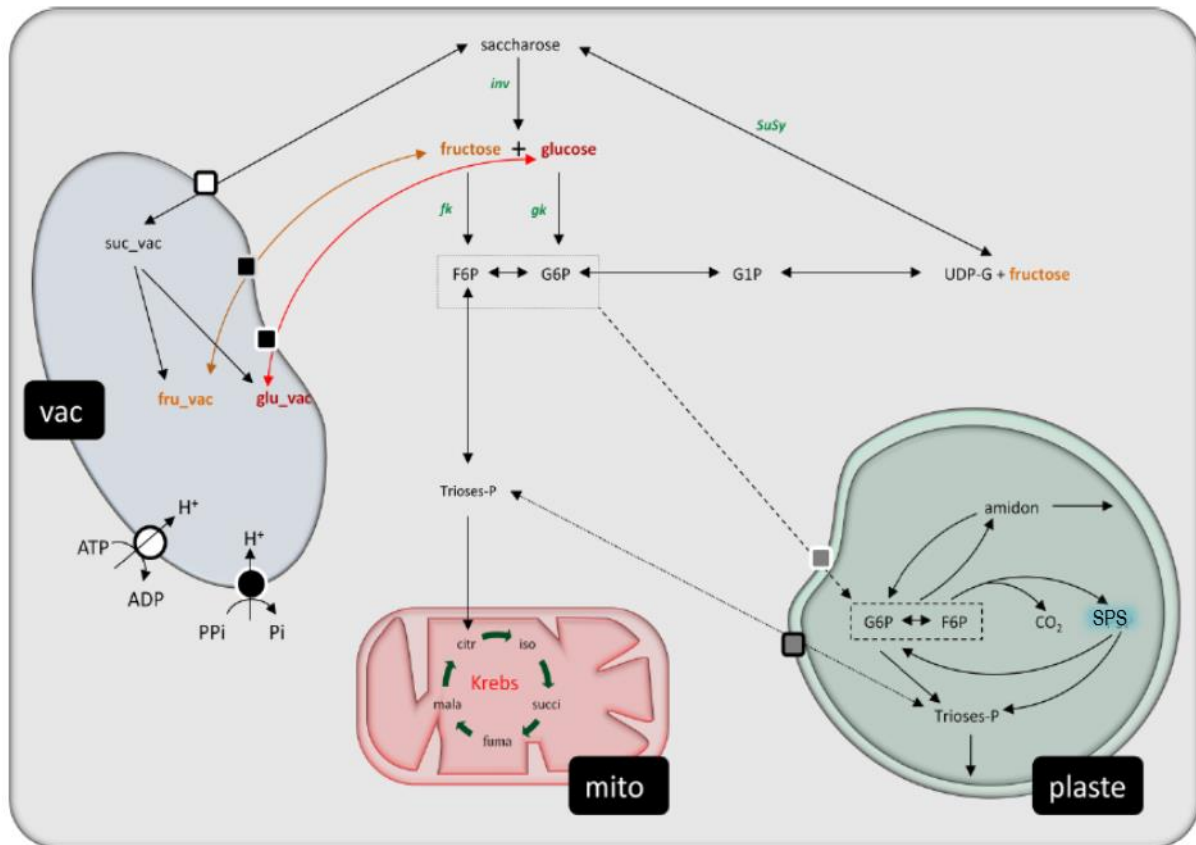


Figure 1. 10. Compartimentage des sucres dans une cellule puits de plantes d'après Monier (2012). Rectangle blanc entouré de noir : transporteurs de saccharose, rectangle noir entouré de blanc : transporteurs d'hexoses, rectangle gris entouré de blanc : échangeurs hexose-Pi/Pi et rectangle gris entouré de noir : triose-Pi/Pi. Les hexoses et le saccharose, après clivage par une invertase neutre cytosolique (*inv*) ou par la saccharose synthase (*SuSy*), peuvent servir à alimenter la respiration et les voies de biosynthèses, après l'action de la fructokinase (*fk*), de la glucokinase (*gk*) et/ou des hexokinases, de la phosphoglucose isomérase (PGI) et de l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase). Les hexoses et le saccharose peuvent être stockés dans la vacuole des cellules puits, grâce à des transporteurs localisés dans le tonoplaste qui catalysent un antiport sucre/proton. Deux pompes  $H^+$ -ATPase et  $H^+$ -pyrophosphatase tonoplastiques permettent de maintenir la différence de potentiel électrochimique de protons nécessaire au fonctionnement des transporteurs. Dans la vacuole, le saccharose peut être dégradé en glucose et fructose par une invertase acide (*Inv*).



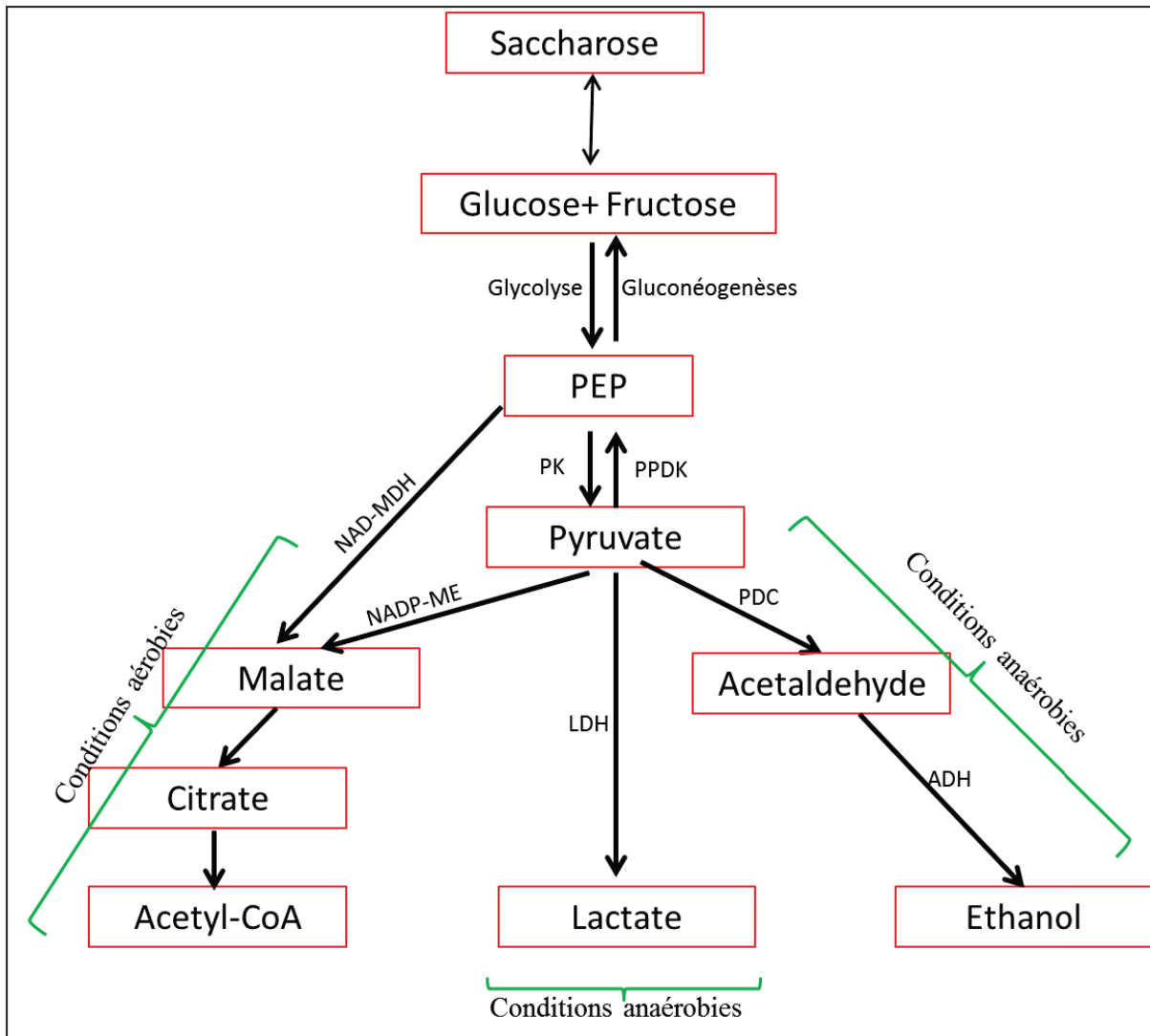


Figure 1. 11. Les voies métaboliques potentielles de la glycolyse du saccharose chez les cellules végétales

## 6. Acidité et métabolisme du malate:

**Acidité d'un fruit :** Elle est reliée à la présence d'acides organiques qui maintiennent le pH des tissus végétaux en dessous de 5.5 (Bennet-Clark 1937). La teneur en acides organiques est plus élevée dans les tissus végétaux que dans d'autres organismes (López-Bucio et al. 2000). Différents types d'acides organiques sont connus depuis longtemps tels que le citrique, l'oxalique, le malique et le tartrique. Ils ont une importance fondamentale dans plusieurs voies biochimiques des plantes. Quelques acides peuvent être en quantités importantes, alors qu'un grand nombre des autres acides ne sont présents que sous formes de traces (Vickery and Pucher 1940). Le malate est l'acide prédominant chez un grand nombre des fruits, qu'ils soient climatériques comme la pomme, la prune (Singh and Singh 2008), la tomate (Kortstee et al. 2007), la pêche (Wu et al. 2005) et la poire (Chen et al. 2007), ou non climatériques comme la cerise (Usenik et al. 2008) et le raisin (Kliwer et al. 1966). Le malate et le tartrate représentent plus de 90% de tous les acides organiques présents dans le raisin.

**Rôle du malate :** Le malate a plusieurs rôles physiologiques dans les tissus végétaux. Il constitue une forme de réserve du CO<sub>2</sub> avant photosynthèse, pendant les premiers stades de développement (Ruffner 1982 ; Kelly et al. 1976 ; Beriashvili and Beriashvili 1996). Puis, suivant le stade de développement, le malate peut alimenter la respiration et la gluconéogenèse (Famiani et al. 2014) ainsi que la fermentation alcoolique ou lactique. De plus, le malate a la capacité de contrôler plusieurs processus physiologiques tel que l'ouverture des stomates, la nutrition minérale, la résistance à la toxicité des métaux lourds (Fernie et Martinoia 2009 ; Schulze et al. 2002).

**Malate au cours du développement du raisin :** La teneur maximale en malate (150-250 mmol L<sup>-1</sup>) est atteinte juste avant le début de la maturation (Ruffner and Hawker 1977). Pendant la maturation, la baie commence à perdre le malate qui est libéré de la vacuole et qui devient disponible pour le catabolisme par diverses voies tels que le cycle des acides tricarboxyliques, la respiration, la gluconéogenèse, la fermentation alcoolique, les inter-conversions d'acides aminés et la production des composés secondaires complexes (anthocyanines, flavonols...) (Famiani et al. 2000 ; Farineau et laval-Martin 1977 ; Ruffner 1982 ; Sweetman et al. 2009). Le malate endogène peut alimenter la respiration pendant 15 jours au mieux, ou permettre la synthèse de 5% des sucres accumulés. Le malate est donc

presque épuisé à la maturité, avec un teneur ne dépassant pas 50 mmol L<sup>-1</sup>. C'est pourquoi la teneur en malate, ou plus précisément le rapport malique/tartrique pendant le développement, occupe une position centrale pour déterminer la véraison et la maturation de la baie de raisin.

### 6.1. Les voies de synthèse du malate (Fig. 1. 12) :

Le malate est synthétisé dans les baies vertes à partir du PEP issus de la glycolyse des hexoses, qui sont formés après inversion du saccharose importé. Les enzymes de la glycolyse et de la synthèse du malate sont actives dans les baies du raisin (Hawker 1969 : Taureilles-Saurel et al. 1995). La photosynthèse, qui se produit dans la baie même, est une autre voie potentielle (Hale 1962). En plus, le malate peut se former par les cycles des acides tricarboxyliques, et du glyoxylate.

#### 6.1.1. Glycolyse :

Le malate est essentiellement produit à partir du PEP (PhosphoEnolPyruvate) *via* .les activités de la PEP-carboxylase (PEPC) et de la malate déshydrogénase (MDH) (Givan 1999). La PEPC est exclusivement située dans le cytosol des plantes (O'Leary et al. 2011), alors que différentes MDH sont situés dans le cytosol, les glyoxysomes et les mitochondries (Taureilles-Saurel et al. 1995 a, b). Les analyses enzymatiques et transcriptomiques montrent un niveau élevé d'activité de PEPC et de MDH lors du début du développement, coïncidant avec l'accumulation de malate, qui diminue fortement juste avant la véraison (Diakou et al. 2000 ; Terrier et al. 2005 ; Guillet et al. 2002), avant que la MDH ne ré-augmente pendant la maturation. Cela suggère que la MDH pourrait être impliquée dans la synthèse et la dégradation nette du malate, en régulant ses isoformes. La MDH catalyse l'oxydoréduction réversible du malate et de l'oxaloacétate (OAA). La PEPC (qui produit l'OAA dans le cytoplasme) et la MDH cytoplasmique seraient responsables de la synthèse du malate pendant le stade vert, alors que la MDH mitochondriale serait impliquée principalement dans la dégradation du malate (respiration). Quoiqu'il en soit, de très anciennes expériences à l'aide de traceurs au <sup>14</sup>C ont montré que la voie  $\text{hexose} + 2\text{CO}_2 \leftrightarrow 2 \text{malate}^{2-} + 4 \text{H}^+$  est potentiellement réversible à tous les stades de développement, indépendamment de son flux net.

### **6.1.2. La photosynthèse :**

Une partie du malate peut être synthétisé à partir des assimilats de la photosynthèse de la baie elle-même (Beriashvili et al. 1996). Les baies mûres du raisin sont incapables de photosynthèse (Piechulla et al. 1987 ; Sweetman et al. 2009), mais la ré-assimilation photosynthétique du CO<sub>2</sub> respiré dans les baies vertes peut fournir une partie du carbone pendant le développement (Ollat and Gaudillere 2000). Dans le chloroplaste de la baie, le CO<sub>2</sub> libéré par décarboxylation du malate par la NADP-ME, peut être absorbé par la RuBisCO (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) et entrer dans le cycle de Calvin (Drincovich et al. 2001).

### **6.1.3. Cycle des acides tricarboxyliques :**

Trois enzymes principales participent au métabolisme du malate dans la mitochondrie de la baie : la Fumarase, la mMDH et l'enzyme malique mitochondriale (mME). D'autres enzymes peuvent synthétiser le malate à partir d'autres intermédiaires du TCA, tels que l'ATP-citrate lyase qui convertit le citrate en malate dans le cytosol (Fatland et al. 2005). La fumarase mitochondriale ne peut pas être limitante dans la synthèse du malate parce que son activité est liée à celle de la succinate déshydrogénase (Sweetman et al. 2009). L'activité forte de mMDH observée pendant le stade vert (Taureilles-Saurel et al. 1995b) peut être liée à la forte vitesse de la respiration pendant ce même stade (Ollat and Gaudillere 2000).

### **6.1.4. Cycle du glyoxylate**

La malate synthase est l'enzyme formant le malate dans le glyoxysome, qui convertit le glyoxylate pendant le cycle du glyoxylate. Terrier et al. (2005) ont montré la forte expression d'un gène putatif de malate synthase pendant la période d'accumulation du malate.

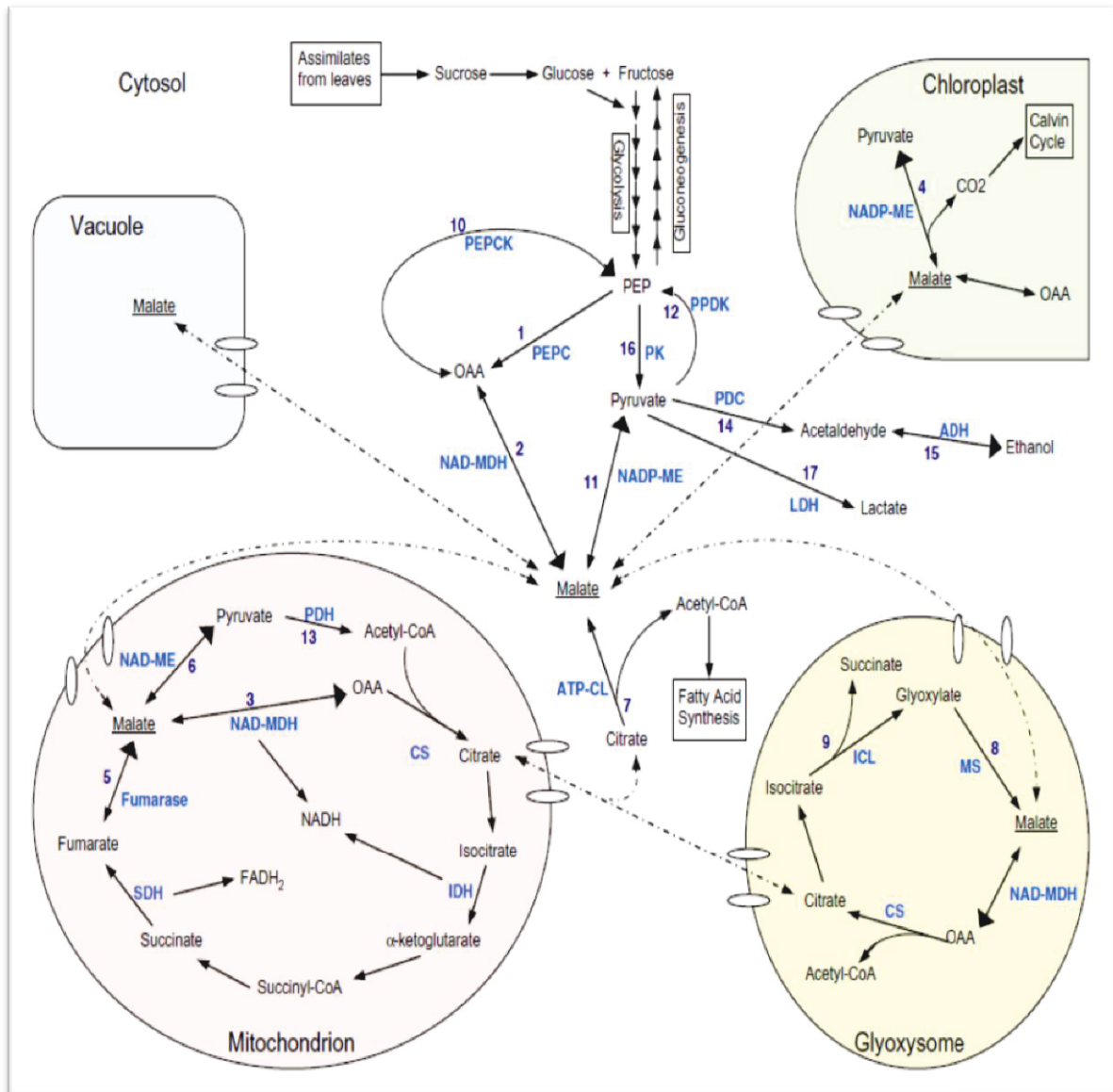


Figure 1. 12. Les voies métaboliques possibles pour la synthèse et la dégradation du malate dans la cellule de la fruitte d'après Sweetman et al. (2009).

## **6.2. Les voies de dégradation du malate (Fig. 1. 12) :**

Dès la véraison, les sucres s'accumulent dans les vacuoles du raisin et les enzymes de la voie gluconéogénèse s'activent (Ruffner et Hawker 1977). Cependant, le malate libéré de la vacuole devient la source principale de carbone, utilisé dans le métabolisme énergétique de la baie, en participant à la gluconéogénèse, la respiration et à la biosynthèse de composés secondaires.

### **6.2.1. Gluconéogénèse :**

La gluconéogénèse se produit pendant la maturation chez les vignes et les tomates, lorsque les sucres s'accumulent rapidement (Halinska and Frenkel 1991 ; Beriashvili and Beriashvili 1996). Le malate peut former le PEP nécessaire à la gluconéogénèse via la MDH et la PEP carboxykinase (PEPCK), via les activités de l'enzyme malique (ME) et du pyruvate ortho-phosphate dikinase (PPDK) (Ruffner et al. 1982 ; Sweetman et al. 2009). La phosphorylation régule de façon différente l'activité de la PEPC et celle de la PEPCK chez les plantes (Famiani et al. 2005). L'expression de gènes codant la PEPCK augmente simultanément avec la diminution de l'expression de gènes PEPC pendant la dégradation du malate dans les baies du raisin (Terrier et al. 2005). Pendant le stade vert, la faible activité PEPCK et la forte activité PEPC (qui sont toutes les deux phosphorylées) encouragent la formation d'OAA à partir de PEP, permettant ainsi à MDH de synthétiser le malate. A la véraison, l'expression des deux protéines diminue et la formation d'OAA à partir du PEP ralentit donc, simultanément à une diminution de la respiration des baies (Ollat and Gaudillere 2000). Pendant la maturation, l'expression de PEPCK augmente et l'OAA se transforme en PEP dans la gluconéogénèse. Ruffner and Hawker (1977) ont observé une diminution du pyruvate suivi d'une augmentation simultanée du PEP dans les baies mûres du raisin. Le ME a une activité réversible (Franke et Adams 1992) et augmente au cours du développement du raisin (Goodenough et al. 1985). L'activité de PPDK pourrait être liée à une faible réponse au stress en oxygène (Huang et al. 2005), encourageant la fermentation. Cependant, Famiani et al. (2016) n'ont pu détecter par immunologie la PPDK que chez la tomate, parmi un nombre important de fruits, dont le raisin.

### **6.2.2. La respiration :**

Le quotient respiratoire de nombreux cépages augmente de 1 (stade vert) à 1.5 (stade mûr) (Harris et al. 1971), ce qui pourrait être lié à l'utilisation du malate comme substrat respiratoire pendant la maturation des baies du raisin, ou bien à la forte propension des baies à la fermentation aérobie (Romieu et al. 1992 ; Taureilles-Saurel et al. 1995b, Tesnière et al. 1994). La respiration élevée pendant le stade vert diminue pendant la maturation puis se stabilise à un faible niveau (Ollat and Gaudillere 2000). À la véraison, la majeure partie du malate libéré de la vacuole est utilisé par les mitochondries comme intermédiaire respiratoire dans le cycle TCA, afin de soutenir la synthèse de l'ATP. Taureilles-Saurel et al. (1995) suggèrent que l'utilisation du malate dans le cycle TCA après la véraison soit liée à la forte activité mMDH à ce moment. La décarboxylation du malate, par l'activité de ME, est également nécessaire pour produire le pyruvate autorisant la formation de l'acetyl CoA qui est absolument requis pour le bouclage du cycle. Pendant la maturation, la NADP-ME participerait à la dégradation du malate (Franke and Adams 1992 ; Sweetman et al. 2009). La dégradation du malate par l'activité de NADP-ME dépend du rapport  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  et du pH (Ruffner et al. 1984) et de régulateurs allostériques tel que  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  et l'ATP (Chang and Tong 2003). Le malate peut également être dégradé par la NAD-ME spécifique des mitochondries des plantes. L'activité correspondante reste incertaine chez le raisin mûr (Romieu et Flanzky 1988), bien que les travaux de (Famiani et al. 2000) aient révélé la présence de la protéine tout au long du développement.

### **6.2.3. La fermentation :**

Le pyruvate formé à partir du malate par l'enzyme malique, peut être fermenté dans les baies mûres du raisin soit en l'alcool, par l'activité du pyruvate décarboxylase (PDC) et de l'alcool déshydrogénase (ADH), soit en lactate via l'activité de lactate déshydrogénase (LDH) (Sweetman et al. 2009). La fermentation se produit normalement si l'environnement interne devient hypoxique, mais également si le cytoplasme s'acidifie, ce qui peut se produire lorsque la glycolyse dépasse la phosphorylation oxydative et que le pyruvate s'accumule (Zabalza et al. 2009), ou bien si l'activité respiratoire est limitée, d'où un rapport  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  élevé (Ponce-Valadez and Watkins 2008). La fermentation lactique se produit par un flux glycolytique rapide de pyruvate et par un ralentissement simultané de la respiration aérobie ainsi qu'une diminution de l'activité du succinate déshydrogénase (Sweetman et al. 2009).

## ***Problématiques et objectifs de la thèse :***

La forte hétérogénéité des baies du raisin grève actuellement toutes les approches du développement du fruit (Carbonell-Bejerano et al. 2016; Rienh et al. 2016; Gouthu et al. 2014) au point que certains analysent, par exemple, l'expression des gènes dans des baies individuelles (Lund et al. 2008), ou des lots de baies triées sur la base de leur composition individuelle (Rienh et al. 2016), de leur densité (Carbonell-Bejerano et al. 2016 ; Terrier et al. 2001 ; Singleton et al. 1966) ou d'un panel d'indicateurs sensoriels ou instrumentaux (fermeté, coloration). Cependant, le corpus de connaissances sur les cinétiques de développement « du raisin » repose sur le concept qu'une baie « idéale » se comporterait comme la population moyenne des baies au vignoble, ce qui est bien évidemment faux, si ces baies sont non synchrones. Dans le meilleur des cas, les protocoles d'échantillonnage visent à décrire le plus fidèlement possible l'évolution de la composition moyenne de la vendange, et l'hétérogénéité n'est d'ailleurs qu'exceptionnellement analysée pour elle-même, et n'a quasiment jamais été conceptualisée en termes d'a-synchronie. En conséquence, nous ignorons comment se développe une baie unique, et toute la variabilité de la composition des vendanges est attribuée à la régulation de la physiologie de la baie. La structure de la population est totalement négligée, en tant que variable explicative.

Usuellement, le développement des baies de raisins est étudié en échantillonnant périodiquement un certain nombre de baies (ca.100 baies), dont la composition moyenne est censée refléter fidèlement l'évolution de la qualité globale de la vendange.

Un biais statistique, lié à l'asynchronie des baies, amène à sous-estimer la vitesse de croissance, comme les flux d'accumulation des sucres et des acides organiques dans le fruit (Coombe 1984). Le décalage entre baies pourrait atteindre jusqu'à 2 semaines, pour les niveaux de sucres et d'anthocyanes, puis les baies auraient tendance à se synchroniser en fin de maturation (Gouthu et al. 2014). L'hétérogénéité des baies pourrait dépendre du génotype, des conditions environnementales, et de la dynamique hormonale interne (Bottcher et al. 2011; Dai et al. 2011; Pagay et al. 2010). Il est largement admis que la population des baies aurait besoin de 40 à 50 jours (Fig. 1. 12) afin d'atteindre 1.1 M d'hexoses pendant la maturation (McCarthy 1999), ce qui correspond à une vitesse moyenne d'accumulation de 15-20  $\mu\text{mol hexoses min}^{-1}$  pour une baie imaginaire pesant un kg à la maturité. Cependant, les cinétiques obtenues par Coombe (1984) suggèrent qu'une baie unique accumulerait les sucres



3 fois plus rapidement. Coombe se demande si le phénomène est bien réel, ou bien s'il s'agit d'un artefact lié à la blessure occasionnée par les prélèvements périodiques de micro-volumes de jus dans les assises sous-épidermiques des baies. Plusieurs cinétiques d'évolution du diamètre ou du volume des baies uniques montrent que la durée de croissance ne dépasserait pas 15-20 jours (Fig. 1. 13 ; Coombe 1984 ; Ollat 1997 ; Hang and Hang 2001 ; Friend et al. 2009), sans que cette incongruité n'ait été soulignée le moindre du monde par les auteurs correspondants, Coombe excepté.

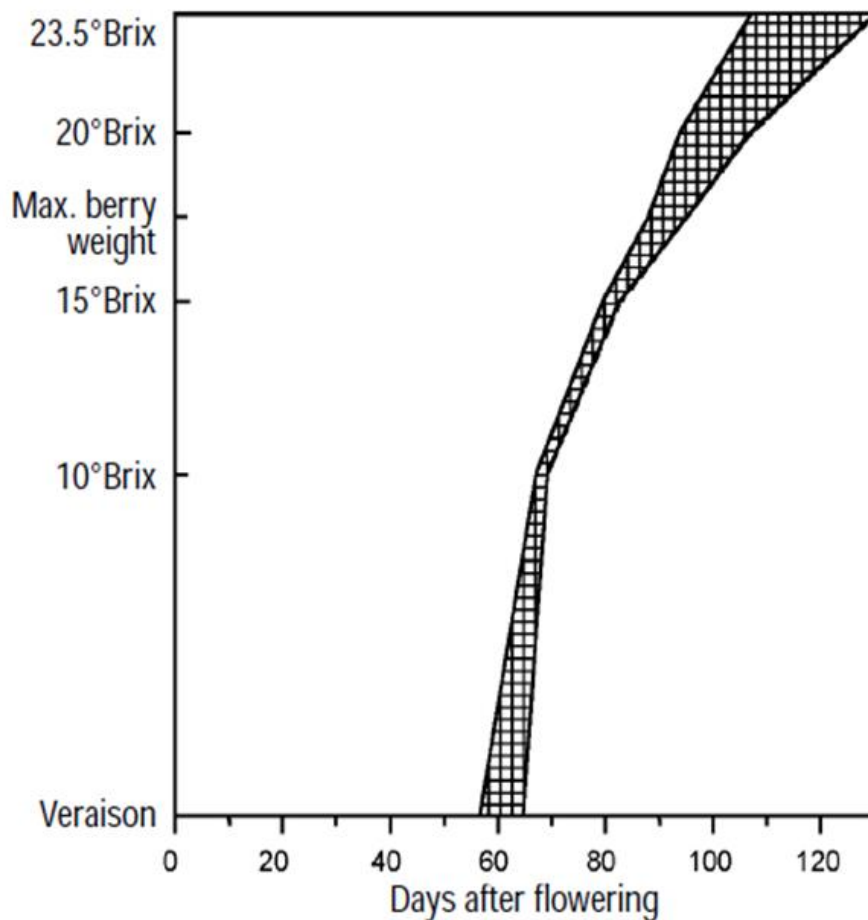


Figure 1. 13. Cinétique de croissance et d'accumulation des sucres de populations de baies de Syrah en cours de maturation, d'après McCarthy (1999). Véraison : au sens traditionnel : changement de couleur de 50 % des baies.

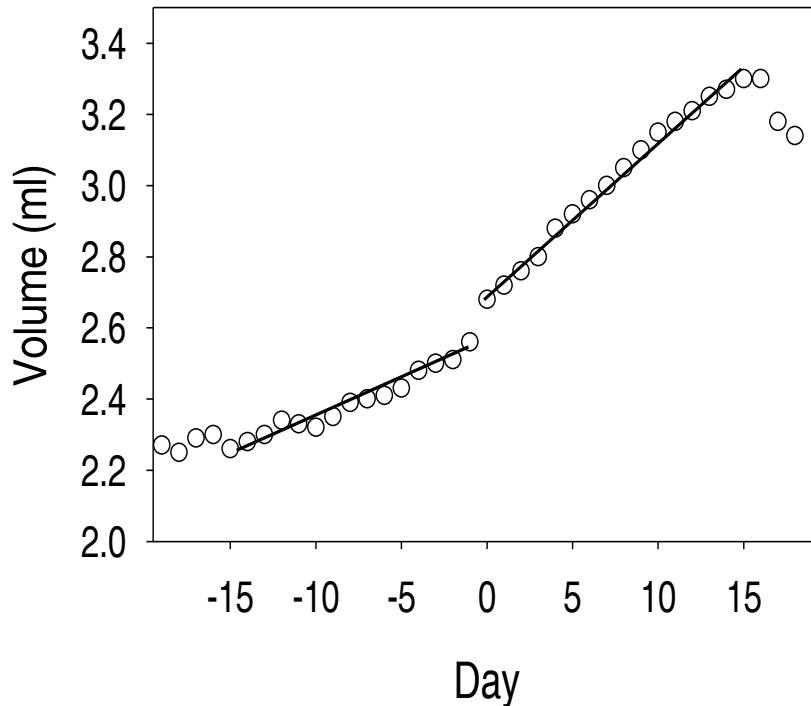


Figure 1. 14. Cinétique de croissance d'une baie unique du cultivar Doradillo d'après Coombe (1984). 0 : initiation de la seconde période de croissance liée à la maturation.

D'autre part, les données bibliographiques permettent d'avancer une respiration de 15 à 24  $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1}$  pour une baie imaginaire pesant un kg au stade mûr (Koch et al. 1978 ; Harris et al. 1971 ; Kriedemann 1968 ; Terrier et al. 1996). Comme la respiration est relativement invariante, il y aurait donc entre 6 à 18 hexoses accumulés par hexose respiré, suivant que les vitesses sur population, ou sur baie unique, sont prises en compte. Il n'est pas réaliste de prétendre comprendre et encore moins modéliser la physiologie du développement du raisin sur des bases aussi incertaines, variant du simple au triple. Le dernier chiffre indique que si la baie consacre 1 ATP au transport et au stockage d'un hexose, alors la demande énergétique liée au stockage des sucres représente 50 % du métabolisme du fruit, ce qui est considérable.

Notre interprétation du métabolisme du raisin doit donc être revisitée sur la base de données quantitatives à l'échelle de la baie. L'incertitude actuelle sur les flux métaboliques au sein des baies, et la non prise en compte de leur synchronisation comme niveau additionnel de régulation, grèvent actuellement toute tentative d'aboutir à des modèles pertinents de

développement du fruit, ou à apporter des réponses à des questions récurrentes, telles que le coût énergétique de l'accumulation des sucres, ou l'utilisation du malate comme substrat respiratoire majoritaire pendant le mûrissement. A ce sujet, il convient de plus de remarquer que l'ensemble des données respiratoires publiées ont été obtenues sur baies détachées, c'est-à-dire en supprimant l'influx de sucre qui est à son paroxysme pendant la maturation, ce qui pourrait sensiblement affecter la variable mesurée. De plus, on ignore si les variations de composition de la vendange, liées aux contraintes environnementales, au génotype et au mode de conduite reposent sur des variations de flux métaboliques au sein de chaque baie, comme supposé implicitement jusqu'alors, ou bien si ces contraintes affectent les compétitions trophiques entre baies, et la synchronisation des mûrissements qui en découle.

Nos travaux visent en premier lieu à revisiter les liens quantitatifs entre le métabolisme sucre/acides organiques, la croissance et la respiration à l'échelle de la baie unique, afin de bien comprendre comment une baie se développe au cours du temps et de réexaminer les liens entre croissance, import des assimilats, métabolisme des osmoticums principaux et énergétique cellulaire, sur une base quantitative rigoureuse. Il s'agit de définir des stades physiologiques réels du fruit, en s'affranchissant du paradoxe que ceux-ci n'ont aucun sens, sur une échelle considérant un mélange de baies asynchrones.

C'est pourquoi, j'ai tenté, au cours de ma thèse, de mesurer la vitesse réelle de développement des baies uniques, au sein de la population. Nous nous sommes également attachés à mettre au point une méthode de mesure de respiration sur baie liée à la plante, afin de détecter la signature de l'activation brutale de l'import des photo-assimilats et de la consommation du malate sur la demande respiratoire du fruit, lors de l'initiation du mûrissement. Enfin, nous avons cherché à savoir quelle est la stabilité de ces relations, et à mesurer l'impact de système de conduite (différentes tailles) sur le synchronisme, ou la vitesse de maturation des baies individuelles.

***Chapitre 2. How fast does a single *Vitis vinifera* L. berry ripen: Water, sugar and acids fluxes revisited.***

## **How fast does a single *Vitis vinifera* L. berry ripen? Water, sugar and acid fluxes revisited.**

**Rezk SHAHOOD<sup>(1,2,3)\*</sup>, Laurent TORREGROSA<sup>(2)</sup>, Charles ROMIEU<sup>(1)\*</sup>**

<sup>1</sup> *INRA Montpellier, UMR AGAP, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 02, France*

<sup>2</sup> *Montpellier SupAgro, UMR AGAP, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier 02, France*

<sup>3</sup> *General Commission for Scientific Agricultural Research - Lattakia, Syria*

**Authorchip declaration:** This is to acknowledge that all authors contributed significantly and equally towards the final manuscript. All authors are in agreement with the contents of the manuscript and gave their consent for publication.

**Corresponding author:** Charles Romieu, INRA Montpellier, UMR AGAP, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 02, France, [charles.romieu@inra.fr](mailto:charles.romieu@inra.fr), 0680278991.

**Acknowledgements:** This research was supported by a PhD grant from the ministry of higher education (Damascus, Syria). The authors greatly acknowledge Pr. Jean Michel Bousiquot, Dr. Thierry Lacombe and Christian Pons for providing access to the INRA-Montpellier SupAgro vineyard. The authors greatly thank Dr. Philippe Chatelet for useful suggestions about text editing.

**Disclosure statement:** There are no conflicts of interest to disclose.

**Running title:** Single berry in a non-synchronized population

## **Abstract**

**Background and Aims:** Grape berry developmental phases address a population of unsynchronized fruits basically incompatible with the very notion of physiological stage. New, precise kinetics of berry ripening are proposed here, freed from population statistical biases.

**Methods and Results:** Sugar, acids and weight were determined on 2290 individual berries and 136 clusters from, mostly cv. Pinot Meunier, Syrah, Zinfandel, Cabernet Sauvignon and Pinot ML1 microvines. A-synchronicity in the start of hexose storage is the major determinant of berry heterogeneity in composition: the delay between berries compares with ripening duration itself threatening time resolution on average kinetics published so far. Phloem unloading starts from softening for a 26 days-period only. Phloem unloading and growth simultaneously stops at 0.9 M hexose, but sugar concentration persists with berry shriveling. Growth resumes six days after softening, suggesting massive xylem backflow during this interval only. Malate becomes the major respiratory substrate during early ripening, but its breakdown rate rapidly declines and stops in two weeks, without affecting sugar accumulation.

**Conclusions:** The present revisit of berry ripening, totally consistent with disparate data on single fruit development, allows elementary physiological processes to be distinguished from population artifacts, resulting in a simpler interpretation of berry development.

**Significance of the Study:** This study provides unprecedented time resolution on berry internal clock and major metabolic fluxes during ripening. Control of fruit synchronicity provides an alternative mechanism to metabolic regulation, concerning the impact of viticultural practices, genetic variation and environmental stress on the elaboration of oenological quality.

**Key words:** Fruit development, primary metabolism, growth, sugar, malate, metabolic flux.

**Abbreviations:** ALMT: aluminum-activated malate transporter, DAF: Day after Flowering, DAS: Days after Softening (individual), DAV: Day after Véraison, EST: expressed sequence tag, GxE: Genes and Environment interaction, Nberry: a normalized imaginary berry weighing one kg at maturity, Phase I: Green phase, Phase II: Lag phase, Phase III: Ripening phase.

## **Introduction**

Omics tools have greatly contributed to elucidate the regulation of grapevine fruit ripening as the non-climacteric fruit best studied so far. However the marked heterogeneity among berries within a bunch still constitutes a serious bottleneck for addressing ripening at pertinent regulatory level, i.e. the fruit, as opposed to the population (Lund et al. 2008; Gouthu et al. 2014; Carbonell-Bejerano et al. 2016; Rienth et al. 2016). In addition to rising methodological concerns (Higginson et al. 2016), the lack of synchronicity in the development of berries restricts the understanding of ripening process to excessively crude concepts. In contrast to fruits such as apples and bananas, grape berries do not preliminarily accumulate starch reserves and necessarily ripen on the vine, at the expense of a marked activation of the phloem apoplastic pathway (Ollat and Gaudillere 1998; Keller and Shrestha 2014; Zhang et al. 2006). Sugar accumulation immediately follows berry softening concomitantly to a relaxation of turgor pressure, the whole sequence being reversibly blocked in jacketed berries (Coombe 1987; Thomas et al. 2008; Gambetta et al. 2010). From the onset of ripening, berries suddenly act as privileged sink for sugars and water. During ripening, growth resumes while osmotic pressure progressively decreases from -0.9 to -3 MPa (Matthews et al. 1987) which enables the ripening fruit to overcome severe water limitation (Keller et al. 2015). Most changes in gene expression at ripening precisely occur during the fast softening period, before any changes in volume, sugars, acids and coloration can even be detected (Terrier et al. 2005; Rienth et al. 2016).

Berry ripening does not involve any autocatalytic emission of ethylene and respiratory climax, hence grape is considered as a typical non-climacteric fruit. However, futile H<sup>+</sup> recirculation is induced across the tonoplast, triggering a net release of vacuolar malic acid previously accumulated as the major osmoticum during the first growth period in green stage (Terrier et al. 2001). Malic acid then serves as a substrate for respiration and gluconeogenesis (Famiani et al. 2016) and any possible excess acidity released into the cytoplasm would readily be detoxified through the formation of a diffusible pool of ethanol (Terrier et al. 2005). Besides enzymes in the sugar/malate interconversion pathway such as PEPcase (*Phosphoenolpyruvate carboxylase*) or PPCKase (*Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase*), members of the ALMT and P<sub>3A</sub>-ATPase families display concerted changes in expression, together with ADHs (*Alcohol dehydrogenases*) as the first ripening related genes identified in

grape (Tesnière and Verriès 2000; Rienth et al. 2016), however the molecular determinism of malate breakdown remains to be clarified.

Numerous academic and practical studies have shown that berries require a 40-50 days ripening period in order to reach 1.1 M hexose concentration (Davies and Robinson 1996; McCarthy and Coombe 1999; Coombe and McCarthy 2000; Rogiers et al. 2006; Famiani et al. 2016), which corresponds to an accumulation rate of 15-20  $\mu\text{mol hexose}/\text{min}/\text{Nberry}$ . Since the activity of the respiratory chain lies within 15-24  $\mu\text{mol O}_2/\text{min}/\text{Nberry}$  (Kriedemann 1968; Harris et al. 1971; Koch and Allewedt 1978; Terrier et al. 1996), sugars are accumulated six times faster than they could be oxidized. Considering its maximum level is reached just before ripening (0.083 mol/Nberry), endogenous malate would support respiration for 7-11 days at best if used as the sole substrate, or allow the synthesis of ca one twentieth of sugars to be accumulated. Malate decay would fit first order kinetics (Duchêne et al. 2014); Famiani et al. (2014) confirmed it should only represent a significant respiratory substrate at the very beginning of berry ripening, when compared to sugar contribution. Moreover, it was recently shown that, at low temperature, malate breakdown can be postponed compared to the onset of hexose storage (Rienth et al. 2016). This suggests that the electro-osmotic or respiratory contributions of preexisting malic acid are not absolutely required for energizing sugar transport in grapevine fruits. Whether the induction of sugar storage necessarily impairs the capacity to maintain vacuolar acidity is a critical question regarding our understanding of the ripening of acidic fleshy fruits, and for targeting realistic breeding goals in grape, citrus, or apple. In this respect, one must realize that previous basic kinetics assessments rely on sequential samples representing the global berry population in the experimental plot, whose average composition was implicitly assumed to obey the same temporal pattern than that of a single typical fruit. This concept was criticized by Coombe (1984) who suggested that an individual berry may ripen up to 3 times faster than ubiquitously observed on averaged berry samples (provided that the sequential hypodermal sampling procedure he used did not itself accelerate fruit ripening). Virtually, all kinetics data on berry development may thus be affected by a critical statistical bias due to the asynchronism of berry ripening. Unfortunately, data on the developmental pattern of individual berries remains particularly scarce, segmented or under-interpreted (Lund et al. 2008; Friend et al. 2009; Castellarin et al. 2011; Higginson et al. 2016, etc.), so severe doubts persist on the actual velocity of water, sugar accumulation and malate breakdown as the more basic aspects of berry fluxomics.



In the present work, exhaustive measurements on individual berries led us to provide a first quantitative basis of berry ripening at the single fruit level, with particular emphasis on the timing of phloem unloading, and on the intensities of associated water, sugar and malate fluxes, highlighting the change in paradigm announced by Bryan G. Coombe thirty years ago.

## **Materials and methods**

### *Plant material*

Experiments were conducted with *Vitis vinifera* L. cultivars Pinot Meunier (1035 berries plus 132 bunches), Syrah (696 unsynchronized berries and 500 synchronized ones), Zinfandel (4 bunches) and Cabernet-sauvignon (49 berries from 1 cluster) and grown in the experimental vineyard of Montpellier SupAgro during 2014 and 2015 seasons. Plants were trained in double Guyot system with a 1.2 x 2.5 m distance, under controlled irrigation. The corresponding environmental variables for 2015 are provided in Supplementary Fig. 2. S1. Single berry growth (10 berries) was analyzed in ML1 microvines grown in greenhouses with a 25/15°C day night temperature, as in (Torregrosa et al. 1998; Rienth et al. 2014).

### *Sampling for primary metabolism analyses*

Berry weight, sugars and organic acids contents were determined (i) on all individual berries from 2-3 clusters at each sampling date, reaching a total of 1035 single fruits for cv. Pinot Meunier (2014), (ii) on 14 berry pools corresponding to 14 clusters at each date(2014). Clusters were harvested on a total of 19 vines, removing a maximum of 30% clusters per vine. Delay between 2 sampling points was 10 days for a total of 7 sampling dates. Then, (iii) individual Syrah berries were sampled randomly on 30 vines, instead on a few clusters as above, in order to address heterogeneity in usual samples that are representative of the experimental plot (2015). Delay between 2 sampling points was reduced to 3-4 days at the onset of ripening and 7 days for other time points, for a total of 11 sampling dates and finally (iv) 500 berries (cv. Syrah) were tagged with colored rings according to their individual softening dates, in order to obtain synchronized fruit samples (accuracy  $\pm$  1 day), representing 3-10 berries per cluster. All fruits were weighed and stored at -80°C within 4 hours after harvest.

### *Cluster development monitoring*

Berry growth at cluster level was non-destructively determined by periodic immersion of twenty clusters attached to the vine, randomly selected from several plants for each variety as specified in the text. Each cluster was immersed weekly to an exact depth indicated by a plastic marker on the rachis in a full container of pure water. Water loss was determined with a 0.1 g accuracy scales (Lang and Thorpe 1989). Berries in each cluster were counted and weighed at the end of the experiment.

### *Individual berry growth*

Ten berries of ML1 microvine plants, a genotype derived from Pinot Meunier (Chaïb et al. 2010; Luchaire et al. 2017) were placed in front of a blue cardboard screen including a surface standard and periodically photographed with a digital camera (Nikon Coolpix L110 12.1MP digital camera with 15X optical vibration reduction (vr) zoom, Tokyo 100-8331, Japan). Single fruit volumes were evaluated from pixel counts, using the ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, ), assuming berries as ellipsoid of revolution. In addition, kinetics of individual berry diameter of Pinot Noir and Cabernet Sauvignon were retrieved from figure 1 and 2 in Friend et al. (2009) with the “save xy coordinate” macro in the Image J software, before volume calculation.

### *Sugar and organic acid content determination*

Individual berries and cluster samples were deseeded and immersed in 5 times their weight of pure water in plastic vessels. In order to save time needed for crushing (2290 berries) samples, samples were autoclaved at 120°C for 20 min, before homogenizing by vigorous hand shaking. It was preliminarily verified that this procedure did not alter the composition of berry juices. The following procedure is essentially the same than described by in Rienth et al. (2014). Briefly, samples were re-diluted tenfold in 0.0125 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with 600 µM acetic acid as internal standard. Potassium bi-tartrate precipitation was prevented by removing potassium using 0.18 g Amberlite IR-120 Plus (sodium form, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per mL of sample. After overnight agitation in a vertical rotary shaker, samples were centrifuged (10,000 g for 10 min, 30°C) and the supernatant transferred into HPLC vials. Injections were performed onto an Aminex HPX87H column (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) with a 0.5 ml/min elution with 0.0125 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 60°C. Detection was

performed with a Waters 2487 dual absorbance detector (Waters Corporation, Milford, MA, USA) and a Kontron 475 RI detector (Kontron Instruments, Rossdorf, Germany).

#### *Firmness and color*

Firmness measurements were taken with a digital penetrometer as in Robin et al. (1997). Maximal displacement was set to one tenth of berry diameter, and firmness was inferred from the linear regression of the force versus displacement data points. Berry color (hue angle) was determined with a Minolta CR200 chromameter exactly as in Robin et al. (1996).

#### *Normalization of berry growth*

Water, sugar and organic acid fluxes refer to the net quantitative variations of the corresponding molecules per time unit and per berry. Each of these substances is controlled by very different pathways and transporters, making concentration a too complex unit, on a mechanistic point of view. Maximal berry volume at the end of phase III (second growth period) dramatically depends on the genotype, so fluxes were normalized in order to consider a similar amount of vacuolar sap, reaching a comparable volume when fully expanded at ripe stage. The development of a purely imaginary berry that would weigh 1 kg at maximal growth is therefore considered on all cultivars. By example, for a 1 g berry, 1000 berries are considered at each sampling date, while for a 2 g berry, 500 berries are considered. For the sake of simplicity, density changes during berry ripening were considered as negligible ( $d=1.04$  (green) to  $d=1.09$  (0.9 mol hexose/kg berry)).

## **Results**

#### *Asynchronous single berry development within bunches at the onset of ripening*

Sequential measurements of color, firmness, sugars and pH on individual berries showed that (1) green, hard and acidic (pH 2.7) immature berries, (2) green, soft and acidic post-véraison berries having just started to accumulate sugars, and (3) red or blue, soft berries up to ripe stage were simultaneously present in Cabernet Sauvignon clusters at the so called mid-véraison stage (50 % colored berries, see Lund et al. (2008) (Fig. 2. 1). Firmness

decreased at the very beginning of the sugar accumulation process but did not exhibit any significant evolution after 0.55 M hexoses, when the first signs of skin coloration appeared. From this point, noticeable discrepancies appear in the coloration of ripening berries, some being still green, while the others, at comparable sugar concentration, were red. The frequency of berries in the 500-1100 gF/mm range was extremely low, indicating that initial berry softening progressed very fast.

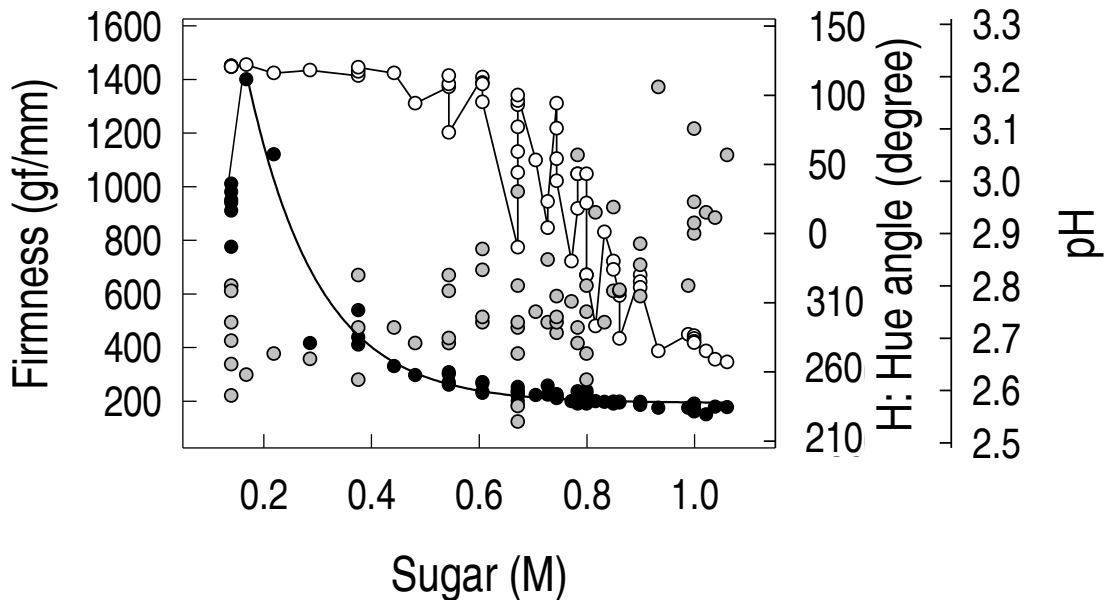


Figure 2. 1. Berry heterogeneity in a Cabernet Sauvignon cluster harvested at mid-veraison (EL 35; Combe 1995) in 2014. The cluster looks like in Fig. 1 in Lund et al. (2008). Each point corresponds to one berry, analyzed for firmness, color, sugars and pH. Black circles correspond to firmness, open circles correspond to the hue angle and the gray circles correspond to the pH as a function of sugar concentration.

*Average berry growth at bunch level*

Pinot Meunier and Zinfandel clusters exhibited typical double sigmoidal growth patterns, with clearly resolved green growth period, lag phase, and ripening period (Fig. 2. 2). At harvest, the rachis accounted for  $3.6 \pm 0.8\%$  of cluster weight only, so its contribution was ignored. The average berry volume displayed 1.8 fold changes among clusters (Fig. 2. 2a), without any obvious dependence on the number of berry per bunch in 2014. In 2015, a greater attention was given to flowering time: late flowering resulted in a lower number of berries per cluster, but in larger ones, while keeping the period between flowering and growth resumption at the onset of ripening unaffected (Supplementary Fig. 2. S2, Table 2. S1). All clusters fitted comparable double sigmoidal growth curves, following normalization of the mean berry volume relatively to the maximal one, and a few day adjustments on the time axis (Fig. 2. 2b, Supplementary Fig. 2. S2). The fruit volume approximately doubled within  $29 \pm 2$  days during the second growth phase (ripening period), but this duration would be reduced to 20 days if maximal growth rate observed at inflexion point was permanently sustained (Supplementary Fig. S3). The two successive periods of berry expansion exhibited a similar maximal growth rate, when normalized for the same maximal volume, with a variance lower than 12% irrespective of the flowering date. At the end of ripening, after reaching its maximum level, berry volume decreased (shrinking) with noticeable variations among bunches (Fig. 2. 2b, Supplementary Fig. 2. S4).

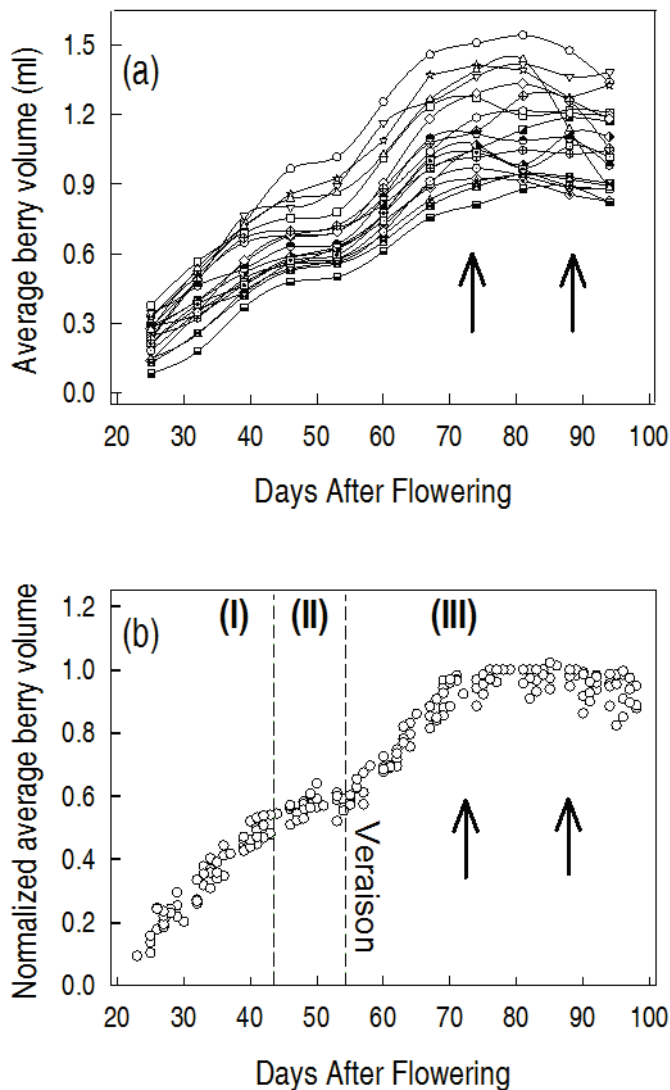


Figure 2.2. Average Pinot Meunier berry volume differs among clusters. (a) Average berry volume on 20 clusters, (b) Normalized average volume plotted as a function of days after flowering. Each curve corresponds to one cluster (a) and the whole set of experimental data obtained on twenty clusters is shown following normalization of the maximal mean volume of the considered cluster, and synchronization of the veraison date (b). Black arrows in (a, b) correspond to maximal and minimal time needed to reach maximal volume after the average flowering date (05.15.2014). (I) Green phase, (II) Lag phase, (III) Ripening phase. Normalized average berry volume is calculated as  $V / (V_{\max} * Nb)$  where  $V$  is cluster volume,  $V_{\max}$  is maximum average berry volume per cluster at the end of phase III (ca 80 DAF in average), and  $Nb$  is the number of berries per cluster. Normalized DAF was obtained upon synchronizing all veraison dates (growth resumption, phaseII/phase III transition) at 55 DAF.

*Evolution of berry growth at fruit level:*

Berries of well-watered, greenhouse-grown Pinot ML1 microvines doubled in volume during ripening in twenty days only (Fig. 2. 3a). The individual growth patterns recalculated from literature data on diameter changes (Fig. 1, 2 in Friend et al. (2009) confirmed this relative volume increase and this short duration in field grown Pinot Noir and Cabernet Sauvignon, irrespective of considerable variations between fruit sizes (Supplementary Fig. 2. S5, 2. S6) as related to seed content.

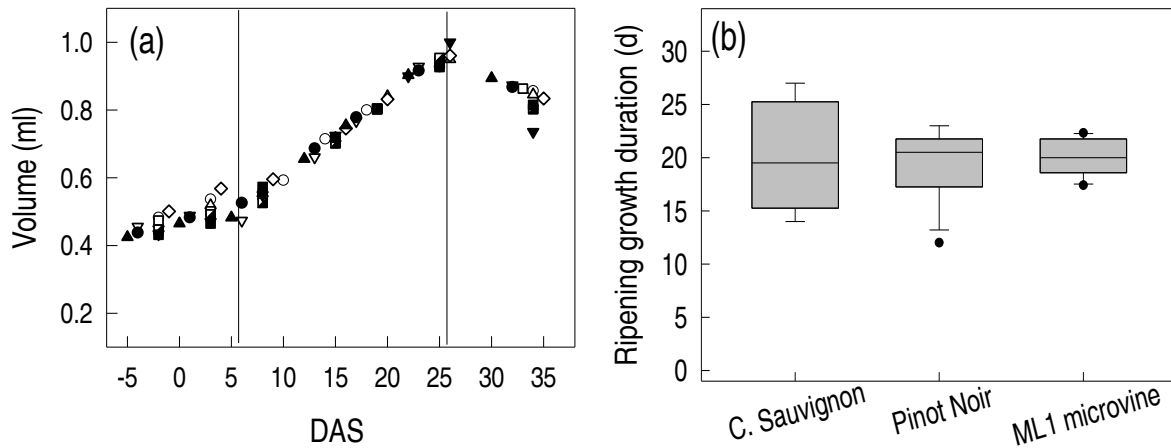


Figure 2. 3. (a) Normalized volume of 10 individual berries of ML1 microvines plotted as a function of days after softening (DAS). Each symbol corresponds to one individual berry which volume was periodically measured (b) Duration of phase III growth period (ripening) in ML1 microvine ( $n= 10$ ), Pinot Noir and Cabernet Sauvignon berries ( $n= 12$ ). The horizontal line in each box is the median, the top and bottom box edges are the 75th and 25th percentiles, respectively, the top and bottom error bars are the 90th and 10th percentiles, respectively, and the black dots are outliers at the 95th and 5th percentiles. For Cabernet Sauvignon, no outliers are shown. The three varieties are non-significantly different (ANOVA,  $P<0.05$ ). In (a), normalized berry volume is calculated as  $V/(V_{\max})$  where  $V$  is berry volume,  $V_{\max}$  is maximum berry volume. DAS was normalized upon synchronizing the growth curves of all 10 berries.

*Developmental changes in sugar, dicarboxylates and growth in unsynchronized clusters and individual berries*

Bunches harvested simultaneously displayed noticeable variations in their average sugar and acid contents (Fig. 2. 4a, 5a). Individual berries inside clusters showed a maximal heterogeneity during the first 20 days following the onset of ripening (Fig. 2. 4b, 5b). Berry weight was the most variable trait, showing at least 3-fold variations, among fruits with the same sugar concentration (Fig. 2. 4). However, the doubling of berry volume during ripening described above was still statistically verified. The sugar/malic acid relation was less variable confirming that i) within a bunch, green hard berries accumulating malic acid above 450 mEq malate with low sugars levels can coincide with soft berries displaying up to 0.8 M sugars and having metabolized most of their malic acid (Fig. 2. 5a) and that ii) a tight relation exists between malate breakdown and sugar accumulation, regardless of the asynchronous berry development. At the end of green growth stage, hexoses (mostly glucose) increased simultaneously with malic acid up to 0.12 M (Supplementary Fig. 2. S7) just before berry softening. However, malic acid concentration could surpass 450 mEq in atypically small berries, before softening (Supplementary Fig. 2. S8, S9). Acceleration of sugar loading was marked by progressive decrease of Glu/Fru ratio below 1.6 (Supplementary Fig. 2. S9b) which was systematically associated with fruit softening.

The heterogeneity in sugar concentration among berries within a given cluster diminishes above 0.7 M sugars, with a clear stacking of the “10 days after veraison” samples at this concentration value (Fig. 2. 4b).



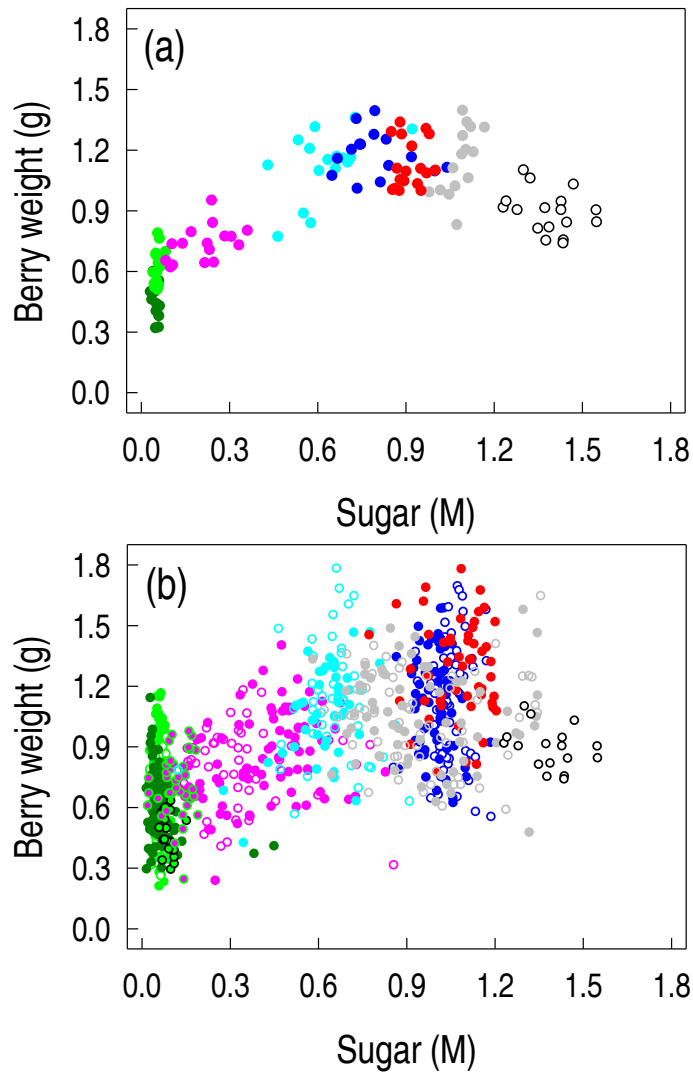


Figure 2. 4. Average fruit weight per cluster (a) or (b) single berry fruit weight of Pinot Meunier as a function of sugar concentration. (a) Each point corresponds to average berry characteristics in clusters sampled at -20 days after veraison (DAV) (dark green circles), -10 DAV (green circles), 0 DAV (pink circles), 10 DAV (cyan circles), 20 DAV (blue circles), 30 DAV (red circles), 40 DAV (gray circles) and 50 DAV (open circles). (b) Each point corresponds to one berry which cluster of origin is defined by different colors, as sampled at -10 DAV (3 clusters: green, dark-green and open-green circles), 0 DAV (2 clusters: pink and open pink circles), 10 DAV (2 clusters: cyan and open-cyan circles), 20 DAV (2 clusters: blue and open blue circles), 30 DAV (1 cluster: red circles) and 40 DAV (2 clusters: gray and open gray circles). Open black circles in (a, b) correspond to shrivelling berries at 50 DAV. DAV: days after veraison (50 % colored berries).

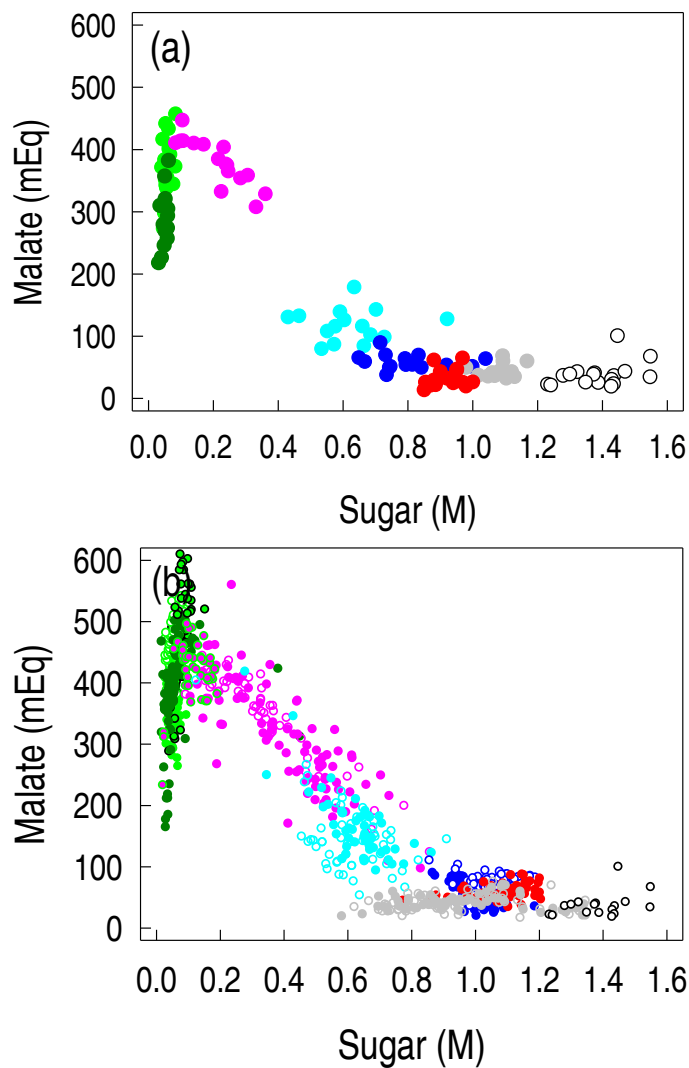


Figure 2. 5. Malate breakdown during the sugar accumulation period in Pinot Meunier berries. (a) Each point corresponds to one average berry on one cluster sampled at -20 Days after veraison (DAV) (dark green circles), -10 DAV (green circles), 0 DAV (pink circles), 10 DAV (cyan circles), 20 DAV (blue circles), 30 DAV (red circles), 40 DAV (gray circles) and 50 DAV (open circles). (b) Each point corresponds to one berry which cluster of origin is defined by different colors, as sampled at -10 DAV (3 clusters: green, dark-green and open-green circles), 0 DAV (2 clusters: pink and open pink circles), 10 DAV (2 clusters: cyan and open-cyan circles), 20 DAV (2 clusters: blue and open blue circles), 30 DAV (1 cluster: red circles) and 40 DAV (2 clusters: gray and open gray circles).

*Asynchrony in softening and berry heterogeneity*

Experiments were conducted on individual Syrah berries randomly sampled (3-10 berries per bunch) (Fig. 2. 6a). These berries which represent the population at plot scale displayed similar developmental trends than fruits sampled to represent intra-cluster heterogeneity of Pinot Meunier, except that malic acid was less concentrated, and that sugar and acids heterogeneity was higher. In both varieties, berries delayed in sugar concentration displayed a lower malate concentration than those having reached the same sugars concentration at an earlier sampling date.

Monitoring individual softening dates allowed obtaining synchronized berries ( Fig. 2. 6b) and dramatically decreased the heterogeneity in major primary metabolites contents at different time points, compared to samples including berries which individual softening dates were unknown (compare Fig. 2. 6a and 6b). Uncontrolled delay in the onset of ripening of individual berries may therefore be the major cause of their apparent heterogeneity (Fig. 2. 6).

A comprehensive analysis of synchronized berries led to the emergence of four successive periods during ripening, after fruit softening (Fig. 2. 7, 2. 8). First, the net flux of sugar in the vacuole is suddenly set at its maximal value (29-43  $\mu\text{mol hexose}/\text{min}/\text{Nberry}$ ) (Fig. 2. 8a) which represents a 50-100 % increase when compared with the fluxes calculated for unsynchronized samples from same experimental plot (19  $\mu\text{mol hexose}/\text{min}/\text{Nberry}$ )(Fig. 8b). Growth resumes six days after berry softening (Fig. 2. 7a, 2. 8a), followed by a twenty days-period of simultaneous accumulation of water and sugars, until 0.9 mol hexose/Nberry is reached (ca 1 M). At the end of this second phase, sugar unloading in berries stops (Fig. 2. 7c, 2. 8). Then, a third period of relative homeostasis becomes apparent on time averaged samples (Fig. 8), however this representation masks either unsynchronized or variable water losses between berries as illustrated in berries ranked according to total solutes concentration (malate+ tartrate+ sugar) (Fig. 2. 7a, Supplementary Fig. 2. S10). The last period corresponds to fruit shriveling period using either time or total solutes as references.

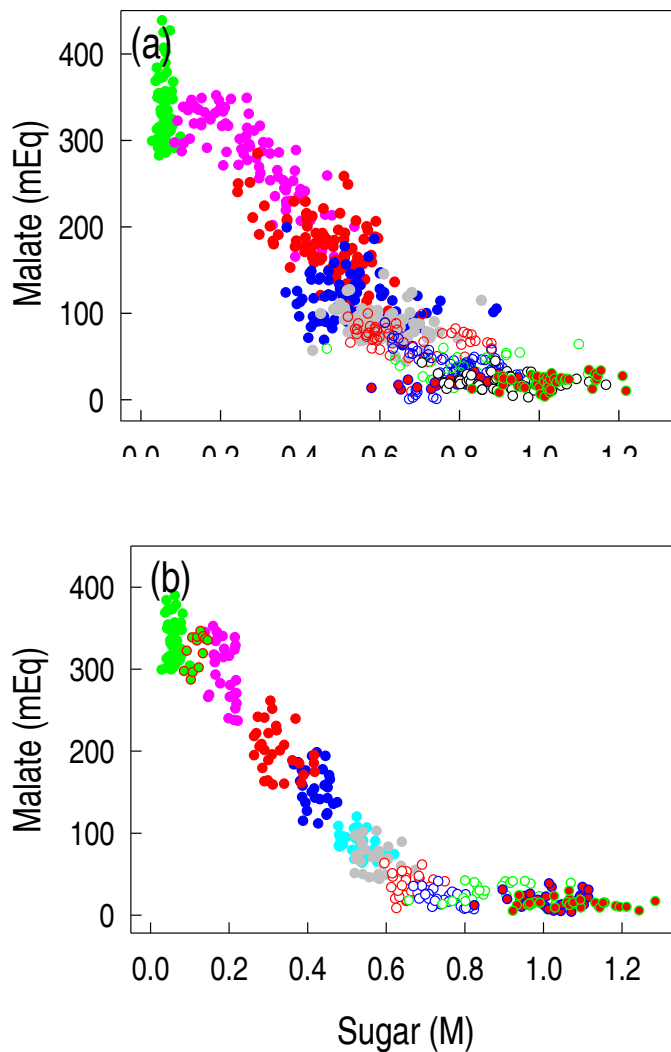


Figure 2.6. Malate breakdown during the sugar accumulation period in individual Syrah berries. (a) Each point corresponds to one berry sampled -10 days after veraison (DAV) (green circles), 0 DAV (pink circles), 5 DAV (red circles), 8 DAV (blue circles), 13 DAV (gray circles), 18 DAV (open red circles), 25 DAV (open blue circles), 32 DAV (open green circles), 39 DAV (blue red circles), 46 DAV (open black circles) and 55 DAV (green red circles), average veraison date being determined by ca 50 % soft berries in the whole population (initial coloration of the first berries in the population). (b) Each point corresponds to one berry sampled at known date after softening, as determined on each berry, -1 day after veraison (DAV) (green circles), 0 DAV (pink green circles), 1 DAV (pink circles), 3-5 DAV (red circles), 5-6 DAV (blue circles), 7-8 DAV (cyan circles), 8-11 DAV (gray circles), 16-18 DAV (open red circles), 19-22 DAV (open blue circles), 29-30 DAV (open green circles), 37-38 DAV (blue red circles) and 52-54 DAV (green red circles).

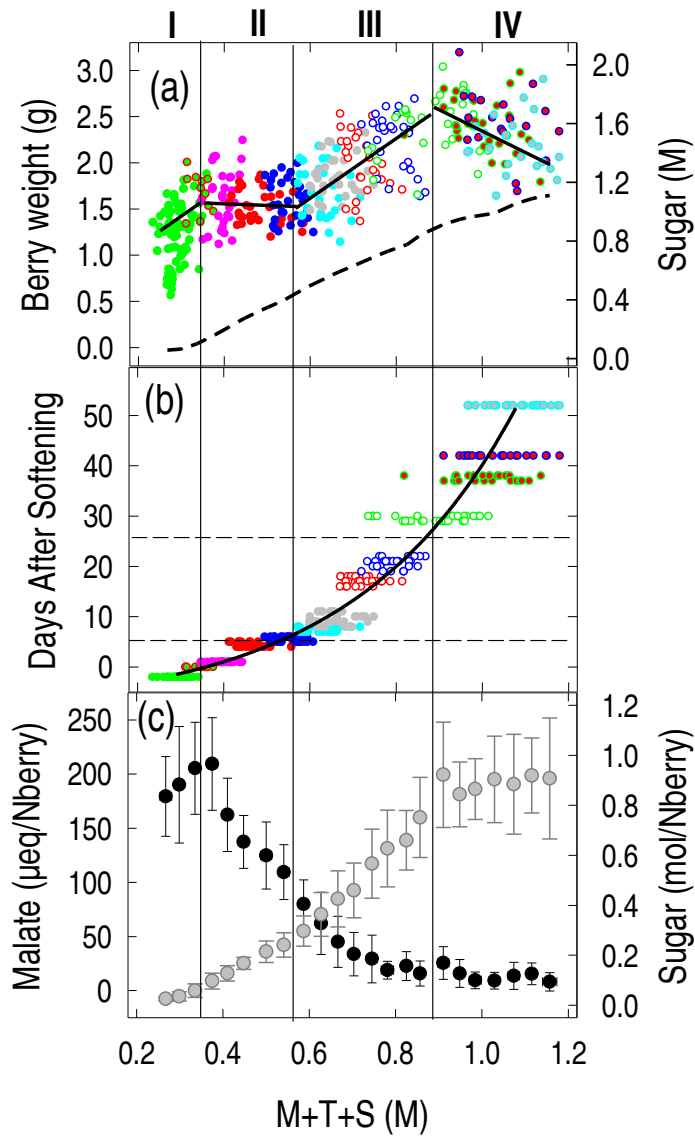


Figure 2. 7. Development of synchronized berries. Berry weight (A), day after softening (B), malate and sugar accumulation (C) of Syrah as a function of total solutes concentration as proxy for osmotic pressure. (A) and (B) : Each point corresponds to one berry and each color corresponds to a known duration after softening of this berry (A) Black line corresponds to mean berry weight, and dotted line presents the sugar concentration. (B) Black line: exponential fit on all berries as detailed in Supplementary Fig. S11. (C) Malate (black) and sugar contents (gray) per berry calculated from Fig. 6A and Fig. 7A were averaged on successive intervals of 0.05 M totale solutes (M+T+S). (I) Green stage (unsynchronized hard berries), (II) Synchronized soft berries starting to ripen at constant volume, (III) Growth of synchronized ripening berries, (IV) Shrivelling berries after the arrest of sugar loading.

The quantitative balance between malate breakdown and net accumulated hexose per berry displayed comparable patterns in the three independent experiments on Syrah and Pinot Meunier (Fig. 9): malate breakdown globally represented one tenth of accumulated sugars from the inception of ripening to ca 0.7 mol sugars/Nberry, malate was then no longer consumed until completion of sugar accumulation. However, synchronized berries revealed that malate breakdown could account for one third of accumulated hexoses at the onset of ripening.

## **Discussion**

The present study puts forward i) asynchrony in berry softening (Coombe 1992) and ii) high heterogeneity in nominal fruit volume depending on early events affecting cell divisions, seed numbers and subsequent hormonal growth control since flowering (Ojeda et al. 1999; Friend et al. 2009; Wong et al. 2016), to be two critical determinants of berry heterogeneity at bunch and plant scales. In the absence of non-destructive methods for measuring sugar and acids, kinetics of berry development have been exclusively inferred from sequential average samples, assuming the average population at plot level can yield a pertinent insight on the development of a typical berry. The most recent process-based model of grapevine fruit ripening relies still on this paradigm (Dai et al. 2016), and the optimal sampling strategy to provide the best representation of the experimental plot remains today a matter of discussion (Higginson et al. 2016). Although simply presented as an “empirical trick” to prepare homogeneous fruit batches, the re-emergence of the density procedure to sort single fruits (Singleton et al. 1966) turns out to be an enormous grain of sand in this predominating concept of average berry, *ipso facto* calling for basic berry kinetics to be revisited in depth (Zouid et al. 2013; Carbonell-Bejerano et al. 2016; Friedel et al. 2016; Liu et al. 2016). We showed here that, with a second growth period lasting 20 d in an individual fruit, 27-31 d in bunches and finally 31-39 d at the usual experimental plot scale (most conservative hypothesis : McCarthy (1999)), time offset between berries can be as long as phase III itself. This lack of synchronism makes usual average developmental stages like in the modified E.L. system absolutely inadequate for addressing the fine molecular, metabolic and compartmentation events regulating fruit development in grapevine, as already understood

regarding high throughput transcriptomic studies (ie Lund et al. 2008; Terrier et al. 2009; Rienth et al. 2014; Rienth et al. 2016).

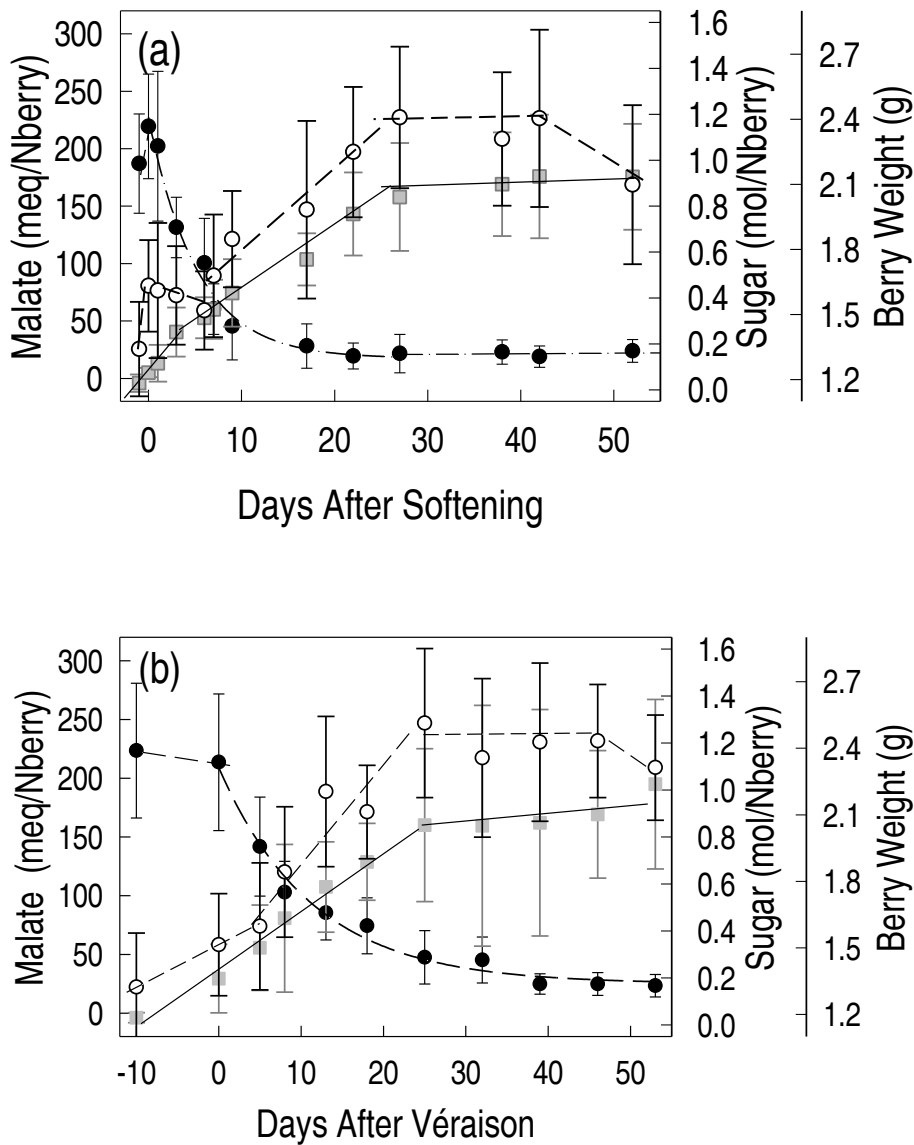


Figure 2.8. Kinetics of malate breakdown (closed circles), sugar loading (gray squares) and berry growth (open circles) of ripening Syrah berries (mean±SD, n= 30 berries for (a) and 40 to 90 berries for (b)). (a) True Days After Softening of individual berries (Fig. 6b). (b) Days After Véraison from averaged veraison date (color change) estimated at population level (Fig. 6a). Normalized Malate and sugar accumulation in an imaginary berry (Nberry) was calculated as  $1000*[G+F]*Bw/Bw_{max}$  where [G+F]: glucose plus fructose concentration, Bw: Berry Weight,  $Bw_{max}$ : maximal average berry weight (2.6 g).

Addressing the individual fruit entails a change in paradigm regarding the berry internal clock and major fluxes: at first, key ripening associated events previously thought to be simultaneous appeared sequential. Evolution of berry firmness and coloration during the sugar concentration process displays the same pattern in individual Cabernet Sauvignon berries than reported in Zinfandel (Castellarin et al. 2016), and present instrumental analysis noticeably clarifies sensory evaluation of firmness and color in Cabernet Sauvignon (Lund et al. 2008). Castellarin et al. (2016) considered berries as homogeneous elastic spheres in order to infer pericarp elasticity, but such simplifying assumption is contradicted by concurring evidences presented by the authors themselves that expression of the cell-wall hydrolases genes *VviExp1* and *VviPME* are delayed in the skin, as this was previously shown concerning skin extensibility and growth resumption themselves (Fig. 2. 7a, 2. 8; Coombe and Bishop 1980; Huang and Huang 2001). Intense transcriptomic changes controlling diverse cell-wall proteins and key transporters such as the vacuolar hexose/H<sup>+</sup> antiporter *VvHT6* (EST RB004G11 in Terrier et al. (2005)), amongst others ripening related genes, were detected as soon as softening could be observed, much before any changes in sugar, coloration or malic acid could be measured (Fig. 2. 1; Rienth et al. 2016). This confirms the original observation, that change in firmness occurred quasi-concomitantly with the onset of sugar storage (Coombe 1992). More precisely, up to 0.12 M hexoses, principally glucose, slowly accumulated together with 0.25 M malate in hard, green fruits before softening and full activation of the phloem unloading pathway (Supplementary Fig. 2. S7; Houel et al. 2015; Rienth et al. 2016). Change in color occurred noticeably later (0.6 M hexoses) in Cabernet Sauvignon as it did in Zinfandel (Castellarin et al. 2016). The increased number of ripening berries analyzed here additionally illustrates the strong plasticity of anthocyanins synthesis in sub-epidermal tissue versus sugar accumulation in the flesh, possibly due to variations in berry microenvironment and trophic conditions (Reshef et al. 2017; Sun et al. 2017). Berry growth would resume 2-3 days before coloration in Cabernet Sauvignon, but withered Merlot fruits began to turn red 1-3 days before swelling again, as the osmotic pressure developing inside the ripening berry makes it the strongest sink for water in stressed vine (Matthews and Shackel 2005; Keller et al. 2006). Coloration must then be rejected as a reliable indicator of the advancement of ripening and fluxes calculated on color-sorted berries should be considered with some circumspection (Lücker et al. 2009; Gouthu et al. 2014; Zhang and Keller 2017).



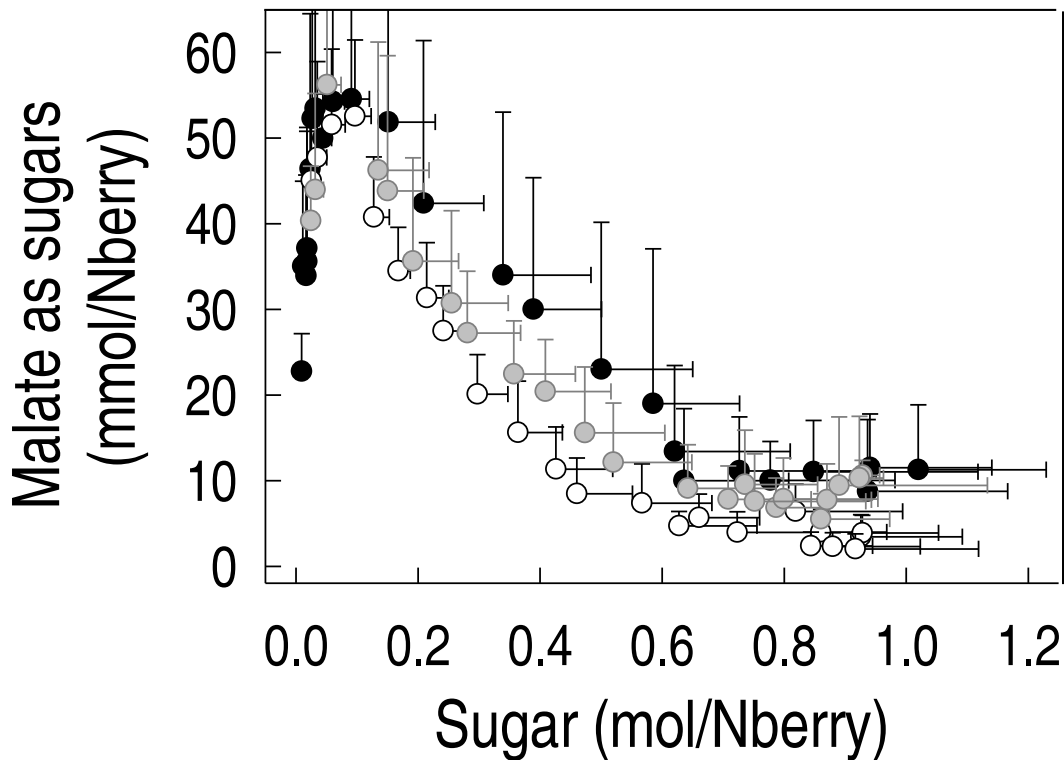


Figure 2. 9. Malate breakdown with respect to sugar accumulation in an imaginary berry (Nberry) that weighs 1 kg at maturity. Malate is calculated as sugar equivalent (2 malate/hexose). Points correspond to average values obtained on successive 0.05 M total solutes (M+T+S) intervals. Open circles: true individual softening date of Syrah berries (Fig. 6b). Gray circles (Syrah), closed circles (Pinot Meunier): average population veraison date (unsynchronized berries). 2231 individual berries were ranked according to total solutes (M+T+S), before calculating average values and standard deviation on every successive 0.05M (M+T+S) intervals. The number of berry per 0.05 M class varies as determined in Fig. 8 and Fig. S8. Normalized Malate and sugar accumulation in an imaginary berry (Nberry) was calculated as  $1000 \cdot [G+F] \cdot Bw / Bw_{max}$  where [G+F]: glucose plus fructose concentration, Bw: Berry Weight,  $Bw_{max}$ : maximal average berry weight (2.6 g for Syrah and 1.2 g for Pinot Meunier). Values are mean  $\pm$ SD of each class.

Synchronized samples allowed us to revisit the respective timings of water and sugar loading and malate breakdown with unprecedented precision, whenever the growth rate and metabolic fluxes that could be calculated from these data remain scrambled by the marked heterogeneity in berry volume. We establish here that a unitary pericarp volume displays quite invariant growth kinetics, irrespective of the considerable heterogeneity in individual fruit size. Fluxes in cultivars with different berry sizes were then normalized upon considering the development of a purely imaginary berry reaching 1 kg at maximal growth ( $N_{\text{berry}}$ ). The dramatic heterogeneity in sugar and malate concentrations among individual fruit harvested simultaneously is essentially explained by delayed softening dates (Fig. 2. 6), as related to flowering date among other causes of variation (Supplementary Fig. 2. S2). Ranking berries according to total major solutes concentration as a proxy for osmotic pressure, the driving force for water accumulation (Dai et al. 2009), improves resolution in pre-véraison berries and slightly reduces variance when compared to brix (not shown) for ripening fruit. A large osmotic gradient among neighbor berries (Fig. 2. 4) may trigger xylem backflow from pre-véraison to ripening berries, similar to that observed towards leaves whose hydric potential falls below -0.8 MPa as a consequence of stress (Greenspan et al. 1994). A few atypically small berries high in malic acid were actually found in Pinot Meunier clusters at veraison, but depletion in tartaric acid (Supplementary Fig. 2. S8, 2. S9) rather argues in favor of intrinsically small fruits. As a matter of fact, such an otherwise expected siphoning of water by ripening berries is prevented by delayed growth until major solutes reach ca 0.6 M (Fig. 2. 7, Supplementary Fig. 2. S10). Sequential, nondestructive measurements on single berries led Coombe and Bishop (1980) and Coombe and Phillips (1982) to propose that growth resumes six days after softening, consistently with the delay observed here following the dramatic activation of the phloem unloading pathways in ripening berries (Fig. 2. 7, 2. 8, and 2. 10). Observations suggest that plasma membrane transporters deplete apoplastic sugars while excess water in phloem mass flow must be exported (or evaporated) until skin extensibility increases, facilitating the completion of the first growth period in late pre-véraison fruit. The discharge of surplus phloem water at the origin of xylem backflow recently documented by Zhang and Keller (2017) should thus be particularly elevated at this stage.

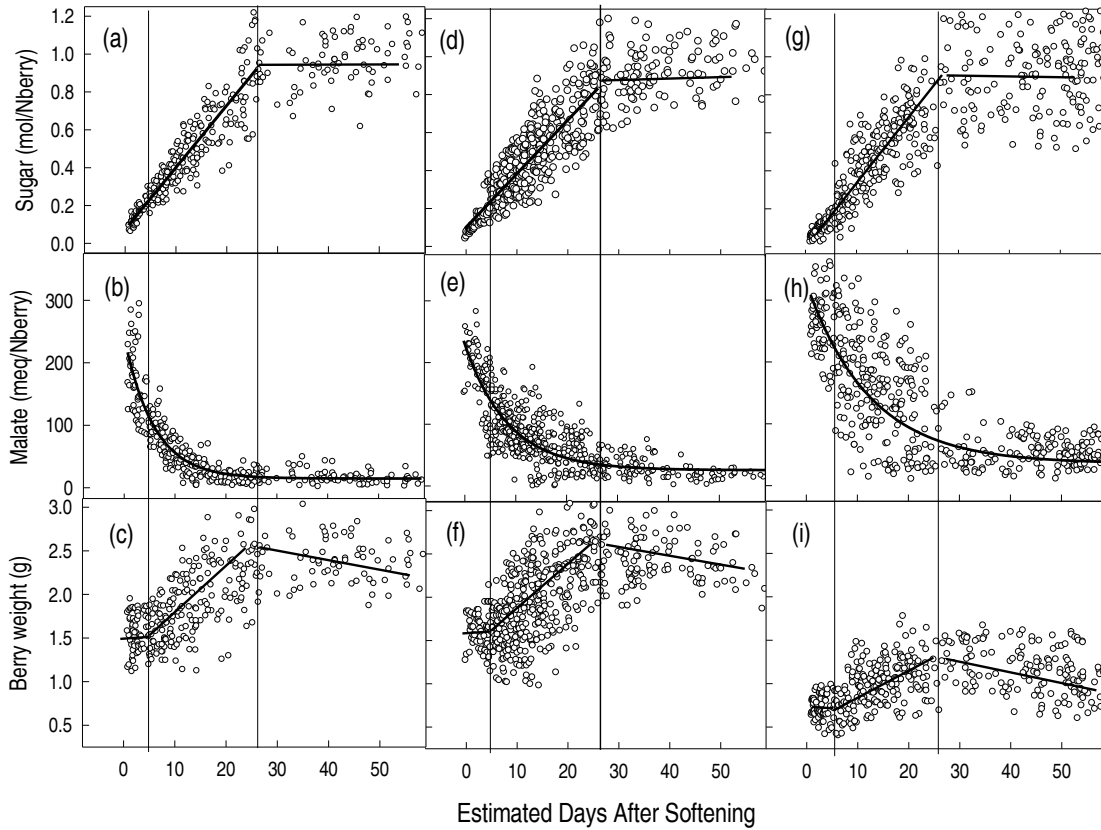


Figure 2. 10. Kinetics of sugar accumulation (a, d, g), malate breakdown (b, e, h) and berry growth (c, f, i) during ripening of individual berries as a function of Days After Softening. DAS was recalculated from individual total solutes according to the exponential fitting in supplementary Fig. S11. (a, b, c) : true individual softening date of Syrah (Fig. 6a), Syrah (d, e, f) and Pinot Meunier (g, h, i): average population veraison date (unsynchronized berries). Normalized Malate and sugar accumulation in an imaginary berry (Nberry) was calculated as  $1000*[G+F]*Bw/Bw_{max}$  where [G+F] : glucose plus fructose concentration, Bw : Berry Weight,  $Bw_{max}$  : maximal average berry weight (2.6 g for Syrah and 1.2 g for Pinot Meunier). Berry weight and sugar accumulation linear regression (a): ( $y= 0.07+0.034x$ ,  $r= 0.91$ ), (d): ( $y= 0.1+ 0.028x$ ,  $r= 0.85$ ), (g): ( $y= 0.03+ 0.03x$ ,  $r= 0.88$ ), (c): ( $y= 1.4+0.04x$ ,  $r=0.56$ ), (f): ( $y= 1.4+ 0.05x$ ,  $r= 0.49$ ), (i): ( $y= 0.66+ 0.02x$ ,  $r= 0.47$ ). Malate exponential decay, (b): ( $y= 15+ 226 e^{-0.14x}$ ,  $r= 0.91$ ), (e): ( $y= 26+ 204 e^{-0.1x}$ ,  $r=0.85$ ), (h): ( $y= 35+ 291 e^{-0.08x}$ ,  $r= 0.78$ ).

Noticeably, synchronized Syrah berries exhibited the same average growth rate as individual berries of Pinot ML1, Pinot Noir and Cabernet Sauvignon, rate that was also compatible with the maximal growth rate observed on whole clusters of Pinot Meunier and Zinfandel (Fig. 2. 2, 2. 10), suggesting that the duration of the second growth period (20 days) should be quite invariant between cultivars and experimental conditions. After softening, the time required by each individual berry to reach the measured concentrations was fitted to an exponential model (Supplementary Fig. 2. S11) allowing to re-synchronize thousands of berries whose individual softening dates could not reasonably be measured (Fig. 2. 10). Growth patterns remained compatible with synchronized random Syrah samples. In the case of Pinot Meunier, whose individual berries were sampled on a cluster basis instead of randomly in the vineyard, erratic variations in mean berry weight per cluster induced a non-random bias (Fig. 2. 4b, 2. 5b). Whilst usual average samples of unsynchronized berries typically provide a mean accumulation rate of 17  $\mu\text{mol hexose}/\text{min}/\text{Nberry}$  within 49 days (Supplementary Fig. 2. S12, Table 2. S2), synchronized ones just need 26 days after softening to reach 0.9 mol hexose/Nberry (ca 10% probable alcohol) at which time phloem unloading stops. Further gain in concentration just relies on berry shriveling, in all cultivars investigated (Fig. 2. 10, 2. 4, 2. 7). McCarthy (1999) also observed maximal berry volume at a similar concentration, before pronounced berry shriveling occurred. Constant hexose accumulation at 24  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{Nberry}$  during 26 days appears the simplest and most conservative model, however sudden activation up to 30  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{Nberry}$  followed by minor decay seems also possible (Fig. 8). This timing noticeably fits with the 6 days delay between softening and growth resumption previously documented on individual berries (Coombe and Bishop 1980; Coombe and Phillips 1982), followed by the 20-day expansion period recalculated from (Friend et al. 2009), as confirmed here by image analyses of microvine fruits. The present study does not confirm phloem unloading in individual berries might continue following growth cessation, as previously calculated at population level during late ripening (McCarthy and Coombe 1999; Keller et al. 2015). Such uncoupling between the net fluxes of water and sugar in berries deserves careful attention since it inevitably emerges as a statistical bias when late berries still growing and accumulating sugars are mixed with others immediately losing water after the arrest of phloem unloading (Supplementary Fig. 2. S14). Further work needs to be done in order to clarify this point in single or synchronized berries at the completion of the ripening growth phase.

Malate breakdown can be delayed from the onset of sugar accumulation under low temperature but seems inescapable (Rienth et al. 2016). None of the thousands berries investigated here escaped a nearly immediate initiation of malic acid breakdown following the onset of hexose accumulation. Malate can be considered as a substrate for gluconeogenesis ( $2 \text{ malate} \rightarrow 1 \text{ hexose} + 2\text{CO}_2$ ), respiration ( $\text{Malate} + 3\text{O}_2 \rightarrow 4\text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$ ), or fermentation ( $\text{Malate} \rightarrow \text{Ethanol} + 2 \text{CO}_2$ ) (Ruffner and Hawker 1977; Ruffner 1982a,b ; Terrier et al. 2001; Sweetman et al. 2009; Famiani et al. 2016). Continuation of sugar accumulation above 0.7 mol/Nberry, when malate breakdown is almost completed, clearly confirms this pathway is not strictly required for sugar accumulation (Fig. 2. 9, 2. 7c). The initial velocity of malate breakdown reaches 8  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{Nberry}$  in synchronized berries, as estimated from pseudo first order kinetics on all experiments (Fig. 2. 10, 2. 11), four times faster than on typical unsynchronized samples in the literature ( $1.9 \pm 0.2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{Nberry}$ ) (see Supplementary Fig. 2. S13, Table 2. S3) . Gluconeogenesis thus plays a minor role in sugar accumulation and one can now reject that its co-activation with vacuolar sugar transport would prime the activation of the phloem sugar unloading pathway which intensity is maximal from the first day after softening. By contrast, the possible contribution of malate to respiration ( $24 \mu\text{mol O}_2/\text{min}/ \text{Nberry}$ ) remarkably matches the  $\text{O}_2$  demand of the ripening fruit (Harris et al. 1971; Koch and Alleweldt 1978; Terrier et al. 1996), this is in support of malate actually becoming the major respiratory substrate at the onset of ripening, which could not be established in usual, un-synchronized samples (Famiani et al. 2016). Moreover, present data suggest that 0.2-0.4 hexoses would be imported while one ATP would be regenerated by the oxidative pathway.  $\text{H}^+$  recirculation between sugar/ $\text{H}^+$  symporters and antiporters present at the plasma and vacuolar membranes, respectively, and corresponding  $\text{H}^+$ -ATPases (Hedrich et al. 2015) together with “futile” sucrose recycling in the cytoplasm indicated by, amongst others, strong transcriptional activation of VVi SPS1 (Martinez-Esteso et al. 2013; Rienth et al. 2016) may thus recruit a significant part of cellular energy, depending on the precise organization of the sugar loading pathway (Afoufa-Bastien et al. 2010; Lecourieux et al. 2010; Chong et al. 2014). These aspects will be examined in a next paper.

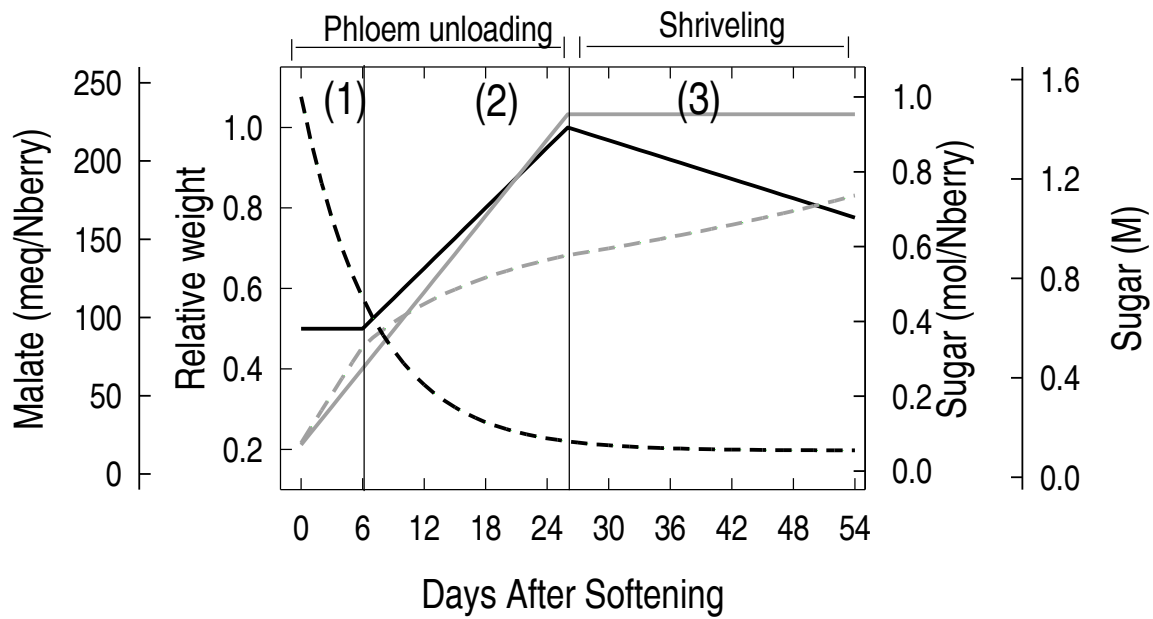


Figure 2. 11. Model of individual berry ripening (1), (2) and (3) represent the 3 sub-phases during ripening. Sugar contents (gray line), Sugar concentration (dashed gray line), Growth (black line), and malate contents (dashed black line). DAS: Days after Softening. Normalized Malate and sugar in an imaginary berry (Nberry) is defined as  $1000 \cdot [G+F] \cdot Bw / Bw_{max}$  where [G+F]: glucose plus fructose concentration, Bw: Berry Weight,  $Bw_{max}$ : maximal average berry weight.

## **Conclusion**

We show here that berry ripening is faster and physiologically simpler than accepted before: following softening, phloem unloading is suddenly activated at full rate for a 26 days period, and just stops. Berry growth would not be allowed before 6 days, due to a delay in skin extensibility, whatever growth and sugar loading stops simultaneously. Sugar loading at constant volume at the end of the ripening process and subsequent xylem backflow may possibly represent an averaging artifact on non-synchronized berries. Malic acid constitutes a major respiratory substrate at the start of hexose accumulation, but there is clearly no need of malate respiration for long term sugar import and storage. The present revisiting of basic metabolic and hydric flux in grapevine berry brings together original data on the composition of individual fruits with disparate previous ones in a more faithful, quantitative and time resolved framework for fruit development. Present model (Fig. 2. 11) freed from usual statistical bias in unsynchronized population paves the way for quantitatively sound modeling approaches of this acidic fleshy fruit under probable compartmentation control (Etienne et al. 2013). Berry synchronism and population structure emerge as a novel regulatory level regarding the impact of GxE interaction on average berry composition at crop level, which is generally attributed to so called ‘metabolic regulation’ alone. This new paradigm should allow to surpass widely overlooked statistical biases in usual sequential samples of unsynchronized fruits, and to really take advantage of the recent methodological advances in transcriptomics, metabolomics, fluxomics and process-based modeling. Non-destructive methods for monitoring single berry development, easier sorting procedures and new statistical models need now to be implemented. These developments will allow refining present model of berry development, in particular to check the impact of berry microenvironment on its own hydric balance and growth, import of photo-assimilates, and primary metabolism.

## Références

- Afoufa-Bastien, D., Medici, A., Jeuffre, J., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Atanassova, R. and Laloi, M. (2010) The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling. *BMC Plant Biology* **10**, 245-245.
- Bobeca, N., Poni, S., Hilbert, G., Renaud, C., Gomès, E., Delrot, S. and 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. doi: 10.3389/fpls.2015.00382
- Carbonell-Bejerano, P., Rodríguez, V., Hernáiz, S., Royo, C., Dal Santo, S., Pezzotti, M. and Martínez-Zapater, J.M. (2016) Reducing sampling bias in molecular studies of grapevine fruit ripening: transcriptomic assessment of the density sorting method. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* **28**, 109-129.
- Castellarin, S.D., Gambetta, G.A., Wada, H., Krasnow, M.N., Cramer, G.R., Peterlunger, E., Shackel, K.A. and Matthews, M.A. (2016) Characterization of major ripening events during softening in grape: turgor, sugar accumulation, abscisic acid metabolism, colour development, and their relationship with growth. *Journal of Experimental Botany* **67**, 709-722.
- Castellarin, S.D., Gambetta, G.A., Wada, H., Shackel, K.A. and Matthews, M.A. (2011) Fruit ripening in *Vitis vinifera*: spatiotemporal relationships among turgor, sugar accumulation, and anthocyanin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 4345-4354.
- Chaib, J., Torregrosa, L., Mackenzie, D., Corena, P., Alain Bouquet, A. and Thomas, M.R. (2010) The grape microvine: a model system for rapid forward and reverse genetics of grapevines. *Plant Journal* **62**, 1083-1092.
- Chong, J., Piron, M.-C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C. and 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. and Bishop, G. (1980) Development of the grape berry. II. Changes in diameter and deformability during veraison. *Australian Journal of Agricultural Research* **31**, 499-509.
- Coombe, B.G. (1984) The Inception of Ripening in The Grape Berry. *Quad. Viti. Enol. Univ. Torino* **8**, 87-99.



- Coombe, B.G. (1987) Distribution of Solutes within the Developing Grape Berry in Relation to Its Morphology. *American Journal of Enology and Viticulture* **38**, 120-127.
- Coombe, B.G. (1992) Research on Development and Ripening of the Grape Berry. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**, 101-110.
- Coombe, B.G. and McCarthy, M.G. (2000) Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 131-135.
- Coombe, B.G. and Phillips, P.E. (1982) Development of the grape berry. III. Compositional changes during veraison measured by sequential hypodermic sampling. . *Proceedings of International Symposium on Grape and Wine*, 132–136.
- Dai, Z., Wu, H., Baldazzi, V., van Leeuwen, C., Bertin, N., Gautier, H., Wu, B., Duchêne, E., Gomès, E., Delrot, S., Lescourret, F. and Génard, M. (2016) Inter-Species Comparative Analysis of Components of Soluble Sugar Concentration in Fleshy Fruits. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Dai, Z.W., Vivin, P., Robert, T., Milin, S., Li, S.H. and Génard, M. (2009) Model-based analysis of sugar accumulation in response to source sink ratio and water supply in grape (*Vitis vinifera*) berries. *Functional Plant Biology* **36**, 527-540.
- Davies, C., Boss, P.K. and Robinson, S.P. (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. and Robinson, S.P. (1996) Sugar Accumulation in Grape Berries (Cloning of Two Putative Vacuolar Invertase cDNAs and Their Expression in Grapevine Tissues). *Plant Physiology* **111**, 275-283.
- Duchêne, E., Dumas, V., Jaegli, N. and Merdinoglu, D. (2014) Genetic variability of descriptors for grapevine berry acidity in Riesling, Gewürztraminer and their progeny. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **20**, 91-99.
- Etienne, A., Génard, M., Bancel, D., Benoit, S. and Bugaud, C. (2013) A model approach revealed the relationship between banana pulp acidity and composition during growth and post-harvest ripening. *Scientia Horticulturae* **162**, 125-134.
- Famiani, F., Farinelli, D., Frioni, T., Palliotti, A., Battistelli, A., Moscatello, S. and Walker, R.P. (2016) Malate as substrate for catabolism and gluconeogenesis during ripening in the pericarp of different grape cultivars. *Biologia Plantarum* **60**, 155-162.
- Famiani, F., Farinelli, D., Palliotti, A., Moscatello, S., Battistelli, A. and Walker, R.P. (2014) Is stored malate the quantitatively most important substrate utilised by respiration and

- ethanolic fermentation in grape berry pericarp during ripening? *Plant Physiology and Biochemistry* **76**, 52-57.
- Friend, A.P., Trought, M.C.T. and Creasy, G.L. (2009) The influence of seed weight on the development and growth of berries and live green ovaries in *Vitis vinifera* L. cvs. Pinot Noir and Cabernet Sauvignon. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **15**, 166-174.
- Friedel, M., Sorrentino, V., Blank, M. and Schüttler, A. (2016) Influence of berry diameter and colour on some determinants of wine composition of *Vitis vinifera* L. cv. Riesling. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **22**, 215-225.
- Gambetta, G.A., Matthews, M.A., Shaghasi, T.H., McElrone, A.J. and Castellarin, S.D. (2010) Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape. *Planta* **232**, 219-234.
- Gouthu, S., O'Neil, S.T., Di, Y., Ansarolia, M., Megraw, M. and Deluc, L.G. (2014) A comparative study of ripening among berries of the grape cluster reveals an altered transcriptional programme and enhanced ripening rate in delayed berries. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5889-5902.
- Greenspan, M.D., Shackel, K.A. and Matthews, M.A. (1994) Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits. *Plant, Cell & Environment* **17**, 811-820.
- Harris, J.M., Kridemann, P.E. and Possingham, J.V. (1971) Grape berry respiration: Effects of metabolic inhibitors. *Vitis* **9**, 291-298.
- Hedrich, R., Sauer, N. and Neuhaus, H.E. (2015) Sugar transport across the plant vacuolar membrane: nature and regulation of carrier proteins. *Current Opinion in Plant Biology* **25**, 63-70.
- Higginson, E.G., Lloyd, N.D.R., Kravchuk, O., Ford, C.M. and Thomas, M.R. (2016) A high-throughput UHPLC MS/MS method for evaluation of tartaric and malic acid concentration in individual grapevine berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **22**, 16-23.
- Houel, C., Chatbanyong, R., Doligez, A., Rienth, M., Foria, S., Luchaire, N., Roux, C., Adivèze, A., Lopez, G., Farnos, M., Pellegrino, A., This, P., Romieu, C. and Torregrosa, L. (2015) Identification of stable QTLs for vegetative and reproductive traits in the microvine (*Vitis vinifera* L.) using the 18 K Infinium chip. *BMC Plant Biology* **15**, 205.

- Huang, X.M., Huang, H.B., (2001) Early post-veraison growth in grapes: evidence for a two step mode of berry enlargement. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **7**, 132-136.
- Jensen, K.H., Savage, J.A and Holbrook, N.M. (2013) Optimal concentration for sugar transport in plants. *Journal of The Royal Society Interface* **10**. DOI: 10.1098/rsif.2013.0138.
- Keller, M. and Shrestha, P.M. (2014) Solute accumulation differs in the vacuoles and apoplast of ripening grape berries. *Planta* **239**, 633-642.
- Keller, M., Smith, J.P. and Bondada, B.R. (2006) Ripening grape berries remain hydraulically connected to the shoot. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2577-2587.
- Keller, M., Zhang, Y.U.N., Shrestha, P.M., Biondi, M. and Bondada, B.R. (2015) Sugar demand of ripening grape berries leads to recycling of surplus phloem water via the xylem. *Plant, Cell & Environment* **38**, 1048-1059.
- Koch, R. and Alleweldt, G. (1978) Der Gaswechsel reifender Weinbeeren. *Vitis* **17**, 30- 44.
- Kriedemann, P. (1968) Observations on Gas Exchange in the Developing Sultana Berry. *Australian Journal of Biological Sciences* **21**, 907-916.
- Lang, A. and Thorpe, M.R. (1989) Xylem, Phloem and Transpiration Flows in a Grape: Application of a Technique for Measuring the Volume of Attached Fruits to High Resolution Using Archimedes' Principle. *Journal of Experimental Botany* **40**, 1069-1078.
- Lecourieux, F., Lecourieux, D., Vignault, C. and Delrot, S. (2010) A Sugar-Inducible Protein Kinase, VvSK1, Regulates Hexose Transport and Sugar Accumulation in Grapevine Cells. *Plant Physiology* **152**, 1096-1106.
- Liu, X., Li, J., Tian, Y., Liao, M. and Zhang, Z. (2016) Influence of Berry Heterogeneity on Phenolics and Antioxidant Activity of Grapes and Wines: A Primary Study of the New Winegrape Cultivar Meili (*Vitis vinifera* L.). *PLoS One* **11**, e0151276.
- Luchaire, N., Rienth, M., Romieu, C., Nehe, A., Chatbanyong, R., Houel, C., Ageorges, A., Gibon, Y., Turc, O., Muller, B., Torregrosa, L. and Pellegrino, A. (2017) Microvine: A New Model to Study Grapevine Growth and Developmental Patterns and their Responses to Elevated Temperature. *American Journal of Enology and Viticulture*. Doi: 10.5344/ajev.2017.16066.
- Lücker, J., Laszczak, M., Smith, D. and Lund, S.T. (2009) Generation of a predicted protein database from EST data and application to iTRAQ analyses in grape (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) berries at ripening initiation. *BMC Genomics* **10**, 50.

- Lund, S.T., Peng, F.Y., Nayar, T., Reid, K.E. and Schlosser, J. (2008) Gene expression analyses in individual grape (*Vitis vinifera* L.) berries during ripening initiation reveal that pigmentation intensity is a valid indicator of developmental staging within the cluster. *Plant Molecular Biology* **68**, 301-315.
- Martínez-Esteso, M.J., Vilella-Antón, M.T., Pedreño, M.Á., Valero, M.L. and Bru-Martínez, R. (2013) iTRAQ-based protein profiling provides insights into the central metabolism changes driving grape berry development and ripening. *BMC Plant Biology* **13**, 167.
- Matthews, M.A., Cheng, G. and Weinbaum, S.A. (1987) Changes in water potential and dermal extensibility during grape berry development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **112**, 314-319.
- Matthews, M.A. and Shackel, K.A. (2005) Growth and water transport in fleshy fruit. Holbrook, N.M. and Zwieniecki, M.A., eds. *Vascular transport in plants*. 1d ed. (Elsevier Academic Press: Boston, MA) pp. 181–197.
- McCarthy, M.G. (1999) Weight loss from ripening berries of Shiraz grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz). *Australian Journal of Grape and Wine Research* **5**, 10-16.
- McCarthy, M.G. and Coombe, B.G. (1999) Is weight loss in ripening grape berries cv. Shiraz caused by impeded phloem transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research* **5**, 17-21.
- Ojeda, H., Deloire, A., Carbonneau, A., Ageorges, A. and Romieu, C. (1999) Berry development of grapevines: relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. *Vitis* **38**, 145-150.
- Ollat, N. and Gaudillere, J.P. (1998) The Effect of Limiting Leaf Area During Stage I of Berry Growth on Development and Composition of Berries of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**, 251-258.
- Reshef, N., Walbaum, N., Agam, N. and Fait, A. (2017) Sunlight Modulates Fruit Metabolic Profile and Shapes the Spatial Pattern of Compound Accumulation within the Grape Cluster. *Frontiers in Plant Science* **8**, 70. doi: 10.3389/fpls.2017.00070
- Rienth, M., Torregrosa, L., Luchoire, N., Chatbanyong, R., Lecourieux, D., Kelly, M.T. and Romieu, C. (2014) Day and night heat stress trigger different transcriptomic responses in green and ripening grapevine (*Vitis vinifera*) fruit. *BMC Plant Biology* **14**, 108.
- Rienth, M., Torregrosa, L., Sarah, G., Ardisson, M., Brillouet, J.-M. and Romieu, C. (2016) Temperature desynchronizes sugar and organic acid metabolism in ripening grapevine fruits and remodels their transcriptome. *BMC Plant Biology* **16**, 1-23.

- Robin, J.P., Abbal, P. and Flanzky, C. (1996) La fermeté des baies de raisin: définition d'un indice de fermeté, corrélation avec les modifications de couleur et application à la détection précoce de la véraison. Lonvaud-Funel, A., eds. Oenologie 95 : 5e Symposium International d' Oenologie. (Lavoisier - Technique et Documentation: Paris, FRA) pp. 109-114.
- Robin, J.P., Abbal, P. and Salmon, J.M. (1997) Fermeté et maturation du raisin. Définition et évolution de différents paramètres rhéologiques au cours de la maturation. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin **31**, 127- 138.
- Rogiers, S.Y., Greer, D.H., Hatfield, J.M., Orchard, B.A. and Keller, M. (2006) Solute Transport into Shiraz Berries during Development and Late-Ripening Shrinkage. American Journal of Enology and Viticulture **57**, 73-80.
- Ruffner, H.P. (1982a) Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review Part A. Vitis **21**, 247-259.
- Ruffner, H.P. (1982b) Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review Part B. Vitis **21**, 346-358.
- Ruffner, H.P. and Hawker, J.S. (1977) Control of glycolysis in ripening berries of *Vitis vinifera*. Phytochemistry **16**, 1171-1175.
- Singleton, V.L., Ough, C.S. and Nelson, K.E. (1966) Density Separations of Wine Grape Berries and Ripeness Distribution. American Journal of Enology and Viticulture **17**, 95-105.
- Sun, R.-Z., Cheng, G., Li, Q., He, Y.-N., Wang, Y., Lan, Y.-B., Li, S.-Y., Zhu, Y.-R., Song, W.-F., Zhang, X., Cui, X.-D., Chen, W. and Wang, J. (2017) Light-induced Variation in Phenolic Compounds in Cabernet Sauvignon Grapes (*Vitis vinifera* L.) Involves Extensive Transcriptome Reprogramming of Biosynthetic Enzymes, Transcription Factors, and Phytohormonal Regulators. Frontiers in Plant Science **8**, 547.doi: 10.3389/fpls.2017.00547.
- Sweetman, C., Deluc, L.G., Cramer, G.R., Ford, C.M. and Soole, K.L. (2009) Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. Phytochemistry **70**, 1329-1344.
- Terrier, N., Glissant, D., Grimplet, J., Barrieu, F., Abbal, P., Couture, C., Ageorges, A., Atanassova, R., Léon, C., Renaudin, J.-P., Dédaldéchamp, F., Romieu, C., Delrot, S. and Hamdi, S. (2005) Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. Planta **222**, 832-847.

- Terrier, N. and Romieu, C. (2001) Grape Berry Acidity. Roubelakis-Angelakis, K.A., eds. Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine. (Springer Netherlands: Dordrecht) pp. 35-57.
- Terrier, N., Sauvage, F.-X., Ageorges, A. and Romieu, C. (2001) Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. *Planta* **213**, 20-28.
- Terrier, N., Sauvage, F.X. and Romieu, C. (1996) Absence de crise respiratoire, induction de l'activité alcool déshydrogénase et diminution de l'acidité vacuolaire lors de la maturation du raisin. Lonvaud-Funel, A., eds. Oenologie 95 : 5e Symposium International d'Oenologie. (Technique & Documentation- Lavoisier: Paris- France) pp. 24-28.
- Terrier, N., Torregrosa, L., Ageorges, A., Vialet, S., Verriès, C., Cheynier, V. and Romieu, C. (2009) Ectopic Expression of VvMybPA2 Promotes Proanthocyanidin Biosynthesis in Grapevine and Suggests Additional Targets in the Pathway. *Plant Physiology* **149**, 1028-1041.
- Tesnière, C. and Verriès, C. (2000) Molecular cloning and expression of cDNAs encoding alcohol dehydrogenases from *Vitis vinifera* L. during berry development. *Plant Science* **157**, 77-88.
- Thomas, T.R., Shackel, K.A. and Matthews, M.A. (2008) Mesocarp cell turgor in *Vitis vinifera* L. berries throughout development and its relation to firmness, growth, and the onset of ripening. *Planta* **228**, 1067-1076.
- Torregrosa, L. (1998) A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L. *Vitis* **37**, 91-92.
- Wong, D.C.J., Lopez Gutierrez, R., Dimopoulos, N., Gambetta, G.A. and Castellarin, S.D. (2016) Combined physiological, transcriptome, and cis-regulatory element analyses indicate that key aspects of ripening, metabolism, and transcriptional program in grapes (*Vitis vinifera* L.) are differentially modulated accordingly to fruit size. *BMC Genomics* **17**, 416.
- Zhang XY, Wang XL, Wang XF, Xia GH, Pan QH, Fan RC, Wu FQ, Yu XC, Zhang DP (2006) A shift of Phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiology* **142**, 220-32.
- Zhang, Y. and Keller, M. (2017) Discharge of surplus phloem water may be required for normal grape ripening. *Journal of Experimental Botany* **68**, 585-595.
- Zouid, I., Siret, R., Jourjon, F., Mehinagic, E. and Rolle, L. (2013) Impact of Grapes Heterogeneity According to Sugar Level on both Physical and Mechanical Berries

Properties and Their Anthocyanins Extractability at Harvest. *Journal of Texture Studies* **44**, 95-103.

Supplementary Data:

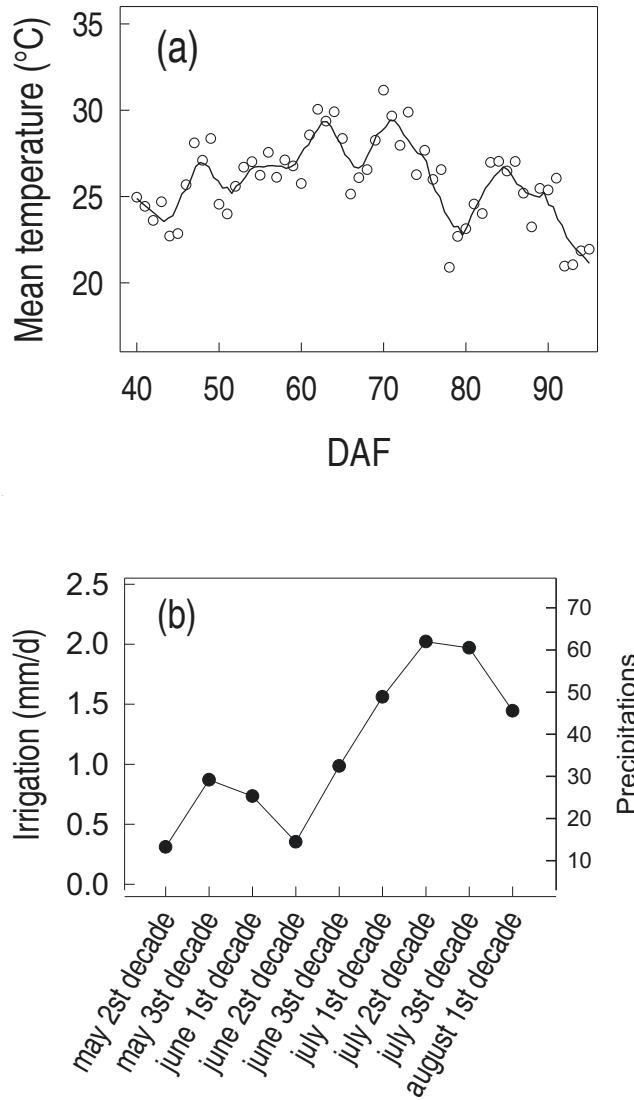


Figure. 2. S1. (a) Mean temperature variations from 40 to 95 days after flowering. Flowering date was 05/12/2015. Plants were irrigated 1-2 time per day. (b) Irrigation management during growing season in 2015.



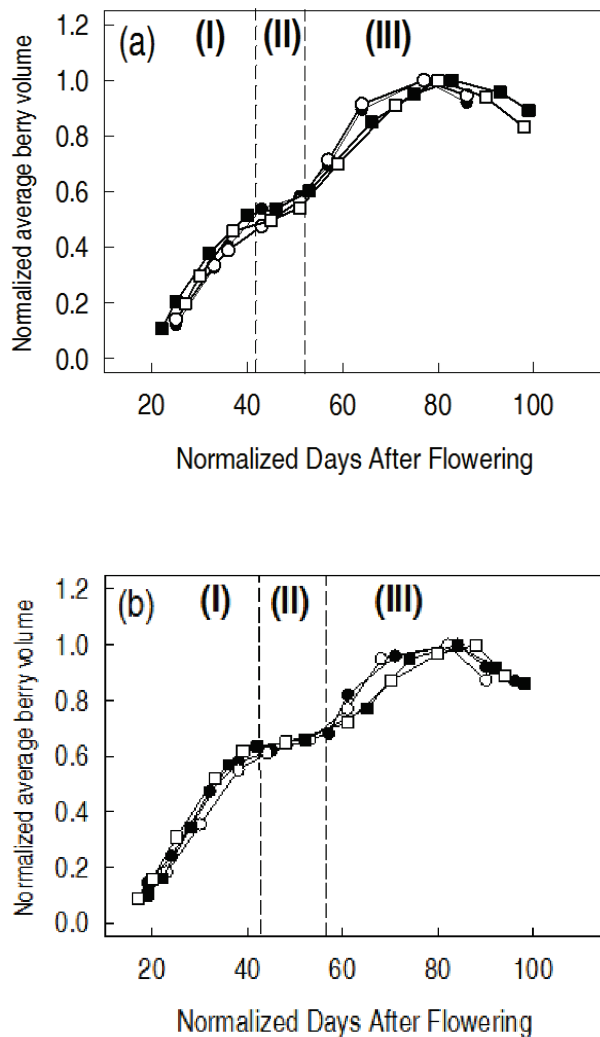


Figure. 2. S2. Normalized average berry volume of *V. vinifera* clusters flowering at different dates. (a) Pinot Meurnier, (b) Zinfandel. Normalized average berry volume is calculated as  $V/(V_{\max} * Nb)$  where  $V$  is cluster volume,  $V_{\max}$  is maximum average berry volume per cluster at the end of phase III (ca 80 DAF), and  $Nb$  is the number of berries per cluster. Normalized DAF was obtained upon synchronizing all veraison dates (growth resumption, phaseII/phase III transition) at 55 DAF. (I) Green phase, (II) Lag phase, (III) Ripening phase. Flowering dates in (a) are 05/12/2015 (closed circles), 05/15/2015 (open circles), 05/22/2015 (closed squares), 05/26/2015 (open squares), and in (b) are 05/16/2015 (closed circles), 05/18/2015 (open circles), 06/03/2015 (closed squares), 06/06/2015 (open squares).

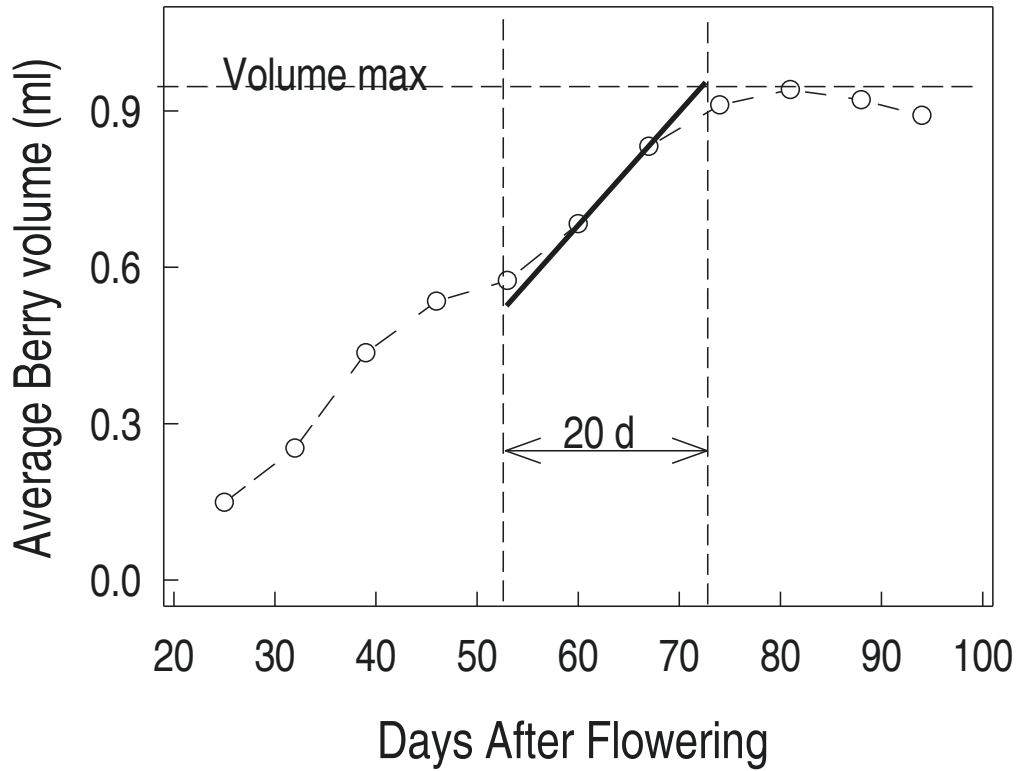


Figure. 2. S3. Normalized Average Pinot Meunier berry volume in one cluster, plotted as a function of days after flowering. Black line corresponds to the maximal growth rate (ideally, growth rate at inflexion point). Typical example from 2014 data (see also Fig. 2).

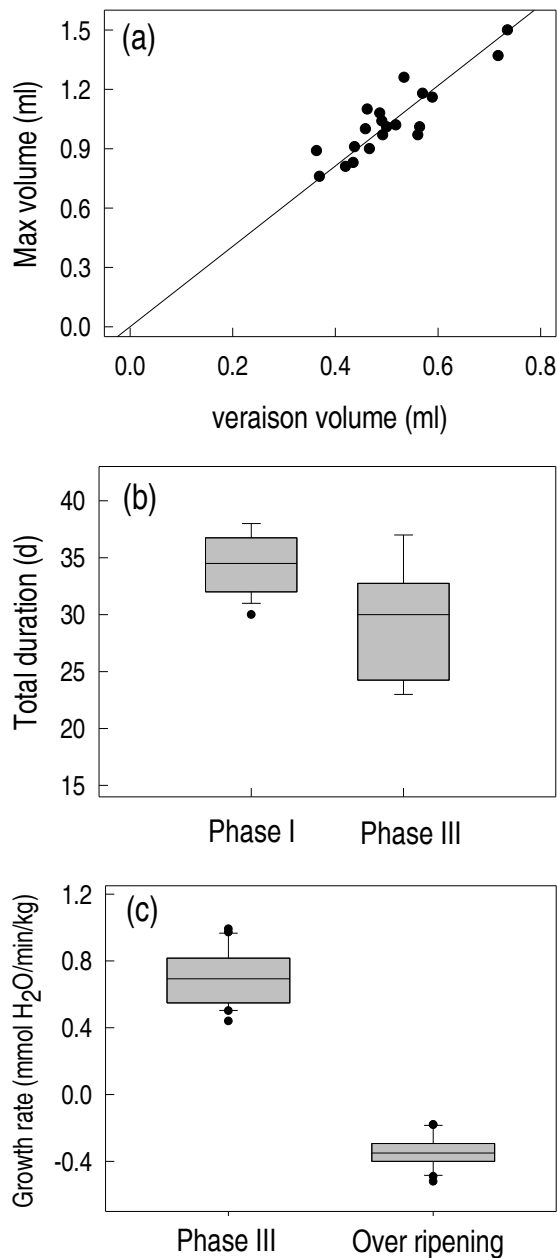


Figure. 2. S4. Development of 20 Pinot Meunier clusters. (a) Relationship between maximum berry volume and veraison volume. Each point represents one clusters. Black line corresponds to the linear regression forced through the origin ( $y = 2.03 * x$ ,  $r^2 = 0.786$ ). (b) total duration of phase I (green) and phase III (ripening) growth periods. (c) growth rates of phase III and over ripening, assuming berry growth is just the result of water accumulation. In (b, c), the horizontal line in each box is the median, the top and bottom box edges are the 75th and 25th percentiles, respectively, the top and bottom error bars are the 90th and 10th percentiles, respectively, and the black dots are outliers at the 95th and 5th percentiles. For phase III in (b), no outliers are shown.

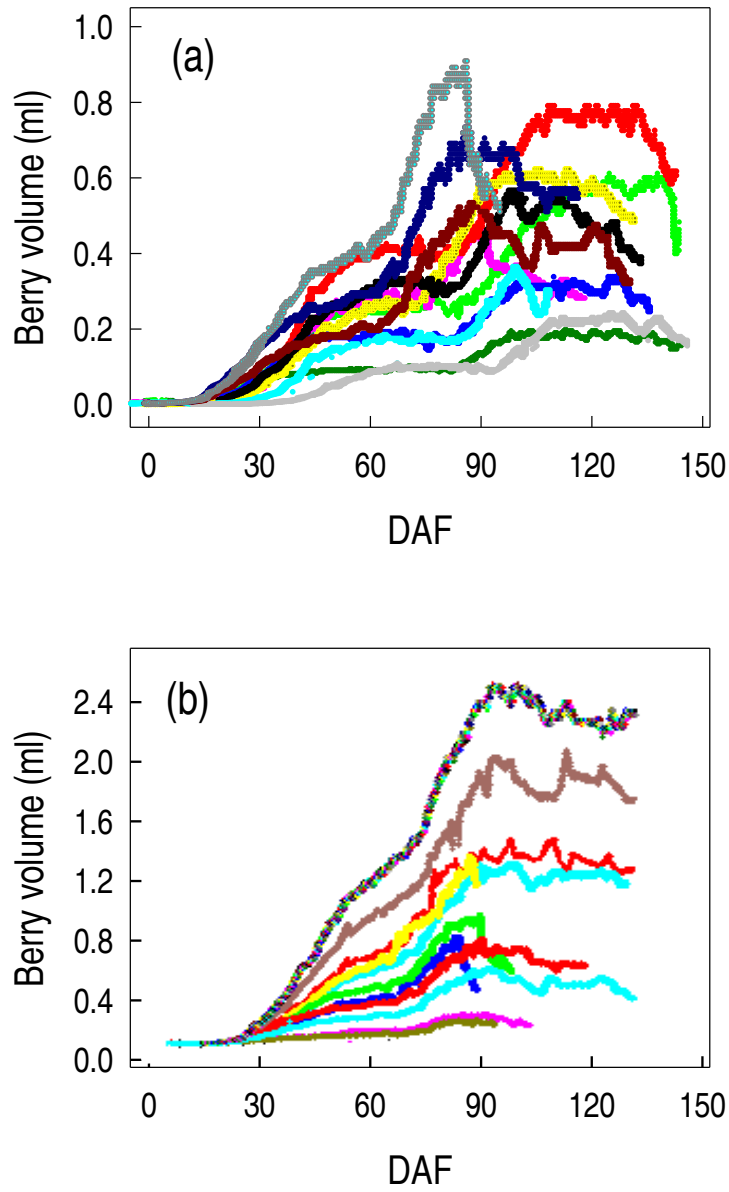


Figure. 2. S5. Development of Cabernet Sauvignon (a) and Pinot Noir (b) individual berries, recalculated from diameter data of Friend et al. (2009). Each colored curve represents a different berry.

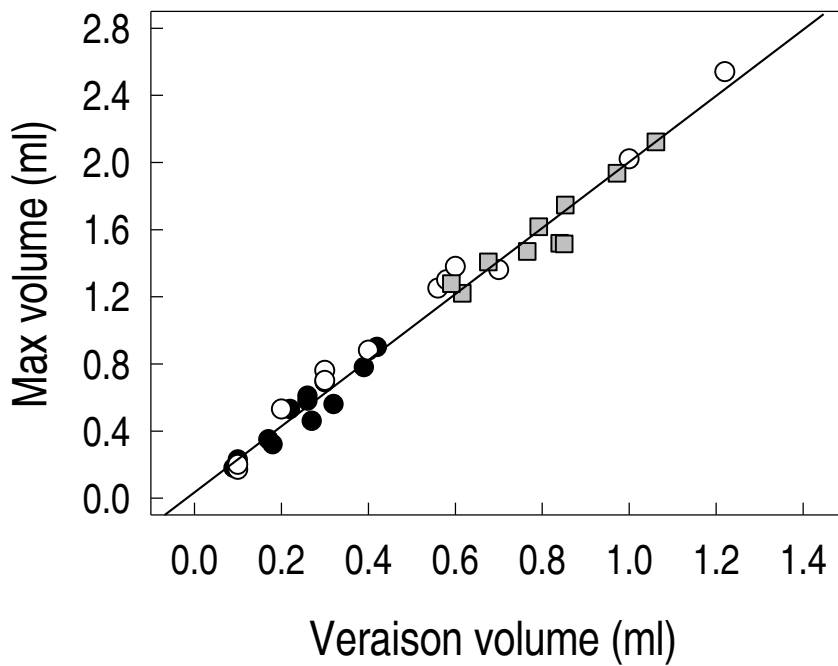


Figure. 2. S6. Relation between maximum and veraison berry volumes in 12 Cabernet Sauvignon (black circles), 12 Pinot Noir (open circles) and 10 ML1 microvine (gray squares) berries as determined in Fig. 3b. Each point represents one berry. Black line corresponds to the linear regression ( $y = 0.05 + 1.96x$ ,  $r^2 = 0.982$ )

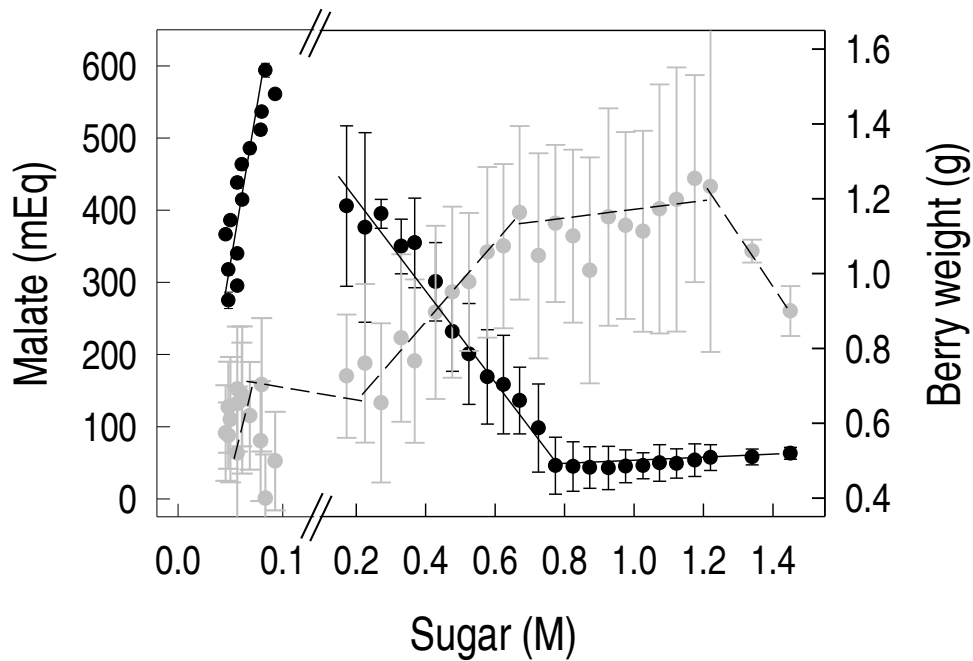


Figure. 2. S7. Malate concentration (black circles) and berry weight (gray circles) of Pinot Meunier cultivar as a function of sugar concentration. 1035 individual berries were ranked according to sugar concentration, before calculating average values and standard deviations on every successive 0.05M sugar concentration intervals, excepted for pre-veraison berries that were ranked according to malate concentration, before calculating sugars. The number of berry per 0.05 M class varies from 19 to 87 berries with an average value of 43. Values are the mean ( $\pm$ SD) of each class.

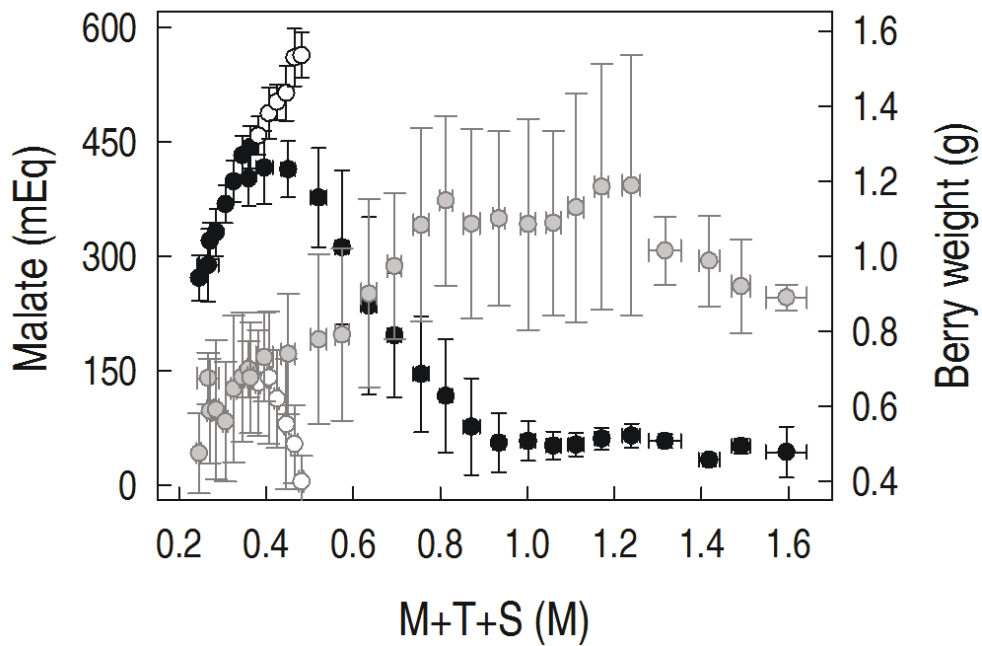


Figure. 2. S8. Berry weight (gray circles) and malate breakdown (closed circles) in Pinot Meunier berries with respect to total solute concentration (M+T+S : Malate+Tartrate+ Sugar). Data were averaged on successive 0.05 M concentration intervals. Open circles correspond to atypically small berries. 1035 individual berries were ranked according to total solutes (M+T+S), before calculating average values and standard deviation on every successive 0.05M (M+T+S) intervals. The number of berry per 0.05 M class varies from 7 to 69 berries with an average value of 31. Values are the mean ( $\pm$ SD) of each class.

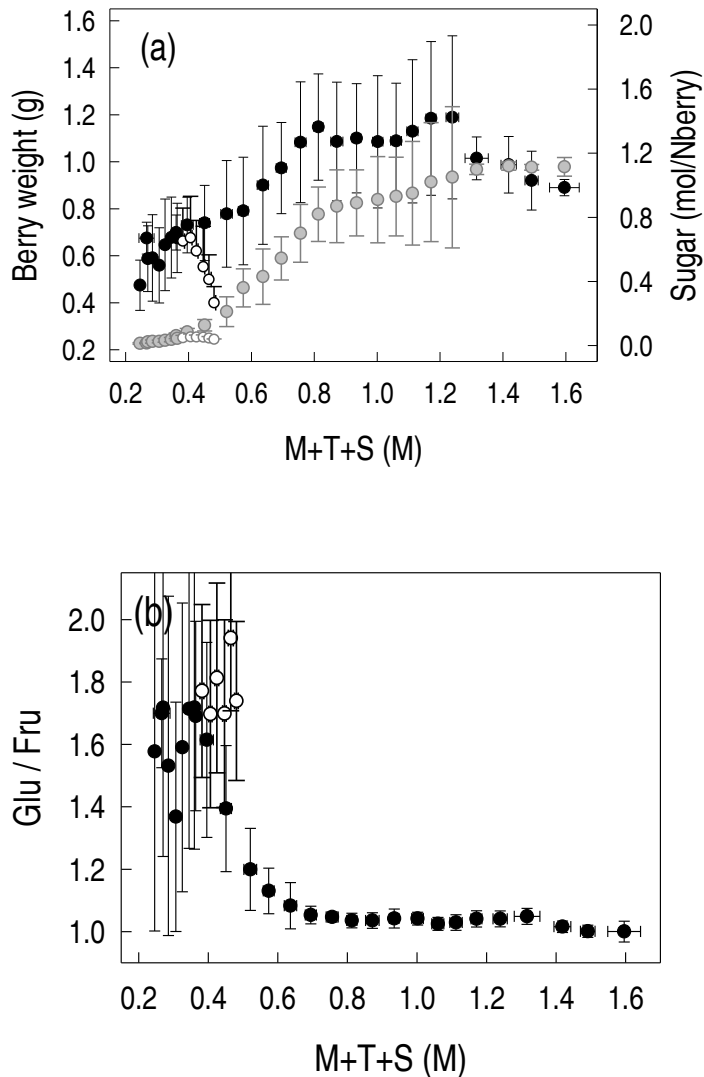


Figure. 2. S9. (a) Development pattern (closed circles) and normalized sugar accumulation (gray circles) in an imaginary Pinot Meunier berry, and (b) Glu/Fru ratio, with respect to total solute concentration (Malate+ Tartrate+ Sugar). Data were averaged on successive 0.05 M concentration intervals. Open circles in (a, b) correspond to atypically small berries. In (a), normalized sugar accumulation (gray circles) in an imaginary berry (Nberry) was calculated as  $1000 \times [G+F] \times Bw / Bw_{\max}$  where [G+F] : glucose plus fructose concentration, Bw : Berry Weight,  $Bw_{\max}$  : maximal average berry weight (1.2 g). 1035 Individual berries were ranked according to total solutes (M+T+S), before calculating average values and standard deviation on every successive 0.05M (M+T+S) intervals. The number of berry per 0.05 M class varies from 7 to 69 with an average value of 31. Values are the mean ( $\pm$ SD) of each class.



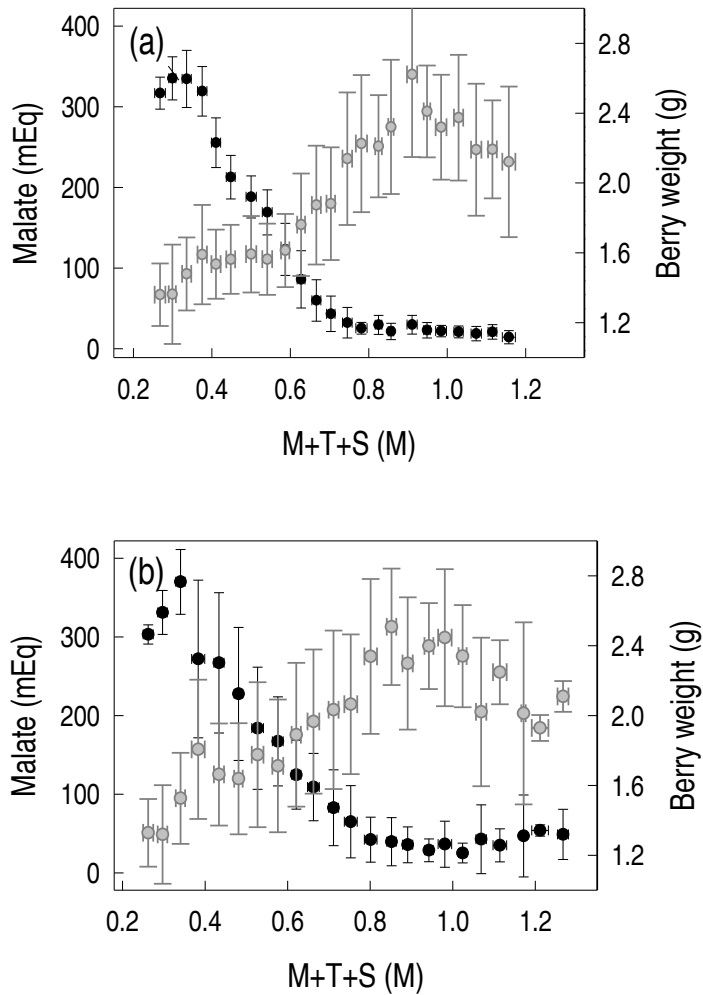


Figure. 2. S10. Development and Malate breakdown of Syrah berries with (a) individually determined DAS and (b) undefined individual DAV, as a function of total solutes concentration. Individual berries (500 for a and 696 for b) were ranked according to total solutes (M+T+S), before calculating average values and standard deviation on every successive 0.05M (M+T+S) intervals. The number of berry per 0.05 M class varies from 9 to 26 and 8 to 68 berries for (a) and (b) respectively, with an average value of 16 for (a) and 32 for (b). Values are the mean ( $\pm$ SD) of each class.

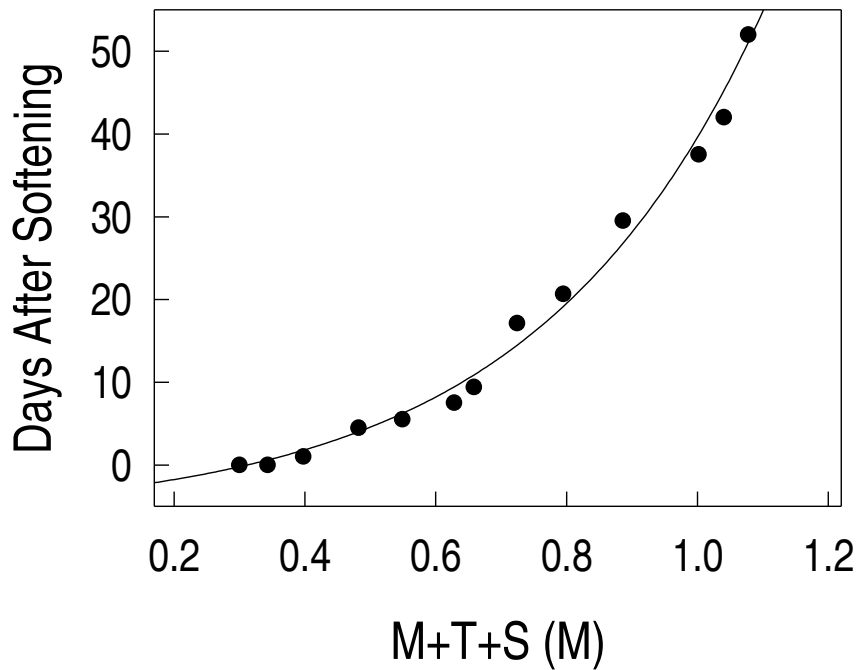


Figure. 2. S11. Relationship between DAS and total solutes concentration (Malate + Tartrate + Sugars) in Syrah berries harvested in 2015. The black line corresponds to exponential growth fitting ( $y = -6.4 + 2.6e^{(2.9x)}$ ,  $R^2=0.993$ ,  $P \leq 0.0001$ ). Each point corresponds to average values obtained on samples of 30 berries harvested at each date (see Fig. 6b).

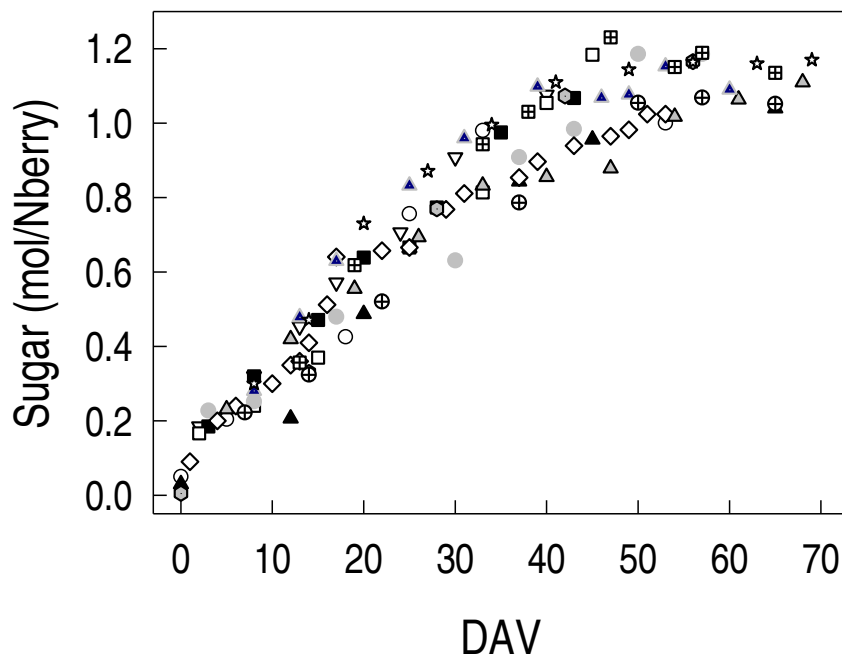


Figure. 2. S12. Sugar accumulation in various cultivars, obtained by recalculating the evolution of sugars per berry from literature data on concentration and volume. Data are from Davies et al. (1996), McCarthy (1999), Coombe and McCarthy (2000), Famiani et al. (2016) as determined in Table S2. Normalized sugar accumulation in an imaginary berry (Nberry) was calculated as  $1000 \times [G+F] \times Bw / Bw_{\max}$  where  $[G+F]$  : glucose plus fructose concentration,  $Bw$  : Berry Weight,  $Bw_{\max}$  : maximal average berry weight.

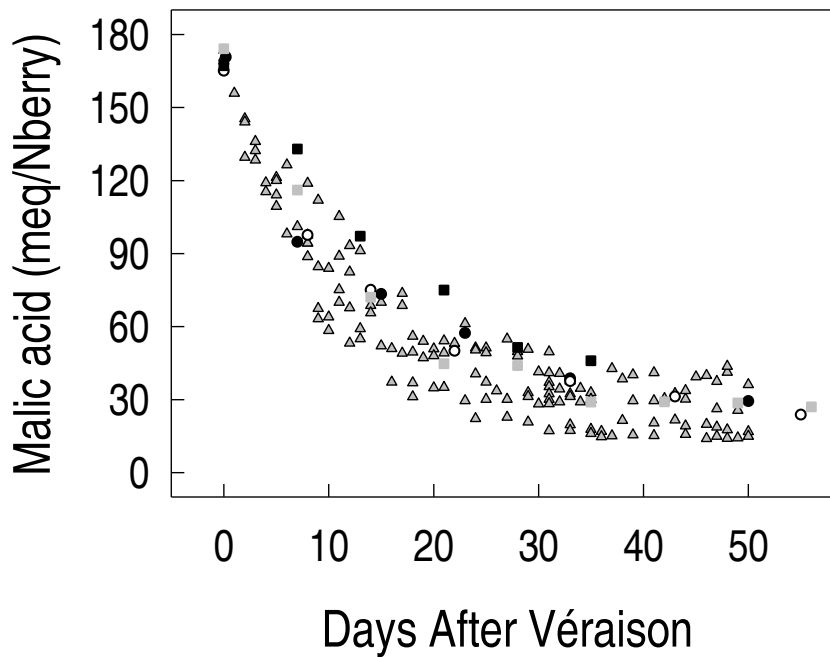


Figure. 2. S13. Malic acid breakdown in various cultivars, obtained by recalculating the evolution of malate per berry from literature data on concentration and volume. Data from Duchêne et al. (2014) ; Bobeica et al. (2015) ; Famiani et al. (2016) as determined in Table S3. Normalized malic acid breakdown in an imaginary berry (Nberry) was calculated as  $1000 \times [\text{Mal}] \times \text{Bw} / \text{Bw}_{\text{max}}$  where  $[\text{mal}]$  : malic acid concentration, Bw : Berry Weight,  $\text{Bw}_{\text{max}}$  : maximal average berry weight.

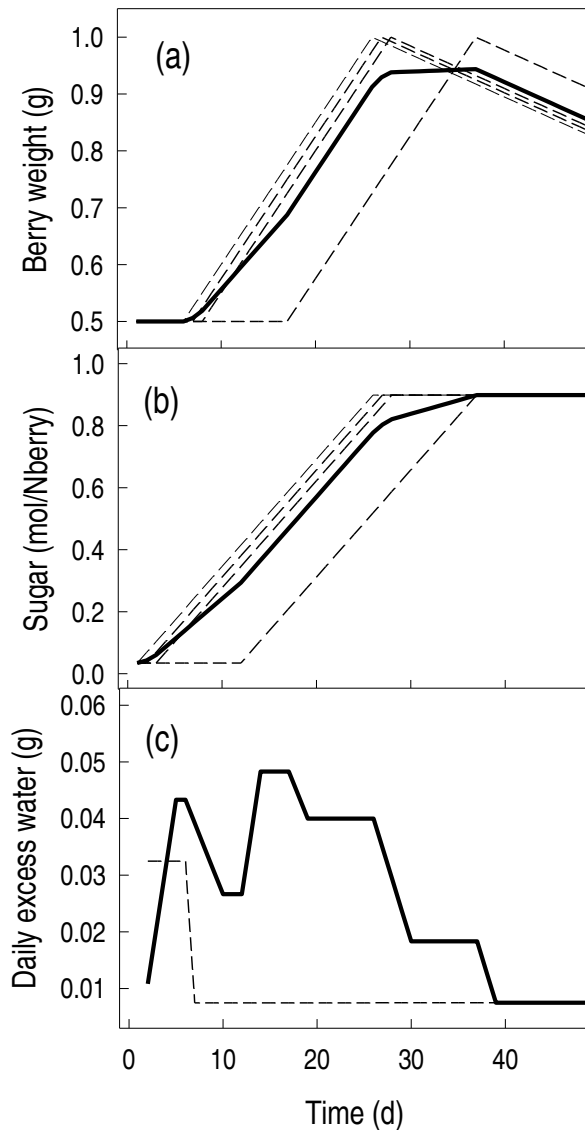


Figure. 2. S14. Accumulation of sugars at constant volume at the end of ripening: a possible artifact in non-synchronized berries. Four identical berries showing the development pattern supported by present experimental evidences are considered (dotted lines): the berry volume (a) starts to increase 6 days later than the onset of sugar accumulation (b), then water and sugar accumulate simultaneously for 20 days. Phloem unloading totally stops at 0.9 M sugars, before immediate berry shriveling. The average composition of four non-synchronized berries (black line) led to erroneous conclusions concerning water and sugar fluxes in berry since the excess of water that emerges during mid and late ripening is a population artifact (c). Daily excess water is calculated as:  $(\text{half imported sugar}/0.532) - \text{daily imported volume}$ , according to Fig. 2 in Jensen et al. (2013). 0.532 M corresponds to optimal sucrose concentration in the phloem.

Table.2. S1. Berry development in Zinfandel and Pinot Meunier clusters flowering at different dates.

Cultivars	Clusters			Flowering date	Growth rate <sup>a</sup>		Over ripening <sup>a</sup>
	Number of berries	Cluster weight(g)	Mean berry weight(g)		Phase (I)	Phase (III)	
Pinot Meunier	165	199	1.31	05.12.2015	0.77	0.71	-0.3
	119	185	1.55	05.15.2015	0.76	0.7	-0.23
	74	131	1.77	05.22.2015	0.71	0.67	-0.2
	51	93	1.82	05.26.2015	0.73	0.62	-0.2
Mean	102.25	152	1.59		0.74 (NS)	0.67(NS)	-0.2
SD	50.47	49	0.28		0.03	0.04	-0.03
Zinfandel	141	290	1.94	05.16.2015	0.77	0.67	-0.19
	133	228	1.71	05.18.2015	0.75	0.69	-0.24
	112	217	2.05	06.03.2015	0.7	0.67	-0.2
	73	164	2.25	06.06.2015	0.68	0.6	-0.2
Mean	114.75	224.75	1.99		0.72 (NS)	0.66 (NS)	-0.2
SD	30.4	51.7	0.23		0.05	0.04	-0.03

SD : standard deviation. Values with (NS) are non significantly different (Wilcox: P>0.05). <sup>a</sup>

mmol H<sub>2</sub>O/min/Nberry

Table.2. S2. Rate of sugar accumulation in different cultivars recalculated from literature data.

References	Cultivars	Duration	Max berry weight (g)	Final sugars (mol/Nberry)	sugars accumulation rate ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{Nberry}$ )
Famiani et al. 2016	Pinot Noir	40	1.5	1.08	18.80
	Sagrantino	60	1.6	1.13	13.04
Coombe and McCarthy 2000	Muscat G.B	40	3.3	1.17	20.24
		43	3.3	1.16	18.68
		45	3	1.28	19.79
		57	2.2	1.28	15.65
Davies et al. 1997	Shiraz	56	1.5	1.26	15.65
Davies et al. 1996	Shiraz	56	1.3	1.20	14.91
McCarthy and Coombe 1999	Shiraz	45	1.6	1.18	18.23
		50	1.65	1.27	17.60
		45	1.8	1.14	17.57
		47	1.4	1.23	18.17
Mean		49.23	1.96	1.19	17.08
SD		6.97	0.75	0.07	2.27
CI		3.79	0.41	0.03	1.24

SD : standard deviation CI: 95 % confidence interval .

Table.2. S3. Rate of malate breakdown of different cultivars recalculated from literature data.

References	Cultivars	Malate Breakdown duration	Max Berry weight (g)	Véraison malate (meq/Nberry)	Malate breakdown ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{Nberry}$ )
Famiani et al. 2016	Sagrantino	36	1.6	146	1.4
	Pinot Noir	28	1.5	171	2.1
Duchêne et al. 2014	Riesling	30	1.4	181	2.1
	Gewurztraminer	30	1.6	162	1.9
Bobeca et al. 2015	Sangiovese	35	1.8	186	1.9
Mean		32	1.6	166	1.9
SD		3	0.13	14	0.24
CI		2.5	0.11	11	0.2

SD: Standard deviation, CI: 95% Confidence interval.



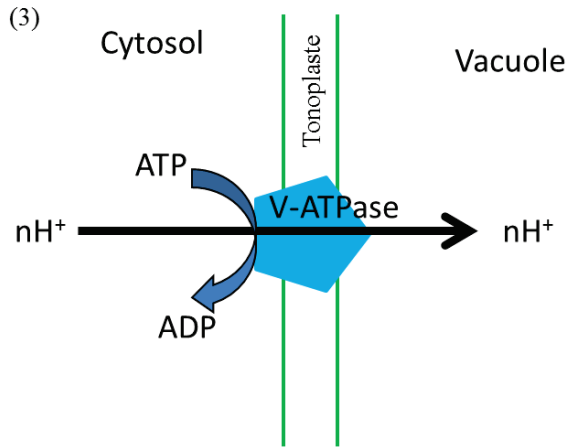
***Chapitre 3. Respiration and bioenergetics of  
sugar import and malate breakdown in ripening  
berries***

**Modèle énergétique de contrôle du pH par l'entrée des sucres :**

L'examen de quelques ordres de grandeur montre que le pH vacuolaire du raisin place l'énergétique cellulaire en situation de contrainte thermodynamique. Dans ce contexte, la relation entre l'entrée des sucres, et la baisse du malate, pourrait s'expliquer par une simple augmentation du flux énergétique cellulaire, et de la respiration qui lui est associée.

En supposant que la V-ATPase soit à l'équilibre thermodynamique, et en appliquant l'équation de Lobit et al. (2006) (Annexe S3. 1), qui relie la stoechiométrie de la V-ATPase aux pH vacuolaires et cytoplasmiques (supposé 7.2 dans les calculs) on peut calculer l'énergie libre de l'ATP dans le cytoplasme. Une simple diminution d'énergie libre de l'ATP de 10  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . (de -68 à -58  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) suffirait pour provoquer l'augmentation usuelle du pH vacuolaire de 2.6 à 3.7 pendant le mûrissement. Ces valeurs de  $\Delta\text{GATP}$  sont tout à fait conformes aux valeurs effectivement mesurées dans les cellules végétales ou animales plus ou moins actives. Plus encore, cette gamme de variation rappelle la relation flux-force du métabolisme énergétique cellulaire lorsqu'un muscle passe du repos au travail maximal (Jeneson et al. 2009), ou bien lorsqu'un tissu végétal est nourri par du succinate ou bien du glucose, en normoxie (Z à F), puis est progressivement forcé à fonctionner en anaérobiose, par empoisonnement progressif au cyanure (E-B), voire en anoxie totale (A) (Roberts, et al 1985). Hors l'on sait que la propension à la fermentation aérobie du raisin augmente lorsqu'il mûrit.

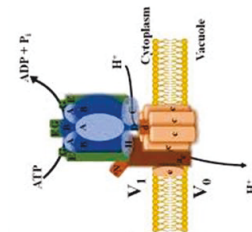
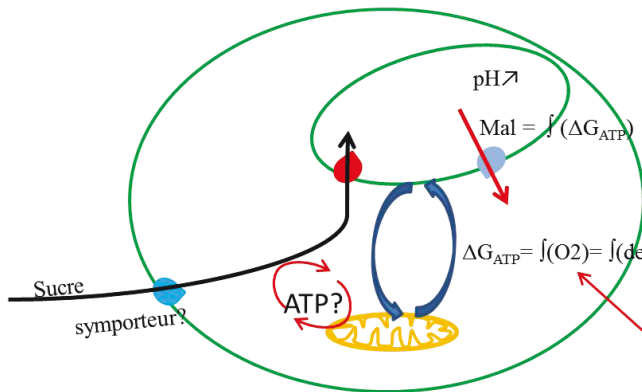
La simple augmentation de la demande énergétique devrait donc saturer la capacité de la phosphorylation oxydative, voire induire la fermentation aérobie. Les résultats du chapitre précédent montrent que la vitesse d'entrée des sucres est considérable, par rapport à la respiration. Le coût énergétique de l'import des sucres serait alors la cause indirecte de la baisse du pH, synonyme du relargage et de la respiration de l'acide malique, puisque le relargage des protons dans le cytoplasme doit être neutralisé par un mouvement similaire d'anion. Ce modèle minimaliste du point de vue de l'expression génique (l'induction de transporteurs de sucre énergivores est une cause suffisante) prévoit que la phosphorylation oxydative, donc la respiration, augmente avec l'entrée des sucres dans la baie (Annexe S3. 2). L'objectif du chapitre suivant est donc de tester ce modèle.



$$\Delta G_{ATPase} = \Delta G_{ATP} + n (F \Delta \Psi - R T \ln 10^{(pH_{vac} - pH_{cyt})})$$

Lobit et al. (2006)

Annex S3. 1. V-ATPase sur le tonoplaste. Les pompes utilisent l'énergie pour le transfert de chaque H<sup>+</sup> du cytoplasme vers la vacuole. L'équation du  $\Delta G_{ATPase}$  est tirée de Lobit et al. (2006).

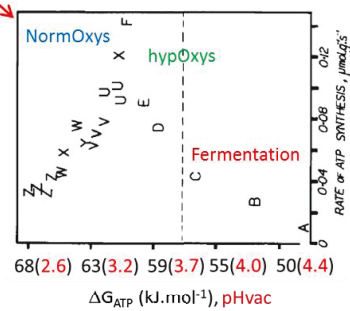


$$\Delta G_{ATPase} = \Delta G_{ATP} + n(F\Delta\Psi - RT\ln 10^{(pH_{vac} - pH_{cyt})})$$

$$n = n_0 + \alpha(pH_{vac} - 7) + \beta 10^{(pH_{cyt} - 7)}$$

Lobit et al. (2006)

1. Activation du transport de sucre
2. Consommation d'ATP et phosphorylation oxydative accrues
3. Diminution du  $\Delta G_{ATP}$
4. Croissance du pH vacuolaire, efflux d'acide malique dans le cytoplasme
5. Respiration, gluconéogenèse et/ou fermentation de l'acide malique sous peine d'acidose cytosolique



Roberts et al. 1985

Annex S3. 2. Modèle énergétique du contrôle du pH par l'entrée des sucres.

# Respiration and bioenergetics of sugar import and malate breakdown in ripening berries

Rezk SHAHOOD<sup>(2,3)</sup>, Laurent TORREGROSA<sup>(2)</sup>, Charles ROMIEU<sup>(1)\*</sup>

<sup>1</sup> INRA Montpellier, UMR AGAP, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex, France

<sup>2</sup> Montpellier SupAgro, UMR AGAP, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier, France; UMT Génovigne, INRA de Pech-Rouge, 11430 Gruissan, France.

<sup>3</sup> General Commission for Scientific Agricultural Research– Lattakia, Syria

\* Correspondance: [charles.romieu@inra.fr](mailto:charles.romieu@inra.fr)

## Abstract

Grape berry respiration has been intensively studied during the last century in order to explain the abrupt change in direction of the malate pathway and the induction of hexose storage as major metabolic changes triggered by berry ripening. In this work, i) we revisited the impact of temperature on the activity of respiratory chains in homogeneous, synchronized berry samples at different developmental stages, and ii) we analyzed the quantitative relationship between respiration and the fate of sugar and malate at the single berry level. Wherefore, iii) we studied the impact on respiration of massive sugar unloading in attached berries.

Detached berries simply use the available respiratory substrate in their vacuoles: malate is the major respiratory substrate at the very beginning of ripening, and then hexoses contribute mostly to respiration throughout ripening. Respiration decreases rapidly with malate concentration for 14 days which follow softening and induction of massive storage of sugars, but is not related to the intensity of sugar loading in the fruit.

Future studies of the evolution of respiratory complexes and vacuolar transporters would advance the understanding of this study, particularly to examine whether alternate Cytochrome C oxidase and mitochondrial decoupling proteins are induced at the beginning of ripening, as in climacteric fruits.

**Key words:** Respiration, Respiratory Flux, activation energy, organic acid, sugar

## **Introduction**

Fruits are classified as climacteric or non-climacteric primarily depending on the occurrence of a burst in respiration at the inception of ripening. Climacteric fruits also display an autocatalytic peak of ethylene emission as an obligate hormonal signal triggering and coordinating multifaceted aspects of ripening in these fruits (Liu et al. 2016). The burst of respiration allows intense breakdown of starch and cell wall material when fruit suddenly becomes attractive, soft and rich in soluble sugars. Amplified electron transfer and dissipation of pmf (Proton motive force) through, respectively, alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial proteins allow to bypass the otherwise strict coupling of primary metabolism to oxidative phosphorylation in this circumstance (see Colombié et al. 2017 for a recent review). By contrast, in grape berry, only some aspects of ripening including cell wall hydrolases are marginally modulated by exogenous ethylene at best (Chervin et al. 2008). This fruit displays very limited bursts in respiration and ethylene and is therefore considered as typical model of non-climacteric fruit. By contrast with apple, banana and tomato, its endogenous starch reserves are negligible when compared to the considerable amount of sugars accumulated during ripening. Thus, even if possibly marked by transient starch recycling within successive nictemeral cycles (Zhu et al. 2017), grape ripening relies on real time activation of the phloem unloading pathway at a considerable rate during a 26 days period (Shahood et al. submitted). A rather complex picture emerges from transcriptomic studies regarding sugar loading in berries (Lecourieux et al. 2014), in which electrogenic transporters, capable of accumulating sugars against their concentration gradients at the expense of cellular energy, coexist with electro-neutral diffusion facilitators, operating in the direction of the concentration gradient (Chong et al. 2014; Hedrich et al. 2015). Whether energization of sugar transport is strictly needed for berry ripening is questionable owing to the large uncertainties in phloem composition (Zhang and Keller 2017), moreover, the versatility in membrane transporters genes identified so far and the relative lack of data on their localization makes the global energy efficiency of the sugar loading process in berries an open question.

Grape berry respiration has been intensively studied during the last century in order to explain the abrupt change in direction of the malate pathway and the induction of hexose storage as major metabolic changes triggered by berry ripening (Famiani et al. 2016; Ribéreau-Gayon and Peynaud 1971). Unfortunately, all measurements published until now dealt with

averaged, heterogeneous berries detached from the plant, resulting in two distinct biases : berries degrading malic acid were mixed with younger ones still accumulating it, and sugar unloading, the fastest known pathway in ripening berries , was obviously suppressed, possibly affecting the measured respiratory variables. Current uncertainty on the activity of respiration in physiologically relevant conditions encumbers any attempt to provide answers to recurring questions, such as the energy cost of the sugar accumulation, or the use of malate as major respiratory substrate during berry ripening. One can even imagine at the extreme that these major experimental drawbacks may have completely quenched a possible transitory rise in respiration at véraison, associated with the dramatic increase in the rate of sugar unloading in berries.

The berry growth pattern can be depicted by a double sigmoidal curve (Coombe 1987) in which three stages of development can be distinguished (Coombe 1992). During stage I, water and acids accumulate, the respiratory rate of the berry increases, with a respiratory quotient ( $R.Q = (CO_2 \text{ produced}) / (O_2 \text{ uptake})$ ) value of about 1 (Harris 1971; Koch and Alleweldt 1978). Respiration reaches a maximum in stage II, together with the acid content. In stage III ripening occurs and berries suddenly act as privileged sink for sugars and water (Coombe 1992; Keller et al. 2014; Ollat et al. 2002). Sugar accumulation begins with softening and concomitant relaxation of turgor pressure, just before the resumption of cell enlargement (Coombe 1987; Gambetta et al. 2010; Kanellis and Roubelakis-Angelakis 1993; Ribéreau-Gayon and Peynaud 1971; Thomas et al. 2008). Furthermore, there is a large decrease in malate content accompanied by changes in berry photosynthetic capacity and respiratory rate (Harris et al. 1971; Famiani et al. 2000; Palliotti and Cartechini 2001). Harris's study (1971) on various cultivars at 30°C show that the respiratory rate is maximal at the onset of ripening then it decreases down to  $24 \mu\text{mol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  at berry maturity.  $O_2$  consumed decreases and R.Q increases immediately at softening time (Harris et al. 1971; Kriedemann 1968; Ollat and Gaudillère 2000). R.Q may exceed 1.3 suggesting the use of malate as a substrate for respiration instead of imported sugars ( $R.Q = 1$ ) during ripening (Harris 1971; Koch and Alleweldt 1978; Ribéreau-Gayon and Peynaud 1971). R.Q could also increase by aerobic ethanolic fermentation, at the expense of endogeneous glucose or malate (Terrier and Romieu 2001). The in vitro study of malic oxidation by purified mature grape mitochondria showed that mitochondrial NAD-malic enzyme would be inactive in mature grape berries, making malate oxidation dependent on pyruvate production in the cytoplasm, or on transamination or gluconeogenesis for the elimination of oxaloacetate as a strong inhibitor of both MDH (malate dehydrogenase) and SDH (Succinate dehydrogenase). Whatever, these mitochondria from

ripe fruits displayed efficient respiratory coupling and negligible cyanide insensitive, alternate oxidase (Romieu and Flanzy 1988; Romieu et al. 1992).

The principal aim of the present work is to revisit the impact of temperature on the activity of respiratory chains in homogeneous, synchronized berry samples at different ripening stages, and analyze the quantitative relationship between this respiratory metabolism and sugar/malate fate at the single berry level. Wherefore, a method to measure gas exchanges on attached berry was developed to detect the signature of the sudden activation of the import of photo-assimilates and malate breakdown on respiratory fruit demand, during the initiation of ripening.

## **Material and methods**

### *Plant material*

*Density Sorting of Homogeneous berries.* Grape berries of Pinot Meunier cultivar (*Vitis vinifera L.*), from the experimental vineyard located in Montpellier SupAgro-INRA campus (southern France), were collected at different physiological stages during 40 consecutive days in 2014 and in 2015. About 1200 berries were randomly picked for each sampling date. Berries were sorted according to their buoyant density using different saline solutions (from 50 to 170 g L<sup>-1</sup> sodium chloride) (Singleton et al. 1966; Kontoudakis et al. 2011; Rolle et al. 2011; Rolle et al. 2015; Torchio et al. 2014). Berries of each class were washed with tap water, weighted and counted, finally retaining the more representative density class at each sampling date, yielding more than 60 berries in each sample at specified developmental stage and temperature. . Respiration measurements were initiated within a maximum of 6 hours after harvest, for another 6 hours duration on average, then the samples was frozen at -80°C before analyzing their sugar and organic acids content by HPLC (Rienth et al. 2014). O<sub>2</sub> reduced was continuously measured with an optode (see below) and CO<sub>2</sub> was continuously trapped in 0.2 N NaOH (ca 30 ml), before end point titration with 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Harris et al. 1971).

### *Measurement of O<sub>2</sub> uptake in detached berry samples*

The study was done under darkness at different temperatures (15, 20, 25, 35, 45°C) (Fig. S3. 1A). Dark conditions were produced by covering the chamber with an aluminum foil.

Oxygen sensor spot was used to measure O<sub>2</sub> consumed by berries (Four Channels Oxy4 oxygen meter, Optode PreSens Precision Sensing GmbH, Germany). O<sub>2</sub> acts as a dynamic fluorescence quencher of dye a specific dye in a polymer matrix. The oxygen sensor spot was stuck onto the inner wall of the respiration chamber and this allowed non-invasive measurements of O<sub>2</sub> content through the glass wall from the outside (detection limit : 0.03% oxygen, 15ppb). Figure (S3. 1B) illustrates a typical example of long a term experiment. The validity and accuracy of the basic principle of the optodes have been amply demonstrated (Gatti et al. 2002; Holst et al. 1997; Irwin et al. 2007).

#### *Measurement of respiration of Individual berries attached to the vine*

The study was conducted with berries of potted microvines of genotype ML1 cl.7, that was regenerated through somatic embryogenesis from cv. 'Pinot Meunier' clone 817 (Torregrosa 1998), during 2015. Plants were grown in greenhouse under controlled conditions (Temperature: 25-15°C; photoperiod: 14h; Vapour-Pressure deficit (VPD): 1kPa). Individual berries were isolated upon eliminating the neighbor ones on clusters, in order to allow the rachis to cross the cap of homemade individual respiration chambers (Supplementary Fig. S3. 2). Tightness of the seal was ensured with rubber and silicon grease. The air volume around the berry was reduced to ca 35 ml with glass beads, as precisely measured at the end of the experiment, in order to decrease the duration of the experiment. 5 ml of 0.2 N NaOH were placed at the bottom of the device as a CO<sub>2</sub> trap.

#### *Control Samples*

The softening dates of 500 random berries (cv. Syrah) from the Montpellier Supagro experimental vineyard were determined manually, by a light pressure by the thumb and forefinger, taking all care to avoid destruction of berry tissues (Lund et al. 2008). These softening dates were indicated with colored plastic rings in order that each individual berry could be sampled at known durations after softening (DAS). Thirty berries were periodically harvested with a 3- 4 days sampling period, weighted and then stored at -80°C until analysis. After 20 DAS, the sampling period was increased to one week.

#### *Sugar and organic acids analyses*

To determine sugar and organic acids, samples were diluted 5 times at least in water, heated (120°C for 20 min) and subsequently homogenized and rediluted with “600 μmol acetate L<sup>-1</sup>



(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.0125N” as internal standard. Following HPLC protocol was described in Rienth et al. (2014).

## **Results and discussion**

### *Sugar import and malate breakdown in synchronized ripening berries*

PCA (Principal Components Analysis) on microarray or RNAseq transcriptomic data showed that most changes in gene expression during berry development occur during the short softening period that signals the onset of sugar accumulation, or ripening (Terrier et al. 2005; Rienth et al. 2016). While a single berry softens within a few days (Coombe 1992), the process spans over 2 to 3 weeks when considering the average population in the experimental plot, illustrating how low and variable berry synchronicity can be (Robin et al. 1997; Lund et al. 2008). Such a marked delay between berries jeopardizes time resolution in usual, unsorted berry samples in which hard and green berries accumulating malic acid are mixed with soft ones oxidizing malate and accumulating considerable amounts of sugars (Rienth et al. 2016; Castellarin et al. 2016; Shahood et al. submitted). Moreover, the proportion of berries at different physiological stages continuously changes in sequential samples, resulting in more vicious statistical bias, like the emergence at the population level of some properties that are never encountered in single berries. In obiter, totally overlooked variations in population structure may affect reproducibility of experiments between labs. There is thus urgent need to revisit the fundamental of berry development at the single fruit level.

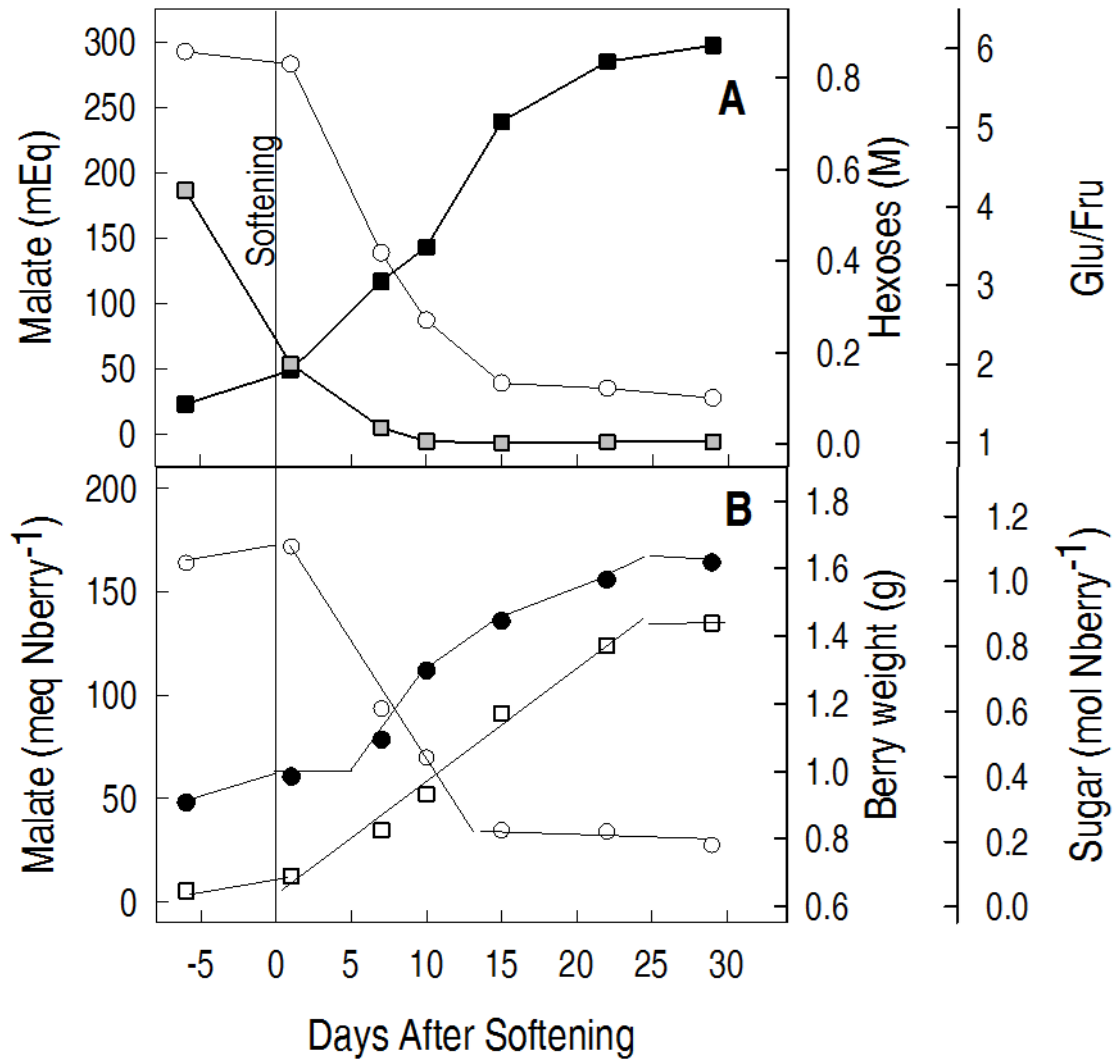


Figure 3.1. Berry development as a function of days after softening. Each sample corresponds to average berries sorted by density. (A): Concentration of malate (open circles), Glucose + Fructose (closed squares), Glucose/fructose ratio (gray squares), (B) Amount per theoretical berry: malate (open circles), Glucose + Fructose (open squares), berry weight (closed circles). Amount per theoretical berry was calculated as amount per berry x 1000/1.6, in order to represent an ideal fruit of 1 Kg at max volume (day 25).

Usual sequential samples of Syrah berries were sorted according to density in NaCl solutions, and the most representative class was retained (Singleton et al. 1966), following the first sample that included only hard berries in green stage. Incrementing the NaCl solution by 10 g L<sup>-1</sup> steps allowed sorting berries with an accuracy better than  $\pm 0.05$  M hexose (Supplementary Fig. 3. S3). This sorting procedure resulted in an accelerated developmental pattern fully compatible with the one observed in single fruits (Fig. 3. 1; Shahood et al. submitted): sugar accumulation and malate breakdown started five days earlier than growth resumption following berry softening. Hexose accumulation was abruptly set at ca 22-38  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{Nberry}^{-1}$ , and a 0.9M hexose concentration was reached in ca 25 days after softening (Fig. 3. 1), with an approximate doubling of the berry weight since the end of herbaceous plateau (end phase II). The trigger of hexose accumulation in the ripening fruit marks a dramatic activation of phloem mass flow (Greenspan et al. 1996), shifting from the symplasmic to the apoplasmic pathways (Chatelet et al. 2008a; Chatelet et al. 2008b; Choat et al. 2009; Patrick 1997; Zhang et al. 2006), and associated with a parallel impairment and possible inversion of xylem flow (Cuéllar et al. 2013; Ollat and Gaudillere 2000; Keller and Shrestha 2014; Keller et al. 2015; Zhang and Keller 2017). Malate breakdown ( $-4 \mu\text{mol malate min}^{-1} \text{Nberry}^{-1}$  on average) was terminated in two weeks only.

#### *Effect of temperature and developmental stage on berry respiration*

Fundamental results on berry respiration were then re-evaluated on synchronized berries, leading to unprecedented time resolution. Results showed that fruit ripening is accompanied by marked changes in Electron transport rate (ETR), respiratory quotient (RQ= CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>) and in the activation energy of ETR. Respiration displayed a minor peak at berry softening, followed by a fast 10-20 % decrease that coincided with the malate breakdown period. The RQ of berries rich in malic acid, hard and green ones at herbaceous plateau and those of soft fruits having just started to accumulate hexose as well, was only moderately affected by temperature up to 45 °C, and was globally consistent with the use of malic acid as respiratory substrate (RQ = 1.33) (Fig. 3. 2), as verified by the disappearance of malic acid during the time course of respiration experiment (Fig. S3. 4), (considering the equation system (1) and (2) in supplementary Annex 1). It can be inferred that the duration of malate breakdown would shift from nine days to one week when temperature increases from 20 to 25 °C (Supplementary Fig. S3. 5), which is faster than the rate of malate breakdown actually observed on berries in the vineyard (Fig. 3. 1B), as will be discussed later.

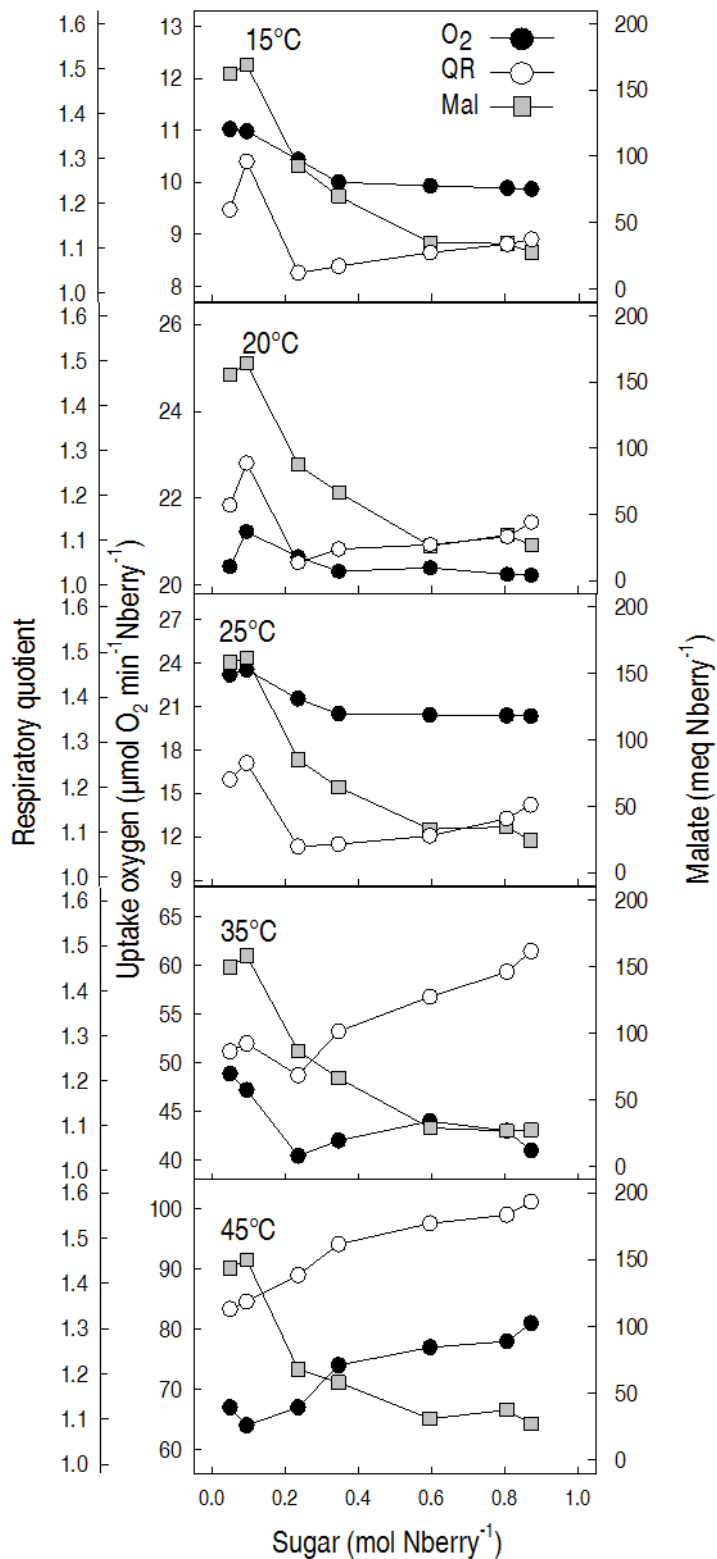


Figure 3. 2. Impact of temperature on respiratory metabolism as a function of sugar accumulation. Each sample, except the first one, corresponds to homogeneous, density sorted berries, as described in Fig. 1.

For temperature strictly below 35°C, the RQ of ripening berries quite abruptly decreased below 1.1 one week after softening, at which time vacuolar hexose concentration was already in fivefold excess with respect to malic acid (Fig. 3. 1A). Malic acid reached its minimal threshold and no longer disappeared during the respiration experiment less than two weeks after softening, however the RQ moderately increased while remaining lower than 1.2 till the completion of the sugar loading process. The RQ of ripening berries dramatically increased above 1.33 at 35°C and 45 °C, and even exceeded 1.5 in the more ripe fruit sample, still without any measurable loss of malic acid, indicating the aerobic fermentative pathways was progressively activated (Fig. 3. 2, Supplementary Fig. S3. 6C). One shall notice that 45°C is a physiologically relevant temperature for developing berries directly exposed to solar irradiance (Haselgrove *et al.*, 2000, Reshef *et al.*, 2017).

Present results show that detached berries simply use the major substrate present in their vacuole as energy source, depending on developmental stage (Supplementary Fig. S3. 6). This obvious conclusion does not confirm the central dogma that green berries would oxidize hexose in green stage and shift to malate following the activation of ripening (Harris *et al.* 1971; Koch and Alleweldt 1978; Ribéreau-Gayon and Peynaud 1971). The RQ of developing berries did not immediately increase following the inception of ripening as stated in Harris *et al.* (1971) and Kriedemann (1968), on the contrary it decreased simultaneously with malic acid concentration as sugars increased. As a matter of fact, QR greater than 1 at green stage is quite commonplace in the literature, and an uncommented transient decrease in RQ was even reproducibly observed following the inception of ripening (25°C: Fig. 2 in Koch and Alleweldt (1978) and 30°C: Fig 1-3 in Harris *et al.* (1971)). It must be stressed that the timing of the previously reported changes in RQ remained noticeably imprecise because green berries still accumulating malic acid and ripening berries accumulating sugars and virtually depleted in malic acid, but showing elevated RQ due to aerobic fermentation, coexisted in these usual samples at the so-called véraison stage and thereafter (Rienth *et al.* 2016; Shahood *et al.* submitted). RQ (ca. 1.33) observed at the inception of ripening and malate disappearing from fruits during the respiration measurements confirmed that the contribution of malate to respiration is maximal at this stage, which was not so clear on recent experiments in unsorted berries at uncontrolled temperature (Famiani *et al.* 2014; Famiani *et al.* 2016). Malic acid reached a minimal threshold below 20 mM before the end of the sugar loading process; such an amount would be depleted in less than one day, if used as a unique substrate as suggested by elevated RQ. Only sugars are available in the late ripening process, so RQ in excess to 1 can be only explained by the co-occurrence of respiration and aerobic fermentation of hexose,

as already shown in ripe berries (Romieu et al. 1992; Tesnière et al. 1994; Terrier et al. 1996). Measurements of O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and malate allowed to recalculate ethanol production with respect to temperature and developmental stage (Supplementary Fig. S3. 6C, Annex 3.1). Ethanol displayed a 12h turn-over in ripening fruits attached to the vine (Terrier et al. 2005). These authors suggested that malate fermentation would represent a H<sup>+</sup> scavenging reaction allowing malic acid released from the vacuole to transiently exceeds its oxidation or gluconeogenesis during stress. As a matter of fact, fermentation did not seem to occur at significant rate in samples where malate breakdown was maximal, even at quite elevated temperature, but developed when berries reached their maximal volume and sugar content. Cyt C oxidase would operate close to saturation at this stage (Romieu et al. 1992), or be limited by O<sub>2</sub> diffusion in the core of the fruit. Induction of ripening is accompanied by marked changes in the relative expression of ADH isogenes (Tesnière and Verries 2000), with a marked tissue specificity at over-ripe stages (> 1M hexoses) (Cramer et al. 2014). This suggests redox shuttle may exist between flesh and skin, whatever, further work is needed in order to understand the function of aerobic fermentation in grape and in other fleshy fruits.

#### *Activation energy of O<sub>2</sub> reduction decreases during berry ripening*

Activation energy (E<sub>a</sub>) and its dependence on temperature was calculated from ETR according to the three parameters exponential model developed by Kruse and Adams (2008), who modified the classical Arrhenius equation to account for the dynamic response of E<sub>a</sub> to measurement temperatures on plant leaves (Fig. 3. 3A). This mechanistic model provides the same predictive power than more abstract, empirical models (Adams et al. 2016). ETR activation energy at 25°C shifted from 68 to 56 kJ mol<sup>-1</sup> between acidic berries oxidizing malic acid, and those using hexoses as a major energy source (Fig. 3. 3B, Table 3. 1). The absolute value of the dynamic response to temperature ( $\delta$ ) was also reduced consistently with the correlation observed between E<sub>a</sub> and  $\delta$  on other plant materials (Supplementary Fig. S3. 7; Kruse and Adams 2008). Mitochondrial ETR can be distributed between two terminal oxydases in superior plants, cytochrome oxydase (COX) and alternative oxydase (AOX) (Buchanan, Grissem and Jones 2000; Kruse and Adams 2008; Kruse et al. 2011). According to this last author, COX inhibition by cyanide negatively and positively affects E<sub>a</sub> and  $\delta$ , respectively, exactly as observed when berries shifted from malic acid to hexose oxidation, suggesting that AOX would become prevalent during ripening.

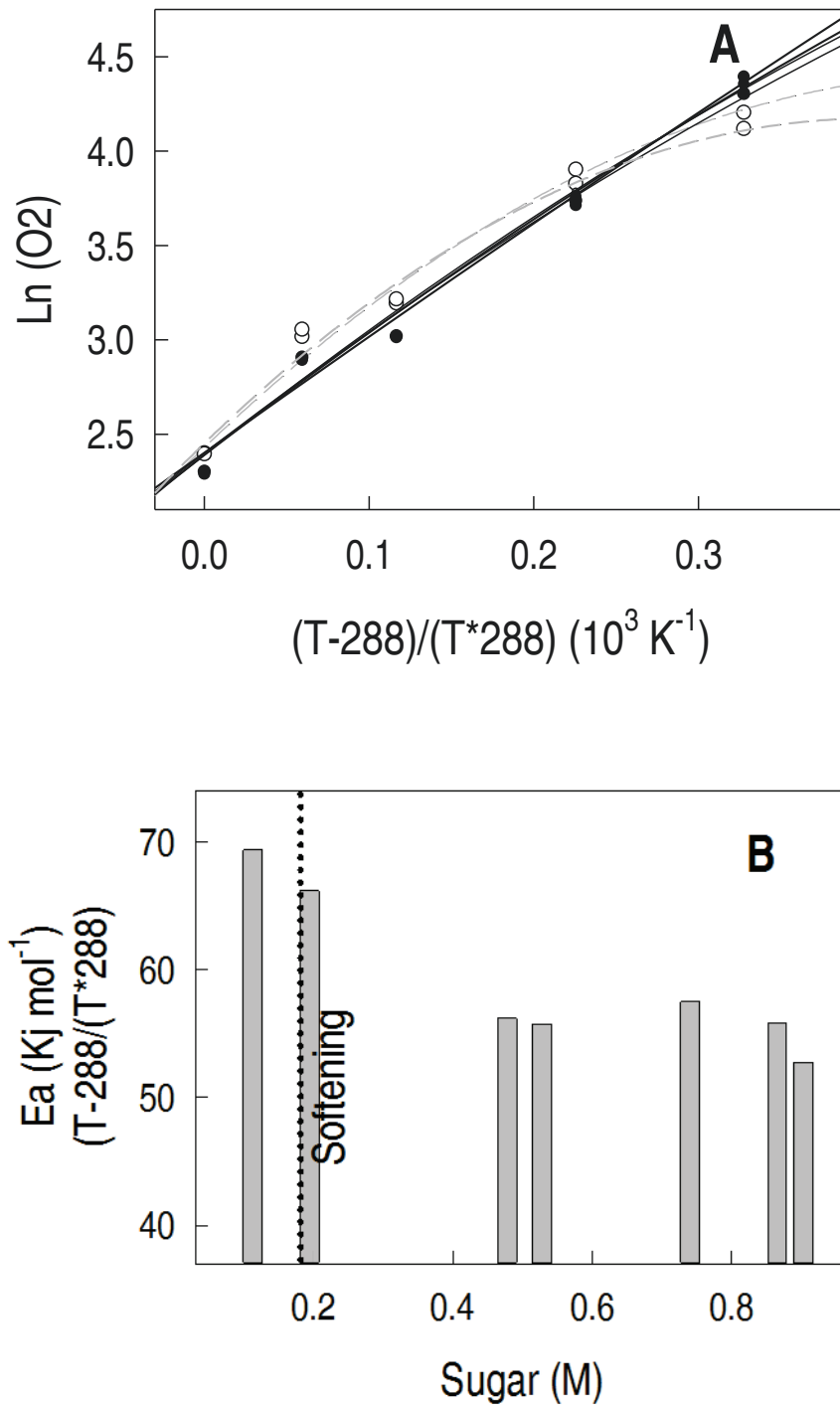


Figure 3.3. Impact of temperature on respiration of homogenous berries samples during development: (A) Arrhenius like plots fitted to the 2<sup>nd</sup> order function described by Kruse et al. (2008), using a 15 °C reference. (B) 25°C Activation energy as a function of sugars concentration, (ANOVA:  $P < 0.001$ ).

Table 3. 1. Change in 25 °C activation energy of O<sub>2</sub> reduction (E<sub>a</sub>) and in dynamic response of E<sub>a</sub> to temperature ( $\delta$ ) during berry development. A 15 °C reference is considered, as in Kruse et al. (2008) vacuolar proton motive force :  $n \cdot \Delta\mu H^+$  where n = stoichiometric efficiency of V-ATPase, calculated as in Lobit et al. (2006).

Sugar (M)	pH	$\delta$ ( $10^3 K^2$ ) (288 K)	E <sub>a</sub> (Kj mol <sup>-1</sup> ) (298 K)
0.09	2.7	-8.8	69
0.16	2.7	-8.5	66
0.36	2.8	-4.4	56
0.43	2.9	-2.9	56
0.71	3.2	-3	57
0.84	3.4	-2.3	56
0.87	3.5	-0.7	52

The parameters E<sub>a0</sub> and  $\delta$  and E<sub>a</sub> were calculated from a modified Arrhenius equation as that demonstrated by Kruse et al (2008).



However, such a ripening related induction of AOX seems rather unlikely in this non-climacteric fruit: AOX is encoded by a small multigene family in *V. vinifera* (Costa et al. 2009) and reexamination of previous mRNAseq data (Rienth et al. 2016) showed no obvious ripening related induction of the VvAox 1 or 2 genes, even if VIT\_202s0033g01400 (vvAox) exhibited a marked induction with temperature. In addition, mitochondria extracted from mature berries exhibited rather tight respiratory controls and negligible AOX activity (Romieu and Flanzy 1988; Romieu et al. 1992). Although further studies on mitochondria purified from synchronized berries are needed in order to definitively rule out a post transcriptional activation of AOX during the transient malate breakdown period, strict control of ETR by ATP demand in a coupled system makes possible that changes in  $E_a$  could reflect modifications in ATP demand and  $\Delta G_{ATP}$  in the ripening fruit, rather than changes in respiratory complexes. Malate breakdown and sugar accumulation triggered by ripening are actually accompanied by increased energy transduction at the tonoplast (Terrier et al. 2001), by pronounced changes in gene expression and protein synthesis, and possibly, by extra energy needs for sugar import and storage themselves (Supplementary Fig. S3. 8, see discussion below). In green stage, tonoplast membrane is virtually impermeable to  $H^+$ , so an energy failure does not result in immediate release of vacuolar acidity in the cytoplasm, and the system apparently allows V-ATPase and  $H^+$  PPIase to reach quasi-thermodynamic equilibrium at a vacuolar pH ( $pH_v$ ) of 2.5. This  $pH_v$  below the  $pK_a$ s of malate alleviates the retro-inhibition of anion and  $H^+$  transports as both transported species recombine in the vacuolar lumen, trapping organic acid in the vacuole (Martinoia et al. 2007). This very particular context is lost during ripening: leaks partly compensated by increased  $H^+$  pumping capacity (futile recycling) develop, so malic acid is massively released in the cytosol (Terrier et al. 2001) and  $pH_v$  progressively increases up to 3.5. The simplified fruit acidity model of Lobit et al. (2006) based on thermodynamic control by V-ATPase raises the possibility that such increase in  $pH_v$  during berry ripening could simply result from the impairment of  $\Delta G_{ATP}$  from -68 to -56 kJ (Supplementary Fig. S3. 9). The transduction function for ADP stimulation of mitochondrial ATP synthesis (Jeneson et al. 2009; Roberts et al. 1985) shows that OXPHOS shifts from thermodynamic equilibrium to its maximal rate in this range of  $\Delta G_{ATP}$ , so the evolution of berry acidity during ripening presents strong analogies with a progressive stage IV-stage III transition, except that conversely to what expected under such circumstance, the ETR diminishes.

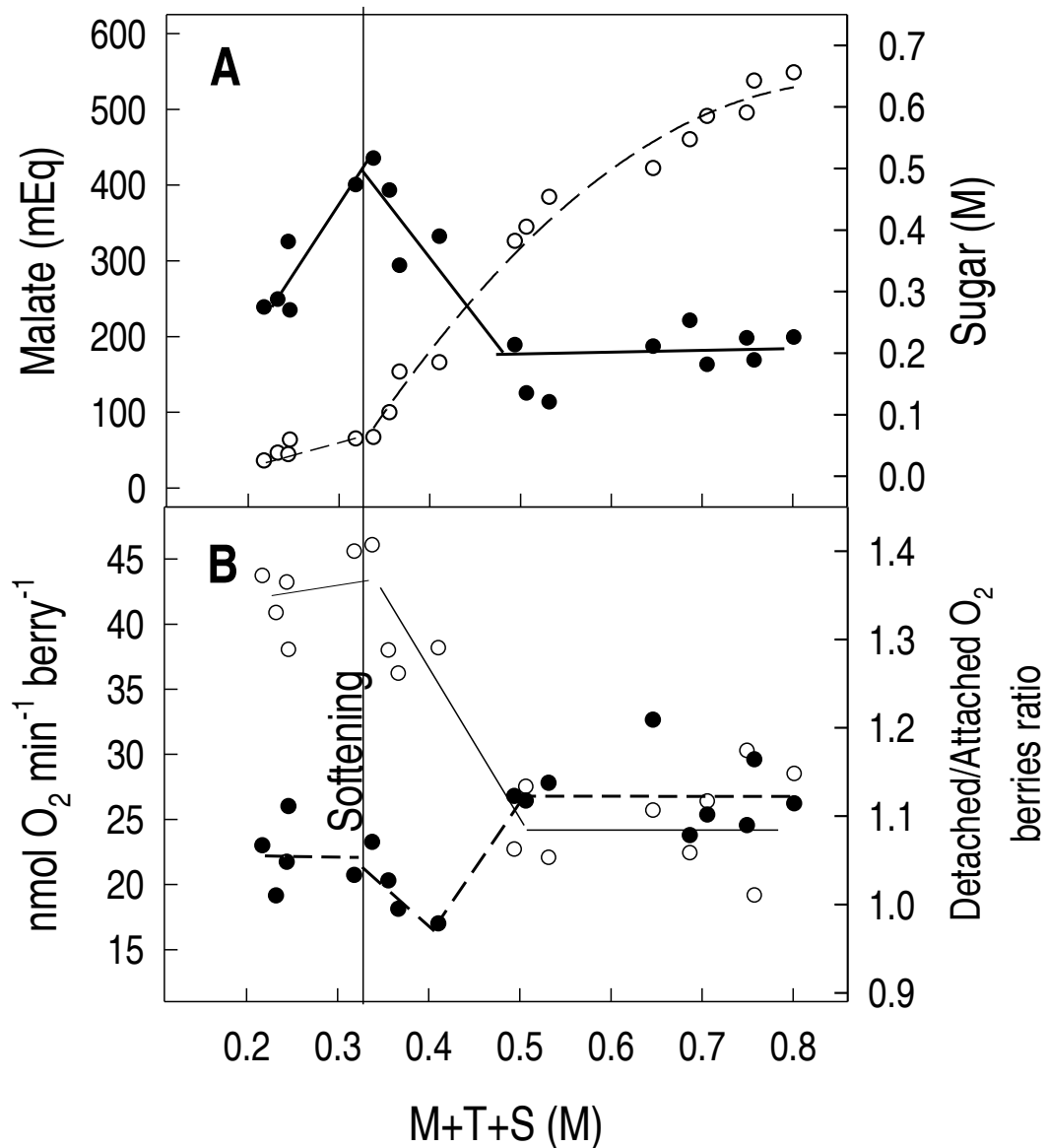


Figure 3.4. Respiratory flux of single berries at 25°C (A) Malate (closed circles) and sugar (open circles) (B)  $\text{O}_2$  uptake of attached berries (open circles) and detached/attached berry  $\text{O}_2$  uptake ratio (closed circles).  $M+T+S$  : total solute concentration, malate plus tartrate plus sugar.

A first task would be to check which changes affect major respiratory complexes during berry development. Moreover, Lobit's model based on V-ATPase thermodynamic control of fruit acidity was elaborated before PH5-like H<sup>+</sup>-ATPase orthologs were identified as more electrogenic H<sup>+</sup> pumps on plant tonoplast (Faraco et al. 2014; Li et al. 2016). This model would thus hold in sweet lime which only bear the classical V-ATPase but would clearly be inappropriate in acidic lime (pH<sub>v</sub>= 2.1) which exhibits a totally vanadate sensitive H<sup>+</sup>-ATPase (Brune et al. 2002). The VviAHA10 ATPase gene expressed in green stage is progressively inhibited during berry ripening (Rienth et al. 2016), unfortunately the corresponding Vanadate sensitive ATPase activity was erroneously taken as a contaminant. Whatever, intense bafilomycin sensitive V-ATPase and PPIase hydrolytic and vectorial activities were confirmed in berries at all stages (Terrier et al. 1998) so the model seems tenable, more particularly during ripening. The quantitative correspondence between the  $\Delta\mu_{H^+}$  "sensed" as a  $\Delta G_{ATP}$  by V-ATPase and ETR activation energy remains extremely puzzling. In addition, berry propensity to aerobic fermentation noticeably increased in the more ripe berries, when  $E_a$  of 56 kJ mol<sup>-1</sup> threshold was reached, exactly as would be expected for  $\Delta G_{ATP}$ , when cytochrome C oxidase is poisoned or O<sub>2</sub> limited (Roberts et al. 1985), which constitutes a second coincidence between  $E_a$  and expected  $\Delta G_{ATP}$ .

ETR comparison with sugar accumulation rate shows that a ripening berry would accumulate 8 hexoses while oxidizing one, or accumulate 1 hexose while 3.7 ATP should be regenerated by OXPHOS (An in vivo P/O of 2.5 (Nath 2016) can be reasonably accepted, as P/O of 2.07±0.2 was experimentally obtained in presence of pyruvate plus malate (Romieu et al. 1992)). Energy needed for intense sugar loading through the apoplastic pathway that is activated at véraison (Zhang et al. 2006) depends on the precise organization of this pathway. It should exceed 1 ATP/hexose, if cell wall invertase and H<sup>+</sup>/hexose symporters and antiporters predominate at the plasma and vacuolar membrane interfaces (Supplementary Fig. S3 .8). Previous experiments on detached berries not only forced the fruit to use its prevalent vacuolar substrates instead than imported photoassimilates as respiratory substrates, they also suppressed sugar import and accumulation as potentially major energy demanding pathways, possibly impacting QR and ETR as the measured variables. We therefore directly measured respiration on attached fruits, a difficult task to be efficiently bypassed by modeling in order to elucidate the underlying mechanisms (Colombié et al. 2017).

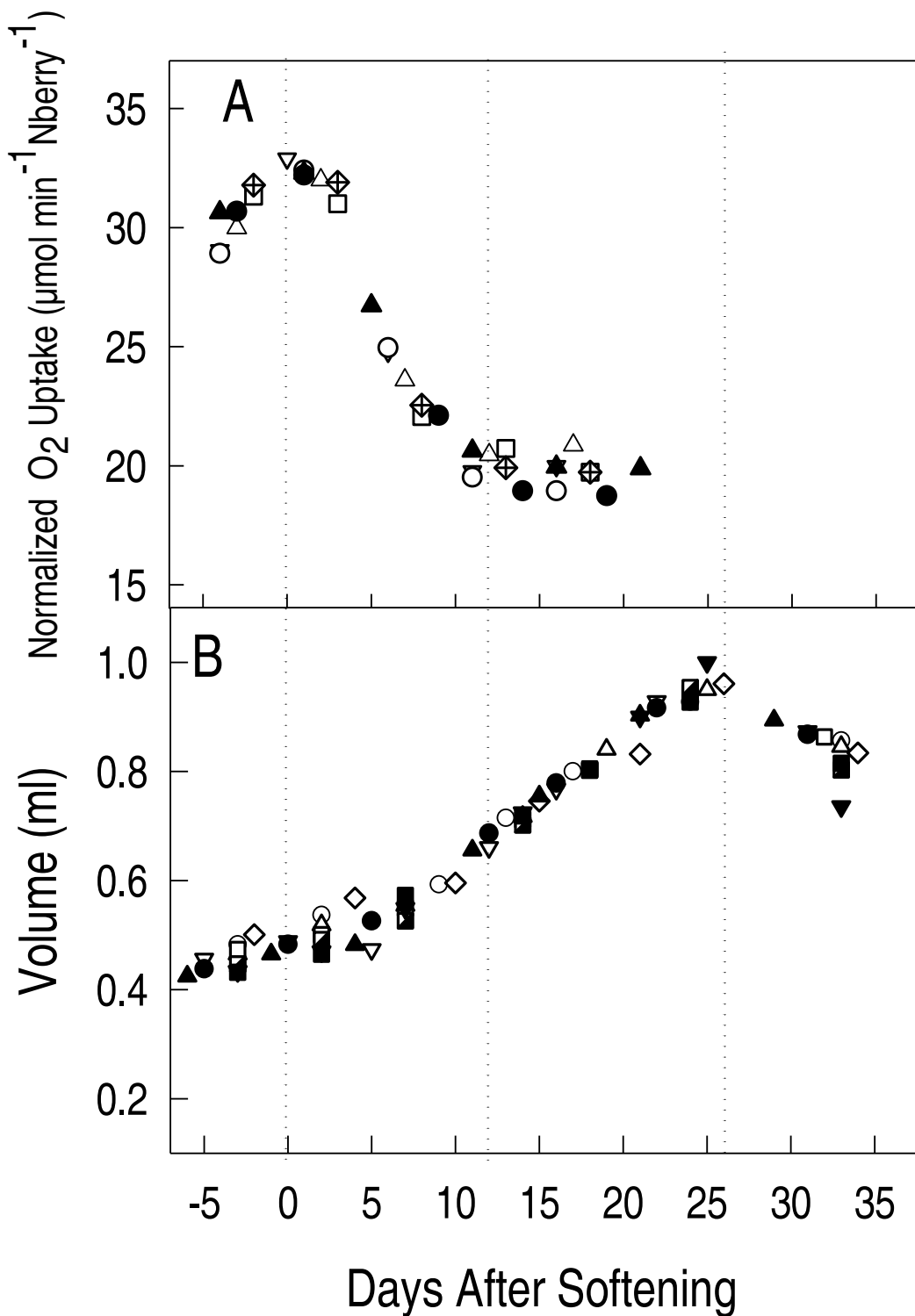


Figure 3. 5. (A) Normalized O<sub>2</sub> uptake at 25°C and (B) normalized growth of attached ML1 microvine berry, as a function of days after softening (DAS). Each symbol represents one berry at different time intervals. Note that berries shrivel after 25 DAS.

*Energy efficiency of photoassimilate partitioning in developing berries.*

The respiratory cost of phloem unloading in single berries was estimated upon sequential measurements of respiration in a set of attached and detached berries, before precise *a posteriori* determination of developmental stage on each individual. Pre-veraison berries still accumulating malic acid (220-410 mEq) at very low sugar concentration (< 0.1 M) were examined, together with veraison berries at the onset of sugar loading and malate breakdown, and more ripe berries reaching 0.65 M hexose, which is significantly below the 0.9 M sugar threshold at which phloem unloading and growth definitively stops (ripe stage) (compare Fig. 3. 4A and Fig. 3. 1 A). Conversely to what expected if the activation of sugar loading in berries was associated with increased energy needs and respiration, the ETR of attached berries was 45 to 50 % impaired as sugar import was set at maximal rate (Fig. 3. 4 B). ETR was more clearly related to the endogenous malic acid content or vacuolar pH, than to the intensity of sugar loading in berries (Fig. 3. 4, Supplementary Fig. S3. 10). Moreover, suppression of phloem unloading upon separating the fruit from the plant led to a quite systematic ETR activation that reached 10 to 20 % during the ripening period, when sugar import rate was maximal (Fig. 3. 4B). Although micro titration led to imprecise CO<sub>2</sub> measurements on single berries since RQ displayed erratic variations in the 1-1.4 range, the RQ of detached berries was systematically 5-20 % higher than that of attached ones, consistently with a greater availability of cytoplasmic sugars for respiration when phloem unloading was active. This confirms our initial observation that malate breakdown was somewhat activated in detached berries, when compared to berries fed with translocated sugars on the vine. Rienth et al. (2016) put forward that the nature of berry respiratory substrate would critically depend on the relative intensities of sugar phloem unloading and vacuolar storage, since malate breakdown was noticeably delayed on vines grown at low temperature, which globally lowered respiratory losses and improved starch reserve in the canopy (Luchaire et al. 2017). ETR was then measured periodically on the same berry during the 25 days ripening period while growth was estimated by image analysis (Fig. 3. 5, Supplementary Fig. S3. 11). Normalization of berry maximal volume and resynchronization of the individual growth patterns, that was not possible in previous experiment where berries were extracted before maximal volume was reached, led to extremely reproducible developmental patterns, as was the case for ETR, showing a respiratory peak at softening followed by a 45% inhibition in less than two weeks (Fig. 3. 5 A, B).

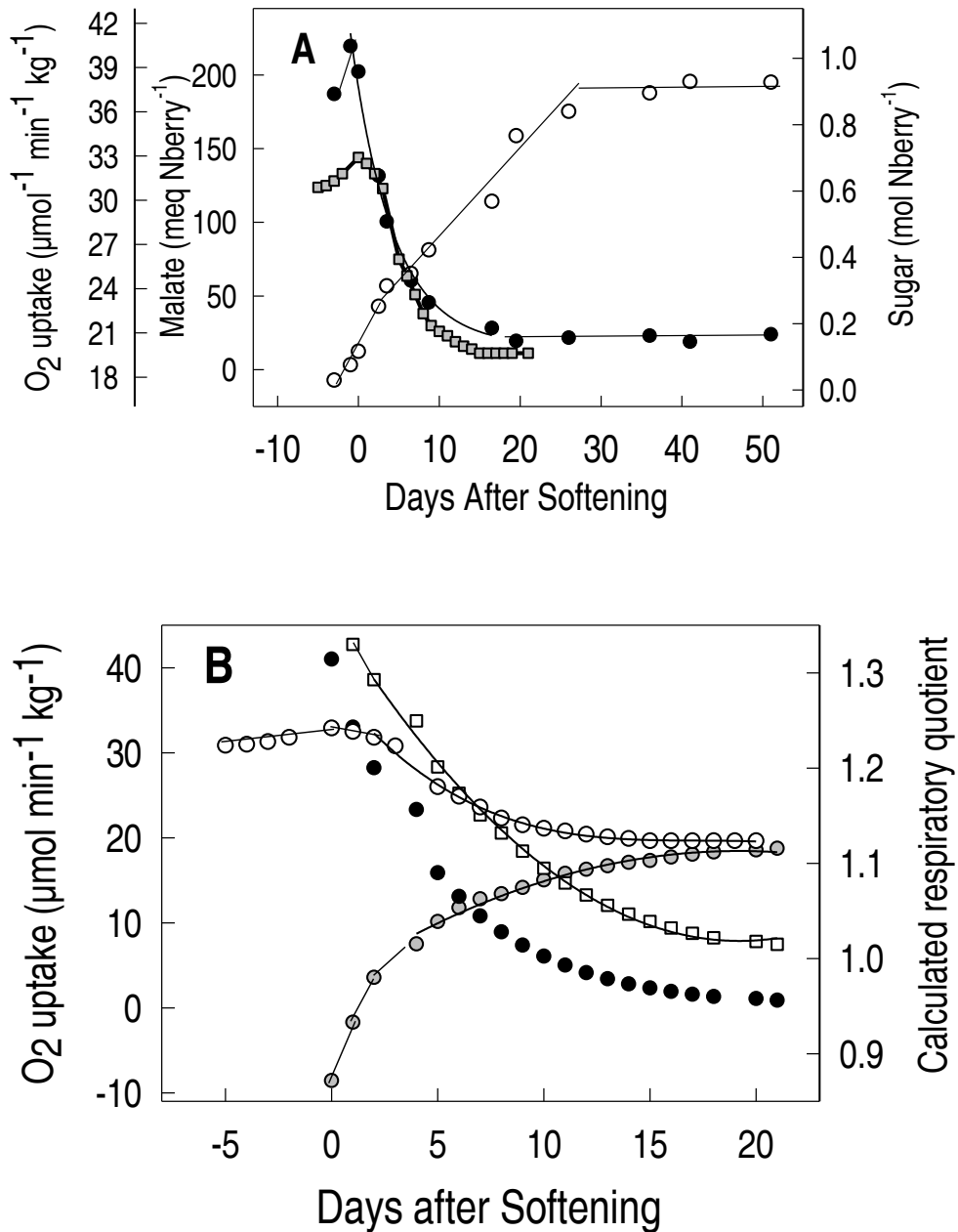


Figure 3. 6. Respiratory flux and change in respiratory substrate in the developing berry as a function of days after softening. (A): Malate breakdown (closed circle), sugar accumulation (open circle) and O<sub>2</sub> uptake (gray squares). Points after 0 DAS represent average berries with the same individual softening dates (B) Overall respiration (open circles), calculated glycolytic flux (gray circles), oxidation of malic acid (closed circles) and calculated respiratory quotient (open squares) as a function of day after softening.

The increase in respiration seemed to precede the activation of phloem unloading and malate breakdown, moreover, berry growth and hexose accumulation persisted for an additional two weeks period following the inhibition of respiration (Fig. 3. 5; Fig. 3. 6A; Shahood et al. submitted). This experiment confirmed the uncoupling between respiration and sugar loading. Late ripening berries accumulated ca 22  $\mu\text{mol hexose min}^{-1} \text{Nberry}^{-1}$  while reducing 20  $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{Nberry}^{-1}$ , indicating that ca 11 % imported sugars serves as energy source at this stage. Taking into account the effective rate of malate breakdown in single berry (Shahood et al. submitted) allowed inferring the respective use of malic acid and hexoses in ripening berries (Fig 3. 6). Malate synthesis is virtually terminated five days before the onset of sugar accumulation and malate breakdown, so ca 5  $\mu\text{mol hexose min}^{-1} \text{Nberry}^{-1}$  would be oxidized, representing the minimal requirement for hexose unloading in berries during green stage, when phloem unloading would be essentially symplasmic. Very abruptly, malate breakdown replaces sugars as respiratory substrate and saturates the oxidative pathway, quite simultaneously with the dramatic activation of the vacuolar storage of hexose. Gluconeogenesis from malate could occur at low rate at this stage only, but sugars rapidly become the major respiratory substrate (Fig. 3. 6B). ETR activation energy would decrease more rapidly than ETR itself, however this should be verified on attached berries, a complicated task. Sugar loading essentially appears as an energetically silent process in ripening berries, which obviously suggests that once the apoplasmic pathway is activated, electro-neutral transporters like SWEETs play a dominant role at the plasma-membrane, when compared to  $\text{H}^+$ -symporters (Chen et al. 2010). At the vacuolar membrane interface, VViHT6 was identified

## References

- Adams MA, Rennenberg H, Kruse J.** 2016. Different models provide equivalent predictive power for cross-biome response of leaf respiration to temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, E5993-E5995.
- Brune A, Muller M, Taiz L, Gonzalez P, Etxeberria E.** 2002. Vacuolar acidification in citrus fruit: comparison between acid lime (*Citrus aurantifolia*) and sweet lime (*Citrus limmetioides*) juice cells. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**, 171–177.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL.** 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland.
- Castellarin SD, Gambetta GA, Wada H, Krasnow MN, Cramer GR, Peterlunger E, Shackel KA, Matthews MA.** 2016. Characterization of major ripening events during softening in grape: turgor, sugar accumulation, abscisic acid metabolism, colour development, and their relationship with growth. *Journal of Experimental Botany* **67**, 709-722.
- Chatelet DS, Rost TL, Shackel KA, Matthews MA.** 2008a. The peripheral xylem of grapevine (*Vitis vinifera*). 1. Structural integrity in post-veraison berries. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1987-1996.
- Chatelet DS, Rost TL, Matthews MA, Shackel KA.** 2008b. The peripheral xylem of grapevine (*Vitis vinifera*) berries. 2. Anatomy and development. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1997-2007.
- Chervin C, Tira-umphon A, Terrier N, Zouine M, Severac D, Roustan J-P.** 2008. Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Plant Physiology* **134**, 534-546.
- Choat B, Gambetta GA, Shackel KA, Matthews MA.** 2009. Vascular Function in Grape Berries across Development and Its Relevance to Apparent Hydraulic Isolation. *Plant Physiology* **151**, 1677-1687.
- 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.
- Colombié S, Beauvoit B, Nazaret C, Bénard C, Vercambre G, Le Gall S, Biais B, Cabasson C, Maucourt M, Bernillon S, Moing A, Dieuaide-Noubhani M, Mazat J-P,**



- Gibon Y.** 2017. Respiration climacteric in tomato fruits elucidated by constraint-based modeling. *New Phytologist* **213**, 1726-1739.
- Coombe B, Bishop G.** 1980. Development of the grape berry. II. Changes in diameter and deformability during veraison. *Australian Journal of Agricultural Research* **31**, 499-509.
- Coombe BG.** 1987. Distribution of Solutes within the Developing Grape Berry in Relation to Its Morphology. *American Journal of Enology and Viticulture* **38**, 120-127.
- Coombe BG.** 1992. Research on Development and Ripening of the Grape Berry. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**, 101-110.
- Costa JH, De Melo DF, Gouveia Z, Cardoso HG, Peixe A, Arnholdt-Schmitt B.** 2009. The alternative oxidase family of *Vitis vinifera* reveals an attractive model to study the importance of genomic design. *Plant Physiology* **137**, 553-565.
- Cramer GR, Ghan R, Schlauch KA, Tillett RL, Heymann H, Ferrarini A, Delledonne M, Zenoni S, Fasoli M, Pezzotti M.** 2014. Transcriptomic analysis of the late stages of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) berry ripening reveals significant induction of ethylene signaling and flavor pathways in the skin. *BMC Plant Biology* **14**, 370.
- Cuéllar T, Azeem F, Andrianteranagna M, Pascaud F, Verdeil J-L, Sentenac H, Zimmermann S, Gaillard I.** 2013. Potassium transport in developing fleshy fruits: the grapevine inward K<sup>+</sup> channel VvK1.2 is activated by CIPK–CBL complexes and induced in ripening berry flesh cells. *The Plant Journal* **73**, 1006-1018.
- Famiani F, Farinelli D, Frioni T, Palliotti A, Battistelli A, Moscatello S, Walker RP.** 2016. Malate as substrate for catabolism and gluconeogenesis during ripening in the pericarp of different grape cultivars. *Biologia Plantarum* **60**, 155-162.
- Famiani F, Farinelli D, Palliotti A, Moscatello S, Battistelli A, Walker RP.** 2014. Is stored malate the quantitatively most important substrate utilised by respiration and ethanolic fermentation in grape berry pericarp during ripening? *Plant Physiology and Biochemistry* **76**, 52-57.
- Famiani F, Walker RP, Técsi L, Chen Z-H, Proietti P, Leegood RC.** 2000. An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *Journal of Experimental Botany* **51**, 675–683.
- Faraco M, Spelt C, Bliet M, Verweij W, Hoshino A, Espen L, Prinsi B, Jaarsma R, Tarhan E, de Boer Albertus H, Di Sansebastiano G-P, Koes R, Quattrocchio Francesca M.** 2014. Hyperacidification of Vacuoles by the Combined Action of Two Different P-ATPases in the Tonoplast Determines Flower Color. *Cell Reports* **6**, 32-43.

- 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.
- Gatti S, Brey T, Müller W, Heilmayer O, Holst G.** 2002. Oxygen microoptodes: a new tool for oxygen measurements in aquatic animal ecology. *Marine Biology* **140**, 1075-1085.
- Harris JM, Kriedemann PE, Possingham JV.** 1971. Grape berry respiration: Effects of metabolic inhibitors. *Vitis* **9**, 291-298.
- Haselgrove L, Botting D, van Heeswijck R, HØJ PB, Dry PR, Ford C, Land PGI.** 2000. Canopy microclimate and berry composition: The effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L cv. Shiraz grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 141-149.
- Hedrich R, Sauer N, Neuhaus HE.** 2015. Sugar transport across the plant vacuolar membrane: nature and regulation of carrier proteins. *Current Opinion in Plant Biology* **25**, 63-70.
- Holst G, Glud RN, Kühl M, Klimant I.** 1997. 3rd European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors A microoptode array for fine-scale measurement of oxygen distribution. *Sensors and Actuators B: Chemical* **38**, 122-129.
- Irwin S, Wall V, Davenport J.** 2007. Measurement of temperature and salinity effects on oxygen consumption of *Artemia franciscana* K., measured using fibre-optic oxygen microsensors. *Hydrobiologia* **575**, 109-115.
- Jeneson JAL, Schmitz JPJ, van den Broek NMA, van Riel NAW, Hilbers PAJ, Nicolay K, Prompers JJ.** 2009. Magnitude and control of mitochondrial sensitivity to ADP. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **297**, E774-E784.
- Kanellis AK, Roubelakis - Angelakis KA.** 1993. Grape. In: Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA, eds. *Biochemistry of Fruit Ripening*. Dordrecht: Springer Netherlands, 189-234.
- Keller M, Shrestha PM.** 2014. Solute accumulation differs in the vacuoles and apoplast of ripening grape berries. *Planta* **239**, 633-642.
- Keller M, Zhang Y, Shrestha PM, Biondi M, Bondada BR.** 2014. Sugar demand of ripening grape berries leads to recycling of surplus phloem water via the xylem. *Plant Cell Environ* **38**, 1048-1059.
- Koch R, Alleweldt G.** 1978. Der Gaswechsel reifender Weinbeeren. *Vitis* **17:30-44**. Kliewer.
- Kriedemann P.** 1968. Observations on Gas Exchange in the Developing Sultana Berry. *Australian Journal of Biological Sciences* **21**, 907-916.

- Kruse J, Adams MA.** 2008. Three parameters comprehensively describe the temperature response of respiratory oxygen reduction. *Plant Cell Environ* **31**, 954-967.
- Kruse J, Rennenberg H, Adams MA.** 2011. Steps towards a mechanistic understanding of respiratory temperature responses. *New Phytologist* **189**, 659-677.
- 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.
- Li Y, Provenzano S, Bliet M, Spelt C, Appelhagen I, Machado de Faria L, Verweij W, Schubert A, Sagasser M, Seidel T, Weisshaar B, Koes R, Quattrocchio F.** 2016. Evolution of tonoplast P-ATPase transporters involved in vacuolar acidification. *New Phytologist* **211**, 1092-1107.
- Liu M, Gomes BL, Mila I, Purgatto E, Peres LEP, Frasse P, Maza E, Zouine M, Roustan J-P, Bouzayen M, Pirrello J.** 2016. Comprehensive Profiling of Ethylene Response Factor Expression Identifies Ripening-Associated ERF Genes and Their Link to Key Regulators of Fruit Ripening in Tomato. *Plant Physiology* **170**, 1732-1744.
- Lobit P, Genard M, Soing P, Habib R.** 2006. Modeling malic acid accumulation in fruits: relationships with organic acids, potassium, and temperature. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1471-1483.
- Luchaire N, Rienth M, Romieu C, Nehe A, Chatbanyong R, Houel C, Ageorges A, Gibon Y, Turc O, Muller B, Torregrosa L, Pellegrino A.** 2017. Microvine: A New Model to Study Grapevine Growth and Developmental Patterns and their Responses to Elevated Temperature. *American Journal of Enology and Viticulture* **68**, 283-292
- Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE.** 2007. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**, 83-102.
- Nath S.** 2016. The thermodynamic efficiency of ATP synthesis in oxidative phosphorylation. *Biophysical Chemistry* **219**, 69-74.
- Ollat N, Diakou-Verdin P, Carde JP, Barrieu F, Gaudillere JP, Moing A. 2002. Grape berry development: a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* (2002) **36**.
- Ollat N, Gaudillère J.** 2000. Carbon balance in developing grapevine berries. *Acta Horticulturae (International Society for Horticultural Science)* **526**, 345-350.
- Palliotti A, Cartechini A.** 2001. Developmental Changes in Gas Exchange Activity in Flowers, Berries, and Tendrils of Field-Grown Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* **52**, 317-323.

- Patrick JW.** 1997. Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. . Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **48**, 191-222.
- Ribéreau-Gayon J, Peynaud E.** 1971. Trattato di enologia: Edagricole.
- Rienth M, Torregrosa L, Kelly MT, Luchaire N, Pellegrino A, Grimplet J, Romieu C.** 2014. Is transcriptomic regulation of berry development more important at night than during the day? PLoS One **9**, e88844.
- Rienth M, Torregrosa L, Sarah G, Ardisson M, Brillouet J-M, Romieu C.** 2016. Temperature desynchronizes sugar and organic acid metabolism in ripening grapevine fruits and remodels their transcriptome. BMC Plant Biology **16**, 1-23.
- Roberts JKM, Lane AN, Clark RA, Nieman RH.** 1985. Relationships between the rate of synthesis of ATP and the concentrations of reactants and products of ATP hydrolysis in maize root tips, determined by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. Archives of Biochemistry and Biophysics **240**, 712-722.
- Robin JP, Abbal P, Salmon JM.** 1997. Fermeté et maturation du raisin. Définition et évolution de différents paramètres rhéologiques au cours de la maturation. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin **31**, 127- 138.
- Romieu C, FLANZY C.** 1988. Extraction des mitochondries de baies de raisin (*Vitis vinifera*). Plant Physiology and Biochemistry **26**, 589-596.
- Romieu C, Tesniere C, Than-Ham L, Flanzy C, Robin J-P.** 1992. An Examination of the Importance of Anaerobiosis and Ethanol in Causing Injury to Grape Mitochondria. American Journal of Enology and Viticulture **43**, 129-133.
- Ruffner HP, Hawker JS.** 1977. Control of glycolysis in ripening berries of *Vitis vinifera*. Phytochemistry **16**, 1171-1175.
- Singleton VL, Ough CS, Nelson KE.** 1966. Density Separations of Wine Grape Berries and Ripeness Distribution. American Journal of Enology and Viticulture **17**, 95-105.
- Terrier N, Deguilloux C, Sauvage F-X, Martinoia E, Romieu C.** 1998. Proton pumps and anion transport in *Vitis vinifera*: The inorganic pyrophosphatase plays a predominant role in the energization of the tonoplast. Plant Physiology and Biochemistry **36**, 367-377.
- Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barrieu F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Léon C, Renaudin J-P, Dédaldéchamp F, Romieu C, Delrot S, Hamdi S.** 2005. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. Planta **222**, 832-847.

- Terrier N, Romieu C.** 2001. Grape Berry Acidity. In: Roubelakis-Angelakis KA, ed. Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine. Dordrecht: Springer Netherlands, 35-57.
- Terrier N, Sauvage F-X, Ageorges A, Romieu C.** 2001. Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. *Planta* **213**, 20-28.
- Terrier N, Sauvage FX, Romieu C.** 1996. Absence de crise respiratoire, induction de l'activité alcool déshydrogénase et diminution de l'acidité vacuolaire lors de la maturation du raisin. *Oenologie* 95, A. Lonvaud-Funel (Ed.). Tec et Doc Lavoisier, Paris, pp.24-28.
- Tesnière C, Romieu C, Dugelay I, Nicol MZ, Flanzky C, Robin JP.** 1994. Partial recovery of grape energy metabolism upon aeration following anaerobic stress. *Journal of Experimental Botany* **45**, 145-151.
- Tesnière C, Verriès C.** 2000. Molecular cloning and expression of cDNAs encoding alcohol dehydrogenases from *Vitis vinifera* L. during berry development. *Plant Science* **157**, 77-88.
- Thomas TR, Shackel KA, Matthews MA.** 2008. Mesocarp cell turgor in *Vitis vinifera* L. berries throughout development and its relation to firmness, growth, and the onset of ripening. *Planta* **228**, 1067-1076.
- Torregrosa L.** 1998. A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L. *Vitis* **37**, 91-92.
- Zhang X-Y, Wang X-L, Wang X-F, Xia G-H, Pan Q-H, Fan R-C, Wu F-Q, Yu X-C, Zhang D-P.** 2006. A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiology* **142**, 220-232.
- Zhang Y, Keller M.** 2017. Discharge of surplus phloem water may be required for normal grape ripening. *Journal of Experimental Botany* **68**, 585-595.
- Zhu X, Zhang C, Wu W, Li X, Zhang C, Fang J.** 2017. Enzyme activities and gene expression of starch metabolism provide insights into grape berry development. *Horticulture Research* **4**, 17018.

## Supplementary Data:

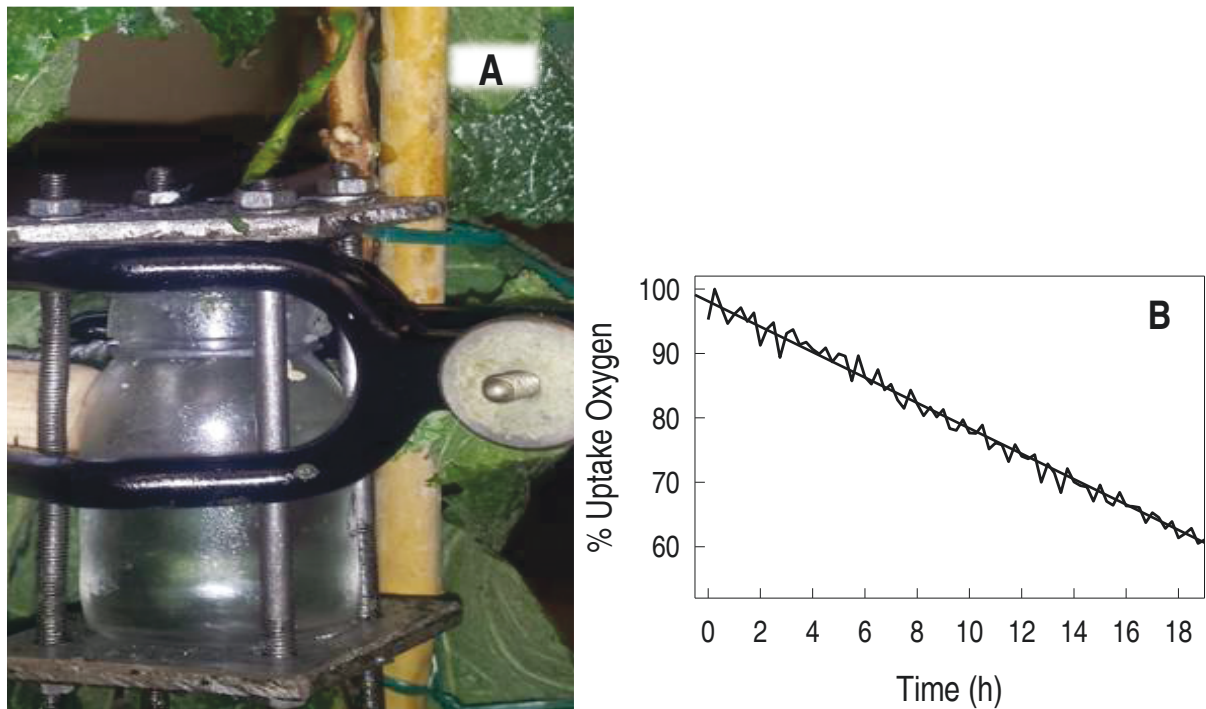


Figure S3. 1. (A): Respiration chamber used for single attached berry. The pedicel crosses the metal cap through a polyurethane cylinder sealed with silicon grease (see Fig. S2) (B):  $O_2$  uptake trace obtained with the OXY-4 mini oxygen meter (PreSens Precision Sensing GmbH, Germany). Usual measurements were conducted in ca 6 hours.



Figure S3. 2. Attached berry of “ML1 microvines” used for periodic respiration measurement shows an usual development pattern. An individual berry was isolated in a cluster, and placed in a respiration chamber every 3 days, for 6 hours measurements, before opening the device. Respiration was conducted at 25°C in darkness. (A) The berry at Day 0 and (B) at Day 25. The gray polyurethane cylinder on the rachis full of silicon grease participates in the tightness of the seal with the cap of the device.

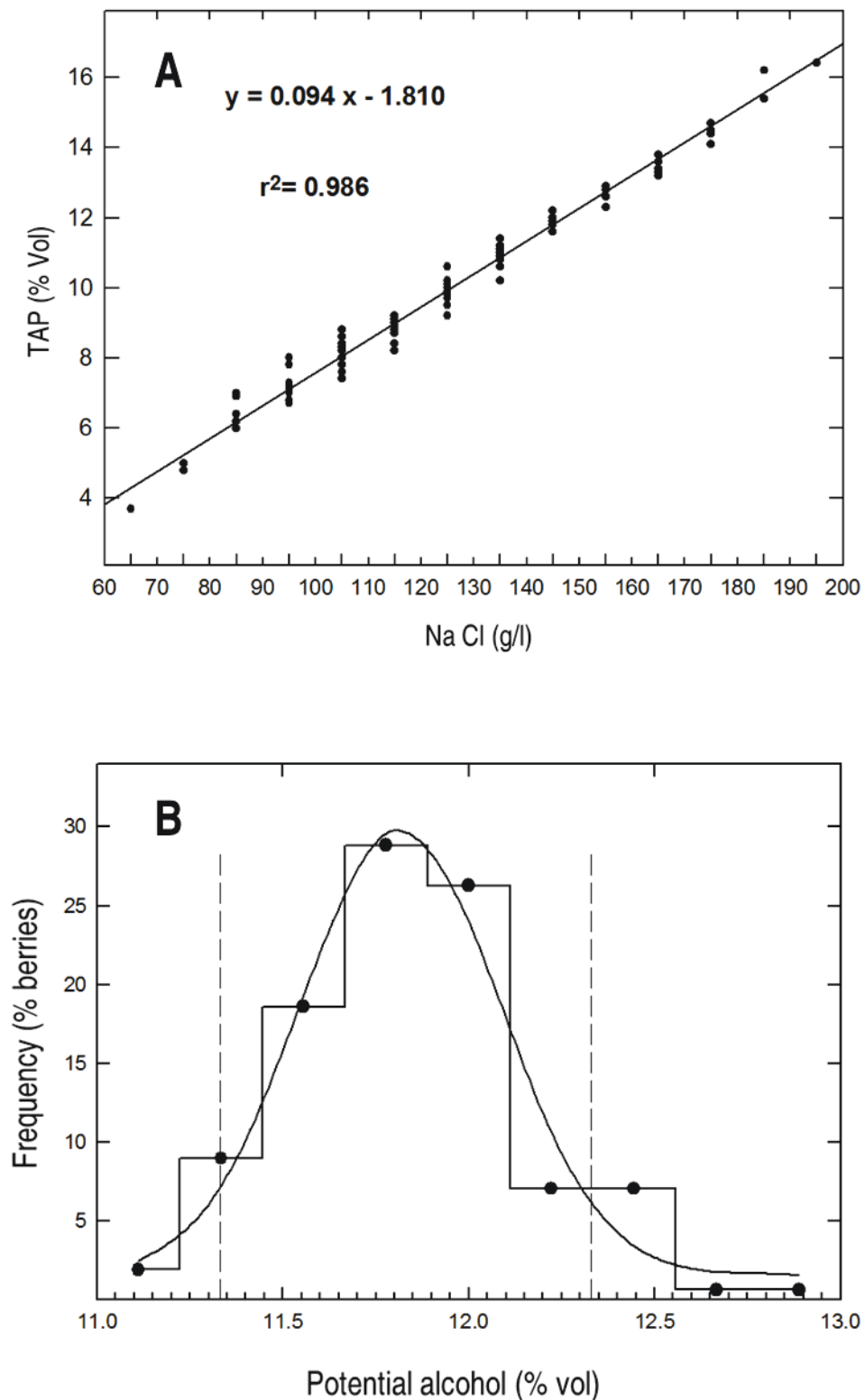


Figure S3.3. Distribution of Pinot berries in different density classes. (A) precision of sorted density and (B) distribution of potential alcohol within the expected boundaries (dotted lines) for a single class .



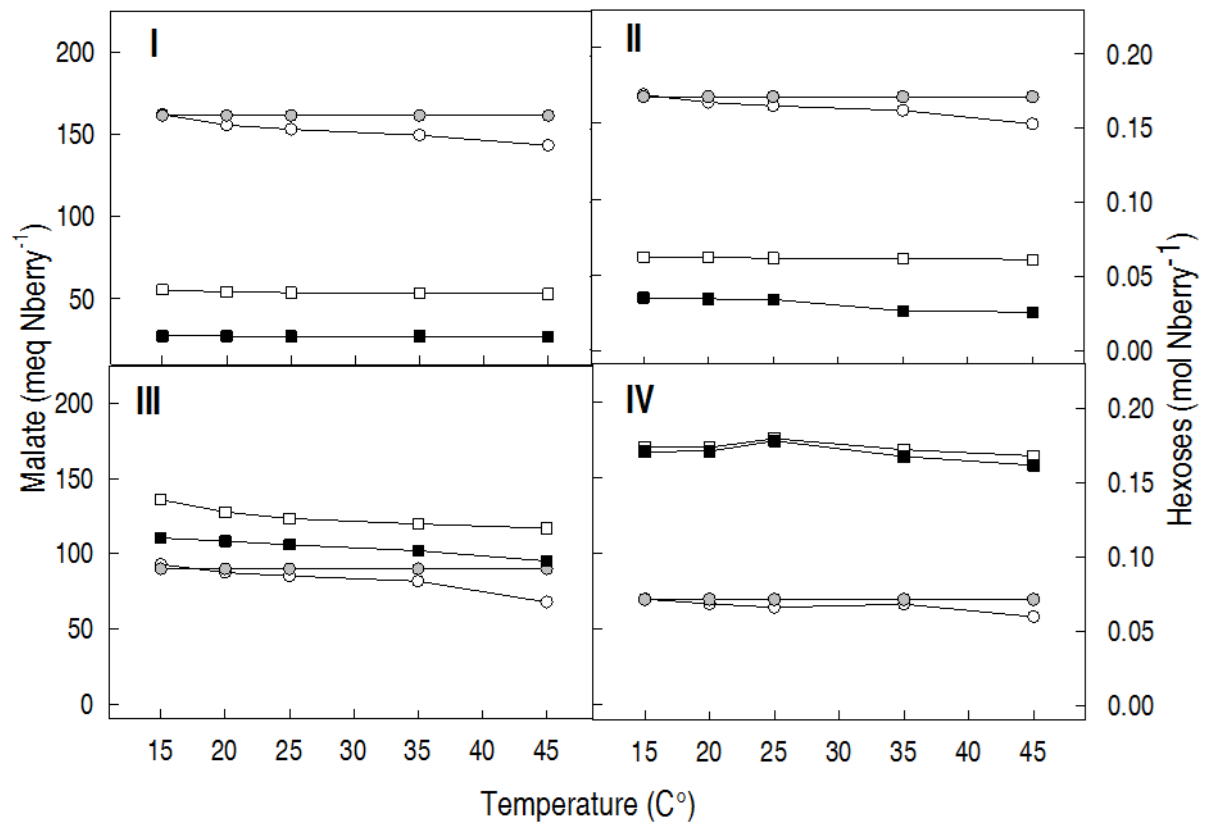


Figure S3.4. Malate and sugar respiration at different stages as a function of temperature: Gray circles : initial malate, open circles : malate remaining after respiration measurement. Open and closed squares represent glucose and fructose respectively. The berries of each stage were density sorted and homogenized.

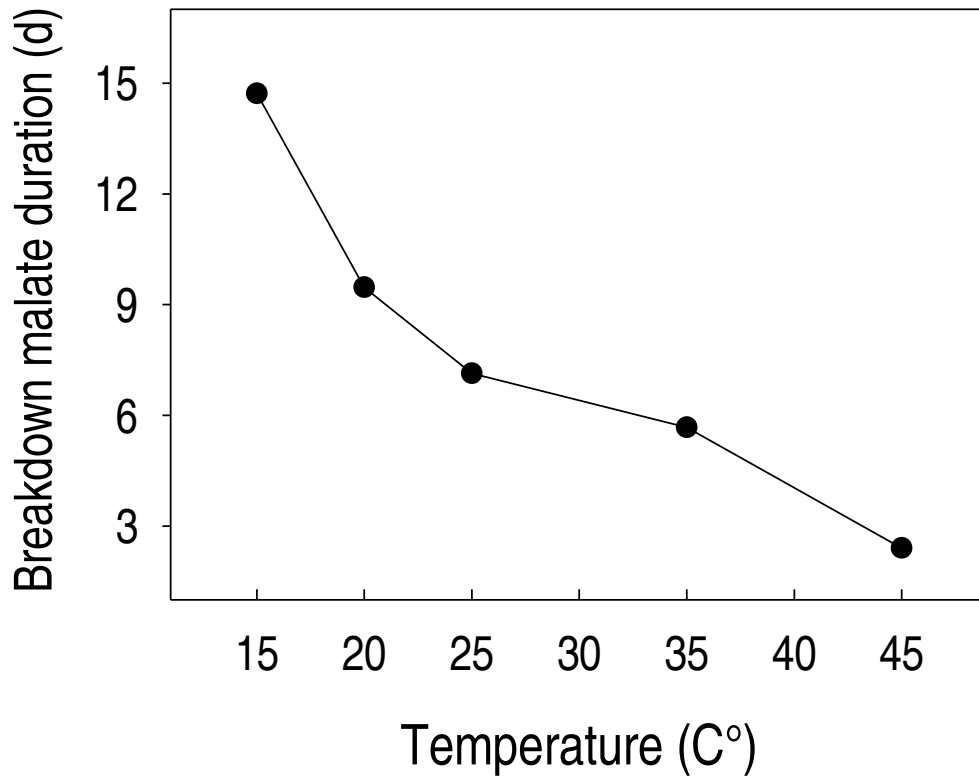


Figure S3. 5. Impact of temperature on the duration of malate breakdown before reaching a minimal 50 mEq threshold, calculated from O<sub>2</sub> consumed and CO<sub>2</sub> emitted.

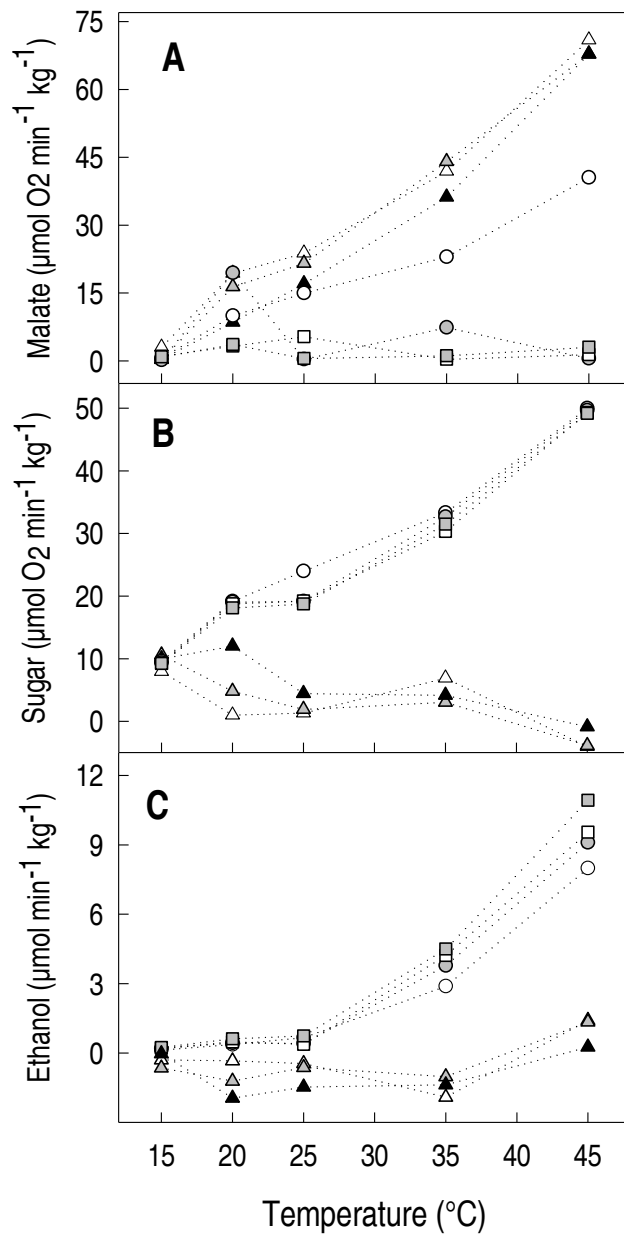


Figure S3. 6. Respiratory flux at different stages as a function of temperature. (A) malate consumed, (B) sugar consumed and (C) Simulated ethanol (aerobic fermentation) . Stage 1 (green): (Open triangles); Stage 2 (softening): (Gray triangles); Stage 3: (Closed triangles); Stage 4: (Open circles); Stage 5: (Gray circles); Stage 6: (Open squares); Stage 7: (Gray squares). Data was calculated from  $O_2$ ,  $CO_2$  and malate measurements, assuming that consumed malate equal to malate oxidized and ethanol comes only from sugars (see Annex 3S. 1).

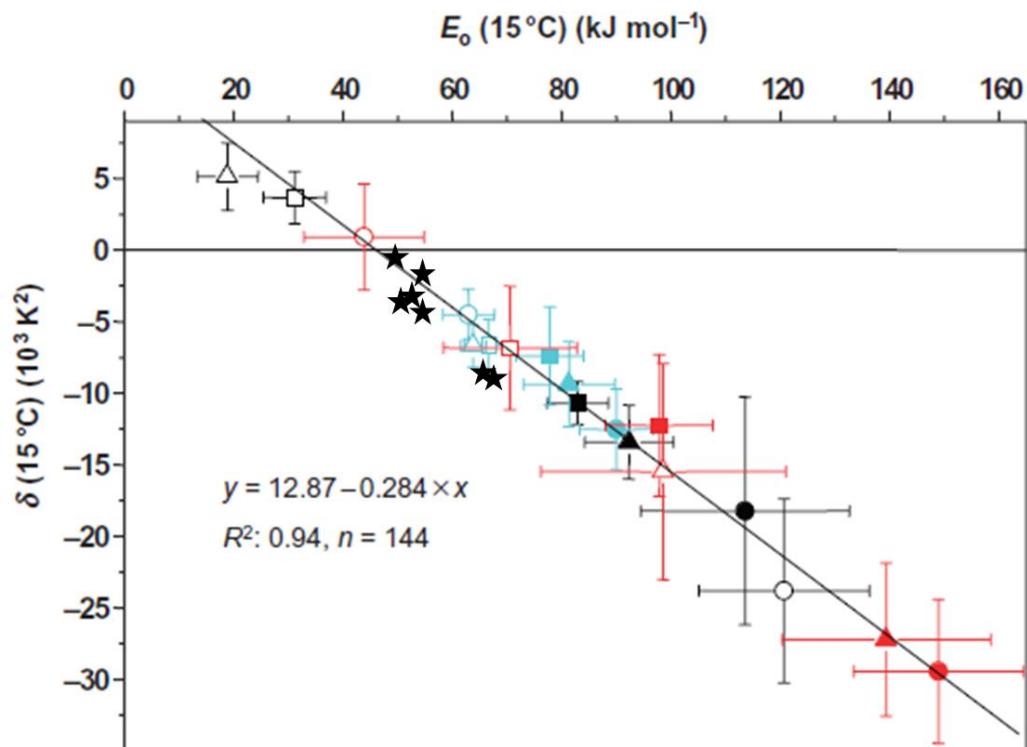


Figure S3. 7. Correlation between the overall activation energy for oxygen reduction ( $E_0$ ) and the parameter  $\delta$ , which describes the dynamic adjustment of  $E_0$  to temperature, starting from the reference temperature 288 K (15°C). Closed stars : present data on grape berries. Other symbols represent other plant species and organs (Kruse et al. (2008), Figure 6).

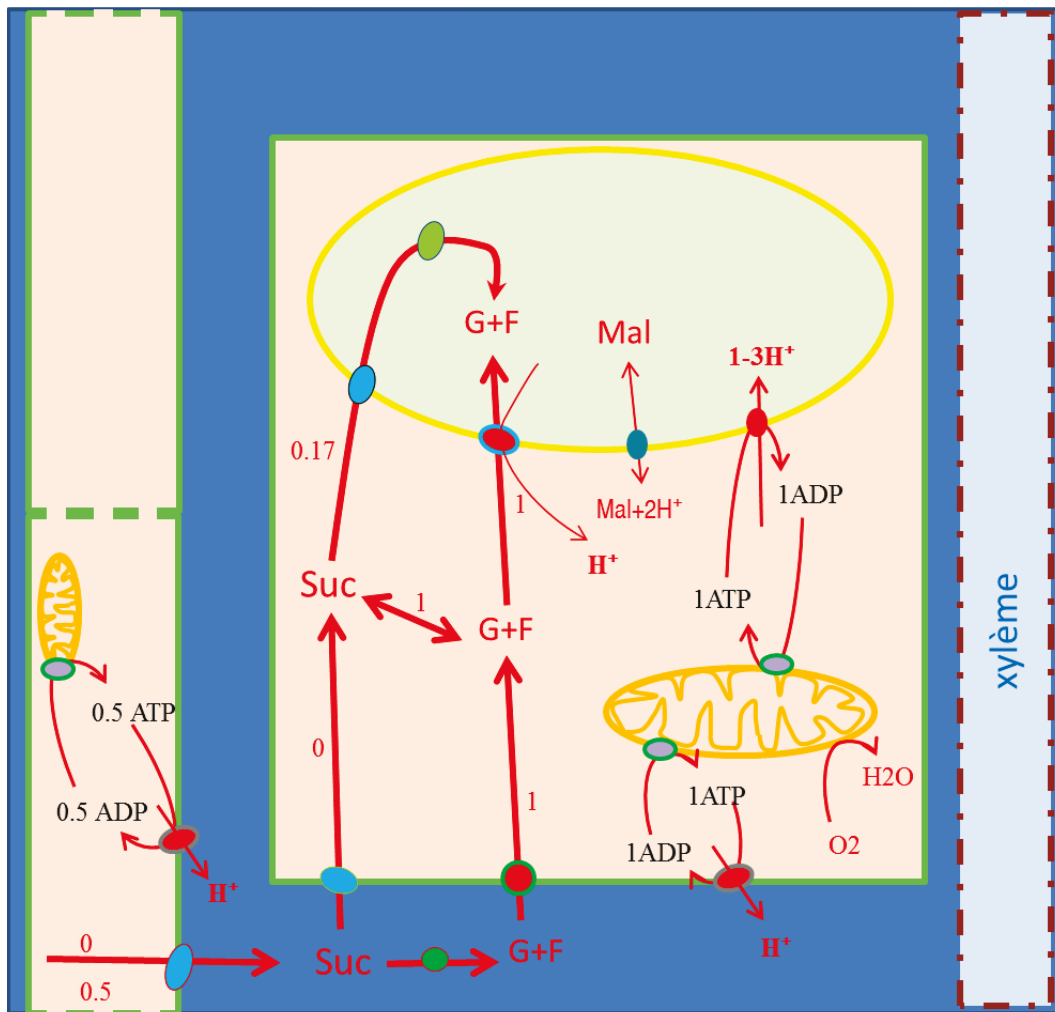


Figure S3. 8. Energy requirement for sugar loading in ripening berries depends on the precise site of sugar inversion in the apoplasmic pathway and the relative fluxes between diffusion facilitators (SWEETs) and energized transporters (H<sup>+</sup> symporters and antiporters). The indicated numbers correspond to the energy cost of sugar transport (ATP/hexose). Only the most and least energy consuming pathways are presented here.

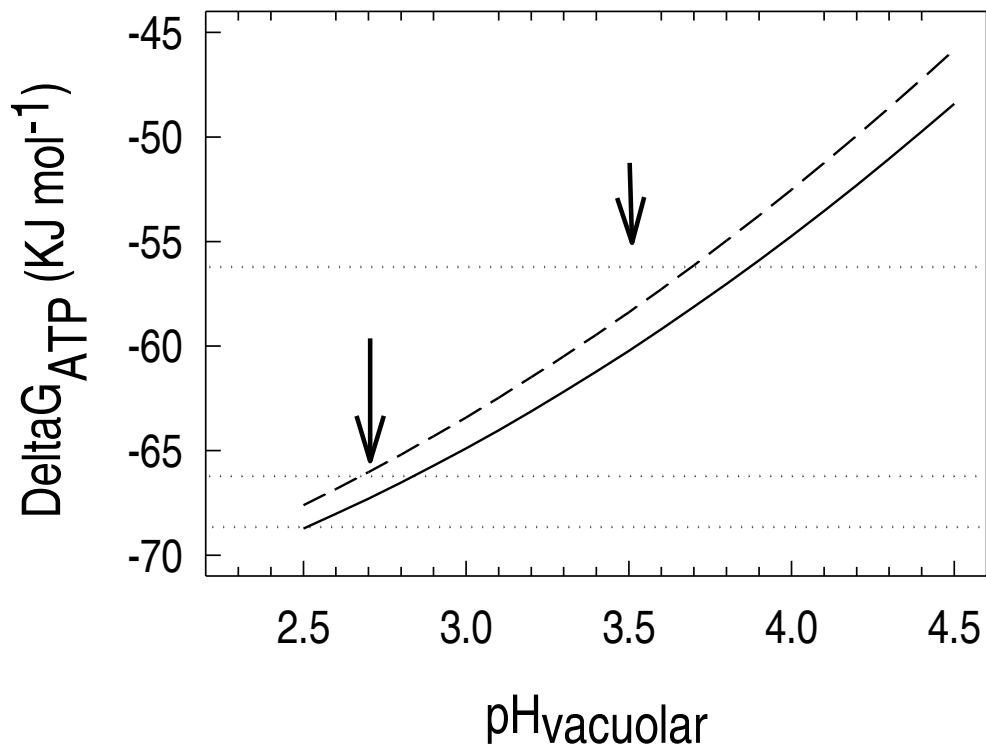


Figure S3. 9. Putative variations in  $\Delta G_{ATP}$  during Pinot Meunier berry development. The values were calculated according to Lobit et al. 2006, assuming  $pH_{Cyt} = 7$  (Dashed line) or 7.2 (Solid line) and  $T = 298^{\circ}K$ . The arrows correspond to the vacuolar pHs of green and ripe stage berries. The dotted lines show the activation energy at green stage ( $69 \text{ KJ mol}^{-1}$ ), softening stage ( $66 \text{ KJ mol}^{-1}$ ) and during ripening ( $56 \text{ KJ mol}^{-1}$ ).

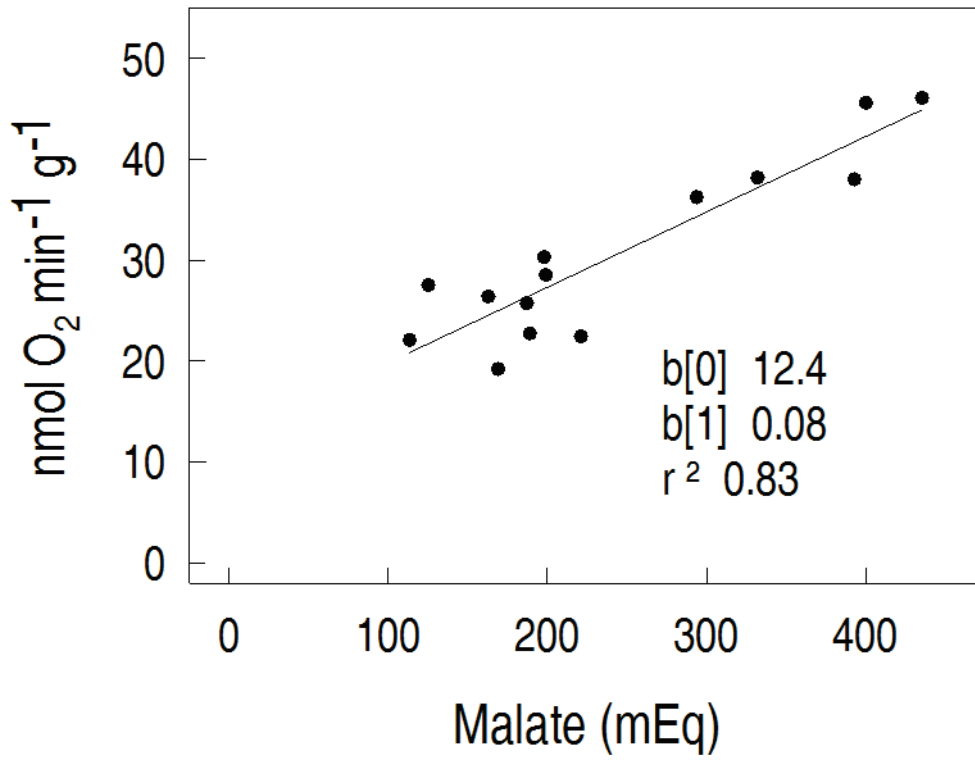


Figure S3. 10. Correlation between respiration and malic acid in single ML1 microvine berries.

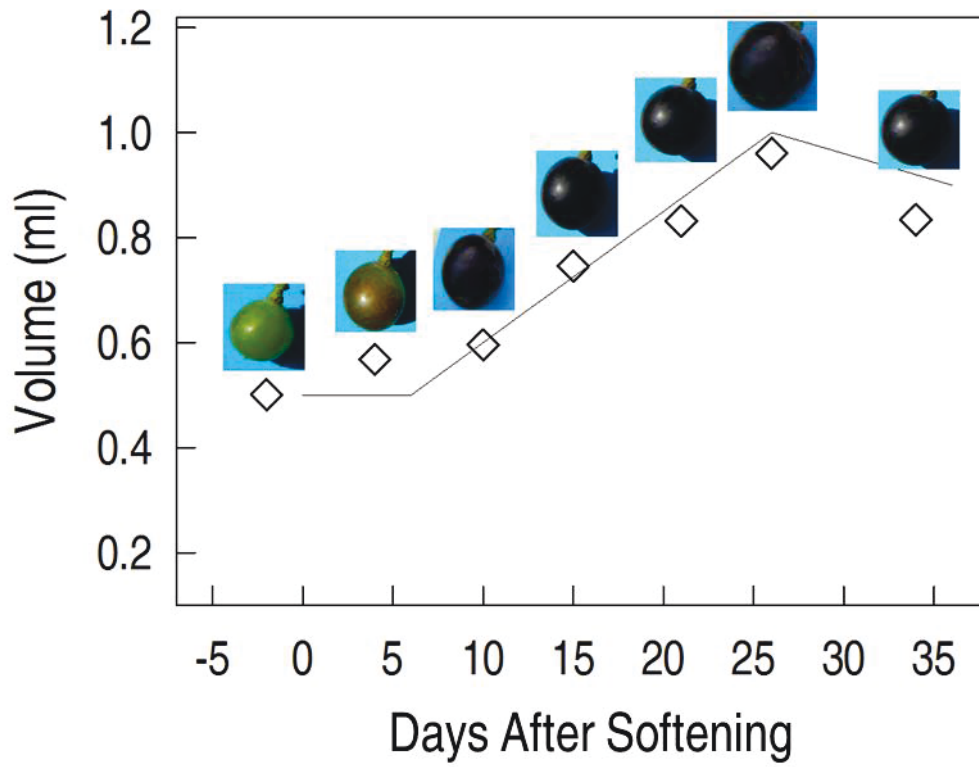
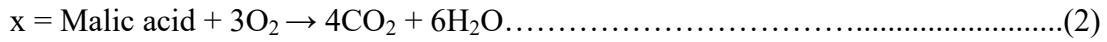
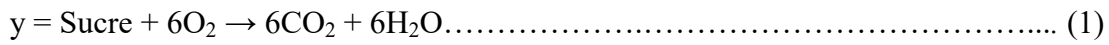


Figure S3. 11. Evolution of berry volume and color of one berry of “ML1 microvines” during respiration measurement in 2015. Berry volume (Open squares) was estimated from pixel counts as described in Shahood et al. submitted.



Annex S3. 3. Calculation of substrate flux in berries from consumed malic acid, CO<sub>2</sub>& O<sub>2</sub>



Where y is sugar oxidized and x is malic acid oxidized

$$\text{O}_2 = 6y + 3x$$

$$\text{QR} = (6y + 4x) / (6y + 3x)$$

$$\text{So } x/y = (6\text{QR} - 6) / (4 - \text{QR})$$

$$y = \text{O}_2 \text{ overall} / ((x/y) + 2)$$

$$x = \text{O}_2 \text{ overall} - y$$

Starting from the known respiratory quotients of sugar and malate (QR= 1 for Sugar and 1.33 for malate) and supposing that consumed malic acid equal to malic acid respiration and the ethanol comes only from sugar

$$\text{O}_2 \text{ malate} = \text{CO}_2 \text{ malate} / 1.33 \dots\dots\dots (3)$$

$$\text{O}_2 \text{ sucre} = \text{O}_2 \text{ overall} - \text{O}_2 \text{ malate} \dots\dots\dots (4)$$

$$\text{Ethanol} = \text{CO}_2 \text{ ethanol} = (\text{QR}_{\text{real}} - 1) * \text{O}_2 \text{ Sucre} \dots\dots\dots (5)$$

***Chapitre 4. Impact de la taille minimale sur les flux de Sucres, d'acides organiques et d'eau au cours de la maturation du raisin.***

## **Impact of minimal pruning on Sugars, Organic acids and Water flux during the ripening of grapevine berries.**

## **Impact de la taille minimale sur les flux de sucres, d'acides organiques et d'eau au cours de la maturation du raisin.**

**Rezk SHAHOOD<sup>(1,2,3)\*</sup>, Laurent TORREGROSA<sup>(2)</sup>, Charles ROMIEU<sup>(1)\*</sup>**

<sup>1</sup> INRA Montpellier, UMR AGAP, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex, France

<sup>2</sup> Montpellier SupAgro, UMR AGAP, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier, France; UMT Génovigne, INRA de Pech-Rouge, 11430 Gruissan, France.

<sup>3</sup> General Commission for Scientific Agricultural Research– Lattakia, Syrie

\*Correspondence: [charles.romieu@inra.fr](mailto:charles.romieu@inra.fr)

### **Résumé**

La taille minimale est une méthode de conduite de la vigne qui permet de réduire le coût de l'itinéraire cultural et d'augmenter les rendements. Elle retarde sensiblement la maturation du raisin et diminue la taille des baies. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de la taille minimale sur la croissance et l'évolution des métabolites majeurs (Glucose, fructose, malate, tartrate), au sein des fruits individuels, plutôt qu'à l'échelle classique d'échantillons représentatifs de l'évolution de la composition moyenne de la vendange. Le poids des baies a été fortement impacté avec une réduction d'un facteur 1.7. Cette réduction concerne tous les stades de développement, mais laisse la cinétique de croissance relative inchangée. L'initiation du stockage des sucres est retardée de 20 jours par rapport au témoin. Les durées du chargement en sucres, et de la seconde phase de croissance n'ont pas été significativement affectées, cependant le déchargement phloémien a cessé à une concentration en sucres sensiblement inférieure. La pression osmotique nécessaire au grandissement cellulaire s'établit différemment par rapport au témoin, avec davantage de sucres et moins de malate. Cependant, ces variations restent relativement marginales, puisque les différences n'ont pu être observées qu'au prix d'un nombre considérable de mesures sur baies individuelles. Les baies observées en taille minimale semblent représenter une frange de celles qui existent dans la population du témoin. Des travaux ultérieurs devraient étendre ces résultats à d'autres cépages et conditions climatiques. Il conviendrait également d'effectuer ce type de comparaisons à charge équivalente, pour mieux cerner les influences relatives du conditionnement à long terme du poids des baies, et de la compétition pour les photoassimilats en temps réel.

## **Introduction**

La gestion du rapport source/puits est déterminante pour le potentiel œnologique de la vendange, en particulier la richesse en sucre, en anthocyanes, et en acides organiques. Les cinétiques de croissance et la composition de la vendange dépendent de l'énergie solaire convertie en biomasse et donc la surface foliaire exposée au rayonnement direct. Une surface foliaire exposée de 1.2 m<sup>2</sup> par Kg de vendange est généralement considérée comme optimale, mais des valeurs de 1 à 2 m<sup>2</sup> ont pu être proposées, suivant le type de vin recherché (Carbonneau et al. 2007 ; Murisier et al. 1997 ; Mabrouk et Carbonneau 1996 ; Murisier et al. 1986 ; Smart et al. 1990). Les rendements excessifs peuvent entraîner des effets négatifs sur la qualité des fruits, comme la réduction des sucres totaux et des anthocyanes, et des perturbations de pH et d'acidité qui traduisent des retards de maturation. Morris et Cawthon (1981) ont trouvé que la taille continue conduit à de faibles niveaux de sucres et de couleur. Une défoliation sévère diminue les réserves d'amidon et de saccharose dans la vigne, et impacte l'activité des enzymes et l'expression des gènes des transporteurs du sucre (Silva et al. 2017).

Différents systèmes de conduite ont été développés afin d'équilibrer la productivité et la croissance végétative, atteindre un rendement et une qualité acceptables, tout en garantissant la pérennité de la vigne. La taille minimale permet de produire des raisins de qualité tout en réduisant le coût du travail (Zheng et al. 2016; Martinez de toda 1989; 1991; 1995; Martinez de Toda et Sancha 1992; 1999; Reynolds 1988; Schultz and Weyand 2005). La taille minimale produit des baies beaucoup plus petites, mais comme le nombre de grappes produites est plus élevé, le rendement augmente, ce qui est associé à un retard de maturité et une baisse de concentration des sucres (Bates et Walter-Peterson 2008 ; Rousseau et al. 2013; Zheng et al. 2016). Cependant, la concentration en anthocyanes augmente (Zheng et al. 2016 ; Clingeffer 2010 ; Archer and Van Schalkwyk 2007). Cet enrichissement en composés pelliculaires traduirait plutôt la réduction du volume des baies, qu'une synthèse accrue.

Les échantillons représentatifs de la parcelle, dont on analyse la composition moyenne en routine pour suivre l'évolution de la future vendange dans le temps, présentent davantage de degrés de liberté que le développement d'une baie, qui serait beaucoup moins plastique (Shahood et al. submitted). On ignore donc dans quelle mesure c'est le métabolisme de

chaque baie, ou bien leur synchronisme au sein de la population qui est affecté par le mode de conduite. Le développement du raisin présente deux périodes de croissance clairement séparées par un ralentissement, avant véraison (Coombe 1984 ; Coombe 1992). Pendant la 1<sup>ère</sup> période (phase verte), la baie accumule principalement les acides organiques et l'eau. La maturation débute par une perte abrupte de fermeté, qui marque l'accélération brutale du déchargement des sucres et l'initiation de la dégradation de l'acide malique dans le fruit (Coombe 1984 ; 1992). La croissance ne reprendrait que 6 jours plus tard (Coombe and Bishop 1980 ; Shahood et al. submitted). A l'échelle d'une baie, le déchargement phloémien stoppe 26 jours après la perte de fermeté, d'où l'arrêt simultané de la croissance et de l'accumulation des sucres, alors que le poids a doublé (Shahood et al. submitted). Selon ce dernier auteur, la concentration finale des sucres par évaporation et flétrissement serait toujours nécessaire pour atteindre un TAP moyen de 12 %. Cependant, comme les baies ne se développent pas simultanément, ce phénomène est gommé à l'échelle de la population, puisque des baies tardives en cours de croissance coexistent avec les baies en cours flétrissement, ce qui donne l'illusion que l'accumulation des sucres se produirait à volume constant, en fin de maturation.

La présente étude vise à établir les modifications des flux d'eau, de sucres et d'acides organiques consécutives aux modifications trophiques et hormonales entraînées par la taille minimale, à l'échelle de la population et des baies individuelles.

## **Matériels et méthodes**

### *Matériel végétal*

Les expériences ont été conduites sur cv Syrah (*Vitis vinifera* L.) établi dans la vigne expérimentale de SupAgro-Montpellier, au cours du millésime 2015. Les baies produites en taille minimale (cordon haut, rideau libre) avec une densité de plantation de 1.2 X 3.5 m ont été comparées avec celles produites en espalier taillé en cordon de Royat, avec une densité de plantation de 1.2 X 2.5 m (Carbonneau et Samson 2015).

Le poids des baies, les sucres et les acides organiques ont été déterminés sur plus de 1000 baies individuelles récoltées à partir de centaines des grappes, à partir de prélèvements hebdomadaires. L'intervalle entre prélèvements a été réduit à 3-5 jours autour de la mi-

véraison (ramollissement). Toutes les échantillons ont été pesés et stockés à -80°C 4 heures après la récolte, en moyenne.

*Calcul de la surface foliaire exposée :*

La surface foliaire exposée par pieds est égale à  $P*(2H+L)$  (m<sup>2</sup>/pieds)

avec

H = Hauteur de végétation mesurée de la base du rameau primaire à son extrémité (m)

L= épaisseur de la végétation sur le pied à mi-hauteur (m)

P= Ecartement entre les pieds (m)

*Sucre et acides organiques :*

Chaque baie a été épépinée dans 5 fois son poids d'eau, dans un tube plastique de 14 ml, puis les échantillons ont été autoclavés à 120°C pendant 20 min, avant homogénéisation par agitation énergique. Les échantillons ont ensuite été dilués 10 fois dans 600 µM d'acide acétique et 12.5 mN de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> additionné de 0.18 g Amberlite IR-120 Plus (sodium form, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ont été ajoutés à chaque 1 ml d'échantillons, avant agitation pendant au moins 6 heures. Les échantillons ont été centrifugé 10000g pendant 10 min, 30°C et les surnageants transférés dans les fioles de l'HPLC, avant l'injection sur une colonne d'Aminex HPX87H (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), éluée avec 0.5 ml min<sup>-1</sup> 12.5 mN H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 60°C et équipée d'un détecteur à double absorbance (Waters Corporation, Milford, MA, USA) et un réfractomètre Kontron 475 RI ((Kontron Instruments, Rossdorf, Germany). Les hexoses et les acides organiques ont été calculés selon Rienth et al. (2014).

*Synchronisation des baies*

L'ensemble des baies dans chaque prélèvement a été classé selon le contenu individuel en solutés totaux (malate+tartrate+sucre). Ensuite, la date moyenne du prélèvement a été recalculée à partir des dates réestimées pour chaque baie. La date moyenne de ramollissement de la population a été suggérée comme temps 0 pour chaque taille de conduite testé.

## **Résultats et discussion :**

Charge en fruit et rendement :

Avec 7.6 Kg de vendange en moyenne en taille minimale, le rendement par pied a été multiplié par 2.5 par rapport au témoin, pour aboutir à une surface externe de couvert végétal de 0.55 m<sup>2</sup> par Kg de vendange, contre 1.3 m<sup>2</sup> Kg<sup>-1</sup> pour le témoin (Table 4.1). Cette dernière valeur est proche du niveau de charge optimal qui se situerait vers 1.2 m<sup>2</sup> de feuilles exposées par kg de raisins (Carbonneau et al. 2007 ; Murisier et al. 1997 ; Mabrouk et Carbonneau 1996 ; Murisier et al. 1986), sachant que la surface foliaire exposée devient un facteur limitant de l'enrichissement en sucre en dessous du seuil de 1 m<sup>2</sup> Kg<sup>-1</sup> (Kliwer and Dokoozlian 2005 ; Duchêne et al. 2012). Bates et Walter-Peterson (2008) et Carbonneau et Samson (2015) ont déjà montré que la taille minimale, qui diminue le nombre des pépins par baie (Weyand et Schultz 2006), induit généralement une réduction de taille des baies, ce que nous confirmons ici (Table 4.1). Cette inhibition de croissance des baies découle t'elle d'une charge excessive ? Bobeica et al. (2015) ont récemment montré que des réductions de surface foliaire de 4 à 0.67 (Cabernet sauvignon) ou de 1.17 à 0.33 m<sup>2</sup> Kg<sup>-1</sup> (Sangiovese) provoquent un ralentissement marqué de la concentration en sucre dans les baies. Parker et al. (2014) observent un retard de coloration et un accroissement de la durée de véraison de 8 jours sur Pinot noir, lorsque la charge passe de 0.5 à 0.3 m<sup>2</sup> Kg<sup>-1</sup>, ce qui est cohérent avec la baisse marquée de synthèse des anthocyanes rapportée par Bobeica et al. (2015) sur Cabernet Sauvignon, et qui s'apparente à une quasi-inhibition sur Sangiovese. Dans ces conditions limitantes, vers 65 jours après l'anthèse, les baies accumulent davantage de sucres que la photosynthèse n'en produit dans la canopée. Cependant, au-delà d'un ralentissement plus ou moins marqué des cinétiques de croissance suivant le cépage, le poids maximal des baies n'est pas affecté. En fait, la réduction de 40 % du poids moyen des baies observée en taille minimale n'a jamais été décrite lors de réduction du rapport source-puits en cours de campagne, sur vigne taillée. Dans ce type d'expériences, la surface foliaire est manipulée trop tardivement pour affecter les réserves initiales de la plante et l'intensité des divisions cellulaires de la baie après l'anthèse (Ojeda et al. 2001) ; et la seconde phase de croissance s'accommode pleinement des réductions notables de concentration en sucres et de pression osmotique qui en découlent.

Table 4. 1. Caractéristiques des grappes sur vignes conduites en taille minimale et taille normale pendant la saison 2015.

	Minimale	normale
Nombre de grappes par pied	112	15.8
Nombre de baies par grappe	69.2	79.3
Poids moyen d'une baie (g)	1.5	2.5
Nombre de feuilles /pied	2156	912
Nombre de feuilles/grappe	19.25	57.72
Nombre de feuilles/baie	0.28	0.73
Rendement (Kg/pied)	7.6	3.1
Surface foliaire (m <sup>2</sup> Kg <sup>-1</sup> de baie)	0.55	1.29

La réduction de taille des baies consécutive à la taille minimale (- 40 %) est programmée bien avant la fin du plateau herbacé (Fig. 4. 1A), comme le sont les écarts de croissance d'une grappe à l'autre, en taille usuelle (Shahood et al. soumis). Le doublement approximatif du poids moyen d'une baie pendant sa maturation a déjà été documenté chez de nombreux cultivars de *Vitis vinifera* L. (Houel et al. 2013 ; Houel et al. 2015 ; Friend et al. 2009 ; Shahood et al. soumis). Les conditions environnementales après véraison, comme le stress hydrique, n'influent pas irréversiblement ce doublement (Ojeda et al. 2001 ; Keller et al. 2014). Les baies au sein d'une population témoin peuvent afficher des variations de poids de 1.8 à 3 fois (Shahood et al. Soumis ; Gouthu et al. 2014), qui dépendent des divisions cellulaires, du nombre de pépins et des hormones contrôlant la croissance depuis la floraison (Friend et al. 2009 ; Ojeda et al. 1999 ; Wong et al. 2016). Tout semble donc se passer comme si la taille minimale privilégiait les petites baies, comme cela est le cas pour certaines grappes du témoin. L'on ignore à quel stade de différenciation des inflorescences ce phénomène est régulé.

La véraison (perte de fermeté) des baies a été retardée de 20 j en moyenne pour la taille minimale, alors que la floraison affichait déjà un retard de 15 j (Fig. 4. 1). Cette observation est cohérente avec d'autres études (Martinez de Toda 1989 ; 1991 ; 1995 ; Martinez de Toda et Sancha 1992 ; 1999 ; Zheng et al. 2016 ; Bates et Walter-Peterson 2008). Par rapport à une taille classique, la véraison (colorimétrique) des baies de la taille minimale est retardée 8 à 16 jours et les baies ont besoin 13- 20 jours de plus pour atteindre 22 °Brix, (Zheng et al. 2016).



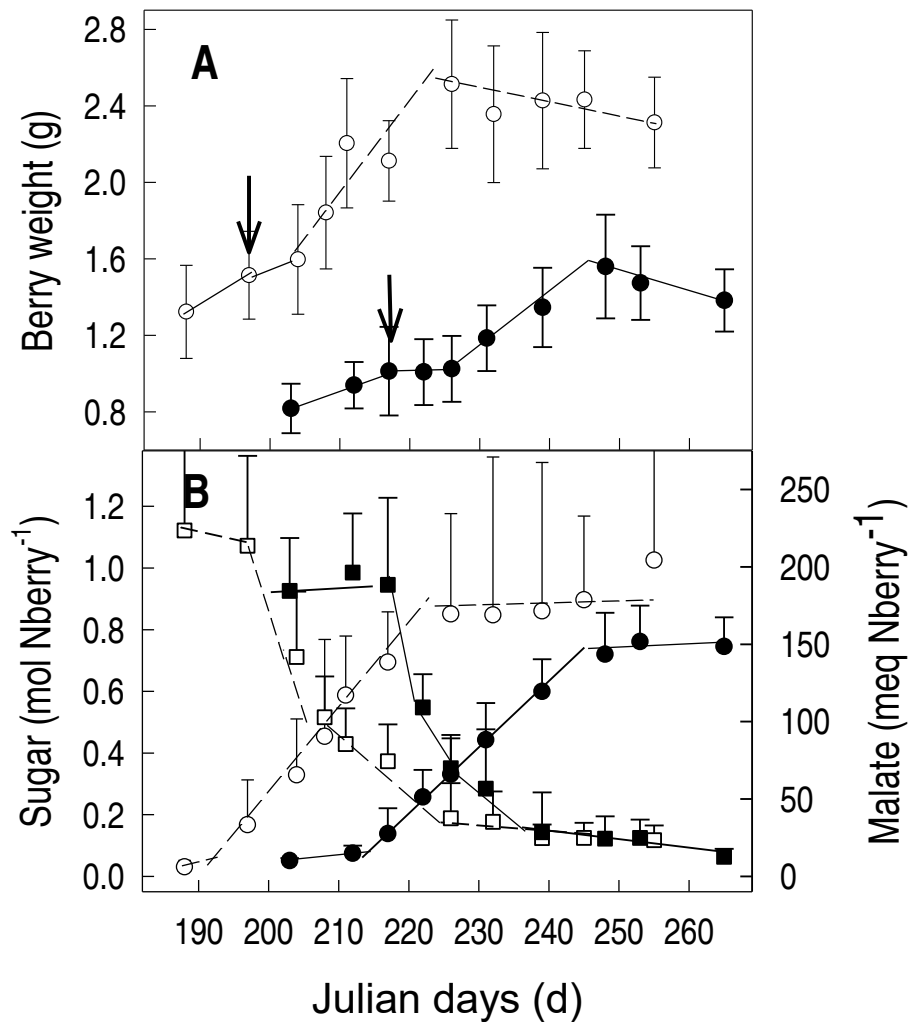


Figure 4.1. Cinétiques des flux dans la baie de Syrah issue de deux tailles différentes (normale (symboles ouverts), minimale (symboles fermés)) pendant la maturation. (A) : développement de la baie. Les deux flèches représentent le jour du ramollissement pour chaque taille. (B) : accumulation du sucre (cercles) et la dégradation du malate (carrés). La floraison a débuté le 11.05.2016 (d=131) pour la taille normale et le 26.05.2016 (d= 146) pour la taille minimale.

Les durées de la seconde phase de croissance (de 21 à 22 jours) et d'accumulation des sucres (28 à 30 jours) ne semblent pas sensiblement affectées par la taille minimale, tout du moins lorsque ces phénomènes sont analysés en considérant les pentes maximales observées sur les deux populations respectives. Cependant, le déchargement phloémien stoppe à une concentration de sucres inférieure en taille minimale, puisque la quantité de sucres finalement accumulés passe de 0.85 à 0.77 mol Hexose Kg<sup>-1</sup> (Fig. 4. 1B). Ce résultat doit toutefois être considéré avec circonspection, puisque les conditions d'arrière-saison ont compromis les prélèvements ultérieurs, en taille minimale. Le flux net d'accumulation des sucres passerait de 19 à 14 µmol Hexose min<sup>-1</sup> Kg<sup>-1</sup>, et la croissance accélérerait légèrement, de 557 à 594 µmol H<sub>2</sub>O min<sup>-1</sup> Kg<sup>-1</sup>, (résultats exprimés pour, respectivement, 385 baies chez le témoin et 641 baies en taille minimale, afin de considérer l'élaboration du même poids de vendange). Les flux sous-tendant l'élaboration d'un Kg de vendange seraient donc relativement invariants, par rapport à la diminution de 40 % du poids moyen des baies. La taille minimale des baies n'affecte pas donc sensiblement la loi de développement d'un futur poids unitaire des baies. Il semble toutefois que la respiration de l'acide malique soit accélérée, en taille minimale (Fig. 4. 1B).

Ces différents résultats ont été précisés en analysant la composition des baies individuelles. Les baies ont été classées suivant leur concentration en osmoticums principaux car cette grandeur est utilisable comme proxy afin d'en synchroniser les horloges internes (Shahood et al. soumis). La quantité d'acide tartrique par baie est plus importante chez le contrôle qu'en taille minimale, et reste en moyenne constante suivant la maturité, conformément à la simple dilution de cet acide pendant la seconde phase de croissance (Fig. 4. 2) (Hale 1977 ; Iland and Coombe 1988 ; DeBolt et al. 2008 ; Duchêne et al. 2014).

Le fait que l'on aboutisse à la même concentration finale en acide tartrique (75 mEq) est tout à fait remarquable, pour des baies de tailles aussi différentes, et dont la fécondation s'est produite à 20 jours d'intervalle, dans des conditions de disponibilité en assimilats potentiellement très différentes. Les populations témoins et taille minimales sont indiscernables lorsque l'acide tartrique est rapporté à, respectivement 385 et 641 baies, ce qui revient à considérer le développement d'un futur Kg de fruit à maturité pour les deux modalités (Fig. 4. 1A, Fig. 4. 2).

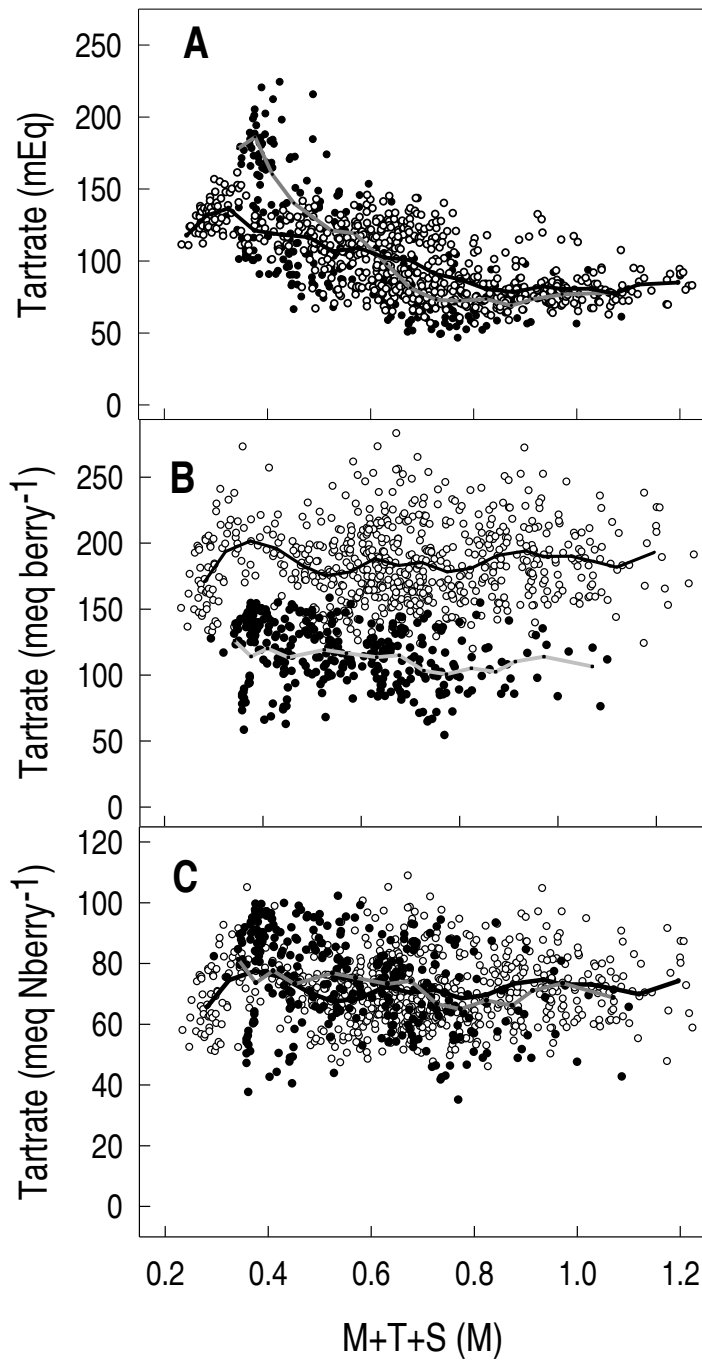


Figure 4. 2. Evolution du tartrate au cours du mûrissement de la Syrah conduite en taille minimale (cercles noirs) ou en cordon de Royat (cercles blancs). Chaque point correspond à une baie individuelle. Les lignes représentent les moyennes des tranches de solutés totales avec un intervalle de 0.05 M. A concentration, B quantité par baie, C quantité dans le nombre de fruit qui deviendra 1 Kg de vendange. Les lignes représentent l'évolution moyenne du tartrate par intervalles successifs de 0.05 M.

Le développement d'un volume unitaire de pulpe est donc quasi-invariant des points de vue de la synthèse, et de la dilution de l'acide tartrique, quand bien même sa concentration semble anormalement élevée (ca 200 mEq) dans une frange de baies en taille minimale, au tout début du mûrissement. Ceci témoigne probablement d'un déficit de croissance-dilution en stade vert tardif (Fig. 4. 2A), puisque cette anomalie disparaît lorsque les résultats sont exprimés par baie. Les baies de taille minimales tendent à être plus concentrées en stade vert, comme en témoigne la baisse initiale du rapport glucose/fructose, à une concentration supérieure en osmotocums (Fig. 4. 3).

Le nombre des feuilles par baie joue un rôle déterminant pour la quantité du sucre dans chaque baie. La taille minimale, qui augmente le rendement par pied (Table 4. 1, Martinez de Toda et Sancha 1999 ; Clingeleffer 1984), et diminue la surface foliaire par kg des baies (Table 4. 1), avec un entassement de feuillage qui ne permet pas une photosynthèse et maturité correctes du raisin, influence en conséquence l'accumulation du sucre dans la baie. Les variations de teneur en sucres sont bien corrélées aux variations de rendement (Tandonnet et al. 1996 ). Zheng et al. (2016) ont montré que la taille minimale peut retarder la maturité et diminué le TSS. La concentration du sucre a été significativement diminuée dans les vignes non taillé (Martinez de Toda et Sancha 1998 ; Weyand et Schultz 2006)

De plus, la taille minimale peut diminuer l'éclairement des grappes et donc modifier le microclimat des baies, et affecter leur métabolisme. L'exposition au soleil augmente la concentration en sucre et diminue celle du malate (Kliewer and Lider 1968). Rienh et al. (2016) ont montré que la chute du malate est été retardée par rapport à l'accumulation du sucre à des températures faibles.

Une forte hétérogénéité du poids, avec un écart de 2-3 fois, a été observée sur les baies ayant la même pression osmotiques, quel que soit le mode de conduite (Fig. 4. 4), mais en moyenne, les baies en taille minimale sont 1.7 fois plus petites (Fig. 4. 1A). Le ramollissement commence à une concentration en solutés majeurs plus élevée en taille minimale (0.45 M, contre 0.37 M sur le témoin). La baie commence à accumuler l'eau à 0.6 M et atteint le poids maximum à 0.8 et 0.9 M pour la taille minimale et normale respectivement (Fig. 4. 4). Les lois du grandissement des baies en fonction de la pression osmotique interne ont donc changé. Quel que soit le mode de conduite, l'accumulation des sucres et la dégradation du malate débutent simultanément (Fig. 4. 5). Cependant, le malate est épuisé à 0.65 M en taille minimale, sensiblement plus précocement que chez le témoin (0.8 M).

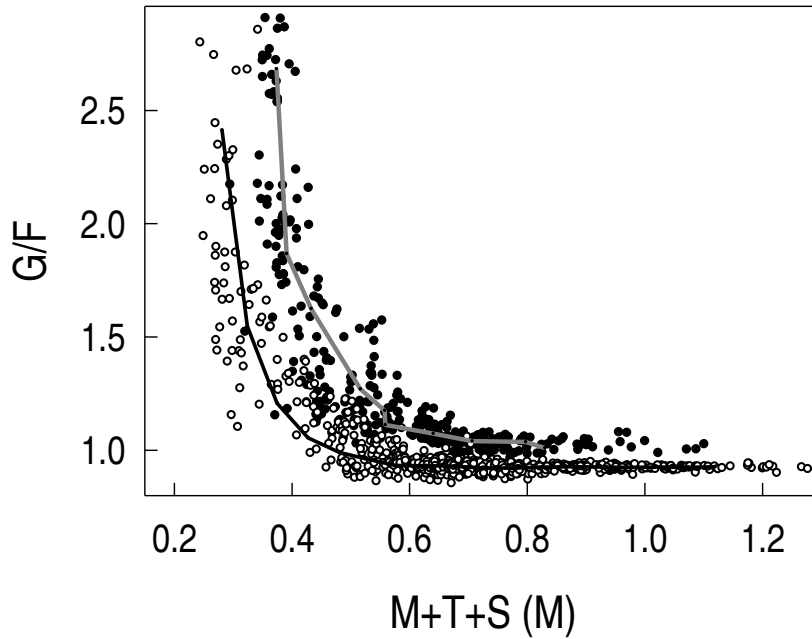


Figure 4. 3. Evolution du rapport du fructose/ glucose suivant la concentration en solutés totaux (cercles blancs : taille normale, cercles noirs : taille minimale). Les lignes représentent les moyennes calculées sur des intervalles successifs de 0.05 M (noir : taille normale ; grise : taille minimale).

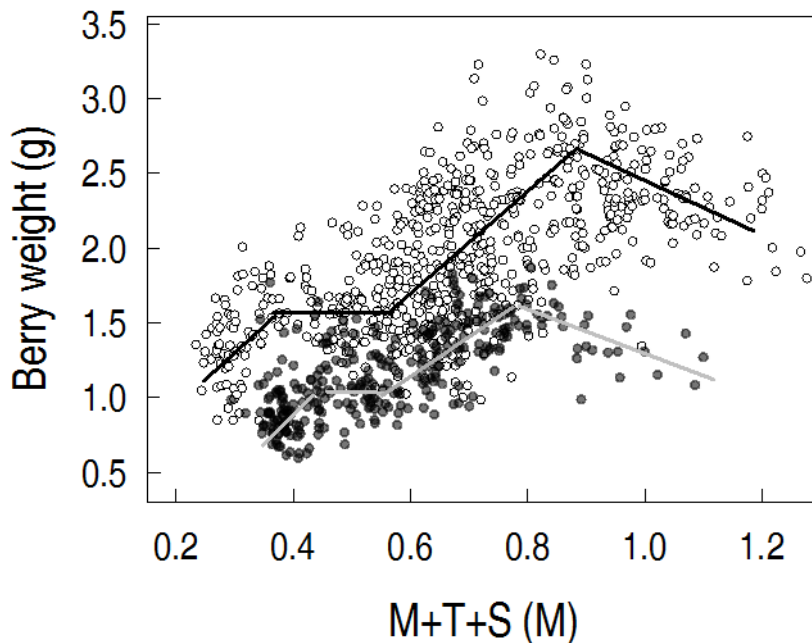


Figure 4. 4. Poids des baies individuelles de Syrah suivant deux modes de conduite (taille normale : cercles blancs, taille minimale : cercles noirs) en fonction des solutés totaux. Chaque point correspond à une baie unique. Les lignes représentent les moyennes par tranches successives de solutés de 0.05 M (noir : taille normale ; grise : taille minimale).

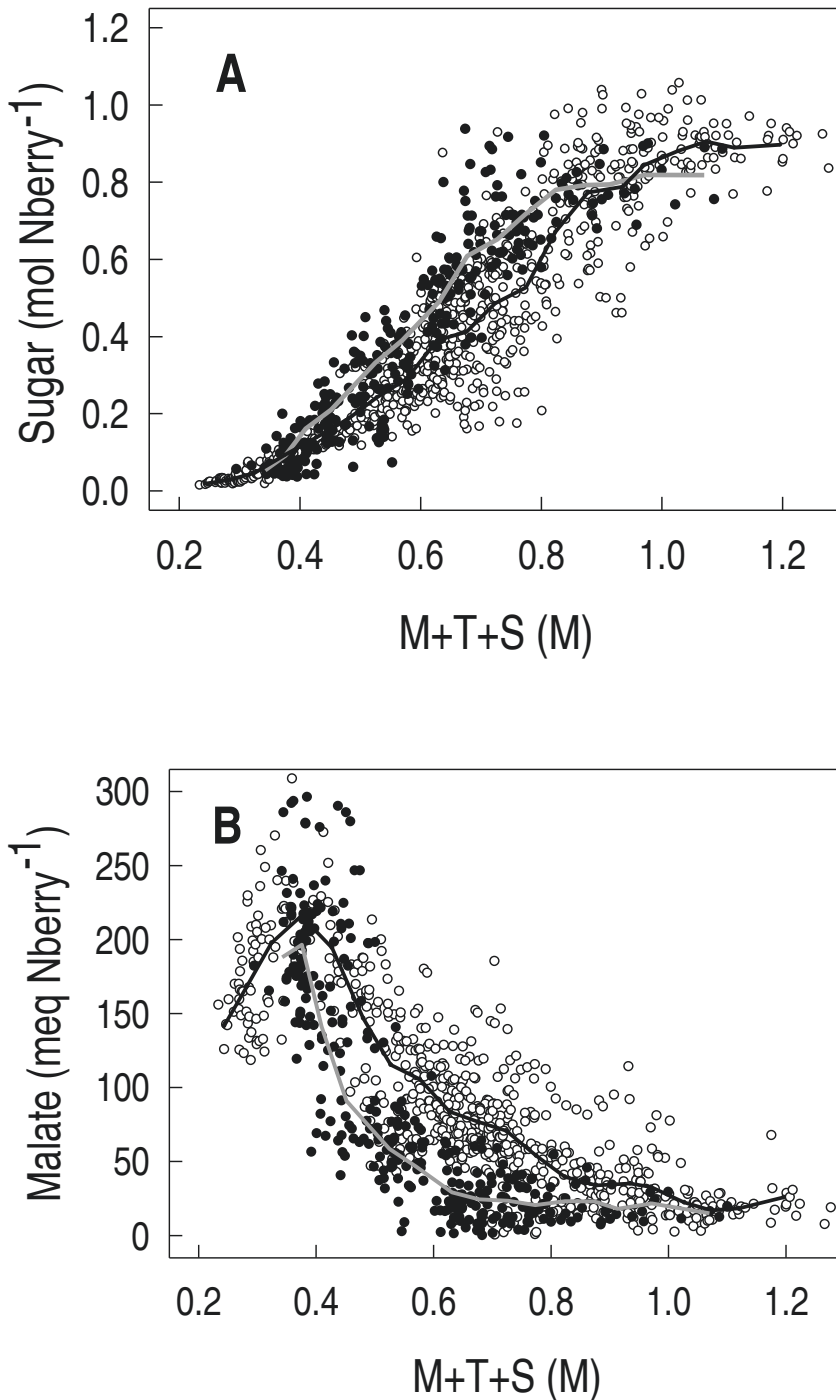


Figure 4.5. Développement des baies de Syrah suivant deux mode de conduite (taille normale : cercles blancs, taille minimale : cercles noirs) en fonction des solutés totaux. Accumulation du sucre (A) et dégradation du malate (B). Chaque point correspond à une baie unique. Les lignes représentent les moyennes par tranches successives de solutés totaux de 0.05 M (ligne noire : taille normale, ligne grise : taille minimale).

L'équilibre entre dégradation du malate et accumulation des hexoses change sensiblement entre les deux modes de conduite (Fig. 4. 6). La chute du malate présente globalement deux sous-phases dans les deux tailles étudiées : i) du début de la maturation jusqu'à 0.5-0.7 mol Hexose Nberry<sup>-1</sup>, les baies dégradent le malate simultanément avec l'accumulation des hexoses, ii) le sucre continue à s'accumuler à quantité constante finale de malate.

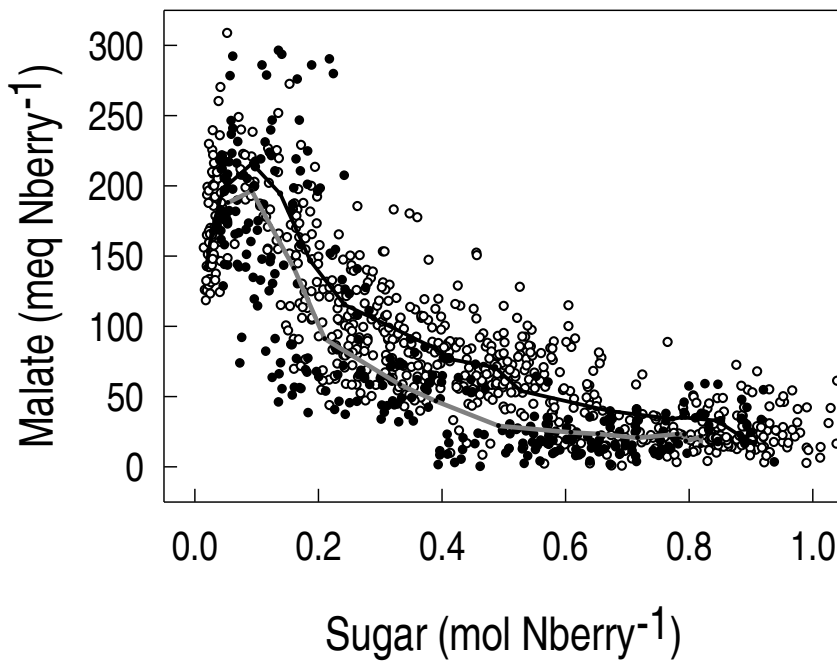


Figure 4. 6. Dégradation du malate en fonction de l'accumulation du sucre pour une baie théorique pesant 1 kg à maturité, suivant deux modes de conduite (taille normale : cercles blancs, taille minimale : cercles noirs). Les lignes représentent les moyennes par intervalles successifs de solutés totaux de 0.05 M. (ligne noire : taille normale, ligne grise : taille minimale).

Pour conclure, la taille minimale influence fortement le poids des baies, le rendement, et retarde le développement des baies indépendamment des conditions environnementales. Ces modifications précoces du poids des baies sont étroitement liées à celles qui affectent la synthèse de l'acide tartrique, avant véraison. Les flux de sucres, de malate et le volume évoluent plus rapidement suivant la pression osmotique dans les baies issues de la taille minimale. Tout se passe comme si la restriction du statut nutritionnel des baies liées à l'augmentation de la charge provoquait une consommation accrue d'acide malique à la véraison, de sorte que les sucres importés, bien que limitants, jouent paradoxalement un rôle osmotique finalement plus important. Les modifications de concentration en cours de maturation paraissent toutefois extrêmement limitées, par rapport à celles qui ont été décrites à des charges similaires, sur des vignes taillées et effeuillées. Des études ultérieures restent nécessaires pour bien appréhender les conséquences de la taille minimale sur les cinétiques de développement des baies individuelles. Il n'a pas été possible de déterminer les dates d'initiation du mûrissement sur chaque baie individuelle, et l'horloge interne de chaque baie n'a pu être appréhendée qu'indirectement, sur la base de la concentration en osmotocums majeurs.



## **Références :**

**Archer E, Van Schalkwyk D.** 2007. the effect of alternative pruning methods on the viticultural and oenological performance of some wine grape varieties. *South African Journal of Enology and Viticulture* **28**, 107-139.

**Bates T, Walter-Peterson H.** 2008. Vineyard mechanization and site specific viticulture practices in New York. *Proceeding for the Justin R. Morris Vineyard Mechanization Symposium*. RK Striegler et al. (eds.), pp. 53-64. Midwest Grape and Wine Conference, Osage Beach, MO.

**Bobeca 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. doi: 10.3389/fpls.2015.00382

**Bureau SM, Razungles AJ, Baumes RL.** 2000. The aroma of Muscat of Frontignan grapes: effect of the light environment of vine or bunch on volatiles and glycoconjugates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 2012-2020.

**Buttrose MS, HALE CR, Kliewer WM.** 1971. Effect of temperature on the composition of Cabernet Sauvignon Berries. *American Journal of Enology and Viticulture* **22**, 71-75.

**Carbonneau A, Deloire A, Jaillard B.** 2007. *La vigne, physiologie, terroir, culture*. Ed. Dunod p. 441.

**Clingeffer P.** 2010. Plant management research: Status and what it can offer to address challenges and limitations. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **16**, 25-32.

**Clingeffer P.** 1984. Production and growth of minimal pruned Sultana vines. *Vitis* **23**, 42-54.

**Coombe B, Bishop G.** 1980. Development of the grape berry. II. Changes in diameter and deformability during veraison. *Australian Journal of Agricultural Research* **31**, 499-509.

**Coombe BG.** 1984. The Inception of Ripening in The Grape Berry. *Quad of Viticulture and Enology of University of Torino* **8**, 87-99.

**Coombe BG.** 1992. Research on development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**, 101-110.

**Coombe BG, Phillips PE.** 1982. Development of the grape berry. III. Compositional changes during veraison measured by sequential hypodermic sampling. *Proceedings of the UCD Grape and Wine Centennial Symposium*, 132-136.

- De Toda FM, Sancha JC.** 1999. Long-term Effects of Simulated Mechanical Pruning on Grenache Vines Under Drought Conditions. *American Journal of Enology and Viticulture* **50**, 87-90.
- DeBolt S, Ristic R, Iland PG, Ford CM.** 2008. Altered light interception reduces grape berry weight and modulated organic acid biosynthesis during development. *HortScience* **43**, 957-961.
- Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP.** 2006. Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**, 257-268.
- Duchêne E, Dumas V, Jaegli N, Merdinoglu D.** 2014. Genetic variability of descriptors for grapevine berry acidity in Riesling, Gewurztraminer and their progeny. *Australian Journal of Grape and Wine research*, **20**, 91-99.
- Friend APT, M. C. T.; Creasy, G. L.** 2009 The influence of seed weight on the development and growth of berries and live green ovaries in *Vitis vinifera* L. cvs Pinot Noir and Cabernet Sauvignon. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **15**, 166-174
- Gouthu S, O'Neil ST, Di Y, Ansarolia M, Megraw M, Deluc LG.** 2014. A comparative study of ripening among berries of the grape cluster reveals an altered transcriptional programme and enhanced ripening rate in delayed berries. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5889-5902.
- HALE CR.** 1977. Relation between potassium and the malate and tartrate contents of grape berries. *Vitis***16**, 9-19.
- Houel C, Martin-Magniette M-L, Nicolas N, Lacombe T, Cunff L, Franck D.** 2013. Genetic variability of the berry size in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research* **19**, 208-220.
- Iland PG, Coombe BG.** 1988. Malate, Tartrate, Potassium, and Sodium in Flesh and Skin of Shiraz Grapes During Ripening: Concentration and Compartmentation. *American Journal of Enology and Viticulture* **39**, 71-76.
- Keller M.** 2010. Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: a climate change primer for viticulturists. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **16**, 56-69.
- Keller M, Mills LJ, Olmstead MA.** 2014. Fruit Ripening Has Little Influence on Grapevine Cold Acclimation. *American Journal of Enology and Viticulture* **65**, 417-423.
- Kliwer WM, Lider LA.** 1968. Influence of cluster exposure to the sun on the composition of Thompson Seedless fruit. *American Journal of Enology and Viticulture* **19**, 175-184.

- Mabrouk H, Carbonneau A.** 1996. Une méthode simple de détermination de la surface foliaire de la vigne (*Vitis vinifera* L.). *Le Progrès Agricole et Viticole* **113**, 392-398.
- Martinez de Toda F.** 1989. Grapevine response after five years of simulated mechanical pruning. *Ciencia e Técnica Vitivinícola* **8**, 113-120.
- Martinez de Toda F.** 1991. *Biología de la vid . Fundamentos biológicos de la viticultura .* Mundi-Prensa, Madrid.
- Martinez de Toda F.** 1995. *Mecanización integral del viñedo .* Mundi-Prensa, Madrid. Mundi-Prensa, Madrid.
- Martinez de Toda F, Sancha JC.** 1992. Ocho años de experiencias sobre poda mecánica y poda mínima de la vid en Rioja *Viticulture and Enology. Prof* **19**, 21-28.
- 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, Sugaya S, Gemma H.** 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* **105**, 319-330.
- Morris JR, Cawthon DL.** 1981. Yield and Quality Response of Concord Grapes (*Vitis labrusca* L.) to Mechanized Vine Pruning. *American Journal of Enology and Viticulture* **32**, 280-282.
- Murisier F.** 1985. Maîtrise du rendement et maturité du raisin : essais 1985. *Revue suisse de viticulture, arboriculture, horticulture* **18**, 149-156.
- Ojeda H, Deloire A, Carbonneau A, Ageorges A, Romieu C.** 1999. Berry development of grapevines: relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. *Vitis* **38**, 145-150.
- Ollat N, Gaudillère J.** 2000. Carbon balance in developing grapevine berries. *Acta Horticulturae (International Symposium on Grapevine Physiology)* **526**, 345-350.
- Ollat N, Gaudillere JP.** 1998. The Effect of Limiting Leaf Area During Stage I of Berry Growth on Development and Composition of Berries of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**, 251-258.
- Reynolds AG.** 1988. Response of Okanagan Riesling Vines to Training System and Simulated Mechanical Pruning. *American Journal of Enology and Viticulture* **39**, 205-212.
- Rienth M, Torregrosa L, Sarah G, Ardisson M, Brillouet J-M, Romieu C.** 2016. Temperature desynchronizes sugar and organic acid metabolism in ripening grapevine fruits and remodels their transcriptome. *BMC Plant Biology* **16**, 1-23.
- 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.

**Schultz HR, Weyand K.** 2005. Minimal pruning systems for cool climate grape production – past and future. In Proceedings of the XIV international GESCO Viticulture Congress, Geisenheim, Germany, pp. 10-16. Groupe d'Etude des Systemes de Conduite de la vigne (GESCO), Germany.

**Silva A, Noronha H, Dai Z, Delrot S, Gerós H.** 2017. Low source–sink ratio reduces reserve starch in grapevine woody canes and modulates sugar transport and metabolism at transcriptional and enzyme activity levels. *Planta*, 1-11.

**Tandonnet JP, Samie B, Ollat N.** 1996. Etude des interactions entre trois systèmes de conduite et le mode d'entretien du sol. CR GESCO n°9, 61-68.

**Wessner LF, Kurtural SK.** 2013. Pruning Systems and Canopy Management Practice Interact on the Yield and Fruit Composition of Syrah. *American Journal of Enology and Viticulture* **64**, 134-138.

**Weyand K, Schultz H.** 2006. Regulating yield and wine quality of minimal pruning systems through the application of gibberellic acid. *OENO One* **40**, 151-163.

**Wong DCJ, Lopez Gutierrez R, Dimopoulos N, Gambetta GA, Castellarin SD.** 2016. Combined physiological, transcriptome, and cis-regulatory element analyses indicate that key aspects of ripening, metabolism, and transcriptional program in grapes (*Vitis vinifera* L.) are differentially modulated accordingly to fruit size. *BMC Genomics* **17**, 416.

**Zheng W, del Galdo V, García J, Balda P, Martínez de Toda F.** 2016. Minimal Pruning as a Tool to Delay Fruit Maturity and to Improve Berry Composition under Climate Change. *American Journal of Enology and Viticulture*.

## Conclusion générale et limites :

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont eu pour objectif de mieux comprendre les phénomènes associés au développement et à la maturation de la baie de raisin. Plus précisément, nous avons choisi d'une part de réétudier les liens quantitatifs entre le sucre, le malate, la croissance et la respiration à l'échelle d'une baie unique, et d'autre part d'examiner la stabilité de ses liens sous l'impact des contraintes tel que le système de conduite. Les résultats ont permis de déterminer avec précision les dates d'initiation, et d'arrêt, du déchargement du phloème dans les baies et d'en préciser le flux, relativement invariant dans le temps, mais tout à fait considérable, rapporté au métabolisme primaire de la baie. Ces travaux nous ont permis de déterminer des relations entre flux hydrique et carboné au sein de la baie et d'élaborer un modèle conceptuel simple qui décrit le développement de la baie (Fig. 5. 1).

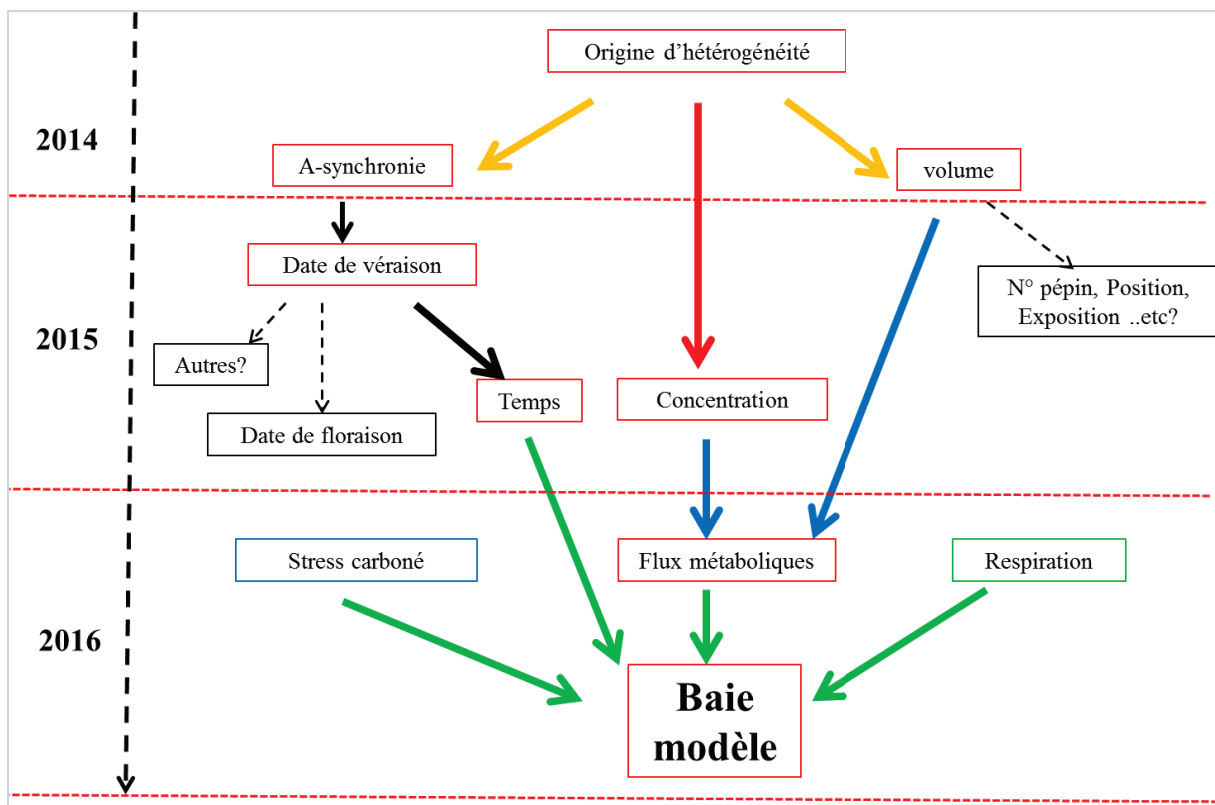


Figure 5. 1. Le déroulement de la thèse vers la baie modèle.

***L'origine de l'hétérogénéité des baies :***

La démarche a été dans un premier temps de mesurer l'hétérogénéité de composition et de volume des baies individuelles au sein de grappes et de population de Pinot Meunier et de (*Vitis vinifera* L.), à différentes dates, suivant une périodicité de prélèvement relativement classique. La date effective du début de mûrissement de chacune d'elle étant inconnue, celles-ci n'ont pu être classées dans le temps, néanmoins l'évolution moyenne de leur volume, a permis de vérifier que celui-ci double, puis diminue, suivant la concentration interne en osmoticums, comme cela a été observé sur grappes et baies dont la croissance a été suivie de façon non destructives. Cependant, l'échantillonnage par grappe, utile pour illustrer l'hétérogénéité des baies en leur sein, a fortement bruité les observations, en raison de la variabilité intrinsèque du poids moyen des baies par grappe, et du faible nombre de grappe analysées à chaque date de prélèvement. La seconde expérimentation a permis de démontrer que l'a-synchronie des baies joue un rôle beaucoup plus important que les écarts de vitesse, pour déterminer la composition d'une baie, à un instant donné.

Les évolutions relevées montrent que l'hétérogénéité des baies aurait deux origines principales, la première est la variabilité du volume nominatif (déterminé à stade équivalent), connu pour être prédéterminé précocement, en liaison avec le nombre de pépins, le nombre des baies par grappes, le nombre des feuilles par grappes, la position des baies sur la grappe, ...etc. De façon inattendue, l'hétérogénéité du poids moyen des baies par grappes s'est avérée tout à fait considérable, et particulièrement modulable par le système de conduite, comme observé en taille minimale. La seconde cause d'hétérogénéité relève de l'a-synchronie du développement des baies, qui s'illustre dès la date de floraison, et qui, à ce titre, pourrait dépendre très fortement des conditions environnementales souvent critiques à cette période de l'année (coups de froids, etc.). Nous n'avons pas testé si le nombre de pépins était corrélé avec les dates de floraison.

Quoiqu'il en soit, la normalisation du volume maximum moyen des baies par grappe a révélé des cinétiques presque identiques pour toutes les grappes testées, avec une durée moyenne  $29 \pm 2$  jours. La vitesse maximum de croissance des grappes est cohérente avec la vitesse observée sur baie individuelle, exactement comme si l'initiation de la seconde phase de croissance s'étalait sur 9 jours au sein d'une grappe, avant que les baies ne croissent

sensiblement à la même vitesse pendant les 10 jours ultérieurs, et ne s'arrêtent les unes après les autres de 20 à 29 jours.

Sur les grappes suivies de façon destructive en parallèle, le maximum de croissance a été observé à 0.8 M de sucres. La plus grande hétérogénéité en concentration au sein des grappes a été observée durant les 10 jours après la véraison, puis l'hétérogénéité a diminué lorsque les grappes ont approché de leur croissance maximale. Dans certains cas, l'évolution de concentration semble relativement bloquée à ce stade, pendant une durée longue.

Les intervalles de prélèvement relativement longs (10 J) ont certainement limité la précision des analyses. De plus, le choix de prélever les échantillons par grappes a induit un biais, puisque le poids moyen des baies varie fortement d'une grappe à l'autre. En conséquence, les poids moyens déterminés sur un petit nombre de grappes ont montré des fluctuations importantes. Ces limites ont été prises en compte dans l'expérience suivante, dans laquelle un cultivar plus hétérogène (Syrah) a été choisi, et les baies ont été échantillonnées au hasard afin de représenter la population totale, les intervalles des prélèvements ont été rapprochés (3-5 J) autour de la véraison. L'eau et les métabolites primaires ont présenté une hétérogénéité plus élevée.

On peut conclure que l'asynchronie des baies au sein de la population est le paramètre principal qui détermine l'hétérogénéité des baies. Celle-ci empêche d'identifier des stades physiologiques précis lorsqu'on échantillonne de façon classique. Pour fixer les idées, le délai entre les baies est du même ordre de grandeur que la durée de la seconde phase de croissance elle-même, mais un peu plus faible. Les cinétiques moyennes d'évolution de la fermeté publiées par Robin et al 1997 indiquent que ce phénomène, réputé ne durer que quelques jours à l'échelle du fruit, peut durer de deux semaines à un mois à l'échelle de la parcelle, suivant les millésimes, ce qui aboutit à une durée apparente de croissance de 30 à 45 jours. McCarthy situe cette fourchette entre 30 et 39 jours en mesurant le poids moyen des baies. Il convient d'ajouter 6 jours supplémentaires pour obtenir la durée au-delà de laquelle la vendange ne gagnera plus rien en sucres ha<sup>-1</sup>. Les variations d'hétérogénéité sont donc susceptibles d'expliquer des décalages de date vendange d'une dizaine de jours, une vendange strictement homogène serait effectuée 10 jours avant. Attendre que toutes les baies aient terminé leur programme de chargement en sucres revient à augmenter le degré avec l'hétérogénéité, puisque les premières baies flétrissent, tandis que l'on attend les dernières. Vouloir vendanger

à degré équivalent une vendange plus hétérogène revient à accepter une baisse de rendement, mais contribuera à relever l'acidité malique. Les fluctuations d'hétérogénéité peuvent donc être à l'origine de variations importantes de la qualité œnologique des moûts et de dates de vendange, sans que le métabolisme du fruit n'ait été modifié le moins du monde.

Bien souvent, l'hétérogénéité du poids des baies est responsable de fluctuations qui rendent assez difficile l'appréciation de la fin du chargement phloémien, ce qui, joint à un échantillonnage hebdomadaire, aboutit à des cinétiques imprécises, tant pour l'évolution pondérale, que pour la quantité totale de sucres accumulés. Cela explique pourquoi les résultats sont le plus souvent exprimés en concentration, une unité totalement inadaptée pour apprécier l'arrêt du déchargement phloémien.

### ***Quelle est l'origine de cette asynchronie ?***

L'origine de l'asynchronie des baies n'est pas très claire. Cependant, une expérience sur la durée de la floraison des baies de Pinot Meunier, Zinfandel et Syrah apporte un premier élément de réponse, puisque la durée moyenne de floraison des baies au sein de la grappe était de 7 à 8 jours, valeur remarquablement proche de l'étalement de la véraison de ces baies (8-10 j), 50 jours plus tard (Fig. 5. 2); Cela suggère que l'asynchronie de la population serait largement déterminée dès la date de floraison de chaque baie. Il convient de repérer les fleurs et marquer la date de floraison et la date de véraison de chaque baie afin de confirmer cette hypothèse. Une difficulté majeure sera alors qu'un nombre considérable de fleurs sont éliminées de la grappe, entre la floraison et la nouaison. Il est cependant connu que certains stress (défoliation intense, stress thermique, etc) peuvent bloquer la véraison des baies tardives, dont le mûrissement n'était pas encore enclenché au moment du stress. Les analogues de l'auxine sont également connus pour retarder la véraison, (Bottcher et al. 2010), ce qui s'accompagne d'une réduction de l'hétérogénéité.

Existe-t-il un lien entre l'asynchronie de la date de la floraison et la vigueur des serments de l'année précédente ou la position des baies sur la grappe ?



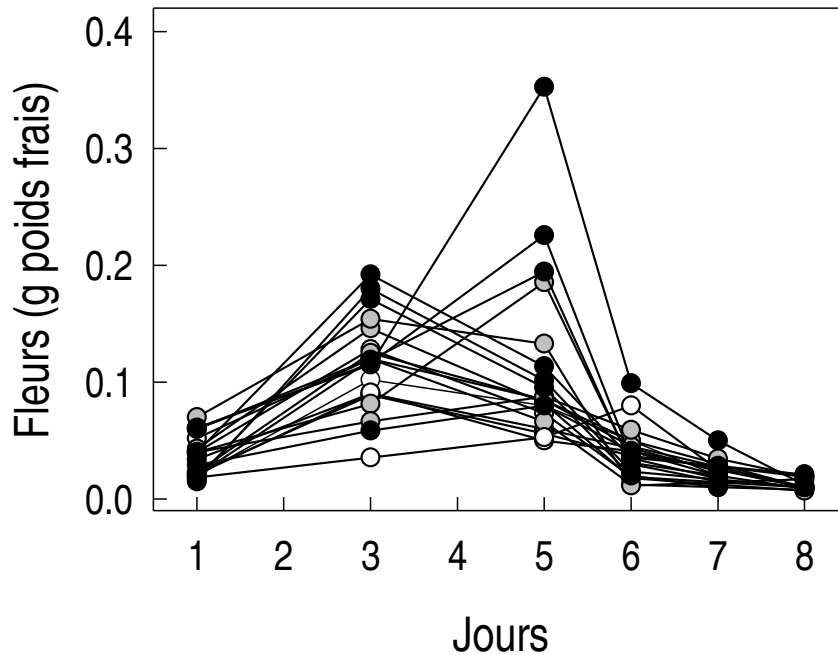


Figure 5.2. Chute des capuchons des grappes de trois cultivars Pinot Meurnier (cercles blancs), Zinfandel (cercles noirs) et Syrah (cercles gris), déterminée par pesée.

#### *Des concentrations vers les flux :*

La mesure destructive des sucres et des acides ne donne accès qu'à la concentration des solutés, hors cette unité est particulièrement complexe sur le plan physiologique, en tant que rapport entre la quantité de solutés finalement accumulés dans la vacuole, et la balance hydrique du fruit, tributaire du cumul des flux xylémiens, phloémiens et de la demande évaporative sur l'ensemble du cycle jusqu'au point de prélèvement, l'ensemble de ces processus étant régulés par des mécanismes très spécifiques. La balance hydrique du fruit est *a priori* susceptible de dépendre fortement de son microenvironnement radiatif. Pourtant, les concentrations montrent des cinétiques remarquablement peu bruités, d'une baie à l'autre, au cours de développement. Le malate diminue lors de l'accumulation des sucres, et des variations de concentrations uniquement provoquées par une dilution variable devraient se traduire par un bruit globalement orthogonal à cette courbe. Les flux ne peuvent être calculés sans référence temporelle précise sur la date de véraison de chaque baie, ni sans connaître quel a été l'incrément de volume depuis cette véraison. L'évolution du volume relatif n'est pas suffisante pour apprécier à quelle date après initiation du mûrissement une baie a été

prélevée, puisque la reprise de croissance ne semble ne pas s'effectuer simultanément avec la perte de fermeté, qui marque l'initiation du chargement en sucres. Un repérage strict des dates de perte de fermeté est donc nécessaire, ce qui présuppose des mesures quasi-journalières, à l'aide d'un pénétromètre adéquat. Les variations intrinsèques du volume absolu d'une baie à l'autre sont trop importantes pour que la simple connaissance du volume à la date de prélèvement ne soit d'une quelconque utilité pour resynchroniser les baies.

Ces travaux ont permis d'élaborer le modèle le plus simple possible en termes de flux métaboliques et d'eau dans la baie, avec un déchargement en sucres à flux constant, et un grandissement initialement décalé, les deux phénomènes cessant simultanément, lorsque le volume a doublé. La combinaison de ces flux explique les variations de concentrations observées, qui sont des variables composites et dont l'évolution est complexe. Ainsi, comme la baie importe à vitesse constante des sucres dans un volume initialement fixe, la concentration croît plus rapidement pendant les six premiers jours, et nécessairement deux fois plus rapidement que lorsque ce même flux se dilue dans des baies deux fois plus grosses, avant l'arrêt du déchargement phloémien. Ceci ne signifie en aucun cas que les dernières baies accélèrent pour rattraper les premières, comme prétendu par Gouthu et al. (2014).

### ***La baie compte les jours ?***

La normalisation des volumes maximums des baies uniques aboutit à des cinétiques de croissance remarquablement reproductibles. Toutes les baies individuelles suivies de façon non destructive ont eu besoin de 20 jours en moyenne pour atteindre le volume maximum en dépit des contraintes environnementales et des différences variétales. C'est également la durée qui est observée lorsque l'on considère l'évolution du poids moyen des baies synchronisées.

Afin d'éliminer l'asynchronie parmi les baies, la date de ramollissement de chaque baie a été marquée. L'évaluation d'analyses de plus de 500 baies de Syrah a montré une relation sucre/malate presque synchronisée tout au long de la maturation. De plus, on a confirmé que toutes les baies ont nécessité en moyenne 26 jours après ramollissement pour atteindre la maturité, définie comme la date d'arrêt du déchargement phloémien.

***Vers un modèle du développement d'une baie :***

La dernière expérience a permis de préciser l'évolution des flux métaboliques au cours de la durée de maturation. Pour cela, on a classé les baies individuelles en fonction de la concentration totale en solutés majeurs (sucres, malate, tartrate) qui détermine la pression osmotique de la baie, à l'origine de l'appel d'eau. Cette méthode de classement a amélioré la résolution des baies pré-vérées et a réduit la variance entre les baies par rapport au classement par le sucre. Cette concentration a été utilisée comme marqueur de l'horloge interne de chaque baie, et la loi de variation établie sur baies de Syrah synchrones a été utilisée pour resynchroniser les baies d'autres cultivars, années et conditions environnementales.

Quels que soient les expérimentations, les résultats montrent que les flux d'eau, de sucres et d'acide malique ne sont pas synchrones et que la baie a besoin de 26 jours pour atteindre le maximum du sucre, 20 jours pour atteindre son volume maximum, et 14 jours pour épuiser son malate.

La maturation d'une baie peut donc être subdivisée en trois sous phase (Fig. 5. 3) : la 1<sup>ère</sup>, dure 6 jours après ramollissement, pendant laquelle la baie commence à accumuler les sucres et dégrader le malate à volume constant. La 2<sup>ème</sup> dure 20 jours, et pendant laquelle la baie accumule simultanément l'eau et les sucres. Le malate est épuisé au milieu de cette sous phase, 14 jours après ramollissement. Le déchargement du phloème cesse à 26 jours, tant pour l'eau, que pour les sucres. La 3<sup>ème</sup> phase ne présente que l'évaporation de l'eau, qui pourrait varier d'une baie à l'autre selon le cultivar, les positions sur la grappe et sur la plante, l'exposition au soleil ...etc.

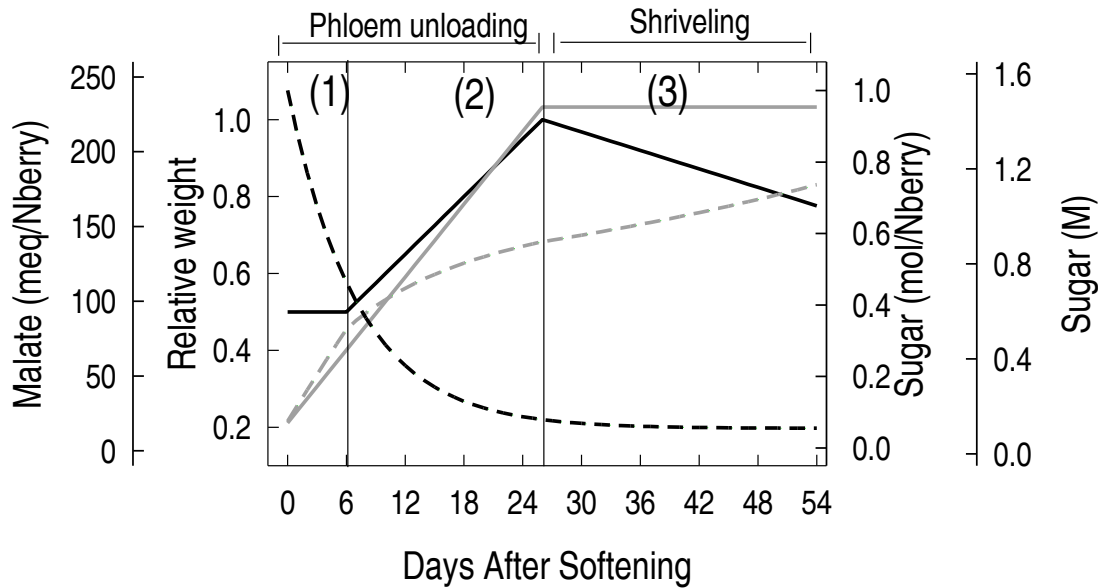


Figure 5.3. Modèle de la maturation d'une baie individuelle. (1), (2) et (3) correspondent aux trois sous-phases détectées pendant la maturation. Quantité de sucre totale (trait gris), concentration en sucres (trait en pointillé gris), croissance (trait noir) et quantité de malate (trait en pointillé noir). DAS : Jours après Ramollissement.

***Effet GxE sur la Stabilité de modèle pendant la maturation (relation sucre/malate ; durée) :***

La taille minimale, qui réduit très fortement le volume nominal des baies, et a décalé la floraison et la véraison de 20 jours, ce qui a bien évidemment modifié les conditions environnementales (longueur des jours, lumière, température) et les conditions trophiques (charge plus importante) durant le développement des baies, a permis de tester la stabilité du modèle. Les résultats ont montré que malgré toutes ces perturbations, la cinétique de développement d'un futur poids unitaire de baies n'est pas sensiblement affectée, ni en croissance, ni en durée, et que le niveau du sucre atteint au point d'arrêt du déchargement phloémien n'est limité que de façon relativement marginale. Cela à dire qu'on peut obtenir le même résultat en juste décalant la floraison d'une vigne normale de 20 jours.

Les données de Friend et al. (2009) supportent ces résultats car les cinétiques de croissance obtenues sur baies uniques montrent des caractéristiques quasi identiques bien que l'expérience ait été réalisée dans un autre endroit, d'autres conditions, et sur plusieurs cultivars, sur des baies minuscules, ou de taille plus importante. De même, nos expérimentations sur micro-vigne, en condition hydrique absolument non limitantes et sous serre, aboutissent à la même durée de croissance, de trois semaines. Ce résultat indique très

probablement que les différentes durées de seconde phase de croissance que l'on peut extraire de la bibliographie seraient davantage liées au synchronisme plus ou moins marqué des populations étudiées, qu'à de réelles modifications des flux d'eau dans chacune d'elles.

Il conviendrait de tester le modèle dans des conditions de contraintes hydriques, thermiques, et trophiques beaucoup plus sévères, mais cela devrait être difficile, car une baie mûrissante devient le puits le plus fort de la plante, à la fois pour l'eau, et pour les sucres. Ainsi Keller et al. (2006) ont démontré que des baies vertes sévèrement flétries sous l'effet d'une forte contrainte hydrique retrouvaient leur turgescence lorsqu'elles décidaient de mûrir. Il serait intéressant de bloquer la croissance des baies, une fois qu'elle a repris, pour tester si c'est la durée de la seconde phase de croissance, ou bien le doublement du volume relatif, qui détermine l'arrêt du déchargement phloémien.

#### ***L'artéfact provoqué par l'asynchronie des baies au sein de la population :***

Le modèle le plus simple, qui décrit le développement des baies, est que la baie compte les jours, que la concentration du saccharose dans le phloème est invariante et proche de celle généralement acceptée chez les plantes (ca 0.5 M). Le déchargement phloémien des sucres et de l'eau cesse simultanément, immédiatement suivi par d'un flétrissement lié à l'excès d'évaporation.

Il suffit donc que les baies individuelles ne mûrissent pas simultanément pour changer toute notre compréhension sur le développement d'une baie lors qu'on l'étudie à partir de la population. C'est-à-dire que, si on prend un certain nombre des baies individuelles, on peut arriver à des cinétiques ressemblant à celles observées sur la population usuelle, simplement en les décalant. L'asynchronie des baies au sein de la population génère des artefacts en créant des comportements de la population qui n'existent pas dans chaque baie, par exemple le chargement final des sucres à volume constant.

#### ***Baie unique & population (Table 5. 1) :***

L'asynchronie des baies vient se cumuler avec la durée de 26 jours de déchargement phloémien au niveau de la population. Les cinétiques de croissance et d'accumulation des

osmotiques majeurs moyens sont totalement perturbées lorsqu'on effectue la moyenne sur une population asynchrone.

La première sous phase de 6 jours d'accumulation des sucres à volume constant n'apparaît plus et la baie moyenne semble accumuler l'eau dès la véraison. La vitesse d'accumulation du sucre pendant cette sous phase paraît plus lente qu'elle ne l'est dans les baies.

La deuxième sous phase apparaît plus compliquée à l'échelle de la population puisqu'elle dure jusqu'à plus de 50 jours et on peut la diviser à deux sous phases. Pendant la première la population accumule le sucre et l'eau simultanément et pendant la deuxième le sucre continue à accumuler lentement avec un volume constant. C'est la conséquence de la coexistence des baies précoces ayant déjà atteint leur maximum du sucre, mais perdant de l'eau et d'autres tardives, continuant à accumuler les sucres et l'eau simultanément. Ce chargement des sucres à volume constant, parfaitement artificiel, suggère inévitablement que l'excès d'eau qui arrive avec les sucres par le phloème doit être éliminé par un flux de retour par le xylème. Il est donc tout à fait possible que la perte d'eau par le xylème en fin de maturation publiée par Keller et al. (2014) n'existe en fait pas au niveau de chaque baie, mais résulte d'un biais statistique sur la population.

Table 5. 1. Phase de la maturation à l'échelle d'une baie individuelle et d'une baie moyenne.

Sous-phase	Baie individuelle	Population
1	Dure 6 jours après ramollissement. Les sucres accumulent et le malate se dégrade à volume constant.	Pas détecté
2	Dure 20 jours. La baie accumule simultanément les sucres et l'eau.	Dure jusqu'à 50 jours. La baie accumule les sucres, dégrade le malate et croît, plus lentement qu'en réalité.
3	Plateau éventuelle ?	Une sous phase supplémentaire peut être suggérée, pendant laquelle la vitesse d'accumulation du sucre semble ralentir mais persiste à volume constant. Cette asynchronie crée le back-flux pendant le plateau du volume.
4	Evaporation de l'eau	Evaporation de l'eau

**Les incertitudes du modèle :***Variabilité des flux ?*

Bien que les baies synchronisées aient montré une pente sucre/malate beaucoup plus homogène que les non-synchronisées, il y demeure une certaine variation qui ne peut pas être négligée. Cette variation peut être due à 1) l'imprécision expérimentale, en particulier, il est assez difficile de déterminer la date de ramollissement de chaque baie individuelle à la journée près, et 2) à des variations de dilution (bilan hydrique ↔ évaporation turgescence).

Les petites baies semblent en effet davantage concentrées en sucre et malate que les grosses (Fig. 5. 4).

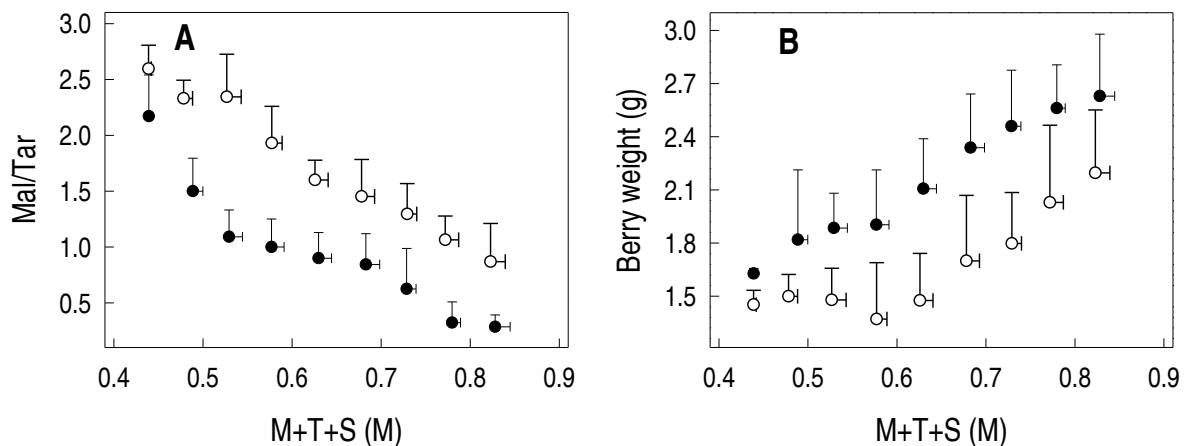


Figure 5. 4. Relation entre l'hétérogénéité en malate/tartrate (A) et l'hétérogénéité en poids (B) des baies du cultivar de Syrah en fonction des solutés majeurs. Les données ont été triées suivant leur concentration en solutés majeurs, et la moyenne a été calculée sur chaque intervalle successif de 0.05 M. Chaque point correspond à la moyenne des classes. Les valeurs moyennes indiquent des différences significatives par classe d'échantillonnage ( $P < 0,05$ ) entre les grandes et petites baies.

*Les baies ne vont pas à la même vitesse ?*

Notre modèle postule que toutes les baies présentent les mêmes cinétiques quel que soient le cultivar et le traitement étudié. Il s'agit bien évidemment d'une simplification puisque les données de Friend et al. (2009) établissent le contraire en ce qui concerne la croissance. Néanmoins, l'impact de ces variations de vitesse est relativement limité, par rapport à l'asynchronie des baies. Il conviendrait d'étudier, par analyse d'image, un grand nombre de baies, de les soumettre à des atmosphères plus ou moins humides, ou de les placer dans des situations de compétition plus ou moins marquées, pour davantage argumenter cette variabilité.

*Limites d'évaporation variable ?*

Notre modèle aboutit à une évaporation constante, à partir du moment où la baie croît et accumule les sucres simultanément. Le flux d'eau correspondant est directement lié aux hypothèses effectuées sur la concentration en sucres dans le phloème. Par contre, les interprétations des expériences confirment que cela n'est pas le cas : Cela peut augmenter l'hétérogénéité parmi les baies. Les données de Friend et al. (2009) montrent que le flétrissement est peut-être pas le même d'une baie à l'autre.

Les baies, n'ayant pas le même taux d'évaporation et n'ayant pas le même flux en retour par le xylème n'ont évidemment pas la même vitesse de chargement de l'eau et des solutés par le phloème, ce qui complique un peu plus notre modèle. Le modèle a donc besoin de tenir compte du bilan hydrique des baies dans des différentes conditions environnementales.

*Plateau ou chute immédiate à volume maximum ?*

Nos données ne permettent pas de distinguer avec certitude deux situations différentes : i) la croissance cesse et la baie se contracte immédiatement (pic à volume maximal) ii) la croissance cesse et le volume reste constant pendant une durée indéterminée (plateau).

L'hétérogénéité du volume nous empêche de trancher entre ces deux possibilités. Cependant, les cinétiques de croissance non destructives obtenues sur baies individuelles et sur grappes que nous avons réalisées, ainsi que celles de la littérature, (Friend et al. 2009 ;



McCarthy 1999) montrent le plus souvent une absence de plateau, ce qui correspond au modèle le plus simple, sur la plan des échanges de sève. L'hypothèse la plus complexe est celle d'un plateau de 6-8 jours. En effet, durant cette période, les sucres ne s'accumulent plus, ou à vitesse très faible, et il faut donc expliquer d'où vient l'eau qui compense l'évaporation. En revanche, les données de Friend et al. (2009) montrent des baies ayant le plateau et d'autres flétrissent directement.

Les résultats indiquant que le plateau n'existe probablement pas à l'échelle de la baie sont :

- a) De même que mes données obtenues sur baie unique montrent des variabilités au niveau de l'évaporation, la moyenne du volume des baies retombe directement.
- b) La quantité de sucres par baie présente un plateau soudain, lorsque la croissance cesse, sans ralentissement progressif.

La transition, si elle existe, sera courte (2-4 jours) ; pendant laquelle le sucre pourrait continuer à s'accumuler à une faible vitesse.

Finalement, cette question reste ouverte et y répondre nécessitera des travaux complémentaires, en mesurant avec plus de précision l'évolution de la fermeté des baies grâce à un pénétromètre et en prenant en compte les contraintes environnementales.

### ***Flux respiratoires :***

Le travail a été orienté dans un premier temps vers la mesure de l'impact de la température sur la respiration des baies homogènes détachées, à différents stades. L'étude d'un nombre suffisant de baies détachées permet de mesurer les QR par piégeage dans une solution de soude avec précision, dans une enceinte totalement close en milieu thermostaté, sans les difficultés expérimentales des mesures sur baies attachées individuelles (miniaturisation des enceintes et piégeage CO<sub>2</sub>, étanchéité jonction pédicelle-enceinte) . C'est le substrat majoritaire au stade étudié qui est respiré, donc le QR est spécifique du malade lorsqu'il est présent, même en stade vert. Ce résultat logique démontre que l'élévation de l'oxydation du malade n'est pas une propriété spécifique des baies murissantes (faute de quoi les baies vertes ne pourraient respirer, en l'absence d'un apport de photoassimilats exogènes) . En revanche la fermentation alcoolique est clairement apparue comme une propriété des stades tardifs, et ne coïncide pas avec les stades d'utilisation maximale du malade, même à haute température. L'énergie d'activation des transferts d'électrons diminue avec le contenu

en malate, ou avec l'augmentation du pH vacuolaire, exactement comme si l'énergie requise pour énergiser le transfert des protons dans la vacuole par la V-ATPase constituait la barrière énergétique de la phosphorylation oxydative. En fait, des énergies d'activation tout à fait comparables peuvent être mesurés sur des organes végétaux beaucoup moins acides. Ces expérimentations mériteraient d'être reconduites sur d'autres types de fruits plus ou moins acides, et d'autres cépages, voire des mutants d'acidité pour vérifier si cette adéquation est circonstancielle ou non.

Quoiqu'il en soit la partie la plus novatrice du travail a été de tester un modèle minimaliste sur le plan génique, de l'activation de la respiration du malate avec l'accélération du chargement des baies en sucre. C'est pourquoi, nous avons réétudié la respiration de la baie lors de l'initiation du mûrissement, sur la plante. Le malate est le substrat respiratoire majeur au tout début du mûrissement, puis les hexoses contribuent majoritairement à la respiration tout au long de la maturation. La respiration diminue rapidement avec la concentration en malate pendant les 14 jours qui suivent le ramollissement et l'induction du stockage massif des sucres. Une limite à l'interprétation est que la respiration des pépins s'ajoute à celle du péricarpe. Il conviendrait donc de reproduire ces expérimentations sur un cépage apyrène, ou de trier des baies en fonction de leur nombre de pépins.

Contrairement à ce qui était attendu, l'interruption de l'import des sucres augmente légèrement la demande respiratoire de la baie. Ce résultat majeur suggère que parmi les différentes organisations possibles de la voie d'import des sucres, c'est la solution la moins énergivore qui a été retenue.

### ***Transporte du sucre/ coût énergétique :***

Des protéines membranaires spécifiques sont nécessaires afin de transporter les sucres depuis le phloème jusqu'aux vacuoles de la pulpe. Quels que soient le stade et le mode de déchargement du phloème, il faut toujours franchir la membrane vacuolaire. Dans le cas du déchargement apoplasmique, qui est induite pendant le mûrissement sans qu'il soit possible de dire exactement quand, viennent s'ajouter au minimum les transporteurs plasmiques autorisant le passage du phloème à l'apoplasme, et ceux autorisant le passage de l'apoplasme aux cellules de la pulpe. Ces transporteurs peuvent impliquer, ou non, un transport de protons, qui doit être contrebalancé par une activité ATPasique, suivant que le transport des sucres

s'effectue par un uniporteur de type SWEET, ou bien un antiporteur ou un symporteur (SUT, TST, ERD6-like,...etc).

Les différentes possibilités concernant la nature des transporteurs, la localisation des invertases, le sens de synthèse ou de dégradation du saccharose dans le cytoplasme, aboutissent à un coût énergétique de l'import d'un hexose dans la baie pourrait se situer entre 0.2 et 2.5 ATP (Fig. 5. 5).

La comparaison des flux d'import de sucres, et de la respiration, suggère que le coût énergétique de l'import des sucres pourrait représenter entre 6 et 75 % des besoins énergétiques du fruit, suivant le chemin suivi pour importer les sucres. Du point de vue strictement thermodynamique, il n'y a aucune nécessité de dépenser cette énergie, car le saccharose véhiculé dans le phloème (0.57 M en moyenne chez les végétaux, Jensen et al. 2013) est quasiment absent du compartiment final (ca 1 M Glu+Fru max). Du point de vue moléculaire, tous les types de transporteurs semblent exprimés, mais le manque de données sur la spécificité tissulaire des gènes exprimés ne permet pas d'affirmer que la totalité du déchargement phloémien passe nécessairement par chacun d'eux. Nous sommes bien incapables de relier un niveau d'expression génique avec l'intensité du flux net par l'enzyme ou le transporteur correspondant.

Tout d'abord, force est de constater que les sucres pénètrent dans la vacuole en stade vert, jusqu'à une concentration de 0.1 à 0.14 M, sans que ce transport ne compromette la formation d'un gradient de protons de l'ordre de 5 unités pH en stade vert, si tant est que sucres et acides soient effectivement accumulés dans les mêmes vacuoles. L'invertase vacuolaire est active à ce stade. Une des limites de nos travaux est que l'invertase n'a pas été inhibée lors du protocole d'extraction, pour des raisons de simplification du protocole sur un nombre d'échantillon considérable. Nous ignorons donc s'il y a dans la vacuole du saccharose à ce stade, mais il est certain que le glucose existe en excès ( $G/F=2$ ). On remarque que la vitesse initiale de disparition du malate correspond au quart de la vitesse d'accumulation des hexoses au début de la maturation, exactement comme si le déchargement des protons (qui accompagnent la sortie du malate) s'effectuait via un antiporteur saccharose/ $H^+$ . Il se trouve que VvHT6 (VIT\_18s0122g00850 ; EST RB004G11) identifié dès les premières expérimentations de microarray comme induit lors du ramollissement des baies (Terrier et al. 2005), est l'orthologue d'AtTMT1/2 qui fonctionnerait comme antiporteur saccharose/ $H^+$  (Schultz et al. 2011). L'échange d'un acide malique contre 2 saccharoses (transformés en 4 hexoses) contribuerait à augmenter la pression osmotique à coût énergétique nul, si la voie apoplasmique n'est pas encore opérationnelle à ce stade. Dans ce contexte, la sortie du malate

vacuolaire alimenterait en énergie le transport d'environ 30 % des sucres finalement accumulés, sans sursaut respiratoire, et ce au tout début du mûrissement.

Concernant la phase, probablement ultérieure, où le déchargement apoplasmique est avéré, l'hydrolyse du saccharose dans les parois est problématique, car le passage par les symporteurs hexose/H<sup>+</sup> sur la membrane plasmique est énergivore. Jusqu'à présent, on a identifié des uniporteurs de type SWEET sur le tonoplaste (Chardon et al. 2013 ; Chong et al. 2014 ; Hedrich et al. 2015) qui permettraient la sortie des sucres de la vacuole, dont on ignore s'ils fonctionnent dans le sens du chargement. Il est possible donc que la baie ne consomme aucune énergie pour importer les sucres jusqu'à la vacuole si les sucres passent toujours par les uni-porteur comme les SWEET.

Notre expérience sur l'effet de suppression de l'import du sucre montre bien que le chargement des sucres dans la baie n'impacte pas directement son métabolisme énergétique. Une augmentation de cout énergétique de 70 % aurait été parfaitement détectable entre baie attachée et détachée, nous pouvons donc conclure que l'import du sucre vers les vacuoles transite finalement par les SWEET.

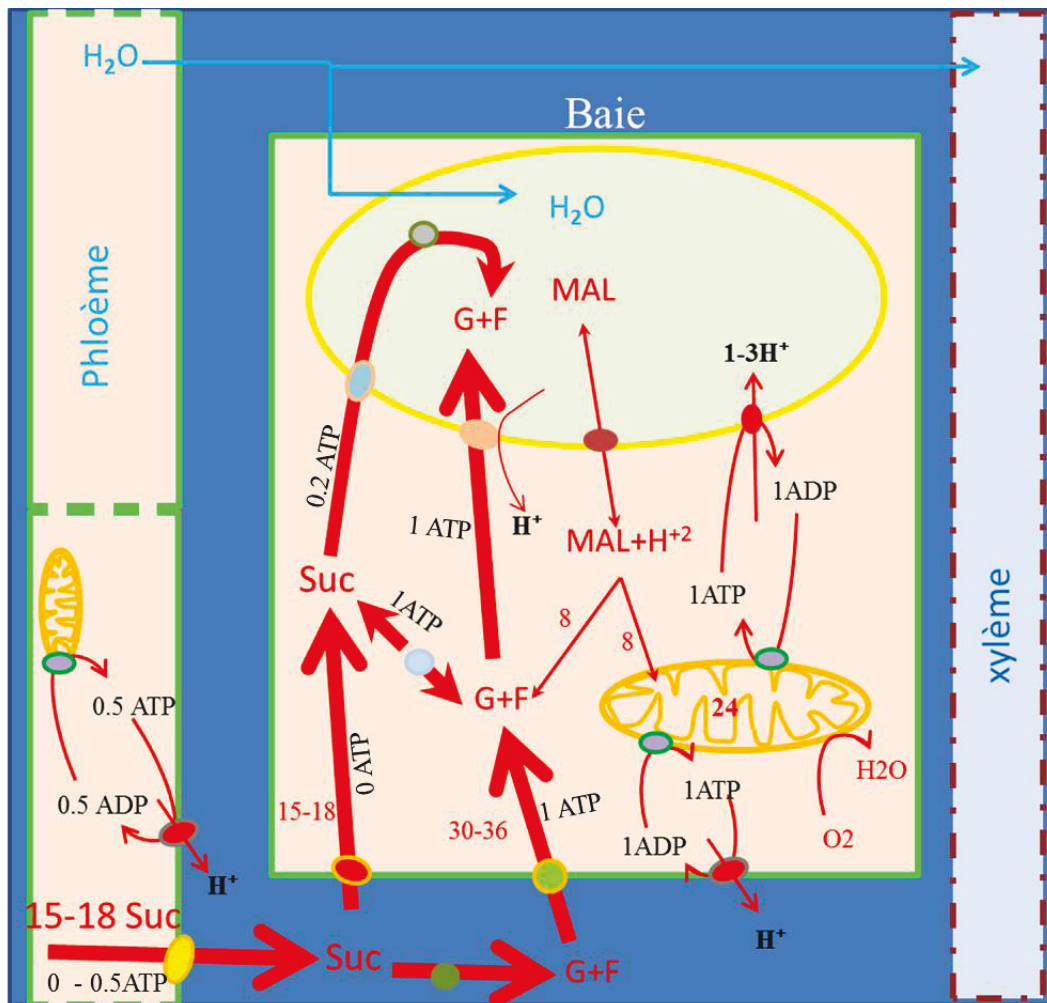


Figure 5. 5. Les voies de transport des sucres possibles pendant la phase de maturation. Les chiffres rouges présentent la vitesse des flux métaboliques en  $\mu\text{mol min}^{-1}$  pour une baie théorique pesant 1 kg à la maturité (17 : vitesse d'importation du saccharose, 36 : vitesse max d'accumulation des hexoses, 8 : vitesse de dégradation du malate (gluconéogénèse ou respiration, 24 : la respiration en O<sub>2</sub>). Les chiffres noirs présentent le nombre d'ATP consommés pour importer les hexoses et pomper les protons par les différentes pompes.

## ***Perspectives :***

Nos travaux ont été focalisés sur l'hétérogénéité et l'évolution des baies uniques pendant la maturation. Il serait également intéressant d'étudier la baie unique depuis la pollinisation jusqu'à la véraison, pour préciser en particulier le flux de synthèse de l'acide malique et des sucres résiduels, en liaison avec la respiration.

Les travaux futurs devraient impliquer des approches plus intégrées concernant l'origine de l'asynchronie dès la floraison, la pollinisation, ou plus avant, la vigueur des sarments de l'année précédente. Une éventuelle modulation de l'hétérogénéité à la véraison même, partiellement documentée par Bottcher et al. (2012) mériterait d'être analysée plus en détail.

La date de véraison n'est pas tout à fait suffisante à expliquer l'hétérogénéité des baies unique au sein de la population, en particulier celle qui apparait dans la relation malate/sucre. De plus, il faudra formaliser des modèles de relation sucres/acides/volume. Le temps imparti pour la durée de la thèse nous a empêché d'avancer dans ce sens. Deux directions semblent envisageables : i) la physiologie et la bioénergétique de la baie ii) l'hétérogénéité en tant que paramètre de la qualité des vendanges

D'autres travaux doivent être effectués afin de préciser les flux relatifs d'eau et d'hexoses à l'échelle de la baie unique, ou au moins sur des baies synchronisées, à la fin de la deuxième phase de la croissance. En particulier l'entrée en flétrissement, le bilan hydrique de la baie, et l'évolution fermentaire sur pieds méritent d'être précisées.

En raison des limites actuelles des technologies, les mesures directes des flux sur une baie unique ne peuvent pas être facilement effectuées. C'est pourquoi il est important de développer, ou d'évaluer, des techniques non-destructives d'analyse des solutés majeurs de la baie unique (moyen infra-rouges, résonance magnétique nucléaire). Jusqu'à présent, ce problème est partiellement résolu à l'échelle du diamètre, de la fermeté et la couleur.

Il serait intéressant d'étudier l'expression génique au cours du développement de la baie unique afin de bien distinguer les différentes sous phases du mûrissement, en poussant la logique de Lund et al. (2008) :

- i) Les 6 jours après le ramollissement pendant lesquelles les sucres s'accumulent à volume constant, en s'échangeant contre du malate, alors que la voie apoplasmique n'est peut-être pas encore opérationnelle.
- ii) La phase simultanée d'accumulation d'eau et des sucres.
- iii) La période d'arrêt du déchargement phloémien.

Il convient en particulier d'envisager quels transporteurs du sucre fonctionnent durant ces différentes sous phase et quels sont les formes préférentielles de transport.

Un chantier considérable s'ouvre concernant la variabilité génétique des flux que nous avons calculés. Les données de ce travail ont déjà permis de reconsidérer les méthodes d'échantillonnage utilisées dans ce sens.

Nos résultats confirment que la taille minimale a influencé les relations sucre/volume/acides. Il serait essentiel de réaliser cette étude à plusieurs modes de conduite, dans plusieurs conditions climatiques, en comparant des géotypes de poids des baies très contrastés, afin de confirmer et d'affiner les résultats obtenus.

Si le développement d'une baie apparaît comme relativement stable en terme de la durée et de flux, se pose la question de l'impact des conditions environnementales sur l'hétérogénéité elle-même.

Enfin, notre étude a été limitée aux flux majeurs d'eau, de sucre et d'acide mais d'autres éléments, comme les cations (potassium), les anthocyanines, les arômes, les acides aminés, et les substances volatiles méritent d'être considérés.

## Références :

- Afoufa-Bastien D, Medici A, Jeuffre J, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Atanassova R, Laloï M (2010) The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and microarray expression profiling. *BMC Plant Biology* **10**, 245-245.
- Adams MA, Rennenberg H, Kruse J. 2016. Different models provide equivalent predictive power for cross-biome response of leaf respiration to temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, E5993-E5995.
- Ageorges A, Issaly N, Picaud S, Delrot S, Romieu C (2000) Identification and functional expression in yeast of a grape berry sucrose carrier§1The accession number for the sequence reported in this paper is AF182445. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 177-185.
- Allen MS, Lacey MJ (1998) Methoxypyrazines of Grapes and Wines. In 'Chemistry of Wine Flavor. Vol. 714. pp. 31-38. (American Chemical Society).
- Alleweldt RKaG (1978) Der Gaswechsel reifender Weinbeeren. *Vitis* **17:30-44. Kliewer.**
- Aluri S, Büttner M (2007) Identification and functional expression of the Arabidopsis thaliana vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 2537-2542.
- Amerine MA, Root GA (1960) Carbohydrate Content of Various Parts of the Grape Cluster. II. *American Journal of Enology and Viticulture* **11**, 137-139.
- Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thévenot P, Delrot S (2003) Sugar-Regulated Expression of a Putative Hexose Transport Gene in Grape. *Plant Physiology* **131**, 326-334.
- Baggiolini M (1952) Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue romande d'Agriculture et d'Arboriculture* **8**, 4-6.
- Barker L, Kuhn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* **12**.
- Barth I, Meyer S, Sauer N (2003) Pmsuc3: Characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*. *The Plant Cell* **15**, 1375-1385.
- Becker T, Knoche M (2011) Water Movement through the Surfaces of the Grape Berry and Its Stem. *American Journal of Enology and Viticulture* **62**, 340-350.



- Bennet-Clark TA (1937) Organic Acids of Plants. *Annual Review of Biochemistry* **6**, 579-594.
- Beriashvili TV, Beriashvili LT (1996) Metabolism of malic and tartaric acids in grape berries. *Biochemistry* **61**, 1316–1321.
- Bertoldi D, Larcher R, Bertamini M, Otto S, Concheri G, Nicolini G (2011) Accumulation and Distribution Pattern of Macro- and Microelements and Trace Elements in *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 7224-7236.
- 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. doi: 10.3389/fpls.2015.00382.
- Böttcher C, Boss PK, Davies C (2012a) Delaying Riesling grape berry ripening with a synthetic auxin affects malic acid metabolism and sugar accumulation, and alters wine sensory characters. *Functional Plant Biology*. **39**, 745-753.
- Bondada BR, Matthews MA, Shackel KA (2005) Functional xylem in the post-veraison grape berry. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2949-2957.
- Boyer JS (1985) Water transport. *Annual Review of Plant Physiology* **36**, 473-516.
- Brune A, Müller M, Taiz L, Gonzalez P, Etxeberria E. 2002. Vacuolar Acidification in Citrus Fruit: Comparison between Acid Lime (*Citrus aurantifolia*) and Sweet Lime (*Citrus limmetioides*) Juice Cells. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**, 171-177.
- Bublitz M, Morth JP, Nissen P. 2011. P-type ATPases at a glance. *Journal of Cell Science* **124**, 2515-2519.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland.
- Büttner M (2007) The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Letters* **581**, 2318-2324.
- Cadot Y, Miñana-Castelló MT, Chevalier M (2006) Anatomical, Histological, and Histochemical Changes in Grape Seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during Fruit Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 9206-9215.
- Carbonell-Bejerano P, Rodríguez V, Hernáiz S, Royo C, Dal Santo S, Pezzotti M, Martínez-Zapater JM (2016) Reducing sampling bias in molecular studies of grapevine fruit

- ripening: transcriptomic assessment of the density sorting method. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* **28**, 109-129.
- Castellarin SD, Gambetta GA, Wada H, Krasnow MN, Cramer GR, Peterlunger E, Shackel KA, Matthews MA (2016) Characterization of major ripening events during softening in grape: turgor, sugar accumulation, abscisic acid metabolism, colour development, and their relationship with growth. *Journal of Experimental Botany* **67**, 709-722.
- Chaïb J, Torregrosa L, Mackenzie D, Corena P, Bouquet A, Thomas MR (2010) The grape microvine – a model system for rapid forward and reverse genetics of grapevines. *The Plant Journal* **62**, 1083–1092.
- Chang G-G, Tong L (2003) Structure and Function of Malic Enzymes, A New Class of Oxidative Decarboxylases. *Biochemistry* **42**, 12721-12733.
- Chardon F, Bedu M, *et al.* (2013) Leaf Fructose Content Is Controlled by the Vacuolar Transporter SWEET17 in Arabidopsis. *Current Biology* **23**, 697-702.
- Chatelet DS, Rost TL, Shackel KA, Matthews MA. 2008a. The peripheral xylem of grapevine (*Vitis vinifera*). 1. Structural integrity in post-veraison berries. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1987-1996.
- Chatelet DS, Rost TL, Matthews MA, Shackel KA (2008b) The peripheral xylem of grapevine (*Vitis vinifera*) berries. 2. Anatomy and development. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1997-2007.
- Chen JY, Liu SL, Siao W, Wang SJ (2010a) Hormone and sugar effects on rice sucrose transporter OsSUT1 expression in germinating embryos. *Acta Physiologiae Plantarum* **32**.
- Chen L-Q (2014) SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist* **201**, 1150-1155.
- Chen L-Q, Hou B-H, *et al.* (2010b) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**, 527-532.
- Chen X-K, Wen SW, Yang Q, Walker MC (2007) Adequacy of prenatal care and neonatal mortality in infants born to mothers with and without antenatal high-risk conditions. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* **47**, 122-127.
- Chervin C, Tira-umphon A, Terrier N, Zouine M, Severac D, Roustan J-P. 2008. Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Plant Physiology* **134**, 534-546.

- Chiou TJ, Bush DR (1996) Molecular cloning, immunochemical localization to the vacuole, and expression in transgenic yeast and tobacco of a putative sugar transporter from sugar beet. *Plant Physiology* **110**, 511-520.
- Cho J-I, Burla B, *et al.* (2010) Expression analysis and functional characterization of the monosaccharide transporters, OsTMTs, involving vacuolar sugar transport in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist* **186**, 657-668.
- Choat B, Gambetta GA, Shackel KA, Matthews MA (2009) Vascular Function in Grape Berries across Development and Its Relevance to Apparent Hydraulic Isolation. *Plant Physiology* **151**, 1677-1687.
- 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.
- Cilindre C, Jégou S, Hovasse A, Schaeffer C, Castro AJ, Clément C, Van Dorselaer A, Jeandet P, Marchal R (2008) Proteomic Approach To Identify Champagne Wine Proteins as Modified by *Botrytis cinerea* Infection. *Journal of Proteome Research* **7**, 1199-1208.
- Clearwater MJ, Luo Z, Ong SEC, Blattmann P, Thorp TG (2012) Vascular functioning and the water balance of ripening kiwifruit (*Actinidia chinensis*) berries. *Journal of Experimental Botany* **63**, 1835-1847.
- Colombié S, Beauvoit B, Nazaret C, Bénard C, Vercambre G, Le Gall S, Biais B, Cabasson C, Maucourt M, Bernillon S, Moing A, Dieuaide-Noubhani M, Mazat J-P, Gibon Y. 2017. Respiration climacteric in tomato fruits elucidated by constraint-based modeling. *New Phytologist* **213**, 1726-1739.
- Conde C, Agasse A, Glissant D, Tavares R, Gerós H, Delrot S (2006) Pathways of Glucose Regulation of Monosaccharide Transport in Grape Cells. *Plant Physiology* **141**, 1563-1577.
- Conde C, da Silva P, Fontes N, Dias ACP, Tavares RM, Sousa MJ, Agasse A, Delrot S, Gerós H (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* **1**, 1-22.
- 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**, 241-250.

- Coombe BG (1976) Development of fleshy fruits. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **27**, 207-228
- Coombe BG (1984) The Inception of Ripening in The Grape Berry. *Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino* **8**, 87-99.
- Coombe BG (1987) Distribution of Solutes within the Developing Grape Berry in Relation to Its Morphology. *American Journal of Enology and Viticulture* **38**, 120-127.
- Coombe BG (1992) Research on development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**, 101-110.
- Coombe B, Bishop G (1980) Development of the grape berry. II. Changes in diameter and deformability during veraison. *Australian Journal of Agricultural Research* **31**, 499-509.
- Coombe BG, Phillips PE (1982) Development of the grape berry. III. Compositional changes during veraison measured by sequential hypodermic sampling. *Proceedings of the UCD Grape and Wine Centennial Symposium*, 132–136.
- Coombe BG, McCarthy MG (2000) Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 131-135.
- Costa JH, De Melo DF, Gouveia Z, Cardoso HG, Peixe A, Arnholdt-Schmitt B. 2009. The alternative oxidase family of *Vitis vinifera* reveals an attractive model to study the importance of genomic design. *Plant Physiology* **137**, 553-565.
- Cramer GR, Ghan R, Schlauch KA, Tillett RL, Heymann H, Ferrarini A, Delledonne M, Zenoni S, Fasoli M, Pezzotti M. 2014. Transcriptomic analysis of the late stages of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) berry ripening reveals significant induction of ethylene signaling and flavor pathways in the skin. *BMC Plant Biology* **14**, 370.
- Cuéllar T, Azeem F, Andrianteranagna M, Pascaud F, Verdeil J-L, Sentenac H, Zimmermann S, Gaillard I. 2013. Potassium transport in developing fleshy fruits: the grapevine inward K<sup>+</sup> channel VvK1.2 is activated by CIPK–CBL complexes and induced in ripening berry flesh cells. *The Plant Journal* **73**, 1006-1018.
- Dai Z, Wu H, *et al.* (2016) Inter-Species Comparative Analysis of Components of Soluble Sugar Concentration in Fleshy Fruits. *Frontiers in Plant Science* **7**, doi: 10.3389/fpls.2016.00649.

- Dai ZW, Vivin P, Barrieu F, Ollat N, Delrot S (2010) Physiological and modeling approaches to understand water and carbon fluxes during grape berry growth and quality development: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **16**, 70-85.
- Dai ZW, Vivin P, Robert T, Milin S, Li SH, Génard M (2009) Model-based analysis of sugar accumulation in response to source/sink ratio and water supply in grape (*Vitis vinifera*) berries. *Functional Plant Biology* **36**, 527-540.
- Davies C, Boss PK, Geros H, Lecourieux F, Delrot S (2012) Source/sink relationships and molecular biology of sugar accumulation in grape berries. In: Geros H Chaves MM Delrot S , eds. The biochemistry of grape berry. Bussum : Bentham Science Publishers, 44–66.
- Davies C, Boss PK, Robinson SP (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.
- Davies C, Wolf T, Robinson SP (1999) Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues. *Plant Science* **147**, 93-100.
- Delrot S, Picaud S, Gaudillère JP (2001) Water Transport and Aquaporins in Grapevine. In 'Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine. (Ed. KA Roubelakis-Angelakis) pp. 241-262. (Springer Netherlands: Dordrecht).
- Diakou P, Svanella L, Raymond P, Gaudillere JP, Moing A (2000) Phosphoenolpyruvate carboxylase during grape berry development: protein level, enzyme activity and regulation. *Australian Journal of Plant Physiology* **27.**, 221-229.
- Dinant S, Lemoine R (2010) The phloem pathway: New issues and old debates. *Comptes Rendus Biologies* **333**, 307-319.
- DraŽeta L, Lang A, Hall AJ, Volz RK, Jameson PE (2004) Causes and Effects of Changes in Xylem Functionality in Apple Fruit. *Annals of Botany* **93**, 275-282.
- Dreier LP, Hunter JJ, Ruffner HP (1998) Invertase activity, grape berry development and cell compartmentation. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 865-872.
- Dreier LP, Stoll GS, Ruffner HP (2000) Berry Ripening and Evapotranspiration in *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture* **51**, 340-346.

- Drincovich MaF, Casati P, Andreo CS (2001) NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Letters* **490**, 1-6.
- Duchêne E, Dumas V, Jaegli N, Merdinoglu D (2014) Genetic variability of descriptors for grapevine berry acidity in Riesling, Gewurztraminer and their progeny. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **20**.
- Eichhorn KW, Lorenz DH (1977) Phänologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **29**, 119-120.
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW (2006) Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* **141**, 196-207.
- Etienne A, Génard M, Bancel D, Benoit S, Bugaud C (2013) A model approach revealed the relationship between banana pulp acidity and composition during growth and post harvest ripening. *Scientia Horticulturae* **162**, 125-134.
- Evert RF (2006) *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Famiani F, Cultrera NGM, Battistelli A, Casulli V, Proietti P, Standardi A, Chen Z-H, Leegood RC, Walker RP (2005) Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its potential role in the catabolism of organic acids in the flesh of soft fruit during ripening. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2959-2969.
- Famiani F, Farinelli D, Frioni T, Palliotti A, Battistelli A, Moscatello S, Walker RP (2016) Malate as substrate for catabolism and gluconeogenesis during ripening in the pericarp of different grape cultivars. *Biologia Plantarum* **60**, 155-162.
- Famiani F, Farinelli D, Palliotti A, Moscatello S, Battistelli A, Walker RP (2014) Is stored malate the quantitatively most important substrate utilised by respiration and ethanolic fermentation in grape berry pericarp during ripening? *Plant Physiology and Biochemistry* **76**, 52-57.
- Famiani F, Walker RP, Técsi L, Chen Z-H, Proietti P, Leegood RC (2000) An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *Journal of Experimental Botany* **51**, 675-683.
- Faraco M, Spelt C, *et al.* (2014) Hyperacidification of vacuoles by the combined action of two different P-ATPases in the tonoplast determines flower color. *Cell Reports* **16**, 32-43.

- Farineau J, Laval-Martin D (1977) Light "versus" Dark Carbon Metabolism in Cherry Tomato Fruits. *II. Relationship Between Malate Metabolism and Photosynthetic Activity* **60**, 877-880.
- Fatland BL, Nikolau BJ, Wurtele ES (2005) Reverse Genetic Characterization of Cytosolic Acetyl-CoA Generation by ATP-Citrate Lyase in Arabidopsis. *The Plant Cell* **17**, 182-203.
- Fernie AR, Martinoia E (2009) Malate. Jack of all trades or master of a few? *Phytochemistry* **70**, 828-832.
- Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S (1999) Cloning and Expression of a Hexose Transporter Gene Expressed during the Ripening of Grape Berry. *Plant Physiology* **120**, 1083-1094.
- Findlay N, Oliver KJ, Nil N, Coombe BG (1987) Solute Accumulation by Grape Pericarp Cells IV. Perfusion of pericarp apoplast via the pedicel and evidence for xylem malfunction in ripening berries. *Journal of Experimental Botany* **38**, 668-679.
- Fishman S, GÉNard M, Huguet J-G (2001) Theoretical Analysis of Systematic Errors Introduced by a Pedicel-Girdling Technique used to Estimate Separately the Xylem and Phloem Flows. *Journal of Theoretical Biology* **213**, 435-446.
- Fontes N, Geros H, Delrot S (2011) Grape Berry Vacuole: A Complex and Heterogeneous Membrane System Specialized in the Accumulation of Solutes. *American Journal of Enology and Viticulture* **62**, 270-278.
- Franke KE, Adams DO (1992) Inhibition of Malic Enzyme From Grape Berries by Sulfhydryl Reagents and Oxalic Acid. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**, 153-158.
- Friedel M, Sorrentino V, Blank M, Schüttler A (2016) Influence of berry diameter and colour on some determinants of wine composition of *Vitis vinifera* L. cv. Riesling. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **22**, 215-225.
- Friend AP, Trought MCT, Creasy GL (2009) The influence of seed weight on the development and growth of berries and live green ovaries in *Vitis vinifera* L. cvs. Pinot Noir and Cabernet Sauvignon. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **15**, 166-174.
- Gambale F, Kolb HA, Cantù AM, Hedrich R (1994) The voltage-dependent H<sup>+</sup>-ATPase of the sugar beet vacuole is reversible. *European Biophysics Journal* **22**, 399-403.

- 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.
- Gatti S, Brey T, Müller W, Heilmayer O, Holst G. 2002. Oxygen microoptodes: a new tool for oxygen measurements in aquatic animal ecology. *Marine Biology* **140**, 1075-1085.
- Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K (2007) Plant proton pumps. *FEBS Letters* **581**, 2204-2214.
- Gholami M, Hayasaka Y, Coombe BG, Jackson JF, Robinson SP, Williams PJ (1995) Biosynthesis of flavour compounds in Muscat Gordo Blanco grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **1**, 19-24.
- Givan CV (1999) Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **74**, 277–309.
- Goodenough PW, Prosser IM, Young K (1985) NADP-linked malic enzyme and malate metabolism in ageing tomato fruit. *Phytochemistry* **24**, 1157-1162.
- Gouthu S, O'Neil ST, Di Y, Ansarolia M, Megraw M, Deluc LG (2014) A comparative study of ripening among berries of the grape cluster reveals an altered transcriptional programme and enhanced ripening rate in delayed berries. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5889-902.
- Gray GR, Maxwell DP, Villarimo AR, McIntosh L (2004) Mitochondria/nuclear signaling of alternative oxidase gene expression occurs through distinct pathways involving organic acids and reactive oxygen species. *Plant Cell Reports* **23**, 497-503.
- Greenspan MD, Schultz HR, Matthews MA (1996) Field evaluation of water transport in grape berries during water deficits. *Physiologia Plantarum* **97**, 55-62.
- Greenspan MD, Shackel KA, Matthews MA (1994) Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits. *Plant, Cell & Environment* **17**, 811-820.
- Greer DH, Rogiers SY (2009) Water Flux of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz Bunches throughout Development and in Relation to Late-Season Weight Loss. *American Journal of Enology and Viticulture* **60**, 155-163.
- Guan L, Wu B, Hilbert G, Li S, Gomès E, Delrot S, Dai Z (2017) Cluster shading modifies amino acids in grape (*Vitis vinifera* L.) berries in a genotype- and tissue-dependent manner. *Food Research International* **98**, 2-9.



- Guillet C, Just D, Bénard N, Destrac-Irvine A, Baldet P, Hernould M, Causse M, Raymond P, Rothan C (2002) A fruit-specific phosphoenolpyruvate carboxylase is related to rapid growth of tomato fruit. *Planta* **214**, 717-726.
- Guo W-J, Nagy R, Chen H-Y, Pfrunder S, Yu Y-C, Santelia D, Frommer WB, Martinoia E (2014) SWEET17, a Facilitative Transporter, Mediates Fructose Transport across the Tonoplast of Arabidopsis Roots and Leaves. *Plant Physiology* **164**, 777-789.
- Hale CR (1962) Synthesis of Organic Acids in the Fruit of the Grape. *Nature* **195**, 917-918.
- Halinska A, Frenkel C (1991) Acetaldehyde Stimulation of Net Gluconeogenic Carbon Movement from Applied Malic Acid in Tomato Fruit Pericarp Tissue. *Plant Physiology* **95**, 954-960.
- Harris JM, E. KP, V. PJ (1971) Grape berry respiration: Effects of metabolic inhibitors. *Vitis* **9**, 291-298.
- Harris JM, Kridemann PE, Possingham JV (1968) Anatomical aspects of grape berry development. *Vitis* **7**, 106-119.
- Haselgrove L, Botting D, van Heeswijk R, HØJ PB, Dry PR, Ford C, Land PGI. 2000. Canopy microclimate and berry composition: The effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L cv. Shiraz grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 141-149.
- 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.
- Hayes MA, Davies C, Dry IB (2007) Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1985-1997.
- Hayes MA, Feechan A, Dry IB (2010) Involvement of Abscisic Acid in the Coordinated Regulation of a Stress-Inducible Hexose Transporter (VvHT5) and a Cell Wall Invertase in Grapevine in Response to Biotrophic Fungal Infection. *Plant Physiology* **153**, 211-221.
- Hedrich R, Becker D, Geiger D, Marten I, Roelfsema MRG (2012) Role of Ion Channels in Plants. In 'Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols. (Ed. Y Okada) pp. 295-322. (Springer Japan: Tokyo).
- Hedrich R, Sauer N, Neuhaus HE (2015) Sugar transport across the plant vacuolar membrane: nature and regulation of carrier proteins. *Current Opinion in Plant Biology* **25**, 63-70.

- Higginson EG, Lloyd NDR, Kravchuk O, Ford CM, Thomas MR (2016) A high-throughput UHPLC MS/MS method for evaluation of tartaric and malic acid concentration in individual grapevine berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **22**, 16-23.
- Holst G, Glud RN, Kühl M, Klimant I. 1997. 3rd European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors A microoptode array for fine-scale measurement of oxygen distribution. *Sensors and Actuators B: Chemical* **38**, 122-129.
- Houel C, Chatbanyong R, *et al.* (2015) Identification of stable QTLs for vegetative and reproductive traits in the microvine (*Vitis vinifera* L.) using the 18 K Infinium chip. *BMC Plant Biology* **15**, 205.
- Houel C, Martin-Magniette ML, *et al.* (2013) Genetic variability of berry size in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research* **19**, 208-220.
- Huang X-M, Huang H-B (2001) Early post-veraison growth in grapes: evidence for a two-step mode of berry enlargement. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **7**, 132-136.
- Huang XM, Huang HB, Wang HC (2005) Cell walls of loosening skin in post-veraison grape berries lose structural polysaccharides and calcium while accumulate structural proteins. *Scientia Horticulturae* **104**, 249–263.
- Huglin P, Schneider C (1998) *Biologie et écologie de la vigne*. Lavoisier Tec Et Doc, Paris, 2e édition., ISBN 9782743002602.
- Irwin S, Wall V, Davenport J. 2007. Measurement of temperature and salinity effects on oxygen consumption of *Artemia franciscana* K., measured using fibre-optic oxygen microsensors. *Hydrobiologia* **575**, 109-115.
- Jaillon O, Aury JM, Noel B (2007) The French-Italian public consortium for grapevine genome characterization: the grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**.
- Jensen KH, Savage JA, Holbrook NM (2013) Optimal concentration for sugar transport in plants. *Journal of The Royal Society Interface* **10**, 20130138–20130138.
- Jeneson JAL, Schmitz JPJ, van den Broek NMA, van Riel NAW, Hilbers PAJ, Nicolay K, Prompers JJ. 2009. Magnitude and control of mitochondrial sensitivity to ADP. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **297**, E774-E784.
- Johannes E, Felle HH (1990) Proton gradient across the tonoplast of *Riccia fluitans* as a result of the joint action of two electroenzymes. *Plant Physiology* **93**, 412-17.

- Jona R, Botta R (1988) FRUIT SET AND EARLY BERRY DEVELOPMENT IN TWO GRAPEVINE CULTIVARS. *Israel Journal of Botany* **37**, 203-216.
- Jung M, Jin S-G, Zhang X, Xiong W, Gogoshin G, Rodin AS, Pfeifer GP (2015) Longitudinal epigenetic and gene expression profiles analyzed by three-component analysis reveal down-regulation of genes involved in protein translation in human aging. *Nucleic Acids Research* **43**, e100-e100.
- Kanellis AK, Roubelakis - Angelakis KA (1993) Grape. In 'Biochemistry of Fruit Ripening. (Eds GB Seymour, JE Taylor and GA Tucker) pp. 189-234. (Springer Netherlands: Dordrecht).
- Keller M, Mills LJ, Olmstead MA (2014) Fruit Ripening Has Little Influence on Grapevine Cold Acclimation. *American Journal of Enology and Viticulture* **65**, 417-423.
- Keller M, Shrestha PM (2014) Solute accumulation differs in the vacuoles and apoplast of ripening grape berries. *Planta* **239**, 633-42.
- Keller M, Smith JP, Bondada BR (2006) Ripening grape berries remain hydraulically connected to the shoot. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2577-2587.
- Keller M, Zhang Y, Shrestha PM, Biondi M, Bondada BR (2015) Sugar demand of ripening grape berries leads to recycling of surplus phloem water via the xylem. *Plant Cell Environ* **38**, 1048-1059.
- Kelly GJ, Latzko E, Walker DA (1976) Regulatory Aspects of Photosynthetic Carbon Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* **27**, 181-205.
- Kennedy JA, Hayasaka Y, Vidal S, Waters EJ, Jones GP (2001) Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5348–5355.
- Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL (2000) Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* **55**, 77-85.
- Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL (2002) Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture* **53**, 268–274.
- Kennedy JA, Saucier C, Glories Y (2006) Grape and wine phenolics: history and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**, 239-248.
- Kettner C, Bertl A, Obermeyer G, Slayman C, Bihler H. 2003. Electrophysiological Analysis of the Yeast V-Type Proton Pump: Variable Coupling Ratio and Proton Shunt. *Biophysical Journal* **85**, 3730-3738.

- Klemens PAW, Patzke K, *et al.* (2013) Overexpression of the Vacuolar Sugar Carrier *AtSWEET16* Modifies Germination, Growth, and Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **163**, 1338-1352.
- Klepek Y-S, Volke M, Konrad KR, Wippel K, Hoth S, Hedrich R, Sauer N (2010) *Arabidopsis thaliana* POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H(+) symporters in pollen and young xylem cells. *Journal of Experimental Botany* **61**, 537-550.
- Kliwer WM (1966) Sugars and Organic Acids of *Vitis vinifera*. *Plant physiology* **41**, 923-31.
- Kortstee AJ, Appeldoorn NJG, Oortwijn MEP, Visser RGF (2007) Differences in regulation of carbohydrate metabolism during early fruit development between domesticated tomato and two wild relatives. *Planta* **226**, 929-939.
- Koch R, Alleweldt G (1978) Der Gaswechsel reifender Weinbeeren. *Vitis* **17**: 30-44.
- Kriedemann P (1968) Observations on Gas Exchange in the Developing Sultana Berry. *Australian Journal of Biological Sciences* **21**, 907-916.
- Kruse J, Adams MA. 2008. Three parameters comprehensively describe the temperature response of respiratory oxygen reduction. *Plant Cell Environ* **31**, 954-967.
- Kruse J, Rennenberg H, Adams MA. 2011. Steps towards a mechanistic understanding of respiratory temperature responses. *New Phytologist* **189**, 659-677.
- Kühn C, Grof CP (2010) Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 288-298.
- Kunz HH, Häusler RE, *et al.* (2010) The role of plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocators in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in starch biosynthesis. *Plant Biology* **12**, 115-128.
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM (1999) The Dual Function of Sugar Carriers: Transport and Sugar Sensing. *The Plant Cell* **11**, 707-726.
- Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB, Patrick JW (2003) Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell & Environment* **26**, 37-56.
- Lang A, Thorpe MR (1989) Xylem, Phloem and Transpiration Flows in a Grape: Application of a Technique for Measuring the Volume of Attached Fruits to High Resolution Using Archimedes' Principle. *Journal of Experimental Botany* **40**, 1069-1078.

- 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, 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.
- Lemoine R (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**, 246-262.
- Lemoine R, Camera SL, *et al.* (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* **4**, 272.
- Li Y, Provenzano S, Bliet M, Spelt C, Appelhagen I, Machado de Faria L, Verweij W, Schubert A, Sagasser M, Seidel T, Weisshaar B, Koes R, Quattrocchio F. 2016. Evolution of tonoplast P-ATPase transporters involved in vacuolar acidification. *New Phytologist* **211**, 1092-1107.
- Lin S-M, Tsai J-Y, Hsiao C-D, Huang Y-T, Chiu C-L, Liu M-H, Tung J-Y, Liu T-H, Pan R-L, Sun Y-J. 2012. Crystal structure of a membrane-embedded H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase. *Nature* **484**, 399-403.
- Lin IW, Sosso D, *et al.* (2014) Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* **508**, 546-549.
- Liu X, Li J, Tian Y, Liao M, Zhang Z (2016) Influence of berry heterogeneity on phenolics and antioxidant activity of grapes and wines: A primary study of the new winegrape cultivar Meili (*Vitis vinifera* L.). *Plos One* **11**, e0151276.
- Lobit P, Genard M, Soing P, Habib R. 2006. Modeling malic acid accumulation in fruits: relationships with organic acids, potassium, and temperature. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1471-1483.
- López-Bucio J, Nieto-Jacobo MaF, Ramírez-Rodríguez V, Herrera-Estrella L (2000) Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science* **160**, 1-13.
- Luchaire N, Rienth M, Romieu C, Nehe A, Chatbanyong R, Houel C, Ageorges A, Gibon Y, Turc O, Muller B, Torregrosa L, Pellegrino A (2017) Microvine, a new model to study growth and developmental patterns in grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture*, doi: 10.5344/ajev.2017.16066.

- Lücker J, Laszczak M, Smith D, Lund ST (2009) Generation of a predicted protein database from EST data and application to iTRAQ analyses in grape (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) berries at ripening initiation. *BMC Genomics* **10**, 50.
- Lund ST, Peng FY, Nayar T, Reid KE, Schlosser J (2008) Gene expression analyses in individual grape (*Vitis vinifera* L.) berries during ripening initiation reveal that pigmentation intensity is a valid indicator of developmental staging within the cluster. *Plant Molecular Biology* **68**, 301-315.
- Lytovchenko A, Sonnewald U, Fernie AR (2007) The complex network of non-cellulosic carbohydrate metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 227-235.
- Manning K, Davies C, Bowen HC, White PJ (2001) Functional Characterization of Two Ripening-related Sucrose Transporters from Grape Berries. *Annals of Botany* **87**, 125-129.
- Martínez-Esteso MJ, Vilella-Antón MT, Pedreño MÁ, Valero ML, Bru-Martínez R (2013) iTRAQ-based protein profiling provides insights into the central metabolism changes driving grape berry development and ripening. *BMC Plant Biology* **13**, 167.
- Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE. 2007. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**, 83-102.
- Matthews M, Shackel K (2005) Growth and water transport in fleshy fruit. In: Holbrook NM, Zwieniecki MA, eds. *Vascular Transport in Plants*. Burlington, California: Academic Press, 189–197. .
- Matthews MA, Cheng G, Weinbaum SA (1987) Changes in water potential and dermal extensibility during grape berry development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **112**, 314-319.
- McCarthy MG (1999) Weight loss from ripening berries of Shiraz grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz). *Australian Journal of Grape and Wine Research* **5**, 10-16.
- McCarthy MG, Coombe BG (1999) Is weight loss in ripening grape berries cv. Shiraz caused by impeded phloem transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research* **5**, 17-21.
- Meier U (2001) Grapevine, Growth stages of mono and dicotyledonous plants. BBCH Monograph. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry. *Berlin Blackwell Wissenschafts-Verlag*, 93-95.
- Metzner R, Schneider HU, Breuer U, Thorpe MR, Schurr U, Schroeder WH (2010) Tracing Cationic Nutrients from Xylem into Stem Tissue of French Bean by Stable Isotope

- Tracers and Cryo-Secondary Ion Mass Spectrometry. *Plant Physiology* **152**, 1030-1043.
- Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N (2004) Wounding Enhances Expression of AtSUC3, a Sucrose Transporter from Arabidopsis Sieve Elements and Sink Tissues. *Plant Physiology* **134**, 684-693.
- Møller JV, Juul B, le Maire M (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1286**, 1-51.
- Monier A. 2012. Rôle des phosphatases acides dans le métabolisme et le stockage des sucres dans la vacuole chez Arabidopsis thaliana : approches in vitro et in silico.
- Müller ML, Jensen M, Taiz L. 1999. The Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase of Lemon Fruits Is Regulated by Variable H<sup>+</sup>/ATP Coupling and Slip. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 10706-10716.
- Murisier F. 1985. Maîtrise du rendement et maturité du raisin : essais 1985. *Revue suisse de viticulture, arboriculture, horticulture* **18**, 149-156.
- Nath S. 2016. The thermodynamic efficiency of ATP synthesis in oxidative phosphorylation. *Biophysical Chemistry* **219**, 69-74.
- Nguyen-Quoc B, Foyer CH (2001) A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* **52**, 881-889.
- Nonis A, Ruperti B, Pierasco A, Canaguier A, Adam-Blondon A-F, Di Gaspero G, Vizzotto G (2008) Neutral invertases in grapevine and comparative analysis with Arabidopsis, poplar and rice. *Planta* **229**, 129.
- O'Leary B, Park J, Plaxton William C (2011) The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochemical Journal* **436**, 15-34.
- Octave S, Amborabé BE, Fleurat-Lessard P, Bergès T, Roblin G (2006a) Modifications of plant cell activities by polypeptides secreted by Eutypa lata, a vineyard fungal pathogen. *Physiologia Plantarum* **128**, 103-115.
- Octave S, Roblin G, Vachaud M, Fleurat-Lessard P (2006b) Polypeptide metabolites secreted by the fungal pathogen Eutypa lata participate in Vitis vinifera cell structure damage observed in Eutypa dieback. *Functional Plant Biology* **33**, 297-307.

- Ojeda H, Deloire A, Carbonneau A, Ageorges A, Romieu C (1999) Berry development of grapevines: relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. *Vitis* **38**, 145-150.
- Ollat N. 1997. Bases physiologiques et anatomiques de la croissance des baies de *Vitis vinifera* cv. Cabernet sauvignon, 1 vol. ( 204 p.).
- Ollat N, Diakou-Verdin P, Carde JP, Barrieu F, Gaudillere JP, Moing A (2002) Grape berry development: a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **36**, 109-131.
- Ollat N, Gaudillère J (2000) Carbon balance in developing grapevine berries. *Acta Horticulturae. (ISHS)* **526**, 345-350.
- Ollat N, Gaudillere JP (1998) The Effect of Limiting Leaf Area During Stage I of Berry Growth on Development and Composition of Berries of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**, 251-258.
- Pagay V, Cheng L. 2010. Variability in Berry Maturation of Concord and Cabernet franc in a Cool Climate. *American Journal of Enology and Viticulture* **61**, 61-67.
- Palliotti A, Cartechini A (2001) Developmental Changes in Gas Exchange Activity in Flowers, Berries, and Tendrils of Field-Grown Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* **52**, 317-323.
- Palmgren MG, Nissen P (2011) P-type ATPases. *Annual Review of Biophysics [Internet]* **40** 243-266.
- Patrick JW (1997) Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. . *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 191-222.
- Pereira GE, Gaudillere JP, Pieri P, Hilbert G, Maucourt M, Deborde C, Moing A, Rolin D (2006) Microclimate Influence on Mineral and Metabolic Profiles of Grape Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 6765-6775.
- Piechulla B, Glick RE, Bahl H, Melis A, Gruissem W (1987) Changes in Photosynthetic Capacity and Photosynthetic Protein Pattern during Tomato Fruit Ripening. *Plant Physiology* **84**, 911-917.
- Ponce-Valadez M, Watkins CB (2008) Fermentation and malate metabolism in response to elevated CO<sub>2</sub> concentrations in two strawberry cultivars. *Physiology Plant* **134**, 121-133.



- Possner D, Kliwer WM (1985) The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* **24**, 229–240.
- Reinders A, Sivitz AB, Starker CG, Gantt JS, Ward JM (2008) Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* **68**, 289.
- Reinders A, Sivitz AB, Ward JM (2012) Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Frontiers in Plant Science* **3**, 3-22.
- Reshef N, Walbaum N, Agam N, Fait A (2017) Sunlight modulates fruit metabolic profile and shapes the spatial pattern of compound accumulation within the grape cluster. *Frontiers in Plant Science* **8**, doi: org/10.3389/fpls.2017.00070.
- Reynier A (2007) Manuel de viticulture. Lavoisier Tec & Doc, 10e édition.
- Ribéreau-Gayon J, Peynaud E (1971) 'Trattato di enologia.' (Edagricole).
- Rienmüller F, Dreyer I, Schönknecht G, Schulz A, Schumacher K, Nagy R, Martinoia E, Marten I, Hedrich R (2012) Luminal and Cytosolic pH Feedback on Proton Pump Activity and ATP Affinity of V-type ATPase from *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 8986-8993.
- Rienth M, Torregrosa L, Ardisson M, Marchi R, Romieu C (2014) Versatile and efficient RNA extraction protocol for grapevine berry tissue, suited for next generation RNA sequencing. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **20**, doi: 10.1111/ajgw.12077.
- Rienth M, Torregrosa L, Sarah G, Ardisson M, Brillouet J-M, Romieu C (2016) Temperature desynchronizes sugar and organic acid metabolism in ripening grapevine fruits and remodels their transcriptome. *BMC Plant Biology* **16**, 1-23.
- Roberts JKM, Lane AN, Clark RA, Nieman RH. 1985. Relationships between the rate of synthesis of ATP and the concentrations of reactants and products of ATP hydrolysis in maize root tips, determined by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **240**, 712-722.
- Robin JP, Abbal P, Salmon JM (1997) Fermeté et maturation du raisin. Définition et évolution de différents paramètres rhéologiques au cours de la maturation. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **31**, 127-138.
- Rogiers SY, Greer DH, Hatfield JM, Orchard BA, Keller M (2006) Solute Transport into Shiraz Berries during Development and Late-Ripening Shrinkage. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**, 73-80.

- Romeyer FM, Macheix JJ, Goiffon JJ, Reminiac CC, Sapis JC (1983) Browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **31**, 346-349.
- Romieu C, Flanzky C. 1988. *Extraction des mitochondries de baies de raisin (Vitis vinifera)*. Paris, France: Elsevier.
- Romieu C, Tesniere C, Than-Ham L, Flanzky C, Robin J-P (1992) An Examination of the Importance of Anaerobiosis and Ethanol in Causing Injury to Grape Mitochondria. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**, 129-133.
- Ruan Y-L, Patrick JW (1995) The cellular pathway of postphloem sugar transport in developing tomato fruit. *Planta* **196**, 434-444.
- Ruffner HP (1982a) Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review – Part B. *Vitis* **21**, 346-358.
- Ruffner HP (1982b) Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review Part A. *Vitis* **21**, 247-259.
- Ruffner HP, Hawker JS (1977) Control of glycolysis in ripening berries of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* **16**, 1171-1175.
- Ruffner HP, Kliwer WM (1975) Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Activity in Grape Berries. *Plant Physiology* **56**, 67-71.
- Ruffner HP, Possner D, Brem S, Rast DM (1984) The physiological role of malic enzyme in grape ripening. *Planta* **160**.
- Saier MH (2000) Families of transmembrane sugar transport proteins. *Molecular Microbiology* **35**, 699- 710.
- Saradhuldhat P, Paull RE (2007) Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development. *Scientia Horticulturae* **112**, 297-303.
- Sarry JE, Sommerer N, Sauvage F, Bergoin A, Rossignol M, Albagnac G, Romieu C (2004) Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *Proteomics* **4**, 201-215.
- Sauer N, Ludwig A, Knoblauch A, Rothe P, Gahrtz M, Klebl F (2004) AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different Arabidopsis ecotypes. *The Plant Journal* **40**, 120-130.

- Schmidt AL, Briskin DP. 1993. Energy Transduction in Tonoplast Vesicles from Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Storage Tissue: H<sup>+</sup>/Substrate Stoichiometries for the H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **301**, 165-173.
- Schneider S, Hulpke S, *et al.* (2012) Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biology* **14**, 325-336.
- Schneider S, Schneidereit A, Udvardi P, Hammes U, Gramann M, Dietrich P, Sauer N (2007) Arabidopsis INOSITOL TRANSPORTER2 Mediates H(+) Symport of Different Inositol Epimers and Derivatives across the Plasma Membrane. *Plant Physiology* **145**, 1395-1407.
- Schulz A, Beyhl D, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, Poschet G (2011) Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *Plant Journal* **68**, 129-136.
- Schulze J, Tesfaye M, Litjens RHMG, Bucciarelli B, Trepp G, Miller S, Samac D, Allan D, Vance CP (2002) Malate plays a central role in plant nutrition. In 'Progress in Plant Nutrition: Plenary Lectures of the XIV International Plant Nutrition Colloquium: Food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research. (Eds WJ Horst, A Bürkert, N Claassen *et al.*) pp. 133-139. (Springer Netherlands: Dordrecht).
- Schulze LM, Britto DT, Li M, Kronzucker HJ (2012) A pharmacological analysis of high-affinity sodium transport in barley (*Hordeum vulgare* L.): a <sup>24</sup>Na<sup>+</sup>/<sup>42</sup>K<sup>+</sup> study. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2479-2489.
- Silva LR, Queiroz M (2016) Bioactive compounds of red grapes from Dão region (Portugal): Evaluation of phenolic and organic profile. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **6**, 315-321.
- Singh SP, Singh Z (2008) Major flavor components in some commercial cultivars of Japanese plum. *Journal Of The American Pomological Society* **62**, 185-190.
- Singleton VL, Ough CS, Nelson KE (1966) Density separations of wine grape berries and ripeness distribution. *American Journal of Enology and Viticulture* **17**, 95-105.
- Soole KL, Dry IB, Wiskich JT (1990) Oxidation of NADH by plant mitochondria: Kinetics and effects of calcium ions. *Physiologia Plantarum* **78**, 205-210.
- Stines AP, Grubb J, Gockowiak H, Henschke PA, HØJ PB, van Heeswijck R (2000) Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian

- vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6**, 150-158.
- Sun R-Z, Cheng G, Li Q, HeY-N, Wang N, Lan Y-B, Li S-Y, Zhu Y-R, Song W-F, Zhang X, Cui X-D, Chen W, Wang J (2017) Light-induced Variation in Phenolic Compounds in Cabernet Sauvignon Grapes (*Vitis vinifera* L.) Involves extensive transcriptome reprogramming of biosynthetic enzymes, transcription factors, and phytohormonal regulators. *Frontiers in Plant Science* **8**, doi.org/10.3389/fpls.2017.00547.
- Sussman MR (1994) Molecular analyses of proteins in the plasma membrane. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **45**, 211-234.
- Swanson CA, El-Shishiny EDH (1958) Translocation of Sugars in the Concord Grape. *Plant Physiology* **33**, 33-37.
- Sweetman C, Deluc LG, Cramer GR, Ford CM, Soole KL (2009) Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry* **70**, 1329-1344.
- Sze H, Li X, Palmgren MG (1999) Energization of Plant Cell Membranes by H<sup>+</sup>Pumping ATPases: Regulation and Biosynthesis. *The Plant Cell* **11**, 677-689.
- Takayanagi T, Yokotsuka K (1997) Relationship between sucrose accumulation and sucrose-metabolizing enzymes in developing grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* **48**, 403-407.
- Taureilles-Saurel C, Romieu CG, Robin J-P, Flanzy C. 1995a. Grape (*Vitis vinifera* L.) Malate Dehydrogenase. I. Intracellular Compartmentation of the Isoforms. *American Journal of Enology and Viticulture* **46**, 22-28.
- Taureilles-Saurel C, Romieu CG, Robin J-P, Flanzy C. 1995b. 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.
- Terrier N, Deguilloux C, Sauvage F-X, Martinoia E, Romieu C. 1998. Proton pumps and anion transport in *Vitis vinifera*: The inorganic pyrophosphatase plays a predominant role in the energization of the tonoplast. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 367-377.
- Terrier N, Glissant GJ, *et al.* (2005) Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* **222**.

- Terrier N, Romieu C. 2001. Grape Berry Acidity. In: Roubelakis-Angelakis KA, ed. *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*. Dordrecht: Springer Netherlands, 35-57.
- Terrier N, Sauvage F-X, Ageorges A, Romieu C (2001) Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. *Planta* **213**, 20-28.
- Terrier N, Sauvage FX, Romieu C (1996) Absence de crise respiratoire, induction de l'activité alcool déshydrogénase et diminution de l'acidité vacuolaire lors de la maturation du raisin. *Oenologie 95*, A. Lonvaud-Funel (Ed.). Tec et Doc Lavoisier, Paris, pp.24-28.
- Tesniere CM, Romieu C, Robin J-P. 1994. Grape *in vivo* Protein Synthesis: Changes in Response to Anaerobiosis. *American Journal of Enology and Viticulture* **45**, 267-272.
- Tesnière C, Verriès C (2000) Molecular cloning and expression of cDNAs encoding alcohol dehydrogenases from *Vitis vinifera* L. during berry development. *Plant Science* **157**, 77-88.
- Tesnière C, Abbal P (2009) Alcohol Dehydrogenase Genes & Proteins In Grapevine. In 'Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology. (Ed. KA Roubelakis-Angelakis) pp. 141-160. (Springer Netherlands: Dordrecht).
- Tiessen A, Hendriks JHM, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farré EM, Geigenberger P (2002) Starch Synthesis in Potato Tubers Is Regulated by Post-Translational Redox Modification of ADP-Glucose Pyrophosphorylase. *A Novel Regulatory Mechanism Linking Starch Synthesis to the Sucrose Supply* **14**, 2191-2213.
- Tilbrook J, Tyerman SD (2008) Cell death in grape berries: varietal differences linked to xylem pressure and berry weight loss. *Functional Plant Biology* **35**, 173-184.
- Tilbrook J, Tyerman SD (2009) Hydraulic connection of grape berries to the vine: varietal differences in water conductance into and out of berries, and potential for backflow. *Functional Plant Biology* **36**, 541-550.
- Thomas TR, Shackel KA, Matthews MA (2008) Mesocarp cell turgor in *Vitis vinifera* L. berries throughout development and its relation to firmness, growth, and the onset of ripening. *Planta* **228**, 1067-1076.
- Torregrosa L. 1998. A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L. *Vitis* **37**, 91-92.
- Turgeon R, Wolf S (2009) Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annual review of plant biology* **60**, 207-221.

- Usenik V, Fabčič J, Štampar F (2008) Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry* **107**, 185-192.
- Van Bel AJE (1990) Xylem-Phloem Exchange Via the Rays: The Undervalued Route of Transport. *Journal of Experimental Botany* **41**, 631-644.
- Van Bel AJE (2003) The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment* **26**, 125-149.
- Vickery HB, Pucher GW (1940) Organic Acids of Plants. *Annual Review of Biochemistry* **9**, 529-544.
- Vignault C, Vachaud M, *et al.* (2005) VvHT1 encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1409-1418.
- Wada H, Shackel KA, Matthews MA (2008) Fruit ripening in *Vitis vinifera*: apoplastic solute accumulation accounts for pre-veraison turgor loss in berries. *Planta* **227**, 1351-61.
- Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Gröner F, Hebbeker U, Flügge U-I (2000) Identification, Purification, and Molecular Cloning of a Putative Plastidic Glucose Translocator. *The Plant Cell* **12**, 787-801.
- Weig A, Franz J, Sauer N, Komor E (1994) Isolation of a Family of cDNA Clones from *Ricinus communis* L. with Close Homology to the Hexose Carriers. *Journal of Plant Physiology* **143**, 178-183.
- Weise A, Barker L, Kuhn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB (2000) A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* **12**, 1345-1355.
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U (2000) Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *The Plant Journal* **21**, 455-467.
- Whiteman S-A, Serazetdinova L, Jones AME, Sanders D, Rathjen J, Peck SC, Maathuis FJM (2008) Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* **8**, 3536-3547.
- Williams JR, Thayyullathil C, Freitag NE (2000) Sequence Variations within PrfA DNA Binding Sites and Effects on *Listeria monocytogenes* Virulence Gene Expression. *Journal of Bacteriology* **182**, 837-841.

- Windt CW, Gerkema E, Van As H (2009) Most Water in the Tomato Truss Is Imported through the Xylem, Not the Phloem: A Nuclear Magnetic Resonance Flow Imaging Study. *Plant Physiology* **151**, 830.
- Wingenter K, Trentmann O, *et al.* (2011) A member of the mitogen-activated protein 3-kinase family is involved in the regulation of plant vacuolar glucose uptake. *The Plant Journal* **68**, 890-900.
- Wong DCJ, Lopez Gutierrez R, Dimopoulos N, Gambetta GA, Castellarin SD (2016) Combined physiological, transcriptome, and cis-regulatory element analyses indicate that key aspects of ripening, metabolism, and transcriptional program in grapes (*Vitis vinifera* L.) are differentially modulated accordingly to fruit size. *BMC Genomics* **17**, 416.
- Wormit A, Trentmann O, Feifer I, Lohr C, Tjaden J, Meyer S, Schmidt U, Martinoia E, Neuhaus HE (2006) Molecular Identification and Physiological Characterization of a Novel Monosaccharide Transporter from Arabidopsis Involved in Vacuolar Sugar Transport. *The Plant Cell* **18**, 3476-3490.
- Wu BH, Quilot-Turion B, Génard M, Kervella J, Li SH (2005) Changes in sugar and organic acid concentrations during fruit maturation in peaches, *P. davidiana* and hybrids as analyzed by principal component analysis. *Scientia Horticulturae* **103**, 429-439.
- Yamada K, Osakabe Y, Mizoi J, Nakashima K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Functional Analysis of an Arabidopsis thaliana Abiotic Stress-inducible Facilitated Diffusion Transporter for Monosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 1138-1146.
- Zabalza A, van Dongen JT, *et al.* (2009) Regulation of Respiration and Fermentation to Control the Plant Internal Oxygen Concentration. *Plant Physiology* **149**, 1087-1098.
- Zai ZW, Ollat N, Gomes E, Decroocq S, Tandonnet JP, 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.
- Zhang J, Arro J, Chen Y, Ming R (2013) Haplotype analysis of sucrose synthase gene family in three *Saccharum* species. *BMC Genomics* **14**, 314.
- Zhang J, Ma H, Feng J, Zeng L, Wang Z, Chen S (2008) Grape berry plasma membrane proteome analysis and its differential expression during ripening. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2979-2990.

- Zhang Q, Hu W, Zhu F, Wang L, Yu Q, Ming R, Zhang J (2016) Structure, phylogeny, allelic haplotypes and expression of sucrose transporter gene families in *Saccharum*. *BMC Genomics* **17**, 88.
- Zhang Q, Moore CS, Soole KL, Wiskich JT (2003) Over-reduction of cultured tobacco cells mediates changes in respiratory activities. *Physiologia Plantarum* **119**, 183-191.
- Zhang XY, Wang XL, Wang XF, Xia GH, Pan QH, Fan RC, Wu FQ, Yu XC, Zhang DP (2006) A shift of Phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiology* **142**, 220-32.
- Zhang Y, Keller M (2017) Discharge of surplus phloem water may be required for normal grape ripening. *Journal of Experimental Botany* **68**, 585-595.
- Zhou Y, Qu H, Dibley KE, Offler CE, Patrick JW (2007) A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators. *The Plant Journal* **49**, 750-764.
- Zouid I, Siret R, Jourjon F, Mehinagic E, Rolle L (2013) Impact of grapes heterogeneity according to sugar level on both physical and mechanical berries properties and their anthocyanins extractability at harvest. *Journal of Texture Studies* **44**, 95-103.